

Y-射线对哺乳动物细胞核 DNA 转录

活性的影响及其机理研究

孙志贤 王怀宾 夏寿莹

(军事医学科学院放射医学研究所)

DNA 是辐射损伤的靶分子。但是,就真核细胞说来,DNA 分子是以同核内蛋白质(组蛋白、非组蛋白)结合成核蛋白复合物存在于细胞核中。因此,重视辐射对整个真核基因组效应的研究,已成为当前国际放射生物学研究的重要课题^[1]。据此,我们观察了辐射对实验大鼠细胞核 DNA 转录活性的影响,从染色质 DNA 模板效率和 DNA 指导的 RNA 聚合酶催化 RNA 合成两个方面探讨了 RNA 合成损伤,尤其是造血组织脾脏 DNA 合成障碍的机理。

材 料 和 方 法

动物: 本院饲养雄性大鼠,重 160—180 克

照射: 钴⁶⁰、Y 线 1000 拉德、剂量率 75.11 伦/分

大鼠肝、脾、胸腺细胞核的分离

自正常与照射大鼠分别取肝、脾、胸腺。除重蔗糖纯化细胞核改用 2.0M 蔗糖、50mM Tris-HCl pH8.0、25mMKCl、1mMMgCl₂、0.1mMdTT、0.1mMPMSF (对甲苯磺酰氟)缓冲液,于 2℃、35,000rpm 超速离心 60 分钟外,其余均与 Widnell & Tata^[2]和 Chauveau^[3]等人方法相同。纯化核最后经光学显微镜检查。

自大鼠脾细胞核分离 RNA 聚合酶

基本参照 Babcock 等人^[4]修改的 Roeder & Rutter^[5]方法操作:纯化核悬于 TSMD 缓冲液(10mM Tris-HCl pH7.9、1.0M 蔗糖、5mMMgCl₂、1mMdTT)中,搅拌下加入 4M 硫酸铵(pH7.9)至终浓度为 0.2M。后于 140W 超声 15 秒×8 次(KuBOTA 200M 型超声仪)、循环冷却温度为 0℃。超声溶出液用 TGMED (50mMTris-HCl pH7.9、25% 甘油、5mMMgCl₂、0.1mMEDTA、0.5mMdTT)等体积稀释,2℃、18,000 rpm 离心 60 分钟。上清加固体硫酸铵至终浓度为 75%,35,000rpm 超速离心 40 分钟后,沉淀溶于小体积 TGMED

(内含 50mM 硫酸铵)缓冲液中。并对同一缓冲液透析 8 小时。次日,35,000 rpm 超速离心 60 分钟,上清即为 RNA 聚合酶。

大鼠脾脏染色质的制备

主要依据 Marshige & Bonner 等人方法^[6]。纯化的脾细胞核同 75 mM NaCl、24 mM EDTA (pH8.0)、0.1 M 蔗糖缓冲液匀浆,2℃ 下、4,500 rpm 离心 15 分钟,沉淀重复离心洗涤一次。再同 20 倍量 10 mM Tris-HCl pH 8.0 温和匀浆;0℃ 下搅拌 60 分钟,16000 rpm 离心 30 分钟。沉淀悬于 1.7 M 蔗糖、10 mM Tris-HCl pH 7.4 缓冲液中,2℃ 下,35,000 rpm 超速离心 20 分钟,将得到的白色染色质溶胶轻度匀浆,悬于 0.1 mM Tris-HCl pH 8.0 缓冲液中,2℃ 下,16000 rpm 离心 30 分钟,得可溶性染色质。

DNA 纯化

按 Kay^[7]方法自染色质抽提高聚 DNA,再以 Marmur^[8]法纯化。

RNA 合成活性测定

反应体系与 Jacob^[9]等人报道相同。终体积为 0.4 毫升,内含有:100mM Tris-HCl pH 7.9、2 mMMnCl₂、5 mM MgCl₂、0.5 mM dTT、3.3 mM NaF、8 mM KCl、ATP、CTP、GTP 各为 0.5mM,UTP 为 0.1mM,³H-UTP 1uci (比活性 15ci/mM);硫酸铵量在离体核 RNA 合成测定时为 200mM;RNA 聚合酶活性检测时为 80mM,DNA 和染色质模板效率测定分别取 100mM 和 120mM。离体核 RNA 合成活性测定:核悬液(0.32M 蔗糖、50mM Tris-HCl pH7.9、25mMKCl、2mM MgCl₂、0.1 mM dTT、0.1 mM PMSF)的 DNA 量相当于 80—100 微克。RNA 聚合酶活力测定:同源性的正常脾 DNA 量为 30 微克,正常与照射脾 RNA 聚合酶用量为 50 微克酶蛋白。模板(DNA 和染色质)效率测定:均以正常脾 RNA 聚合酶(50 微克蛋白量)催化反应,正常与照射脾 DNA 与染色质模板量,分别为 30

微克 DNA 和 50 微克 DNA; 此外, RNA 聚合酶活力测定中, 反应体系含 200 微克/毫升牛血清白蛋白。37℃ 水浴保温 40 分钟之后, 立即置冰浴, 同时加入 3 毫升冷 10% TCA (内含 1% $\text{Na}_4\text{O}_2\text{O}_7$) 停止反应。30 分钟后, 室温下微孔滤膜 (0.45 微米孔径, 上海医工院试制) 过滤酸性不溶物, 依次用 5% TCA 5 毫升洗 3 次, 60% 乙醇 5 毫升洗 2 次, 95% 乙醇 5 毫升洗 1 次。红外灯烘干, 置滤膜于 5 毫升甲苯闪烁液 (每升甲苯 PPO 4 克、POPOP 0.1 克) 中, LKB-1215 型液体闪烁计数器测定。

染色质化学组成分析及紫外光谱扫描

染色质化学组成分析详见 Scpelsberg^[10]方法。

Burton 法^[11]测定 DNA, 本室纯化小牛胸腺 DNA 为标准 DNA。蛋白质按 Shacterle^[12]修改的 Lowry 法进行。牛血清白蛋白 (电泳纯、生物物理所制备) 和组蛋白 (本室制备并纯化) 为标准蛋白。

染色质紫外光谱扫描测定于 Beckman DU 型分光光度计上进行, 扫描波长为 220—340 nm。

结果与讨论

一、大鼠组织 RNA 合成的辐射敏感性

实验首先比较了 1000 拉德 γ 线整体受照射大鼠肝、脾、胸腺于照后 2、6、24 小时 RNA 合成能力的改变。合成反应是在体外条件下利用完整核内源性的 DNA 为模板和内源性 RNA 聚合酶催化完成的。测定结果 (见表 1): 即或在照射早期 2 小时, 当脾细胞未见丢失时已见到 RNA 合成速率降低 36.8%, 照后 24 小时则降低至正常的 51.8%。胸腺于照后 2 小时未见 RNA 合成明显改变, 但在照后 6 小时、24 小时分别降低为正常的 55.4% 和 37.8%。从照后 24 小时胸腺的损伤程度来看, 似乎更重一些。这可以从胸腺淋巴细胞的更新时间比脾脏淋巴细胞的更新时间短、增殖能力快, 因而辐射敏感性强, 符合 Bergonie-Tribondeau 氏定律得到解释。但在照后 2 小时, 胸腺 RNA 合成并未见明显改变, 如何解释? 对此, 国内田牛等人研究认为: 脾、胸腺等组织辐射敏感性的差别不仅要考虑单一细胞群的反应, 而且要注意细胞间、组织间的相互联系与相互影响, 注意从实质与间质细胞及相互影响来分析。他们的实验证

表 1 γ -线 1000 拉德照射大鼠组织 RNA 合成辐射敏感性比较*

组织	照后时间 (小时)	c.p.m./毫克 DNA ($\times 10^3$)	百分数
脾	对照	2.25 $\pm$ 0.166	100.0
	2	1.42 $\pm$ 0.095	63.2
	6	1.26 $\pm$ 0.095	55.8
	24	1.17 $\pm$ 0.120	51.8
胸腺	对照	1.92 $\pm$ 0.011	100.0
	2	2.04 $\pm$ 0.030	105.0
	6	1.07 $\pm$ 0.108	55.4
	24	0.73 $\pm$ 0.054	37.8
肝	对照	5.21 $\pm$ 0.102	100.0
	2	6.67 $\pm$ 0.116	128.1
	6	9.54 $\pm$ 0.183	183.3

* 表中数据为三批实验平均值 $\pm$ 标准误, 每批为 6 只以上大鼠。

明: 照射早期, 胸腺淋巴细胞破坏轻于脾脏。原因是, 辐射早期微循环改变胸腺比脾脏为轻, 胸腺虽有淋巴管, 但淋巴窦远不如脾脏发达, 加之胸腺微血管周围存在有屏障, 即血管周围的间隙, 使得胸腺实质细胞对射线的损伤似乎比脾脏为迟钝。与脾、胸腺相反, 肝脏 RNA 合成表现为辐射抗性。照后 2 小时, RNA 合成即已表现出增高, 这同辐射细胞学方面的研究结果是一致的。此种增高, 据认为是同某些核内蛋白质的合成, 尤其是肝组织中某些特异性的酸性蛋白质合成受到选择性的刺激有关^[13]。

RNA 合成能力的损伤可以从两个方面探求原因: 一是 RNA 合成所依赖的 DNA 模板效率改变, 二是 DNA 指导的 RNA 聚合酶活力变化。但就离体核 RNA 合成测定而言, 由于反应是在内源性 RNA 聚合酶催化下, 利用内源性模板进行的, 因此, 模板效率同 RNA 聚合酶活力的测定结果是一致的。对于进一步探讨辐射对 DNA 转录活性的效应及其机理, 则需要于离体条件下, 研究辐射对 DNA 指导的 RNA 聚合酶活力和染色质 DNA 模板效率的变化。

二、辐射对 DNA 指导的 RNA

聚合酶活力影响

DNA 指导的 RNA 聚合酶是合成 RNA 的催化酶, 是研究真核基因表达的重要探针。为此, 我们利用同源性的正常脾脏 DNA 为模板, 但分别利用由正常和 1000 拉德照射后 6 小时大鼠脾脏分离的 RNA 聚合酶催化 RNA 合成反应。RNA 聚合酶是于低盐浓度下超声, 使 RNA 聚合酶同染色质 DNA 解离, 后经超速离心分离

的可溶性 RNA 聚合酶全酶。以此催化 RNA 合成, 较能全面反映整个 RNA 合成的辐射效应。如表 2 所示, 尽管正常与照射大鼠脾 RNA 聚合酶利用的 DNA 模板在质与量上并无差别, 但是, 受照射大鼠脾脏 RNA 聚合酶所催化的合成反应, 其转录能力明显受到抑制。这种抑制作用或是由于酶蛋白活性水平的降低, 或是由于酶本身受到部分钝化。因此, 深入研究 RNA 聚合酶在转录调控中的作用, 在放射生物学中是十分必要的。

表 2 γ -线 1000 拉德照射后 6 小时大鼠脾 RNA 聚合酶活力 (cpm/毫克蛋白 $\times 10^3$) 及 DNA 染色质模板活性 (cpm/毫克 DNA $\times 10^3$) 比较*

实验组	正常脾	照射脾	抑制 %
RNA 聚合酶活力	2.24 ± 0.107	0.57 ± 0.01	74.6
DNA 模板	3.37 ± 0.044	1.73 ± 0.025	48.6
染色质模板	2.50 ± 0.081	2.07 ± 0.022	17.2

* 表中数据为三批以上测定平均值 $\pm$ 标准误, 每批 6 只大鼠脾。

表 3 正常与受照射大鼠脾染色质 DNA 与蛋白比值*

	DNA	总蛋白	组蛋白	非组蛋白
正常	1.0	1.45 ± 0.04	0.95 ± 0.02	0.43 ± 0.04
照射	1.0	2.53 ± 0.06	1.53 ± 0.03	1.01 ± 0.07

* 三批实验动物测定平均值 $\pm$ 标准误, 每批为六只大鼠脾。

三、辐射对染色质 DNA 模板效率的影响

表 2 可见, 实验对于正常和照射 DNA 和染色质均是同等的给予同源的, 正常的脾脏 RNA 聚合酶催化合成反应。但是, 结果表明: 照射后染色质和 DNA 模板均受到了抑制, 抑制率分别为 17.2% 和 48.6%。受照射染色质模板效率降低较小, 可能与染色质复合物中染色质蛋白对基因表达的调控作用有关。

对正常与受照射大鼠脾染色质的化学组成分析和紫外光谱扫描测定 (见表 3 和图 1) 表明: 照射 DNA 与组蛋白、非组蛋白的比值和紫外吸收光谱均表现出明显的改变。但是, 这些变化主要反映了 DNA 与蛋白质合成方面的代谢障碍。而在上述剂量条件下, 染色质复合物的结构变化, 看来主要还是 DNA 和蛋白质

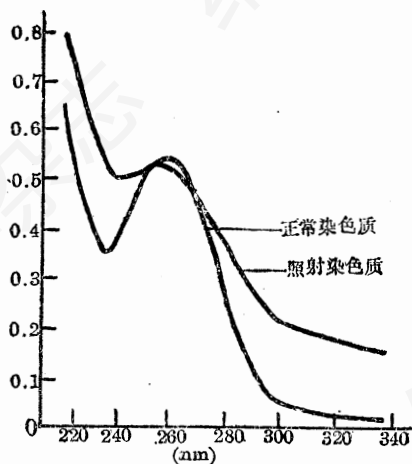


图 1 正常与照射大鼠脾染色质 UV 光谱

正常脾染色质: $220/260 = 1.226$
 $260/280 = 1.650$ $320/260 = 0.052$
 照射脾染色质: $220/260 = 1.528$
 $260/280 = 1.352$ $320/260 = 0.368$

分子之间的部分交联。有关辐射对染色质 DNA 和核内蛋白质,尤其是组蛋白和某些起结构作用的非组蛋白的交联作用,已经引起人们的注意^[1]。

上述实验表明:造血组织—脾脏 RNA 合成对 γ -射线的辐射是敏感的,照后早期即可观察到明显抑制。其抑制机理:一方面是由于 DNA 指导的 RNA 聚合酶受到抑制或钝化,另一方面则是由于 DNA 模板的转录功能受到损伤,导致模板转录活性的降低。因此,辐射对核内 DNA 转录活性的损伤是同 DNA 模板效率和 DNA 指导的 RNA 聚合酶活力改变密切相关。所以,深入地从整个基因组,从基因组 DNA 与非 DNA 成分(组蛋白、非组蛋白、核内 RNA)及细胞内其他因素的相互作用中,研究辐射对真核细胞损伤与修复规律无疑是重要的。

参 考 文 献

[1] 孙志贤, 1980, 国外军事医学资料(放射医学

分册), 3:15—29。

[2] Widnell, C. C. and Tata, J. R. 1964. *Biochem. J.* 313—317.

[3] Chauveau, J. et al. 1956. *Exp. cell. Res.* 11: 317—321.

[4] Babcock, D. F. et al. 1973. *Biochem. J.* 133: 797—804.

[5] Roeder, R. G. and Rutter, W. J. 1970. *Proc. Natl. Acad. sci. USA*, 65: 675—682.

[6] Marushige, K. and Bonner, J. 1966. *J. Mol. Biol.* 15: 160—174.

[7] Kay, E. R. M. et al. 1952. *Amer. chem. Soc.* 74: 1724—1726.

[8] Marmur, J. 1961. *J. Mol. Biol.* 3: 208—218

[9] Jacob, S. T. et al. 1975. *J. Biochemistry*, 14: 3589—3597

[10] Spelsberg, T. C. et al. 1971. *Biochem. Biophys. Acta*, 228: 202—211.

[11] Burton, K. 1956. *Biochem. J.* 62: 315—323.

[12] Schacterle, G. R. 1973. *Anal. Biochem.* 51: 654—657.

[13] Subba, Rao M. N. 1971. *FEBS. lett.* 48: 161—169.

叶片细胞的膜束缚 ATP 酶活性的测定

陈季楚 傅婉华

(中国科学院上海植物生理研究所)

目前已在不同植物的一些器官及组织中发现细胞膜上存在离子激活的 ATP 酶活性。研究得较多的有根——涉及的植物如燕麦、大麦及玉米等; 胚轴——如大豆、蚕豆、笋瓜等; 此外尚有叶片表皮、子叶、芽鞘及种子等不同组织。这些工作均以植物组织为材料来直接分离膜分部。不少作者认为, 这种束缚于细胞膜上能为离子激活的 ATP 酶与离子吸收、气孔关闭及激素诱导的生长等生理过程有关。叶片为具有重要生理功能的器官, 但有关束缚于叶肉细胞质膜上 ATP 酶的特性及作用的研究不及根的。有关研究深入, 而且以叶片原生质体为材料来分离质膜分部进行 ATP 酶的研究尚未见报道。考

虑到原生质体可能成为分离质膜的理想材料, 我们以单子叶植物元麦及双子叶植物蚕豆幼叶的叶肉原生质体为材料, 测定分析与膜系相连的 ATP 酶的活性, 作为以后进一步探讨叶片中束缚于膜上 ATP 酶的特性及功能的基楚。

材 料 和 方 法

植物材料 元麦(*Hordeum vulgare* var *nudum*) 品种 114, 取在室温中水培 5—6 天幼苗的第一叶。蚕豆(*Vicia faba* L.) 上海栽培品种, 用十月下旬播种后 2—4 个月的植株, 取由上至下第二节上舒展的幼叶供试验用。

元麦及蚕豆叶肉原生质体的制备 以酶解脱壁法制备原生质体。用于元麦的酶液为 0.7% 纤维素酶, 以