

小鼠胸腺淋巴细胞 DNA 聚合酶活性及溴乙啶的抑制研究

韩复生 王爱民 高文珍 刘培楠

(北京市肿瘤防治研究所)

胸腺中含有大量的淋巴细胞。这些细胞的活化与成熟是机体免疫功能发挥作用的主要条件。其中淋巴细胞的 DNA 合成和染色质复制是关键问题。我们用小鼠胸腺淋巴做材料分离测定 DNA 聚合酶 α , 并用溴乙啶做探针, 观察它对 DNA 聚合酶 α 活性的作用及其机制。

材料和方法

一、材料

小白鼠 (LACA), 雄, 体重约 15g。 [^3H] 胸腺嘧啶核苷三磷酸 ([^3H]-TTP, 比活性 37 Ci/mmol, 中国医学科学院放射医学所提供)。四种脱氧核苷三磷酸 (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (sigma)。腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) (中国科学院生物物理所提供)。磷酸肌酸 (上海试剂二分厂产)。二巯基苏糖醇 (Sigma)。溴乙啶 (EB) (BDH)。磷酸氢二钾, 磷酸二氢钾和氯化镁 (北京化工厂产)。DE81 纸片 (Whatman)。

二、方法

1. 肌酸磷酸激酶的制备 取新鲜兔骨骼肌按 Kuby 氏法^[3]制备和测活。比活为 53 单位/毫克蛋白。

2. 活化小牛胸腺 DNA 的制备 小牛胸腺 DNA 是本室以 SDS 法粗提, 以氯仿法纯化的^[4]。脱氧核糖核酸酶 I 是包头医学院产品。DNA 活化方法按 Korberg 氏法^[5]制备。

3. 小鼠胸腺淋巴细胞 DNA 聚合酶的提取 根据 DNA 聚合酶 α 在水溶液中容易从细胞核中释放出来的特点, 取小白鼠 LACA 的胸腺用 0.9% NaCl 洗净, 再用较松的玻璃匀浆器轻研三次, 使淋巴细胞分散; 匀浆液经尼龙网过

滤。细胞悬浮液在 3000r.p.m. 下离心 10 分钟。将沉在管底的细胞悬浮在冷重蒸水中。一只胸腺的细胞需用 1ml 重蒸水。强烈摇动使细胞在低渗下胀裂, 成为粘稠状液。然后加入磷酸钾缓冲液 (pH7.5) 到 5mM, 补加 MgCl_2 至 2mM。最后在 4℃ 下 15,000r.p.m. 离心 15 分钟, 取上清液作为酶液备用。

4. DNA 聚合酶活性的测定 按 Kaftory 氏法^[6], 所用条件和反应混合液组成除改用 50mM 磷酸钾缓冲液 (pH7.3) 外, 余均不变。反应混合物的组份如下: 1mM 二巯基苏糖醇, 5mM MgCl_2 , 10mM 磷酸肌酸, 10 μg 肌酸磷酸激酶, 0.25mM ATP, 0.1mM dGTP, 0.1mM dCTP, 0.1mM dATP, 20 μg 活化小牛胸腺 DNA, 甘油最终浓度为 30%, 1 μCi [^3H]-TTP (95cpm/pmol), 再加入一定量的 DNA 聚合酶溶液。总反应液体积为 100 μl 。在 37℃ 下保温至需要的时间, 取反应液 20 μl , 点在 DE81 纸片上 (直径 20mm), 吹干。浸泡在 4% 磷酸钾溶液中, 轻轻摇动, 放置冰浴中 10 分钟, 倾去洗涤液, 再用 4% 的磷酸钾液洗 3 次, 每次间隔 5 分钟。最后用 95% 乙醇洗 2 次, 用乙醚洗一次, 吹干, 放在甲苯系统闪烁液中在 FJ353 液体闪烁计数器中计数。

结 果

一、DE81 纸片法比 TCA 沉淀法优越

1. 按“方法”中所述进行小鼠胸腺淋巴细胞中 DNA 聚合酶活性的测定。从每一反应试管中抽取两个样品 (各 20 μl), 分别点在 DE81 纸片上和 Whatman 3MM 纸片上。DE81 纸片按方法中所述处理。Whatman 3MM 纸片放在冷

10%三氯乙酸(TCA)中,轻轻摇动,放置10分钟,再以5%TCA洗3次,每次5分钟,然后用9.5%乙醇洗2次,乙醚洗1次。干燥后在甲苯系统闪烁液中读取放射性计数。由图1可见,同一样品,同时取样,在DE81纸片上所得计数较TCA沉淀法约高40%。

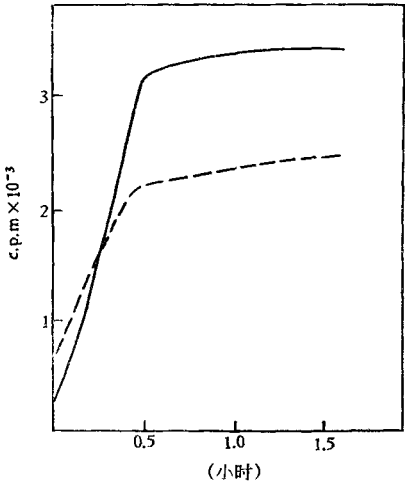


图1 DE81 纸片法和 TCA 沉淀法比较
——:DE81 纸片法,:TCA 沉淀法

2. 取相同面积 (20mm ϕ) 的 DE81 和 Whatman 3MM 纸片,不点样品,分别投入各自洗涤液中,处理如上述。DE81 纸片的计数在 30c. p. m. 左右,与仪器本底计数相近,而 Whatman 3MM 的计数则在 200c. p. m. 左右。

3. 此外,我们用 4%K₂HPO₄ 洗涤纸片,在 0℃下,第一次洗 10 分钟,再洗三次每次 5 分钟,能将未反应的 [³H] 胸腺核苷三磷酸洗净。如果第一次洗 20 分钟,以后三次各 10 分钟,用 2%K₂HPO₄ 就能洗净未反应的 [³H] 胸腺核苷三磷酸。而文献一般报道使用 5%K₂HPO₄^[7],我们认为还是太浓,还会有少量的新合成的寡核苷酸被洗掉。

二、胸腺淋巴细胞 DNA 聚合酶活性的分布和鉴定

1. 以上提取的 DNA 聚合酶溶液(上清部分)的活性占全部酶活性的 80% 以上,沉淀部分的活性则不及 20%,可见上述方法可以将大部分 DNA 聚合酶抽提到水溶液中。

2. 将此酶液与 N-乙基马来酸亚胺(NEM)(最终浓度为 5mM)在 0℃ 放置 30 分钟,再测定 DNA 聚合酶活性,发现酶的活性全部丧失。证明此酶液所含是 DNA 聚合酶 α , 而不是 DNA 聚合酶 β , 因为 5mM NEM 不能抑制 β 酶的活性^[8]。

3. 在 50mM 磷酸缓冲液中测得 α 酶的最适 pH 为 7.3。这也是 α 酶与 β 酶和 γ 酶的区别之一^[8]。

4. 在反应液中减去 ATP 恢复体系,或不加活化的 DNA 模板,都未测出 DNA 聚合酶活性。但加入大量 ATP 恢复体系时,胸腺淋巴细胞中末端脱氧核苷酰转移酶活性受到强烈的抑制^[9],也证明溶液内所含是 DNA 聚合酶 α 。

5. 在反应液中用 1 μ Ci [³H]-胸腺嘧啶核苷代替 [³H]-TTP,没有显示胸腺嘧啶核苷的合并(见图 2),表明此酶溶液不含有使胸腺嘧啶核苷变为 TTP 的激酶活性。

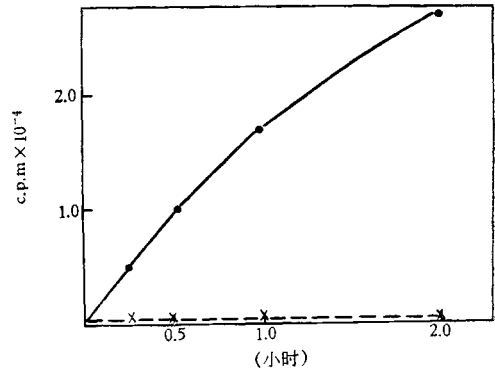


图2 [³H]-TdR 和 [³H]-TTP 的利用
---X---[³H]-TdR, 1 μ Ci/100 μ l
——•——[³H]-TTP 1 μ Ci/100 μ l

三、溴乙啶的抑制作用

我们在 100 μ l 的反应液中加入 10 μ g 溴乙啶时,酶液中 DNA 聚合酶 α 的活性几乎完全被抑制。溴乙啶浓度为 1.8 μ g/100 μ l 时,50% 的 α 酶活性被抑制(图 3)。在每 100 μ l 反应液中加入 2 μ g 溴乙啶,用不同浓度的活化小牛胸腺 DNA,测定 DNA 聚合酶 α 活性,另一系列的反应液不加溴乙啶做为对照。由 DNA 聚合

酶 α 反应速度的倒数和 DNA 浓度的倒数作图 (Lineweaver-Burk 作图)(图 4)。此图显示溴乙啶与 DNA 模板引物之间对酶起竞争性抑制作用。说明溴乙啶通过与 DNA 模板结合达到抑制 DNA 聚合酶 α 的作用。这与大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 所得的结果相符合^[2]。

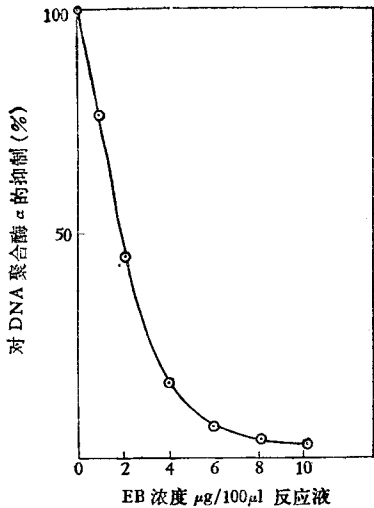


图 3 不同浓度 EB 对 DNA 聚合酶 α 的抑制

我们用 RF-502 荧光分光光度计测定了天然 DNA、变性 DNA 和活化 DNA 的激发光谱(图 5)。从光谱的相对荧光强度看,相同浓度的各种 DNA 的相对荧光强度各不相同。天然 DNA 的相对荧光强度最高,说明它的双螺旋程

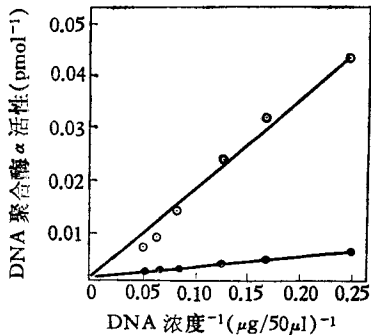


图 4 在不同浓度 DNA 中加 EB(1μg/50μl) 观察它对 DNA 聚合酶的抑制作用
· — · : 对照(不加 EB)

度最高,变性 DNA 次之,活化 DNA 最低。其中变性 DNA 是加热 100℃ 5 分钟,突然冷却到 0℃ 得到的。用这三种 DNA 作为模板引物

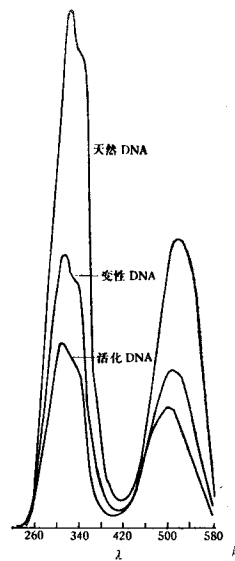


图 5 不同 DNA 对溴乙啶嵌入后的激发荧光光谱
2μg/ml EB 4μg/ml DNA λ_{EM} :600nm
 λ_{EX} :200—580nm SLIT:6nm

分别测定了 DNA 聚合酶的活力。同时作了溴乙啶抑制试验与之比较。结果如图 6,说明活化 DNA 比天然 DNA 和变性 DNA 表现出更强的 DNA 聚合酶活力,而且溴乙啶对活化 DNA 为模板时的 DNA 聚合酶活性的抑制小于其它二者。

讨 论

我们用 DE81 纸片法收集新合成的 DNA

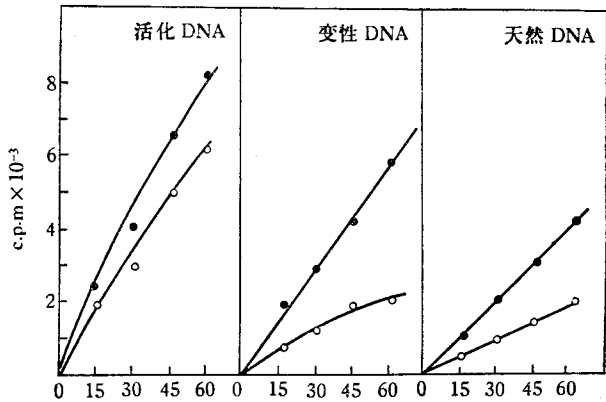


图 6 不同 DNA 模板对 DNA 聚合酶 α 的影响及溴乙啶的抑制作用

○ — ○ 10μl 酶 + 1r 溴乙啶 / 100μl 反应液
● — ● 10μl 酶

片段(代表 DNA 聚合酶 α 的活性),它的放射

活性计数远比用三氯乙酸沉淀并用 Whatman 3MM 滤纸片者为高。这是由于 DE81 阴离子交换纸吸附的新合成的 DNA 片段较完全,避免了10%三氯乙酸沉淀不完全的缺点。Wang^[9]和 Coleman^[7]在测定其他酶活性时,都已指出酸沉淀不完全和应用 DE81 纸片法的优越性。

此外,我们还比较了 0.45 μ l 微孔滤膜收集酸沉淀的效果与 DE81 吸附新合成 DNA 能力。实验采用部分纯化的小牛胸腺 DNA 聚合酶 α ,用 10% 冷三氯乙酸沉淀反应液,0 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟,加在微孔滤膜上,抽滤,再用 5% 三氯乙酸洗涤三次,在 60 $^{\circ}$ C 烘干,在同样的闪烁液中计数。同样酶量,同样反应条件,同样反应时间,不同方法后处理。微孔滤膜的计数为 22,846c. p. m., 而 DE81 纸片为 38,245c. p. m.。尽管一般认为微孔滤膜对 3 H 的计数效率高于 DE81 纸片。此结果表明酸沉淀法使新合成的 DNA 片段丢失很多。

再则,DE81 纸片可用测定较大的样品,处理简单,价格低廉。

2. 在 DNA 生物合成的抑制物中,有多种化合物是与 DNA 分子起嵌合作用,如溴乙啶能嵌入 DNA 双螺旋上下碱基对之间^[12]。

本实验比较了活化的小牛胸腺 DNA,变性的和天然的同一 DNA 为模板时淋巴细胞 DNA 聚合酶 α 的作用,以及溴乙啶对这些反应的抑制作用。以活化 DNA 为模板时, DNA 聚合酶 α 活性,亦即 DNA 合成,依反应时间增长而增高;以变性 DNA 为模板时, DNA 的合成较低;以天然 DNA 为模板时, DNA 合成更低。说明在活化 DNA 链上有较多的切口,便于 DNA 聚合酶的作用。变性 DNA 的双链

松开,对 DNA 聚合酶 α 作用是有利的,但在这些链上的切口不可能比活化 DNA 的多。在天然 DNA 中单链少,切口亦少。关于溴乙啶的抑制作用,变性 DNA 与天然 DNA 的情况相似,然而在活化 DNA 中由于 DNA 切口多和切断的 DNA 片段亦较多,溴乙啶的嵌入相对地减少,所以 DNA 聚合酶 α 的活性显著增高。至于在环状 DNA 的情况下,开放的双链和溴乙啶的结合较未开放者为多,似与线形 DNA (如小牛胸腺 DNA) 与溴乙啶结合者亦有所不同。这个问题尚待进一步探讨。

活化 DNA,变性 DNA 和天然 DNA 的荧光激发光谱图也说明在天然 DNA 链中氢键配对程度高,活化 DNA 的氢键配对程度低,因此,溴乙啶嵌入程度最高的为天然 DNA,活化 DNA 最低。这个结果和溴乙啶对这三种 DNA 的作用是相符合的。

参 考 文 献

- [1] Weissbach, A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **193**, 336, 1979.
- [2] Aktipis, S. et al.: *FEBS Letter*, **49**, 149, 1979.
- [3] Kuby, S. A. et al.: *Methods in Enzymology*, **II**, 605, 1955.
- [4] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, **3**, 208, 1961.
- [5] Kornberg, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 519, 1962.
- [6] Kafory, A. et al.: *Nucleic Acid Res.*, **5**, 2679, 1978.
- [7] Coleman, M. S.: *Nucleic Acid Res.*, **4**, 4305, 1977.
- [8] Falaschi, A., Spadar, S.: *DNA Synthesis present and future*, p. 487, 1979.
- [9] Mertalsmann, R.: *Leukemia*, **2**, 57, 1978.
- [10] Wang, T. S. F. et al.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 7040, 1975.
- [11] Fujisawa, T. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **475**, 611, 1977.
- [12] Kornberg, A.: *DNA Synthesis*, p. 20, 1974.

[本文于1982年4月16日收到]

科技消息

视觉系统对物体的识别与“老祖母细胞”

有人根据视觉系统内较低级水平上有一些“特征”检测细胞只对物体的某一简单特征起反应的事实推测:这类特征检测器的输出在较高级水平上可能会聚到某些细胞上而成为复杂特征检测器。如此逐级“提

高”,最终就可能由若干细胞形成物体检测器,它只对某一物体的存在起反应。这种只能检测特定物体的细胞有人戏称之为“老祖母细胞”。

最近,美国普林斯顿大学心理系的 C. Bruce, R.

(下转第 29 页)