

明显的两条沉淀线。

4. 从 C_3 -PAGE 与 ^{125}I 放射活性图谱。(图 3) 可看出, C_3 与 ^{125}I -天花粉凝集素无结合。

5. 从红细胞膜的 SDS-PAGE 与 ^{125}I 放射活性图谱(图 4)。可看出, 在区带 3 与 4 的部位有两个明显的放射峰。

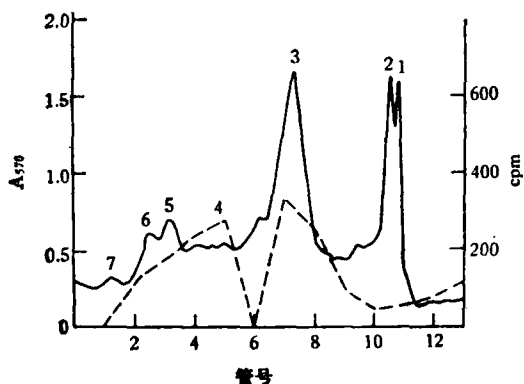


图 4 红细胞膜的 SDS-PAGE 与 ^{125}I 放射活性图谱

——红细胞膜 SDS-PAGE 扫描
-- ^{125}I 的放射性

三、讨 论

以上结果初步表明, 被激活的补体与红细胞作用产生溶血, 其溶血可能与半乳糖基有关。当用天花粉凝集素封闭半乳糖后, 正常及人工补体敏感红细胞溶血度都有所降低。天花粉凝集素可降低补体溶血作用, 其作用机制可能有二: (1)凝集素可能封闭 C_3 的半乳糖基, 使其

不能与红细胞膜的 C_3 受体结合。从本文的 C_3 与酶标记的天花粉凝集素的琼脂糖双扩散实验与 C_3 -PAGE 与 ^{125}I 放射活性图谱看, 天花粉凝集素未与 C_3 结合, 所以降低溶血不是由于 C_3 的半乳糖基被封闭的结果。(2) 天花粉凝集素作用于红细胞膜, 影响 C_3 与 C_3 受体的结合, 本实验中, 从正常红细胞膜与酶标天花粉凝集素的琼脂糖双扩散图谱与红细胞膜的 SDS-PAGE 与 ^{125}I 放射活性图谱看, 天花粉凝集素主要结合于红细胞膜蛋白的区带 3 及 4 部位, 据 Mechessi 电泳图谱分析, 区带 3、4 分子量分别为 88,000 及 78,000 道尔顿的糖蛋白。Fearn^[5] 曾报道, 红细胞膜 C_3 受体是糖蛋白, 分子量为 205,000, 区带 3 及 4 部位不是 C_3 受体部位。所以天花粉凝集素降低补体溶血, 可能是由于结合膜上区带 3 及 4 的半乳糖后, 使膜上糖蛋白结构发生变化, 从而改变了 C_3 受体本身的构型; 也可能 C_3 受体周围糖蛋白的变化, 影响 C_3 受体与 C_3 的结合, 致使溶血度降低。 C_3 受体的结构是否确有变化, 还有待进一步阐明。

参 考 文 献

- [1] Mussel H. H. et al: *Immunology letters*, 4,1,1982.
- [2] 王世中:《免疫化学技术》141 页, 1980.
- [3] 潘华珍等:《中华血液学杂志》2 期 114 页, 1981.
- [4] 潘华珍等: 待发表.
- [5] Fearn D. T. *J Exp. Med.*, 152, 20, 1980.

[本文于 1983 年 5 月 20 日收到]

DNA 聚合酶 β 在分离细胞核中的激活*

施 产 甫

(南京铁道医学院科研所)

DNA 聚合酶 α 的活性与细胞增殖的速率及细胞周期的变化有良好的平行关系^[1]。并且当 DNA 聚合酶 β 的特异抑制剂 ddTTP 存在时, 复制样 DNA 合成的所有步骤并不受影响^[2]。DNA 聚合酶 β 并不参与 DNA 复制过程中任何重要的步骤, 但可能与 DNA 的修复或 DNA

重组有关。DNA 聚合酶 β 的一个特点是无论在快速增生或是静止的组织细胞中, 它的活性均很低^[1]。由下文可以看到, 在分离的艾氏腹水

* 本文是作者在西德海德堡市西德全国肿瘤研究中心肿瘤及细胞生物所所作博士论文的第一部分。

癌细胞核中(0℃贮存一段时间后),通过内源的引物/模板活性的检测,DNA聚合酶 β 的活性可升高数倍。可见,在新鲜分离的细胞核中含有大量“静止”的DNA聚合酶 β ,它们随着有效的引物/模板的产生而被激活。

一、方 法

1. 细胞株和试剂 用艾氏腹水癌细胞 HD₃₄^[3] 无菌接种于小鼠腹腔, 5×10^4 细胞/小鼠。七天后收集细胞。DNA 的放射预标记在收集细胞前 24 小时进行,腹腔注射 ^3H -胸腺嘧啶核苷 100 μCi /小鼠 (54 Ci/mMole Amersham/Braunschweig)。实验所用的 Hepes, NEM(N-乙基顺丁烯二酰亚胺) 来自 Serva/Heidelberg, 商品液体闪烁液 Rotiszint 购自 Carl Roth KG/Karlsruhe, ddTTP 购自 Boehringer/Mannheim。

2. 细胞核的分离 细胞核的制备按 Hershey 法进行^[4]。细胞收集后,用 SSC 缓冲液(150 mM , NaCl, 15 mM 柠檬酸钠 pH7.0)洗涤两次,然后悬浮于 TEM 缓冲液(10 mM Tris, 1 mM EDTA, 4 mM MgCl_2 , pH7.8)中,冰浴十分钟。经低渗处理的细胞用 Dounce 匀浆器手法匀浆 15 次。细胞匀浆离心后用 TEM 缓冲液洗涤两遍。最后将细胞核悬浮于 TEM + 2 mM 巯基乙醇缓冲液中,并调整浓度至 10^8 细胞核/毫升。

3. 分析条件 两倍体积的细胞核悬液(新鲜制备或于 0℃ 贮存一定时间)中加入一体积的分析混合液,总量为 300 或 600 微升。分析混合液中各成分的终浓度为 100 mM NaCl, 9.3 mM MgCl_2 , 4 mM ATP, 33 mM HEPES, pH 7.65 以及 dCTP, dATP, dGTP 各 100 μM , ^3H -dTTP 0.33 μM (83.2 Ci/mMole , 某些实验还加入 DNA 聚合酶的特异抑制剂 ddTTP 或 NEM。核悬浮液首先与分析混合液各组分(四种脱氧核苷三磷酸盐除外)充分混和。在 0℃ 5 分钟及 37℃ 2 分钟平衡。当加入各种三磷酸脱氧核苷后, DNA 合成反应开始,在 37℃ 恒温培养箱中的摇床上进行。每到一定的时间,立即用吸管吸出 50 微升反应液滴到 Whatman 3MM 滤纸片上,随加 100 微升冰冷的 10% 三氯乙

酸。滤纸片用 5% 的三氯乙酸及乙醇洗涤,干燥后,放入 10 毫升商品液闪液 Rotiszint 中,用液闪计数器测定冷酸不溶性沉淀物的放射性。

4. 碱性蔗糖梯度 一体积(通常为 0.5 毫升)新鲜制备的或于 0℃ 放置一定时间的、放射预标记的细胞核,悬浮于 TEM 缓冲液中,加入一体积的溶解液(0.5% SDS, 40 mM EDTA, 300 mM NaHCO_3 pH8.0),随后加入一体积 1 N 的 NaOH (终浓度为 0.33 N)。于室温中放置一小时后,置于 5—20% 蔗糖梯度之上。蔗糖液中含有 0.3 N NaOH, 2 mM EDTA, 0.7 M NaCl。使用 SW 27 转子,离心条件为 20,000 转/分,13 小时,5℃。梯度分部,放射性计数及 S 沉降值的计算按 Werner 法^[5]进行。

二、实验结果

新鲜制备的艾氏腹水癌细胞的细胞核,可

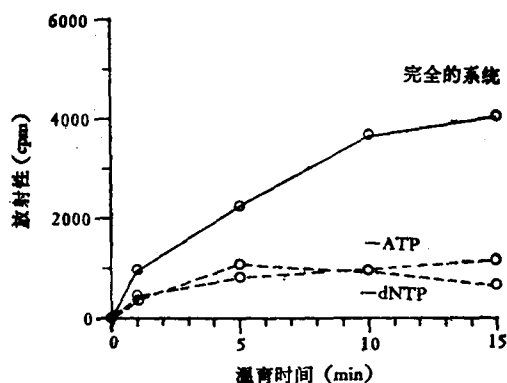


图1 新鲜制备的细胞核中的 DNA 合成
完全的系统是指在四种脱氧核苷三磷酸盐(dNTPs)和 ATP 存在条件下的 DNA 合成

以继续复制样 DNA 合成^[4]。DNA 合成依赖于四种脱氧核苷三磷酸及高浓度 ATP (图1)。若将分离的细胞核保存于 0℃, 简单的悬浮于 TEM 缓冲液中,其 DNA 合成能力可保持 10 天以上,十分稳定。并且随着贮存时间的增加,其 ^3H -dTTP 的掺入率还不断增加(图 2)。由此推测,该细胞核内所含核酸酶及蛋白酶很低。依据这一特点,作者设计了以下实验,使用 DNA 合成酶的特异抑制剂分析体外核系统中 DNA 合成有关酶活性的变化动态。DNA 合成酶 α

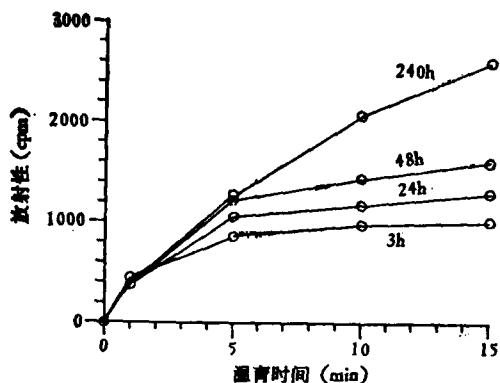


图2 分离的细胞核贮存于0°C不同时间后的DNA合成 (h——小时)
(在完全的系统中检测)

的特异抑制剂 ddTTP 能有效的抑制 DNA 合成酶 β 和 γ , 但 DNA 合成酶 α 对它有很大的抗性^[2]; 1mM 的 NEM 几乎能完全抑制 DNA 合成酶 α , 但 10mM 的 NEM 却不影响 DNA 合成酶 β 的活性^[6]。图 3 A 显示, 在新鲜制备的细胞核中, 几乎仅 DNA 合成酶 α 有活性。这证实了 Lynch 等^[7]提出的假说, 即在制备过程中, 只有正处在 DNA 合成期即 S 期的细胞核才具有在体外继续合成 DNA 的能力。换言之, 新鲜的细胞核制品, 其 DNA 合成乃是在原来已起动的复制叉上的延伸, 本质是 DNA 复制。

细胞核于 0°C 贮存一段时间, 其 ³H-dTTP 的掺入能力显著增加。加入 DNA 合成酶抑制剂的试验说明, DNA 合成酶 α 的活性已极大地下降, 而 DNA 合成酶 β 的活性则大幅度上升 (图 3B)。当细胞核贮存 5 天后, 两种 DNA 聚合酶的活性几乎相当; 贮存 10 天时, 两种 DNA 聚合酶的活性比率与新鲜核中相比刚好相反。

DNA 聚合酶 α 活性相对下降, 一种可能是此酶被某些灭活过程如内源的蛋白酶消化。如果是这样, 则 DNA 聚合酶 β 亦应如此; 很难设想 DNA 聚合酶 β 能选择性地不受蛋白酶攻击。DNA 聚合酶 α 活性下降的另一种原因是 DNA 引物/模板对 DNA 聚合酶 α 的选择有效性变化。与其比较, DNA 聚合酶 β 活性升高只能是 DNA 聚合酶 β 分子被激活引起的。这

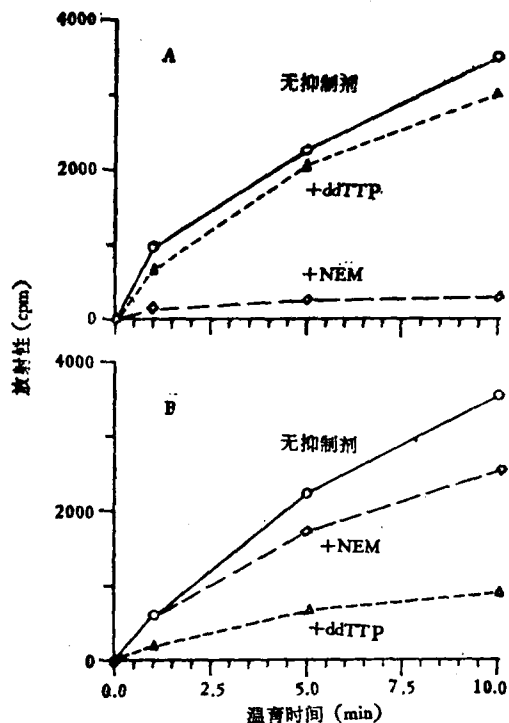


图3 新鲜分离的细胞核(A)和0°C贮存了10天的细胞核(B)的DNA合成

实验在完全的系统中进行, 分别加入了 DNA 聚合酶 α 的特异抑制剂 NEM (5mM) 和 DNA 聚合酶 β 的特异抑制剂 ddTTP (50 μ M), 以无抑制剂存在作为对照。注意图 3 B 中在抑制剂 ddTTP 和 NEM 存在时的 DNA 合成的比例与图 3 A 中的情况刚好相反

种激活可能是 DNA 引物/模板从无活性向有活性的转化, 或者是由于其他的激活机制(见后文)。因细胞核贮存所引起的 DNA 模板活性变化可用碱性蔗糖梯度离心加以证实。从新鲜分离核中释放出的单链 DNA 的沉降系数大于

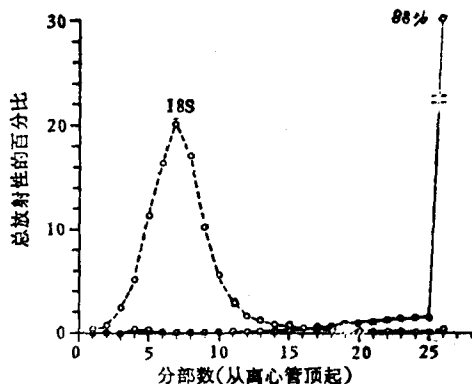


图4 从细胞核释放出的单链 DNA 的碱性蔗糖梯度分析

○——○ 新鲜制备的细胞核
○---○ 0°C 贮存 10 天的细胞核

100S, 而从贮存于 0℃ 10 天的细胞核中释出的单链 DNA 就短得多, 其峰值为 18S (图 4)。图 4 是预期的细胞核在贮存过程中 DNA 上缺口或裂隙不断增加, 它们与 DNA 聚合酶 β 活性的激活相平行。

三、讨 论

DNA 聚合酶 α 的活性与复制活性密切相关, 说明此酶主要与 DNA 复制有关^[1]。DNA 聚合酶 β 与复制活性之间无相关性。有人曾证明用某些因素诱导 DNA 修复合成, 可使静止细胞中 DNA 聚合酶 β 活性上升。例如, 缺乏 DNA 聚合酶 α 的大鼠神经细胞核用紫外线照射后可导致 DNA 聚合酶 β 活性升高 7—10 倍^[8]。是否会有少量的 DNA 复制, 这个可能性并未完全排除^[8], 至少可以说, DNA 聚合酶 β 主要与 DNA 修复有关。因此当细胞核于 0℃ 贮存期间, DNA 聚合酶 β 活性升高 8 倍——它与单链 DNA 长度的变短相平行, 这很可能是内源性核酸酶解过程促进了 DNA 修复作用。已知 DNA 聚合酶 β 选择性地延长裂隙 DNA 的 3'-OH 末端^[1], 可以得出结论, 在细胞核的贮存过程中 DNA 的裂隙形成是激发 DNA 聚合酶 β 活性的唯一原因。虽然裂隙 DNA 均为 DNA 聚合酶 α 和 β 所喜好的引物/模板, 令人惊异的是, 只有 DNA 聚合酶 β 为核酸酶解所激发。由此推测, 除了 3'-OH 末端的产生之外, 尚有其他更特异的机制促进 DNA

聚合酶 β 活性升高。促进 DNA 聚合酶 β 活性的结合蛋白质^[9,10], 很可能参与这种作用。

最后需提出, 当分离的细胞核用低盐缓冲液、高盐缓冲液 (2M NaCl) 以及含非离子洗涤剂缓冲液洗后, 仍有大部分的 DNA 聚合酶 β 的活性保留在核基质中, (待发表的资料)。可见, 用细胞核提取物为材料分析 DNA 聚合酶 β 活性的系统中, 低估了 DNA 聚合酶的正常水平。

参 考 文 献

- [1] Kornberg, A.: *DNA Replication*. p. 206, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1980.
- [2] Waqar, M. A. et al.: *Nucl. Acids Res.*, **5**, 1933, 1978.
- [3] Granzow, Kopun, M. et al.: *An experimental model for studies on secondary invasion in vitro* (ed. E. Grundmann) Vol. 4, p. 43, G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1980.
- [4] Hershey, H. V.: *Biochim. Biophys. Acta*, **479**, 246, 1977.
- [5] Werner, D. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **608**, 243, 1980.
- [6] Dube, D. K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **561**, 369, 1979.
- [7] Lynch, W. E. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **287**, 28, 1972.
- [8] Hübscher, U. et al.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **43**, 625, 1978.
- [9] Duguet, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 1660, 1978.
- [10] Blue, W. T. et al.: *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 603, 1978.

[本文于 1983 年 3 月 25 日收到]

丁酸钠等对小鼠腹水型肝癌全组蛋白电泳图谱 及 DNA 含量的影响

张绍斌 宋兰芳 常金珍

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

Pieler 等^[1] 用丁酸钠等诱导药物作用于小鼠神经母细胞瘤细胞系, 发现在抑制细胞分裂, 诱导形态分化和一系列生化变化的同时, 出现

组蛋白 H1⁰ 的积累。一般认为, 组蛋白 H1⁰ 是在分化程度高, DNA 合成不旺盛的组织中才含有的一种赖氨酸丰富的组蛋白, 它在细胞分