

大鼠小肠粘膜上皮细胞体外转录系统

杨文学 易禄康

(第三军医大学生化教研室, 重庆)

提 要

作者用改良的 Bronstein 法分离纯化大鼠小肠粘膜上皮细胞核, 建立了粘膜上皮细胞核、染色质和 RNA 聚合酶体外转录系统, 并对它们的转录活性和某些因素的影响进行了一些比较研究。实验结果提示肝素可提高细胞核、染色质的转录活性, 抑制分离的可溶性 RNA 聚合酶活性。鹅膏蕈碱可抑制核和染色质转录活性。精胺在低浓度 ($<10\text{mmol/L}$) 对 RNA 聚合酶有加强作用, 而高浓度有抑制作用, 表明上述系统适用于转录调控的研究。

研究基因转录的辐射损伤, 对于阐明转录的调控机理和放射病、遗传病的发病机理具有重要意义。关于电离辐射对小肠粘膜细胞基因转录的影响尚未见报道。我们建立的小肠粘膜上皮细胞核、染色质和 RNA 聚合酶体外转录系统, 为进一步研究辐射对小肠粘膜上皮细胞基因转录的影响, 或其他因素对转录调控的机理, 将提供一条有用的途径。

材 料 和 方 法

1. 材料

动物: 健康雄性大白鼠, 杂种, 体重 150—200 克。

试剂: ^3H -UTP ($15\text{Ci}/\text{mmol}$), 中国科学院上海原子能研究所。 α -鹅膏蕈碱 (α -amanitin), 西德 Boehringer 公司。ATP、CTP、GTP 和苯甲磺酰氟 (PMSF) 为上海东风生化试剂厂出品。全部实验用玻璃器皿和缓冲液均经灭菌处理。

2. 方法

(1) 小肠粘膜上皮细胞核的制备 实验大鼠饥饿 24 小时, 断头处死。取十二指肠以下全段小肠, 用冷生理盐水除去内容物。将小肠翻

转, 玻片刮取肠粘膜。加三倍体积 0.32mol/L 蔗糖缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl, $\text{pH}7.0$, 25mmol/L KCl, 5mmol/L MgCl_2 , 0.5mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 0.1mmol/L PMSF, 0.32mol/L 蔗糖, 0.1% (V/V) Triton X-100]。用玻璃-Teflon 匀浆器磨成匀浆。10 倍稀释后, 于 200 目尼龙布过滤, 纯化细胞核具体操作按 Bronstein^[1] 方法进行。所得纯核用 H. E 染色, 经光学显微镜检查, 悬浮于少量细胞核保存液中 [50mmol/L Tris-HCl $\text{pH}7.9$, 1mmol/L MgCl_2 , 1mmol/L DTT, 25% (V/V) 甘油], 调整细胞核浓度为 $1\text{mg DNA}/\text{ml}$ 核悬液。分装后, 于液氮中贮存备用。全部操作在 4°C 或冰浴中进行。

(2) 细胞核转录活性的测定 反应系统总体积 $100\mu\text{l}$, 含 50mmol/L Tris-HCl $\text{pH}7.9$, 100mmol/L KCl, 5mmol/L MgCl_2 , 5mmol/L DTT, 1% 牛血清白蛋白, ATP、CTP、GTP 各 1mmol/L , ^3H -UTP $2\mu\text{Ci}$, 细胞核悬液 $50\mu\text{l}$ 。 30°C 水浴振荡保温到指定时间。反应完毕, 立即置冰浴中, 同时加 2ml 冰冷的 10% TCA- 20mmol/L $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 终止反应。 4°C 静置 30 分钟后, 酸不溶性物质经玻璃纤维滤膜过

滤,分别用 10% TCA、5% TCA、95% 乙醇各 5ml 抽洗三次。滤膜在 80℃ 干燥 30 分钟后,浸于 5ml 0.4% PPO-0.01% POPOP-甲苯闪烁液内,在 LKB-Rack-Bata 1217 型液体闪烁计数器中测 c. p. m。细胞核体外转录活性以 ^3H -UMP 掺入 RNA c. p. m/mg 细胞核 DNA 表示。

(3) 染色质制备和染色质结合的 RNA 聚合酶活性测定 参照 Raul 和 Decken^[2] 方法,从上述纯化细胞核分离染色质。染色质结合的 RNA 聚合酶活性测定采用 Raul 和 Decken 方法略加修改:反应系统总体积 130 μl ,含 30mmol/L Tris-HCl, pH7.8, 2mmol/L MgCl_2 , 2mmol/L MnCl_2 , 1mmol/L DTT, 70mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4% 甘油, ATP、CTP、GTP 各 0.3mmol/L, ^3H -UTP 3 μCi , 染色质悬液 50 μl (含染色质 DNA 约 50 μg)。35℃ 水浴振荡保温到指定时间。其余操作同方法 (2)。染色质结合的 RNA 聚合酶活性以 ^3H -UMP 掺入 RNA c. p. m/mg 染色质 DNA 表示。

(4) RNA 聚合酶制备与活性测定 按 Suzuki^[3] 等方法略加修改,从纯化细胞核提取 RNA 聚合酶。主要省略原法中搅拌 60 分钟,原法 200W/10S $\times$ 2 改为 200W/10S $\times$ 3 超声破碎细胞核。盐析时,原法 4mol/L 硫酸铵改为加固体硫酸铵使终浓度达 43.7%。所得 RNA 聚合酶溶液用改良 Lowry 法^[4]测定蛋白质浓度,分装后,于液氮中保存备用。RNA 聚合酶活性测定反应系统总体积 250 μl ,含 50mmol/L Tris-HCl pH7.9, 3mmol/L MgCl_2 , 3mmol/L MnCl_2 , 8mmol/L KCl, 46mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.25 mmol/L EDTA, 12mmol/L β -巯基乙醇, 12% (V/V) 甘油, 1mmol/L DTT, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 牛血清白蛋白, ATP、GTP 和 CTP 各 0.3 mmol/L, ^3H -UTP 1 μCi , 天然小牛胸腺 DNA 25 μg , RNA 聚合酶溶液 50 μl (约 50 μg 酶蛋白)。在检测酶的特异性时,分别加精胺或肝素到指定浓度。37℃ 保温 30 分钟。其余操作同方法 (2)。RNA 聚合酶活性以 ^3H -UMP 掺入 RNA c. p. m/mg 酶蛋白表示。

结果与讨论

1. 细胞核、染色质和 RNA 聚合酶的分离及其转录活性

1) 细胞核制备 小肠粘膜组织含大量粘液和消化酶,分离纯化细胞核比较困难。本实验在原法基础上,加 PMSF 和 DTT 抑制蛋白酶和核酸酶活性,用大体积稀释降低匀浆粘度,在匀浆介质中加 Triton X-100 减少胞浆沾染,严格控制匀浆条件以减少细胞损伤,所得纯化细胞核在光学显微镜下观察形态结构均正常,并具有较高的转录活性。实验测定结果如图 1。由图可见 RNA 合成量与细胞核用量在 50 μg DNA 范围内成直线关系。

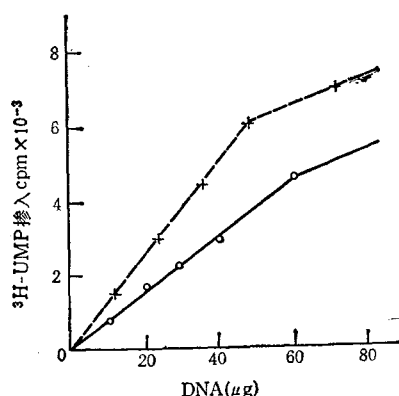


图 1 细胞核或染色质浓度对体外转录活性的影响
横坐标为加入反应管中的细胞核或染色质 DNA (μg)
×---×: 染色质; o---o: 细胞核

2) 染色质 细胞核经自溶消化后得到的染色质,其转录活性较细胞核略高(图 1)。反应是在内源性染色质模板和内源性 RNA 聚合酶催化下进行的。实验表明,染色质结合的 RNA 聚合酶催化的 ^3H -UMP 的掺入量较细胞核高。这一现象与 Raul 等^[2]的结果相似。究其原因可能是在染色质分离过程中,水解消化或机械搅拌,导致染色质 DNA 断裂,核小体开放成疏松结构,从而增加了转录的起始位点^[5]。

3) RNA 聚合酶 本方法分离的是可溶性 RNA 聚合酶全酶,所催化的 RNA 合成作用,较能反映细胞内总 RNA 合成的状况。实验测定此酶制剂与反应速度的关系表明,酶蛋白量在 100 μg 范围内与 ^3H -UMP 掺入 RNA 量成直

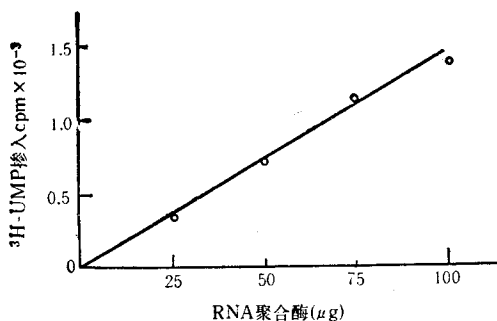


图2 RNA聚合酶浓度对反应速度的影响
横坐标为加入各反应管中的 RNA 聚合酶量 (μg)

线关系(图2)。

2. 肝素与精胺对细胞核和 RNA 聚合酶活性的影响:

1) 肝素 肝素对细胞核、染色质和 RNA 聚合酶转录活性的影响分别见图3、4、5。从图可以看出,肝素能提高细胞核转录活性,加强染色质结合的 RNA 聚合酶活性,但是对分离的 RNA 聚合酶起抑制作用。这种现象与文献报道^[6,7]相类似。

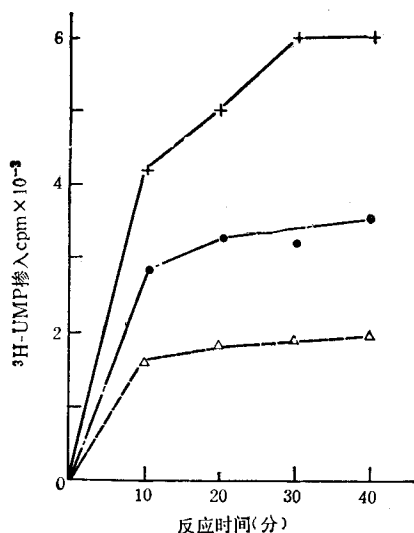


图3 肝素和 α-amanitin 对细胞核体外转录活性的影响
●---●对照 ×---×加肝素 1mg/ml
△---△加 α-amanitin 1.4 μg/ml

2) 精胺: 精胺对 RNA 聚合酶活性的影响见图5。低浓度 (<10mmol/L) 精胺加强 RNA 聚合酶活性,而高浓度反而起抑制作用。这与 Blair^[9] 等的结果相类似。最近有众多的实验证实,多胺对基因转录有调节作用^[10]。因

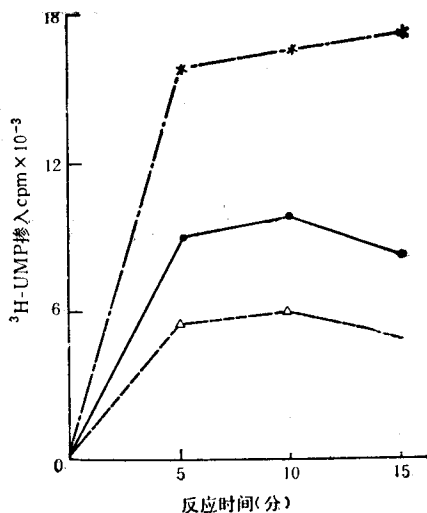


图4 肝素和 α-amanitin 对染色质结合的 RNA 聚合酶活性的影响

●---●: 对照 *---*: 加肝素 1mg/ml
△---△: 加 α-amanitin 1.4 μg/ml

此精胺可作为鉴定 RNA 聚合酶的特异性指标之一。

3) α-鹅膏蕈碱: 本实验中 1.4 μg/ml 鹅膏蕈碱使细胞核总转录活性抑制 50% 左右(参见图1)。说明 RNA 聚合酶 II 是粘膜上皮细胞

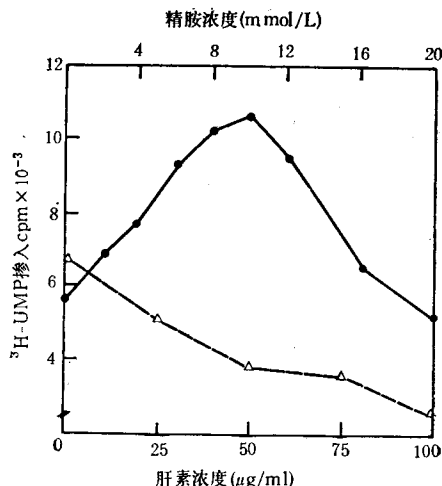


图5 精胺和肝素对 RNA 聚合酶活性的影响
●---●: 精胺 △---△: 肝素

中主要的 RNA 聚合酶。对染色质结合的 RNA 聚合酶及分离的可溶性 RNA 聚合酶的抑制作用与细胞核相同。α-鹅膏蕈碱是 DNA-依赖的 RNA 聚合酶的特异性抑制剂。这些结果表
(下转第54页)

小型永磁铁的药物磁定位方法

韩家康 于德山 安荣姝 陈惟昌 高文伟 张 力

(中日友好医院临床医学研究所, 北京)

关于磁性药物的制备和外磁场定位方法的研究已屡见报道。1984 年陈骥等人用磁通密度为 1570 G 的异性双极电磁铁在家兔和人体外对药物磁微球进行了定位实验。日本学者盐田正久等也将钐钴永磁铁片用手术植入贴敷于胃外壁的方法、进行了家兔体内铁粉定位的研究。但采用小型永磁铁在体外进行磁定位的给药方法迄今未见报道。

我们将 $2 \times 2.5\text{cm}^2$ 长方形永磁铁片置于家兔体外食道部位, 用普通注射器通过塑料导管将约 3ml 的还原铁粉石蜡溶液注入家兔咽部, 然后用 X 光摄影拍片, 观察还原铁粉的分布。实验用家兔为雌性、体重 4kg, 还原铁粉由我们在实验室制备, 定位用磁铁表面磁通密度为 3400 G, 最大磁能积为 31 MGOe。

本实验共对家兔拍摄了三张 X 光片; 〈一〉在注入还原铁粉之前。〈二〉磁铁未对准食道部位注入还原铁粉。〈三〉磁铁对准食道部位后注入还原铁粉。

实验结果: 第一张 X 光片在食道部位未摄

到任何物体; 第二张 X 光片在食道部位亦未摄到任何物体, 但在胃部有一处铁粉显影清晰可见; 第三张所摄 X 光片上在磁铁对准的相应食道部位可见到还原铁粉聚集, 其他部位未见铁粉显影。我们又用另一家兔作重复试验, 在磁铁对准后注入还原铁粉, 并在定位后打开颈部观察, 亦可用肉眼清楚地看到还原铁粉被吸着在磁铁对应的食道部位。

实验结果表明, 实验动物由消化道摄入的还原铁粉可用外磁场定位的方法使其固定在食道部位。我们亦制成一些含有药物的磁微球, 采用外磁场定位的方法, 可使抗癌药物或同位素等在肿瘤附近聚集, 可增加疗效, 减少副作用。因此, 药物的磁定位是一种颇有前途的新给药方法。与陈骥等人的电磁铁体外定位法比较, 本实验采用小型永磁铁片, 使定位区域更集中, 而且不妨碍实验对象正常行动, 能长时间定位, 使磁定位方法更接近临床应用。

[本文于 1987 年 5 月 12 日收到]

(上接第 45 页)

明, 上述建立的转录系统反映的是 DNA-依赖的 RNA 聚合酶活性, 适用于转录调控研究。

参 考 文 献

- [1] Bronstein, A. D. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **739**, 334, 1983.
- [2] Raul, F. et al.: *Experimenta*, **40**, 364, 1984.
- [3] Suzuki, N. et al.: *J. Biochem.*, **95**(5), 1389, 1984.
- [4] Schalterle, G. R.: *Anal. Biochem.*, **51**, 654, 1973.
- [5] Zhivotovsky, B. D. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **42**(2), 199, 1982.
- [6] Coupar, E. H. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **79**, 525, 1977.
- [7] Ballario, P. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **105**, 225, 1980.
- [8] 韩玉珉《生物化学与生物物理进展》**58**, 38, 1984.
- [9] Blair, D. G. R.: *Int. J. Biochem.*, **16**, 747, 1984.
- [10] Blair, D. G. R.: *Int. J. Biochem.*, **17**, 23, 1985.

[本文于 1986 年 11 月 26 日收到]