

CHO 细胞周期各时相中 DNA 和 RNA 的合成能力

吴 同 乐

(中国科学院生物物理所, 北京 100101)

关键词 细胞周期, CHO 细胞, 双标记

本实验的目的在于通过对 CHO 同步细胞各时相中 DNA 和 RNA 合成能力的了解, 进一步探讨细胞繁殖的分子机理。

1 材料和方法

选用 CHO 细胞株, 将其培养在含有 10% 小牛血清和 30% 的 0.5% 水解乳蛋白及 60% 的 Eagle 培养液中, 培养方法和 M 期同步细胞的收集, 参阅文献 [2]。将所收集的 M 期同步细胞调至每 200 μ l 细胞悬液中含有 10^5 个细胞, 置于 37℃ 温箱中, 在慢速旋转鼓下旋转培养, 并及时加入 ^3H -胸腺嘧啶核苷(由上海原子核所提供, 比放射性: 1 mCi/ml) 和 ^{14}C -尿嘧啶核苷(由中国医学科学院提供, 放射性: 0.05 mCi/0.25 ml)。根据我们已发表的资料 [3] 中有关 M 期同步化 CHO 细胞释放后不同时间之 LI (标记有丝分裂指数) 和 MI (有丝分裂指数) 的变化(图 1), 并参照文献 [3] 用液闪技术测定 CHO 细胞周期各时相放射性同位素的掺入。分别于培养后的 2, 10 及 16h 吸取 200 μ l 的细胞悬液(此时细胞分别应为 G_1 , S 及 G_2 期)精确滴在直径为 2.5 cm 圆片的玻璃纤维纸上, 置抽滤瓶中抽滤, 先加 10 ml 0.85% 的生理盐水洗一次, 然后再加 5 ml 5% 的三氯乙酸(TCA)溶液固定三次, 最后再以 5 ml 的无水乙醇洗一次。将纸片取出置

60℃ 干燥, 干后, 将纸片放入含有 5ml PPO-甲苯闪烁液(PPO 0.3%, POPOP 0.03%, 溶于甲苯溶液)中测量。

测量条件的选择和效率的计算: 用 YS-二型液闪计数器, 甄别阈为 0.5V—5.6V—8.0V, 根据我们利用 ^3H -氟水和 ^{14}C -正十六烷的标准溶液, 采用内标准法标定 ^3H -胸腺嘧啶核苷及 ^{14}C -尿嘧啶核苷的放射性。然后以一定量的 ^3H -胸腺嘧啶核苷和 ^{14}C -尿嘧啶核苷分别滴在滤膜上, 置于闪烁液中测定各在 A, B 道的计数, 计算出效率, 并根据以下公式求出样品中所含 ^3H -胸腺嘧啶核苷和 ^{14}C -尿嘧啶核苷的 dpm 数:

$$^{14}\text{C}_{\text{dpm}} = \frac{\text{B 道中每分钟计数} - \text{B 道中本底计数}}{\text{B 道中 } ^{14}\text{C 的计数效率 (0.36)}}$$

$$^{14}\text{C 在 A 道中的 cpm} = ^{14}\text{C}_{\text{dpm}} \times ^{14}\text{C 在 A 道中的效率 (0.12)}$$

$$^3\text{H 在 A 道中的 cpm} = ^3\text{H 在 A 道中所测的 cpm} - ^{14}\text{C 在 A 道中的 cpm}$$

$$^3\text{H}_{\text{dpm}} = ^3\text{H 在 A 道中的 cpm} / ^3\text{H 在 A 道中的效率 (0.28)}$$

由此即可算出样品中所含 ^3H 和 ^{14}C 的 dpm 数, 根据样品中的 dpm 的大小, 即可反映 DNA 和 RNA 的合成能力。

2 结果和讨论

我们利用 ^3H -胸腺嘧啶核苷和 ^{14}C -尿嘧啶核苷双标记技术研究了 CHO 细胞周期各时相中 DNA 和 RNA 合成能力, 结果如表 1。

表 1 CHO 细胞各时相中 ^3H , ^{14}C 的 dpm 数

样品值 dpm \ 时相	G_1	S	G_2
$^3\text{H}_{\text{dpm}}$	249.8 $\pm$ 57.1	1307.3 $\pm$ 245.8	85.4 $\pm$ 18.2
$^{14}\text{C}_{\text{dpm}}$	2202.6 $\pm$ 193.4	628.3 $\pm$ 57.6	955.4 $\pm$ 79.1

从表 1 可以看出细胞在 G_1 期, 只有 RNA 合成,

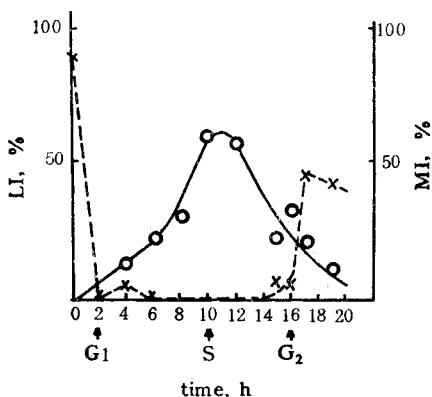


图 1 M 期同步化 CHO 细胞释放后不同时间之 LI (标记有丝分裂指数) 和 MI (有丝分裂指数) 变化
○—○—○ LI ×...×...× MI

DNA 是在 S 期合成, S 期除了有 DNA 的合成外, 还伴有 RNA 合成, 当细胞进入 G₁ 期, DNA 的合成已很少, 而 RNA 的合成仍在进行。据文献[4]介绍, 细胞在进入 M 期后即不再合成新的 DNA, 而 M 期的末期 RNA 的合成又开始。在 G₁ 期主要是 RNA 和蛋白质的合成, 直到 G₁ 期的后期开始发出 DNA 合成的信号, 为 DNA 的合成作准备。细胞在 S 期, 主要的特征是 DNA 合成, 此时细胞原有的遗传信息 DNA 的量增加一倍。在 S 期, 除了 DNA 合成, 还伴有 RNA 和蛋白质的合成, 因 DNA 合成的连续性亦依赖于 RNA 的合成^[5], G₁ 期 RNA 和蛋白质合成是为细胞进入有丝分裂做准备^[6,7], 而此时已不再合成 DNA。这与我们所得结果基本一致。我们采用同位素双标记技术, 其优点是在同一个样品中同时给出 ³H 和 ¹⁴C 两种参数, 这是单标记法无法做到的。

根据文献[8]介绍, 也根据我们对 CHO 细胞各时相中 cAMP 水平的测量数据^[9]分析, cAMP 在 M 期水平最低, G₁ 早期增长约三倍, G₁ 晚期及 S 期处于

中等水平。而到 G₂ 期, cAMP 水平较其它各期均高。我们考虑它们之间可能存在着一定的相互依赖和协调的关系, 这需进一步探讨和证实。

参 考 文 献

- 1 Howard A, Pelc S R. *Heredity Suppl*, 1953; 6: 261
- 2 张鸿卿, 吴同乐. 北京师范大学学报, 1981; 4: 89
- 3 Barranco S C *et al. Cell Tissue Kinetic*, 1977; 10: 335
- 4 Prescott D M. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1964; 3: 33
- 5 Seki S, Mueller G C. *Biochem Biophys Acta*, 1975; 378: 354
- 6 Donnelly G M, Siskin J E. *Exp Cell Res*, 1967; 46: 93
- 7 Kishimoto S, Liberman I. *Exp Cell Res*, 1964; 36: 92
- 8 Sheppard J R, Prescott D M. *Exp Cell Res*, 1972; 75: 293
- 9 吴同乐, 张鸿卿. 生物化学与生物物理进展, 1983; 5: 58

裸鼠人体原发性肝癌移植模型 ras 族基因的表达

屠华成 沈兆忠* 许凯黎* 于尔辛

(上海医科大学肿瘤医院, 上海 200032)

关键词 裸鼠人体原发性肝癌移植模型, ras 族基因, 基因表达

人体原发性肝癌癌基因谱的研究已经证明, N-ras 基因是人体原发性肝癌的主要转化基因之一^[1]。另外, 在大多数人体原发性肝癌组织中 N-ras 基因转录的 mRNA 有过量表达, 且癌组织表达高于癌旁组织^[2]。但应用裸鼠人体肝癌模型作癌基因表达的研究, 少有报道。为此, 本文选用一株裸鼠人体原发性肝癌移植模型, 用 Northern 印迹杂交和斑点杂交方法对 ras 族基因的表达进行了研究, 初步观察到除 N-ras 以外, Ha-ras 和 Ki-ras 基因均有不同程度的表达。

1 材料和方法

1.1 实验动物 雌性 BALB/C 裸鼠 (nu/nu), 4 至 6 周龄, 由上海市肿瘤研究所动物房提供, 饲养于具有合格证书符合 SPF 条件的该动物房裸鼠室内。裸鼠人体肝癌移植模型 (已通过鉴定) 由第二军医大学病解教研室陶文照教授提供, 本动物房已皮下接种传代

二年、10 代以上。每次传代用 4 至 5 只裸鼠, 每只裸鼠两腋侧皮下接种肿瘤组织。当肿瘤长至一定体积时, 摘除裸鼠一侧眼球取血后脱颈处死, 取出瘤块, 留取少许作接种传代, 其余立即液氮冷冻备用。每次实验采用 4 至 5 只裸鼠人体肝癌组织提取 RNA。

1.2 RNA 提取 按 Chomczynski 法进行^[3], RNA 样品用适量经 0.1% DEPC 处理的双蒸水溶解, 岛津 UV-300 型紫外分光光度计测 A 值, $A_{260}/A_{280} = 1.87 \pm 0.05$ 。

1.3 Northern 吸印膜制备 取 RNA 样品 40 μ g 在 1.0% 琼脂糖甲醛凝胶上加样电泳, 电泳结束, 经紫外灯观察, 见清晰的 28S、18S 条带。然后, 在浸湿 20×SSC 的滤纸桥上, 迭加硝酸纤维素膜, 将 RNA 转移至硝酸纤维素膜上。膜片经 80℃ 烘干 2h, -20℃ 贮

* 上海市肿瘤研究所, 上海 200032

收稿日期: 1991-01-07 修回日期: 1991-04-16