

500拉德 γ -射线照射对大鼠肝脏非组蛋白染色体蛋白的影响

丁邦裕* 姜文昌 周碧华 杨瑞琨 许以盛

(中国科学院昆明动物研究所)

摘 要

500拉德 ^{60}Co γ -线照射后,大鼠肝脏非组蛋白染色体蛋白,经等电聚焦—SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,考马斯亮兰R250染色,蛋白斑点可达到高度的重复性。UP组分可以看到100—150个蛋白斑点, NP可以看到40—60个蛋白斑点。照射后不同时间,在凝胶板上,蛋白斑点的变化,与放射病的发展有一定的关系。本文就辐射致癌和辐射致畸等原理进行了讨论。

染色质是真核细胞间期染色体物质,是由DNA、组蛋白、非组蛋白和少量RNA组成。Chiu (1975) 曾将非组蛋白分为与DNA疏松结合的非组蛋白染色体蛋白(UP)和与DNA紧密结合的非组蛋白染色体蛋白(NP)。这两类蛋白极不均一,含有多种核酸酶,如聚合酶和连接酶(Howk, 1970; Chiu, 1972; Zimmerman, 1975), RNA聚合酶(Miller, 1969; Tala, 1974), DNA酶以及非组蛋白激酶(O'Connor, 1969; Takeda, 1971), 结构蛋白和调节蛋白(Liew, 1979), 核抗原(Taylor 1979)等。NP在染色质中约占总非组蛋白的20%,具有调节基因表达的作用(Li, 1977)。Gates等人(1979)认为非组蛋白染色体蛋白(NHCP)能与DNA特异顺序结合,对DNA顺序有识别能力,可能与调节遗传密码有关,所以研究电离辐射对这类蛋白的影响具有特殊意义。关于 γ -射线照射在体外对DNA的影响已有大量报道,对染色质及其在基因活动中起重要作用的非DNA组分—非组蛋白染色体蛋白的研究却很少(Ramakrishnan, 1979; Kuwabara, 1976; Стражевская, 1977等)。本文就大鼠经500拉德全身照射后,不同时间,用高分辨率的等电聚焦(IEF)—SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分析肝脏中UP和NP组分,试图为辐射遗传效应,辐射致癌以及辐射防护等基本原理的研究提供线索和方法。

* 现通讯处(南京)江苏省肿瘤防治研究所。
本文于1980年10月3日收到。

材 料 和 方 法

一、实验动物和照射条件:

雄性大白鼠, 体重220—240克, 年龄为1周。对照组和照射组均在同一条件下饲养, 在取材前12小时除水外停供其它。动物分成5组, 除对照组外, 其余分批照射, 同时取材。

照射条件: 照射源为暴露式⁶⁰钴 γ -射线, 一次全身照射, 剂量率为27.07拉德/分钟, 总剂量500拉德。

二、染色质制备:

染色质制备按Marushige等人(1966)方法, 并略加改进。从取材直至UP和NP组分的分离均在4°C下进行。制备染色质的每一步所用试剂均加有蛋白水解酶抑制剂—0.2mM氟化磺酰苯甲烷。

三、UP和NP的提取:

UP和NP组分的提取按(Macgillivray, 1972; Fujitani, 1978)方法进行。所得UP和NP组分对蒸馏水透析(4°C)。除去盐和尿素, 冻干浓缩成每毫升2毫克, 供电泳分析用。

四、DNA、RNA和蛋白的测定:

用二苯胺法测定DNA的含量, 以小牛胸腺DNA作为标准。RNA用苔黑酚法测定, 以酵母RNA作为标准。蛋白按Lowry(1951)方法测定, 以牛血清白蛋白作为标准。

五、等电聚焦(IF)—SDS聚丙烯酰胺凝胶两相电泳(2-DGE):

等电聚焦—SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳按O'Farrell(1975)改良法进行。第一相(IF)胶浓度为4%, 样品用量300微克/每管。为防止尿素析出, 必须在25—28°C条件下完成, 在10—20°C电泳, (IF)电泳完毕后, 凝胶在平衡液[0.75M Tris(pH8.8) 25毫升, 10% SDS 15毫升, 甘油 5毫升, β -巯基乙醇2.5毫升, 水2.5毫升混合]中平衡10分钟; 接着进行第二相SDS垂直板胶电泳, 凝胶浓度为10%, 上槽为阴极, 下槽为阳极, 在10—20°C下电泳, 电流为20毫安/块, 20分钟后调至25毫安, 当示踪染料达底部0.5厘米处, 即停止电泳(约需6小时)。电泳完毕后, 取出板胶置于10%三氟醋酸(内含5%磷基水杨酸)中, 室温固定1小时或60°C固定10分钟, 再移入脱色液中10—15分钟, 然后转入染色液中染色2小时以上或55°C染色20分钟, 经脱色液多次脱色, 直到凝胶背景无色, 蛋白斑点清晰为止, 脱色好的凝胶可保存在7%的冰乙酸中, 亦可直接照相。

凝胶干燥: 将凝胶板浸在7%冰乙酸(内含3%甘油)中30—60分钟, 玻璃纸浸5—10分钟后, 将玻璃纸平铺于玻璃板上, 并将凝胶放在玻璃纸上, 再盖一层玻璃纸, 四周用夹子夹紧(无气泡和漏气现象)。40°C鼓风干燥10小时左右, 即成透明胶片, 夹在书中可长期保存。

pH梯度测定: 第一相电泳后的凝胶分割成0.5厘米长, 按顺序分别置于抽过气的2毫升0.01M KCL中, 轻轻振荡10分钟, 测定pH值, 根据凝胶长度和pH值绘制曲线。

UP和NP组分的分子量测定: 按Weber和Osborn(1969)叙述的方法, 用已知分子

量蛋白作标准,按上述电泳条件进行比较。

结 果

大鼠受500拉德 ^{60}Co γ -线照射后,3、9、15和30天食欲均正常,没有明显的放射病极期症状。UP组分照射后3天,明显下降,9天、15天开始恢复,30天时超过正常水平见表1。

表1. 500拉德照射对大鼠肝UP组分的影响

	对 照 组	照 射 组 照 后 天 数			
		3	9	15	30
蛋白毫克/10克肝	17.6	7.8	16.9	15.4	19.0

图1表示正常大鼠肝UP和NP组分第一相凝胶电泳pH梯度。UP组分的梯度为pH 4.3—7.8,而NP组分为pH4.8—7.5。图2为标准蛋白分子量测定结果。UP和NP蛋白斑点主要集中在pH4.8—6.8之间,分子量范围为20,000—90,000,但绝大部分在30,000—80,000。与曾报导的DNA结合的非组蛋白分子量和等电点范围基本一致(Suria, 1974; Teng, 1971)。结合DNA的组蛋白分子量范围在11,000—21,000之间,等电点大于或等于pH10,可见本文中的UP和NP组分可能没有组蛋白混入。

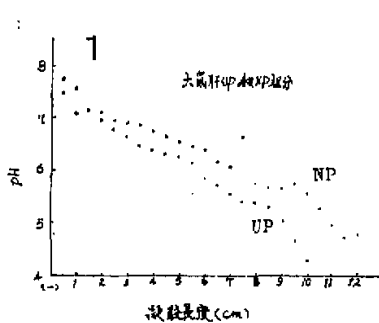


图1 大鼠肝UP和NP组分的第一相(IF)凝胶电泳梯度。

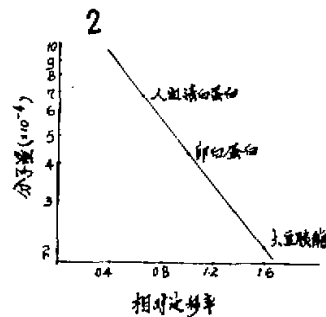


图2 标准蛋白质分子量。

照后不同时间大鼠肝UP组分的2-DGE图谱:图3为对照组,图4为照射后3天,图5为照射后9天,图6和图7分别为照射后15天和30天。照射后不同时间的电泳基本图形,分子量范围,等电点与对照组比较大体相似,但也存在较大的差异。

照射后第3天蛋白斑点A,已不明显,而15天时消失。蛋白斑点B原来是连接的两个大斑点,照射后3、9、15和30天时分开成两个较小的斑点,说明照射后其含量的减少。E区域斑点(1.2.3.4)照射后不同时间一般表现为蛋白含量逐渐减低直至消失,30天时已开始恢复。照射后第3天、第15天和30天高分子量($5-7 \times 10^4$)的蛋

白斑点有所减少,而低分子量的蛋白斑点(尤其是C区)数量明显增加,而 $5 \times 10^4/5.5$ (分子量/pH)的几个蛋白斑点则随时间逐渐加深。从上述照射后不同时间,电泳图形看出照射后伴随着放射病的发展,蛋白斑点有增加的倾向。狼犬受200拉德全身照射后不同时间,血清蛋白电泳图谱也看到带型的增加(丁邦裕等1980)。同样Baserga(1966)和Stein(1974)报道移植肝癌的大鼠,肝细胞NHCP中28,000—40,000低分子量区亦出现新带。可见,照射后低分子量NHCP斑点增加对机体是不利的。

NP组分的蛋白种类较UP组分少的多,但照射后的变化较大。如图8、9和10。正常大鼠肝中显色极淡的斑点A,在照后有规律的加深。蛋白斑点B₂与A相反照射后逐渐变浅。C和E两个蛋白斑点,照射后随时间的推移越来越加深。蛋白斑点D照后也有一定的变化。照后还出现了新的斑点H。

动物照射后不同时间,出现蛋白斑点的丢失或增加,还有染色深浅的变化,这可能反应了酶系统及调节功能的异常,从而引起一系列病变,以及远后期效应。

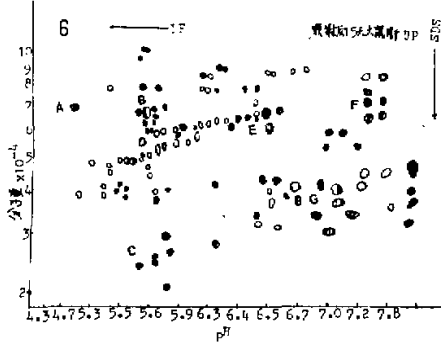
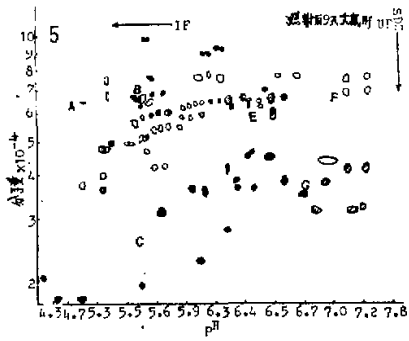
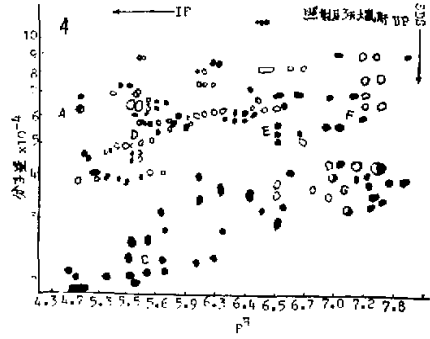
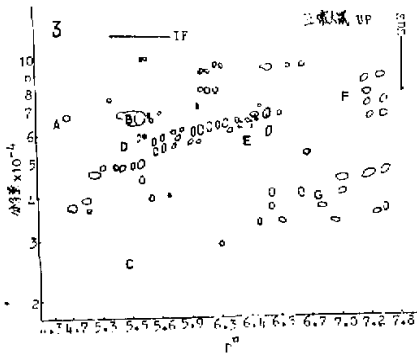
讨 论

本文为比较照射前后大鼠肝非组蛋白染色体蛋白的变化,选用同一年龄、同一性别的大白鼠,并在同一条件下饲养,避免动物个体差异对结果的影响。从提取染色质直至电泳结束,均在同一条件下严格顺序操作,使环境因素对非组蛋白染色体蛋白的影响相对恒定,从而使UP和NP组分的制备和同一样品的2-DGE图谱重复性比较好。大鼠经500拉德照射后,非组蛋白染色体蛋白2-DGE图谱的改变,可能有如下原因,

射线直接作用于蛋白分子,引起蛋白的降解或蛋白质合成代谢强度的改变,Ramakrishnan等(1979)用体外实验证明由于染色质特异的构象,可使染色质蛋白免于辐射损伤,而Patil等人(1975)证实,大鼠经1,000拉德照射后,同位素标记发现器官RNA合成能力降低或丧失,并引起蛋白质的改变。本文蛋白2-DGE图谱的改变可能与Patil等人的实验结果类似。射线直接引起蛋白质变化的可能性较小。

DNA比RNA对辐射更敏感,照射后DNA的碱基及核糖的破坏、单链和双链的断裂、以及分子交联可使DNA分子某些节段的碱基序列发生改变,从而影响DNA的正常复制。异常复制的DNA通过mRNA的结构变化,反应在新合成的蛋白质结构上,有可能成为蛋白电泳图谱改变的原因。由于DNA的异常复制和异常非组蛋白的调节,以及修复过程中的错构,也可能导致肿瘤和遗传效应的发生。

UP和NP组分与DNA以不同的形式结合,而且参与染色体的结构,在基因活动中对DNA转录起调节作用,因此射线直接或间接引起DNA或非组蛋白的损伤,都可能最终在转录的环节上影响蛋白质的合成,使UP和NP的2-DGE图谱发生变化。



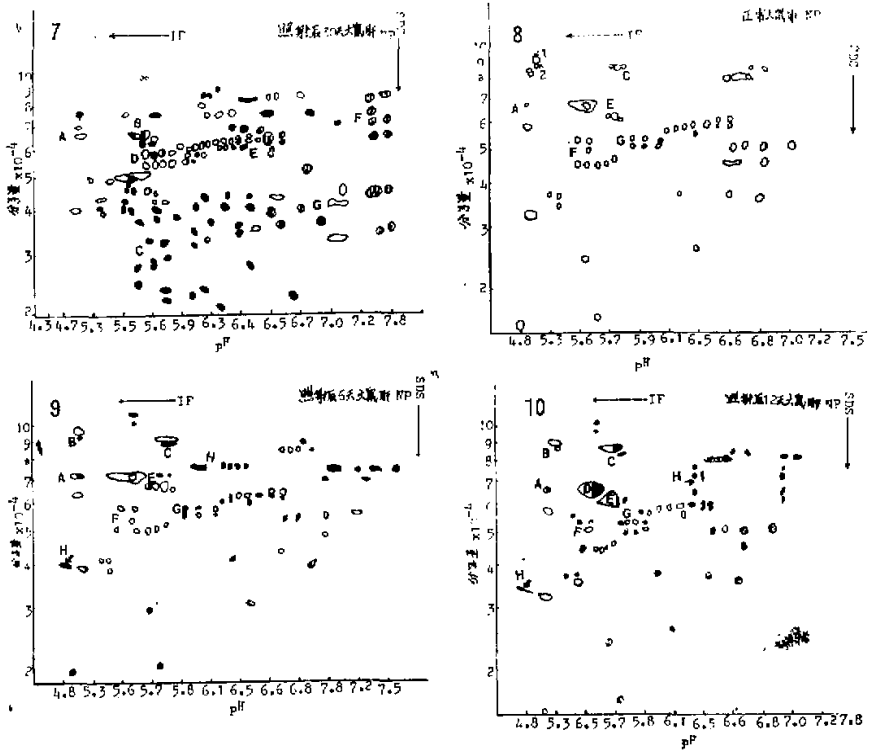


图 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 和 10. 大鼠肝 NP 和 UP 组分的 2-DGE 示意图。

○表示正常的蛋白斑点; ◐表示蛋白浓度降低; ◑表示蛋白浓度增加;
 ⊙表示丢失的蛋白斑点; ●表示增加的蛋白斑点。

参 考 文 献

- 丁邦裕等 1980 生物化学与生物物理进展 3:78—79.
- Baserga, R., C. Nicolin 1976 *Biochem. Biophys. Acta*, 458:109.
- Chiu, J. F. and S. C. Sung 1972 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 57:740.
- Chiu, J. F., Y. H. Tsal, K. Sakuma and L. S. Hnilica 1975 *J. Biol. Chem.*, 250 (24) :9431—9432.
- Fujitani, H., J. F. Chiu and L. S. Hnilica 1978 *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 75(4):1943—1946.
- Gates, D. M. and I. Bekhor 1979 *Nucleic Acids Res.*, 6 (10):3411—3425.
- Hawk, R. and T. Y. Wang 1970 *Arch. Biochem. Biophys.*, 136:422.
- Kuwabara, M. et al. 1976 *Biochem. Biophys. Acta*, 432:292.
- Li, H. J. and R. Eckhardt: 1977 *Chromatin and Chromosomal Structure*, Academic Press, PP. 255—298.
- Liew, C. C. 1979 *Recent Adv. in Genetic Res.*, 2.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall 1951 *J. Biol. Chem.*, 193:265—275.
- Macgillivray, A. J., A. Cameron, R. J. Krauze, D. Rickwood and J. Paul 1972 *J. Biochem. Biophys. Acta*, 277:384.
- Marushige, K. and J. Bonner 1966 *J. Mol. Biol.*, 15:160—174.
- Miller, O. L. and B. R. Beatty 1969 *J. Cell Physiol.*, 74, Suppl. 1:225.
- O' Farrell, P. H. 1975 *J. Biol. Chem.*, 250 (10):4007—4021.
- O' Connor, P. J. 1969 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35:805—810.
- Patil, M. S., D.S. Pradhan and A. Sreenivasan 1975 *Int. J. Radiat. Biol.*, 27(4):363—370
- Ramakrishnan, N. et al. 1979 *Int. J. Radiat. Biol.*, 35(4):365—371.
- Stein, G., W. E. Criss and H. P. Morris 1974 *Life Sci.*, 14:95.
- Suria, D. and C. C. Liew 1974 *Can. J. Biochem.*, 52(12): 1143—1153.
- Takeda, M., H. Yamamura, Y. Ohga 1971 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 42:183—140.
- Tala, J. R., B. Baker 1974 *Exp. Cell Res.*, 83:111—138.
- Taylor, C. W. 1979 *Biochemistry*, 18: 4049.
- Teng, C. S., C. T. Teng and V. G. Allfrey 1971 *J. Biol. Chem.*, 246(11):3597—3609.
- Weber, K. and M. Osborn 1969 *J. Biol. Chem.*, 244:4406—4412.
- Zimmerman, S. B. and C. J. Levin 1975 *J. Biol. Chem.*, 250:149.
- Стражевская, Н. Б. 1977 Биофизика Сложных Систем и Радиационных нарушений, Р.145.

EFFECT OF IRRADIATION WITH 500 RADS OF ^{60}Co γ - RAYS ON THE LIVER NONHISTONE CHROMOSOMAL PROTEINS IN RATS

Ding Bangyu, Jiang Wenchang, Zhou Bihua, Yang Ruikun and Xu Yisheng

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica*)

Abstract

After rats being irradiated with 500 rads of ^{60}Co γ -rays, on the 3rd, 9th, 15th and 30th day, we used improved Macgillivray (1972) and Fujitoni (1978) method to extract non-histone chromosomal proteins loose combining with DNA (UP) and non-histone chromosomal proteins tightly combining with DNA (NP) in chromatin. On the 3rd day after irradiation, rats' liver UP decreased and on the 9th and 15th day UP increased, but it was higher than normal on the 30th day. The liver non-histone chromosomal proteins were isolated by improved O' Farrell (1975) method, isoelectric focusing—SDS polyacrylamide gel electro-phoresis, using Coomassie Brilliant Blue R250 for staining. The protein spot products could be obtained with high reproducibility, 100—150 protein spots could be seen in UP and 40—60 in NP. At different time after irradiation, the figure of electrophoresis, the range of molecular weight, the pH gradient were similar to the control. The UP spots with high molecular weight diminished gradually. Spot A cleared up, and low molecular weight parts were increased. NP spots A, C, E darkened progressively, furthermore, new protein spot H appeared and gel plate had something to do with the development of radiation damage. The mechanism of irradiation induced cancer and aberration etc. have been discussed. It has provided an important molecular basis for radiation damage research.