

小肠匀浆中提高受照射小鼠肠腺存活率的有效成分的分离和鉴定

曾桂英 陈镔复 刘爱平 周元恺

(第四军医大学, 西安 710032)

摘要 正常小鼠小肠匀浆经加热、离心、盐析和提取核酸等步骤制备提取物, 用单位面积法对各提取物分别进行生物活性鉴定, 用紫外法和生化法对提取的核酸进行生化成分的分析。结果表明, 从小肠匀浆中提取的 DNA 和 RNA 均能提高受照射小鼠的肠腺存活率。并认为其有效成分为核酸类物质。

关键词 照射, 生物活性鉴定, 有效成分, 核酸, 肠腺

在肠道辐射损伤与修复的研究中已证实, 正常小鼠小肠匀浆中含有某种能提高受照射小鼠肠腺存活率的耐热因子^[1-3]。本文报道此因子的分离和鉴定, 并证实其为核酸类物质。

1 材料与 方法

1.1 试剂和材料

盐酸胍、 β -巯基乙醇为国产生化试剂。十二烷基肌氨酸钠和透析袋(分子截留量为 2000)系 Sigma 公司产品。蛋白酶 K、RNase A、酵母 RNA、小牛胸腺 DNA、牛血清白蛋白等由华美生物工程公司提供。其它试剂均为国产分析纯试剂。

变性溶液 7 mol/L 盐酸胍、25 mmol/L 柠檬酸钠、0.5% 十二烷基肌氨酸钠、0.1 mol/L β -巯基乙醇。

苯酚溶液 依次用 1 mol/L 和 0.1 mol/L Tris (pH 7.5)液平衡重蒸苯酚, 4℃下存放。

1.2 提取流程

取正常小鼠全小肠, 用冷却生理盐水冲净肠内容物, 滤纸吸干, 剪碎并称重, 用生理盐水制成 100 mg/ml 湿重肠组织的小肠匀浆, 然后按流程图分离提取(见图 1)。

1.3 总核酸的提取

采用苯酚-乙醚抽提, 乙醇沉淀法从上清Ⅲ中提取总核酸, 溶于 EDTA (1 mmol/L, pH 7.5)液中, -20℃保存。

1.4 小肠 DNA 和 RNA 的提取

初步实验已证实, 提高受照射小鼠肠腺存活率的有效成分为核酸后, 分别从未经加热处理的小肠匀浆和经 100℃ 15 min 加热处理的上清 I 中分离提取 DNA 和 RNA。

1.4.1 DNA 的提取 采用苯酚-氯仿-醋酸钾抽提, 乙醇沉淀 DNA, 并用蛋白酶 K 和 RNase A 除去蛋白质和 RNA, 提取的小肠 DNA 溶于 Tris-EDTA (pH 7.4)液中, 4℃下保存。

国家自然科学基金资助课题

收稿日期: 1991-11-26

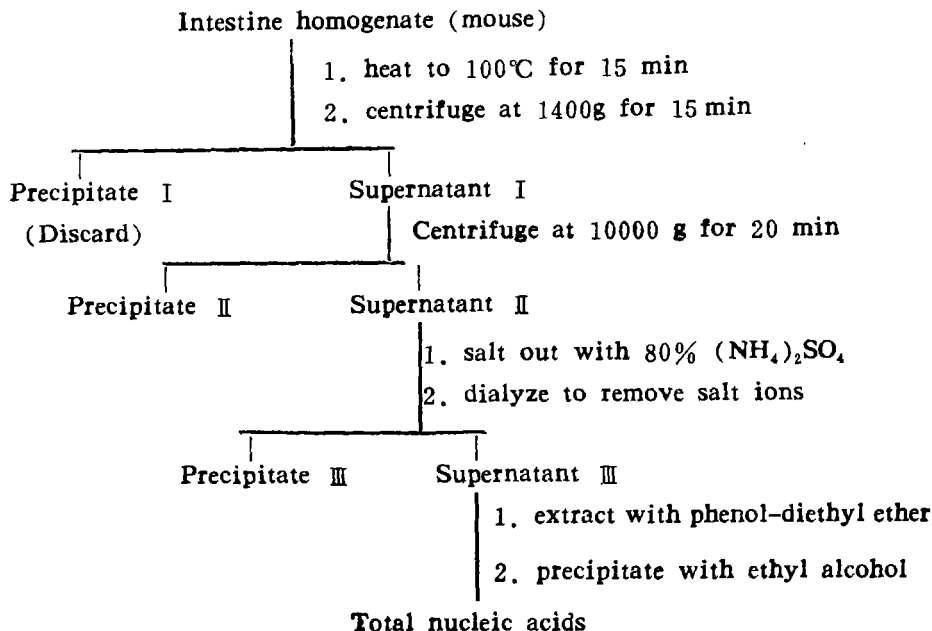


Fig 1. Flow Chart for isolation of crypt survival enhancing entity from mouse intestine homogenate

1.4.2 RNA 的提取 根据刘西平^[4]的方法稍加改变后提取。即采用盐酸胍-苯酚-氯仿抽提、异丙醇沉淀 RNA，并用 75% 乙醇洗涤。提取的小肠 RNA 溶于 EDTA (1 mmol/L, pH 7.5) 液中，-20℃ 下保存。

提取的总核酸、DNA 和 RNA 的含量用紫外法和生化法测定。在作生物活性鉴定时，各提取组分均用生理盐水稀释成 150—175 mg/ml 浓度的溶液，湿重肠组织内的提取物作为比较的标准。

1.5 生物活性鉴定

用小鼠对分离提取的每一提取物(上清 I、上清 II、上清 III、沉淀 II、沉淀 III 和总核酸、DNA 和 RNA) 分别进行生物活性鉴定。

1.5.1 动物和照射条件 采用 10—12 周龄的 BALB/c 小鼠，性别不拘。以 ⁶⁰Co γ 线进行腹部照射，剂量率 85.7—77.7 cGy/min，总剂量 980 cGy。躯体的其余部位用 5 cm 厚的铅块屏蔽。

1.5.2 肠腺存活率测定 采用局部肠腔扩张注入法^[1]，于照射后 1—3 h 内将 0.4 ml 提取物溶液中的一种注入受照小鼠 3—4 cm 长的一段空肠内。根据实验设计，分别于照后第 4 d、8 d 或 12 d 活杀小鼠，取实验小鼠的注入肠段和照射对照小鼠的相应肠段，用单位面积法测定肠腺存活率^[5]，鉴定各提取物的生物活性。

2 结果与讨论

2.1 小肠 DNA 和 RNA 的纯度测定

2.1.1 紫外法 用 UV-3000 双光束双波长分光光度计(日本岛津)对小肠 DNA 和 RNA 进行光密度扫描，呈典型的核酸吸收光谱，在 260 nm 处有一吸收峰，并求得 A₂₆₀ 与 A₂₈₀ 的比值分别为 1.89—1.92 和 1.87—1.97。

2.1.2 生化法 用二苯胺法、苔黑酚法和考马斯亮兰 G-250 染色法对提取的核酸进行生化成分鉴定, 并由光密度值推算出核酸溶液中 DNA、RNA 和蛋白质的含量, 结果见表 1。

2.2 各提取物的生物活性鉴定

根据实验设计和提取物提取时间的不同, 分批进行实验。每组 5—10 只小鼠, 在每只小鼠局部肠腔内注入 0.4 ml 提取物溶液中的一种, 即相当于 60—70 mg 湿重肠组织内的提取物。

2.2.1 照后第 4 d 肠腺存活率的变化 小鼠于受照射并注入提取物溶液后的第 4 d 活杀, 取小肠标本, 测定肠腺存活率, 结果见表 2。

Tab 1. The chemical constituents of nucleic acids extracted from intestine homogenate of mice

Constituents	Extracts		
	Total nucleic acids	DNA	RNA
Ribose	+++	-	+++
Deoxyribose	+++	+++	-
Protein	trace	-	-

+++ The amount of DNA or RNA is greater than 70 µg/ml based on deoxyribose or ribose color reaction

由表 2 表明, 小鼠受照并注入上清 I、上清 II、上清 III、总核酸以及分别从上清 I 和未经加热处理的小肠匀浆中提取的 DNA 和 RNA 后的肠腺存活率在 78.5%—90.0% 之间。各组间无显著差别 ($P>0.05$), 但与照射对照组小鼠肠腺存活率 (56.6%) 有非常显著的差别 ($P<0.01$)。而小鼠受照并注入沉淀 II、沉淀 III 后肠腺存活率 (61.3% 和 60.7%) 与照射对照组小鼠肠腺存活率间无显著差别 ($P>0.05$)。此结果并结合小肠 DNA 和 RNA 的纯度测定说明, 小肠匀浆经 100℃ 15 min 加热处理及 80% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析, 除去不耐热的成分和部分蛋白质后, 从中提取的核酸类物质, 是小肠匀浆中提高受照射小鼠肠腺存活率的有效成分。小肠匀浆粗提液中提高受照射小鼠肠腺存活率的成分是耐热的^[3], 因而在设计分离提取过程时, 首先将小肠匀浆加热, 以除去不耐热的成分。为了证明小肠匀浆经加热处理后是否影响所提取的 DNA 和 RNA 的生物活性, 从未经加热处理的小肠匀浆直接提取 DNA 和 RNA 与之比较。从表 2 的结果可以看出, 两者具有提高受照射小鼠肠腺存活率相同的能力, 表示经 100℃ 15 min 加热处理后的小肠 DNA 和 RNA 仍保持其活性。用热变性小肠 DNA (加热 100℃ 15 min, 盐冰浴中速冷) 作实验, 也证明变性前后的 DNA 活性不变。

2.2.2 照射后不同时间肠腺存活率测定 为进一步观察小肠 DNA 和 RNA 对受照小鼠肠腺较长时间的影响, 于照后第 4 d, 8 d 或 12 d 活杀小鼠, 取小肠标本, 测定肠腺存活率, 结果见图 2。

图 2 结果表明, 小鼠在受照射并注入上清 I 和分别从上清 I 及未经加热处理的小肠匀浆中提取的 DNA 和 RNA 后第 4—12 d 内, 肠腺存活率一直维持在 80%—90% 之间, 比照射对照组的

Tab 2. Biological activity assay of fractions isolated from the intestine homogenate of mice

Fraction	Crypt survival/%
Supernatant I	89.4±1.4*
Supernatant II	81.5±2.3*
Precipitate II	61.3±1.4**
Supernatant III	87.8±2.1*
Precipitate III	60.7±2.4**
Total nucleic acids	79.1±1.7*
Intestine DNA	
△ heated	86.7±2.4*
▲ unheated	90.5±1.5*
Intestine RNA	
△ heated	79.5±1.6*
▲ unheated	78.5±1.6*
Irradiated control	56.6±1.0

△ isolated from supernatant I

▲ isolated from unheated intestine homogenate,

* $p<0.01$, ** $p>0.05$, as compared with irradiated control

The data are expressed as mean±SE, $n=5$ to 10

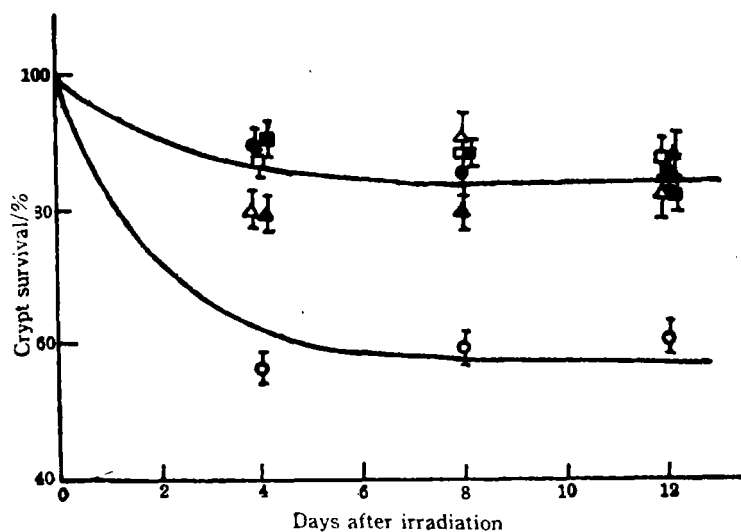


Fig 2. Changes of crypt survival in mice as a function of time after 980 cGy γ -ray abdominal irradiation and administration of various fractions extracted from intestine homogenate

(□) Intestine DNA, heated (■) Intestine DNA, unheated
 (△) Intestine RNA, heated (▲) Intestine RNA, unheated
 (●) Supernatant I (○) Irradiated control

肠腺存活率(60.0%左右)提高20%—30% ($P < 0.01$)。此曲线与用小肠匀浆粗提液实验的结果也是一致的^[1-3]。

以上实验证实,正常小鼠小肠匀浆中能提高受照射小鼠肠腺存活率的有效成分为核酸类物质。

参 考 文 献

- 1 周元恺, 韩士臣, 曾桂英, 刘健. 军事医学科学院院刊, 1987, 11(2): 88
- 2 曾桂英, 韩士臣, 刘健, 刘爱平, 周元恺. 辐射研究与辐射工艺学报, 1990, 8(4): 228
- 3 王 娇, 周元恺. 军事医学科学院院刊, 1990, 14(3): 174
- 4 刘西平, 袁恬莹. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(1): 65
- 5 周元恺, 沈世仁. 生物化学与生物物理进展, 1979, (2): 70

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE ACTIVE ENTITIES IN INTESTINE HOMOGENATE THOSE ENHANCING THE CRYPT SURVIVAL IN MICE AFTER γ -IRRADIATION

Zeng Guiying Chen Binfu Liu Aiping Zhou Yuankai

(Fourth Military Medical University, Xian 710032)

ABSTRACT The intestine homogenate of mice was undergone stepwise procedure of heating, centrifugation, salting out and nucleic acid isolation, and each fraction was subjected to biological activity assay using the method of crypt counting per unit intestine area in mice. The results showed that the nucleic acid extracted from intestine homogenate, either DNA or RNA, was capable of enhancing the crypt survival in mice after γ -irradiation. These are consistent with our previous results obtained by using the crude extract of intestine homogenate. Therefore, the crypt survival enhancing entities in intestine homogenate of mice are identified to be nucleic acids.

KEYWORDS Biological activity assay, Efficacious component, Nucleic acid, Irradiation, Intestinal gland recovery

(上接第30页 Continued from p 30)

THE EFFECT OF γ -RAY IRRADIATION ON PLASMID pBR 322 DNA

Zhou Lijun Fang Yunzhong Zhang Yangpei Wei Kang

(Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

ABSTRACT Using the agarose gel electrophoresis in combination with laser densitometer and recording integrator, the effect of γ -ray irradiation on plasmid pBR 322 was studied. It was found that the amount of supercoiled (SC) DNA decreased with the increase of irradiation dose, whereas the nicked circular (OC) DNA increased. Formate, a well known hydroxyl free radical scavenger, could decreased the radiosensitivity of the pBR 322 DNA, indicating that the effect of the ^{60}Co irradiation on plasmid was mainly attributable to the indirect action of radiation, Which is resulted from OH radical produced by the radiolysis of water, giving rise to single strand break of DNA.

KEYWORDS γ -irradiation, DNA damage, Plasmid pBR 322, Free radical scavenger