

## 二甲基黄诱发大白鼠肝癌癌变过程中的核酸分子杂交竞争抑制试验

关惠连 罗超权 杨英浩 戴瑞英

(生物化学教研室)

二甲基黄(DAB)诱发大白鼠肝癌癌变过程中食物因素对鼠肝核酸、磷脂的含量有影响,已见前述<sup>[1]</sup>。这可能是由于肝癌癌变过程中肝细胞核膜的通透性改变、基因表达的调控机理异常,和混合功能氧化酶系统的功能改变,文献也已陆续述及<sup>[2-6]</sup>。

为了进一步探讨DAB诱发肝癌的大白鼠肝脏核酸的变化,我们建立了肝细胞核与肝细胞质的分步分离,核酸的提取与纯化,核糖核酸(RNA)体外同位素碘标记及固相核酸分子杂交等技术,并作了正常鼠与DAB诱发肝癌的鼠肝核酸杂交竞争抑制试验,现报告如下。

### 材料与方 法

**实验动物** 大白鼠,雄性,体重150~200克。共分5组,每组20~30只:1组食入一般饲料(正常组),另4组分别食入含DAB 0.06%的饲料2、4、8、16周。观察肝癌癌变过程中肝脏核酸的变化。

**大白鼠肝细胞核的分步分离** 大白鼠饥饿24小时,重击头部,剪颈,放血,剖开腹部,用预冷的0.15M氯化钠—0.015M柠檬酸三钠(1×SSC)从门静脉灌注,冲洗肝脏内的血液,取出肝脏投入冷冻的1×SSC中浸洗,沥干,剪碎。按1:6比例加入冷冻的1×SSC,用电动玻璃匀浆器把肝细胞适度弄破,用双层洁净纱布滤过,再用双层尼龙布滤过。在2,000转/分,离心10分钟,吸取悬液的上2/3作细胞质核糖核酸(RNA)提取(在显微镜下观察此悬液无完整的细胞和细胞核),其余下层的1/3悬液弃去。沉淀(含细胞核)用10倍体积冷冻的1.5%柠檬酸液洗涤3次,离心。沉淀分散于0.25 M蔗糖—1.5%柠檬酸—0.003 M(CaCl<sub>2</sub>)溶液中,然后铺在盛有0.88 M蔗糖—1.5%柠檬酸—0.003 M CaCl<sub>2</sub>溶液中,界面轻轻搅动,造成粗糙的梯度,再离心,弃去悬液,沉淀用0.05 M(Tris-HCl)—0.15 M(NaCl), pH 7.5溶液洗2次,以解除细胞核的酸性环境。得出的肝细胞核用显微镜染色观察是完整的,平均每100个细胞核中只有少于5个完整细胞存在。

**DNA 提取** 从大白鼠肝细胞核提取DNA,根据Marmur<sup>[9]</sup>法和张玉砚等<sup>[10]</sup>的方法,但略有修改。将纯化的细胞核悬于0.05 M Tris-HCl—0.15 M NaCl, pH 7.5的溶

液中(按鲜肝1克,缓冲液1.2—1.5毫升的比例)。在搅拌下慢慢滴加25%十二烷基磺酸钠(SDS),使SDS最终浓度达1.6%;此时细胞核膜破裂,溶液由混浊变为清亮粘稠;再加入固体NaCl,使NaCl的最终浓度达1M;电动连续慢慢地搅拌1小时。加入等体积氯仿-异戊醇(24:1,V/V)混液,轻度摇动20分钟,7,000转/分,离心20分钟。蛋白质形成一混浊层分布在水相与氯仿相之界面处,小心地吸取上层水相,用氯仿-异戊醇重复去蛋白质1次,然后吸取上层水相,加2倍体积的冷冻无水乙醇,捞取DNA纤维。将DNA纤维溶于1/10×SSC中(一般在室温下2天以上才能完全溶解),再加入1/2体积氯仿-异戊醇,重复抽提约3~4次,加2倍体积冷冻无水乙醇,再捞取DNA纤维。

按上述过程制得的正常大白鼠肝细胞核DNA,其A<sup>260</sup>/A<sup>280</sup>比值为1.91~1.94, A<sup>260</sup>/A<sup>230</sup>比值为2.10~2.18,蛋白质污染<1%。将提纯的DNA冷冻干燥,一部分用1×SSC制成悬液,全部存放在低温冰箱内保存。

**RNA提取** 用热酚、SDS法<sup>[10,11]</sup>提取肝细胞核RNA(SDS的最终浓度为0.1%,提取细胞质RNA时为0.3%)。市售酵母RNA亦经上述方法提纯,SDS的最终浓度为0.3%。

制得的大白鼠肝细胞核RNA, A<sup>260</sup>/A<sup>280</sup>比值为1.98~2.18, A<sup>260</sup>/A<sup>230</sup>比值为1.94~2.12。大白鼠肝细胞质RNA, A<sup>260</sup>/A<sup>280</sup>比值为2.02~2.18, A<sup>260</sup>/A<sup>230</sup>比值1.98~2.36。RNA的蛋白质污染,一般<1.5%。蛋白质测定用Lowry等的Folin酚试剂法。测定时所用的蛋白质标准为上海东风厂出产的牛血清白蛋白,经过水分含量测定和用凯氏定氮法校正其确实含氮量。

**肝细胞核RNA体外(<sup>125</sup>I)标记** 根据Getz和张玉砚等的方法<sup>[4,12,13]</sup>。体外同位素碘标记所使用的三氯化铊(TlCl<sub>3</sub>)是实验者用TlCl(上海试剂厂)制成\*。同位素碘源由北京中国科学院原子核研究所提供(20~40毫居里/毫升, pH 7.5)。

经上述制备的<sup>125</sup>I-RNA的比放射活性为1.3~4.0×10<sup>5</sup>脉冲数/分钟/微克RNA;在核酸杂交实验中,硝酸纤维滤膜上的非特异性吸附物质为0.04~0.14%。表1与图1列出<sup>125</sup>I-RNA经过Sephadex-G50柱层析结果。

表1 <sup>125</sup>I标记RNA经Sephadex-G50层析分离

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
脉冲数*	676	1405	165150	72121	6927	55826	112977	21219	9474	2457	2966	2984
A <sub>260</sub>	0.000	0.000	∞	0.680	0.135	0.051	0.038	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000
备注	收集脉冲数和A <sub>260</sub> 均高的管号,混合,作核酸杂交试验用											

条件: Na<sup>125</sup>I 1.5毫居里,正常大白鼠肝细胞核RNA 1.5毫克。反应介质中含有:碘化钾(KI) 1.25×10<sup>-4</sup>M, TlCl<sub>3</sub> 4.4×10<sup>-3</sup>M。反应总容积1毫升。pH 5.0, 60°C温育20分钟。冷却,加入新鲜配制Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.05M,调至pH 8。经Sephadex-G50柱层析,蒸馏水洗脱,收集1毫升/分,5毫升/管。分别测定脉冲数和A<sub>260</sub>,作图。

\* γ-射线计数器,井上测定10秒的脉冲数。

\* “A”代表吸光率,下同。

\* 制备TlCl<sub>3</sub>的方法,为上海细胞生物学研究所张玉砚等同志提供。

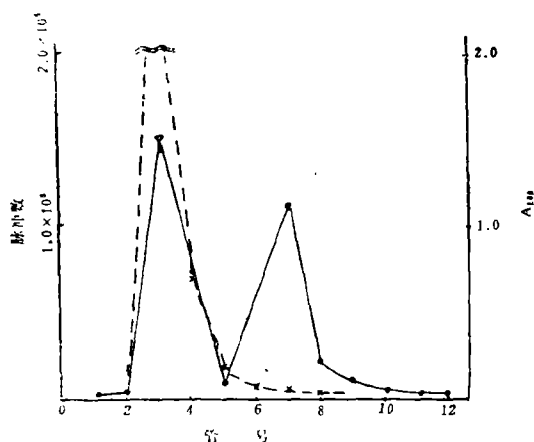


图1 Sephadex-G50 层析分离曲线

○——○ 脉冲数  
 ×——× A 260

**滤膜固相核酸分子杂交** DNA 滤膜制备根据 Church<sup>[14]</sup> 和张玉砚等<sup>[4]</sup> 的方法。滤膜是 Schleicher & Schuell 厂的硝酸纤维素滤膜(滤膜), 直径25 毫米, 孔径 0.45 微米。实验用小滤膜直径为 6 毫米, 每小片吸附单链 DNA 1.5 微克。

滤膜固相核酸分子杂交根据 Gillespie 和 Spiegelman<sup>[15]</sup> 张玉砚<sup>[4]</sup> 及 Bonner<sup>[16]</sup> 等的方法。每个实验重复 2~3 次。

## 实 验 结 果

### 一、杂交反应动力学和杂交特异性实验

(一) 反应温度 表 2 和图 2 显示出标记 RNA 与 DNA 在不同反应温度下的杂交率。当反应温度从室温升至 35℃ 时, <sup>125</sup>I-RNA-DNA 杂交率最大; 45℃ 开始下降; 在 45~55℃ 之间, 杂交率下降趋缓慢; 在 65℃ 杂交率最小。据文献报道<sup>[4,12]</sup> 在 35℃ <sup>125</sup>I-RNA 与 DNA 杂交的杂交率大大升高, 是由于非特异分子杂交引起的, 故本文选择 45℃ 作为核酸杂交的最适温度。

表 2 DNA 与 RNA 杂交反应温度

温度℃	25	35	45	55	65
脉冲数/分	33359	34579	21957	15502	2852

条件: 6 毫米的滤膜片中, 含有从正常大白鼠肝细胞核抽提的单链 DNA 1.5 微克, <sup>125</sup>I 标记的大白鼠肝细胞核 RNA 5 微克, 反应总容积 0.2 毫升中, 含有甲酰胺 30%, SDS 0.1%, 盐浓度为 2 × SSC, 分别置于 25℃、35℃、45℃、55℃、65℃, 温育 24 小时。

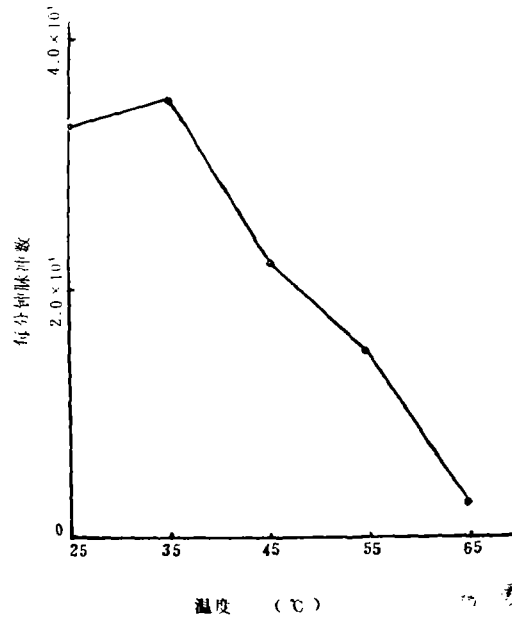


图2 DNA与RNA杂交温度曲线

(二) 反应时间 按上述杂交反应条件, 反应管温育的时间、核酸杂交与反应时间的关系, 如表3与图3所示。核酸杂交反应开始后, 随着时间延长, 核酸杂交率不断增加, 但温育至16小时以上时, 杂交率曲线已趋平缓, 即核酸杂交反应趋于饱和, 故选择20~24小时为杂交反应的最适时间。

表3 DNA与RNA杂交反应时间

反应时间(小时)	0	1	1.5	4	8	16	24
脉冲数/分	96	4469	5757	8076	13006	20951	21537

条件: 反应条件同表2, 在45°C分别温育, 2, 4, 8, 16, 20, 24小时。

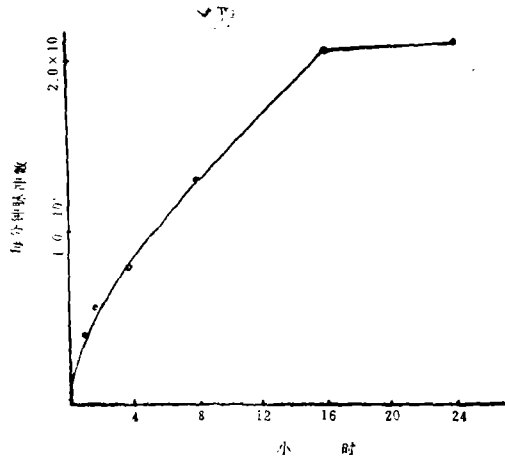


图3 DNA与RNA杂交的时间曲线

(三) 杂交饱和试验上述杂交反应条件下, 当 DNA 的量为一定时, 核酸的杂交率将随  $^{125}\text{I}$ -RNA 投入量的递增而递增, 但当  $^{125}\text{I}$ -RNA 的量增加至滤膜上能与它互补的 DNA 单链的核甙酸顺序已全部被加入的  $^{125}\text{I}$ -RNA 互补杂交时, 则虽继续添加  $^{125}\text{I}$ -RNA, 而 RNA 与 DNA 的杂交率亦不再增加, 此即表示核酸分子杂交已达到饱和。见表 4 图 4。

表 4 正常大白鼠肝细胞核 DNA 与同源的  $^{125}\text{I}$  标记的肝细胞核 RNA 杂交饱和试验

$^{125}\text{I}$ -RNA/DNA (微克)	1	2	4	6	8	12
杂交率(%)	1.6	3.3	5.4	6.8	8.1	8.6

条件: 反应管总容积 0.2 毫升中, 含有 30% 甲酰胺, 0.1% SDS, 盐浓度为  $2 \times \text{SSC}$ 。6 毫米直径的滤膜, 含正常大白鼠肝细胞核抽提的单链 DNA 2 微克, 逐步增加  $^{125}\text{I}$  标记的正常大白鼠肝细胞核 RNA 的浓度, 增加的  $^{125}\text{I}$ -RNA/DNA 的比值分别为 1、2、4、6、8、12。45°C, 温育 24 小时。

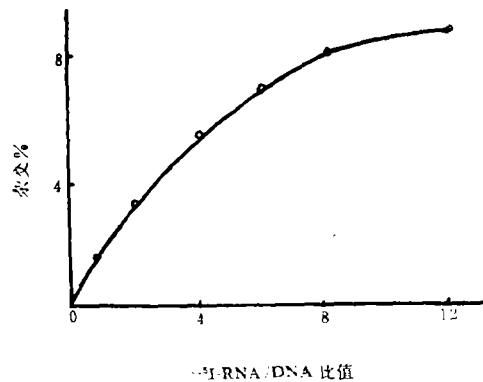


图 4 正常大白鼠肝细胞核 DNA 与同源  $^{125}\text{I}$  标记的肝细胞核 RNA 杂交饱和曲线

(四) 杂交特异性试验——杂交竞争抑制试验 在上述的条件下, 使参与杂交反应的各管中, DNA 与  $^{125}\text{I}$ -RNA 的量为一定, 分别加入不同数量的未标记的同源或异源 RNA 进行核酸杂交。如图 5 表 5 中, 加入的未标记的大白鼠肝细胞核 RNA 是同源 RNA, 未标记的肝细胞质 RNA 和酵母 RNA 是异源 RNA。试验结束时, 以不加入竞争 RNA 的  $^{125}\text{I}$ -RNA-DNA 杂交体的杂交率为 100%, 加入竞争 RNA 的  $^{125}\text{I}$ -RNA-DNA 杂交体作为剩余杂交百分率。因为在加入的竞争 RNA 分子中, 可能有一些核甙酸顺序能与固定在滤膜上的 DNA 单链的某些核甙酸顺序进行互补; 这样, 它就会排斥或竞争  $^{125}\text{I}$ -RNA 与 DNA 杂交体的形成; 但是, 那些吸附在滤膜上尚未形成杂交体的 DNA 碱基顺序, 仍然可以和  $^{125}\text{I}$ -RNA 构成杂交体。这样所形成的杂交体与对照相比, 便称为剩余杂交百分率。同源 RNA, 由于它的核甙酸排列顺序与参与杂交反应的  $^{125}\text{I}$ -RNA 的核甙酸顺序有一定程度的相似性, 竞争能力较强, 故杂交抑制试验的结果, 剩余杂交百分率一般

较小；反之，异源 RNA 的剩余杂交百分率就较大或完全不显示杂交竞争作用。

表 5 杂交反应的特异性

竞争 RNA 来源	竞争 RNA 量				
	0	100 (微克)	200 (微克)	400 (微克)	800 (微克)
正常大白鼠肝细胞核	100	18.1	10.8	5.0	4.7
正常大白鼠肝细胞质	100	84.0	81.0	77.7	75.7
酵母	100	97	99	101	106

条件：正常大白鼠肝细胞核抽提的单链 DNA 1.5 微克，与  $^{125}\text{I}$  标记的正常大白鼠肝细胞核 RNA 5 微克的杂交反应中，分别加入不同量的未标记的同源肝细胞核 RNA，正常大白鼠肝细胞质 RNA，以及酵母 RNA 进行竞争杂交试验。

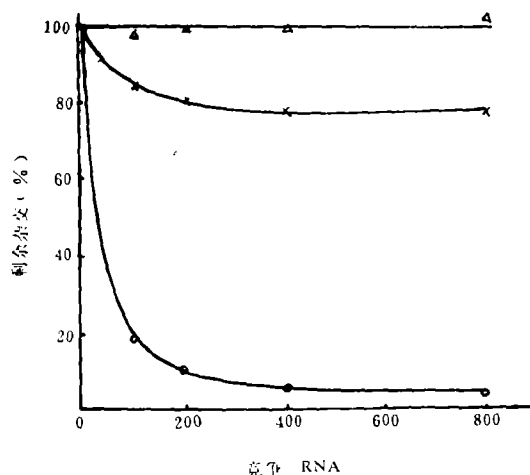


图 5 杂交反应的特异性曲线 反应条件见表 5

竞争 RNA:

○—○ 正常大白鼠肝细胞核 RNA

×—× 正常大白鼠肝细胞质 RNA

△—△ 酵母 RNA

表 5 图 5 说明核酸杂交实验具有严格的特异性。

## 二、DAB 诱发大白鼠肝癌变过程中的核酸杂交竞争抑制试验

DAB 诱发肝癌的大白鼠的核酸 (RNA-P, DNA-P) 和磷脂的含量与正常组不同，已见前述<sup>[1]</sup>，在此基础上，我们重复用含 DAB 0.06% 的饲料喂鼠 2、4、8 和 16 周，并按期杀鼠、取肝、分离提纯其细胞质和细胞核 RNA。进行核酸分子杂交竞争抑制试验。结果显示鼠肝的细胞核与细胞质 RNA 在大白鼠食入 DAB 2 与 4 周时，竞争抑制能力比较大。见表 6、7，图 6、7。

表 6 正常大白鼠肝细胞核 DNA 与 <sup>125</sup>I 标记的同源肝细胞核 RNA 杂交竞争抑制试验

竞争 RNA 来源	剩 余 杂 交 %				
	竞 争 RNA 量 (微克)				
	0	100	200	400	800
正常大白鼠肝细胞核 RNA	100	18.1	10.8	5.0	4.7
摄食 DAB 2 周大白鼠肝细胞核 RNA	100	12.5	9.4	3.4	3.8
摄食 DAB 4 周大白鼠肝细胞核 RNA	100	14.9	9.5	4.5	3.1
摄食 DAB 8 周大白鼠肝细胞核 RNA	100	16.2	9.2	7.2	7.3
摄食 DAB14 周大白鼠肝细胞核 RNA	100	19.1	12.1	8.6	7.9

条件：反应总容积 0.2 毫升中，含甲酰胺 30%，SDS 0.1%，盐浓度为 2×SSC，6 毫米的滤膜片含正常大白鼠肝细胞核抽提的单链 DNA 1.5 微克，<sup>125</sup>I-标记正常大白鼠肝细胞核 RNA 5 微克 (4.2~3.0×10<sup>5</sup> cpm/微克 RNA)，同时加入未标记的、不同量的正常大白鼠肝细胞核 RNA 和大白鼠摄食 DAB 不同时期的肝细胞核 RNA 进行竞争抑制试验，45℃，温育 24 小时。

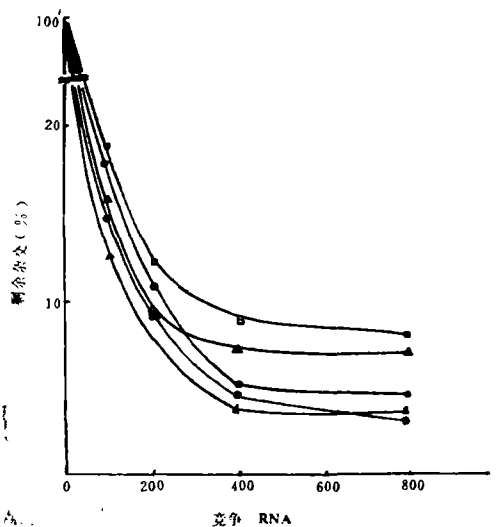


图 6 正常大白鼠肝细胞核 DNA 与 <sup>125</sup>I 标记的同源肝细胞核 RNA 杂交竞争抑制曲线

竞争 RNA:

- 正常大白鼠肝细胞核 RNA
- △—△ 大白鼠摄食 DAB 2 周的肝细胞核 RNA
- 大白鼠摄食 DAB 4 周的肝细胞核 RNA
- ▲—▲ 大白鼠摄食 DAB 8 周的肝细胞核 RNA
- 大白鼠摄食 DAB16 周的肝细胞核 RNA

表7 正常大白鼠肝细胞核 DNA 与<sup>125</sup>I 标记的  
正常大白鼠肝细胞核 RNA 杂交竞争抑制试验

竞争 RNA 来源	剩余杂交 %				
	竞争 RNA 量 (微克)				
	0	100	200	400	800
正常大白鼠肝细胞质 RNA	100	81.0	81.0	77.7	75.7
摄食 DAB 2 周大白鼠肝细胞质 RNA	100	83.9	78.1	68.1	56.6
摄食 DAB 4 周大白鼠肝细胞质 RNA	100	72.5	66.7	63.6	53.7
摄食 DAB 8 周大白鼠肝细胞质 RNA	100	87.8	84.3	70.6	70.4
摄食 DAB 16 周大白鼠肝细胞质 RNA	100	91.0	86.0	78.5	71.1

条件: 反应总容积0.2毫升, 含甲酰胺30%, SDS 0.1%, 盐浓度为2×SSC, 6毫米的滤膜片含正常大白鼠肝细胞核抽提的单链 DNA 1.5微克, <sup>125</sup>I 标记正常大白鼠肝细胞核 RNA 5微克。同时加入未标记的不同量的正常大白鼠肝细胞质 RNA 和 大白鼠摄食 DAB 不同时期的肝细胞质 RNA 进行竞争抑制试验。45℃, 温育24小时。

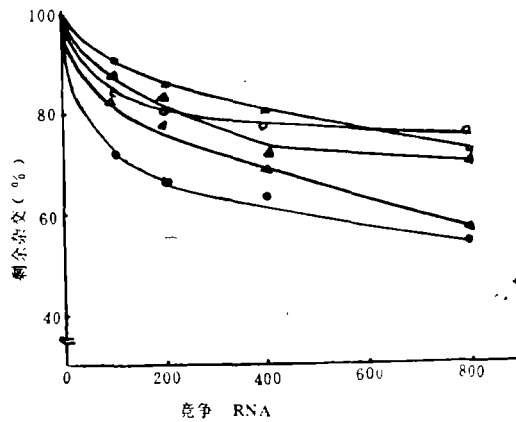


图7 正常大白鼠肝细胞核 DNA 与<sup>125</sup>I 标记的同源肝细胞核 RNA 杂交竞争抑制曲线

竞争 RNA:

- 正常大白鼠肝细胞质 RNA.
- △—△ 大白鼠摄食 DAB 2 周肝细胞质 RNA
- 大白鼠摄食 DAB 4 周肝细胞质 RNA
- ▲—▲ 大白鼠摄食 DAB 8 周肝细胞质 RNA
- 大白鼠摄食 DAB 16 周肝细胞质 RNA

## 讨 论 与 总 结

1. 从上述一系列技术试验结果看来, 我们分离提纯的核酸的纯度, 和文献上报道的约略接近<sup>[16,18]</sup>。

	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$	蛋白质污染
DNA	1.91~1.94	2.10~2.18	<1%
肝细胞核 RNA	1.98~2.18	1.94~2.12	<1.5%
肝细胞质 RNA	2.02~2.18	1.91~2.36	<1.5%

RNA 体外同位素碘标记,  $^{125}\text{I}$ -RNA 的比放射活性为  $1.3\sim 4.0 \times 10^5$  脉冲数/分钟/微克 (cpm/微克), 这个数值和张玉砚等所报道的接近<sup>[4]</sup>;  $^{125}\text{I}$ -RNA 在通过硝酸纤维滤膜时, 其非特异性吸附物质为 0.04~0.14%, 符合文献上的要求<sup>[17,19]</sup>

2. 我们在本文中进行了 DAB 诱发肝癌的大白鼠肝脏核酸杂交竞争抑制试验。从试验结果看来, 食入含 DAB 0.06% 的饲料 2~4 周的大白鼠的未标记的肝细胞核与细胞质 RNA 的杂交竞争抑制能力, 均较正常组强; 食入 DAB 8 周和超过 8 周以上的大白鼠肝的未标记细胞核 RNA 的杂交竞争抑制能力较弱, 但其细胞质 RNA 的杂交竞争抑制能力的则仍较强。这些现象可能提示: 在 DAB 诱发肝癌的早期, 鼠肝的 RNA 已发生质方力的变化。在致癌过程中, 在细胞核膜选择性运输细胞核内 RNA 到细胞质中去的机理方面也可能改变。但是, 致癌剂诱发肝癌的机理是复杂的: 致癌剂可能引起鼠肝的 DNA 转录水平基因调控失调<sup>[3]</sup>, 可能引起肝细胞核膜对细胞核内 RNA 选择运输的功能改变<sup>[2,3]</sup>, 也可能影响肝的混合功能氧化酶系统的生物转化功能紊乱<sup>[5,6]</sup>, 以及在致癌的肝细胞质中, 也可能有某些特异的能干扰细胞核 DNA 转录的大分子蛋白质存在<sup>[20,21,22]</sup>。上述几种因素可能同时起作用, 或者在不同阶段作用的侧重点有所不同。而且核酸分子杂交竞争抑制试验也仅仅是肿瘤研究的一个指标, 其本身还需要其它有关指标来加以说明<sup>[18,23,24]</sup>。在这样繁多的因素中, 我们将作进一步的探讨和研究。

(在建立方法的过程中, 蒙中国科学院上海细胞生物学研究所张玉砚等同志和本院放射医学教研室有关同志热情指导与帮助, 仅致谢忱。)

## 参 考 文 献

- [1] 关惠连 杨英浩: 在大白鼠低蛋白食料中添加全鸡蛋粉和胆碱对 DAB (二甲基黄) 诱发肝癌癌变及肝脏中核酸和磷脂的影响。中山医学院学报 2(1), 569, 1981
- [2] Shearer R W, et al: Alter regulation of the transport of RNA from nucleus to cytoplasm in rat hepatoma cells. *Cancer Res* 32:339, 1972
- [3] Shearer R W, et al: Irreversibility of the alteration in RNA transport induced by an azo-dye carcinogen in the rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 57:604, 1974 (through Chem Abstr 81:10328z, 1974)
- [4] 张玉砚等: 大白鼠肝癌发生过程基因转录调控机理的研究。1. 与 DNA 重复顺序互补的 RNA 的比较。实验生物学报 11:97, 1978

- [5] Paul O P Ts'o et al: *Chemical Carcinogenesis, Part A*, Marcel Dekker, Inc, New York, p 271, 1974
- [6] Miller J A: *Carcinogenesis by chemicals: an overview*-G H, A Clowes memorial lecture. *Cancer Res* 30:559, 1970
- [7] Wang T Y: The isolation and purification of mammalian cell nuclei. *Methods Enzymology* XII, Part A, p 417, 1967
- [8] Garret C T, et al: Competitive RNA-DNA hybridization of nuclear and microsomal RNA during diethyl-nitrosamine hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 33:1662, 1973
- [9] Marmur J: A procedure for the isolation of DNA from micro-organism. *J Mol Biol* 3:208, 1961
- [10] 张玉砚等: 核酸分子杂交技术的应用——比较小鼠腹水肝癌和正常肝 RNA。生物化学与生物物理进展 3:20, 1975
- [11] Scheer K, et al: Sedimentation characteristic of rapidly labeled RNA from HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 7:486, 1962
- [12] Getz M T, et al: The use of RNA labeled in vitro with iodine-I <sup>125</sup>I in molecular hybridization. *Biochem Biophys Acta* 287:485, 1972
- [13] Prensky W: The radioiodination of RNA and DNA to high specific activities, in *Molecular Techniques and Approaches in Developmental Biology*, editor: Chrispeels, M J, A Wiley-Interscience Publication, p 121, 1973
- [14] Church R B: Methods for the study of hybridization and reassociation of nucleic acids extracted from cells of high animals, *ibid*, p 223, 1973
- [15] Gillespie D, et al: A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on membrane. *J Mol Biol* 12:829, 1965
- [16] Bonner J, et al: A method for the hybridization of nucleic acid molecules at low temperature. *Biochem* 6:3,650, 1967
- [17] Gillespie D: The formation and detection of DNA-RNA hybrids. *Methods Enzymology*, XII, Part B, 641, 1968
- [18] Chattapahyay S K, et al: Qualitative and quantitative studies of AKR-type murine leukemia virus sequences in mouse DNA, *Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology* XXXIX, Part 2, 1,085, 1974
- [19] Church R B, et al: RNA synthesis in regenerating and embryonic liver. 1. The synthesis of new species of RNA during regeneration of mouse liver after partial hepatectomy. *J Mol Biol* 23:459, 1967
- [20] Drorokin G A et al: Nucleus-plasma in a cell-free system containing isolated nuclei of rat liver cells. *Mol Biol (Moscow)* 8:78, 1974 (through *Chem Abstr* 81:34660c, 1974)
- [21] Raju K S, et al: Isolation and characterization of a cytosol protein (64/7.2) present in large amount in rapidly growing hepatoma. *Cancer Res* 38:1,922, 1978
- [22] Christine B: Comparative studies on molecular hybridization of nuclear RNA synthesized by isolated rat liver nuclei effected of homologous and heterogenous cytosol. *Biochem Biophys Commun* 83:893, 1978
- [23] Grene R F, et al: Analysis of gene expression in regenerating rat liver by hy-

bridization of nuclear and cytoplasmic RNA and DNA. *Cancer Res* 37:118, 1977

[24] Pagano J S: The Epstein-Barr virus and malignancymolecular evidence. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology XXXIX, Part 2,797, 1974

## Competitive Inhibition of Nucleic Acid Molecular Hybridization Observed on Rats during DAB-hepatomized Process

Guan Weilian      Luo Chaoquan  
Yang Yinghao     Dai Ruiying

(Department of Biochemistry, Zhong Shan Medical College)

### Abstract

1. Despite the limitations of our laboratory facilities we have managed to acquire through self-reliance and aids from our brethren a series of techniques of isolating and purifying the cell nuclei as well as nucleic acids from rat livers and the techniques of labelling the RNA isolated with  $^{125}\text{I}$  (iodine-125) in vitro, and that of performing nucleic acid molecular hybridization, etc.

The purity of the nuclei isolated is observed under the visual microscope and it was found that there is less than 5 intact cells per 100 nuclei.

The absorbent ratios of  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ ,  $\frac{A_{260}}{A_{230}}$ , and protein contamination of the nucleic acids isolated are as follows:

	$\frac{A_{260}}{A_{280}}$	$\frac{A_{260}}{A_{230}}$	protein-contamination(%)
DNA	1.91—1.94	2.10—2.18	1
RNA (nuclear)	1.98—2.18	1.94—2.12	<1.5
RNA (Cytoplasmic)	2.02—2.18	1.91—2.36	<1.5

The specific radioactivity of the  $^{125}\text{I}$ -RNA prepared is  $1.3-4.0 \times 10^5$  cpm per microgram. The noise absorbed on the nitrocellulose filter is 0.04-0.14% of the RNA input.

2. RNA-DNA hybridization technique has been used to identify the differences between the qualities of the RNAs isolated from normal rats and from the DAB-hepatomized rats. The results obtained show that the competitive capacities of the non-labelled nuclear RNA and cytoplasmic RNA of rats fed 2 weeks with DAB-

containing diet are higher than those of the normal, while the capacities of the nuclear RNA of rats fed 8 weeks or more are lower than those of the normal. However the capacities of the plasmic RNA of these rats are higher than those of the normal.

3. Since the mechanisms of the chemical carcinogenesis are so complicated and our research work is just at the beginning, before any definite conclusion can be reached, a lot of work have to be done.