

琼脂糖凝胶直接杂交法

金顺钱 张伟

(中国医学科学院肿瘤研究所, 北京 100021)

关键词: DNA 印迹 (Southern blot) 杂交, 琼脂糖凝胶

DNA 印迹 (Southern blot) 杂交法是研究 DNA 分子结构, 变异及其组成的一种分子生物学技术。自 1975 年^[1]问世以来, 在分子生物学, 遗传学及分子病毒学等研究领域得到广泛应用, 对这些学科的发展起了重要作用。由于该技术均需要首先将电泳后已变性的 DNA 从琼脂糖凝胶转移至支持膜上, 因此, 实验结果的好坏很大程度取决于吸印的效果, 同时也受支持物吸附能力的影响。另外作为支持物的硝酸纤维薄膜或尼龙膜价格昂贵, 因此我们考虑用电泳后的琼脂糖凝胶不经吸印直接进行杂交来代替经典的 DNA 印迹杂交方法, 并在这方面进行了尝试, 取得了较为理想的结果。

1 材料和方法

1.1 电泳 人乳头瘤病毒 16 型 DNA (HPV-16) 经 Bam HI 或 Pst I 酶切后, 在 1.2% 琼脂糖 (Sigma VII) 凝胶支持物上电泳, 电泳条件 40V, 6h。

1.2 DNA 变性 凝胶浸入 DNA 变性液中 (0.5 mol/L NaOH, 1.5 mol/L NaCl), 处理 30min。再将

其置于中和液中 (1.0 mol/L Tris-Cl pH8.0, 1.5 mol/L NaCl) 30min。

1.3 凝胶干燥^[2] 取出凝胶, 将其平放在滤纸上, 保鲜膜封盖在凝胶上, 置于真空凝胶干燥器中, 室温抽真空 30min 后, 65℃ 继续抽干 30min。这时凝胶成为干燥的胶膜 (10cm × 8cm)。

1.4 预杂交及杂交 将胶膜浸入蒸馏水中浸泡 5min, 从滤纸上轻轻剥离, 装入杂交袋, 按 200μl/cm² 胶膜量加入预杂交液 (0.1% SDS, 5 × SSPE, 100μg/ml 变性鱼精 DNA) 30ml, 65℃ 水浴保温 4h, 弃去预杂交液, 并加入原 1/2 体积的杂交液 15ml, 同时加入变性的经 ³²P-dCTP 标记的 HPV-16 DNA 探针 (探针浓度 2 × 10⁶cpm/ml), 65℃ 杂交过夜。杂交时可轻轻摇晃杂交袋。

1.5 洗膜 用 6 × SSC 溶液按下列次序洗涤胶膜 6 次。室温 2 次, 每次 1h; 65℃ 2 次, 每次 5min; 又在

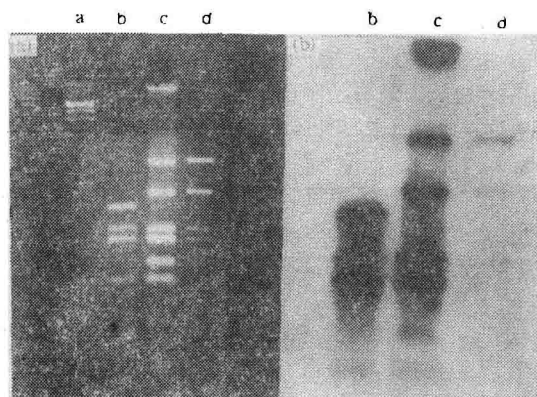


图 1 DNA 电泳 (a) 及胶杂交 (b) 结果
a. λDNA/Hind III 片段; b. HPV 16F/BamHI + Pst I 酶切片段; c. HPV 16Z/BamHI + Pst I 酶切片段; d. HPV 16/BamHI + Pst I 酶切片段; 1.2% agarose 胶电泳后, 干燥成膜, 以 ³²P-dCTP 标记 HPV DNA 探针进行杂交



图 2 胶杂交敏感性实验结果
HPV 16 DNA 经 Bam HI 及 Pst I 酶切后, 系列稀释后, 经 1.2% agarose 电泳再干燥成膜, 以 HPV 16 DNA 探针与其杂交。a—d 为不同 HPV DNA 稀释度, 分别是 50ng, 5ng, 500pg, 50pg

室温洗 2 次,每次 30 min。

1.6 曝光 将胶膜置滤纸上,晾干后用保鲜膜加封,用 X 光片在 -70°C 曝光 2—4 h,得到放射自显影结果。

2 结果与讨论

采用琼脂糖凝胶杂交法得到了比较满意的结果,它具有如下特点:

2.1 用本法取得的杂交结果具有带型清楚,整齐等特点,X 光片显影背景低(见图 1)。本方法敏感度达 50 pg(见图 2)。其总体杂交效果可与 DNA 印迹杂交相媲美。

2.2 方法简便,省时。本方法采用琼脂糖凝胶电泳后抽干成膜代替硝酸纤维薄膜或尼龙膜,不仅省略了繁琐的吸印步骤,而且减少了曝光时间。使实验周期由原来的 10 d 减为 2 d。

2.3 节省材料,本实验以价格低廉的琼脂糖凝胶代替价格昂贵的硝酸纤维膜或尼龙膜,具有一定的经济效益。

2.4 DNA 带型不扩散,虽然核酸在胶膜中与琼脂糖分子结合疏松,不如在常用杂交膜上那样牢固,但核酸位于胶膜中间,经 65°C 固定后,不易发生 DNA 分子的扩散或逃逸。

本文介绍了 DNA 印迹杂交替代法,与经典的 DNA 印迹法比较,具有许多独到之处。它不仅节约实验器材和时间,而且还有操作简单方便等特点。可在条件较差的实验室完成 DNA 杂交实验。

参 考 文 献

- 1 Southern E M. *J Mol Biol*, 1975; 98: 503
- 2 Fabric D. *Molecular and Cellular Probes*, 1990; 4: 53

酶偶联法尿素氮测定最适条件的探讨

宋耀虹 李学仁 马德均 林其颢

(北京协和医院,北京 100730)

关键词 血尿素氮,脲酶,谷氨酸脱氢酶

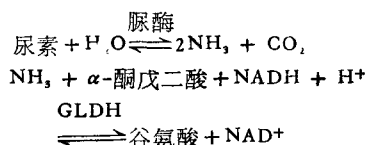
血尿素氮(BUN)测定是临床上检查肾功能最常用的指标之一。其测定方法有比色法和酶法二类,用脲酶检测又可配以各种技术,如电化学法测定 CO_2 和 NH_3 的释放^[1,2],比色法^[3]或酶偶联法^[4],另外还可采用固定化脲酶的酶电极^[5]和酶试纸^[6]。本文是采用脲酶、谷氨酸脱氢酶偶联反应测定 BUN,此法具有特异性高、快速、准确、可使用单一试剂、便于自动分析等特点。

1 材料与方 法

1.1 试剂 谷氨酸脱氢酶(GLDH),腺苷二磷酸(ADP)均为中国科学院生物物理所生化试剂厂产品;脲酶,四川省生化试剂一厂产品;还原型辅酶 I(NADH_2),中国科学院上海生化所东风试剂厂; α -酮戊二酸,生化试剂,中国科学院微生物所;三羟甲基甲烷(Tris),成都化学试剂厂产品。

1.2 仪器 自动生化分析仪 PACER(美国 Ames 公司);ENCORE(美国 Baker 公司);连续流动式自动生化分析仪 SMA PLUS(日本 Technicon 公司)。

1.3 方法 酶偶联法测定尿素氮的原理如下:



在相同条件下,测定空白、标准和样品的 340 nm 吸光度下降程度,然后按下式计算样品中尿素氮的含量。

$$C_{\text{样品}} = \frac{\Delta A_{\text{样品}}}{\Delta A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}}$$

式中 $C_{\text{标准}}$ 为标准液浓度 (mg/dL); $C_{\text{样品}}$ 为未知样品中 BUN 的浓度 (mg/dL); ΔA 为线性范围内一定时间的吸光度差值。

2 实验结果

2.1 脲酶及谷氨酸脱氢酶用量的选择 首先作不同活性单位 GLDH 对 NADH_2 氧化速率的影响,其反应条件为:缓冲液 pH 8.0, 110 mmol/L Tris-HCl; α -酮戊二酸 12 mmol/L; NADH , 0.25 mmol/L; 脲酶