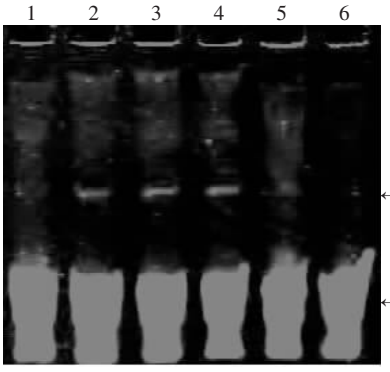


图 1　微波处理后的 STAT3 与 DNA 的结合活性

3　讨论

凝胶迁移或电泳迁移率实验是一种研究 DNA 结合蛋白和其相关的 DNA 结合序列相互作用的技术,可用于定性和定量分析。既往的实验通常将纯化的蛋白和细胞粗提液和^{32}P 同位素标记的 DNA 或 RNA 探针一同孵育,在非变性的聚丙烯凝胶电泳上,分离复合物和非结合的探针。DNA-复合物或 RNA-复合物比非结合的探针移动得慢。同位素标记的探针依据研究的结合蛋白的不同,可是双链或者是单链。当检测如转录调控因子一类竞争实验中采用含蛋白结合序列的 DNA 或 RNA 片段和寡核苷酸片段(特异),和其它非相关的片段(非特异),来确定 DNA 或 RNA 结合蛋白的特异性。在竞争的特异和非特异片段的存在下,依据复合物的特点和强度来确定特异结合[2]。在制备同位素标记的 DNA 或 RNA 方面, DNA 核苷酸探针一般用 g-^{32}P 和 T_4 多核苷酸激酶来作末端标记,同位素标记的 RNA 用噬菌体 RNA 聚合酶和同位素标记的核苷酸在体外合成。在结合蛋白和同位素标记的探针作用后,在非变性的聚丙烯凝胶电泳上,分离复合物,随后将凝胶干燥并放射自显影分析[3]。这种传统的实验方法广泛应用于各种实验室。

LI-COR 生命科学公司的 ODYSSEY 的红外成像检测系统,主要用于双色 Western blot,凝胶 Western blot,微孔板 In-cell Western 分析,蛋白磷酸化双色分析,考马斯亮蓝蛋白凝胶分析,蛋白核酸相互作用检测,2-D 蛋白凝胶分析, BCA 文库分析,cDNA 微阵列分析等[4,5]。本实验利用 ODYSSEY 的红外成像检测系统这-先进的技术平台,将 LI-COR 公司研发的近红外荧光染料标记的 DNA 探针直接和蛋白结合,将抗体通过免疫反应结合到蛋白上,从而使细胞内的蛋白活性具有可见性。

一般的荧光染料激发和检测波长位于可见光范围内,易产生高背景荧光干扰,而红外波长下,常用的膜,生物分子或者药物化合物几乎不发光,这是红外荧光检测的一大优势。良好的信噪比使得该检测方法能够检测出微小的变化。ODYSSEY 红外成像检测系统检测 DNA 结合蛋白的特点在于,拥有高灵敏度,低背景,方法实用简单,大大缩短了实验时间,而且保证了实验人员避免接触同位素和化学荧光燃料的危险。

相比较以往的实验方法,我们的技术具有稳定性好,操作简单方便,结果可靠等非常明显的技术优势。说明我们采用的这一方法是一种非常理想的检测转录分子活性的好方法。

关键词: EMSA;优化;红外

中图法分类号: R394-33　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] Wolf S S, Hopley J G, Schweizer M. The application of ^{33}P-labeling in the electrophoretic mobility shift assay[J]. Biotechniques, 1994, 16(4): 590 - 592.

[2] Chuang Y J, Huang J W, Makamba H, *et al*. Electrophoretic mobility shift assay on poly(ethylene glycol)-modified glass microchips for the study of estrogen responsive element binding[J]. Electrophoresis, 2006, 27(21): 4158 - 4165.

[3] Moxley R A, Jarrett H W. Oligonucleotide trapping method for transcription factor purification systematic optimization using electrophoretic mobility shift assay[J]. J Chromatogr A, 2005, 1070(1-2): 23 - 34.

[4] Geddie M L, O'Loughlin T L, Woods K K, *et al*. Rational design of p53, an intrinsically unstructured protein, for the fabrication of novel molecular sensors[J]. J Biol Chem, 2005, 280(42): 35641 - 35646.

[5] Li Y, Ahmed F, Ali S, *et al*. Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(15): 6934 - 6942.

(编辑　栾　嘉)

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神,血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg),但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡](kPa)的换算系数(1 mmHg = 0.133 kPa)。

本刊编辑部