DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.02.025

关键词 疾病模型,动物;脑缺血;栓塞

参考文献

1. Julio H, Carcia MD. Experimental ischemic stroke:a reriew. Stroke,1984;15:5～11
2. Okada Y,Shima T,Yamamoto Y,et al. Regional cerebral blood flow, sensory evoked potentials and intracranial pressure in dogs with MCA occlusion by embolization or trapping. J. Neurosurg,1983;58:500～507
3. Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologicin changes in a new rat model of middle cerebral artery occlution. Stroke,1989;20:1037～1042
4. Alfonso M,Bremer MD,Robert S,et al. Artificial embolization of the middle cerebral artery in primates. Stroke,1975;6:387～390
5. Smith AL,Hoff JT,Nielsen SL,et al. Barbitarate protection in acate focal cerebral carotid artery. Surgery,1969;65:862～865
6. 赵卫国 张天锡。兔 MCA-O 型局灶脑缺血模型的建立。中国神经精神疾病杂志,1990;16:143～145
7. 贾 兰 游国雄。脑缺血急性期血液流变改变的机制探讨和临床意义。国际脑血管病学术研讨会汇编资料(唐山),1991:44
8. 周定标。脑底动脉环的穿通支。国外医学:神经病学及神经外科病学分册,1989;16(1):3～5
9. 赵合庆。脑梗塞的血流再开通。国外医学:神经病学及神经外科病学分册,1989;16(2):59～61
10. 顾正中。脑循环与临床。上海:上海科技出版社,1982:12

(收稿:1992-12-10;修回:1993-03-03)

一种生物素探针杂交技术

姚家慧 陈鸿书 (第三军医大学基础部分子生物学实验室) 630038

生物素标记的 DNA 探针由于其稳定、便宜及非放射性特点而日益受到重视。为提高生物素探针灵敏度,Gregersen 等[1]和 Chan 等[2]均做了较多工作。本文综合两者之所长,并作部分修改,建立了一套生物素探针标记、杂交及检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

含 1.8kb c-myc cDNA 与 pBR322 重组质粒的大肠杆菌菌株(HB101)(上海肿瘤研究所提供);碱性磷酸酶标记的抗生物素蛋白(AAP)(Sigma);DNase Ⅰ、DNA 聚合酶Ⅰ、非标记的 dNTP(华美生物工程公司);Bio-11-dUTP(北京医科大学药厂)。

1.2 生物素 DNA 探针的制备

提取的质粒 DNA 用二步缺口翻译法[3]标记:1μl DNA(0.1～0.5μg)、1μl 3×NT 缓冲液[1×NT:5mmol/L Tris-HCl,10mmol/L $MgSO_4$,0.1mmol/L DTT,0.05% BSA(W/V),pH 7.5]、0.3u DNase Ⅰ,加水至 3μl,混匀,37℃保温 15min。加入 6u DNA 聚合酶Ⅰ,5.7μl 10×NT,加 dCTP、dATP、dGTP 及 Bio-11-dUTP水溶液使终浓度均为20μmol/L,加水至终体积为60μl,14℃保温2h或更长时间。加 EDTA(pH8.0)终止液,终浓度为 10mmol/L。标记好的探针不必纯化而可直接进行以下实验。

1.3 在硝酸纤维素滤膜(NC 膜)上点样

质粒 DNA 或生物素标记 DNA 用含载体 DNA 的 2×SSC(1×SSC:0.15mol/L NaCl,0.015mol/L 柠檬酸钠,pH 7.0)梯度稀释后热变性,点在 20×SSC 处理过的 NC 膜上,80℃真空烘烤 1 h。

1.4 斑点杂交

制好的膜放入预杂交液[50%甲酰胺,5×SSPE,5×Denhardts 溶液(不含 BSA),0.1% SDS,100μg/ml 载体 DNA],42℃保温 4 h;转入杂交液(预杂交液中加入探针,探针终浓度 150ng/ml),保

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

温 4～20 h，杂交液使用前在 70℃保温 30mim 使探针变性。杂交后用 2×SSC/0.1% SDS 将膜简单漂洗几下，再用该液漂洗 3×5min；0.25×SSC/0.1% SDS 漂洗 3×5min，最后用该液在 55℃漂洗 3×15min。

1.5 生物素探针的检测

烘好的点有生物素探针的 NC 膜或者杂交后漂洗过的膜在 37℃的"封闭液"[100mmol/L NaCl，100mmol/L Tris-HCl，3mmol/L $MgCl_2$，0.5% Tween 20(v/v)，pH9.0]中振荡保温 1h 后装入塑料袋中，加入 AAP 浓度为 1μg/ml 的"温育液"[类似"封闭液"，但只含 0.05% Tween 20(V/V)，用量为 3～4ml/100cm²]，反应 20min。趁湿将膜在"封闭液"中漂洗 3×15min，随后在"显色液"(100mmol/L Na-HCl，100mmol/L Tris · Cl，10mmol/L $MgCl_2$，pH9.6)中漂洗 2×5min，最后在"底物液"(含有 330μg/ml N-硝基四氮唑蓝和 167μg/ml 5-溴-4-氯-3-吲哚乙酸的"显色液")中闭光显色 10min 至 4h 或更长时间。

2 结果及讨论

2.1 探针制备及灵敏度检测

用二步缺口翻译法标记 0.5μg 质粒 DNA，可重复得到灵敏度高且非常恒定的生物素探针，说明此法可靠、易掌握。

用 AAP 系统测定生物素探针灵敏度，最小检出量可达 1pg，对照未显色，且本底较低。探针存放 1 年后重复测定，其最小检出量不变，显示了良好的稳定性和重复性。

2.2 斑点杂交

以 Bio-11-dUTP 标记的含 c-myc cDNA 的重组质粒 DNA 为探针，与未标记的系列浓度的重组质粒 DNA 进行斑点杂交，最小检出量可达 10pg 左右，对照点未显色，且本底低。杂交液重复使用多次杂交灵敏度不变，不过使用前应在 70℃保温使探针完全变性。生物素探针的使用浓度也较大，因为生物素探针对 NC 膜的非特异吸附比同位素小得多，这样杂交时间可大大缩短[4]。可见生物素探针经济、省时。

2.3 杂交结果的检测

生物素探针灵敏度和特异性的提高主要依赖于检测技术的提高。本文在以下三方面采用了改良措施：①选用简单且灵敏度较高的 AAP 系统，杂交终止后显色时间不超过 5 h；②AAP 温育斑点的缓冲液 pH 改用 9.0，而不用通常的 7.5[4]，使信噪比得到实质性提高；③用 Tween 20 代替 BSA 作为封膜试剂，可以更有效地封闭背景。

关键词 Bio-11-dUTP；DNA 探针；

参考文献

1. Gregersen N，Koch J，KØlvraa S，et al. Improved methods for the detection of unique sequences in Southern blots of mammalian DNA by non-radioactive biotinylated DNA hybridization probes. Clin Chim Acta，1987；169：267
2. Chan VTW，Fleming KA，McGee JOD. Detection of subpicogram quantities of specific DNA sequences on blot hybridization with biotinylated probes. Nucl Acid Res，1985；13：8083
3. Koch J，KØlvraa S，Bolund L. An improved method for labelling of DNA probes by nick-translation. Nucl Acid Res，1986；14：7132
4. Leary EJ，Brigati DJ，Ward DC. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose：Bio-blots. Proc Natl Acad Sci USA，1983；80：4045

(收稿：1992-03-10；修回：1992-09-16)

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net