

# EBIOTECH

生物通技术周刊

第54期

2009年1月7日

全文下载

## 〔技术前沿〕

iPS技术的前世今生

如何选购凝胶成像系统？

## 〔聚焦2008技术突破〕

膜蛋白的晶体结构

成像到底有多深？

miRNA靶点预测

定量蛋白质组学

## 〔2008新品回顾〕

2008新品回顾之小分子RNA篇

2008新品回顾之表达系统篇

2008年最受人关注的创新产品

## 〔新品速递〕

干细胞的研究利器

安捷伦推出最灵敏的TOF LC/MS

Bio-Rad推出高通量的CFX384实时定量PCR仪

Invitrogen发布新产品，简化了新一代测序的样品制备

## 〔行业动态〕

北京基因组研究所再添8台SOLiD

生命科技公司将利用人胚胎干细胞构建疾病模型

主办：



生物通版权所有 谢绝转载 本期责编:余亮 制作:吴春红  
广告联系电话:020-87511980 欢迎访问:www.ebiotrade.com

# iPS 技术的前世今生

早在 20 世纪 50 年代，我们通过 John Gurdon 等人的实验就已经得知卵细胞质能重编程体细胞核。<sup>1</sup> 这些实验是为了解决分化细胞的基因组是否经历了不可逆转的变化，以及是否不再支持早期发育这些问题而进行的。Gurdon 的实验表明并非如此，蝌蚪的分化细胞的细胞核在移植进入卵母细胞质中后，能指导卵细胞发育为性成熟成体青蛙。<sup>2</sup> 尽管发生在 50 年前的重组 DNA 前时代，这些早期的核转移或克隆实验还是引起了报刊上关于克隆人可能性的猜测。

几乎在同一时期，McCullough 和 Till 证实了单个的骨髓来源细胞能产生多种造血细胞类型，<sup>3</sup> 这是干细胞领域的重大发现。二十年后，发现了能生成体小鼠所有组织类型的胚胎干细胞（ES）。<sup>4,5</sup> 细胞核转移和干细胞这两个各自迷人的领域，在 2006 年发生了非常引人注目的碰撞。一些重大的发现为这次事件铺平了道路。正如两栖动物中一样，细胞核移植进入小鼠卵母细胞后表明体细胞核重编程成为多能状态。<sup>6</sup> Tada 等发现不止是卵细胞质，胚胎干细胞质在核移植细胞融合后也能重编程体细胞核。<sup>7</sup> 发育生物学的研究随后鉴定了一组在胚胎干细胞和其他多能细胞类型特异表达的基因，这些基因可以认为是决定细胞多能状态的候选基因。

细胞即使是放置在早期发育环境如卵中，也不能够指导早期胚胎发育。这些实验也被称为体细胞核转移（SCNT）或克隆。实际上，蝌蚪的肠细胞核在置于摘除细胞核的青蛙卵母细胞中时，能够支持整个发育过程直至形成一个成熟的青蛙。这个过程，也就是卵细胞质中存在的因子改变了基因表达的模式，将已分化的细胞核转变成成为未分化细胞核的过程，称之为重编程。其中涉及的变化是表观遗传的，包括 DNA 甲基化的改变、组蛋白修饰和染色质结构。

B. 后来，将成体卵丘细胞的核注入去核的小鼠卵母细胞产生了克隆小鼠。如同青蛙实验一样，卵丘细胞核重编程成为多能状态，能支持完整的发育。

C. 重要的是，重编程体细胞核的能力不仅仅限于卵细胞质，如成体小鼠胸腺细胞与胚胎干细胞融合。

实验所示。尽管重编程不完全，但体细胞核中存在的 Oct-3/4 绿色荧光蛋白（GFP）在杂交细胞中表达，而在未融合的亲代胸腺细胞中不表达。

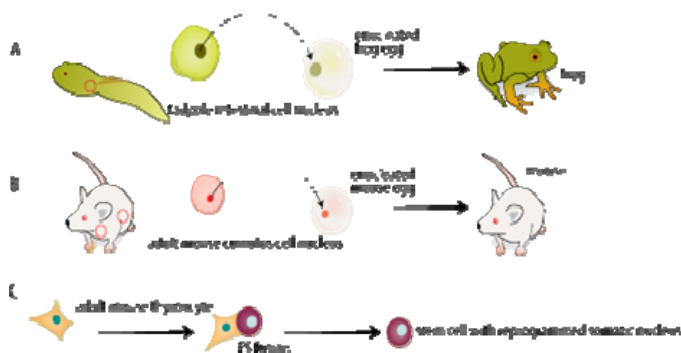


图 1. 细胞核重编程

A. 在 20 世纪 50 年代，发育生物学家着手做实验来研究细胞分化是否涉及 DNA 水平的永久改变。如果是这样，他们推断，分化细胞的细

## 通过确定的细胞因子诱导细胞多能性

在 2006 年，Takahashi 和 Yamanaka 推断胚胎干细胞特异的基因产物或许可以替代胚胎干细胞质，重编程体细胞核返回多能状态。为了验

证这个假说，他们利用反转录病毒表达载体在体细胞内过表达 24 个候选基因。<sup>9</sup> 为了确保罕见的重编程事件能被检测到，他们开发了一种分析系统，其中胚胎干细胞/早期胚胎特异的 **Fbx15** 基因激活将使细胞产生抗药性。起始的体细胞群（小鼠胚胎成纤维细胞，MEF）因为 **Fbx15** 基因不表达，药物筛选杀死了全部细胞。接着他们向小鼠胚胎成纤维细胞中分别转导了 24 个候选基因，还是没有获得具抗药性的细胞。然而，当 24 个候选基因一起转导，研究人员确实分离到了具抗药性的细胞克隆。其中某些克隆表现出与胚胎干细胞类似的形态和增殖特征。进一步分析证实了它们丧失了成纤维细胞特异的基因表达，而获得了胚胎干细胞标志物基因的表达，包括 **Oct-3/4**、**Nanog**、**Cripto**、**Dax1** 和 **FGF4**。通过挨个抽离 24 个因子中的单个因子，他们最后鉴定出克隆形成必需的 10 个因子。第二轮又从这 10 个因子中逐个抽出单个因子，最终将必需因子的范围缩小至 4 个：**Oct-3/4**、**KLF4**、**SOX2** 和 **c-Myc**。**Takahashi** 和 **Yamanaka** 将这些细胞命名为 iPS 细胞，即诱导多能干细胞。为了检验这些细胞在功能上是否具有多能性，他们将 iPS 细胞皮下注射入裸鼠来产生畸胎瘤。一般来说，细胞形成的畸胎瘤形成具全部三个胚层（外胚层、中胚层和内胚层）特征的组织被认为是细胞多能性的可靠分析。4 种因子诱导产生的大多数 iPS 细胞表现出了此种多能性。然而，小鼠系统中多能性的最终明确鉴定是：将这些细胞注入小鼠囊胚中，能形成包含正常胚胎所有组织的嵌合体。在这些独创的 iPS 细胞的嵌合体分析中，在胚胎第 13 天可发现具备 iPS 发展出来的三个胚层组织的胚胎。但是，没有获得存活的嵌合体小鼠。

这篇里程碑式的论文让学术界为之振奋，同时也引发了一些有趣的问题。例如，作者根据基因表达分析和嵌合体分析中的行为断定 iPS 细胞类似但不等同于胚胎干细胞。那么这两种细胞类

型的关系是什么呢？另一个问题有关获得 iPS 克隆的低频率，提出了一种可能性——稀有的成体干细胞是唯一一种能诱导成更多多能性状态的细胞。尽管他们观察到从富集较多成体干细胞的细胞群如小鼠骨髓基质获得 iPS 诱导频率与原来相仿，这显然与该模型相悖，但他们的文章并没有解决这个问题。

产生与胚胎干细胞更加类似的 iPS 细胞的关键是改变筛选基因。三个独立的小组（包括山中伸弥）采用这种方法，产生了三种 iPS 细胞。通过全局基因表达模式和嵌合体分析，这三种细胞本质上非常接近小鼠胚胎干细胞。<sup>10-12</sup> **Okita** 等利用 **Nanog** 的激活来取代 **Fbx15** 作为筛选标记，推测筛选更严谨的标准应该是激活多能性的必需基因（**Nanog**），而不是非必需基因（**Fbx15**）。10 与 **Fbx15** 表达选择的 iPS 细胞相比，**Nanog** iPS 细胞表达了更高水平的关键胚胎干细胞标志物基因，包括内源的 **Nanog** 基因，**E-ras**，**Esg1** 和 **Rex1**。另外，**Nanog** 筛选获得的 iPS 细胞能更有效地沉默用于诱导 iPS 表型的反转录载体，由于已知胚胎干细胞能沉默反转录病毒序列，这提示 **Nanog** 筛选细胞与胚胎干细胞更相似。**Fbx15** 与 **Nanog** 筛选细胞的其他不同还包括 **Nanog** 筛选获得克隆的频率比 **Fbx15** 低 10 倍；但稳定性更高。更重要的是，与 **Fbx15** 选择的 iPS 细胞相比，**Nanog** 筛选的细胞更有利于嵌合体形成，它们不但出生还能存活至成年期，甚至繁殖种系并传递到下一代。然而，这个嵌合体分析表现的显著提高却带来了 4 因子重编程方案的一个关键缺陷，由于 **c-Myc** 反转录病毒的再活化，大约 20% 的 F1 小鼠形成了肿瘤。

**Wernig** 等利用 **Nanog** 以及 **Oct-3/4** 的激活作为选择标记，得到了与 **Okita** 等类似的结果：获得从表型上和功能上相当于小鼠胚胎干细胞的 iPS 的几率为 0.1%。<sup>11</sup> 作者就 iPS 细胞的表现

遗传状态进行了进一步的分析，表明组蛋白修饰的模式更接近于胚胎干细胞，而与分化的体细胞相反。他们还证实了 iPS 内确实发生了反转录病毒转基因沉默（同胚胎干细胞），推测这是 iPS 细胞在体外或嵌合体胚胎环境中分化所必需的。这个小组还获得了嵌合体成体并可进行种系传代，但没有报道肿瘤形成。

Maherali 等也利用 Nanog 的激活作为筛选标记，证实 X 染色体在重编程中的再激活，和 iPS 细胞株在分化中的随机 X 失活。<sup>12</sup> 这个小组也获得了高比例的种系嵌合体。

以上三个小组的数据得出了两个关键结论。第一，4 个重编程因子的表达只是瞬时需要，因为 iPS 细胞沉默了转基因表达后依然维持了 iPS 表型。显然，这是由于多能性相关基因的内源拷贝被激活。第二个关键结论是：重编程是一个有着中间阶段的渐进过程。例如，Fbx15 选择的细胞似乎是部分而不是全部重编程了。

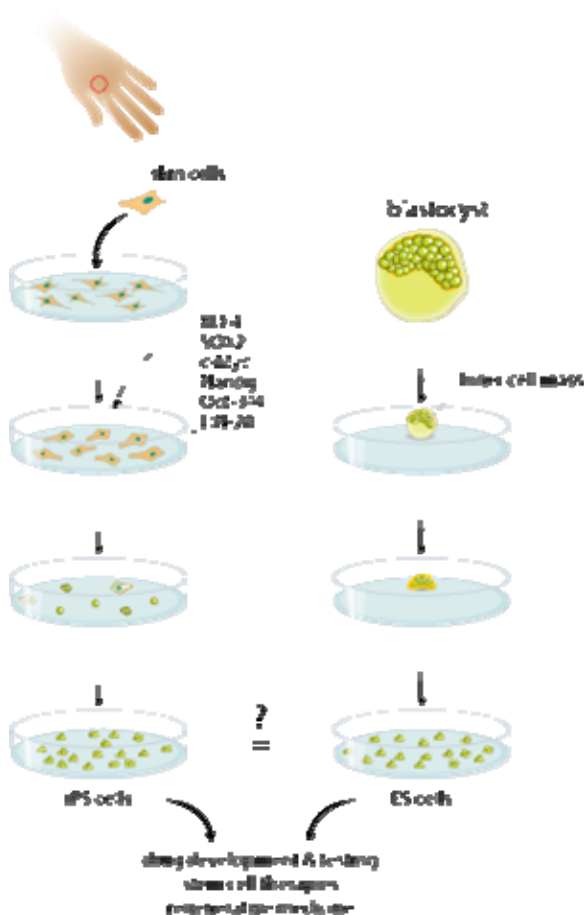


图 2. 多能干细胞的产生。

在这幅图中，分离胚胎干细胞的经典技术（右）与最近开发的产生诱导性多能干细胞的方法（左）进行了比较。胚胎干细胞来源于移植前胚胎的囊胚中的细胞群，能产生胚胎需要的所有组织的 ICM(inner cell mass)。囊胚被铺在一层小鼠胚胎成纤维滋养层细胞（MEF，图中未示）上，内细胞群（ICM）产生的细胞克隆被挑选并增殖，产生了胚胎干细胞系。

而 iPS 细胞，则是将来源于皮肤或其他组织的体细胞在体外培养，用包含编码多能性相关的转录因子的表达载体进行转导。对于大多数细胞类型采用的是 Oct-3/4、SOX2、Nanog 和 LIN-28 这 4 个因子，尽管用 Oct-3/4、SOX2、Nanog 和 LIN-28 这 4 个因子或用全部 6 个因子也能成功。这些外源因子的表达引发了重编程的渐进过程，结果在一些细胞中分化表型的标志物被沉默，多能状态的标志物被诱导激活。通过基因表达、畸胎瘤行为和嵌合体分析、表观遗传状态的评估，产生的 iPS 细胞克隆非常类似于胚胎干细胞。尽管对 iPS 与胚胎干细胞的确切关系还有疑问，但两者都有望成为药物筛选和检测、干细胞治疗和再生医学的宝贵工具。

### 同样适用于人类细胞吗？

接下来的一个大问题是，这种 4 因子结合的方式是否能将人的体细胞转变成类似胚胎干细胞的 iPS 表型。这种无需使用人体胚胎就能形成患者特异的多能干细胞的优点不言而喻，因而引起了研究人员极大的兴趣。

希望将小鼠的研究结果应用在人体细胞上的研究人员面临了几个挑战。目前人体系统中还没有小鼠系统中的遗传工具。如果效率也是这么低，研究人员不得不在整个诱导群体的大海中寻找 iPS 这根针，而没有选择的辅助。人细胞中反转

录病毒转导效率更低，而且人体胚胎干细胞需要不同的生长环境来维持多能性。尽管如此，人体 iPS 细胞还是迅速地被三个研究小组攻克并报道。

**Yamanaka** 的小组利用成年人表皮成纤维细胞作为起始群体，并通过将小鼠反转录病毒受体（**Slc7a1**）引入人体细胞，优化了反转录病毒的转导效率。<sup>13</sup> 根据形态学来分离 iPS 克隆，随后证实这些克隆表达了人体胚胎干细胞的标志物，包括 **Oct-3/4**、**Nanog**、**Sox2**、**GDF3**、**Rex1**、**Fgf-4**、**ESG1**、**DPPA2**、**DPPA4** 和 **hTERT**。人体 iPS 细胞中也同样存在反转录病毒被沉默现象，可以通过体外分化形成具三胚层特有的标志物来证明其多能性。通过每种细胞类型的多个标志物评估，这些细胞也能分化形成多巴胺的神经元以及心肌。iPS 细胞在畸胎瘤环境中表现出三系分化。与小鼠的 0.1% 相比，人细胞的重编程效率更低，只有 0.02%。

**Thomson** 的实验室采用了稍有不同的路线来研究人 iPS 细胞。<sup>14</sup> 为了避免 **c-Myc** 转导中潜在的致癌性，他们开发出另一套重编程因子：**Oct-3/4**、**Sox2**、**Nanog** 和 **LIN-28**。另外，他们改造了人类胚胎干细胞的选择系，用内源的 **Oct-3/4** 启动子来控制抗药性基因的表达。利用这个方法与 **Takahashi** 和 **Yamanaka** 最初的小鼠方法类似的线路和策略，他们从 14 种可能的重编程因子起始，最终缩小到 4 个候选因子。然而，他们没有采用包含选择标记的体内分化组织，而是采用由改造的胚胎干细胞体外分化而来的细胞，并利用 4 个重编程因子让分化的 **ES** 细胞逆转退回到未分化状态。随后他们利用胚胎及新生儿的成纤维细胞，证实了这 4 个因子重编程人原代细胞的能力。如 **Yamanaka** 小组产生的细胞一样，这些 iPS 细胞也表达典型的胚胎干细胞多能性标志物，并在畸胎瘤分析中分化成全部三个胚层的

细胞。

第三个构建人类 iPS 细胞的小组由 **Daley** 领导，也是起始自遗传改造利用 **Oct-3/4** 作为筛选标记并分化的人胚胎干细胞。<sup>15</sup> 胚胎干细胞来源的成纤维细胞通过最初的 4 个因子组合 **Oct-3/4**、**SOX2**、**KLF4** 和 **c-Myc** 进行反转录病毒转导，iPS 细胞的分离效率相对较高，达到 0.1%。为了证实原代细胞也能被重编程，他们利用了两种类型的胚胎成纤维细胞，并成功产生了 iPS 克隆。然而，除非再加入两种因子：**hTERT** 和 **SV40** 大 T 抗原，否则从进一步发育成熟的细胞——包括新生儿成纤维细胞、成体间充质干细胞和成体成纤维细胞中都分离不到 iPS 克隆。**Park** 等也研究了人 iPS 细胞的甲基化模式，并表明它们更类似于人类胚胎干细胞，而不是母体的成纤维细胞。

为了解答是否某些细胞类型能比其他细胞更容易被重编程的问题，研究人员在随后集中研究小鼠不同的起始细胞群。例如，**Yamanaka** 的小组检测了来自成体小鼠肝和胃的上皮细胞。<sup>16</sup> 结果表明，原代肝细胞和胃上皮细胞这两种细胞在 **Fbx15** 的激活作为筛选标记的情况下转导 **Oct-3/4**、**Sox2**、**Klf4** 和 **c-Myc**，都可以转化为 iPS 细胞。这些 iPS 系都生成了畸胎瘤并可最终形成嵌合体成体小鼠，其中部分还可以进行种系传递。有趣的是，这些结果与他们之前的工作并不一致，<sup>9,10</sup> 此前的结果表明胎鼠或鼠尾成纤维细胞，在 **Nanog** 而不是 **Fbx15** 的选择标记下，可转化为有种系传递能力的 iPS 细胞。与成纤维细胞来源的 iPS 系相比，这些源于内胚层的 iPS 细胞的成瘤性也有不同，胃和肝 iPS 细胞发生肿瘤的情况要少得多。这些差别显然是由于 **c-Myc** 在胃和肝细胞的重编程过程中的并不重要。**Stadtfield** 等利用产胰岛素的小鼠胰腺  $\beta$  细胞作为起始细胞群，证实其重编程效率与成纤维细胞相当（0.1-0.2%）。<sup>17</sup> 因此，至少在小鼠中，不同器官来源的多种分

化完全的细胞都能被成功地重编程。

### 有没有更安全的 iPS 细胞?

普遍的看法认为目前制造 iPS 细胞的方法并不适于应用在临床。忧虑不仅限于 c-Myc, 还包括众多的反转录病毒整合位点, 它们本身有能力导致突变或致癌。因此, 避免采用 c-Myc、总体采用更少因子的重编程, 或最终用小分子来取代这些因子, 更合乎理想。为此目的, Nakagawa 等进行了研究,<sup>18</sup> 表明小鼠或人类成纤维细胞在没有 c-Myc 的情况下也能产生 iPS 细胞。这种 3 因子诱导的 iPS 细胞在转导与用筛选试剂进行筛选之间需要更长的间隔, 表明在缺少 c-Myc 时重编程过程更慢。产生的细胞可形成成体嵌合体, 且不会导致肿瘤。人皮肤成纤维细胞也能够无 c-Myc 的条件下重编程, 与有 c-Myc 相比效率则低很多。

为了将所需的外源因子数量减至最低, Kim 等试图以内源高水平表达重编程因子的细胞群作为起始细胞群。<sup>19</sup> 例如, 成体小鼠神经干细胞 (NSC) 高水平表达内源的 Sox2 和 c-Myc, 因此可能需要更少的外源因子。实际上, 成体神经干细胞只需要两种因子 Oct-3/4 和 Klf4 或者 Oct-3/4 和 c-Myc 就能产生 iPS 细胞。这些“2 因子”的 iPS 细胞表达了典型的胚胎干细胞标志物, 并在畸胎瘤和嵌合体中产生全部三个胚层。此外, 嵌合体小鼠中没有观察到肿瘤产生。毫无疑问, 研究人员很快会在人类神经干细胞中检验这种方法。

在另一项旨在筛选能替代一种或多种重编程因子的小分子的研究中, 也选择了神经干细胞作为起始细胞群。Shi 等鉴定了一种 G9a 组蛋白甲基转移酶的抑制剂 (BIX) 能改善两种因子转导的神经干细胞的重编程效率。<sup>20</sup> 另外, BIX 的存在能让小鼠胎儿神经干细胞在有其他三种因子但缺

乏 Oct-3/4 时产生 iPS 细胞。

### 机制

关于 iPS 细胞, 至今仍有许多让人迷惑不解的问题, 尤其是重编程发生的机制。几个实验室的结果证实重编程是一个缓慢的过程, 外源重编程因子的表达只是最初所必需的, 后来则可有可无。为了更好地调控重编程的诱导过程, 两个小组构建了含有可诱导的四个重编程因子的表达载体。<sup>21,22</sup> 目标成纤维细胞被可诱导载体感染, 加入强力霉素 (Dox) 激活重编程因子的表达。通过瞬时控制重编程因子的表达, 这些小组确定了重编程过程中事件发生的顺序。他们的研究表明, 4 因子至少必需表达 8 天后, iPS 细胞才能独立维持多能状态。他们的研究还显示重编程的最初事件之一是起始的分化成纤维细胞特有的标志物如 Thy1 等表达下调。接着, 不表达 Thy-1 的细胞子集开始表达多能性标志物 SSEA-1。内源的 Sox2、Nanog 和 Oct-3/4 的上调是重编程过程中的晚期事件。Wernig 等将这种方法再向前进一步, 利用 Dox 诱导的 iPS 细胞产生嵌合体小鼠,<sup>23</sup> 再从嵌合体小鼠的不同组织和器官中分离原代细胞, 随后仅加入强力霉素, 即可诱导发生第二次重编程。

由于可以分离中间群体, 诱导策略将有助于更深入地了解和观察重编程机制。更好地了解这个机制反过来会促进开发更安全的 iPS 细胞制备方法。但是即使不需反转录病毒整合就能成功获得 iPS 细胞, 在 iPS 实际应用于临床之前还是存在着问题和挑战。在分化的皮肤成纤维细胞中, 一直保持沉默的那些积累的体细胞突变, 在 iPS 细胞或它们定向分化的衍生细胞中也许不是这样。一些证据表明不同人类胚胎干细胞株在分化过程中按照其特定品系具有不同的偏向性,<sup>24</sup> 不同的 iPS 细胞系同样可能出现类似的情况。移植胚胎干细胞分化系时面临的畸胎瘤形成的风险同

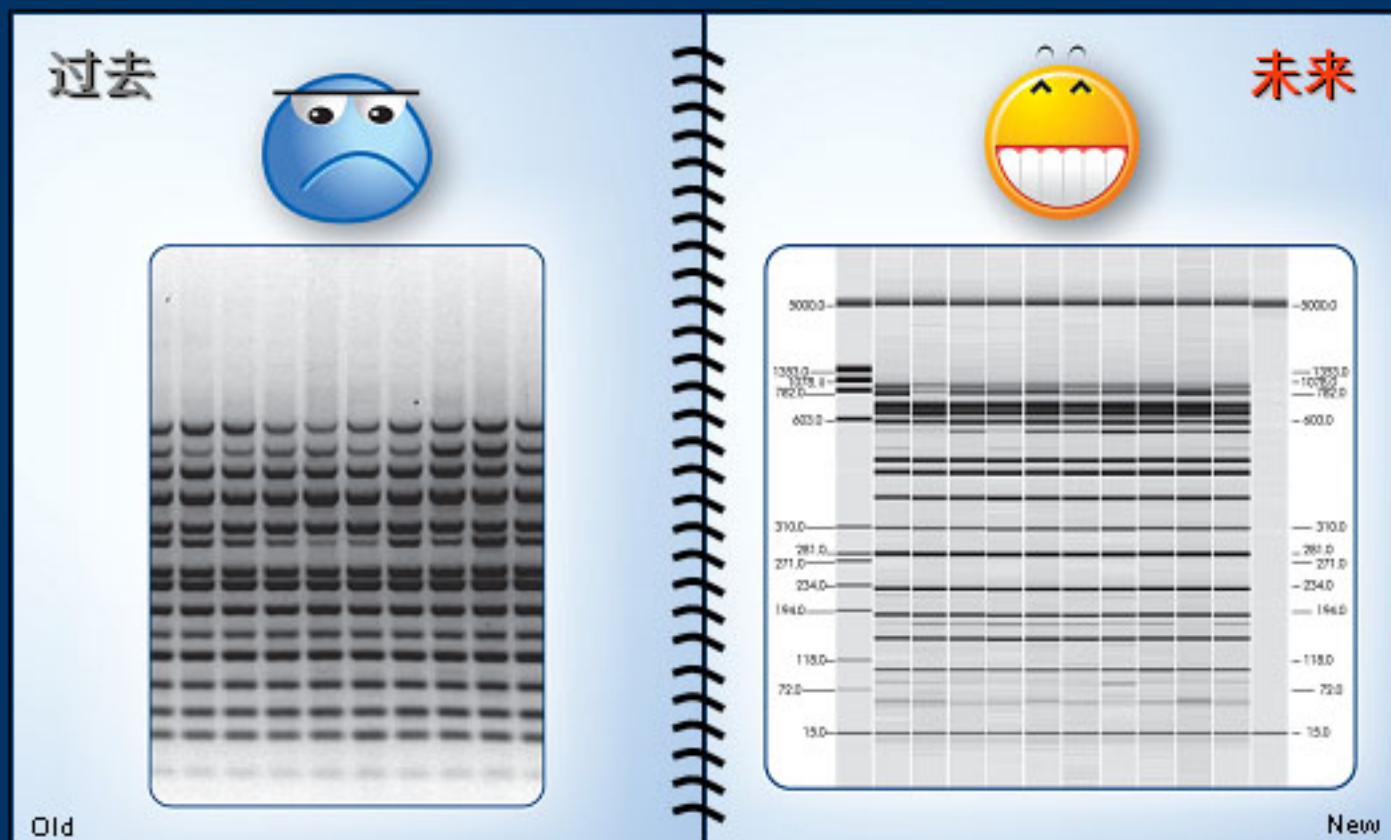
样也是 iPS 分化细胞担心的问题。

尽管如此, iPS 细胞还是有很多可以立即实现的优势。例如, Park 等最近制备了十种疾病特异的 iPS 系。25 这些细胞系的分化所得到受特定疾病影响的细胞或组织类型, 可用于生产药物筛选的细胞, 或阐明疾病的病因。细胞的多能性是细胞生物学中长期存在的疑团, 可能对再生医学的未来产生激动人心的结果, 而 iPS 细胞正好为了解多能性的本质提供了一种手段。

#### 参考文献

1. Gurdon, J.B.(2006) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22:1.
2. Gurdon, J.B. et al. (1958) Nature 182:64.
3. Till, J.E. and E.A. McCullough (1961) Rad. Res. 14:213.
4. Evans, M.J. and M.H. Kaufman (1981) Nature 292:154.
5. Martin, G.R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:7634.
6. Wakayama, T. et al. (1998) Nature 394:369.
7. Tada, M. et al. (2001) Curr. Biol. 11:1553.
8. Mitsui, K. et al. (2003) Cell 113:631.
9. Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006) Cell 126:663.
10. Okita, K. et al. (2007) Nature 448:313.
11. Wernig, M. et al. (2007) Nature 448:318.
12. Maherali, N. et al. (2007) Cell Stem Cell 1:55.
13. Takahashi, K. et al. (2007) Cell 131:861.
14. Yu, J. et al. (2007) Science 318:1917.
15. Park, I-H. et al. (2008) Nature 451:141.
16. Aoi, T. et al. (2008) Science 321:699.
17. Stadtfeld, M. et al. (2008) Curr. Biol. 18:890.
18. Nakagawa, M. et al. (2008) Nature Biotechnol. 26:101.
19. Kim, J.B. et al. (2008) Nature 454:646.
20. Shi, Y. et al. (2008) Cell Stem Cell 2:525.
21. Stadtfeld, M. et al. (2008) Cell Stem Cell 2:230.
22. Brambrink, T. et al. (2008) Cell Stem Cell 2:151.
23. Wernig, M. et al. (2008) Nature Biotechnol. 26:916.
24. Fenno, L.E. et al. (2008) Curr. Opin. Genet. Dev. 18:1.
25. Park, I-H. et al. (2008) Cell 134:1.

# Bye-bye了，传统凝胶电泳！



3-5分钟常规片段分离；10分钟高分辨率片段分离……

不用制胶、上样、拍照……

一切尽在鼠标轻点之间……

QIAxcel新一代的核酸片段分析系统，开启凝胶电泳的新篇章！

更多QIAxcel信息请点击进入>>

# 如何选购凝胶成像系统？

数码产品的更新换代总是特别快，凝胶成像系统当然也不例外。灵敏度越来越高，自动化程度也更高，设计也更加人性化，逐渐变得像傻瓜照相机一般易用。另外，外型也更加小巧、时尚。市场上有很多种凝胶成像仪，如何选购呢？生物通为你指明方向。

凝胶成像系统的基本骨架是 CCD 照相机、暗室和分析软件。不过其功能不仅仅限于对琼脂糖凝胶进行成像，现在的成像仪趋向于多功能化，还适用于蛋白胶、发荧光的胶、印迹膜和菌落平板等应用。在 Western Blot 方面，高性能的 CCD 成像仪能与胶片媲美。

## 高灵敏度低噪音

作为用户，我们最关心的当然是成像质量。有些实验需要检测非常微弱的条带，如果成像质量不过关，则可能带给我们错误的信息。Bio-Rad 公司已连续三年获得了生命科学产业成像分析系统的大奖，它的 VersaDoc MP 4000 系统有着极高的分辨率，非常适于核酸凝胶、蛋白胶和印迹膜的检测。VersaDoc 采用高量子效率的蓝光增强型 CCD。数字式 CCD 经冷却至绝对温度，可减少背景噪音并稳定地提高信噪比。这个高性能的数字式摄像头还能获得良好的化学发光图像，其速度可与胶片检测的曝光时间相媲美。VersaDoc 系统拥有 8 个发射滤光片位置，可有效地多通道检测标准品及未知样品。

英国 UVIttec 公司提供了 UVIDOC Xplorer 和 Platinum 凝胶成像系统，以及最新的 Alliance 4.7 成像系统，在高端凝胶成像上傲视群雄。UVIttec 系统的灵敏度在于其专利的光学组件和 CCD 传感器，能同时检测非常弱和非常强的条带。如果你想要准确的定量，则需要购买具有高像素和高分辨率的照相机。像素是决定 CCD 灵敏度的一个

主要因素。Alliance 4.7 系统的 CCD 传感器为 420 万像素，并具有超强的冷却能力（零下 65 度），实现最高的信噪比。其动态范围达到 4.8 个数量级。该系统还具有短焦距，让曝光时间更长，灵敏度更高。

## 自动化

自动化已经成为越来越多实验室的需求。我们为什么要花几个小时来做这些常规工作，而不让高科技的仪器来替代呢？尽管凝胶成像不能够完全自动化，但有些部件如照相机能自动上下移动，增加灵敏度，让图像质量更好。

自动化是 Kodak Image Station 4000MM Pro 的一大特征。这个系统是多功能的数码成像系统，能对化学发光、多波长荧光，以及凝胶、印迹和平板上的发光或放射性标记进行成像。该系统的智能数码定位技术包括：精确的自动对焦镜头、10 倍放大和 400 万像素的冷却型 CCD，无需手动调节，都能得到精确且可重复的结果。另外，精确的滤光镜，与其他的自动化特征结合，让设置时间最少，而效率最大化。该系统还配备了可选择波长的氙白光照明光源，10 个自动的激发滤光片（380-780 nm）和 4 个自动的广角发射滤光片（440-830 nm）。Molecular Imaging 软件能记忆并自动调用成像数据，这样你不用每次设置就能获得重复性好的结果。

UVP 的 BioSpectrum 成像系统有一个完全自

动的升降台和四个自动的镜头，能自动调节光圈、变焦和焦距。UVP 还提供 6 种科研级的 CCD 照相机，你可以根据自己的需要进行选择。BioSpectrum 系列为低亮度成像如化学发光、生物发光和荧光提供了无以伦比的灵敏度。自动化的暗室、镜头和匹配滤片组合让研究人员能更快捕捉图像，确保万无一失，且重复性高。另外，VisionWorks 软件的半自动分析能自动鉴定和分析泳道和条带，并自动生成报告。

生物通提示：在自动的软件分析时，有一点需要特别注意。有些软件会进行自动化的背景消除。乍一看是不错，但软件可能会同时消除你的目的条带。有时目的条带很弱，会被软件误认为是噪音，毕竟那是个软件，你也不能要求太高，所以这个功能最好还是慎用。

### 简约时尚

如果你对成像的要求不高，只想看看核酸或蛋白胶，Alpha Innotech 公司的一款小巧又经济的凝胶成像系统——Alphamager Mini 应该能满足你的需求。Alphamager Mini 科研级的 130 万像素摄像头，能带来很好的分辨率和动态范围，还带有 USB2.0 接口让数据传输更快速。研究人员还能通过 AlphaSnap 软件自定义曝光时间，打印他们的图像，并以多种方式保存图像以便下游的加工和分析。用户可以利用 Alphamager Mini 分析各种染料如 EB、SYBR Green、SYBR Safe 和 Hoechst Blue 染色的 DNA 和蛋白凝胶。麻雀虽小，五脏俱全。基本的功能都具备了，还能节省经费。现在金融危机当头，钱还是应该省着点

花。

作为时尚达人的你，可能不喜欢漆黑笨重的成像仪，那么你应该瞧一瞧“RED”。这款红色的凝胶成像系统一改以往成像仪笨重、沉闷的造型，尽显时尚。它最独特的地方就是不需要配置电脑，将电脑整合在内部。成像仪的上方是 8 英寸的触摸式显示屏，所有操作尽在指尖。RED 的创新设计也将易用性发挥到极致。无论是它的简单安装，还是直观的用户界面，整个系统都是即插即用，真的就像 ATM 机取钱一样简单。

### 高通量

如果你的实验任务繁重，每次需要对多块凝胶或印迹进行成像，那你一定会对高通量成像系统感兴趣。Syngene 公司的 Dyversity 4 和 Dyversity 6 系统，专门用于 2D 蛋白胶的快速成像。它利用 CyDye 移动激发模块和高质量的发射滤片，能同时对多种 GE 的 CyDye 进行成像，与激光扫描相比，灵敏度高，而曝光时间缩短。此款成像仪能分辨最高密度的蛋白斑点，而且能捕获微弱的斑点，确保成像质量与价格更为昂贵的激光扫描系统相当。Dyversity 系统还能对化学发光、可见染料、DNA 和 RNA 条带和多种 Qdot 进行成像。

市场上的成像系统如此之多，无法向大家一一介绍。在此挑选了一些有特色的新产品，与大家分享。

（生物通 余亮）

# 膜蛋白的晶体结构

膜蛋白在整个蛋白质组中大约占了三成，但在 PDB 的结构库中，还不到可怜的 1%。这并不是因为膜蛋白不重要，相反，膜蛋白受体是绝大多数药物的靶点。其配体覆盖蛋白、肽段、糖类、脂类及其他多种有机分子。晶体结构对膜蛋白而言尤其重要。试想一下，如果你了解它们的结构，再去理解突变、配体及相互作用分子等，应该会变得更简单。对于药物开发而言，3D 结构能指导人们去开发小分子药物。

现实中主要的瓶颈在于无法大量表达膜蛋白，没有合适的去污剂来溶解它们，以及其固有的结构松散性。G 蛋白偶联受体（GPCR）通常很大，疏水结构多，有许多松散的环。第一个发表的 GPCR 结构是牛视紫红质，时间是 2000 年。为什么它能成为第一？因为它能从牛眼睛中大量纯化，而没有表达上的限制。此后，GPCR 的晶体结构就一直局限在视紫红质。

但是技术在创新，方法在改进。一些结构生物学家逐渐开发出新方法，来解决膜蛋白表达、溶解和结晶的瓶颈。七年的沉寂之后，终于有一些 GPCR 的晶体结构陆续被报道。美国斯坦福大学医学院的 Rosenbaum 等人通过两条途径来解决 GPCR 结晶上的疑难杂症。对于  $\beta 2$  肾上腺素受体，关键的问题在于其松散的胞内环。Rosenbaum 等用 T4 溶菌酶取代了第三个胞内环的大部分，而蛋白保留了近似原始的性质。另一方面，他们则用一种单克隆抗体来靶定第三个胞内环，发现这个抗体对于获得晶体衍射非常关键。

结构基因组学小组如美国的 NYCOMPS（纽约膜蛋白结构协会）和 CSMP（膜蛋白结构中心）以及其他一些国际组织，正在建立高通量的途径来

简化膜蛋白结构确定，尽管到目前为止只确定了几个新的结构。同时，无需结晶的固体 NMR 方法，也在迅速发展，但灵敏度和分辨率仍需进一步提高。

同时，在膜蛋白的表达方面，Invitrogen 公司新推出了 MembraneMax 蛋白表达试剂盒，能得到高产量可溶性的膜蛋白。它的秘密武器就在于其中专利的 MembraneMax 试剂。MembraneMax™ 试剂与细胞膜有点类似，外环是一种专利配方的支架蛋白，中间是脂双层。它提供了与细胞内相似的环境，帮助膜蛋白正确折叠，避免了蛋白聚集，同时也省去了反复优化的繁琐步骤。与 Invitrogen 的 Expressway 体外表达系统结合，MembraneMax 试剂就能生产出微克至毫克级的可溶膜蛋白。更详细的描述请看[膜蛋白的表达也能轻松实现](#)。这个试剂盒还入围了[2008 生命科学十大创新产品评选](#)。

当然，对于膜蛋白结构而言，不可能有放之四海而皆准的操作步骤。我们需要多种方法，来确定不同蛋白的结构。今后的几年，我们有望看到膜蛋白的更多解决方案出炉，而 PDB 中的膜蛋白结构也将与日俱增。

（生物通 薄荷）

# 成像到底有多深？

生命世界是三维的，细胞也很少像在培养皿中那样单层分布。然而，对于体内研究而言，一直存在着技术上的挑战，细胞成像也是如此。

生物组织是不透明的，能有效散射光线。厚样品的成像效果通常很差。传统的共聚焦显微镜只能对样品上的几百微米进行成像；而哺乳动物的胚胎或组织切片通常会厚几倍。另外，我们也希望对整个样品进行成像，以便得到组织结构的全局了解。这用传统的方法同样无法实现。尽管核磁共振成像能对生物样品进行更深入的成像，但图像分辨率很低。

因此，在高分辨率的共聚焦显微镜和低分辨率的体内方法如 MRI 之间，始终存在着一个空缺。为了填补这个空缺，近年来显现出一些新的光学方法。

单层光显微方法（light sheet microscopy）能对样品的几毫米深度进行荧光成像，已经用于一些微小生物和胚胎上。在 2008 年，EMBL 的研究人员用新一代的数字扫描激光显微镜（Digital

Scanned Laser Light-Sheet Microscope），在超过 24 个小时的时间内监测了斑马鱼胚胎由单个细胞生长成几万个细胞的情况，绘制了第一张脊椎动物的发育蓝图。详细的介绍请看：[首个脊椎动物的发育蓝图](#)。

相比之下，断层 X 光摄影方法如光学投影层析（optical projection tomography, OPT）则倾向于从不同的角度对样品进行成像，并利用数学模型来重新计算原始的 3D 信息。OPT 的成像深度最可达 10 mm。它与体外器官培养结合，能对发育中的小鼠肢芽进行成像，了解组织移动和基因表达。

尽管这些方法还有待广泛应用，但也许多不了多久，我们就能深入探索生物体的内部，并看见生物过程的三维动画。

（生物通 薄荷）

# miRNA 靶点预测

很小很重要的 microRNA (miRNA) 在 2008 年仍是人们关注的焦点。miRNA 通过与靶 mRNA 3'UTR 的结合, 或促使 mRNA 降解, 或阻碍其翻译进程, 从而抑制目的基因的表达。miRNA 虽然只有 20 几个碱基, 却调控了体内上千基因的表达, 其力量确实不容小觑。

为了更好地了解它们的生物学意义, 我们需要知道 miRNA 究竟与哪个/哪些 mRNA 配对。前些年虽然出现了很多靶预测程序, 但都不大管用。2008 年, 许多实验室对 miRNA 的靶点进行了大规模的验证, 当然, 成效显著。

德国科学家 Nikolaus Rajewsky 等通过 SILAC 技术检验上千个蛋白表达情况与转染的 miRNA 或是内生的 miRNA 相对应的关系。研究结果证实, 单个的 miRNA 可抑制上百个蛋白的表达, 但是单个的 miRNA 对蛋白表达的调控并不是直接作用的。大量已知的 miRNA 结合位点比如 seed sequence 都参与人类蛋白表达的调控过程 (Nature 455, 58-63)。

几乎同时, 美国 Whitehead Institute 的 David Bartel 及其同事也利用定量的质谱分析来研究 miRNA 的导入对数千个蛋白的影响。他们发现单个 miRNA 会直接抑制数百个基因。有些靶点在 mRNA 水平的改变几乎检测不到, 不过翻译量下降三分之一的靶点则表现出 mRNA 的不稳定, 而对于高度抑制的靶点, mRNA 不稳定是抑制的主要成因。miRNA 像可变电阻器一样, 精确地调节

着蛋白的表达量 (Nature 455, 64-71; 2008)

另一种解决 miRNA 靶点预测的方法是测序。Pamela Green (Nat. Biotechnol. 26, 941-946; 2008) 和 Michael Axtell (Curr. Biol. 18, 758-762; 2008) 两个小组分别进行了此方面的研究。研究者们对 miRNA 调节的 mRNA 产物进行了测序, 利用产生的序列特征来鉴定 miRNA。这种策略在植物中非常成功, 因为 miRNA 和靶点之间完全匹配。对于那些不完全匹配的物种来说, 这种方法还需要改进。

同时, 计算机方面的专家也利用越来越多的实验数据来设计靶点预测的新软件。mirWIP 就是其中一个。Victor Ambros 小组利用 miRNA 相关 mRNA 的大量数据信息来预测线虫中的 miRNA 靶点。 (Nat. Methods 5, 813-819; 2008)

科学家们的共同努力将改善靶点预测的准确性, 并为实验验证提供更好的候选者, 同时高通量的实验室验证仍是必不可少。静候佳音吧。

(生物通 余亮)

# 定量蛋白质组学

质谱用于蛋白质鉴定已经成为常规技术，目前还广泛应用于蛋白质组学研究中。但是为了深入了解复杂系统的生物学机理，我们还需要掌握关于蛋白表达水平的更多信息。不幸的是，质谱不能定量。

因此，在过去的十几年，蛋白质组研究人员发明了一系列的稳定同位素标记策略，来获得定量信息。这些方法能用于研究干扰、抑制剂的效果；比较两种疾病状态；确定蛋白在复合物中的量；甚至监测蛋白质组随时间变化的情况。同时也归功于仪器和生物信息学上的不断发展，2008 年许多重要的蛋白质组研究成果被报道，尤其是利用代谢标记技术如 2002 年 Matthias Mann 发明的 SILAC。

2008 年，Mann 的小组及其他小组的研究表明，SILAC 能用于整个小鼠的同位素标记，研究细胞周期中磷酸化的动力学，以及 microRNA 对胞内蛋白质组的影响，并比较了单倍体和二倍体酵母的蛋白质组。

Mann 小组通过给小鼠提供含有 <sup>13</sup>C6 赖氨酸的饲料，将 SILAC 方法拓展应用于体内研究。通过对小鼠饮食、生长发育、生育能力、活动和生理情况的观测，发现 SILAC 标记对小鼠后代都无不利影响。在 F2 代小鼠体内，他们观察到 <sup>13</sup>C6 赖氨酸几乎标记了体内所有器官的蛋白质，使得对这一代和以后若干代小鼠进行定量的蛋白质分析成为可能。Krüger 等人采用了三种基因表达缺陷的小鼠模型对上述方法进行了验证。在每个实验中，差异标记野生型小鼠和基因表达缺陷的小鼠，然后通过质谱检测明确证实了相关组织中相应蛋白质的表达缺失。最后，Krüger 等人表明体内 SILAC 标记方法是一种多功能工具，能定量比较缺陷小鼠的蛋白质组，从而确定体内复杂环境中的蛋白功能 (Cell. 2008 Jul 25;134(2):353-64.)。

Mann 小组还培养出 SILAC 完全标记的胚胎干细胞，并结合双向电泳和 LTQ-Orbitrap 仪器，成功鉴定并定量出胚胎干细胞中出现的 5111 种蛋

白质，这个数量是以前研究结果的三倍，是目前为止制作出的最大的蛋白质图谱。这项研究有助于促进干细胞生物学研究发现新的线索，鉴于干细胞中至少表达了所有已知小鼠蛋白质的 25%，这项研究体现出了这些重要细胞的复杂性。(Mol Cell Proteomics. 2008 Apr;7(4):672-83.)

英德两国的科学家则通过 SILAC 技术检验上千个蛋白表达情况与转染的 miRNA 或是内生的 miRNA 相对应的关系。研究结果证实，单个的 miRNA 可抑制上百个蛋白的表达，但是单个的 miRNA 对蛋白表达的调控并不是直接作用的。大量已知的 miRNA 结合位点比如 seed sequence 都参与人类蛋白表达的调控过程。(Nature 455, 58-63)

蛋白水平的绝对定量只能是在消化的蛋白样品中加入已知量的同位素标记肽段，这个概念最早由 Steven Gygi 在 2003 年提出。然而，除非出现了能代表所有蛋白的同位素标记酶解肽，否则蛋白质组的绝对定量还只是一个遥远的梦。

蛋白质组学正逐渐转变成一种工具，让科学家们在蛋白质水平解决如干细胞、信号通路等研究中更多富有挑战性的问题。

附：SILAC 的基本原理是分别用天然同位素(轻型)或稳定同位素(重型)标记的必需氨基酸取代细胞培养基中相应氨基酸，细胞经 5-6 个倍增周期后，稳定同位素标记的氨基酸完全掺入到细胞新合成的蛋白质中替代了原有氨基酸。不同标记细胞的裂解蛋白按细胞数或蛋白量等比例混合，经分离、纯化后进行质谱鉴定。

(生物通 薄荷)

# 2008 新品回顾之小分子 RNA 篇

生物通编者按：每一年，生命科学领域都迸发出许多创新的闪光点。技术的创新正推动生命科学飞速地发展；而创新的产品也在争相亮相。在即将过去的 2008 年，有哪些创新的技术让你印象深刻，又有哪些创新的产品让你受益无穷？在 2008 年末，生物通推出“2008 生命科学十大创新产品评选”活动。通过这次活动，我们将盘点出 2007-2008 年对生命科学领域影响最大的新产品，让更多的人了解科学发展的新方向，也早日享受到科技创新带来的成果。

小分子 RNA 近年来一直很红，从 siRNA、shRNA 到如今的 miRNA。miRNA 分子虽然小，却在体内起着不可估量的作用。单单一个 miRNA，就有可能调控了数百个基因的表达。在癌症中，它们也同时充当着“推手”和“打手”的双重作用。无怪乎目前众多的研究纷纷集中在 miRNA，而首个 miRNA 药物也在今年进入临床试验，暗示其前途无量。RNAi 技术也仍是研究基因功能的利器，屡现突破。

研究的热点自然是新品不断。下面生物通就来盘点一下在小分子 RNA 领域有什么新货上市。

在 RNAi 领域，Accell siRNA 的上市，可谓掀起了 RNA 干扰领域的新革命。Dharmacon 公司推出的 Accell siRNA 试剂，采用特殊的化学修饰，不需要任何传统的转染介质（比如转染试剂、病毒载体和电转等）就能被直接吸收进入细胞。众多公认的难转染的细胞（如：原代培养细胞、悬浮细胞和神经元细胞等）全都不在话下。Accell siRNA 首次克服了由于细胞转染问题所带来的基因沉默效率不佳的障碍，大大加速了实验进程。如此创新的产品，当然成为十大创新产品的候选。

ABI 公司的 SOLiD 系统也是候选产品之一，不过它可不仅仅是测序仪，还是小分子 RNA 研究的新武器。SOLiD 系统和 SOLiD Small RNA Expression Kit 结合，能在无需预先知道序列信息

的情况下高通量地发现新的 RNA 分子。这个新方案有望显著地提高研究人员鉴别小分子 RNA 的能力，将过去不可能完成的实验变为可能。目前已发现的 microRNAs 还非常有限，SOLiD 可在不知道目标分子 DNA 序列的情况下进行检测和定量小的 RNA 分子，而样品制备工作从常规方法的四天缩短为仅需一天，是分析在生物样品中表达的已知和未知 miRNA 及其它小分子 RNAs 的有力工具。

目前，芯片仍是高通量分析 miRNA 的首选。Sanger microRNA 数据库(miRBase) 12.0 版于 2008 年 9 月 1 日发布，最新版本报道了 8273 条成熟 microRNA 序列，新增 2062 条，是史上规模最大的一次版本更新。LC Sciences 公司（联川生物）专利的微流体芯片技术保证了芯片探针随 Sanger miRBase 数据库实时更新。于是，它在 9 月份全球首家推出最新 Sanger 12.0 版 microRNA 探针信息，其标准 microRNA 微阵列芯片可对最新版数据库报道的包括人、大鼠、小鼠、斑马鱼、鸡、猪、水稻、玉米、拟南芥、病毒等在内的所有单个物种或是同类物种组，如哺乳动物、植物等的 microRNA 进行检测，并提供完整的数据分析。

同样是微流体芯片技术，ABI 的 TaqMan MicroRNA Array 却和常规芯片截然不同，它更像是 TaqMan MicroRNA Assay 的芯片集成形式——通过对分析方法的创新改造，将 TaqMan Assay 和

实时定量 PCR 的特异性、灵敏度和重复性金标准引入到 miRNA 的检测和定量中，特别适合人、大鼠和小鼠的 miRNA 图谱分析。原理其实很简单，就是 384 个定量 PCR 反应在一块微流量板上进行。每个阵列的包含最多 381 个独特的 TaqMan MicroRNA Assays，有效缩短了准备时间，并减少实验的不确定性。用 Megaplex RT Primers 反转录 miRNA 靶点及用 Megaplex PreAmp Primers 预扩增之后，TaqMan Universal PCR Master Mix 可与每个反应简单混合，并移至 TaqMan Array 的八个上样口中之一，一个工作日内就能产生覆盖 Sanger miRBase 的综合数据集。与芯片相比，它的上样量仅为百分之一，即使 1ng 的总 RNA，也能产生综合的表达图谱。这种打破常规的产品，无疑也是十大创新产品评选的入围作品。

在小分子 RNA 的制备方面，Roche 也推出了多面手——High Pure miRNA Isolation Kit。它不仅能从细胞、动植物组织中提取 miRNA，还能从 FFPE 样品中提取。它适用的 FFPE 样品大小为 5-10um (1cm×1cm)，先用二甲苯脱蜡，乙醇洗涤之后再用裂解液、SDS 和蛋白酶 K 处理，后面的流程就与普通的组织一样了。除去脱蜡和蛋白酶 K 这些比较繁琐耗时的步骤之外，其他步骤只需要 30 分钟。

另外，RNA 领域最出众的公司 Ambion 推出了 microRNA 研究指南。从 microRNA 的定义和生成，到纯化和富集，检测和定量，功能分析，还有 miRNA 表达载体和前体分子以及阻遏物，转染等等，囊括 miRNA 研究的方方面面。欢迎[点击下载](#)。

(生物通 薄荷)

# 2008 新品回顾之表达系统篇

生物通编者按：每一年，生命科学领域都迸发出许多创新的闪光点。技术的创新正推动生命科学飞速地发展；而创新的产品也在争相亮相。在即将过去的 2008 年，有哪些创新的技术让你印象深刻，又有哪些创新的产品让你受益无穷？在 2008 年末，生物通推出“2008 生命科学十大创新产品评选”活动。通过这次活动，我们将盘点出 2007-2008 年对生命科学领域影响最大的新产品，让更多的人了解科学发展的新方向，也早日享受到科技创新带来的成果。

在表达系统方面，新产品当然没有像干细胞、miRNA 那样出现井喷。现有的原核、真核表达系统已经相当成熟，大部分新产品为了让表达量更高或溶解性增加，对载体进行例牌的局部改善。当然，也有一些新鲜的东西，吸引我们的眼球，如膜蛋白表达试剂盒和自由调控目的蛋白表达量的 ProteoTuner 系统。

以往，膜蛋白的表达总是让人相当头疼，产量不高，或总是形成包涵体。Invitrogen 首家推出了 MembraneMax 膜蛋白表达试剂盒，能克服以上的困难，得到高产量可溶性的膜蛋白。它的秘密武器就在于其中专利的 MembraneMax 试剂。MembraneMax 试剂与细胞膜有点类似，是优化的脂-蛋白配方，外环是一种专利配方的支架蛋白，中间是脂双层。它提供了与细胞内相似的环境，帮助膜蛋白正确折叠，避免了蛋白聚集，同时也省去了反复优化的繁琐步骤。与 Invitrogen 的 Expressway 体外表达系统结合，MembraneMax 试剂就能生产出微克至毫克级的可溶膜蛋白。在蛋白合成结束之后，膜蛋白可以从脂双层的任一侧取出。经 Invitrogen 内部验证，许多膜蛋白的表达量都大于 0.1mg/ml，这对于很多下游应用来说都是足够的，且蛋白可溶性明显增加。

我们都不是魔术师，不能让蛋白说有就有，

说无就无。不过，Clontech 公司革新的 ProteoTuner 系统，能让研究人员随心所欲地调控细胞内目的蛋白的表达水平。它有两个关键元件：破坏稳定结构域(DD)和小分子配体 Shield1。向细胞培养基中加入 Shield1 稳定配体，就能保护你的目的蛋白不被蛋白酶体降解，在细胞内迅速积累。相反地，为了降解你的目的蛋白，就将细胞转移至不含 Shield1 的培养基中。没有了 Shield1 的保护，目的细胞就迅速降解。蛋白表达量的调控就是这么简单而直接，比以前的四环素诱导系统可快多了。ProteoTuner 系统也入围了十大创新产品的评选。

除了这两个与众不同的新产品，其他新品都是对现有系统的改造。如 QIAGEN 公司的 QIAgenes 表达载体，上面已包含完全测序的人类基因的 cDNA。目前已有 35,000 个人类 ORF 的全长 cDNA 构建在载体上。如果只是克隆好的重组载体，那并不稀奇。关键是为了在 E.coli 表达系统中得到最高产量的蛋白，QIAgenes 大肠杆菌表达载体上的蛋白编码序列从密码子偏好性、mRNA 稳定性及二级结构等多方面来考虑，通过专利的软件进行了优化。你得到的是即用型的重组载体，无需克隆、测序和优化，非常方便。

在体外表达系统方面，Promega 公司今年推出了两个新产品，一种是利用大肠杆菌 S30 提取

物，另一种则是昆虫细胞提取物。**S30 T7** 表达系统的最大特点是产量高。**T7** 启动子的载体在 1 小时内最高能表达 500 ug/ml 的蛋白。而昆虫细胞体外表达系统则源自 **Sf21** 细胞系，有着独特的优势：表达温度比其他系统低。在低温下表达能增强蛋白的折叠以及稳定性，是进行突变研究的科学家的首选。

**NEB** 公司也推出了新一代的体外表达系统——**PURE**。这种“纯净”的表达系统最特别的地方就是去除了所有污染可能。**PURE** 中的所有活性组份都来自于重组制备，避免了天然提取物中核酸外切酶，**RNase** 和蛋白酶的污染，使 **DNA** 模板不被降解，表达的蛋白也不会有任何降解和修饰。由于翻译混合液的背景表达很低，因此，合成后的蛋白质通常不需要提纯就可以直接用于检

测。正是由于系统成份的高纯度，产品寿命也得到了延长，试剂盒经得起反复冻融 5 次，而不影响其活性。

做真核表达的对 **pcDNA** 系列载体应该不会陌生。**Invitrogen** 公司今年推出了一个改良版：**pcDNA 3.3-TOPO** 载体。此载体利用 **CMV** 启动子/增强子的组合在大多数哺乳动物细胞中实现高水平表达。它可以瞬时转染贴壁细胞，也可与悬浮的 **FreeStyle MAX** 系列结合，大量表达 **native** 蛋白。克隆方式是 **TOPO**，很快很省心。

今年在表达系统方面的新品就这么多，报告完毕。

（生物通 薄荷）

# 2008 年最受人关注的创新产品

生物通编者按：每一年，生命科学领域都迸发出许多创新的闪光点。技术的创新正推动生命科学飞速地发展；而创新的产品也在争相亮相。在即将过去的 2008 年，有哪些创新的技术让你印象深刻，又有哪些创新的产品让你受益无穷？在 2008 年末，生物通推出“[2008 生命科学十大创新产品评选](#)”活动。通过这次活动，我们将盘点出 2007-2008 年对生命科学领域影响最大的新产品，让更多的人了解科学发展的新方向，也早日享受到科技创新带来的成果。

新技术最吸引人之处，在于创新——能过去之所不能，化繁为简，由慢变快，花费由大变小——由此推动科研不断加速前进。每年的技术创新中，有一些逐渐沉淀，成为推进未来研究热潮的主流技术。例如新一代测序，在两年的时间内成功取代了 Sanger 测序，风头之劲，一时无人能比。今年若干个人基因组图谱的出炉，也再次证明了其功能强大。除了万众瞩目的新一代测序仪，还有很多新产品值得我们关注。Accell siRNA 让我们跨越了转染试剂的障碍，不再需要为转染效率低而寝食难安。Criterion 无染料凝胶成像系统则抛弃了繁复的蛋白染色和脱色，工作效率骤然提高了几十倍。作为 2008 生命科学十大创新产品评选活动的候选产品，每一个都有其与众不同之处。了解这些特点，说不定明天就能为你的实验助上一臂之力。

截至 2008 年 12 月 31 日，我们的评选已经进行了 1 个月的时间，得到了众多网友的大力支持。目前投票总数为 3264 票。得票最多的十大创新产品分别是：

## Synergy 4 酶标仪

得票数：1585 票

上榜理由：首次采用 Hybrid 技术以及多种检测光源和光路来配合不同的检测技术

## STEMPRO MSC SFM

得票数：1516 票

上榜理由：首个间充质干细胞的无血清培养基

## SOLiD 3 系统

得票数：1489 票

上榜理由：超高通量的基因组分析平台，内在可扩展性高。目前每轮测序可获得 20GB 以上的数据

## EL406 高通量自动洗板分液系统

得票数：1489 票

上榜理由：独创性地整合了洗板机和分液器，在洗板的同时实现高精度和高准度的分液

## ImageStream 图像流式细胞仪

得票数：1487 票

上榜理由：流式细胞术与荧光显微成像的完美结合，既有细胞群统计学资料，又有丰富的形态信息，应用广泛

## ProteoTuner 表达系统

得票数：1478 票

上榜理由：直接在蛋白水平快速、可逆地调控蛋白的表达量，获悉蛋白的功能

### **PURExpress 体外表达系统**

得票数：1472 票

上榜理由：所有活性组份都来自于重组，避免了核酸酶和蛋白酶的污染，表达的蛋白也不会有任何降解和修饰

### **Epidermal Keratinocyte 3D 培养基**

得票数：1469 票

上榜理由：首个表皮角质形成细胞的 3D 培养基，让你轻松构建 3D 表皮模型

### **xCELLigence 系统**

得票数：1462 票

上榜理由：无需标记、可对细胞进行全程实时监测的新型细胞分析平台，避免了传统终点检测的弊端

### **Accell siRNA 试剂**

得票数：1459 票

上榜理由：无需转染试剂和病毒载体，Accell siRNA 可有效地自行导入任何细胞，克服了关键的转染障碍

还有更多的创新产品，等着你来投票哦。

[2008 生命科学十大创新产品评选](#)

# 干细胞的研究利器

胚胎干细胞具备分化成多种细胞类型的潜能，并被普遍认为有着重要的医疗前景。干细胞培养的质量决定了它有效产生分化细胞类型的能力，这可以通过对多能表型的分子标记的表达进行分析来测定。早期谱系限制性细胞的标记也能用于确定在干细胞培养物中是否存在分化的细胞，并能表明分化细胞所代表的谱系通路。生物通就为你推荐一些好的工具。

R&D Systems 提供的人类多能干细胞评估引物对（货号为 SC012，图 1）可用于检测评估 14 种基因的 mRNA 转录本——这 14 种基因经常作为未分化细胞和早期谱系限制性人胚胎干细胞的分子鉴定标记。该产品还包含人类 GAPDH 的引物对，可作为对照用于验证 cDNA 合成是否成功。此外产品还包含了一个阳性对照。另外，R&D Systems 还提供了这个试剂盒的小鼠/大鼠版本（货号为 SC015）。

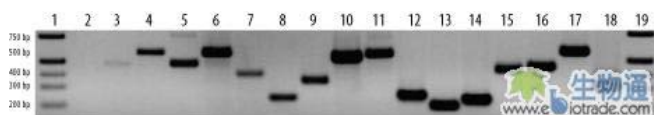


图 1. 用于干细胞多能和谱系限制的 14 种不同分子标记的引物对进行扩增，PCR 产物进行凝胶电泳。用于扩增的 cDNA 来源于多种胚胎组织。条带 3-6 的标记（DPPA5/ESG1、Nanog、Oct3/4、SOX2）表达于未分化的胚胎干细胞，条带 7-9 是外胚层谱系（Nestin、Otx2、TP63），条带 10-14 是内胚层谱系（AFP、GATA-4、PDX-1、SOX17、HNF-3 beta），条带 15 是中胚层谱系（Brachyury），条带 16 包含生殖细胞的标记 Stella。1，2.17-19 条带都是对照。

R&D Systems 还提供其他试剂来评估干细胞表型。例如，通过流式细胞仪来检测未分化的 NTERA2 人畸胎瘤细胞中 Oct 3/4 的表达（图 2），通过免疫细胞化学来检测小鼠 D3 胚胎干细胞核中 DPPA4 的表达（图 3）。

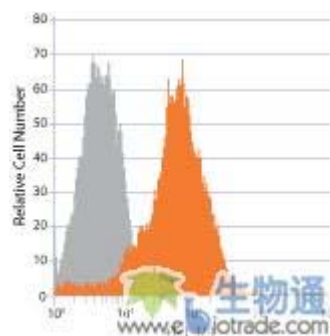


图 2. 通过流式细胞仪对 NTERA2 细胞中 Oct3/4 的表达进行评估。用大鼠抗人/小鼠的 Oct3/3 单克隆抗体（货号为 MAB1759；橙色）或同型对照（货号为 MAB0061；灰色）作为一抗，接着使用 APC 结合的二抗。



图 3. 利用 R&D Systems 的抗小鼠 DPPA4 多克隆抗体（货号为 AF3730）和 R&D Systems Northern Lights™ 557 结合的二抗（货号 NL001）来检测 D3 细胞核中的 DPPA4。

在干细胞的分离和扩增过程中，必须有办法能确定分离细胞的状态——最好能测定其分化能力。R&D Systems 的间充质干细胞功能鉴定试剂盒（货号为 SC010）能根据小鼠 BMSC/MSC 分化成多种间充质细胞的能力从而鉴定它们。这个试剂

盒包含了特殊配方的培养基补剂，能有效诱导 BMSC/MSC 分化成脂肪生成细胞、软骨形成细胞或成骨细胞。试剂盒中还包含了一组抗体，包括羊抗小鼠的 FABP4，羊抗小鼠的胶原蛋白 II，以及羊抗小鼠的骨桥素，用于评估成熟细胞的表型。

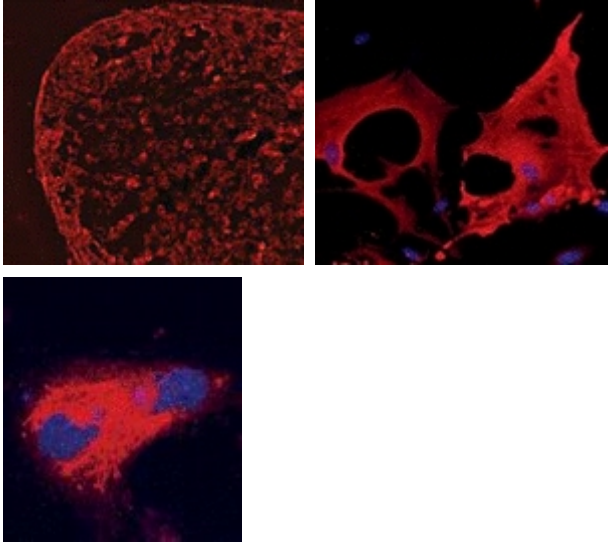


图 4. 小鼠间充质干细胞 (MSC) 的分化。  
小鼠间充质干细胞功能鉴定试剂盒 (货号为 SC010) 用于诱导 MSC 分化形成脂肪生成细胞、软骨形成细胞或成骨细胞。利用试剂盒中提供的抗体包括抗-胶原蛋白 II (A)、抗-FABP4 (B) 或抗骨桥素 (C) 来评估成熟细胞的表型。B 和 C 中的细胞核由 DAPI 复染 (蓝色)。

# 安捷伦推出最灵敏的 TOF LC/MS

安捷伦科技最近推出 **Agilent 6230 精确质量飞行时间液相色谱/质谱 (LC/MS) 系统**。这台新仪器能检测并鉴定低至 **2 pg** 的化合物，让它成为食品安全、毒理学和其他痕量化合物测定的有力工具。

除了无以伦比的灵敏度和质量准确性之外，安捷伦还编制了一个农药的精确质量综合数据库，让用户能快速鉴定食品和环境样品中的农药，同时具有很高的可信度。

**Agilent 6230 精确质量 TOF LC/MS** 具有低于 **1 ppm** 的质量精确度，与更昂贵的 **FTMS** 相当或更好。安捷伦特有的喷气流热梯度聚焦技术让柱上的灵敏度较以前的仪器提高了 **5 倍以上**。这种专利设计利用过热的氮气作为鞘气，因此更多的离子和更少的溶剂液滴进入质谱分析仪。与传统的设计相比，信号更强而噪音更低，灵敏度更高。

安捷伦的产品经理 **Ken Imatani** 表示：“食品安全科学家对 **TOF** 技术来筛选食品表示出了强烈的兴趣，但是需要更高的灵敏度来检测 **10 ppb** 或更低的分析物。我们改进了检测水平，现在能达到 **1 ppb**，甚至能达到 **0.1 ppb** 的浓度水平，这可是 **TOF** 检测技术的真正突破。它与新的精确质量农药综合数据库结合，能让客户更快更自信地鉴定出农药。”

新的安捷伦农药数据库包含了超过 **1600 种** 化合物的精确质量信息，包括链接到 **PubChem**、**ChemSpider** 和其他化学数据库中的结构数据。这个数据库还容许添加 **LC** 保留时间，再加上精

确质量结果，为验证化合物的身份增添了信心。

除了农药数据库，安捷伦还计划推出毒理学和滥用药物的化合物数据库。

科罗拉多大学环境质谱学中心的 **Michael Thurman** 博士认为：“利用飞行时间进行精确质量分析对环境分析来说非常有用，新的 **Agilent TOF 6230** 很可靠，并有着高的分辨率和准确性。灵敏度上的改进让这台仪器成为农药和药物分析的绝佳选择。”

**Agilent 6230 精确质量 TOF** 利用 **MassHunter Workstation** 软件来获取数据，并进行定性和定量的数据分析。其中包括独特的数据发掘功能，它基于强大的分子特征提取和分子量生成算法，让复杂混合物中的化合物鉴定更简单。

## 关于安捷伦

安捷伦科技公司（纽约证券交易所代码：**A**）是世界上最好的测量公司，也是通信、电子、生命科学和化学分析领域的领先者。该公司总部设在美国加利福尼亚州，拥有 **20000 名** 员工，为 **110 多个** 国家的客户提供服务。安捷伦在 **2008 财年** 的净营业收入达 **58 亿美元**。更多关于安捷伦的信息，请访问：[www.agilent.com](http://www.agilent.com)。

（生物通 余亮）

# Bio-Rad 推出高通量的 CFX384 实时定量 PCR 仪

Bio-Rad 继今年 5 月推出 CFX96 定量 PCR 仪之后，最近又推出新的 CFX384 实时定量 PCR 仪，以及安全版的 CFX Manager 软件。

有了 CFX384 系统，研究人员能以 384 孔板的形式进行高通量的实时定量 PCR 反应，同时还保留灵活性和便利性。CFX384 系统在一致性、检测的动力范围 and 多重分析方面表现出了极好的性能。同时有几种配置可供选择，你可以只选择一台不带电脑的单机，或一台仪器同时控制四台仪器。

利用 Bio-Rad C1000 PCR 仪的基座作为基本的热循环仪，CFX384 实时定量 PCR 仪融合了创新的光学技术和软件，带来了灵敏、可靠的检测，应用范围包括绝对定量、遗传变异分析和基因表达。该系统单独读取每个孔，灵敏度高、无干扰，能提供最佳的定量结果。多种数据获取模式能根据应用进行调整，小巧的外型设计满足任何实验室的要求。

CFX384 实时定量 PCR 系统提供了多种扫描模式，因此仪器操作可根据不同的检测试剂进行调整。通过 SYBR/FAM 扫描模式，SYBR Green I 和单色的 FAM 的步骤能在较短时间内完成，只需 8 秒就能收集 384 孔的数据。在多通道扫描模式中，仪器能在 20 秒内检测 1 到 4 个通道中的所有 384 孔，区分单个孔中的四种模板。

CFX384 实时定量 PCR 仪的优势包括：

## ◆ 性能可靠

光学系统运用耐用的固态技术以及过滤的 LED 和过滤的光电二极管，能准确的定量和区分模板。

## ◆ 节约样品和试剂

它能进行 4 种靶点的多重反应，利用最少的

样品取得最佳的定量结果。

## ◆ 配置灵活

CFX384 实时定量 PCR 仪有几种配置可供用户选择，包括全自动模式。

## ◆ 简化数据分析

CFX Manager 软件能让研究人员利用多个对照基因和各自的反应效率进行基因表达分析。

## ◆ 结果可靠

CFX384 系统能整合安全版的 CFX Manager 软件，符合美国 FDA 的规定。

CFX384 实时定量 PCR 仪能通过 CFX Manager 软件（1.1 版本）来控制。1.1 版本的特征是能更准确地帮助研究人员进行实验和分析数据。

更多信息，请访问[www.bio-rad.com/pcr/](http://www.bio-rad.com/pcr/)。

## 关于 Bio-Rad

Bio-Rad 公司（美国证券交易所代码：BIO & BIOb）50 多年来一直致力于生产和销售生命科学研究和临床诊断系列产品，在科学探索领域保持领先水平。该公司的产品质量与客户服务在世界各地的医院、大学、主要研究机构、生物技术公司及药厂中都有口皆碑。1952 年，Bio-Rad 成立于美国加州的 Hercules，为全球市场 85,000 多名科研和工业客户提供服务。这家公司全球雇员超过 6300 名，2007 年收入接近 15 亿美金。更详细的信息请访问[www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)。

（生物通 余亮）

# Invitrogen 发布新产品，简化了新一代测序的样品制备

Invitrogen（现属于生命科技公司）最近推出了两种试剂，能简化新一代测序中的基因组和转录组分析。这两种试剂为研究人员提供了创新的工作流程，大大减少了新一代测序的文库制备中的时间、费用和实验可变性。

这两种产品分别是 RiboMinus 试剂盒和 E-Gel SizeSelect 2% 预制琼脂糖胶。它们适于转录组的探索和鉴定、全基因组相关结果的验证、目标重测序、染色质免疫沉淀（ChIP）、稀有的体细胞突变检测、以及表观遗传研究，能简化工作流程，减少实验的时间和成本。这些产品与新一代高通量基因组分析平台都兼容，包括 ABI 的 SOLiD 系统、Illumina 的 Genome Analyzer 和 Roche 的 GS FLX 系统。

RiboMinus 试剂盒有两种：一种是真核生物通用的，另一种是特别针对植物的。它们能在全转录组分析前富集 RNA。这些试剂盒利用特定的寡核苷酸探针锁定核酸，并利用磁珠进行分离，从而去除转录组中丰度最高的核糖体 RNA。如果不去除核糖体 RNA，它会覆盖许多有意义的 mRNA，影响新的 RNA 转录本的发现。研究人员可以利用 RiboMinus 来发现与人类疾病相关的低丰度 RNA，或农产品中参与抗旱抗虫害的因素。

E-Gel SizeSelect 2% 预制琼脂糖胶则简化了短片断文库构建过程中小于 1000 bp 的核酸片断的分离和回收。对于大部分的新一代测序平台，核酸链需要打断成更小的片断，作为测序模板。E-Gel SizeSelect 2% 系统将这个步骤的时间从几个小时缩短至 15 分钟，且不需要进一步的纯化。E-Gel 系统已经用于 SOLiD 系统和 Genome Analyzer 中片断和配对末端的文库构建。

南加州大学 Zilkha 神经系统研究所的教授 Jim Knowles 博士一直在用 E-Gel SizeSelect 2% 系统来探索让个体易感精神病的遗传因素。他的研究团队一直致力于急性焦虑症、强迫症、烟瘾、毒瘾、重型抑郁症和肺动脉高血压的研究。

Knowles 博士表示：“我们在新一代测序的文库制备时用 E-Gel SizeSelect 2% 系统来选择不同大小的 DNA 片断。与琼脂糖胶相比，它更快更有效，产量高且不需要太多技巧。”

更多的信息，请访问：[www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com) 和 [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)。

## 关于生命科技公司

生命科技公司（纳斯达克代码：LIFE）是一家致力于改善人类环境的全球生物技术公司。我们的仪器、耗材和服务能让研究者加速科学探索与开发，让生命变得更美好。我们的客户在生物学领域努力工作，不断加速个性化药物、再生科学、分子诊断、农业和环境研究以及 21 世纪的法医鉴定。公司的历史销售额接近 35 亿，全球雇员达 9500 人，分布在 100 多个国家，并拥有 3600 多项知识产权专利及专有许可证。生命科技公司由 Invitrogen 公司 and 应用生物系统公司合并而成。更多信息，请访问我们的网站 [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)。

（生物通 余亮）

# 北京基因组研究所再添 8 台 SOLiD

根据 ABI（现属于生命科技公司）的报道，中国科学院北京基因组研究所（BIG）再添 8 台 SOLiD 系统，用于多种基因组研究。

基于它强大的基因组分析平台，北京基因组研究所的研究精力主要集中在基因组学和生物信息学，长期目标是将原始的基因组数据转换成对生命科学研究有意义的信息。有了这些新的 SOLiD 系统，BIG 计划用于探索癌症基因的突变图谱、研究模式生物的遗传变异、微生物基因组学分析，以及发现并鉴定新颖的 microRNA。利用高通量的基因组分析技术如 SOLiD 系统产生的海量数据，科学家能对体细胞突变如何产生疾病有更好的了解。

北京基因组研究所所长吴仲义博士表示：“北京基因组研究所在生产和分析复杂基因组数据上扮演着重要角色。DNA 测序是我们探索的基石，我们不断投资新技术，以更综合的视角探索生物变异。这次扩展 SOLiD 系统，我们将受益于它们的通量、灵活性和灵敏度，这些将大大促进基因组研究，如重测序来发现病原体基因组、癌症遗传学，以及研究所的单个研究计划。”

BIG 的研究人员将得益于 SOLiD 系统的灵活性和多重分析能力，来进行一系列大规模重测序和 RNA 分析计划。例如，他们计划用 SOLiD 系统和新的 SOLiD 小分子 RNA 表达分析试剂盒，来研究编码及非编码转录本的作用，发现干细胞的 RNA 表达谱。个体干细胞的综合 RNA 表达谱将为遗传上相同细胞的分子变异提供线索，并有助于了解引发多能干细胞分化的分子机制。

SOLiD 系统是生命科学行业最高通量的基因

组分析平台。该系统还不断更新，目前最新的版本——SOLiD 3 的样品通量大大提高。它每轮测序能产生 20GB 以上的可作图序列数据或 4 亿个标签，预计将在 2009 年上市。数据输出的巨大改进有望进一步降低基因组测序的费用，包括 DNA、RNA 和表观遗传学分析。高质量的基因组数据加上成本降低，研究人员能加速疾病关联和生物标志物的发现，从而改善诊断和疾病管理。

SOLiD 系统还入选了 2008 年度生命科学十大创新产品评选活动。它的创新在于：超高通量的基因组分析平台，内在可扩展性高。关于 SOLiD 系统的更详细介绍，请看[新一代测序技术的先锋 SOLiD 系统](#)。

## 关于生命科技公司

生命科技公司（纳斯达克代码：LIFE）是一家致力于改善人类环境的全球生物技术公司。我们的仪器、耗材和服务能让研究者加速科学探索与开发，让生命变得更美好。我们的客户在生物学领域努力工作，不断加速个性化药物、再生科学、分子诊断、农业和环境研究以及 21 世纪的法医鉴定。公司的历史销售额接近 35 亿，全球雇员达 9500 人，分布在 100 多个国家，并拥有 3600 多项知识产权专利及专有许可证。生命科技公司由 Invitrogen 公司 and 应用生物系统公司合并而成。更多信息，请访问我们的网站 [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)。

（生物通 余亮）

# 生命科技公司将利用人胚胎干细胞 构建疾病模型

生命科技公司（前 Invitrogen）近日宣布将利用人胚胎干细胞来开发肌萎缩性侧索硬化症（Lou Gehrig's Disease, ALS）和其他神经退化性疾病的研究模型。这项研究的资金来自加利福尼亚再生医学研究所（CIRM），该机构专门为加州的大学、私营公司和研究所提供资金。

根据 ALS 协会的数据，每年美国有近 5600 人被诊断出患有 ALS。肌萎缩性侧索硬化症是一种进行性的神经退化疾病，攻击运动神经元和脊髓。在神经死亡之后，正常的肌肉功能丧失，导致疾病晚期的瘫痪。

生命科技公司获得了 87 万美元的资金，为期两年。该公司将会利用人胚胎干细胞来构建疾病模型，并开发相关的步骤和试剂，用于遗传改造干细胞。ALS 的突变和病因已经通过动物模型有了大致了解。但还未能准确靶定突变基因，而且人的疾病通常不能在动物模型中完整还原。疾病的人类模型将用于筛选药物，并进行相关的药物分析。

这个项目的首席科学家刘颖（音译）博士表示：“在开发有效改造人类干细胞的新工具方面，我们已经表现出高水平的技能和创新性。我们的研究小组在改造人胚胎干细胞方面已经形成了核心竞争力。生命科技公司在干细胞领域大踏步前进。”

根据 CIRM 的说法，Tools and Technologies Awards 将会支持任何创造出干细胞研究新试剂和新方法，或对现有技术扩大化的研究。这项资金是为了加速慢性病治疗方法的开发。

## 关于生命科技公司

生命科技公司（纳斯达克代码：LIFE）是一家致力于改善人类环境的全球生物技术公司。我们的仪器、耗材和服务能让研究者加速科学探索与开发，让生命变得更美好。我们的客户在生物学领域努力工作，不断加速个性化药物、再生科学、分子诊断、农业和环境研究以及 21 世纪的法医鉴定。公司的历史销售额接近 35 亿，全球雇员达 9500 人，分布在 100 多个国家，并拥有 3600 多项知识产权专利及专有许可证。生命科技公司由 Invitrogen 公司 and 应用生物系统公司合并而成。更多信息，请访问我们的网站 [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com)。

（生物通 余亮）