

EBIOTECH

生物通技术周刊

第55期

2009年1月16日

全文下载

【技术前沿】

如何制备高滴度的慢病毒？

多功能的白介素-33

蛋白多糖 (Glypican) 在癌症中的角色

【新品速递】

干细胞SILAC研究的新工具

美天旎新推出EPC富集工具

Invitrogen推出无异源成分的hESC培养试剂

基于单色器的Synergy Mx多功能酶标仪新上市

专业设计、定量独享—Eppendorf 荧光定量PCR耗材全新上市

【应用指南】

转录组测序发现前列腺癌中新的基因融合

【行业动态】

Sigma收购Seppro去除技术及700种抗体

打击水货——美天旎公司郑重声明

如何制备高滴度的慢病毒？

慢病毒在基因表达中广受欢迎，因为其能转导大部分的细胞类型，并整合到宿主基因组上，实现长期稳定的表达。不过很多研究人员的困扰是制备出的慢病毒滴度不高，需要纯化和浓缩后才能有效地感染细胞。在此，罗氏公司的研究人员开发出一种制备慢病毒的新方法。它主要利用了一些升级换代的新产品，能摆脱慢病毒制备过程中的毒性困扰，并实现高达 1010TU/ml 的产量。更重要的是，重复性好。

实验材料

T175 培养瓶：此步骤适合于 T175 培养瓶。
实验中可能需要 5-10 个培养瓶。

包装细胞系：HEK 293-FT (Invitrogen)

表达载体：第三代的慢病毒表达载体（详见[慢病毒表达载体](#)一文）或 cFUGW (Cal Tech)

包装质粒：pLP1、pLP2 和 pLP/VSV-G (Invitrogen)

转染试剂：Fugene HD (罗氏)

操作步骤

Day 1

1. Coat T-175 flask(s) with 10 ml polylysine solution (0.01 mg/ml, or 10 µg/ml) in sterile water/PBS. Leave for at least 1 h.

2. Wash twice with 20 ml sterile water.

3. Split HEK-293FT cells into coated flasks at ~50% confluency around 5:00 PM the day before transfection, with cells growing in 20 ml of 10% FBS Opti-MEM (with GlutaMAX).

Day 2

4. Next morning (9:00 AM), remove media,

add 20 ml serum-free (SF) Opti-MEM (with GlutaMAX) supplemented with 25 µM chloroquine.

5. Prepare transfection complex:

a. Add together 10.5 µg pLP1, 7 µg pLP2, 10.5 µg pVSV-G, and 9.3 µg cFUGW. Plasmid preparations should be of extremely high quality and endotoxin free.

b. Dilute DNA into 2 ml of SF Opti-MEM.

c. Add 100 µl FuGENE• HD Transfection Reagent, briefly vortex, and incubate 15 minutes at room temperature.

6. Pipet directly to media in the flask of cells. Agitate flask until contents are distributed.

7. In the early evening of the same day (~5:00 PM), supplement with 10 µM sodium butyrate, directly to the flask medium.

Day 3

8. Next morning (9:00 AM), discard media and replace with 20 ml of SF Opti-MEM (with GlutaMAX and no other supplements).

Note: the discarded media has a small amount of virus and is BSL-2 (bleach disposal,

etc.).

Day 4

9. Next morning, transfer the media in each flask (~20 ml) to a Falcon 50 ml centrifuge tube. Replace 20 ml of fresh SF Opti-MEM (with GlutaMAX) media to flask.

10. Spin Falcon tube at 2000× g for 10 min at 4°C and transfer supernatant to new 50 ml tube. Store at 4°C overnight.

Day 5

11. Next morning (9:00 AM), collect ~20 ml of media to a new 50 ml tube.

12. Spin at 2000× g for 10 min at 4°C and then transfer supernatant to the existing 50 ml tube from the day before, which will now contain approximately 40 ml of viral

supernatant.

13. Pass tube contents through a 22 μm vacuum filter (Millipore).

14. Virus can be used as a 1× virus preparation (~1× 10⁷ TU/ml); freeze as 5 ml aliquots at -80° C.

为了确定慢病毒的纯度和浓度是否达到体内应用的要求,将 2 微升 4×10¹⁰ TU 的病毒(编码 eGFP) 注射进入小鼠尾壳核区的前部。一星期后,用免疫组织化学和免疫荧光的方法分析脑区。感染性广,而毒性低,说明这种方法能制备出高质量的慢病毒。

更详细的优化步骤,请登录罗氏公司的网站查看 [Optimized Production of Lentivirus Using FuGENE HD Transfection Reagent](#). Biochemica 3/2008: 17-19。

多功能的白介素-33

白介素-33 (IL-33) 的功能曾被三个独立研究小组从不同的生物角度进行了研究。Onda 等人确定 DVS27 是一种脑动脉血管痉挛时上调的蛋白质¹。Baekkevold 等人发现 NF-HEV 是高内皮微静脉的内皮细胞的一种核因子²。Schmitz 等人认为 IL-33 是白介素-1 家族的细胞因子³。DVS27、NF-HEV 和 IL-33 指的都是同一个功能蛋白, 它们主要在内皮细胞及平滑肌细胞的脉管和气管系统中表达^{3,4}。在炎症刺激时, IL-33 在这些细胞中表达上调, 同样的, 在炎症刺激的表皮细胞和真皮成纤维细胞中, 机械牵拉时的心肌成纤维细胞中 IL-33 表达也上调^{1,5,6}。

人的 IL-33, 是含有 270 个氨基酸的蛋白质和包含一个 N 末端核定位信号 (NLS), 螺旋-转角-螺旋 (HTH) 的基元 (Motif), 和 C 端与白介素 1 家庭细胞因子结构的同源性区域。在体外, 它可以被 caspase-1 切割产生 18 kDa 的 C 端片段, 发挥细胞因子功能作用^{3,5}, 而切割后释放的 N 端片段作用至今仍未被阐明。全长白介素-33 (IL-33) 定位于细胞核, 与异染色质和有丝分裂中染色体有关^{1,2,5}。这些相互作用由 HTH 而不是 NLS 基元介导⁵。IL-33 作为一个转录抑制子 (repressor) 发挥作用, 不过, IL-33 靶基因尚未被发现⁵。

IL-33 的 C 端片段的是唯一与受体 ST2L 偶联的细胞因子^{3,7-9}。IL-33/ST2L 复合体接着与 IL-1 受体 AcP 结合, 激活白细胞介素-33 依赖性 NF- κ B 的活性^{3,10}。IL-1 受体 AcP 是一个共享信号亚单位, 也与 IL-1 受体 1 和 IL-1 受体 6 偶联。细胞外 IL-33 能促进 Th2 亲和的免疫反应, 导致在嗜伊红性白血球和过敏性炎症。在 Th2 细胞, 它促进 IL-4、IL-5、IL-13、以及 ST2L 的上调表达¹⁰; 在肥大细胞中, 它与 TSLP 结合诱导产生几种细胞因子和趋化因子, 但不会触发肥大细胞脱颗粒或类花生酸的产生⁷。ST2L 选择性剪接产生 ST2, ST2 是一种可溶性的诱饵

受体, 在哮喘和心脏衰竭患者的血清中有高表达^{6,8}。ST2 与 IL-33 偶联阻断 ST2L 依赖性信号传导和 IL-33 对免疫学和心脏的影响⁶⁻⁸。IL-33/ST2L 系统在心脏中具有独特的作用。IL-33 可抑制心肌细胞肥大, 而血管紧张素 II (angiotensin II) 或去氧肾上腺素 (phenylephrine), 心肌可诱导细胞肥大⁶。IL-33 对心肌的保护作用, 依赖于 ST2L 介导的信号传导⁶。当 IL-33 在心脏成纤维细胞被诱表达时, ST2 在心肌细胞中机械应激情况下被诱导⁶。

无论在细胞核内还是细胞外, IL-33 与 IL-1 α 和 HMG-B1 表现出相似功能⁴。不像其它的因子, 人们对 IL-33 的全长和被剪接形式的功能了解很少。进一步研究可能会揭示它的转录靶点, 染色体的结合特性, 免疫和心脏功能, 以及与其它利用 IL-1 受体 AcP 的细胞因子的潜在的信号交谈 (crosstalk) 之间的关系。

参考文献:

1. Onda, H. et al, (1990) J. Cereb. Blood Row Metab. 19:1279.*
2. Baekkevold, E S. et al. (2003) Am. J. Pathol. 163:69.*

3. Schmitz, J. et al. (2005) Immunity
23:479.*

4. Gadina, M.& C.A. Jefferies (2007)
Science STKE pe31. *

5. Carriere, V.et al. (2007) Proc Natl Acad
Sci USA 104:282. *

6. Sanada, S.et al. (2007) J.Clin. Invest.
117:1538. *

7. Allakhverdi, Z.et al. (2007) J. Immunol

179:2051. *

8. Hayakawa, H.et al. (2007) J. Biol.
Chem. 282:26369. *

9. Barksby, H.E. et al. (2007) Clin Exp.
Immunol. 149:217. *

10. Chackerian, A.A. et al. (2007) J.
Immunol. 179:2551. *

注：* 标记表示所标参考文献引用了 R&D
Systems 的产品

蛋白多糖(Glypican)在癌症中的角色

蛋白多糖(Proteoglycans,PGs)是一种含有长而不分硫支共价结合重复二糖长链的糖蛋白。酸乙酰肝素蛋白多糖(HSPGs)是含有硫酸乙酰肝素(HS)粘多糖(GAG)链的蛋白多糖。该物质在细胞中和细胞外基质(ECM)中含量丰富,并在发育和病理生理学中发挥多种作用¹。HSPG作为生长因子和成形成素(morphogen)的共受体,可调节ECM中的信号分子及创伤处聚集的趋化因子的稳态和分布,调节细胞粘附和运动,影响细胞内的膜运输²。HSPG分为三类:分泌型的细胞外基质蛋白多糖、跨膜型的黏结蛋白多糖(Syndecan)和GPI连接的Glypican^{1,2}。在哺乳动物中已鉴定出六种glypican(GPC1-6),每种都含有一个60-70kDa的蛋白核心,并通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定在细胞膜上,因其球形结构而被限制在HS型GAG附着位点上¹⁻³。

由于glypican作为共受体可以易化配体和受体的结合并有效降低所需配体的浓度,因此glypican在肿瘤环境中表达⁴。Glypican-1、-3、-5都与肿瘤发生过程相关,主要影响生长因子信号传导和细胞增殖。GPC1在人类神经胶质瘤和神经胶质瘤起源的细胞株中表达增加,可以增强碱性FGF(FGFb)信号传导和有丝分裂发生⁵。在胰腺和乳腺癌细胞中,GPC1同样过量产生,从而影响FGF和肝素结合类EGF信号传导^{6,7}。在胰腺癌细胞中,反义GPC1能降低肿瘤在体内的形成⁸。另外,GPC5也具有增强肿瘤细胞增殖的能力,其上调与一种恶性骨骼肌肿瘤——横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma)的发生及其细胞增殖提高密切相关。它的机制与GPC5介导的碱性FGF、肝细胞生长因子(HGF)和Wnt-1活性相关⁹。

Glypican-3在肿瘤发生中的作用并不是一目了然。一方面,GPC3在肝细胞肿瘤发生中过量表达并促进其生长^{10,11}。在此过程中GPC3削弱FGF和骨形态发生蛋白-7(BMP-7)的信号表达,却刺激经典的Wnt信号的传导^{10,11}。另一方面,下调GPC3功能促进HepG2肝癌细

胞生长,而且GPC3在间皮瘤、卵巢癌和乳腺癌细胞株中通常也处于沉默状态^{3,12}。从对Simpson-Golabi-Behmel综合症的临床研究来看,GPC3可能扮演抑制细胞增殖的角色。该病患者GPC3蛋白没有功能,表现出许多异常,如出生前及出生后的生长过度以及易患某些恶性肿瘤¹³。

HS链上带负电的硫酸根与配体上的碱性氨基酸相互作用将生长因子以HS固定住似乎不足以解释glypican在生长因子介导的信号转导中的作用。例如,硫酸根的分步和数量影响FGF受体2c与硫酸乙酰肝素相互作用,该过程需要2-O-和6-O-硫酸根残基同时出现¹⁴。还有证据显示,HS链并不是所有蛋白多糖活动所必须的,蛋白多糖可通过其蛋白核心直接与生长因子相互作用^{1,3}。另外,分泌型的glypican可能通过与其膜整合型不同的机制发生作用³。尽管如此,蛋白多糖对生长因子信号的调控使glypican(及其它多聚糖)成为癌症治疗中极具吸引力的研究对象⁴。

参考文献:

1. Bishop, J.R et al. (2007) Nature

446:1030.

2. Kirkpatrick, C.A. & S.B. Selteck (2007) J. Cell Sci. 120:1829.

3. Fimus, J. (2001) Glycobiology 11:19R.

4. Fuster, M.M. & J.D. Esko (2005) Nat Rev Cancer 5:526

5. Su, G. et al. (2006) Am. J. Pathol. 168:2014. *

6. Kleeff J. et al. (1998) J. Clin. Invest 102:1662.

7. Matsuda, K. et al. (2001) Cancer Res. 61:5562. *

8. Kleeff, J. et al. (1999) Pancreas 19:281.

9. Williamson, D. et al. (2007) Cancer Res. 67:57. *

10. Midrikawa, Y. et al. (2003) Int J. Cancer 103:455. *

11. Capurro, M.L. et al. (2005) Cancer Res 65:6245. *

12. Sung, Y.K. et al. (2003) Exp. Mol. Med. 35:257. *

13. Jakubovic, B.D. & S. Jothy (2007) Exp Mol. Pathol. 82:184.

14. Pye, D.A. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:22936. *

15. Rosenberg, R.D. et al. (1997) J. Clin. Invest. 100:567.

16. Vengelters, M. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:26968.

注：* 标记表示所标参考文献引用了 R&D Systems 的产品

干细胞 SILAC 研究的新工具

定量蛋白质组学在 2008 年取得了不少突破，许多重要的蛋白质组研究成果被报道，包括目前最大的 ES 细胞的蛋白质图谱，细胞周期中磷酸化的动力学以及单倍体和二倍体酵母的蛋白质组的比较。其中利用代谢标记的 SILAC 技术立下了汗马功劳。

SILAC 的全称为“在细胞培养中利用氨基酸进行稳定同位素标记”。它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和定量。

目前用于 SILAC 研究的培养基主要有 DMEM 和 RPMI-1640 两种，尽管它能用于多种细胞的培养，但毕竟不是全能的，像干细胞的培养就无法胜任。于是，赛默飞世尔科技扩充了 SILAC 产品线，推出了干细胞和乳腺癌研究的 SILAC 工具，主要包括：

◆ 用于 SILAC 的小鼠干细胞扩增 DMEM，低渗透压小鼠干细胞 DMEM 和人间充质干细胞通用的扩增培养基。它们是专门设计用于干细胞增殖和 SILAC 蛋白表达图谱的质谱分析。

◆ 干细胞筛选过的透析 FBS，确保不会促进干细胞分化。

◆ 小鼠胚胎干细胞的血清替代物，利于检测分泌蛋白。

◆ 用于 SILAC 的无酚红 MEM 培养基，适用于易受雌激素刺激的细胞，如乳腺癌细胞系 MCF7，而不会产生人为的雌激素反应。

上述产品能与 Thermo Scientific HyClone 的 AdvanceSTEM 系列干细胞产品共同使用，为研究人员提供了干细胞培养的整体解决方案。除了这些癌症和干细胞蛋白定量的培养基，赛默飞世尔还单独提供了同位素标记的氨基酸，有 13C6, 15N2 标记的 L-赖氨酸和 13C6 标记的 L-精氨酸。有了这些氨基酸，你能进行多重 SILAC 分析。例如，在正常的精氨酸和赖氨酸，精氨酸 (+10) 和赖氨酸 (+6)，或精氨酸 (+6) 和赖氨酸 (+8) 中培养细胞，并同时比较三种处理方法。此外，赛默飞世尔还提供了 L-脯氨酸作为培养基添加剂，以防止同位素标记的精氨酸代谢转换成脯氨酸。

关于更多的 SILAC 产品，请访问 www.thermo.com/SILAC。

(生物通 余亮)

美天旎新推出 EPC 富集工具

许多实验数据和临床研究发现骨髓中存在着大量的内皮祖细胞 (EPC)。它们在血液中循环, 具有分化成内皮细胞的能力。内皮祖细胞生成血管的过程称为血管发生 (vasculogenesis)。大部分血管发生出现在胚胎发育时期。普遍认为内皮祖细胞参与了病态的血管再生 (angiogenesis), 如视网膜病和肿瘤生长。内皮祖细胞最初来源于骨髓, 研究表明各种细胞因子、生长因子和激素促使它们进入外周循环, 并最终停留在血管再生的区域。

内皮祖细胞的特点是共表达 CD34、CD133、CD309 (VEGFR-2)。CD133 的表达似乎只限于最早期的 EPC, 而在成熟过程中丧失, 因此对它的分析是鉴定 EPC 成熟状态所必需的。

人们尝试了多种方法通过流式细胞仪来定量全血或骨髓中的 EPC, 但鉴于 EPC 的数量不一, 从 10 到 2500 个/ml 不等, 因此定量存在一定难度。而多种分离和定量步骤让结果之间的比较和阐释更复杂。

为此, 德国美天旎公司近日推出了 EPC 富集试剂盒 (EPC Enrichment and Enumeration Kit), 专门设计用于从外周血、脐带血中收集循环的 EPC, 以及从骨髓中富集 EPC。

试剂盒中包含了红细胞裂解, EPC 富集, Fc 受体调节的非靶细胞的非特异性标记的封闭, 根据 CD34、CD133 和 CD309 的表达富集

EPC, 以及去除 CD14 阳性细胞的所有试剂, 同型对照和去除死细胞试剂。

循环的 EPC (cEPC) 被认为是评估多种疾病的危险系数和血管修复能力的可度量参数。cEPC 的数量与多种状态相关, 包括充血性心力衰竭、急性心肌梗塞、动脉粥样硬化的危险系数、心血管疾病、体育锻炼等。

此种分析方法快速 (只需 2 小时)、重复性好, 能满足稀少细胞分析的需要。通过 FcR 封闭试剂、优化的阳性和阴性标记物以及去除死细胞、非目的细胞和自发荧光细胞的策略, 能够实现可靠的标准化结果。

更多关于 EPC 富集及定量试剂盒的信息, 请访问美天旎的网站: <http://www.miltenyibiotec.com>。

(生物通 余亮)

Invitrogen 推出无异源成分的 hESC 培养试剂

Invitrogen (现属于生命科技公司) 近日宣布推出了 KNOCKOUT SR XenoFree 血清替代物, 用于人胚胎干细胞 (hESC) 和人诱导多能干细胞 (iPS) 的培养。

到目前为止, 大部分 hESC 的研究还沿用小鼠来源的滋养层细胞, 以及来自牛的血清。而在理想情况下, hESC 研究及向治疗上的转换都不允许使用异源成分, 因为异源成分会让人胚胎干细胞系污染非人源蛋白, 在干细胞研究向临床转换时带来监管上的问题。

KNOCKOUT SR XenoFree 血清替代物源自 KNOCKOUT SR。KNOCKOUT SR 是维持未分化 hESC 同时保留细胞多能性的金标准试剂, 到目前为止已经有 200 多篇论文中提到了它。KNOCKOUT SR XenoFree 血清替代物的所有成分都是人源或合成的, 完全不含有异源成分。

特点:

- ◆ 配方中只含有人源或在 cGMP 条件下生产的人重组蛋白
- ◆ 维持 hESC 和人 iPS 细胞的多能性和正常的形态/核型
- ◆ 保留 hESC 和人 iPS 细胞的分化潜能
- ◆ 它能在无异源无滋养层的环境中与 CELLstart 和 KnockOut SR XenoFree 生长因子套装共同使用
- ◆ 它能在无异源有滋养层的环境中与人包皮成纤维细胞 (HFF) 和 CELLstart 共用, 来实

现细胞附着

生命科技公司原代及干细胞系统的副总裁 Joydeep Goswami 表示: “为了避免污染蛋白进入人胚胎干细胞, 科学家们努力开发一种不含有外源蛋白的试剂。KNOCKOUT SR XenoFree 血清替代物实现了这个目标, 为干细胞研究的临床应用铺平道路。”

关于 KNOCKOUT SR XenoFree 血清替代物及相关产品的更多信息, 请访问: www.invitrogen.com/stemcell/ksrxf。

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 公司和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。

(生物通 余亮)

基于单色器的 Synergy Mx 多功能酶标仪新上市

EBIOTECH

生物通

BioTek 仪器公司在酶标板技术又有创新，近日推出具有超微调功能的 Synergy Mx 多功能酶标仪。Synergy Mx 在荧光、冷光和吸收率读数模式上的超微调功能让其可与单一模式系统相媲美。

这种上下读数的荧光系统是完全基于单色器的，并装有可变的波段选择系统，增加了灵活性。这种荧光系统的四倍光栅设计确保了精细水平的光谱识别和平稳的光谱扫描。上部光度头的自动化 Z 轴高度调整能容纳不同厚度的微孔板。在小体积样品时也同样能实现光学灵敏度。

Synergy Mx 系统是模块形式的，你可以根据实验室的需要来选择检测模块，当然在任何时候都能升级。振摇和温度控制系统，以及 Gen5 数据分析软件是所有 Synergy Mx 型号的标准配置。

仪器的配件包括 UV-可见光的比色皿槽和双试剂的分液器。比色皿槽能容纳比色皿装的样品，与标准的比色皿分光光度计类似，增加了多功能性。双试剂分液器能在动力学研究、离子通道分析和 flash ATP 分析中精确控制试剂的添加量和时机。

BioTek 市场销售部的主管 Gary Barush 表

示：“在推出 Synergy Mx 之后，我们的生命科学客户只要拥有一台基于单色器的酶标仪，就具备了以前昂贵系统才有的性能和灵活性。我们 Synergy 家族的多功能酶标仪为生命科学研究和药物筛选领域的每个客户都提供了解决方案；并由我们资深的客户服务和支持团队来给予支持。”

BioTek 的 Synergy 产品线包括以 Hybrid 技术融合了单色器和滤光片荧光的 Synergy 4，基于滤光片荧光的 Synergy 2，基于单色器荧光的 Synergy Mx 以及基于滤光片荧光的 Synergy HT。

总部设在美国佛蒙特州的 BioTek 仪器公司，是设计、制造、销售酶标仪及软件的全球领先者。BioTek 的仪器可以加速药物筛选进程，推动基因组和蛋白质组的探索，并协助改进生命科学研究。

（生物通 余亮）

专业设计、定量独享—Eppendorf 荧光定量 PCR 耗材全新上市

EBIOTECH

生物通

Eppendorf 最新推出专为定量 PCR 实验设计的 twin.tec 荧光定量 PCR 板、8 联管及 Masterclear™ 8 联管盖。其独特的白孔和嵌入式管盖设计,可以帮您显著提高实验的灵敏度和重复性,并有利于开展微量体系的定量 PCR。

进行微量体系定量 PCR 最大的限度往往取决于管内的荧光强度。Eppendorf twin.tec 荧光定量 PCR 板及 8 联管的白孔设计,相比普通板或 8 联管的磨砂孔和透明孔设计,反射荧光的能力更强,可以将荧光信号强度提高十倍,从而提高实验的灵敏度。此外,白孔可以显著减少背景信号的干扰,提高实验结果的重复性和均一性。

在定量 PCR 实验中,使用 twin.tec 荧光定量 PCR 板和 8 联管,还可以降低探针的使用量,节省实验成本。而采用微量的反应体系,也是节约成本的一个好方法,不仅节省试剂,还可以节

省珍贵的样本。

Eppendorf Masterclear™ 8 联管盖为您的定量 PCR 带来进一步的优势,巧妙的嵌入式管盖设计,防止光学表面被刮伤或污染,并降低反应管的容量,减少蒸发。极薄的管盖设计,使透光率高达 90%以上,方便在标准管中开展小反应体系的实验。

更多关于twin.tec 荧光定量PCR板、8 联管及Masterclear™ 8 联管盖的信息,欢迎随时与Eppendorf中国各办事处联系,或登录我们的网页www.eppendorf.com/realtime

转录组测序发现前列腺癌中新的基因融合

近日，一项基于转录组测序的研究发现了前列腺癌中新的基因融合。这项研究是由密歇根大学的研究团队完成的，他们通过对病人细胞系和肿瘤样本的转录组进行测序，发现了前列腺癌中新的基因融合。文章发表在1月11日的《Nature》网络版上。

在新发现的融合中，研究人员发现了一个周期性的转录本通读，称为 SLC45A3-ELK4，以及几个似乎是个体突变的融合。密歇根大学的科学家 Arul Chinnaiyan，同时也是文章的通讯作者表示：“周期性的融合被认为是癌症的主要诱因。但我们还发现了其他几个融合，是个别病人独具的。”

癌症中的染色体重排常常导致两个独立的基因融合在一起。在某些情况下，两个基因编码区连接在一起，导致融合蛋白的表达。而有时基因重排会导致一个基因处于另一个基因的调控元件之下，从而引起异常的基因表达。基因融合与多种血液、骨髓和软组织癌症，如白血病、淋巴瘤等相关。最近也发现它们开始在实体瘤中出现。

为了鉴定前列腺癌中致癌的基因融合，Chinnaiyan 和他的同事们同时利用了 Roche 454 的 GS FLX 和 Illumina 的 Genome Analyzer 进行转录组的测序分析。

最初为了验证他们的方法，研究人员进行了一系列验证实验，来看在慢性粒细胞白血病中是否能检测到已知的基因融合-BCR-ABL1。

在构建了 cDNA 文库之后，研究人员在 Genome Analyzer 上得到了几百万个 36-核苷酸的序列读长。他们筛选了这些读长来找出不止含有一个基因的序列。通过与参考序列信息整合，

研究小组提出了发现已知和新基因融合的方法。参考序列信息来自 454 测序产生的长读长。

他们还成功发现了前列腺癌肿瘤样品和细胞系中的 TMPRSS2-ERG 融合。在这个过程中，研究人员发现了新的融合的通读事件。例如，在 VcaP 细胞系中，他们检测到在 16 号染色体上的两个基因 USP10 和 ZDHHC7 发生了融合，以及 2 号染色体上 HJURP 基因的融合。同时在 LNCaP 细胞系中，他们发现了 14 号染色体上 MIPOL1 基因和 7 号染色体上 DGKB 基因的融合。

接下来，研究小组从细胞系转向肿瘤样本。利用转录组测序方法，他们评估了两种已知携带 TMPRSS2-ERG 融合的转移性前列腺癌样本。他们如预期所示发现了 TMPRSS2-ERG 融合，此外，还发现了几种新的融合和通读转录本。

其中，SLC45A3-ELK4 似乎是前列腺癌的常客，20 个转移性组织中有 7 个表达这种融合。作者表示，SLC45A3-ELK4 融合似乎不会引起 DNA 产生可检测到的变化。

Chinnaiyan 和他的同事还在应用类似的方法研究乳腺癌、肺癌和黑色素瘤中的基因融合。他们认为：“这项利用高通量测序研究为发现新的基因融合建立了可靠的方法，展现了与癌症相关的重要突变。”

原文检索：Transcriptome sequencing to

detect gene fusions in cancer

摘要: Recurrent gene fusions, typically associated with haematological malignancies and rare bone and soft-tissue tumours¹, have recently been described in common solid tumours^{2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9}. Here we use an integrative analysis of high-throughput long- and short-read transcriptome sequencing of cancer cells to discover novel gene fusions. As a proof of concept, we successfully used integrative transcriptome sequencing to 're-discover' the BCR-ABL1 (ref. 10) gene fusion in a chronic myelogenous leukaemia

cell line and the TMPRSS2-ERG 2, 3 gene fusion in a prostate cancer cell line and tissues. Additionally, we nominated, and experimentally validated, novel gene fusions resulting in chimaeric transcripts in cancer cell lines and tumours. Taken together, this study establishes a robust pipeline for the discovery of novel gene chimaeras using high-throughput sequencing, opening up an important class of cancer-related mutations for comprehensive characterization.

(生物通 余亮)

Sigma 收购 Seppro 去除技术及 700 种抗体

EBIOTECH

生物通

Sigma-Aldrich 公司近日从 GenWay 生物技术公司收购了 Seppro 亲和去除技术 (affinity depletion technology) 及 700 种禽源的抗体, 扩展了其蛋白质组学产品线。Seppro 去除产品能让研究人员更准确地测定多种样品中蛋白标记物的表达。此次收购涉及目前的存货, 生产技术以及生产和销售产品线的所有未来授权。

Seppro IgY 去除平台是基于抗体的技术, 能处理血浆、血清和植物样品。它通过去除高丰度蛋白, 让研究人员能检测并分析样品中难以发现的生物标记物。Seppro 去除产品是基于鸡来源的 IgY 抗体, 与其他类似产品相比选择性更高, 而交叉反应更低。Seppro 平台再加上 SuperMix 技术, 代表了目前最完整的去除系统, 能从人血清或血浆中去除 14 种最高丰度的蛋白, 以及其他高或中等丰度的蛋白。同时还有适用于小鼠和大鼠的去除产品, 以及唯一能去除 Rubisco 的系统。

从 GenWay 收购而来的 700 种多克隆的 IgY 抗体, 是 Sigma-Aldrich 首次提供 IgY 抗体。这些抗体来源于鸡胚, 是用重组抗原来制备的。鸡抗与哺乳动物蛋白之间显示了较少的交叉反应, 让免疫化学分析中假阳性的反应更少。鸡的 IgY 一般比哺乳动物来源的 IgG 更稳定。在此次收购完成后, Sigma-Aldrich 还计划扩充抗体目录, 因为在 2008 年新增了 8000 多种抗体。

Sigma-Aldrich 生物技术产业部的总裁 Dave Smoller 博士表示: “这次对 Seppro 的收购显著增强了 Sigma-Aldrich 在抗体去除技术上

的地位。我们的目标是通过收购和合作, 为研究人员提供最全面和最具特色的抗体和抗体相关产品。”

Seppro 技术包括从人血清和血浆中去除高丰度蛋白 (如白蛋白和 IgG) 的 ProteoPrep 试剂盒。更多关于 Seppro 和所有蛋白样品制备的产品信息, 请访问 <http://www.sigma-aldrich.com/genway>。

关于 Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich 是一个领先的生命科学和高科技公司。它的生化和有机化学产品和试剂盒广泛应用于基因组学研究、生物技术、药物研发和疾病诊断, 并成为药物及其他高科技生产的关键组分。该公司的客户遍布生命科学公司、大学和政府研究院、医院和工业。超过百万科学家和技术人员使用其产品。Sigma-Aldrich 致力于通过在生命科学的领导地位、高科技和服务来加速客户的成功。如需 Sigma-Aldrich 的更详细信息, 请访问其屡获大奖的网站 www.sigma-aldrich.com。

(生物通 余亮)

打击水货——美天旎公司郑重声明

近日我们发现有以下公司：

美科美(北京)生物医学科技中心

上海世仪生物科技有限公司

武汉华瑞康生物科技有限公司

湖南科泰生物技术有限公司

未经授权经营我公司产品，现做如下声明：

1 —美天旎公司是德国最具有权威性的细胞分选技术的技术鼻祖，为保证合法经营活动和保障用户利益，我司在中国的一切“经营，技术服务，供应链管理”均采用在遵守“合同法”指导下授权予合法经营的生物公司合作资格的授权担保制度；

2 —以上公司均未出具合法经营资质，也未在本公司本案申请经营授权，本公司对其销售的“产品”，其承诺的“技术服务”不承担任何责任；

3 —本司协同中国地区授权的合法区域代理商：北京利文公司，上海强智公司，上海优宁维公司向用户郑重承诺：

“秉承质量，确保效期，优质服务，客户至上，恪守承诺”

本司对上述未经许可擅自挥霍我司经营形象的公司提出强烈谴责，勒令其停止一切对美天旎产品的经营活动。如经查处，我司保留诉讼权利。

同时，敬请广大钟爱美天旎产品和技术理念的新老客户认清授权，挑选放心合法授权的渠道供应商，谨防伤害客户利益事件发生，共同维系正当的服务品质。

德国美天旎生物技术公司

2009/1/12