

# EBIOTECH

生物通技术周刊

第58期

2009年3月19日

全文下载

## 【技术前沿】

在合适的时间点检测凋亡

## 【新品速递】

牛年说New: QIAGEN质粒纯化 不止是经典  
安捷伦突破新一代测序的瓶颈, 推出目标富集平台

一种纯化Fab片断的新介质-KappaSelect

向绿色进发--Promega公司推出GoTaq<sup>®</sup>热启动酶

NanoDrop又出新品

## 【应用指南】

检测小鼠肝脏的caspase活性

DeadEnd (TM) 比色法凋亡检测系统: 在病理学中的应用

## 【行业动态】

Illumina公布测序仪发展大计

赛默飞世尔推出4小时快速检测禽流感的新技术

SOLID系统两度夺魁, 成为2008年最受瞩目的创新产品

# 在合适的时间点检测凋亡

## 在合适的时间点检测凋亡（上）

作者：TERRI SUNDQUIST, M.S., RICH MORAVEC, B.S., ANDREW NILES, M.S., MARTHA O'BRIEN, PH.D., AND TERRY RISS, PH.D., PROMEGA CORPORATION

凋亡是指与细胞死亡相关的一系列的特定的细胞形态学变化。我们列出了一些影响因素，这些因素可能会对凋亡相关的生物化学事件产生的时间产生影响，并着重阐述在某适合的时间区段内监测这些生化事件的重要性。

### 引言

细胞死亡会发生一系列的作用通路不同的细胞形态学和生物化学变化，包括凋亡、坏死和自我吞噬(1)。“凋亡”这一名词最先由 Kerr 等人 (2) 创建，用来描述具有确定的形态学变化的细胞死亡，包括细胞皱缩、染色质浓集、核膜的完整性消失、胞膜空泡化 (plasma membrane blebbing)、最后形成凋亡小体。虽然凋亡指的是纯粹的形态学变化，但是在这些形态学变化中常伴随着生物化学反应的发生。这些生化反应包括起始 Caspase 酶和效应 Caspase 酶的激活、线粒体细胞色素 C 的释放、质膜磷脂酰丝氨酸的外化，多聚[ADP-核糖]聚合酶 (PARP) 的降解和核 DNA 的断裂。

这些生物化学事件并不都是凋亡所特有的，不会在所有的凋亡细胞或凋亡的所有阶段都发生，也不会所有凋亡诱导剂刺激时都发生。这些生化事件发生的时程也有很大差别，并受许多因素的影响，包括细胞系或组织、凋亡诱导剂、药物浓度或刺激强度和暴露时间。因此，有策略地选择检测哪些生化事件就变得十分关键，通过

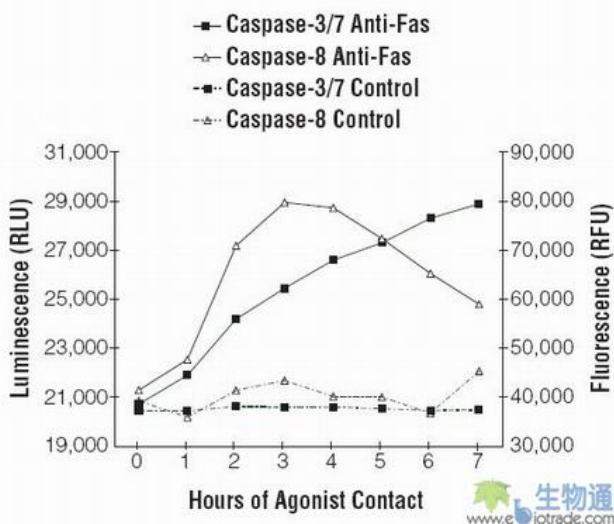
检测这些生化事件可以证实细胞的死亡是由于凋亡引起的，同时，还可以了解细胞死亡的动态过程。本文中我们主要讨论了在适宜的时间段内检测这些生化事件的重要性，确保这些变化被捕捉到，而不致错过。我们也列出了一些可能会影响相关生化事件的检测时限的因素。

### 细胞凋亡过程中的生化事件的时限

通常，细胞凋亡是通过外部的或内部固有的途径而进行的。外部 (受体介导的) 途径涉及受体结合、激活起始 caspase 酶 (caspase-8)、caspase-8 继而激活 caspase-3 或者切割 Bcl-2 家族成员 Bid，从而放大 caspase-3 的激活效应；Bid 的切割导致细胞色素 C 漏出、蛋白复合体 (也称作凋亡复合体) 的形成，以及 caspase-9 的激活 (3)。内部固有 (线粒体介导的) 途径涉及某些 Bcl-2 家族成员，这些成员可以调节细胞色素 C 从线粒体中的释放。细胞色素 C 一旦从线粒体中释放出来，就会与 Apaf-1、dATP 和 caspase-9 前体形成凋亡复合体。作为凋亡复合体的一部分，caspase-9 经过某种处理而被激活，激活的 caspase-9 继而激活 caspase-3。在这两种途径中，晚期凋亡事件在效应 caspase 酶被激活后发生，包括质膜外表面磷脂酰丝氨酸的暴露 (可通过锚定蛋白 V 的结合而被检测到)、多聚[ADP-核糖]聚合酶 (PARP) 的降解和核 DNA 断裂。

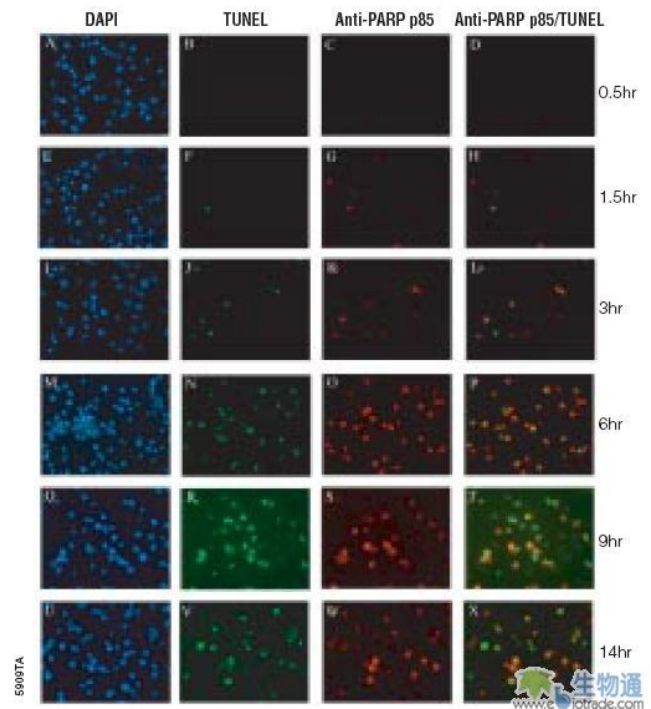
生物化学事件发生的精确时间取决于凋亡途

径。另外，凋亡被诱导后，检测不同的生化事件或活性的时间点往往也是不同的。例如，使用抗 Fas 单克隆抗体 (mAb) 处理 Jurkat 细胞，凋亡的外部通路即被激活，Fas 受体形成三聚体，引发构象变化，促使死亡诱导信号复合体 (DISC) 形成。使用抗 Fas 单克隆抗体处理 Jurkat 细胞后，caspase-8 活性在处理 3 小时就达到峰值，而 caspase-3/7 活性在测量的 7 小时内逐渐增加(图 1)。PARP 在处理 6 小时达到降解高峰，而晚期事件-DNA 断裂，直到处理后 9 小时仍没有达到峰值 (图 2)。在最佳测量时间段之前或之后对这些事件进行检测，都可能导致测量的信号与背景 (比较 1 小时和 7 小时时溶剂对照组和抗 Fas 单克隆抗体处理组的 caspase-8 活性，图 1) 相比太弱或没有，从而导致结论错误，认为该处理方式不会诱导细胞凋亡。因此，根据经验确定在什么时候目标活性出现峰值是非常关键的。所以，研究者应进行预实验来确定某一检测的最佳时间，或实验时，确保在足够长的一段时间内进行检测，并设立多个间隔适当的检测时间点，以捕捉到活性峰值。



**图 1. caspase-8 和 caspase-3/7 活性的时间依赖性。**按 25000 个细胞/孔的密度接种 Jurkat 细胞，每小时加入抗 Fas 单克隆抗体或溶剂，共 7 小时。使用 Caspase-Glo® 8 发光试剂盒检测 caspase-8 活性，底物为 Z-LETD 氨基荧光素。使用改进的荧光 Apo-ONE®

Homogeneous Caspase-3/7 试剂盒检测 caspase-3/7 的活性，底物为 (Z-DEVD)2-R110。室温孵育 1 小时后，记录同一孔的发光值和荧光值(4)。



**图 2. TUNEL 和 PARP 降解的时间过程。**按照图示的时间用抗-Fas 单克隆抗体处理 Jurkat 细胞。使用 DeadEnd™ Fluorometric TUNEL 系统 (Cat.#G3250) 和抗 PARP p85 片断的 pAb(Cat.#: G7341)PARP，对细胞进行双标记，前者可评估 DNA 片段化的程度，后者用于特异性识别被切割的 PARP。每一横排表示在图示时间点的同一区域的细胞。每一纵列表示不同的染色方法。在每一个时间点，DAPI 染色显示每一区域中细胞核的数量。标尺=20µm。

许多因素都可能对凋亡事件的时限产生影响，包括所用的细胞系或组织、凋亡诱导剂、药物浓度或刺激强度、暴露时间等。在此，我们对这些因素中的一些进行讨论，并指出在适宜的时间段检测这些生化反应事件的重要性。

### 细胞系或组织的影响

在完全相同的条件下，不同的细胞系或组织的反应可能会有很大差异。同一种诱导剂在一种

细胞系中可能会诱导凋亡，而在另一种细胞系中则不能诱导出凋亡。在某些情况下，某一处理方式所导致的结果相同（细胞死亡），但是作用机制完全不同。使用相似浓度的阿霉素处理 HL60 和 K562 细胞，HL60 细胞会出现凋亡形态学变化和 DNA laddering，而 K562 细胞则出现坏死性的形态学变化，并且不会出现 DNA 片断化（5）。

即便是使用完全相同的凋亡诱导剂，不同的细胞发生凋亡的时间进程也会不同。在一种细胞系中活性达到峰值所需要的时间可能会不同于另外一种细胞系。例如，十字孢碱处理细胞后，DNA 出现片断化。在 EL4 细胞中（6），这种 DNA 片断化在处理后的 5-6 小时达到峰值，而在 HCE 细胞（7）中则在处理后 24 小时才达到峰值。因此当您查阅出版文献中的凋亡诱导条件时，请不要假定该诱导条件对您的细胞系的影响与对其它细胞系的影响相同。

一般来讲，诱导培养细胞表现出凋亡事件的特征所需要的时间（几小时内；5-10）要早于组织中的细胞（几天内；11-14）。当对体内模型进行研究时，可能永远检测不到某些晚期凋亡事件，因为在这些事件被检测到之前，组织内发生凋亡的细胞常常已经被吞噬掉了。

在一些情况下，由于被观察的组织或细胞系未表达某一必需蛋白，则某些凋亡相关的生化事件可能会被“低估”了。乳腺癌细胞系 MCF-7 缺少功能性 caspase-3 蛋白，所以当使用 DEVD 底物来检测 caspase-3/7 活性时，凋亡情况可能会被低估。与此类似，一种细胞如果不能表达某一必需受体，就不能通过外部通路诱导其凋亡。一个经典的例子就是使用抗 Fas 单克隆抗体诱导带有 Fas 受体的 Jukat 细胞，通过外部通路诱导凋亡。缺少 Fas 受体的细胞不会对抗 Fas 单克隆抗体的处理发生反应，细胞就不会发生凋亡。

因为细胞周期各阶段存在不均一性和差异，同一细胞群中的不同细胞可能会在不同的时间点经历凋亡事件。例如，HeLa 细胞经紫外线照射时，一些细胞可能会出现凋亡晚期事件，如细胞膜破裂，而同一群中的其它细胞可能正经历细胞色素 C 从线粒体内释放这一相对早期的凋亡事件（10）。紫外线照射后检测早期凋亡信号的时间点和多种凋亡事件之间检测的时间间隔都不是固定不变的。在本例中，细胞色素 C 从某一单个细胞中释放只发生在 5 分钟的时间内，而整个细胞群释放细胞色素 C 却在数小时的时间内均能检测到。这样，细胞群的不均一性就降低了在某一较窄时间段内检测感兴趣的生化事件的要求。然而，为了得到一个时间上比较精确的事件，还是要对单个细胞进行分析（10，15）。

[点击索取Promega公司细胞凋亡产品的最新资讯](#)

## 在合适的时间点检测凋亡（下）

### 凋亡诱导剂的影响

不同的药物或刺激因素对同一细胞系或组织可能会产生不同的影响。对某一种细胞系，一些制剂可能会没有作用，而另外一些制剂可能会诱导细胞出现坏死，而非凋亡，或是诱导出不同途径的凋亡。例如，如果希望诱导HeLa细胞的凋亡，应使用蛋白激酶C抑制剂—十字孢碱处理细胞，而不能使用抗Fas单克隆抗体诱导，因为HeLa细胞缺失Fas受体。对于大多数细胞或组织，一些方法如使用激酶抑制剂处理、紫外线照射或X射线照射等手段可引起更有效的凋亡。但是，我们建议您仔细地选择合适的凋亡诱导剂。请查阅文献或进行预实验，确认您所使用的诱导剂确实能够诱导受试细胞系的凋亡。  
[www.promega.com/apoasst/](http://www.promega.com/apoasst/) 网页为Promega公司提供的免费的凋亡帮助软件，是一个非常有用

的资源。

#### 药物浓度或刺激强度和暴露时间的影响

药物使用浓度和刺激强度也会影响细胞的反应。较低的药物浓度可能不会对细胞产生预期的影响，或产生未加预期的效应。例如，使用较低浓度的强心苷乌本苷、毒毛花苷 K、地高辛和地高辛素处理 HeLa 细胞后，通过结晶紫染色测定吸光度，发现细胞生长没有被抑制，反而被促进了。在较高浓度下，相同的药物则诱导细胞出现凋亡 (16)。如果使用了不当的高浓度或高强度的凋亡刺激手段，则细胞可能会出现坏死而非凋亡。

暴露时间也会对细胞凋亡的诱导产生影响。一般情况下，如果诱导凋亡的药物浓度较低或诱导刺激方法的强度较低，药物需要的暴露时间就长。这样 EC50 值会随着暴露时间的延长而降低 (9, 16)。当 HeLa 细胞暴露于较低浓度的强心苷 48 小时，药物会促进细胞增长，而当暴露 72 或 96 小时，该药物既不会促进也不会抑制细胞的生长。在较高的药物浓度下，随着暴露时间的增加，药物对细胞增长的抑制作用更为明显。因此，细胞对某一毒素或损伤的暴露时间可能会对实验结果和结论产生很大影响。看起来没有效应或没有短期效应的处理方式可能会在长时间处理后产生极为不同的效应。

即使是在可以诱导出凋亡的条件下，某一特异的凋亡事件发生的时间也会随着暴露时间的变化而变化。在他莫昔芬处理的 HepG2 细胞中，caspase-3 活性的达峰时间依赖于药物浓度，并且也与药物暴露时间相关 (图 3; 17)。在较高浓度的他莫昔芬处理下，caspase-3 活性的达峰时间为药物作用后 1-2 小时，而当使用的他莫昔芬浓度较低时，直到更长的暴露时间 (24 小时)，caspase-3 的活性也没有达到峰值。我们建议进行预实验，建立初始的剂量效应曲线，以确定诱导目的细胞或组织凋亡所需的合适的药物浓度或

刺激强度。请在足够长的时间段内、并在间隔适当的多个时间点来检测凋亡事件，以确保捕捉到峰活性。

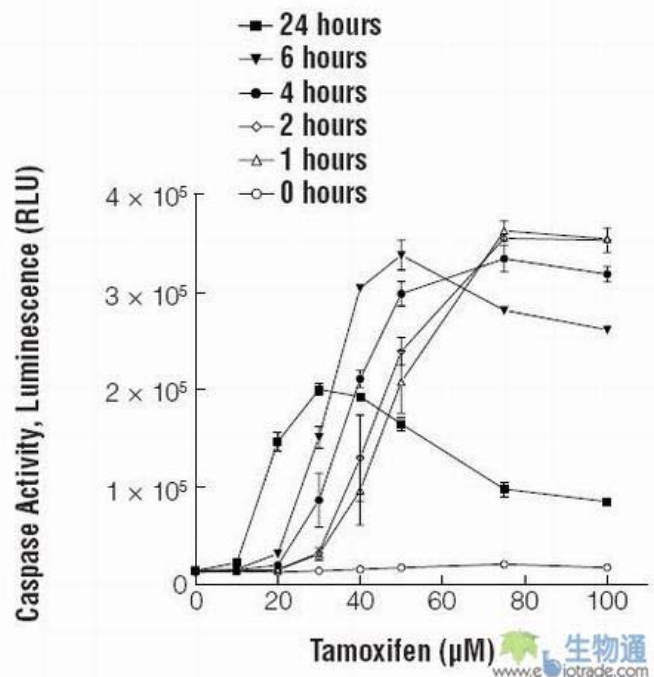


图 3. 使用 0-100µM 他莫昔芬处理 HepG2 细胞 0-24

小时后，caspase-3 的活性检测结果。按 25000 个细胞/孔的密度接种 HepG2 细胞于 96 孔培养板，过夜培养。使用 RPMI 培养基进一步稀释溶解在 DMSO 中的他莫昔芬贮存液，以间隔时间加入。所有不加他莫昔芬的培养孔都含有终浓度为 0.2% 的 DMSO。使用 Caspase-Glo® 3/7 试剂盒检测 caspase-3/7 的活性。加入他莫昔芬后，在适当的时间点加入 Caspase-Glo® 3/7 试剂 (100µl/孔)，在检测发光强度前，预先将待分析的细胞板在室温下孵育 1 小时。无细胞的对照培养基的发光值是 708 ± 68 (数据未显示)。数据以均数 ± 标准差 (n=3) 表示。图片的引用得到了以下授权：Moravec, R. and Riss, T (2004) ASSAY Drug Dev. Tech. 2, 1-12.

#### 细胞培养条件的影响

如上所述，检测凋亡所使用的细胞系对实验结果也会产生很大的影响。然而，人们可能对于细胞培养条件也会对结果产生影响这一事实还了解较少 (9)。一些因素如细胞密度、传代次数和亲本储存细胞生长的密度都可能会对细胞生理学

产生影响，从而也会影响细胞对刺激物的反应能力。如果细胞数量较多，可能会产生保护性作用；药物可能会非特异地结合在细胞表面或培养基中的细胞蛋白上，从而降低了有效的药物浓度。使用递增浓度的他莫昔芬处理不同密度的 HepG2 细胞时，发现药物的效能会随着细胞数量的降低而增加 (EC50 值降低) (图 4)。由于 caspase-3/7 活性的达峰时间随着他莫昔芬浓度的降低而增加 (图 3)，这表明当使用的细胞数量较多时，要检测某一特异的凋亡事件所要求的药物暴露时间也会更长。在准备研究凋亡的受试细胞时，请确保要遵循完善建立的细胞培养程序，并使每次实验的细胞数量一致，从而将这些因素的影响减至最低。

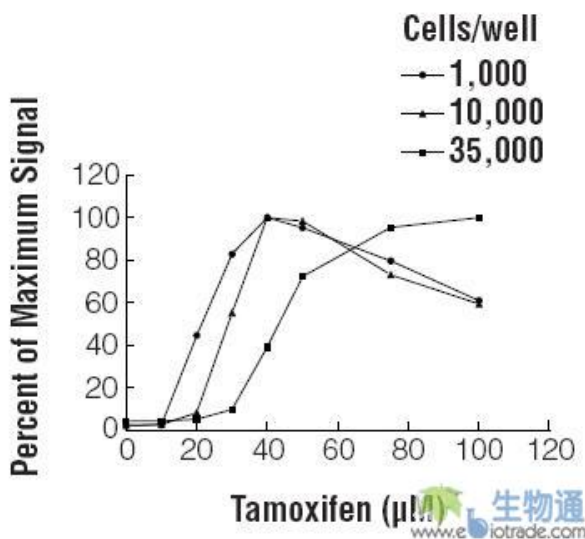


图 4. 细胞数量对 caspase 激活时限的影响。按照 1,000, 10,000 或者 35,000 个细胞/孔的密度接种 HepG2 细胞于 96 孔培养板，将细胞暴露于不同浓度的他莫昔芬中 4 个小时。使用 Caspase-Glo® 3/7 试剂盒检测 caspase-3/7 活性，结果以每一细胞密度的最大信号的百分比表示。所用数据点以均数±标准差 (n=3) 表示。图片的引用得到了以下授权：Moravec, R. and Riss, T, (2004) ASSAY Drug Dev. Tech. 2, 1–12.

## 总结

凋亡过程可能会通过多种不同的机制被诱

发，凋亡时，细胞会产生相关的生化事件，这些生化事件发生的时间点取决于很多因素。本文所讨论的目的不是想要列出所有这些影响因素，而是将可能会对凋亡时限产生影响的因素进行简单介绍。当您进行凋亡研究设计时，请确保考虑到这些因素。请进行预实验以确定适合的分析检测条件。当选择凋亡生化标志物时要谨慎考虑，确保这个生化标志物与您的实验系统具有较高的相关性。通过建立初始剂量反应曲线，确定合适的药物浓度或者刺激强度，以有效地诱导目的细胞或组织的凋亡。在足够长的时间内、并以适当间隔的不同时间点对某一生化事件进行检测，以确保捕捉到峰活性，从而最大限度地降低基于不当的时间点的检测而得到的错误结论。

[点击索取Promega公司细胞凋亡产品的最新资料](#)

## 参考文献

1. Kroemer, G. et al. (2005) Cell Death Differ. 12, 1463–7.
2. Kerr, J.F.R. Wylie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Br. J. Cancer 26, 239–57.
3. Hengartner, M.O. (1997) In: C. elegans II. Riddle, D.L. et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, 383–496.
4. Farfan, A. et al. (2004) Cell Notes 10, 15–7.
5. Studzinski (1999) Apoptosis A practical approach. Oxford University Press, New York.
6. Jessel, R. et al. (2002) J. Cell Mol. Med. 6, 82–92.
7. Härtel, S. et al. (2003) Cytometry 55A, 15–23.

8. O'Brien, M.A., Moravec, R. and Riss, T. (2001) *Biotechniques* 4, 886–91.
9. Riss, T. and Moravec, R. (2004) *ASSAY Drug Dev. Tech.* 2, 1–12.
10. Goldstein, J.C. et al. (2000) *Nature Cell Biol.* 2, 156–62.
11. Beer, R. et al. (2001) *J. Neurochem.* 78, 862–73.
12. Kyrianiou, N. and Issacs, J.T. (1988) *Endocrinol.* 122, 552–62.
13. Yamamoto, H. et al. (2004) *Urol. Res.* 32, 9–13.
14. Franz, G. et al. (2002) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 951–8.
15. Ward, M.S. et al. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 5837–44.
16. Ramirez-Ortega, M. et al. (2006) *Eur. J. Pharmacol.* 534, 71–6.

17. Riss, T.L. et al. (2006) In: *Handbook of Assay Development in Drug Discovery*. L. Minor, ed. Taylor & Francis, CRC Press.

相关产品:

产品	规格	目录号
Caspase-Glo® 3/7 Assay*	2.5ml	G8090
Caspase-Glo® 8 Assay*	2.5ml	G8200
Caspase-Glo® 9 Assay*	2.5ml	G8210
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7	1ml	G7791
CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker	50µl	G7461
DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System	20 reactions	G7360
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	60 reactions	G3250
Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK	50µl	G7231
Caspase Inhibitor Ac-DEVD-CHO	100µl	G5961
Anti-PARP p85 Fragment pAb	50µl	G7341
Anti-ACTIVE® Caspase-3 pAb	50µl	G7481
Anti-Cytochrome c mAb	100µg	G7421

\* 仅限实验室使用。其中一些产品还有其它包装规格。

Anti-ACTIVE, Apo-ONE and Caspase-Glo 为 Promega 公司的注册商标。

产品可能涉及正在申请的专利或已经颁布的专利，或者可能具有使用限制。请访问网站以获取更多的信息。

# 牛年说 New: QIAGEN 质粒纯化 不止是经典

一提起核酸纯化,大家脑子里肯定都会闪过 QIAGEN。这个在当前核酸纯化领域里公认最牛的品牌,凭借原创的技术专利,出色而稳定的产品质量,专业而体贴的产品划分,不断创新的精神,多年来一直稳稳占据欧美核酸纯化领域第一的市场份额。即便是在科研经费紧缺的中国,虽然进口的 QIAGEN 价格要明显高于国产同类仿制产品,但很多人还是会屯着几个 QIAGEN 的蓝盒子,在最关键的实验中才使用,可见 QIAGEN 在大家心目中的“金标准”地位。让你在购买产品时很难把它忽略,就像我们在购买手机时,诺基亚终归还是要看看的。

QIAGEN 为什么这么牛?首先是技术的原创性。早在 1986 年 QIAGEN 推出全球第一个基于阴离子交换树脂技术的质粒纯化试剂盒,上市 23 年来, QIAGEN Plasmid Kit 依然是 QIAGEN 最经典的产品,质粒纯化的 Top 10 地位从未动摇。1992 年 QIAGEN 更推出了日后风靡全球的硅胶膜核酸纯化技术。借助小型台式离心机,只要 15 分钟即可获得高纯度的质粒。快速、稳定、质量高,无需经验和技巧, QIAGEN Spin 迅速成为最受欢迎的产品之一。如今,即便擅长于手工提取的实验室,大部分人再也不愿退回到手工提取的年代。毕竟试剂盒更快速简便,质量也更加稳定。

尽管 QIAGEN 雄踞核酸纯化领域榜首多年, QIAGEN 的产品依然是 100%德国原产,从未假手他人代工,哪怕这可能导致产品运输成本偏高。质量稳定可靠,有口皆碑,使得大部分同类产品纷纷以 Q 品牌作为“金标准”来对照——不过甭管谁家说明再精彩,至今未见谁能超越 QIAGEN 市场占有率第一的地位。当然 QIAGEN 也没有固步自封,尽管产品线已按不同需求进行了最全面的划分, QIAGEN 每年还是能不断推陈出新,力求让质粒提取更贴心,更快,更轻松。这种创新能力,而不是模仿能力,恰恰是衡量一个品牌长青与活力的重要因素。

**更快: 09 新动向**

不断加速,用来描述当今的实验室竞争并不过分,如果你现在还觉得“要那么快干吗?”那你一定已经 OUT 出顶尖实验室的竞争了。更快、更多、更简便,本来就是所有实验人对实验的基本期盼。QIAGEN 深明此道。

以转染级的 QIAGEN Plasmid Kit 为例,在产量和纯度方面都让人相当满意,除了速度。虽然比 2 次氯化铯超速离心要快得多,手工操作也不复杂,可整个操作流程仍约耗费 2-3 个小时。QIAGEN 在 2009 年最新推出超快速的转染级质粒纯化试剂盒——QIAGEN Plasmid plus Kit, 20 分钟即可纯化 24 个样本 (Midi 或者 Maxi), 是市面上最快的转染级别中到大型质粒纯化试剂盒。相对于 QIAGEN Plasmid Maxi Kit, 纯化速度一下子就提高了 8 倍,可实现 24 个样品并行纯化,而得到的质粒纯度相当,内毒素水平低至 0.1-1 EU/ $\mu$ gDNA。究竟是什么改进使得转染级质粒纯化实现又快又多又高通量呢?

QIAGEN Plasmid plus Kit 的创新在于更快速的硅胶膜纯化方法,在碱裂解步骤后,利用 QIAfilter 无须离心即可过滤获得澄清裂解液,利用真空抽滤替代离心进行 DNA 的结合和洗涤步骤,最终获得转染级别的高纯质粒 DNA。

传统的硅胶膜纯化方法胜在速度快,但纯度不及阴离子交换技术高,那么 QIAGEN Plasmid plus

Kit 获得高纯质粒的法宝是什么呢？生物通小编剖析了整个纯化过程，发现有几个与众不同之处。

1. 独特的 QIAGEN Plasmid Plus 离心柱，性能与阴离子交换柱相当。
2. 增加内毒素去除溶液 (ETR buffer for Midi/Maxi kit, CPW buffer for Mega/Giga Kit)；
3. 额外增加了一步清洗步骤；
4. 增加 LyseBlue 可直观监测裂解效率。别小看最后一点，作为手工大提质粒熟手工人级别的生物通小编，深知质粒大提的得率往往不如小提，技术难点之一就在于细胞裂解是否充分、变性和复性是否彻底，对于那些“难搞”的菌株如 HB101 之类的尤其如此。LyseBlue 的作用类似于 pH 值指示剂，可以直观地看到裂解效果和中和效果。溶液 I 悬浮细菌后加入溶液 II 就会变蓝，如果你看到溶液中局部呈现白色，就需要再振摇直到全部变蓝，加入溶液 III 后蓝色又会褪去，如果还有蓝色痕迹，请继续振摇，直到全部无色。有了 LyseBlue 的提示，无需经验也不易犯错，实现质粒高产变得简单了。

说实话，提一次质粒花费不少，转染起来消耗又大，作为操作人员当然希望产量越高越好，QIAGEN Plasmid plus Midi/Maxi Kit 中提供了优化的高产量 protocol，以较大的洗脱体积确保质粒 DNA 的产量更高（中提达到 250  $\mu\text{g}$ ，大提达到 1000  $\mu\text{g}$ ），满足你的更多需求。当然标准方法的洗脱体积相比同类产品来说是最小的，只需 100-200ul，这使得产物浓度高，自然更方便后继使用。

### 比快更快

更多的质粒是用于 PCR 或酶切，虽然 QIAprep Spin Miniprep Kit 就已经足够好用了。可还能再快点吗？能。

QuickLyse Miniprep Kit 顾名思义，就是快速裂解。这个试剂盒放弃了经典碱裂解的三步，而采用了酶解和渗透过程一步裂解细菌细胞，时间只需 3 分钟。这个过程本身并不比加溶液 123 快，关键快在可以直接得到澄清的裂解液，无需离心 10 分

钟沉淀蛋白质和染色体，直接加到 QuickLyse 离心柱上进行清洗和洗脱。整个纯化过程只需 9 分钟就能从 1.5 ml 的菌液中获得 1.5  $\mu\text{g}$  的质粒 DNA，24 个样品并行纯化也仅用 22 分钟，最大程度了减少手动操作时间。特别适合高拷贝质粒，制备得到的 DNA 可用于测序、限制性酶切等。

还要再快点再轻松点吗？行呀。过去，载体酶切连接后筛选重组子是相当痛苦的。重组子少自然凄凉，多了也头疼---最终的目标载体往往用不上蓝白斑，何况蓝白斑也不那么靠谱，成百上千个克隆要培养，提质粒，还要酶切判断是否重组子以及片段插入方向是否正确。。。逐个培养实在太费功夫了，不得不自创点板直接快提质粒。。。以至于生物通小编一看到大型平板电泳槽就会条件反射地回忆起过去一行 20 多个样，一次 4 行上百个样排队电泳的大阵势。。。泪呀。。。还有 cDNA 文库筛选也一样可怕，如果要逐个扩大培养，逐个抽提质粒，那工作量可不是一般的大。QIAGEN 新出的 PlasmidAmp Kit 则让你从这种艰苦劳动中解放出来，这个方法跳出了单纯的核酸纯化的范围，而利用 PCR 替代细菌培养等等繁琐工作，直接从单菌落中扩增质粒 DNA。虽说 PCR 直接检测重组子的方法早已有之，但过去方法算不上成熟稳定。PlasmidAmp 用反向 PCR 来获得环状模板的线性拷贝。专利的引物能与质粒上的 ColE1 复制起点互补，因此适用于 pUC19, pBR322 等常见质粒。试剂盒内特殊的混合酶保证了扩增的保真度和产量，最长扩增片段可达 9 kb。有 Q 家品牌保证，那就不必担心稳定性了，他家的验证工作可是非常非常严谨的。

如一些资深老用户所言，选择 QIAGEN 试剂盒最大的好处是可靠省心，尽管贵，但从未让人失望过。经过前几年代理价格战，QIAGEN 直销等等变化，QIAGEN 产品的价格也实惠了不少，遇上 09 年产品推广促销，可就是囤货的好时机啦。

(生物通 吴青 余亮)

# 安捷伦突破新一代测序的瓶颈， 推出目标富集平台

安捷伦科技公司近日推出了一个独特的工具-Agilent SureSelect Target Enrichment System，能大大简化 DNA 测序研究，让科学家利用新一代测序仪只对感兴趣的基因组区域进行测序。

目标富集，也称为定向重测序、基因组划分或 DNA 捕获，在研究人员只对基因组的某个特定区域感兴趣时相当有用。在这种情况下，Agilent SureSelect 平台能在测序前捕获一系列外显子或其他基因组目标，并洗掉基因组的其他部分。SureSelect 取代了其他耗时耗力的定向重测序方法，突破了大部分新一代测序流程中的主要瓶颈。

安捷伦的基因划分产品是一个即用型的试剂盒，包含了客户指定的探针混合物，单管中最多能包含 55000 个生物素化的 RNA 探针。这些捕获探针长度为 120 bp，是目前市场上最长的。它们能有效捕获包含未知突变的 DNA，如 SNP、插入或缺失。SureSelect 试剂盒有多种包装，适于几十个到几千个样品，也能与超高通量流程中的自动化相适应。此外，杂交反应在 24 小时内就能完成，而不是几天。

用户可利用安捷伦的 eArray 在线设计工具，自行设计 SureSelect 探针混合物。eArray 工具中包含了许多主要的基因组，用户也能上传他们自己的序列。这种直观的在线设计工具是安捷伦定制基因组产品的核心，在芯片研究群体中很受欢迎，现在又扩展到新的 SureSelect 平台。eArray 让生物学家轻松设计他们所需的工具，不收取任何费用。

Agilent SureSelect 目标富集系统目前能应用在 Illumina 的 Genome Analyzer 系统上。安捷伦同时还在优化该系统，以便晚些应用在 ABI 公司的 SOLiD 系统上。

安捷伦的 SureSelect 试剂盒是源自 Broad 研究院的授权。去年 Broad 研究院的研究人员利用生物素化的 RNA 作为诱饵去捕获溶液中的 DNA 靶点。在上个月的《Nature Biotechnology》中，Broad 研究院和安捷伦的研究人员详细描述了这个方法。他们可用它靶定约 15000 个外显子或 2.5

MB 的 DNA 序列，以及四个基因组区域共 1.7 MB 序列。

安捷伦大约一年前获得了这项技术的授权，并将它包装成一个试剂盒，加上了质量控制步骤。安捷伦的产品与 Broad 研究院原始方法的最大区别是诱饵的长度，现在的 120 聚体取代了原始的 170 聚体。

到目前为止，一些早期用户已经试用了安捷伦的 SureSelect 系统，包括 Wellcome Trust Sanger 研究院。其测序技术开发的主管 Daniel Turner 表示：“安捷伦 SureSelect 目标富集系统的性能给我们留下了很深的印象。该技术与对手相比，有几个重要的特点：它操作简单，很容易扩展到 96 孔的形式；它比芯片或 PCR 等方法需要更少的基因组 DNA；特异性极佳。实际上，它所需的 DNA 起始量只有其他平台的十分之一，因此对于珍贵样品而言是再适合不过了。”

今年下半年，安捷伦还会推出以芯片为基础的基因组划分产品，用于更小型的实验，让研究人员享有全面的目标富集产品。目前安捷伦正在让早期用户试用，包括 Broad 研究院和冷泉港实验室。

SureSelect 试剂盒于 2 月 26 日正式上市，接受订购。规格从 10 个反应到 5000 个反应。更多信息，请访问 [www.opengenomics.com/SureSelect](http://www.opengenomics.com/SureSelect)。eArray 设计工具在 <https://earray.chem.agilent.com>。

新一代测序的达人们，你们在样品制备时是不是也遇上了瓶颈，那就赶快点击索取 [SureSelect Target Enrichment System](#) 的详细资料吧！

(生物通 余亮)

# 一种纯化 Fab 片断的新介质-KappaSelect

作为潜在的生物药品, 抗体片断特别是 Fab 受到了越来越多的关注, 因为它们比单克隆抗体 (MAb) 具有更多的优势。例如, Fab 对于组织渗透表现出更好的药物代谢动力学特性, 并能与传统的抗原结合位点无法接近的靶点结合。

KappaSelect 是专为纯化 Fab (kappa) 片断而设计的亲和介质, 能有效地捕获 Fab, 获得高纯度和高产量的 Fab。KappaSelect 是通用电气医疗集团定制设计填料项目的一部分。

## KappaSelect 亲和层析介质提供了:

- 通过亲和层析有效、工业规模地捕获 Fabs
- Fabs 的高结合能力
- 刚性琼脂糖基质, 能承受高流速, 以及大样品体积的处理, 以提高产量
- 非哺乳动物来源的产品, 减少了生产 Fab 在临床应用中法规的顾虑
- 配基脱落水平低, 确保了 Fab 的纯度和产量增加

## 介质的特征

KappaSelect 以高度刚性的琼脂糖基质为基础, 能在大规模生产中承受高流速和低反压。它是一种亲和填料, 特点是配体能与 Kappa 轻链的恒定区结合——也就是说, 缺乏 Kappa 轻链恒定区的片断不会与之结合 (图 1)。因此, KappaSelect 能够结合其他包含 Kappa 轻链恒定区的目标分子, 如 IgA 和 IgM。配体通过长的亲水间隔臂与基质相连, 使之易于结合目标分子 (图 2)。配体是基于用人 IgG kappa 进行筛选的一个单链抗体片断。配体由酵母表达系统产生, 发酵和随后的纯化/配制都是在无哺乳动物成分的条件

下进行的。KappaSelect 的特征总结在表 1。

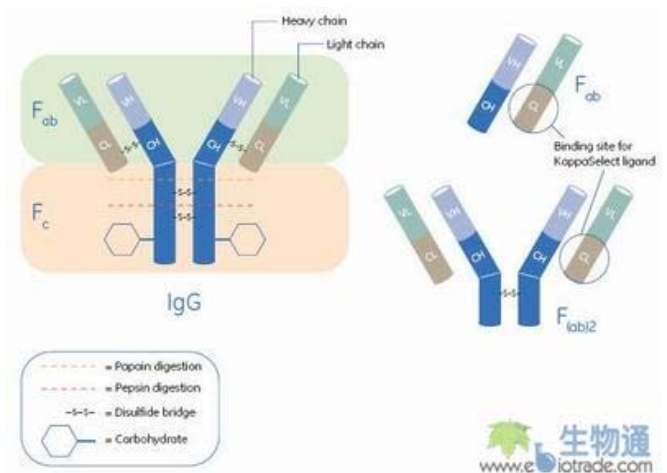


图 1. 抗体结构以及 KappaSelect 配体与 Fab 片断的结合位点。

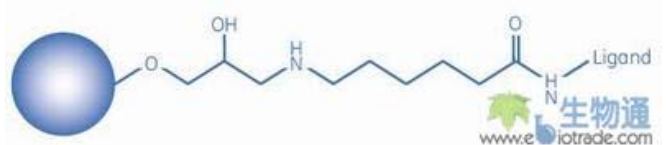


图 2. KappaSelect 的部分结构。

表 1. KappaSelect 的主要特征

基质	高度交联的高流速琼脂糖
颗粒大小 1	75 $\mu$ m (d50V)
配体	酿酒酵母中产生的重组蛋白(分子量 13000), 与 Fab kappa 轻链的恒定区结合
配体密度	约为 5 mg/ml 填料
结合能力 2	约为 11 mg Fab/ml 填料

流动速度 20°C, 在 1 m 柱子中, 床高 20 cm, 至少为 600 cm/h, 在 <3 bar (0.3 Mpa) 利用粘度与水相同的缓冲液

pH 稳定性

长期 3-10

短期 2-12

工作温度 3 4-30°C

1 d50V 是体积分布分布的颗粒平均大小

2 利用多孔板和多克隆 Fab 作为试剂进行测定

3 推荐的长期保存条件: 4-8°C, 20%乙醇

原理

一般的亲和层析原理是利用一个固定化的配体在适当的结合条件下吸附特定分子或一组分子, 并在适当的洗脱条件下释放它们。这些条件取决于靶分子、原料组成、以及层析填料, 这些还需要与其他的层析参数 (如上样量、流速、床高、再生、在位清洗等) 共同研究, 从而确定以最高的产品回收率、在最短时间内结合最多靶分子的条件。

利用 KappaSelect 及推荐缓冲液的标准流程如下:

平衡/洗涤缓冲液: PBS, pH 7.4 (0.01 M 磷酸缓冲液、0.0027 M KCl、0.14 M NaCl)

洗脱缓冲液: 0.1 M 甘氨酸缓冲液, pH 3

1. 用 KappaSelect 装柱。
2. 用 10 倍柱体积 (CV) 的平衡缓冲液平衡。
3. 上样。

4. 用洗涤缓冲液洗涤

5. 用 5 到 10 CV 的洗脱缓冲液洗脱。立即加入中和缓冲液 (如 1 M Tris, pH 7.5-8.5), 将洗脱部分调整为生理 pH。

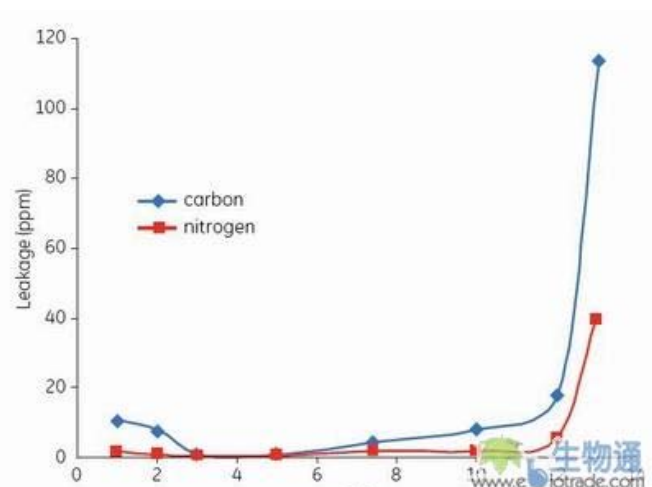
[点击索取KappaSelect介质的更多资料!](#)

再生可恢复填料的原始功能。取决于样品的性质, 再生一般在每个循环后进行, 接着用起始缓冲液重新平衡。为了预防污染物随时间而积累, 可能需要应用更加严格的步骤 (详见在位清洗和处理)。

### 稳定性

配基通过稳定的氨基键固定在琼脂糖基质上, 确保化学稳定性高, 脱落少。图 3 显示了 KappaSelect 用不同 pH 值的溶液在 20°C 条件下储存一星期后的稳定性。在 2-12 的 pH 范围内, 配基脱落少 (渗漏低), 当 KappaSelect 储存在 pH 1、2 和 12 的溶液中 (20°C 一星期, 图 4), 对 Fab 结合能力也只有轻微的影响。在 pH 值 >12 时, 碳和氮同时释放, 表明配体水解。

图 3. KappaSelect 在不同 pH 下的稳定性。



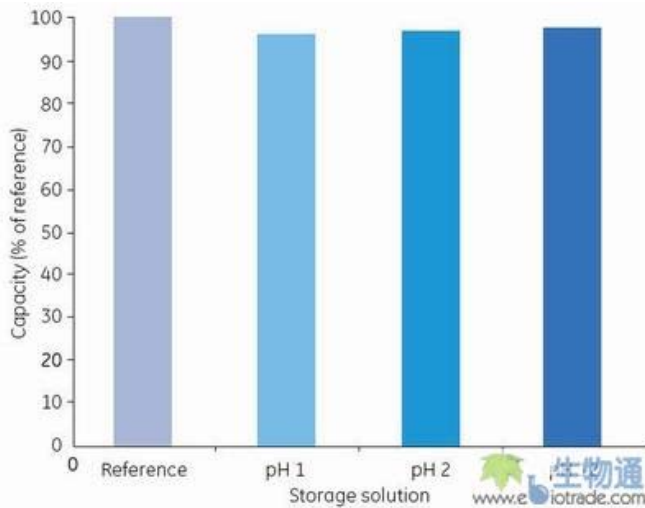


图 4. KappaSelect 储存在不同 pH 值溶液后的 Fab 结合能力（测定与对照的百分比）。

### 脱落分析

测定配基脱落的分析来自荷兰Bio Affinity公司（BAC BV）的网站（[www.bac.nl](http://www.bac.nl)）。

### 在位清洗（CIP）和处理

在一项研究中，用多种常用的 CIP 溶液对 KappaSelect 进行处理。在固定时间间隔测定 Fab 结合能力（图 5）。KappaSelect 在 pH 高达 12 时，依然表现出良好的稳定性。推荐在清洗步骤中用低 pH 值的溶液或试剂，如盐酸胍。不过要

避免长时间（几天）暴露在 pH <2 的溶液中，因为琼脂糖基质在低 pH 下会缓慢分解。pH 高于 12 也要避免，因为在碱性条件下配体稳定性有限。清洗或处理的步骤需要根据每个应用来设计。

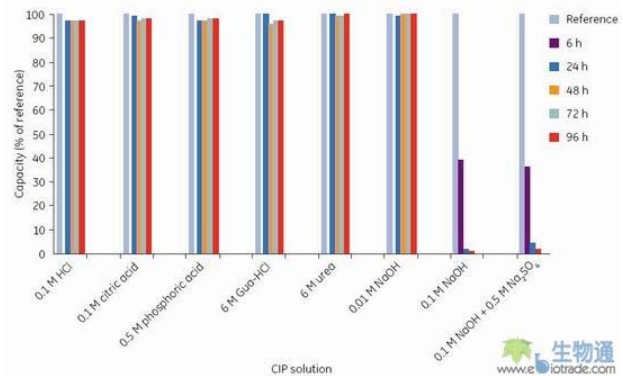


图 5. KappaSelect 在用各种 CIP 溶液处理后的 Fab 结合能力（以与对照的百分比确定）。

### 储存

我们推荐将填料储存在 4-8°C、20%乙醇中。KappaSelect 以在 20%乙醇中预膨胀的形式提供。

[点击索取KappaSelect介质的更多资料！](#)

（GE Healthcare 供稿，生物通翻译）

# 向绿色进发--Promega 公司推出 GoTaq®热启动酶

Madison, WI USA. (2009年3月5日)作为全球领先的DNA、RNA分析工具的供应商,5月31日以前,每售出一件GoTaq®热启动产品,Promega公司将种植一棵树苗。这一绿色行动是为了协助全球生命科学研究者完成其使命-改善当今人类以及后世子孙的生活。与科学家们的研究工作和科学发现非常相似,种植树苗将给全球带来长远利益。

认识到仅仅一棵树即能够帮助净化空气,Promega希望促成在全球种植上千棵树苗,并在今后几十年内对环境产生良性影响。本活动得到了某非赢利国际环境保护组织的支持,科学家们现在仅需在其日常工作中即可为此做出贡献。

除了种植新的树苗外,我们也力求节约现有的资源,我们将把本次GoTaq® Go Green活动的信息沟通方式转变为资源保护型—只基于电子媒介宣传,而不使用纸张资源。已种植的树苗的数量可在“扩增树木”网页上查到:

<http://www.promega.com/gotaggreen>

GoTaq®家族产品是具有专利配方的Taq DNA聚合酶,与常规Taq DNA聚合酶相比较,该类产品能够得到更强的扩增反应。GoTaq®绿色反应缓冲液带有示踪染料,使用者可直接将反应产物加入到琼脂糖凝胶上进行分析,提高了实验效率和便利程度;此外,该缓冲液中还含有PCR增强剂,对于难扩增的靶基因也能够得到可靠的扩增产物。

GoTaq® Hot Start Master Mix是GoTaq®家族中最新的成员,热启动聚合酶采用抗体封闭,提高了特异性和灵敏度,使用方便、节约时间。

同时,还提供多种不同配方设计的GoTaq® DNA聚合酶类产品,给使用者带来最大的灵活性、可控性和便利性。

## 关于 Promega 公司

普洛麦格公司在为生命科学领域提供创新的解决方案和技术支持方面处于领先地位。公司的2000余种产品使全世界的科学家加强了在基因组学、蛋白质组学、细胞分析、分子诊断和遗传鉴定等方面的知识。公司成立于1978年,总部坐落在美国威斯康辛州的麦迪逊市,在14个国家设有分公司,拥有超过50家全球性的经销商。关于普洛麦格公司的详细信息请访问[www.promega.com](http://www.promega.com)。

###

Contact: Penny Patterson

Director, Corporate Affairs

Promega Corporation

Phone: (608) 274-4330

E-mail: [penny.patterson@promega.com](mailto:penny.patterson@promega.com)

# NanoDrop 又出新品

芝加哥(2009年3月9日) – 服务科技, 世界领先的赛默飞世尔科技公司今日宣布推出 Thermo Scientific NanoDrop 2000c – 目前唯一的一款既可提供微量分析, 具备无以伦比的快捷, 又配备有比色皿的紫外-可见分光光度计. 该产品将在今年3月9日至12日于美国芝加哥举行的2009年度匹兹堡会议(PITTCON)的1432号 Thermo Scientific 展位展出。



NanoDrop 2000c 将把所需样品容量降至新低, 对于某些样品仅需要 0.5 微升. 这种已获专利的样品保留系统能令贵重的样品得以保存, 而同时其配备的比色皿功能扩大了单个平台可以分析的样品种类. 这两种测量选择方式相结合令用户能够分析微量样品的同时也可享受基于比色皿的各种优势, 例如更高的灵敏度, 细胞培养液的分析以及易挥发样品的测量。

由于同时具有微样底座和比色皿的能力, NanoDrop 2000c 可使得分光光度计能提供最宽的浓度范围 – 从低至传统分光光度计灵敏度的浓度, 到高达 15000 ng/ $\mu$ L 的双链 dsDNA(不稀释). 对于想测量低波长吸光度的样品 (例如在 205nm 吸收的肽类) 的实验室来说, NanoDrop 2000c 也是一个理想的选择. 另外, 由于所需样品量更小, 溶剂用量减少, 因而实验室效率, 产

出率和可持续性均可得到提高。

除了其功能带来的效率提高, NanoDrop 2000c 所占地面比一本实验记录本还小, 从而可以节省很多的实验工作台空间. 其新软件可以让用户自行建立个性化的方法并提供单位选择自由, 和一个 Oligo 计算器以及灵活的数据文件输入和输出选项. NanoDrop 2000c 的用户可以通过登陆网址 [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com) 拥有补充软件升级的完全访问权限。

“作为工业界的一个微样品定量分析的领先者, NanoDrop 2000c 代表了我们对如今的实验室科学工作者需求的回应, “赛默飞世尔科技公司 NanoDrop 系列产品的市场总监 Cathy Williams 说, “我们的实验室客户们追求工作流程的效率, 产率和性能同时要求能保留简单性和牢固性, 而我们的 NanoDrop 系列产品的用户已经能体会到这一点。”

开发这款简单易用的 NanoDrop 2000c 产品的微样品分析专家早在 2001 年就开始制造这类仪器, 他们现在服务于世界最大的致力于改善实验室工作流程的微样品紫外-可见分光光度计用户. 这种革新型的仪器也得到了另外一组生命科学家的技术支持, 他们一直致力于解决科学工作者的实际需求从而能够发挥仪器的最佳效果。

对于那些所有想在自己的实验室用自己的样品试用NanoDrop 2000c产品的科学工作者来说,现在您也拥有这个机会 --- 赛默飞世尔科技公司可以提供仪器给做免费的示范. 想要咨询更多的关于NanoDrop 2000c 产品信息和免费示范, 请参观 2009 年 PITTCON 会议上的 Thermo Scientific 1432 号展位, 或者访问 [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com) 或致电 1-302-479-7707 垂询。

想要了解关于 2009 年PITTCON会议的全部新产品的新闻发布, 请登陆媒体在线网址: [www.thermofisher.com/pittcon09](http://www.thermofisher.com/pittcon09).

Thermo Scientific 是 Thermo Fisher Scientific 旗下品牌之一, 是全球科学服务领域的领导者。

---

### 关于赛默飞世尔科技 (Thermo Fisher Scientific)

赛默飞世尔科技有限公司 (Thermo Fisher Scientific Inc.) (纽约证交所代码: TMO) 是全球

科学服务领域的领导者, 致力于帮助客户使世界变得更健康、更清洁、更安全。公司年度营收达到 105 亿美元, 拥有员工 34,000 多人, 为 350,000 多家客户提供服务。这些客户包括: 医药和生物技术公司、医院和临床诊断实验室、大学、研究院和政府机构以及环境与工业过程控制装备制造等。该公司借助于 Thermo Scientific 和 Fisher Scientific 这两个主要品牌, 帮助客户解决从常规测试到复杂的研发项目中所面临的各种分析方面的挑战。Thermo Scientific 能够为客户提供一整套包括高端分析仪器、实验室装备、软件、服务、耗材和试剂在内的实验室工作流程综合解决方案。Fisher Scientific 则提供了一系列用于卫生保健, 科学研究, 以及安全和教育领域的实验室装备、化学药品以及其他用品和服务。赛默飞世尔科技将努力为客户提供最为便捷的采购方案, 为科研的飞速发展不断地改进工艺技术, 并提升客户价值, 帮助股东提高收益, 为员工创造良好的发展空间。欲获取更多信息, 请登陆: [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com) (英文), [www.thermo.com.cn](http://www.thermo.com.cn) (中文)。

# 检测小鼠肝脏的 caspase 活性

细胞发生凋亡时，除了形态学变化以外，还会发生一系列生化事件。其中，caspase 酶的依次激活是凋亡重要的生化改变。Promega 公司的 Caspase-Glo® Assays(a,b) (以下称 Caspase-Glo® 检测试剂盒)是一种检测 caspase 活力的均质发光检测方法。试剂盒中提供了一种氨基荧光素发光前体底物(含蛋白酶识别序列)和专利的耐热荧光素酶，试剂已经经过优化。加入 Caspase-Glo® 试剂会导致细胞裂解，随后 caspase 将底物裂解。释放出的游离氨基荧光素被 Ultra-Glo™ 重组荧光素酶作用后产生一种"辉光型"的发光信号。该信号的强弱与 caspase 的活性成正比。稳定的荧光素酶和专利的缓冲液使得该试剂盒在不同的实验条件下都可发挥很好的性能。不同于荧光或比色分析法，该发光分析法不易被其他化合物的干扰而影响。Caspase-Glo® 3/7,8 和 9 试剂盒可以用多孔板模式，既可用于纯化的酶测定，也可直接在培养的细胞中应用。Caspase-Glo® 2 和 6 试剂盒用于纯酶制备。

我们在此节选了 Promega 公司的用户使用 Caspase-Glo® 试剂盒而发表的论文 (Liu, D. et al. (2004) Nuclear import of proinflammatory transcription factors is required for massive liver apoptosis induced by bacterial lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 279, 48434–42), 供更多的研究者参考。节选原文发表于 Promega 公司的技术刊物 Cell Notes 第 11 期。

## -- 普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司

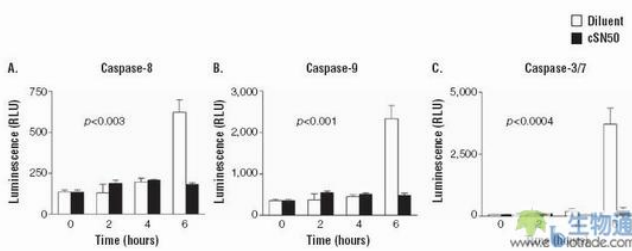
本研究观察了 cSN50 肽在小鼠肝细胞凋亡中的作用。cSN50 肽是应激反应转录因子 (stress-responsive transcription factors, SRTFs) 的核内转移抑制剂。使用脂多糖 (LPS) 和 2-氨基-2-脱氧-D-半乳糖 (D-Gal) 攻击造成急性肝损伤的小鼠动物模型，实验组于造模前后使用 cSN50 肽进行处理，对照组仅用溶剂做相应处理，结果显示实验组小鼠的肝细胞凋亡程度低于对照组。本工作检测了 LPS /D-Gal 处理的小鼠肝组织匀浆中的起始 caspase 酶 (caspase-8、caspase-9) 和效应 caspase 酶 (caspase-3/7) 的活性。

## 用 caspase-Glo® 3/7、-8 和-9 试剂盒检测小鼠肝组织匀浆中 caspase-3/7、8 和 9 的活性

雌性 C57BL/6 小鼠腹腔注射 LPS 和 D-Gal。然后将小鼠分成两组。在使用脂多糖和 D-Gal 攻击前后，实验组小鼠接受腹腔注射 cSN50 肽，共 7 次。对照组小鼠腹腔注射物为 5% DMSO (溶剂对照)。

为检测小鼠肝脏 caspase-3/7, -8 和-9 活性，作者使用了 Caspase-Glo®-3/7, -8 和-9 检测试剂盒(a,b)(Cat.#分别是 G8090, G8200 和 G8210)，仅对操作步骤做了轻微修改。被修改的步骤为：在制备 Dounce 肝组织匀浆过程中，使用了低渗提取缓冲液 (25mM HEPES [pH7.5], 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 1mM Pefabloc®和胃酶抑素、亮肽素和抑酞酶各 1µg/ml)。匀浆后，4°C 13000 rpm 离心 15 分钟，澄清提取液。将澄清的提取液中的蛋白质浓度预先调整为 1mg/ml，-80°C 下冻存。为测定 caspase 活性，作者将稀释后的提取液 (10µg/ml)与 Caspase-Glo®检测试剂等体积混合，置于 96 孔白壁培养板中。室温孵育 1 小时，之后使用读板的发光检测仪读数。

caspase-3/7 的检测数据表明, C57BL/6 小鼠先单独使用溶剂 (5%DMSO; 无肽抑制剂) 处理, 然后再用 LPS 和 D-Gal 攻击, 使用 Caspase-Glo<sup>®</sup>R3/7 检测试剂盒检测, 结果显示肝组织中被激活的 caspase-3 和 caspase-7 的水平增加。LPS 和 D-Gal 攻击后 6 小时, 细胞中的 caspase-3/7 活性达到最大值(图 1)。最有趣的是, 小鼠经 cSN50 肽处理, 其肝细胞的凋亡程度低于溶剂对照组。

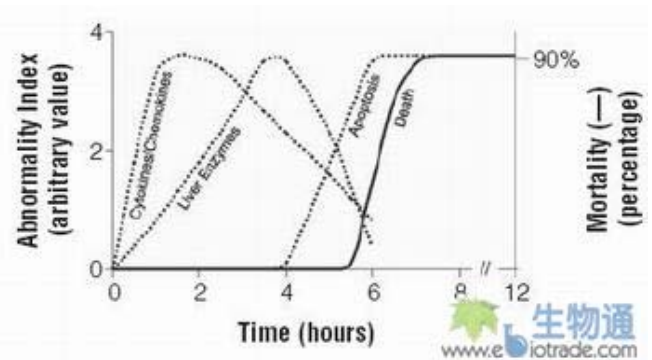


**图 1. 对照组和 cSN50 肽处理组小鼠启动 caspase 酶和效应 caspase 酶激活的时间依赖性。** 根据 Liu, D 等 2004 年描述的实验方案, 野生型 C57BL6 小鼠腹腔注射 LPS 和 D-Gal 前后, 用 cSN50 肽 (0.7mg, 溶于 200 $\mu$ l 5% DMSO) 或溶剂进行处理。LPS 和 D-Gal 攻击后检测了溶剂对照组(空白柱)和 cSN50 肽处理组(实心柱)肝脏 caspase 酶的活性。误差线表示每个数据点四只小鼠均值的 $\pm$ 标准差。P 值表示对照组和 cSN50 肽处理组之间相对光单位-RLU 的差异显著性(双向 ANOVA 分析)。图片的引用得到了以下授权: Dr. Jacek Hawiger, Vanderbilt University, 及 The Journal of Biological Chemistry.

通过研究启动 caspase 酶-caspase-9(内源性途径)的活性和 caspase-8(外源性途径)的活性, 作者还分析了诱导凋亡的内源性和外源性途径。在 LPS 和 D-Gal 攻击后的不同时间点 (0-6 小时), 分别检测肝组织提取物中两种 caspase 酶的活性。没有接受 cSN50 肽的对照组小鼠, 在接受 LPS 和

D-Gal 治疗后 6 小时, caspase-8 和 caspase-9 两种酶的活性都显著提高。在经过 cSN50 肽处理的小鼠组, caspase-8 和-9 的活性与 caspase-3/7 一样, 均有降低。作者指出, 虽然在 LPS/D-Gal 治疗后的 1 小时内炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  水平增加, 但是肝组织的 caspase-8 活性直到治疗后的 6 小时都不会增加。

根据肝组织 caspase 酶活性的数据和其它相关支持数据, 作者推断 SRTFs 的核内转移对于凋亡的启动和由于巨噬细胞释放细胞因子而引起的肝损伤(图 2) 具有非常重要的意义。最终, 这一发现将有助于理解由巨噬细胞表达的炎症细胞因子介导的大面积肝组织凋亡的生物学及其发病机理。



**图 2. 细胞因子/趋化因子激活、以及在此 LPS 诱导的肝损伤模型中, 以肝组织酶的释放、肝细胞凋亡和死亡表示的肝脏损伤的时间进程示意图。** 异常指数表示所研究的参数的增加倍数。图片的引用得到了以下授权: Dr. Jacek Hawiger, Vanderbilt University, 以及 The Journal of Biological Chemistry.

[了解Caspase-Glo试剂盒的更详细信息及更多用户体验](#)

# DeadEnd(TM)比色法凋亡检测系统： 在病理学中的应用

作者：Martha O'Brien, Angela Okragly, Promega Corporation; Tom Warner, Ron Kalil, University of Wisconsin Medical School; Guus Wolswijk, Netherlands Institute for Brain Research, Amsterdam, The Netherlands

由于凋亡在发育、自我稳态调节和多种重大疾病中扮演着重要角色，因此对凋亡的遗传、分子和形态学方面的研究正在深入地进行。Promega 的 DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis Detection System（以下简称 DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统）对凋亡的生化标志物——片断化降解的 DNA 进行标记。这一比色系统很适合对组织切片和培养细胞中的凋亡细胞的胞核进行标记，而且还可以同时进行形态学评估。本文展示了 DeadEnd™ 凋亡系统在凋亡的细胞模型、动物模型和多种病理组织切片中的应用。

## 简介

凋亡是一种细胞自杀机制，是一种固有的生物学事件，在发育、自我稳态调节和多种疾病过程中扮演着重要角色。正常发育的一个重要方面就是以精确而系统的方式剔除过剩的细胞。因此，此过程又叫做程序性细胞死亡。但是，在一些疾病中，细胞死亡程序会发生错误。退行性疾病可能会导致细胞的过度凋亡，细胞的过度凋亡也可导致退行性疾病。一些癌症抑制了细胞死亡的级联反应，导致细胞出现过度的、不可控的增殖。

最初，凋亡定义的是细胞形态学的变化，如细胞体积减少、细胞核浓集和胞膜出泡。经历凋亡的细胞降解成膜彼此相连的凋亡小体，此时，这些凋亡小体可被巨噬细胞或其它临近的细胞

所吞噬，而不产生炎症反应。这一过程与坏死完全不同，坏死是细胞遭受严重损伤所导致的，其特征是细胞肿胀、溶酶体酶类释放、细胞膜完整性丧失和炎症反应等。

许多类型的细胞都会发生凋亡，并且可以被多种胞外刺激物触发。研究发现几个细胞死亡基因在不同物种间非常保守，针对细胞死亡通路的研究正在不断深入。在凋亡细胞中会观察到细胞核发生形态学变化，在内源性核酸内切酶的作用下使 DNA 降解成片断（1，2），这些酶包括 caspase 依赖的 DNase，即 CAD（3）。这种 DNA 片断化降解是凋亡的重要标志。通常，凋亡细胞内的 DNA 被切割成为长度大小为 180-220bp 的整数倍的很多个 DNA 片断。这些片断在琼脂糖凝胶电泳中呈现出“梯子型”，很容易被观察到。

DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统可以对凋亡细胞的降解 DNA 进行末端标记。本系统以改进的 TUNEL 方法为基础，TUNEL 为 TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记法（TdT-mediated dUTP nick end-labeling）的简称。图 1 所示为检测步骤。DeadEnd™ 系统对培养细胞和组织切片的 DNA 降解片段都可进行原位标记（4）。使用这一方法，凋亡细胞核被染成深褐色。

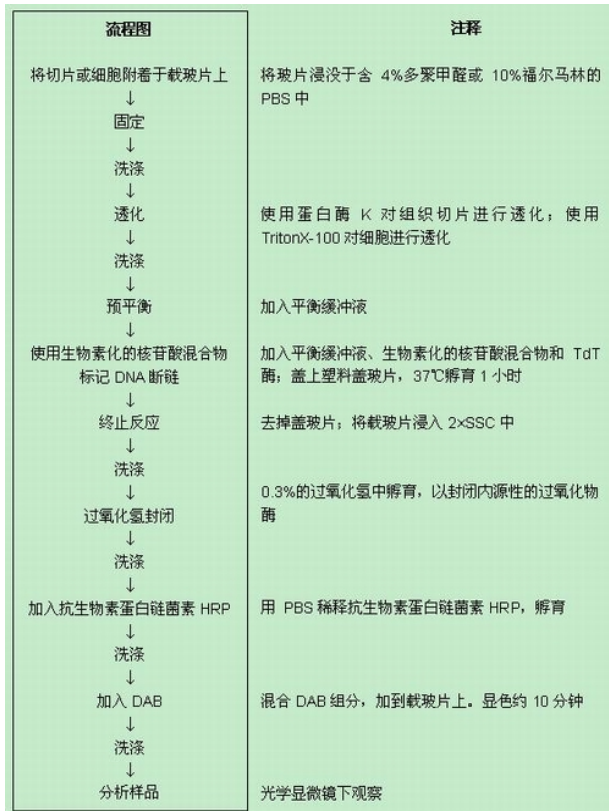


图 1. DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统使用方法概述

### 凋亡的细胞模型

Fas 介导的细胞死亡模型是已建立的、较好的凋亡模型。Fas 配体 (FasL) 结合于 Fas 受体或受体的交联抗体后可以启动这一模型 (5, 6)。配体结合后几小时内就可以观察到 Fas 介导的细胞死亡，这一过程不需要蛋白质合成 (5, 7)。普遍认为 Fas 连接作用激活了蛋白酶的级联反应，最终转换成细胞死亡信号 (8)。Jurkat 细胞为人 T 淋巴细胞，我们使用了抗体交联的 Fas 致使 Jurkat 细胞发生凋亡，并以此为模型，验证了 Promenga 的 DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统的效用。如图 2 所示，使用抗 Fas 处理后，DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统可将许多凋亡细胞标记出来，而未经处理的对照组细胞几乎都没有被标记上。

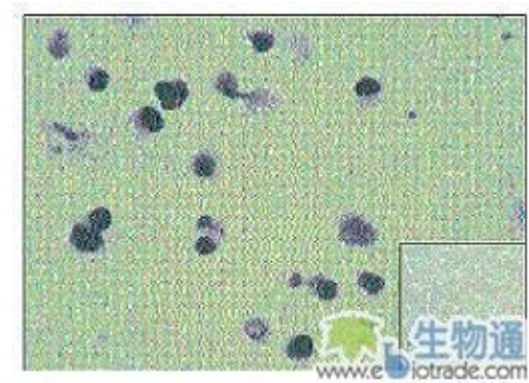


图 2. 抗 Fas 单克隆抗体 (50ng/ml; CH-11 克隆, Oncor) 诱导的 Jurkat 细胞凋亡。细胞经 Fas mAb 处理后 (16 小时)，使用 DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统标记凋亡细胞的胞核。未处理的对照组细胞无着色 (插图)。

此外，实验还先后使用了 Promega 公司的 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (以下称 CellTiter® 96 AQueous 单溶液细胞增殖检测试剂盒) (a) 和 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (以下称 CytoTox® 96 非放射性细胞毒检测试剂盒)，来检测凋亡诱导后 16 小时的细胞活力 (图 3)。CellTiter® 96 AQueous 试剂盒检测的是四唑盐 MTS(a)的生物还原，从而对细胞活力进行定量检测 (9)。CytoTox® 96 试剂盒检测的是细胞膜被破坏后，从细胞内漏出的乳酸脱氢酶 (LDH)。如图 3 所示，CellTiter® 96 AQueous 试剂盒检测的结果是：随着诱导 Jurkat 细胞凋亡加入的 Fas mAb 的增多，活细胞总数降低；而同时使用的 CytoTox® 96 试剂盒检测的结果是死亡细胞总数增加。在这一 Fas 介导的 Jurkat 细胞凋亡模型中，上述两种方法的检测结果与使用 DeadEnd™ 检测系统所检测的凋亡情况是一致的 (图 2 和 3)。在使用茴香霉素诱导 HL-60 细胞的凋亡时也观察到了相似的结果，证实了 CellTiter® 96 AQueous 试剂盒、CytoTox® 96 试剂盒以及 CaspACETM 荧光检测系统的检测结果具有一致性 (11)。

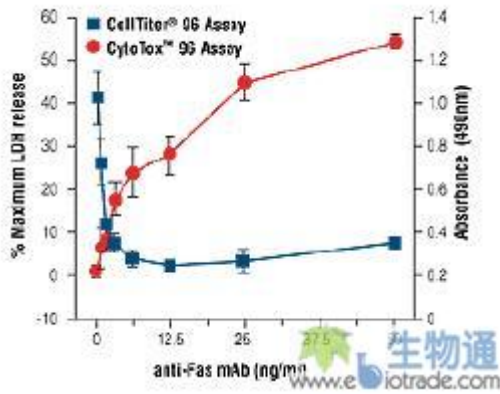


图 3. 不同浓度的抗 Fas mAb 诱导的 Jurkat 细胞凋亡。将 Jurkat 细胞调整浓度至 106 个/ml, 加入 0-50 ng/ml 不同浓度的抗 Fas mAb, 用于诱导凋亡。在含 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中, 37°C 孵育, 16 小时后, 按照每种试剂盒提供的操作方案, 使用 CellTiter® 96 AQueous 单溶液细胞增殖检测试剂盒 (490nm 吸光度) 和 CytoTox® 96 非放射性细胞毒检测试剂盒 (LDH 最大释放的百分比) 检测细胞活力状态 (9, 10)。

### 凋亡的动物模型

凋亡的动物模型对研究体内细胞的程序性死亡通路非常有用。研究人员已经建立了神经元轴索显微手术导致大鼠脑神经元死亡的模型, 用于凋亡研究。大鼠脑部视觉皮层的单侧损伤会导致与损伤同侧的外侧膝状核 (LGN) 的神经元广泛死亡 (12, 13)。经轴索显微手术处理的 LGN 神经元, 在诱导损伤后的精确时间点出现萎缩和死亡。轴索显微手术诱导细胞凋亡的时程表明: 损伤后 3 天, 损伤同侧的 LGN 神经元仅有 5% 发生死亡; 但是, 在损伤后 3-7 天, 则出现广泛的神经元死亡。在此期间, 背部同侧的 LGN 约有 2/3 的神经元出现细胞死亡 (12)。在图 4 中, 损伤同侧 LGN 的多数细胞核都可以被 DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统清楚地标记上, 而损伤对侧的 LGN 却未被标记。这些结果清楚地表明这一凋亡检测系统可以有效地标记轴索显微手术诱导的神经元死亡模型的凋亡细胞核。

细胞核。

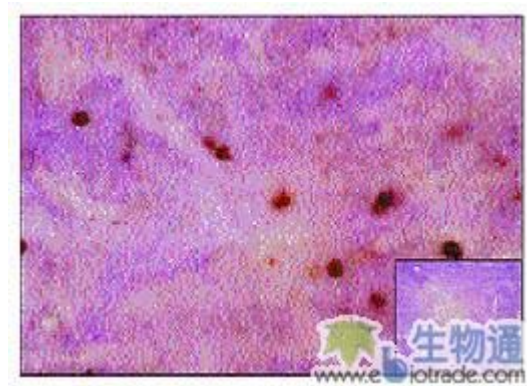


图 4. 在轴索显微手术诱导凋亡的大鼠脑模型中, 使用 DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统标记背外侧膝状核 (LGN) 的凋亡细胞核 (11, 12)。使用多聚甲醛/戊二醛固定大鼠脑, 振动切片切片 (50μm), 进行轴索显微手术的大脑 LGN 出现几个深染细胞, 而在同一张切片 (插图) 上的对侧 LGN 则没有观察到深染细胞。图片中的“洗衣板”效应是振动切片所造成的人为现象。

[点击索取DeadEnd\(TM\)比色法凋亡检测系统的详细资料](#)

### 人类疾病中的凋亡

理解许多疾病状态相关的细胞死亡过程对于解决发病机理和找出可能的治疗方案是至关重要的。在许多疾病中, 细胞的死亡是由于凋亡引起还是由其它的溶细胞途径引起, 还不十分清楚。我们使用了 DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统对几种疾病组织 (下面) 中的 DNA 降解进行了检测。这种类型的分析能够在组织原位层面上提供细胞死亡机制的信息。凋亡的确认通常需要多方面的证据, 如形态学变化和通过 DNA laddering 证实的核小体降解。使用 DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统分析 DNA 是否降解, 是进一步理解疾病状态下的细胞死亡机制的第一步。

### 移植物抗宿主疾病

移植物抗宿主疾病 (GVHD) 是骨髓移植的一种严重并发症。在急性 GVHD 中, 皮肤是被攻

击的第一靶器官，这种攻击是供体骨髓衍生的淋巴细胞渗透而产生的。最近有研究标明，在该免疫性疾病中，过度的程序性细胞死亡可能与角质细胞受损有关。最终，靶细胞受效应 T 细胞攻击而受损，被认定是 GVHD 中的凋亡途径（14，15）。在图 5 中，样本为 GVHD 活检标本，使用福尔马林固定，石蜡包埋，切片的基底细胞层使用 DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统进行了标记。效应淋巴细胞致使皮肤损伤，导致 GVHD 皮肤病变中的角质细胞凋亡，上述实验得到的结果与此结论一致。

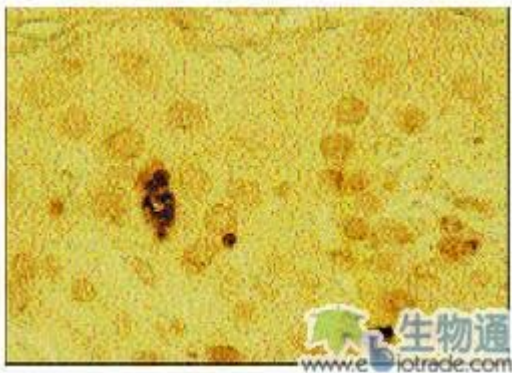


图 5. DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统标记出移植抗宿主病患者皮肤基底细胞层的一些细胞核。切片为 5-10μm 的石蜡包埋组织样本。切片按照本系统提供的操作手册中描述的实验方案进行操作（4）。

### 基底细胞癌

基底细胞癌（BCC）是由紫外线照射触发的一种皮肤疾病。虽然 BCC 生长较慢，并很少发生转移，但是这种肿瘤细胞可能会侵蚀并破坏周围组织。在这种疾病中，正常的程序性细胞死亡会被抑制。一般认为 BCC 是一种较活跃的高凋亡活性的增殖性损伤。损伤的严重程度依赖于细胞的增殖速率与死亡速率的比值。BCC 细胞表达 Bcl-2 蛋白，后者会抑制细胞凋亡（16，17）。Bcl-2 表达水平的差异可能会影响基底细胞癌的细胞死亡速率。在肿瘤消退的 BCC 病例中，细胞死亡速率增加。一般认为凋亡会导致肿瘤消退

（18）。

在图 6 中，DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统标记出了肿瘤消退的 BCC 的组织切片中的多数基底细胞核的凋亡状况。BCC 损伤周围区域的淋巴细胞染色也非常明显。一般认为 BCC 中，肿瘤周围浸润性的 T 淋巴细胞也发生了细胞凋亡（19）。细胞毒 T 淋巴细胞和肿瘤基底细胞之间的竞争可能对疾病的结局具有决定作用。



图 6. 消退性基底细胞癌中的凋亡检测。切片来自于自发消退性基底细胞癌患者，DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统标记出了损伤区域的基底细胞层的几个细胞（图 A）。在损伤区域外的基底细胞，未观察到被标记出的细胞核（图 B）。损伤区域附近的几个淋巴细胞被明显标记（图 C）。基底细胞层的背景要高于其它被检测的组织。

### 多发性硬化症

当前，对多发性硬化症（MS）脱髓鞘斑的髓鞘和少突细胞的清除机制进行了深入的研究。在多发性硬化症中，脱髓鞘区域所发生的凋亡发挥着重要作用。在此疾病状态下，浸润细胞和小神经胶质细胞发生凋亡，但是少突神经胶质细胞的细胞死亡途径还没有明确（20-24）。

为了确定 MS 和其它疾病中发生 DNA 降解的细胞类型，我们联合使用了比色法的 TUNEL 技术与抗体着色技术。在细胞增生的慢性 MS 损伤的脱髓鞘区域，使用 Promega 的 DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统检测细胞凋亡（图 7）。DeadEnd™ 检测系统用于标记凋亡的细胞核

(黑色)，并使用髓鞘少突神经胶质细胞糖蛋白 (MOG) 抗体进行双标记，以识别少突神经胶质细胞 (红色)。图 7 中的凋亡细胞为 MOG 阴性，因此这些凋亡细胞不是少突神经胶质细胞。

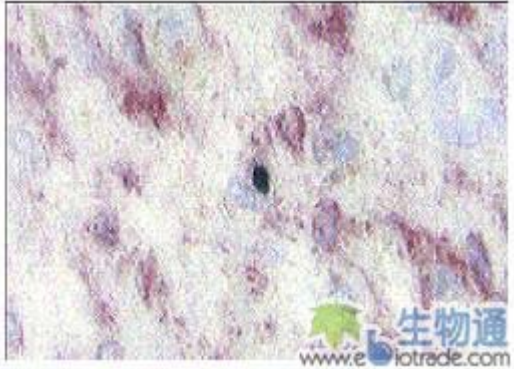


图 7. 双标记法显示细胞增生的慢性多发性硬化症损伤的部分脱髓鞘区域的凋亡细胞核。使用 DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统显示细胞核的片断化降解 (使用镍剂增强显色, 呈黑色), 而使用抗少突细胞糖蛋白 (MOG) 抗体可以显示髓鞘部分和少突神经胶质细胞体 (呈红色)。凋亡细胞为 MOG 阴性, 因此这些凋亡细胞不是少突胶质细胞。使用苏木素复染 (蓝色)

### 总结

我们已经在凋亡的细胞模型和动物模型上证明了 DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统的效用。这种比色系统在检测 DNA 降解的同时, 还可以进行细胞或组织的形态学分析。另外, 还证明了 DeadEnd™ 比色法凋亡检测系统对于检测疾病组织中的细胞死亡特别有效。这一系统能够与抗体染色联合使用, 用于对某些特定的细胞类型或凋亡途径中的其它分子进行标记。

[点击索取DeadEnd\(TM\)比色法凋亡检测系统的详细资料](#)

### 参考文献

1. Arends, M.J. et al. (1990) Amer. J. Path. 136, 593.
2. Gavrieli, Y. et al. (1992) J. Cell. Biol. 119,

493.

3. Enari, M. et al. (1998) Nature 391, 43.
4. DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis Detection System Technical Bulletin #TB199, Promega Corporation.
5. Itoh, N. et al. (1991) Cell 66, 233.
6. Nagata, S. and Golstein, P. (1995) Science 267, 1449.
7. Schulze-Osthoff, K. et al. (1994) J. Cell Biol. 127, 15.
8. Frazer, A. and Evan, G. (1996) Cell 85, 781.
9. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Technical Bulletin #TB245, Promega Corporation.
10. CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Technical Bulletin #TB163, Promega Corporation.
11. Moravec, R. and Riss, T. (1998) Promega Notes 68, 13.
12. Agarwala, S. and Kalil, R. (1998) J. Comp. Neurol. 392, 252.
13. Agarwala, S. and Kalil, R. (1998) J. Comp. Neurol. 392, 264.
14. Yoo, Y.H. et al. (1997) Arch. Dermatol. Res. 289, 389.
15. Langley, R.G.B. et al. (1996) J. Amer. Acad. Dermatol. 35, 187.
16. Crowson, A.N. et al. (1996) Human Pathol. 27, 355.

17. Verhaegh, M.E. et al. (1995) Brit. J. Dermatol. 132, 740.

18. Buechner, S.A. et al. (1997) J. Clin. Invest. 100, 2691.

19. Gutierrez-Steil, C. et al. (1998) J. Clin. Invest. 101, 33.

20. Bonetti, B. and Raine, C.S. (1997) Ann. Neurol. 42, 74.

21. Bonetti, B. et al. (1997) J. Immunol. 159, 5733.

22. Ladiwala, U. et al. (1998) J. Neurosci. 18, 1297.

23. Menard, A. et al. (1998) J. Neurol. Sci.

154, 209.

24. Hishari, S. et al. (1997) J. Neurochem. 69, 10.

产品	规格	目录号
DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis	40 reactions	G7130
CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	200 assays	G3582
	1,000 assays	G3581
	5,000 assays	G3580
CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	1,000 assays	G1780

# ILLUMINA 公布测序仪发展大计

ILLUMINA 公司近日公布了其新一代测序仪 Genome Analyzer 系统的发展路线，计划在 2009 年实现每次运行获得超过 95 GB 的高质量数据。该路线勾勒出试剂、算法和硬件的升级，将会显著改善准确率、读长、数据密度和易用性。ILLUMINA 预计今年底单个流动室能产生人类基因组的 25 倍覆盖度，而人类基因组的测序费用降低至 1 万美元以下。

以 Genome Analyzer 现在的配置，每次运行能产生 15 GB 以上的高质量数据。以此为基础，2009 年 Genome Analyzer 的性能会提升 6 倍以上。这些改进将分几个阶段进行，并包括以下元素：

- 试剂改良，包括使用全新的聚合酶，让运行速度更快，配对片断超过 2×100 bp。这些改进有望提高测序准确性，实现 2×100 配对末端阅读片断的准确性超过 98.5%，2×50 配对末端片断则超过 99.9%。

- 硬件升级，包括流动室支架改进和试剂冷却器扩容，不仅能增加产量，还能实现至少 100 个循环的无人值守自动化。这些硬件将组成 Genome Analyzer 升级试剂盒，现在的用户也能立即订购，享受升级的乐趣。

- 算法改进，包括检测簇的新方法，将让高密度流动室的产量提高 80%，并改善碱基检出的准确性。

- 数据密度增加，通过利用 1 微米及亚微米特征的半有序阵列。这些有序的阵列，以及读长的增加，有望在每次运行中分别产生 55 和 95 GB 的数据。

这些改进不仅增加了 Genome Analyzer 的产量，降低了测序费用，还大大扩展了它的应用

空间。ILLUMINA 生命科学部的副总裁 Joel McComb 表示：“作为应用最广的新一代测序平台，Genome Analyzer 已发表论文 200 多篇，并让世界各地的科学家快速经济地进行突破性的研究。经过 2009 年的系统升级，我们预计 Genome Analyzer 将继续成为众多应用中的灵活工具，包括大规模全基因组分析、从头测序、宏基因组学等，并将加快人类健康、生物多样性和环境的探索速度。”

## 关于 ILLUMINA

ILLUMINA 公司 ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)) 是全球领先的新一代生命科学工具的开发和生产者，并开发大规模分析遗传变异和生物功能的集成工具。我们利用专利技术，为测序、基因分型和基因表达提供全面的产品和服务，还将进入分子诊断市场。我们的客户包含一流的基因研究中心、药厂、研究院、临床研究机构和生物公司。我们的工具有足够的表现力、通量、成本效益和灵活性，使全世界的研究者能通过遗传实验来得到有价值的信息。我们相信这个信息能使研究者把遗传变异与生物功能关联起来，从而加大药物开发和临床研究，让疾病能更早地检测出来，为患者提供更好的药物。

(生物通 余亮)

# 赛默飞世尔推出 4 小时快速检测 禽流感的新技术

赛默飞世尔公司产品 KingFisher 系列自动化磁珠提取纯化仪器,联合 Invitrogen 公司 Ambion 病毒 RNA 提取试剂盒,将传统方法的禽流感检测由 21 天缩短至 4 小时左右。此技术经过美国国家兽医服务实验室(NVSL)验证,是美国农业部认可的禽流感检测的分子生物学方法。该技术已由赛默飞世尔公司引进中国,将对促进我国禽产品的出口创汇、降低成本和疫情早期诊断具有重大意义。

禽流感快速高通量检测新技术是基于分子生物学的方法,在病毒感染的初期即可快速确诊病毒的存在。该方法包括两大主要步骤。第一步,联合使用赛默飞世尔公司的 KingFisher 自动化磁珠提取纯化仪器,及 Invitrogen 公司的 Ambion 病毒 RNA 提取试剂盒,进行自动化的病毒 RNA 提取。该步骤需要约 30 分钟。第二步,实时定量 RT-PCR 检测病毒 RNA。该步骤需要约 3 小时。整体方法经过优化,并经过超过 200,000 禽类咽喉拭子样品的检测验证。

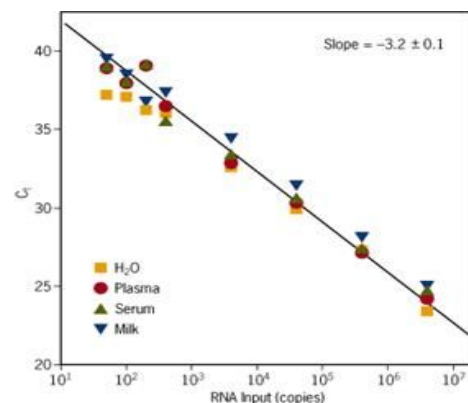
这项技术可以用于从生物体液和无细胞样品中,如血清、血浆、口腔拭子和细胞培养液中,提取病毒 RNA。从无细胞样品中分离纯化 RNA 比从组织和培养细胞中分离纯化 RNA 更具挑战性。这是因为低的病毒滴度、大的操作体积和样品的复杂性,且操作步骤必须适合实时定量 RT-PCR。使用自动化磁珠提取方法可满足上述各项要求,赛默飞世尔公司的 KingFisher 专利磁珠提取技术,不需有机溶剂或 RNA 沉淀步骤,消除了基于滤膜的方法经常碰到的问题,如滤膜堵塞、大的洗脱体积和不稳定的产率。而结合后续的实时定量 RT-PCR,可检测到低至 10 拷贝的病毒 RNA,极大提高了禽流感病毒检测的灵敏度。

禽流感快速高通量检测新技术比较传统方法的优势

- 灵敏度极高,可从 100-400ul 样品中分离到至少 10 拷贝的病毒 RNA
- 对于 96 个样品,整个磁珠提取纯化过程不超过 30 分钟,整个禽流感检测过程不超过 4 个小时
- 用于低病毒浓度时尤其理想
- 线性纯化效率低至 50 转录子
- 经美国国家兽医服务实验室(NVSL)认证可用于 AI/ND 病毒

线性纯化效率可低至 10 拷贝的转录子

用 MagMAX 病毒 RNA 提取试剂盒,可以从血浆和血清中定量纯化病毒 RNA,线性范围大于约 5 个数量级。这可由血浆、血清和水样品的试验体系中,以系列稀释的 RNA 作对照。



图一 病毒 RNA 提取效率

图一的定量 RT-PCR 结果说明 RNA 的纯化

率在很大的病毒浓度的范围内均为线性，含少至10个拷贝的转录子的样品也可被纯化。

### 基于磁珠的纯化技术的好处

磁珠用于从细胞中纯化 RNA 和从无细胞样品中纯化病毒 RNA 有许多好处。RNA 产率更稳定，不仅是实验到实验间的差异极小，而且是大范围的样品尺寸所得到的 RNA 产率也很稳定。磁珠技术消除了因细胞聚集而产生滤膜堵塞的情况，因为高效的磁珠结合仅需很小体积的磁珠，所以结合的 RNA 用 20-50ul 的不含核酸酶的水就可以洗脱。这使得磁珠纯化技术对于从大体积、稀释样品中浓缩 RNA 极其有用。



图二 赛默飞世尔公司 KingFisher Flex 自动化磁珠提取纯化仪

KingFisher(图二)专利的磁珠提取纯化技术，用转移磁珠代替了转移溶液，因此具有更高的提取纯化效率和产率。

### 关于赛默飞世尔科技 (Thermo Fisher Scientific)

赛默飞世尔科技 (Thermo Fisher Scientific)(纽约证交所代码: TMO)是全球科学服务领域的领导者，致力于帮助客户使世界更健康、更清洁、更安全。公司年销售额超过 100 亿美元，拥有员工约 33,000 人，在全球范围内服务超过 350,000 家客户。主要客户类型包括：医药和生物公司，医院和临床诊断实验室，大学、科研院所和政府机构，以及环境与工业过程控制装备制造商等。公司借助于 Thermo Scientific 和 Fisher Scientific 这两个主要的品牌，帮助客户解决在分析化学领域从常规的测试到复杂的研发项目中所遇到的各种挑战。Thermo Scientific 能够为客户提供一整套包括高端分析仪器、实验室装备、软件、服务、耗材和试剂在内的实验室综合解决方案。Fisher Scientific 为卫生保健，科学研究，以及安全和教育领域的客户提供一系列的实验室装备、化学药品以及其他用品和服务。赛默飞世尔科技将努力为客户提供最为便捷的采购方案，为科研的飞速发展不断地改进工艺技术，提升客户价值，帮助股东提高收益，为员工创造良好的发展空间。欲获取更多信息，请浏览公司的网站：[www.thermo.com.cn](http://www.thermo.com.cn)

# SOLiD 系统两度夺魁，成为 2008 年最受瞩目的创新产品

在刚刚结束的“生物通 2008 年度生命科学十大创新产品”评比中，SOLiD 系统以最高的票数当选，成为人气最高的创新产品。无独有偶，在美国《科学家》杂志举办的 2008 十大技术创新的评选中，SOLiD 系统也被评审团评为 2008 年度十大技术创新之首。



2008 年最新推出的 SOLiD 3 系统就通量而言，是革命性的，而其无以伦比的准确性、系统可靠性和可扩展性更让它从其他新一代测序平台中脱颖而出。

SOLiD 3 系统能在每次运行中产生 30 GB 可定位的序列数据，相当于 10 倍人类基因组覆盖度。无人值守的自动化和增强的数据分析工具显著缩短了手工操作时间，并加快了实验进程。SOLiD 3 系统具有开放玻片形式和灵活的微珠密度，只需简单地优化分析和试剂，就能实现通量的增加。凭借双碱基编码，SOLiD 3 系统的准确性超过 99.94%，与其他检测变异的新一代测序平台相比，数据更为准确。这种无可匹敌的准确性是系统固有的，产生的假阳性率也更低。SOLiD 3

系统的独立流动室让用户能在一台 SOLiD 分析仪中运行两个完全独立的实验。样品多重分析和条形码序列提供了额外的灵活性，显著增加了定向重测序、表达和 ChIP 分析的经济性。

作为新一代测序仪中的佼佼者，SOLiD 系统的应用范围超越了单纯的测序，覆盖了 SNP、microRNA、ChIP、甲基化等多种分析，并得到 Invitrogen、ABI、Ambion 核心技术和试剂的全力支持，可广泛应用于全球的科研实验室、基因组中心、核心及服务合同机构、以及生物技术和制药公司。最新发布的 SOLiD 3 系统更有望在 2009 年让科学家最终实现 10000 美元的人类基因组测序。

不久前，ABI 公司和贝勒医学院人类基因组测序中心（HGSC）的科学家总结了他们在千人基因组计划首次数据发布中的贡献。作为商业参与者以及与 HGSC 共同协作，ABI 公司利用 SOLiD 系统产生了超过 460 GB（1GB = 10 亿个碱基）可作图的序列数据，比这两个机构的预定目标超出了 65%。

拥有精确、高通量、应用广泛、可不断扩展的未来，SOLiD 系统这个创新的平台将过去种种梦想都变成了现实，不仅将大大加速生命科学研究的进程，甚至可能改变我们的生活。生物通将在 3-4 月推出的《生物通技术专辑：新一代测序技术之三国演义》中，将为您逐步揭秘 Solid3 的精妙之处，敬请期待！

（生物通 余亮）