

# EBIOTECH

生物通技术周刊

第59期  
2009年4月16日  
全文下载

## 〔技术前沿〕

QIAGEN替您完成real-time PCR引物设计和反应优化  
一次性生物反应器从25升--500升的可扩展性：技术回顾  
少量RNA也能进行高通量的miRNA表达图谱分析

## 〔新品速递〕

新一代平行分析的SPR生物传感器  
罗氏xCELLigence家族再添新成员  
Invitrogen推出第一款转染仪器，简化了原代和干细胞研究

## 〔应用指南〕

进行优质的科学的研究：鉴定细胞系的遗传特征  
轻松实现高通量、经济的基因分型  
细菌人工染色体（BAC）测序流程的优化

## 〔行业动态〕

通用电气与Tecan合作进行药物开发  
2009年度神经生物学奖评选征集中  
各大生物芯片公司最新动向

# QIAGEN 替您完成 real-time PCR 引物设计和反应优化

随着荧光定量 PCR 仪的普及，荧光定量 PCR 也开始飞入寻常实验室了。不过 real-time PCR 可不像终端 PCR 那么轻巧。常规 PCR 只要扩出条带就算行，条带深点浅点偶尔有点副产物问题不太大，而实时定量 PCR 既然目标是定量，自然就要严谨得多。稍有偏差都会被级数放大而严重影响结果。由于涉及若干种荧光标记，定量 PCR 头一件麻烦事就是引物和探针的设计。虽说科研是 re-search 的过程，但估计没人愿意在同一个实验上反反复复花上几个月的时间，天天搞 troubleshooting，那么，我们就应该选择一些可信赖的产品。

QIAGEN 不仅是核酸纯化方面的老大哥，在定量 PCR 上也有一手。在上个月人禽流感频频出现的时候，QIAGEN 的销售人员曾颇为自豪地告诉小编，现在疾控中心都在用他们的定量 PCR 试剂盒检测禽流感病毒，俨然国家标准。既然这么有市场，QIAGEN 的产品究竟好在哪里？

## 简单快速

SYBR Green 的荧光定量 PCR 方法是很多人的青睐，一来价格比较实惠，二则不用设计探针。但是，SYBR Green 法绝非常规 PCR+SYBR Green 这么简单。这种方法饱受诟病的地方就是少了探针，专一性没那么好。其实只要引物设计得好，同样能得到高特异性的结果。引物设计在 SYBR Green 的荧光定量 PCR 方法中尤显重要。QIAGEN 就推出了专为 SYBR Green 荧光定量法而设计的 QuantiTect 引物对。它是经生物信息学验证的，专一性强，灵敏度高，不形成引物二聚体，是基因表达分析的不二选择，例如 RNAi 和芯片的结果验证。

更重要的是，QuantiTect 引物对和 QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit 配合使用，就完全不必担心实验没结果，可以天天高枕无忧了，因为 QIAGEN 100% 保证实验结果。你可能觉得奇怪，QuantiTect 引物对又不是全部经过实验室验证，为什么 QIAGEN 如此信心满满。据 QIAGEN 的技术

专家介绍，QuantiTect 引物对在欧美很畅销，凡是用过的都是 happy ending，从没有不成功的案例。此外，QIAGEN 的专家有着几十万条引物设计的丰富经验，在设计时考虑更周全，且经过严格的生物信息学验证，比自己设计引物当然更有优势。因此，QIAGEN 才敢拍着胸脯说 100% 保障。就算你万一不好彩碰上一对没结果的，QIAGEN 也会负责到底，免费提供相关试剂直到实验成功。

新手们看了上文，一定欢欣鼓舞。而荧光定量 PCR 的达人们则可能不以为然，他们觉得自己设计引物也很简单，而且经济实惠，何必购买现成引物？是的，但自行设计引物还需要花费不少时间去 Blast，更需要花费不少试剂和精力去验证合成的引物是否有效，结果是否专一。如果引物出了问题，不但要浪费了时间和精力，还要挨骂。既然如此，还不如花钱买个放心。况且 QuantiTect 引物对的价格 -650 元也能勉强接受，如果是 25 μl 反应体系，能用 400 次，每次的价格仅为 1.6 元，应该还能再打折。

[我对QuantiTect引物对感兴趣，想了解更多信息！](#)

成功的荧光定量 PCR 除了需要有好的引物，试剂也是关键。一步法的 QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit 就是 QuantiTect 引物对的好搭档。顾名

思义，这个试剂盒最大的特点是快，比市面上普遍用的master mix可提速到达 60%，最快约 45 分钟。你再也不用成为PCR仪霸，成天霸占着实验室的定量PCR仪了。速度大提升主要归功于缓冲液中的新组分Q-Bond。Q-Bond里的专利组分能提高单链Primer和Taq酶之间的亲和性，使得Taq酶-Primer复合物可以同时结合到模板上，这样退火和延伸就同时进行了。且优化的缓冲液还可帮助DNA解链并减少二级结构，使得变性和延伸步骤的时间更加缩短，因而QuantiFast每个循环的完整的退火延伸时间仅需要 30 秒（变性时间 10 秒）。另外，聚合酶也升级了。HotStarTaq Plus DNA聚合酶只需 5 分钟就能脱去修饰完全恢复Taq酶活性，比以前的HotStarTaq节省了 10 分钟。至于检测灵敏度，试剂盒里的Sensiscript和Omniscript反转录酶二合一应该不会让你失望，即使目标低至几个拷贝，也能准确检测。这两种反转录酶的特性，生物通之前在[热销反转录酶大盘点](#)详细介绍过。

美国杜兰国立灵长目研究中心（Tulane National Primate Research Center）的研究人员利用芯片比较了 2D 和 3D 培养模式下细胞的基因表达差异，并用QuantiTect 引物对和QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit来验证了影响G1/S细胞周期检测点的 4 个基因，发现其中 3 个基因的表达变化与芯片结果一致<sup>1</sup>。

### 灵敏可靠探针法

做荧光定量PCR，准确当然是第一要务。这也是很多人钟情于探针法的原因。QuantiTect Probe RT-PCR Kit就是上文提到的各CDC用于检测禽流感的试剂盒了。除了我国的CDC，还有很多研究人员也选择了它作为病毒检测工具。德国诊断病毒研究所（Institute of Diagnostic Virology）的科学家们就证明QIAGEN的QuantiTect Probe RT-PCR Kit是灵敏特异检测高致病性禽流感病毒H5N1（青海株）的有力工具<sup>2</sup>。他们认为，在此试剂盒及探针的协助下，能对HPAIV H5N1 进行快速分型，比常规的RT-PCR和SYBR Green法更好。该方法让

他们成功检测到 2006 年德国野生鸟类中H5N1 禽流感的爆发，现已成为德国国际兽疫局（OIE）和国家禽流感参考实验室的常规检测手段。另外，奥地利健康与食品安全局的研究人员还利用 QuantiTect Probe RT-PCR Kit检测样品中的牛病毒性腹泻病毒（BVDV）<sup>3</sup>。

研究人员之所以对这个试剂盒情有独钟，主要看中的就是它的高灵敏度。试剂盒中 HotStarTaq DNA 聚合酶和独特的缓冲液配方确保了它能对低拷贝的 RNA 目标进行准确定量。HotStarTaq DNA 聚合酶采用化学修饰，在室温时完全失活，这就避免了加样、反转录和第一次变性过程中错配产物或引物二聚体的延伸。只有在 95°C 孵育 15 分钟，才能完全脱去修饰恢复 Taq 酶的活性。这个过程也同时灭活了反转录酶，一石二鸟。

QuantiTect Probe RT-PCR Kit 中的缓冲液也不容小觑，QIAGEN 总是将秘密武器摆在最不起眼的缓冲液里。QuantiTect 缓冲体系中特别均衡了铵离子和钾离子的比例以提高引物模板退火条件的严谨性，令非特异引物结合模板的比例大大减少，进一步减少非特异扩增，提高反应的专一性。同时也使得 Taq 酶受镁离子的影响降低到可以忽略的地步，也就不需要优化镁离子浓度啦。因为钾离子可以结合模板和引物上的磷酸骨架中和负电荷，提高模板引物结合力；铵根离子可以强化特异性结合的模板和引物，削弱那些非特异结合到模板上的引物之间的结合力。

除了试剂本身的性能，试剂盒的便利易用也是检测人员非常看重的。不单是方便操作人员，在遇上高致病性的病毒传播时，速度那可就是生命啊。QuantiTect Probe RT-PCR Kit 也考虑到这一点，将试剂盒预装成 Master Mix 的形式，只需加入模板、引物和探针，即可使用。无需优化，同时也避免了可能发生的加样失误。

[点击索取QuantiTect Probe RT-PCR Kit的更多资料！](#)

## 多重检测

如果你想一次检测多个目标，可以尝试一下 QuantiTect multiplex PCR kit。同样无需优化，QIAGEN 已经帮你做了这部分的工作，对试剂和步骤进行了预先的优化，你能轻松完成最多 4 个目标的定量分析。此试剂盒同样以 Master Mix 的形式提供，包含了 HotStarTaq DNA 聚合酶、ROX 荧光染料、dNTP mix 及独特的缓冲液。这里还是要重点提一下缓冲液，QIAGEN 的缓冲液真是奥妙无穷啊。除了上文所述的钾离子和铵离子，这个还特别添加了 MP 因子，它能够增加模板上引物的局部浓度。与钾离子等其他阳离子共同作用，MP 因子还能稳定特异结合的引物，让 HotStarTaq DNA 聚合酶进行更有效的引物延伸。

瑞士诺华生物医药研究中心（NIBR）的研究人员比较了 ABI、Stratagene 和 Qiagen 的三种定量 Master Mix，希望能找到一种无需优化，性能接近单重分析的多重分析试剂。他们用三种 Master Mix 进行了 40 个 TaqMan 基因表达分析，并将结果与单重反应进行比较，发现只有 Qiagen 的 QuantiTect multiplex PCR kit 无需优化，就能在双重分析中产生可靠、重复性好的结果<sup>4</sup>。Wada 等则利用 QuantiTect multiplex PCR kit 首次对全血和血浆中的 EB 病毒、巨细胞病毒和人疱疹病毒 6 同时进行定量，他们认为多重定量分析与单重分析同样灵敏和特异，并且能开发成更经济的诊断方法<sup>5</sup>。多重定量 PCR 的方法同样能应用于食品检测中。瑞士 Canton Thurgau 食品管理局的研究人员就在 QuantiTect multiplex PCR kit 的基础上，开发出肉类产品的检测方法，能同时定量样品中的牛肉、猪肉、鸡肉和火鸡肉成分。他们认为这种方法很准确，能让食品管理和生产控制实验室有效控制合成的肉类产品<sup>6</sup>。

如果你已经厌倦了定量 PCR 中的反反复复优化，那不妨来试试 QIAGEN 的定量试剂盒，肯定不会让你失望。相反，如果你很享受这种反复优化

的过程，那么请忽略本文吧。（生物通：余亮 吴青）

## 参考文献：

1. Myers TA, Nickerson CA, Kaushal D, Otte CM, Höner zu Bentrup K, Rajee Ramamurthy, Nelman-Gonzalez M, Pierson DL, Philipp MT. Closing the phenotypic gap between transformed neuronal cell lines in culture and untransformed neurons. *J Neurosci Methods* 2008; 174: 31-41.
2. Hoffmann B, Harder T, Starick E, Depner K, Werner O, Beer M. Rapid and Highly Sensitive Pathotyping of Avian Influenza A H5N1 Virus by Using Real-Time Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2007; 45(2): 600-3.
3. Hornberg A, Fernández SR, Vogl C, Vilcek S, Matt M, Fink M, Köfer J, Schöpf K. Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. *Vet Microbiol*. 2008. [Epub ahead of print]
4. Hein AE, Bodendorf U. Real-time PCR: duplexing without optimization. *Anal Biochem*. 2007; 360(1): 41-6.
5. Wada K, Kubota N, Ito Y, Yagasaki H, Kato K, Yoshikawa T, Ono Y, Ando H, Fujimoto Y, Kiuchi T, Kojima S, Nishiyama Y, Kimura H. Simultaneous Quantification of Epstein-Barr Virus, Cytomegalovirus, and Human Herpesvirus 6 DNA in Samples from Transplant Recipients by Multiplex Real-Time PCR Assay. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(5): 1426-32.
6. Köppel R, Ruf J, Zimmerli F, Breitenmoser A. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, chicken and turkey. *Eur Food Res Technol*. 2008; 227(4): 1199-1203.

# 一次性生物反应器从 25 升--500 升的可扩展性：技术回顾

作者：LEIGH N. PIERCE & PAUL W. SHABRAM

Leigh N. Pierce ([lpierce@arizeke.com](mailto:lpierce@arizeke.com))是美国加利福尼亚州圣迭戈Arizeke制药公司细胞培养与开发部经理；Paul W. Shabram是负责工艺开发与制造的副总裁。

一次性使用的组件为生物制品的生产带来了很多优势。它们干净、买来即用、不需要灭菌，因此也就减少了如冲洗用水系统（WFI）和蒸汽发生器检修的需求。一次性的组件不能用于后续的操作，消除了工艺流程运行之间交叉污染的可能性。因为减少或摈弃了对不锈钢设备的需求，也可以避免了设备组装的长周期。系统的复杂度降低，因而所涉及的工程需求也同样减少。再也无需在位清洗（CIP）或在位灭菌（SIP）操作，以及相关的管道、阀门、控制器或容器的压力等级。此外，一次性组件的使用还降低了验证的复杂度。因为几乎没有可反复使用的组件，也就没有什么项目需要跟踪，也就节省了大量的灭菌、清洁验证研究。最后，通过消除了坚固的管道系统和固定发酵罐的限制，一次性组件还有利于实现更快速的改装以便用于新流程的运行。

一次性组件的使用可在劳力、设备、厂房设计以及验证方面实实在在地节省可观的费用。一次性的组件包括：生物处理袋、管、囊式过滤器、切向流舱、生物反应器、层析舱及混合系统 2。

## 一次性生物反应器的使用及放大

在某些应用中，灌流式细胞培养比分批和补料分批工艺更具优势。操作方式的选择是根据工艺规程所指定的综合需求。工艺的优化常常是评估哪种类型生产最有效的唯一途径。分批是最常用的以终点为依据的生产方式。在分批生产方式中，生物反

应器在接种、培养并达到指定的细胞密度和产品浓度的时即收集细胞上清。在补料分批工艺中，在生产流程的晚期进行补加原料以改进细胞活力，增加总的产率。在灌流方式中，原料溶液持续加入生物反应器中，用过的培养基也不断排出。以灌流方式来运行工艺能增加培养的持久性和细胞密度，反过来又增加了整体的生产率 3,4,9。

我们的目的蛋白，AZ-IL2B，是一个二聚体融合蛋白，由人 IL-2 连接人免疫球蛋白特异针对 pIgR 的 scFv 区域而组成 6。这个融合蛋白最适合灌流方式的生产。细胞产生的蛋白水平较低，而且 AZ-IL2B 很脆弱，特别是在 37° C。灌流生产所带来的生产容量增加，以及缩短了不稳定蛋白在反应器中停留的时间，都有助于实现更高的产量。

本文总结了 Wave Biotech, LLC 所生产的一次性生物反应器以灌流方式从 25 升 工作体积放大至 500 升 工作体积的生产放大结果。我们将比较 25 升、100 升和 500 升 工作体积的三个不同系统。对于每个生物反应器的运行都测定了以下参数，包括：细胞数量和活力、产生的蛋白数量、葡萄糖和乳酸水平。对每个系统间的这些参数进行了比较，结果显示三个不同体积的生物反应器是相当的。

## 材料与方法

### 生物反应器描述

每个生物反应器由一个灵活的、一次性的、预

先灭菌的塑料袋组成，这个塑料袋称为细胞袋 (Cellbag®)。在操作中，细胞袋放置在摇摆平台上，充入部分培养基 (图 1)。细胞袋的剩余体积则充入了由二氧化碳 (CO<sub>2</sub>) 和氧气 (O<sub>2</sub>) 组成的气体混合物。这些气体是通过预留在细胞袋上的无菌过滤入口来添加的。空气流提供了氧气，以及控制 pH 和去除二氧化碳所需的气体交换。废气则通过另一个无菌过滤器和背压控制阀排出。背压控制阀确保了细胞袋在任何空气流下总是充满的。阀门也防止了细胞袋的过度膨胀以及爆炸的可能。填充空气的顶部空间占据了细胞袋被填满时的一半体积。例如，一个充满时是 50 升总体积的细胞袋将包含 25 升 细胞悬液和 25 升 空气。空气在培养时持续地穿过顶部空间。流程中的气体，如 CO<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub>，以可控的方式与空气混合。液体混匀以及气体的物质传递是通过来回摇动细胞袋而实现的。这种摇动在气相和液相对分界面产生了波动。这些波动大大增加表面积，能提高气体转移。波浪运动还促进细胞和颗粒离开底部悬浮 (防止沉降) 以及大面积混匀，同时不会给细胞带来任何伤害。摇动可以通过设定摇摆角度和每分钟的摇动次数来控制。这些参数必须根据细胞袋中的使用体积来确定。细胞袋的温度可通过加热器来控制，此加热器位于设备的底盘，对细胞袋的底部进行加热。加热器是由同样位于单元的底盘的非插入式的温度传感器来调节。

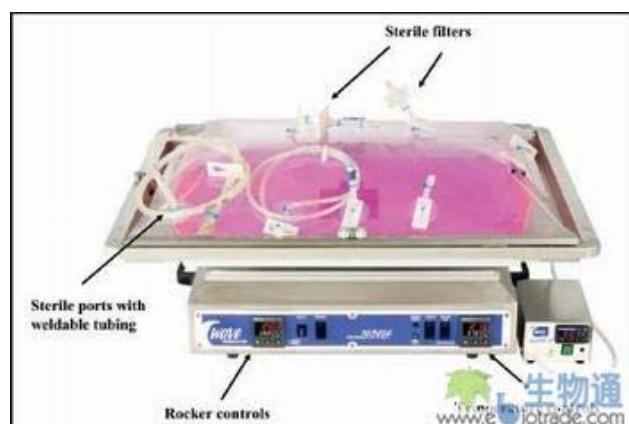


图 1. 波浪生物反应器。20/50EH 系统。

另外还设计了特别的接口，以供无菌加料及样

品的取出，而无需将生物反应器置于层流柜中。可用无菌的管道连接器将培养基、缓冲液和葡萄糖储存液加入系统中。使用的生物反应器分别为 20/50EH 系统、200 系统和 1000 系统 (Wave Biotech, LLC)。

### 细胞解冻与增殖

我们使用了 P6A2 细胞系，它是一种基于 CHO 的悬浮克隆，选择这个细胞株的原因在于其蛋白生产及生长特性俱佳。细胞在 120 毫升过滤的培养基中解冻，并放置在 150 毫升的转瓶内。细胞在转瓶内扩增，直到有足够的细胞来接种更大的转瓶，直至 6 升。一旦培养物充分扩增，即被转移到细胞袋中接种。转瓶内的细胞密度维持在约  $2 \times 10^5$  细胞/毫升。用于扩增的培养基是带有添加剂的无血清的 IS CHO-V (Irvine Scientific)。

我们使用了血球计数器来计算细胞数量，并利用台盼蓝染料排除分析来确定细胞活力。利用 Bioprofile® 300A (Nova Biomedical) 来分析细胞培养试剂。pH 值是通过细胞袋探头进行在线测定，或用 PHM220 pH 计 (Meter Lab) 来离线测定。氧气、二氧化碳、温度、摇速及摇摆角度是由 Wave Bioreactor 的控制器来测定并控制的。

### 细胞袋接种

细胞一般以  $1 \times 10^5$ - $4 \times 10^5$  细胞/毫升的密度接种在细胞袋生物反应器中。我们曾以更低的密度 (如  $6 \times 10^4$  细胞/毫升) 接种细胞，对细胞生长或生产也没有不良影响。一旦细胞在转瓶中充分扩增，就进行细胞袋生物反应器的接种。这可将转瓶的内容物直接转移到生物反应器内。在此时，生物反应器已经充满了二氧化碳和氧气，并包含温暖的培养基 (37° C)。细胞悬浮液由无菌接管连接到细胞袋，然后通过无菌的端口泵入生物反应器中。

### 生物反应器里的增殖

细胞袋中的细胞能达到比转瓶更高的密度。这最有

可能是由于细胞袋内溶氧的增加，以及控制pH的能力。在转瓶中，密度维持在  $2\times10^5-6\times10^5$  细胞/毫升，加入细胞袋后，细胞的密度增加至  $8\times10^5-1\times10^6$  细胞/毫升，直到在灌流开始后，P6A2 细胞克隆的密度可高达  $3\times10^7$  细胞/毫升。

### 灌流

一旦细胞达到  $1\times10^6-2\times10^6$  细胞/毫升，即可开始灌流。收集用过的培养基，同时以相同速率向生物反应器中加入新鲜的培养基、养分、调控pH的缓冲液。这是由生物反应器的以重量为基础的灌流控制器来直接控制的。在这个细胞密度下每天的体积交换约为总体积的 70-75%。只要细胞活力高于 50%，反应器就持续灌流。一旦细胞密度达到约  $2\times10^7$  细胞/毫升，控制乳酸及其他毒副产物的累积就变得更加困难，反过来导致pH的控制也非常困难。到此阶段，要移除部分细胞从而维持密度在  $1\times10^7-2\times10^7$  细胞/毫升。每天的体积交换提高至约 100%，包括培养基、缓冲液及其他添加剂。利用孔径为 0.2 微米的中空纤维微孔过滤柱来灌流细胞培养上清。

### 通过 ELISA 和 Western Blot 进行蛋白分析

AZ-IL2B 目标蛋白的定量是通过 ELISA 进行的。细胞培养上清是以一种专用于检测和定量 AZ-IL2B 嵌合体的方法来分析的。细胞培养上清中的 AZ-IL2B 通过与包被 pIgR 区域特异性抗体的微滴定板的结合而被捕获，捕获的 AZ-IL2B 通过生物素标记的山羊抗人 IL-2 多克隆抗体（R&D Systems, Inc.）来检测。链亲和素-HRP 结合物（BD Biosciences, Pharmingen）加入最后的检测步骤中。TMB 底物溶液加入反应中，与反应中存在的酶直接反映并产生颜色变化，这种颜色变化与样品中 AZ-IL2B 的量成正比。利用 AZ-IL2B 标准曲线和质量对照来测定细胞培养上清样品中 AZ-IL2B 的量。

根据标准的步骤来进行 western blot 分析 7。蛋白通过 8-16% 的 Tris-甘氨酸聚丙烯酰胺凝胶电泳进行大小分离，并转移到硝酸纤维素膜上。膜与一抗——兔抗人白介素-2 的多克隆抗体（Chemicon International, Inc.）及二抗——碱性磷酸酶结合的驴抗兔 IgG 抗体（Pierce Biotechnology, Inc.）一起孵育。

[点击了解一次性生物反应器的更多信息！](#)

### 结果

生物反应器运行 WVA、WVB 和 WVC 分别指的是 Wave Biotech® 的生物反应器 20/50EH 系统、200 系统和 1000 系统。

### 细胞计数与活力

图 2 显示了每种生物反应器的细胞生长和密度相当。生物反应器运行 WVB 没有达到 WVA 和 WVC 那么高的细胞密度，但是确实达到了  $1.2\times10^7$  细胞/毫升。这是由于在第 8 天加入了高浓度的葡萄糖后导致的葡萄糖峰（图 3）。

在运行生物反应器 WVA 后，我们发现现有的培养基配方和投料策略无法支持超过  $2\times10^7$  细胞/毫升以上的细胞密度。在细胞密度达到  $3\times10^7$  细胞/毫升后，WVA 的培养物的细胞活力和细胞生长显著下降，并无法恢复，这可能是由于缺乏营养物，以及毒性物质的积累，包括培养物中的高水平乳酸（图 3）<sup>5</sup>。氧气不是一个大问题，因为我们能调节向培养物中添加的氧气量。每个反应器运行中的溶氧维持在 73-100%。

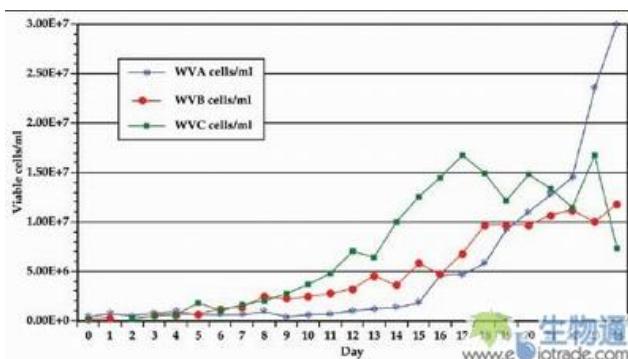


图 2. 每天活细胞密度的比较。生物反应器运行 WVA、WVB 和 WVC 的细胞密度比较。WVA 的灌流在第 13 天开始。WVB 和 WVC 的灌流在第 8 天开始。

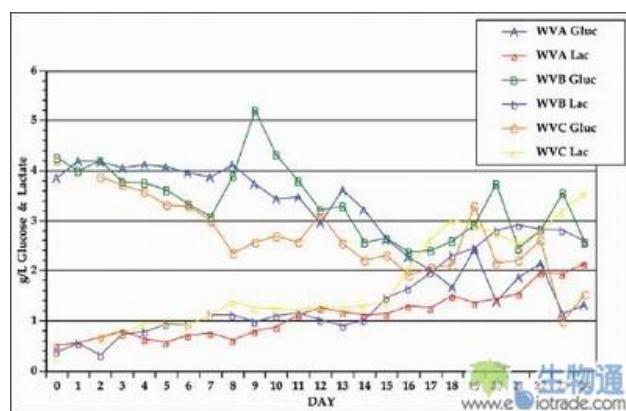


图 3. 每天葡萄糖和乳酸水平的化学分析。WVA、WVB 和 WVC 生物反应器运行的葡萄糖和乳酸水平。

对于随后的反应器，在细胞密度达到  $1.5 \times 10^7$  细胞/毫升或更高，乳酸水平达 2.2 克/升或更高时就将部分细胞除去。通过去除细胞和调整每天的灌流量，生物反应器运行被延长，收获了更多的蛋白。WVA 需要更长时间才到达灌流密度 ( $1.2 \times 10^6$  细胞/毫升)，这可能是由于第 6 天温度意外降至  $25^\circ\text{C}$ 。WVA 灌流持续了 13 天，平均产量为 12.5 毫克/升，而 WVB 灌流持续了 18 天，平均为 8.3 毫克/升，比 WVA 多了 5 天，收获蛋白也多了 6.7 克。WVC 灌流了 16 天，平均产量为 12.2 毫克/升，比 WVA 多了 3 天，收获蛋白也增加了 16.4 克。活力的增加及生物反应器运行的延长都能使产量更高。

### 蛋白产量

图 4 比较了每个运行的蛋白浓度。WVA 的蛋白浓度 (37.5 毫克/升) 比 WVB (15.46 毫克/升) 或 WVC (27.91 毫克/升) 更高，这是由于更高的细胞密度。每个反应器的整体蛋白产量如下：WVA 7.8 克，WVB 21.4 克，WVC 149.2 克。蛋白产量与细胞密度紧密关联。这个解释是合理的，因为存在更多的细胞，自然也有更多的细胞生产蛋白。WVB 并没有达到 WVA 或 WVC 那么高的蛋白浓

度。这与观察到的细胞密度更低是一致的。

在图 5a、5b 和 5c 中，每个反应器运行的细胞密度与蛋白浓度重叠。蛋白浓度的增加与细胞密度直接相关。在每个反应器运行终止时确定细胞活力的减少，以及蛋白产量的减少。

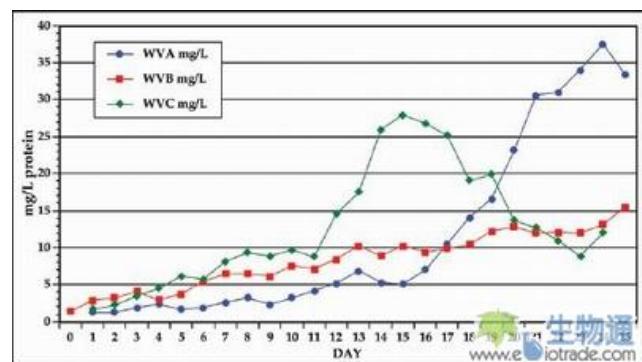
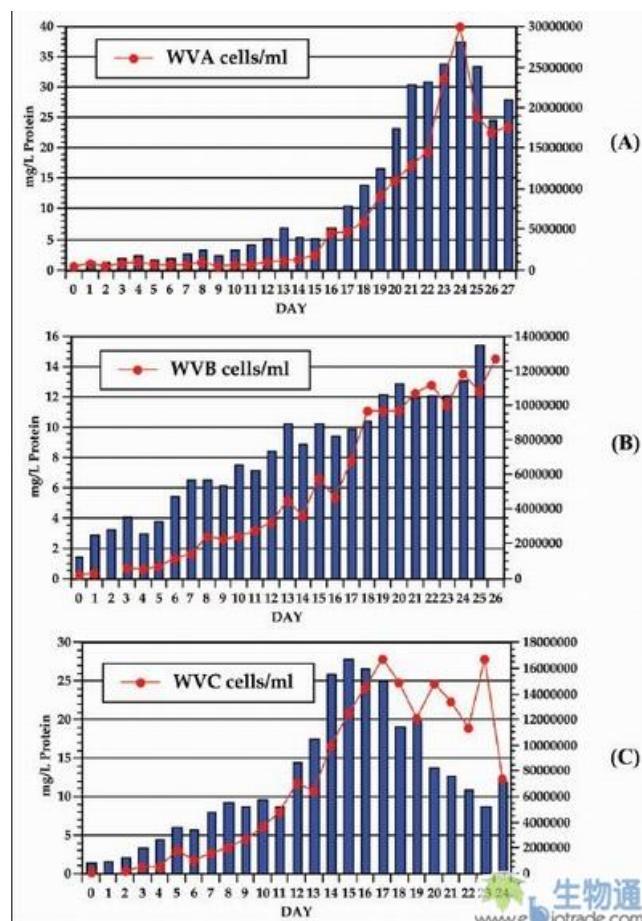


图 4. 每天的蛋白浓度。三个生物反应器运行的蛋白水平的比较，以毫克/升表示。蛋白水平通过 ELISA 测定。

图 5. 蛋白水平与活细胞密度。细胞密度与蛋白水平的



关联。  
A. 生物反应器运行 WVA。  
B. 生物反应器运行 WVB。  
C. 生物反应器运行 WVC。

## 葡萄糖和乳酸浓度

每个运行中的葡萄糖和乳酸浓度在图 3 中显示。每个运行的水平基本相似，除了第 9 天 WVB 的葡萄糖峰。由于每个反应器运行持续，细胞密度不断增加，葡萄糖被消耗，而乳酸增加。每个运行后期葡萄糖浓度的尖峰是由于当生物反应器葡萄糖水平降低至 2.0 克/升时，添加了 50% 的葡萄糖储存液而引起的。

## 蛋白分析

AZ-IL2B 作为一个二聚体蛋白，跑胶时分子量在 36-50 kDa。图 6(a)是 WVD 的 Western blot，WVD 反应器的工作体积为 10 升 (Wave Biotech 20/50EH 系统)。图 6(b)是 WVC 的 Western blot，它的工作体积为 500 升。图中通过 Western blot 对第 3 天到第 9 天进行了比较，显示小型反应器与大型反应器产生的蛋白之间并无区别。

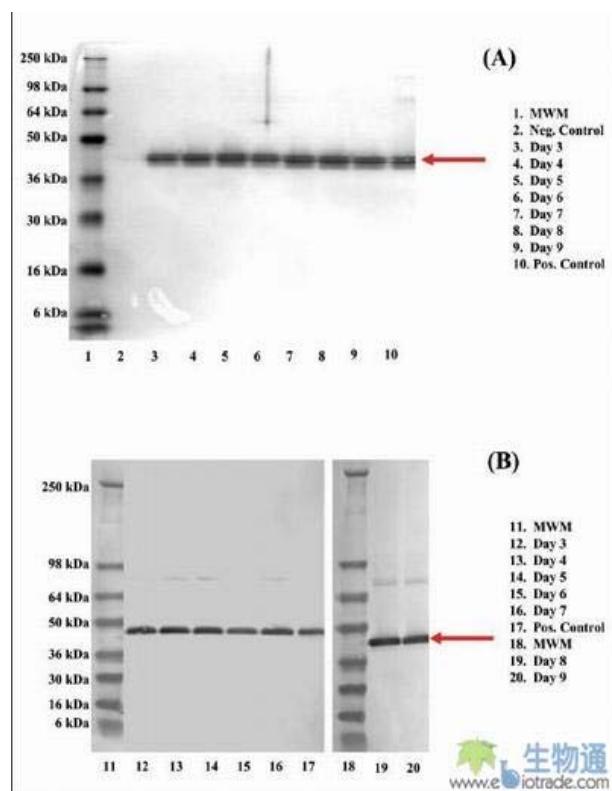


图 6. 两个生物反应器运行的 Western blot 分析。A. 生物反应器运行 WVD 的工作体积为 10 升。B. 生物反应器运行 WVC 的工作体积为 500 升。MWM=分子量标准。

## 讨论

Wave Biotech 的一次性生物反应器从 25 升放大到 500 升，对细胞生长或蛋白生产没有不良影响。其他影响活力和蛋白产量的因素包括高细胞密度、不合适的添加剂浓度，以及温度波动。不仅每个系统规格所产生的蛋白水平相似，而且产生的蛋白在 Western blot 分析和生物活性测试(数据未显示)时也一致。每个系统的细胞生长和倍增时间也是相当的。平均的蛋白浓度与细胞密度直接相关。每个生物反应器的葡萄糖消耗量与乳酸产量是类似的。随着每个生物反应器的运行，葡萄糖水平下降，而乳酸水平上升。

选择一次性的生物反应器实现了生物反应器运行之间的快速转换。生物反应器的安装、接种以及处理都很轻松，因此生物反应器运行的终止以及新反应器的接种能在同一天内完成。10 升、25 升和 100 升生物反应器能在标准的 8 小时工作日内取下并重新接种。500 升细胞袋的清空、填充以及培养基预热需要更长的时间，但生物反应器也能在 2 个 8 小时工作日内取下并重新接种。这个过程很简单：细胞袋清空、净化并抛弃。新的预灭菌细胞袋放置在平台上，并充入二氧化碳和氧气。添加培养基并加热，接着进行细胞接种。10 升和 25 升工作体积的生物反应器一般从转瓶中接种。100 升和 500 升的生物反应器则从小型的 25 升反应器中接种。

系统从 25 升到 500 升的放大不仅简单而且成比例，只需对体积变化做出调整。而培养基配方或添加剂则无需改变。细胞系在 25 升、100 升和 500 升反应体系中以相似的方式增殖和生产。

## 结论

成功的灌流工艺是在培养物健康与最佳产量之间达到平衡。适合最佳的细胞生长和对生长有利的因素可能对生产不利。例如，增加灌流速率以去

除毒性物质会将产物稀释到很低的浓度，为下游处理带来不便，更不用说与灌流增加相关的商品费用增加。对培养基成分、添加剂以及投料策略的调整可能会增加灌流的天数，而不稀释蛋白的浓度水平。有报道在生物反应器运行中采用两种不同的培养基配方来控制细胞代谢可降低细胞生长，同时维持其活力，从而延长收获产物的天数<sup>1</sup>。

从生物反应器中去除细胞也是一个选择，我们将它加入工艺中来控制细胞密度。这很难频繁处理，并增加了生物危害的废料。如果一种培养基配方能支持早期的快速细胞生长，然后在生产中控制细胞生长，那是最理想的。

一次性的生物反应器比反复使用的生物反应器在清洗、灭菌、验证、安装和运行之间的转换时间上更具优势。我们证明了 25 升、100 升和 500 升 工作体积的系统运行在细胞生长、蛋白产量、葡萄糖消耗以及乳酸生产上是相当的。

#### [点击了解一次性生物反应器的更多信息！](#)

#### 致谢

Wave Biotech, LLC 借出 System1000 生物反应器。

Becky Basken, Marie Gonzales, Malena Jimenez, Vivian Nguy, Michael Ports, Angelica Romero, Guillermo Viramontes, Xiaoying Wang, 和 Laurin White 对于细胞培养和生物反应器的支持。

Zemeda Ainekulu, Val Barra, Kim Cushing, Bill Edwards, 和 Marla Madison 对于分析的支持。

Eva Boco, Brian Danaher, Victoria Piamonte, 和 Joey Rattanasinh 对于实验室的支持。

#### 参考文献

##### 1. Altamirano C et al. Decoupling cell growth

and product formation in Chinese hamster ovary cells through metabolic control. *Biotech Bioeng* 2001;76:351–360.

2. Hodge G. Disposable components enable a new approach to biopharmaceutical manufacturing. *BioPharm Intl* 2004;17:38–49.

3. Konstantinov KB et al. Control and long-term perfusion Chinese hamster ovary cell culture by glucose auxostat. *Biotechnol Prog* 1996;12:100–109.

4. Ohashi R et al. Perfusion cell culture in disposable reactors. Paper presented at 17th European Society for Animal Cell Technology Meeting 2001 June 10–14; Tylösand, Sweden.

5. Ryll T et al. Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. *Biotech Bioeng* 1994;44:184–193.

6. Sacaan A et al. Transport of aerosolized IL-2 chimeric protein using polymeric immunoglobulin receptor in the lung. *Respiratory Drug Del IX* 2004;2:357–360.

7. Sambrook J et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.

8. Singh V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitations. *Cytotechnology* 1999; 30:149–158.

9. Yang JD et al. Achievement of high cell density and high antibody productivity by a controlled-fed perfusion bioreactor process. *Biotechnol Bioeng* 2000;69:74–82.

# 少量 RNA 也能进行高通量的 miRNA 表达图谱分析

比利时根特大学(Ghent University)医学遗传学中心 Vandesompele 和 Speleman 教授的实验室正致力于神经母细胞瘤的遗传基础研究。博士生 Pieter Mestdagh 正在研究 miRNA 在神经母细胞瘤发病机理中的作用。他和同事们最近开始使用美国应用生物系统公司的工具，对大量神经母细胞肿瘤样品中的几百个 miRNA 进行图谱分析[1]。

这项研究应用美国应用生物系统公司的 Megaplex™ RT 引物及预扩增步骤，通过 TaqMan® 实时定量 RT-PCR 分析同时检测 400 多个 miRNA 的表达。Megaplex RT 引物是新型的茎环结构的反转录引物混合库，能简化单个实验中数百个 miRNA 靶点的图谱分析。Megaplex PreAmp 引物可显著增加低表达 miRNA 的检测能力，可实现单细胞 (2 pg 总 RNA) 样品中的 miRNA 定量。

这项研究显示预扩增的方法增加了 miRNA 检测的灵敏度，低至 10 ng 的 RNA 也能成功进行图谱分析。在预扩增步骤中，相对表达水平保持不变，而可检测的 miRNA 的数量增加。此外，这种方法还能重现以前发表的 miRNA 差异表达结果，并由此得到验证[2, 3]。

这些结果强调了 Megaplex RT Primers 和 Megaplex PreAmp Primers 可成功应用于从少量起始材料进行可靠而高通量的 miRNA 表达图谱分析上。这些工具能简化神经母细胞瘤中 miRNA 所扮演角色的研究。

[点击索取更多 Megaplex 引物的应用文献！](#)

## 参考文献：

- Mestdagh P, Fey T, Bernard N, Guenther S, Chen C, Speleman F, Vandesompele J (2008) High throughput stem-loop RT-PCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA. Nucl Acids Res doi:10.1093/nar/gkn725.

- Schulte JH, Horn S, Otto T, Samans B, Heukamp LC, Eilers UC, Krause M,

Astrahantseff K, Klein-Hitpass L, Buettner R, Schramm A, Christiansen H, Eilers M, Eggert A, Berwanger B (2008). MYCN regulates oncogenic miRNAs in neuroblastoma. Int J Cancer 122(3):699-704.

3. Applied Biosystems Inc (2008) Your Data: Using miRNA Inhibitors to Study Neuroblastoma Tumor Pathogenesis. TechNotes 15(1):16-17.

## 神经母细胞瘤的遗传学

神经母细胞瘤是儿童颅外肿瘤的主要成因。MYCN 癌基因调节了一系列 miRNA，在一系列浸润性的神经母细胞肿瘤中扮演着重要角色。该实验室最近介绍了受 MYCN 调节的 miRNA 的致癌作用[3]。

## Megaplex™ 引物混合库

Megaplex RT Primers 是新型的茎环结构的反转录引物混合库，能简化单个实验中数百个 miRNA 靶点的图谱分析，减少反转录反应的数量，以及获得综合的 miRNA 表达谱所需的总 RNA 的量。

可选的 Megaplex PreAmp Primers 显著增加了低表达 miRNA 的检测能力，从而使少至 1 ng 的总 RNA 也能获得综合的 miRNA 表达图谱。

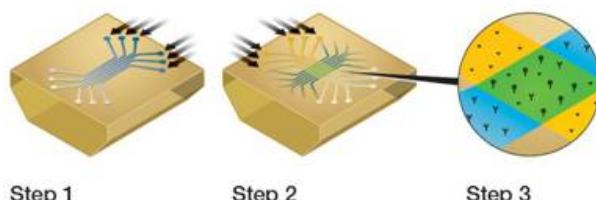
Megaplex Primer 混合库既可与单个 TaqMan® MicroRNA 分析共同使用，也能与 TaqMan MicroRNA Array 一起进行理想的图谱分析流程。更多信息，请访问 [mirna.appliedbiosystems.com](http://mirna.appliedbiosystems.com)。

# 新一代平行分析的SPR生物传感器

表面等离子体共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 技术研究生物分子以及和小分子药物之间的相互作用，具有非标记、实时检测和样品用量小的特点，因而在基础生命科学、医学研究和药物开发中应用越来越广泛，几乎成为研究生物分子相互作用必不可少的一种方法。

基于 SPR 技术的生物传感器，只有大约 20 年的历史。根据美国 Utah 大学 David Myszka 教授的相关文献，我们可以将 SPR 生物传感器的发展划分成 5 代，其中最先进的一代传感器具有高通量和平行分析的特点。美国 Bio-Rad 公司最新推出的一款 ProteOn XPR36 蛋白相互作用阵列系统，就是其中的优秀代表，本文将着重介绍它的技术特点以及给互做研究带来的提升。

与传统的 SPR 生物传感器一样，最新一代技术也是将一个分子固定在芯片上，叫做 **ligand**，另一个分子在溶液中流过 **ligand**，叫做 **analyte**。所不同的是两者的工作方式。以 Bio-Rad 公司的 ProteOn XPR36 系统为例，它有一套非常独特的流动池，称之为 MCM (Multi- Channel Module)。MCM 上有 6 条平行的凹槽，它先以垂直方向扣在芯片表面上，就形成了垂直方向上的 6 条平行通道，用以标记 **ligand**，如下图“Step 1”。随后 MCM 旋转 90°后再芯片表面结合，就形成 6 条与原先交叉的通道，可以同时流过 6 个不同浓度的 **analyte**，如下图“Step 2”。这样两组通道交叉形成 36 个互做位点，如下图“Step 3”所示，可以实现一次 **analyte** 注入就完成它和最多 6 个 **ligand** 结合的动力学常数 (Kon、Koff) 和解离平衡常数 (KD) 的测定，而无需反复再生 **ligand**。这种分析方式就称之为平行分析。而此前的 SPR 传感器芯片上不管有多少位点，都只能一次让一个浓度的 **analyte** 溶液流过芯片，叫做顺序分析。

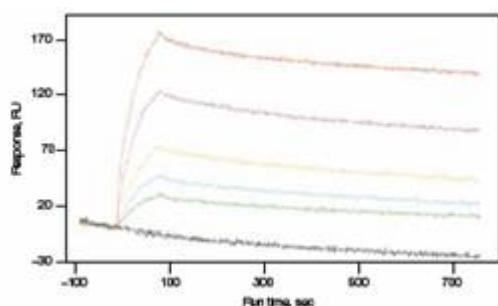


Step 1                    Step 2                    Step 3

很多人会直观地认为，平行分析极大提高了通量。这固然不错，但除了一些药厂进行药物筛选以外，对于大多数实验室而言，平行分析的最大好处是方便了实验条件的摸索，提高了数据质量。传统的 SPR 传感器采用顺序分析，一次注入一个浓度的 **analyte**，在两次注入之间，需要用酸、碱、高浓度盐等试剂把和 **ligand** 结合的 **analyte** 全部洗脱下来，叫做再生。再生条件的摸索经常是一件很困难的事，过于温和的试剂不能洗脱干净，强烈一些的试剂又很容易破坏 **ligand**，从而使最终动力学数据与实际发生偏离，有时偏离还非常明显，相差可达 100 倍以上。

平行分析的另外一大好处是基线联动，使基线更平稳，信号更准确。对于通过捕获方式标记 **ligand** 或者存在明显非特异性反应的实验来讲，基线是不平的，而且每次再生后的基线漂移水平都不一样，很难通过一个固定的校准参数进行校准。而 ProteOn 系统采用的平行分析方式，可以在流过样品的同时，留出一个通道走缓冲液，观察基线漂移的情况，然后通过软件处理实时校准基线，就能得到基线平稳的、不含非特异性反应的信号。下图就是一个抗体筛选的例子。芯片上首先标记抗小鼠

IgG, 用来捕获培养上清中的单抗, 然后流过抗原, 测量单抗和抗原的结合力。因为单抗和抗原在结合的时候, 单抗本身还在跟芯片上的 IgG 逐渐解离, 使基线不断降低, 而且降低的速率在不同的时间也不均匀; 所以只有通过基线联动, 才能知道什么时候基线在什么位置, 如下左图, 从而通过软件校准基线, 如下右图。如果用传统的 SPR 传感器反复再生, 就无法保证每次注入时的基线漂移完全一样, 自然也就得不到准确的结果。



总之, 新一代 SPR 生物传感器突破了传统的顺序分析模式, 提高了数据质量, 加快了分析速度,

而且还可以降低使用成本。它把广大科研工作者从条件摸索的繁琐劳动中解放出来, 从而得到了科研工作者的青睐。

#### 参考文献:

1 Rich RL and Myszka DG, Survey of the year 2004 commercial optical biosensor literature, J Mol Recognit 18, 431–478 (2005)

2 Rich RL and Myszka DG, Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis, Anal Biochem 361, 1–6 (2007)

3 Tsafrir B., et al, The ProteOn XPR36TM Array System—High Throughput Kinetic Binding Analysis of Biomolecular Interactions, Cel. Mol. Bioengineering, Vol. 1, No. 4, December 2008, 216–228

# 罗氏 xCELLigence 家族再添新成员

继去年推出革新性的 xCELLigence 实时细胞分析仪 (Real-Time Cell Analyzer, RTCA) SP 和 RTCA MP 之后，罗氏应用科学部再接再厉，推出了最新型号的 RTCA DP 仪器。xCELLigence 实时细胞分析仪大家应该都听说过，它是无需标记、可对细胞进行全程实时监测的新型细胞分析平台，并被评为“2008 年度生命科学十大创新产品”。新的 RTCA DP 仪器与其他两个的最大不同在于通量。DP 是 dual plate 的简称，适合于低通量的研究分析，最多能使用三块 16 孔板进行同时的实验。相比之下，RTCA SP (96 孔) 和 MP (6×96 孔) 仪器则更适合于中到高通量的分析。



尽管分析形式有所不同，但它们的原理和用途完全一致。新的 RTCA DP 仪器利用无标记、非侵入性的阻抗测量，提供了实时的细胞分析，并对平行进行短期（几小时）和长期（几天）分析的研究者来说具有高度的灵活性。RTCA DP 仪器的三块 16 孔板可由三个不同的用户来操作，每个 16 孔 E-Plate 独立进行监控和分析。由于它的体积小，RTCA DP 仪器以及 16 孔板可放置在标准的 CO<sub>2</sub> 培养箱中，轻松实现最优的细胞培养条件。

**RTCA DP 仪器的应用范围包括：**

化合物介导和细胞介导的细胞毒性

- 细胞粘附与细胞伸展
- 细胞增殖与细胞分化
- 受体介导的信号通路

- 病毒介导的细胞病变
- 细胞的长期质量控制
- 细胞侵入和迁移分析

xCELLigence RTCA 仪器无需外部标记，通过测量电阻来持续监控细胞反应。微电极整合在特殊设计的组织培养 E-Plate 的底部，来测量细胞状态的改变，并提供精确的定量信息，包括细胞数量、细胞粘附、细胞活力和细胞形态。对细胞响应度的持续阻抗监控让研究人员能准确地找出重要的实验时间点，来进行更详细的下游分析。阻抗测量与传统的终端分析相比，代表了细胞监控的革命。如果你想了解更多关于 RTCA 仪器的信息，请[点击](#)此处获取最新的资料。

## 关于罗氏

总部设在瑞士巴塞尔的罗氏，是一个世界领先的、注重科研的医药和诊断产品开发集团。作为世界上最大的生物技术公司，该集团为疾病的早期发现、预防、诊断和治疗提供了创新产品和服务，在改善人类健康和生活质量的各个方面都做出了大量贡献。罗氏公司是体外诊断的世界领先公司，是治疗癌症和器官移植所需药物的领先供应者，也是病毒学的市场领导者，并活跃在其他主要的治疗领域，如自身免疫性疾病，炎症，代谢及中枢神经系统疾病。

统。2008 年该集团药品部的销售总额为 360 亿瑞士法郎，诊断部的销售额为 97 亿瑞士法郎。罗氏公司与众多的合作伙伴签订了研发协议并结成战略联盟，包括在美国基因技术公司（Genentech, Inc.）和日本中外制药株式会社（Chugai

Pharmaceutical Co., Ltd.）拥有多数股权，2008 年研发投入接近 90 亿瑞士法郎。罗氏集团的全球员工总数约 8 万。如需了解更详细的信息，请访问 [www.roche.com](http://www.roche.com)。

(生物通 余亮)

# Invitrogen 推出第一款转染仪器，简化了原代和干细胞研究

近日，转染试剂的王牌，拥有众多转染明星产品如 Lipofectamine 的 Invitrogen（现属于生命科技公司）推出了第一款转染仪器—Neon™转染系统，这个台式的工具将让研究人员更好地了解细胞、基因和蛋白的功能。此仪器简化了 DNA、RNA 和蛋白导入多种哺乳动物细胞类型的过程，尤其适用于难转染的细胞，如原代细胞和干细胞。

Neon 转染系统是 Invitrogen 推出的第一款台式细胞转染工具，扩大了其行业领先的转染产品线。该仪器的特点是拥有独特的转染小室，能减少细胞死亡，以及可编程的软件和最少的试剂用量，让研究人员能灵活处理多个不同的细胞类型。它利用电穿孔技术，能将核酸、蛋白和 siRNA 有效导入所有哺乳动物细胞类型。

传统的电穿孔仪器饱受诟病的原因是对细胞的毒性大，细胞存活率低。因此，Neon 转染系统采用了专利的生物兼容的移液器吸头小室，来取代传统的比色皿之类的电穿孔小室。这种设计能更好地维持生理状态，实现高的细胞存活率。

Neon转染系统利用了单个转染试剂盒（Neon Kit）。此试剂盒能与各种哺乳动物细胞类型兼容，包括原代细胞和干细胞，也就避免了针对每种细胞类型来优化缓冲液的需要。且Neon系统采用了开放、透明的步骤，能够轻松方便地优化。系统中预设了一个 24 孔的优化步骤，或者你也可以自设程序，并存储在Neon的数据库中，最多能存 50 个。现在，许多常用细胞类型的优化步骤都可在 Invitrogen 的网站 ([www.invitrogen.com/neon](http://www.invitrogen.com/neon)) 上下载，让你轻松实现转染效率最大化。

Neon 转染系统包含了三个部分：Neon Device（下图左），一个小方块，样子有点像多士炉，前面有一块触摸屏，可以设定程序；Neon Pipette Station（下图右），电穿孔时那个特殊的移液器放置其中，并保护你不受电击；Neon Kit，包含 Neon Tip、Neon Tube 和缓冲液。



转染过程也是简单到不能再简单了。首先用 Neon 移液器吸头吸取细胞和质粒混合物，然后放入移液器的支架中，选定合适的程序，按“开始”。结束之后将转染过的细胞放入培养器皿中就行了。整个过程只需 3 步，转染就发生在吸头内。



## Neon 转染系统的优点：

**高效：** 用户友好的 Neon Device 台式设计，能轻松适应你的组织培养方式，并轻松高效地转染多种细胞，包括原代细胞和干细胞，多数细胞类型的转染效率高于 75%

**灵活：** 轻松转染  $2 \times 10^4$  到  $6 \times 10^6$  个细胞，样品体积为 10 ul 或 100 ul

**简单：** 通用的缓冲液系统，适用所有细胞类型

**易用：** 简单的触摸屏界面，能轻松设定电穿孔参数的程序

**多功能：** 开放的系统，转染参数能轻松调整

**安全：** 仪器中内置的安全特征确保用户安全

[点击索取Neon转染系统的更多资料！](#)

(生物通 余亮)

# 进行优质的科学研究：鉴定细胞系的遗传特征

## 前言

能够重复出科研领域中已经发表的结果，对于确认、证实科学发现是十分重要的。如果数据无法重复，那么是否有人会追随这个工作就十分值得怀疑了。很多生物医药的研究都采用培养细胞来进行，这些细胞可能是从细胞库（如美国 ATCC, American Type Culture Collection）得来，也可能是受赠于其它研究人员。据估计，15-20%的时间里，实验中所使用的细胞已经不是原来的细胞系，或者与其它细胞系发生了交叉污染(1-3)。ATCC，以及其它细胞库（Coriell Institute for Medical Research, European Collection of Cell Cultures (ECACC), Deutsche Sammlung von Mikrorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Japanese Collection of Research Resources）都收到过提交的“错误”的细胞系，尽管提交者把细胞系提交到上述机构之前，还经过了检验。然而，最终证实这些细胞系还是鉴别错了(4,5)。此外，干细胞也可能被污染，作为干细胞赖以增殖的哺育细胞层，小鼠细胞很容易污染到干细胞中。显然，细胞系遭到污染、特征鉴别错误，将会极大地威胁着基于这些细胞而发表的论文的质量和研究发现的正确性。为此，很多细胞库现在都要对提交来的细胞系进行鉴定，并对细胞系之间的交叉污染进行监测。

[索要更多技术资料>>>](#)



插图注解：

直到他们发现所使用的 HeLa 细胞系表达了 Y 染色体标记物之前，一切都进展得非常顺利。

## 关于此问题的历史观点

HeLa 细胞系建立于 1952 年，是第一个人源的癌细胞系。在随后的 15 年里，陆续建立了多种不同组织的人源细胞系(6)。1968 年，研究人员发现许多培养细胞的特征都与原始细胞株的特征不

符。这是第一个证据，证明某种细胞培养方法可能会导致细胞出现不可预测的变化，或细胞特征被错误地辨识。无菌技术的进一步发展降低了交叉污染的可能性，几乎没有检测方法能够证明哪种细胞已经遭受了上述影响。然而，从那时起，操作快速而又成本低廉的标准化方法应运而生。虽然这些改进方法应该消除许多细胞间的交叉污染，但是，交叉污染仍然是一个突出问题。ATCC 和其它细胞库现在正对他们所提供的所有细胞系进行交叉污染监控和遗传特征鉴定，但是对于绝大多数研究人员，在他们的研究中并不执行这些看似过分谨慎的鉴定程序。加利福尼亚大学伯克利分校的 Gertrude Buehring 和其同事在 2004 年对接近 500 位生物学家进行了一项调查，发现事实上仅有不到一半的研究人员按部就班地对他们使用的细胞系使用任何一项常规技术进行验证，如短串联重复序列（STR）分析的 DNA 指纹图谱 (6)。如果所有的

细胞系都不经检验和证明，则细胞系被错误地辨识将是一个非常严重的问题。

### 进行细胞系鉴定可节约时间和金钱

除了会导致数据前后不一致或令人质疑外，交叉污染还会浪费时间和金钱。 Mordechai Liscovitch 是一位以色列研究人员，他说他和其实验室的研究人员在两株乳腺癌细胞系（MCF-7 和 MCF-7/AdrR，现在被重命名为 MCI/ADR-RES）上花了 3 年时间，他们开始认为这两株细胞系是具有相关性的，但后来才发现这两种细胞系实际上并不相关。尽管早在 1998 年，有些科学家就怀疑人们错误地判断了这两个细胞系的“身份”，但是直到最近才证实了这一论断(4,7)。开始，人们都认为 MCI/ADR-RES 来源于乳腺癌细胞系 MCF-7，而事实并不是这样—它来源于卵巢癌细胞系 OVCAR-8 (7)。这三个细胞系都属于 NCI-60 类，后者是药物筛选所常规使用的细胞系(4)。

Liscovitch 实验室就曾放弃了论文的发表，就是因为使用了被错误辨识的细胞系而导致了错误的结论。然而，还有未知数量的研究工作已经发表，而这些结论是基于被错误辨识的细胞系而得出的。南加利福尼亚大学和洛杉矶儿童医院儿科临床研究所的 Charles Patrick Reynolds 建立了儿童癌细胞系，并使用已有的多个细胞系进行了抗癌药物研究。据他估计，已发表的细胞生物学文献中，高达 35-40% 的论文都需要撤回，因为这些文献中都含有无效数据。这一估计引起了美国天主教大学 Roland Nardone 的注意，他号召广大研究机构进行细胞系的鉴定工作 — 美国国立卫生研究院（NIH）和美国癌症协会这样的主要机构应该将细胞系鉴定作为给予基金资助的条件，同时在主要杂志中发表的基于细胞培养的相关研究也需要进行细胞系的鉴定。他还要求对技术人员和科学家进行关于预防和检查细胞系交叉污染的教育，包括对这些提议方针的相关专业团体认可机构、主办会议和

研讨会的教育，以便于推进这一标准被广泛接受。Nardone 博士认为这些改变对科学研究至关重要，这一信念甚至使他参与创建了“全球细胞系鉴定认知月”[2008 年 5 月] — 由一些专业科学家发起的活动，针对细胞系被广泛地错误辨识和交叉污染所造成的混乱和浪费。

少数机构已经认识到了交叉污染的问题，如 ATCC (7) 和 FDA，这些机构要求对用于制药领域的实验中所使用的材料 — 诸如细胞系 — 应该进行“身份鉴定”和纯度测试 (8)。Nature 杂志最近也要求报告新的人类胚胎干细胞系的文章提供 STR 指纹图谱数据，但没有对其它细胞系进行要求(4)。虽然一些杂志和基金组织认识到了细胞系被错误辨识的问题，但是他们还不确定如何能够最好地解决这些问题。应该在什么时候要求研究人员确认细胞系身份，是在审核前还是审核后？用于证实作者的细胞系身份的参照资源从哪里来？

细胞系被错误辨识不仅会浪费时间和金钱、导致结果前后不一或不可重复、或文献被退回，还可能对人类健康产生潜在的威胁。药物、疫苗和其它生物药物都是以实验室的研究发现为基础而产生的，往往都是跟细胞培养相关。基于误导性的或虚假的数据而制造的药物产品将会导致该药品全面投产的延迟，同时还推迟了针对多种疾病的有效治疗手段的推出。研发治疗手段的时间越长，遭受疾病困扰的人数就越多。

### 基于 STR 的方法可以轻松、快速地鉴定细胞身份

所有这些问题都可以通过价格低廉的方法来解决，这一方法目前被用于鉴定细胞系的标准程序，但是这一鉴定过程必须要进行。 Roderick MacLeod 及其同事在 DSMZ 发现约有 90% 的科学家在提交新细胞系时，忽视或拒绝细胞库的要求，他们抵触建立细胞系 DNA 指纹图谱以备将来

鉴定细胞系使用(5,7)。研究人员需要在他们从事研究的早期就接受教育，知道如何检测种系内和种系间的交叉污染，并了解为什么这样做会如此重要。

在细胞培养中可以使用许多方法对交叉污染进行鉴定，如同功酶分析、染色体组分型、人淋巴细胞抗原（HLA）分型和扩增片段长度多态性（AFLP）的特征分析。但是，比较好的方法是 STR 图谱法，此方法是在以 DNA 为基础的法医鉴定领域成功建立起来的。在 ATCC，STR 分析使用的是多重 PCR（Promega PowerPlex®1.2 系统），可以同时扩增 8 个 STR 位点加 1 个性别决定位点 Amelogenin（10, 11）。每个被分析的人源细胞系都有其独特的 DNA 重复模式，因此通过与基础图谱进行比对，即可对每一批新细胞系的身份进行确证。STR 方法防止了 ATCC 将其 6 个“错误”细胞系进一步传播出去 — 因为经过 STR 分型后，发现原本来自女性的细胞系中存在着 Y 染色体特异的扩增产物。此研究团体希望 STR 图谱技术能够作为全球范围的检测并消除细胞系污染的参考技术。

### Cell ID™系统能够为您提供基于 STR 的细胞系身份认证

Promega 公司是 STR 分型系统的主要供应商，在法医和亲子鉴定方面具有领先优势，其 PowerPlex®1.2 STR 分析系统（PowerPlex® 1.2 STR analysis system）已经成为细胞培养机构进行细胞系鉴定的“金标准”。为了满足使用更简便地进行细胞系鉴定的需要，我们研发了 Cell ID™ 系统（Cell ID™ System a,b），并对此系统进行了改进，提供了能够成功而简便地鉴定、鉴别人源细胞系和检测种系内细胞系交叉污染的试剂。

Cell ID™ 系统使用 STR 分型技术，同时扩增特异性强、具有高度多态性的 10 个位点(9 个 STR 位点和性别识别位点 Amelogenin; 包括 D21S11, TH01, TPOX, vWA, Amelogenin, CSF1PO,

D16S539, D7S820, D13S317 和 D5S818)，三色荧光标记。这些位点组合所提供的遗传图谱的随机匹配概率为 29.2 亿分之一。该系统包括一个热启动的 Taq DNA 聚合酶，可以方便地在室温条件下组装反应组分。扩增后，采用单次注射毛细管电泳对样本进行分析，同时结合使用所提供的标准品，用以帮助确定不同位点的等位基因的大小（图 2）。使用等位基因分析软件确定遗传图谱。

即使大多数科研人员所在的实验室没有进行 STR 分型的设备，他们仍可通过具备仪器（毛细管电泳）、软件和经验的研究所中心实验室和专业服务公司来完成 STR 分型。文献中，通常建议研究人员在培养细胞的较早阶段（细胞培养第一周）来鉴定细胞系的身份。细胞在被冻存前应再一次进行鉴定；对于活跃生长的细胞，每两个月应鉴定一次；文献发表前也应对细胞系身份进行鉴定。如果一个实验室使用不止一种细胞系，则应在实验最开始时，就要对所有的细胞系进行鉴定，以便排除交叉污染(8)。

### 总结

由于细胞培养体系在生物药物的研究和技术发展中非常重要，适当的细胞系鉴定过程即成为每个研究人员的最大兴趣点。然而，交叉污染的问题仍然存在。随着世界范围内实验室使用新细胞系的数量增多和频率增加，在质量控制（如：细胞系鉴定）的基本原则上产生了巨大的差别。从已经发表的、使用“错误”的细胞系而导致可疑性结果的研究论文，到用于临床的干细胞系和其它细胞系，交叉污染影响到了科学的研究的每个领域—从实验台到临床。如果在细胞培养的处理和操作中不进行重大变革，那么交叉污染将会成为一个更大、更严重的问题。

### 参考文献

1. Drexler, H.G., Dirks, W.G. and MacLeod,

- R.A.F. (1999) Leukemia 13, 1601–7.
2. Drexler, H. G. et al. (2001) Blood 98, 3495–6.
  3. Cabrera, C.M. et al. (2006) Cytotechnology 51, 45–50.
  4. Chatterjee, R. (2007) Science 315, 928–31.
  5. MacLeod, R.A.F. et al. (1999) Int. J. Cancer 83, 555–63.
  6. Buehring, G.C., Eby, E.A. and Eby, M.J. (2004) In Vitro Cell. Dev. Biol. 40, 211–5.
  7. Liscovitch, M. and Ravid, D. (2007) Cancer Lett. 245, 350–2.
  8. FDA. General Requirements for Laboratory Controls. 21 CFR211.160 and 21 CFR 610.18.
  9. ATCC Connection Newsletter (2007) 27, 2–4.
  10. ATCC Connection Newsletter (2000) 21, 1–2.
  11. Masters, J.R. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 8012–7.

#### 操作手册

Cell ID™ System Technical Manual #TM074  
[www.promega.com/tbs/tm074/tm074.html](http://www.promega.com/tbs/tm074/tm074.html)

#### 订购信息

产品	包装规格	目录号
Cell ID™ System	50 次反应	G9500
StemElite™ ID System	50 次反应	G9530

仅供研究使用。不可用于诊断。

(a) 本产品经 USB 公司授权许可进行售卖，可以在法医和遗传鉴定领域应用，不能应用于与移植或其它医疗操作相关的组织分型。如需获取更多许可信息，请联系 USB 公司，26111 Miles Road, Cleveland, OH 44128。

(b) 本产品经 Stratagene 公司授权许可进行售卖，可以在法医和遗传鉴定领域应用，不能应用于与移植或其它医疗操作相关的组织分型。如需获取更多许可信息，请联系 Stratagene 公司，11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037。

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。

Maxwell 和 PowerPlex 为 Promega 公司的注册商标。

Cell ID 是 Promega 公司商标。

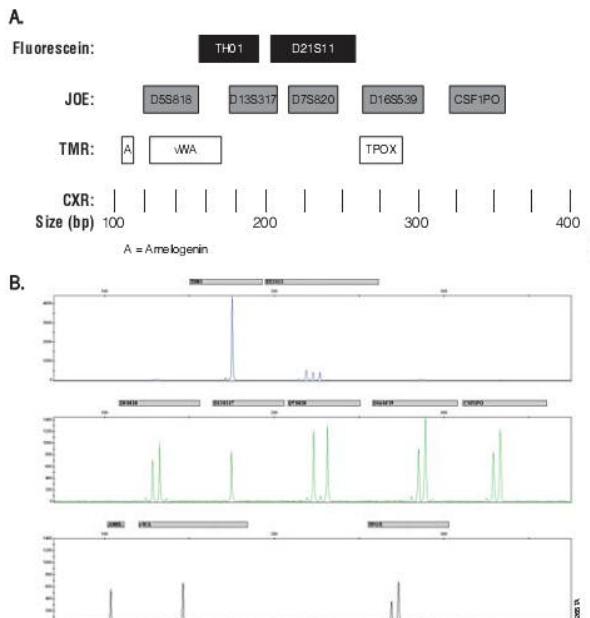


图 1 . A: Cell ID™ 系统的等位基因大小范围。使用 Cell ID™ 系统扩增 STR 片段，使用不同的染料进行标记，通过毛细管电泳进行片段大小分离。每个样本中都有一个标准品以确定被检样本的大小。JOE 标记的位点为灰色。Fluorescein 标记的位点为白色。CXR 标记的内标 600 片段为黑色。

B: K562 细胞系 DNA 图谱。使用 Cell ID<sup>TM</sup>系统扩增并进行毛细管电泳检测后，样本数据显示为一系列染料标记的等位基因峰。

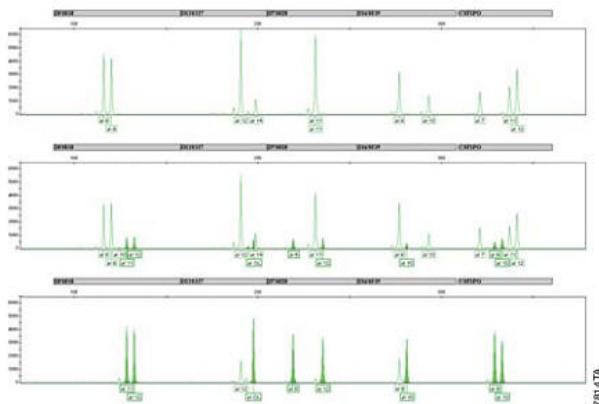


图 2. Cell ID<sup>TM</sup>系统鉴定细胞系污染。 A: HEK293 细胞系的 STR 图谱。B: 污染有 29%HeLa 细胞系的 HEK293 细胞系的 STR 图谱。C: HeLa 细胞系的 STR 图谱。使用 Maxwell® 16Cell LEV DNA 纯化试剂盒纯化 DNA，细胞数为 104 个，并使用 Cell ID<sup>TM</sup>系统进行扩增。扩增产物通过毛细管电泳进行分析。为了简化问题，仅显示了 JOE 标记的等位基因图谱。

# 轻松实现高通量、经济的基因分型

TaqMan® OpenArray™基因分型系统为科学家们提供了基于 TaqMan 技术的简单、快速、经济且高通量的基因分型方法。TaqMan OpenArray 基因分型系统以基于 PCR 的方式对成千上万个样品中的几十个甚至几百个靶点进行 SNP 分析。系统的简单流程能让一个人在一天内可进行 9 万多个基因分型分析，而用户操作极少，也无需自动化机器人的协助。需要对大量样本进行分析的高通量研究，如人类世系连锁基因分型和鲑鱼群基因分型，均可受益于 TaqMan OpenArray 基因分型系统。

## 人类世系连锁基因分型

大规模的群体研究可能涉及几万个样品，因此需要有一种可靠、高样品通量的技术来确保对候选 SNP 进行有效的基因分型。加利福尼亚大学戴维斯分校医学院生物化学和医学教授，Michael F. Seldin 博士，正在利用 TaqMan OpenArray 基因分型系统进行大规模的群体研究，旨在评估种族世系在复杂的遗传病中的作用。

与美国应用生物系统公司合作，Seldin 博士开发了一组 TaqMan SNP 基因分型分析，用于确定美国普通人群中美洲大陆原住民和混合人口的比例。在过去的一年中，作为该系统的早期试用者，Seldin 博士已经实现了更经济的基因分型项目，包括在大量的生物样品中进行多组 -64、96 或 128-SNP 分析。Seldin 博士的研究小组目前正在对 20000 个 DNA 样品进行基因分型，以便了解包括非洲裔美国人和西班牙裔美国人在内的混合群体中世系与各种表型之间的联系。这些样品来自女性健康倡议的参与者。女性健康倡议是一项长期的全国性健康研究，致力于更年期女性的心脏病、乳腺及结肠直肠癌、骨折的预防策略。根据 Seldin 博士的说法，“TaqMan OpenArray 基因分型系统为那些包含大量样品和几十个至几百个 SNP 的研究项目提供了省钱省力的基因分型方法。该平台提高了我们研究的速度、简易性和效率。它实现了在

高样品通量的前提下，获得与传统的 TaqMan SNP 基因分型分析质量相当的基因分型结果。”

## 鲑鱼群体基因分型

TaqMan OpenArray 基因分型系统形式灵活，让研究人员可在每个实验中对不同样品进行不同的 SNP 基因分型的研究。Willie Davidson 博士是加拿大不列颠哥伦比亚省西蒙弗雷泽大学（Simon Fraser University）分子生物学和生物化学系的教授，他正领导一组研究人员用 TaqMan SNP 基因分型分析进行大西洋鲑鱼的基因分型，用于选择性育种、种群动态和保护生物学的研究。

作为 TaqMan OpenArray 基因分型系统的早期试用者，Davidson 博士计划用该系统进行与数量性状位点的鉴定和遗传连锁图谱开发相关的 SNP 分析，对于更好地了解不同鲑鱼群遗传变异来说，这两者都是很重要资源。“TaqMan OpenArray 基因分型系统的易用性，以及可配置不同样品的不同 SNP 的灵活性，让它成为鲑鱼育种研究的理想工具。”Davidson 博士表示，“此外，TaqMan SNP 基因分型分析非常有效，试剂可靠，结果的重复性也很棒。”

## 简化的流程

TaqMan OpenArray 基因分型流程中的步骤如下：

## 第一步：选择分析

访问 [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com) 选择 TaqMan 基因分型分析的组合。TaqMan OpenArray 基因分型平板交货时每个通孔中已包含指定的冻干形式的分析试剂。

## 第二步：加入样品和 Master Mix

在 TaqMan OpenArray 384 孔样品平板中加入 DNA 样品，和 TaqMan OpenArray Master Mix 混合。

## 第三步：样品上样

用 OpenArray 自动上样仪将样品混合物上样到 TaqMan OpenArray 基因分型平板中。

## 第四步：插入箱中并密封

将 TaqMan OpenArray 基因分型平板插入 OpenArray 封箱工作站中，装满浸液，并用封箱胶水密封。将箱子放入 OpenArray 密封工作站中，完成密封。

## 第五步：循环、照相、分析数据

在指定的热循环仪上进行循环，用 OpenArray NT 成像仪成像，并分析数据。

## 可靠的高通量基因分型

TaqMan OpenArray 基因分型系统为中等密度的基因分型提供了最高的样品通量。一天可运行 32 块 TaqMan OpenArray 基因分型平板，提供 98304 个基因分型结果。无需自动化机器人的协助，该系统能在数万个样品中进行多达 256 个 SNP 筛选。图 1 显示了 TaqMan OpenArray 基因分型系统与 Applied Biosystems 7900HT 快速定量 PCR 系统的聚类坐标图是相似的。

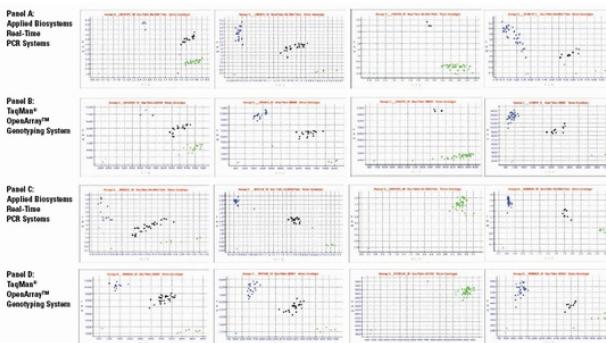


图 1. TaqMan® OpenArray™ 基因分型系统与美国应用生物系统公司实时定量 PCR 系统之间相似的聚类坐标图。将 Applied Biosystems 7900HT 快速定量 PCR 系统 (A、C 组) 和 TaqMan OpenArray 基因分型系统 (B、D 组) 产生的等位基因鉴定聚类图进行了配对比较。作为整体性能评估的一部分，用卡瑞尔医疗研究所的 46 个基因组 DNA 样品进行了 896 个 TaqMan SNP 基因分型分析。研究中还包括了两个无模板对照 (NTC)。在实验中选取了 8 个具有代表性的分析，它们的聚类坐标图显示了减去 NTC 信号比例后相似的 Rn (Normalized Reporter)，聚类分离和检出率。比较研究产生的基因型有着 99.7% 的相似性。

## 完整的基因分析方案

TaqMan OpenArray 基因分型系统是高通量基因分型应用中价格合理的全系统方案。这种独特的技术组合减少了试剂用量，并大大降低了每个基因分型的费用。

[我对OpenArray基因分型系统感兴趣，想了解更多信息！](#)

## 附：什么是 OpenArray™ 技术？

OpenArray 纳升流体技术让研究人员能在一块 TaqMan OpenArray 基因分型平板上操作 3000 多个数据点。在一块显微镜载玻片大小的平板上有 3072 个通孔（图 2）。在目前这一代的产品中，每个孔的直径是 300 微米，深度也为 300 微米。平板以 48 个子阵，每个子阵 64 通孔的形式排列

(图 3)。平板表面经过专利处理，是疏水的，而内部是亲水且生物兼容的。液体通过表面张力留于平板中。

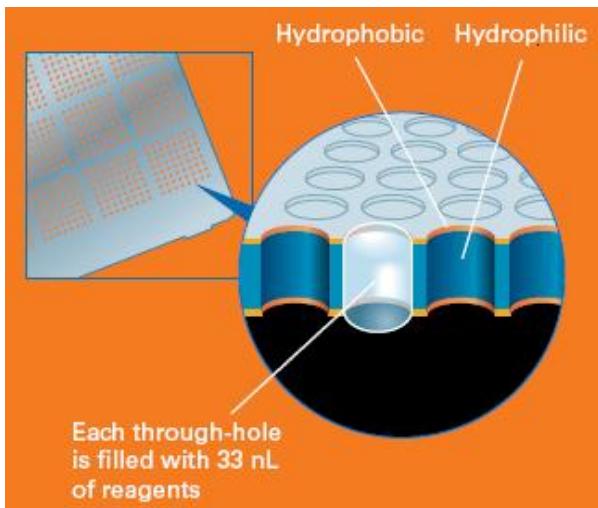


图 2. OpenArray™ 剖面图。OpenArray 基因分型平板上几个通孔的横截面。每个通孔覆盖了疏

水和亲水的包被。试剂通过毛细管作用保留在通孔内。BioTrove, Inc.供图

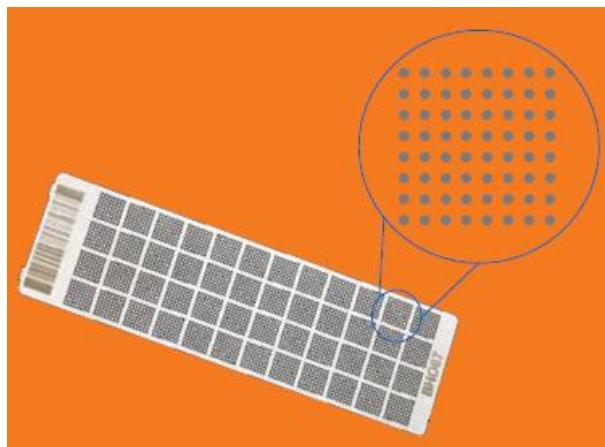


图 3. TaqMan OpenArray 基因分型平板。每块 TaqMan OpenArray 基因分型平板包含 48 个子阵，每个 64 通孔。BioTrove, Inc.供图

# 细菌人工染色体（BAC）测序流程的优化

Eliane Escher 是瑞士苏黎世大学分子生物学研究所测序中心的管理者。这个研究小组每月常规进行 1500 到 2000 个测序反应，以质粒、PCR 产物和细菌人工染色体（BAC）DNA 作为循环测序的模板。Escher 女士利用 BigDye® Terminator 循环测序试剂盒、GeneAmp® 9700 PCR 系统和 3730 DNA 测序仪，以一种改进的方法\*对 BAC DNA 进行测序。此外，Escher 女士的研究小组发现利用 BigDye® XTerminator™ 纯化试剂盒进行反应纯化，能增加信号强度，并从整体上改善序列数据的读取质量，产生与质粒模板相当的结果。

## 关于细菌人工染色体（BAC）

一般说来，细菌人工染色体（BAC）DNA 的测序比质粒或 PCR 产物的测序要困难得多。它片段长（一般大于 100 Kb），会形成二级结构，可能由于二级结构区域后的 DNA 链延伸不够充分而导致测序异常。BAC 测序需要毫克级高纯度的 DNA，从而获得充足信号，以利于准确的碱基信号检出和最大读长。

## 细菌人工染色体（BAC）测序流程的优化

Escher 女士所在测序中心的工作量很大，他们需要一种省时又经济的测序方法来对细菌人工染色体（BAC）样品进行常规分析。从过夜培养的细菌培养物中纯化细菌人工染色体（BAC）DNA，然后用 BigDye Terminator v3.1 循环测序试剂盒在 GeneAmp 9700 PCR 系统上进行测序。Escher 女士最初使用的步骤是针对质粒和 PCR 产物测序而开发的热循环条件。然而，这种方法导致 BAC DNA 序列质量不高，以及大量未掺入的染料终止子（“染料团”）。

为了解决这个问题，Escher 女士修改了\*热循环条件，延长最初的变性步骤，并增加了测序循环的数量。她还在先采用了 BigDye XTerminator 纯化试剂盒进行循环测序反应产物的纯化，然后才用

美国应用生物系统公司的 3730 DNA 测序仪进行毛细管电泳分析。同时平行分析质粒模板作为对照。11 个独立样品的分析数据显示与初始步骤相比，结果有了很大改善。

## 更高质量的 BAC 序列数据

Escher 女士发现，用 BigDye Terminator v3.1 循环测序试剂盒及改良的步骤，使 BAC DNA 的测序质量达到甚至超过质粒测序中所得到的结果。在测序流程中加入 BigDye XTerminator 纯化试剂盒，能极大改善大型细菌人工染色体 DNA 样品测序所面临的挑战。与 Sephadex 纯化相比，BigDye XTerminator 纯化试剂盒纯化的 BAC 序列数据的信号强度显著得到改善。根据 Escher 女士的实验结果，在 BAC 测序中使用 BigDye XTerminator 纯化试剂盒可稳定地去除染料污染，从而消除了干扰序列分析的假象。关于 Escher 女士使用的操作步骤，请参考美国应用生物系统公司的应用指南“从细菌人工染色体（BAC）DNA 获取高质量的测序数据的流 程”，P/N 107AP05-01 ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com))。

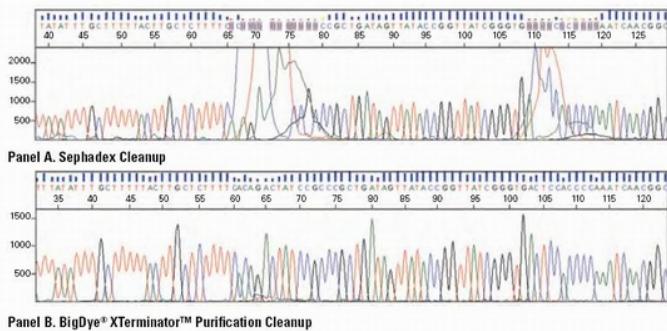


图 1. 改进\*的热循环条件和 BigDye XTerminator 纯化试剂盒纯化让细菌人工染色体 BAC DNA 测序生成了高质量的序列数据。BAC DNA 用 BigDye Terminator v3.1 循环测序试剂盒的改进步骤进行测序。Sephadex (A 组) 或 BigDye XTerminator 纯化试剂盒 (B 组) 分别用于测序反应的纯化。蓝色的条代表相应碱基的 QV\*\* 值。(数据来自瑞士苏黎世大学分子生物学研究所 E Escher)。\*\*质量数值 (QV) 是确定测序数据质量的既定参数。QV>20，一般认为可以接受，说明该碱基被误读的可能性不高于 1%。

\*这个操作步骤是对美国应用生物系统公司推荐的 BigDye Terminator v3.1 循环测序试剂盒操作步骤的一种修改。本文展示的结果来自提供结果的实验室，在您的实验设置中可能需要经过优化以获得最好的结果。请注意美

国应用生物系统公司仅在按照推荐步骤、试剂配方、试剂盒储存条件进行操作时为 BigDye Terminator 循环测序试剂盒的性能提供支持。

### 利用 BigDye XTerminator 纯化试剂盒进行有效的纯化

BigDye XTerminator 纯化试剂盒用一种简单的纯化方法对 DNA 测序反应进行纯化，并增加了纯化后样品的信号强度。纯化反应在 40 分钟内完成，只需要 10 分钟的手工操作。



染料污染 Game Over !

BigDye® XTerminator™纯化试剂盒

# 通用电气与 Tecan 合作进行药物开发

近日，通用电气医疗集团（GE Healthcare）与 Tecan 两大公司宣布合作，来提高工艺开发的质量和效率。两家公司的合作将集中在蛋白纯化条件的高通量筛选上，计划联合使用 Tecan 的 Freedom EVO 自动化工作站以及 GE Healthcare 的 PreDictor 96 孔板，板中预填充了 BioProcess 层析填料。

Tecan 自动化平台的通量、准确性和可靠性确保了 GE Healthcare 的 96 孔工艺开发技术的可靠结果，实现了高效的小型化平行筛选，同时，交叉污染的可能性降至最低。两项技术的联合缩短了工艺开发的时间，同时拓展了更大的实验空间，让研究人员更好地了解工艺。



PreDictor plates 为一次性使用的 96 孔滤板，预填充适量的 BioProcess 层析介质。第一代板填充的为 Capto<sup>TM</sup> 或 MabSelect<sup>TM</sup> 介质。PreDictor 板可采用手动或自动的工作流程，对层析条件进行平行筛选，从而支持高通量的工艺开发（high-throughput process development, HTPD）。PreDictor 板可快速高效地评估样品与介质的结合/清洗/洗脱条件的相关参数，同时还可以评估介质基准。使用 PreDictor 板获得的数据与层

析柱所得的数据具有很好的相关性，使得 PreDictor 板成为工艺操作条件初筛的极佳的工具。



PreDictor 的详细步骤现在已嵌入 Tecan Freedom EVO 工作站的控制软件 EVOWare 中，节省了安装所需的时间。其他附件，包括滤纸架、振荡器等，确保了高效、可靠的板处理。

Tecan 蛋白科学的市场部经理 Eric Willimann 表示：“通过此次合作，我们为工艺开发创造了一个强大的解决方案。GE 的试剂与 Tecan 的硬件联手，为我们的客户提供了快速有效的筛选工艺参数的方法，而手工操作时间最少。”

GE Healthcare 的市场部经理 Catharina Hemström Nilsson 则表示：“自动化的平行筛选让工艺开发者能快速获得对工艺的更全面了解。同时对于工艺的优化也有了更多有根据的判断，显著缩短了到临床的时间。这些数据是宝贵的，能帮助定义可靠的制造工艺。”

（生物通 余亮）

# 2009 年度神经生物学奖评选征集中

Eppendorf & Science 神经生物学奖是 Eppendorf 公司联合《Science》杂志，为鼓励全球青年科学家（35 岁以下）对大脑及神经系统功能方面进行研究而设立的神经生物学奖项，奖励金额为 25000 美元。这一国际性的奖项建立于 2002 年，至今已颁给了 7 位杰出的年轻神经生物学家。

参加这个奖项评选的青年科学家需满足几个条件：年龄不超过 35 岁；研究领域必须属于神经生物学；参与者必须进行或指导了此项研究；研究必须是最近三年内完成的。

2009 年度神经生物学奖的申请截止日期是：  
**2009 年 6 月 15 日。**

如果你的年龄在 35 岁以下，研究领域又刚好是神经生物学，那么不妨一试。动动笔，就有机会拿到 17 万元人民币，何乐而不为？申请过程肯定比国内的基金简单。一旦获奖，你的工作将发表在《Science》杂志上，你还将被邀请去 Eppendorf 公司的总部-德国汉堡。

你需要提交下列材料：

一篇描述研究的短文，注意要紧跟目前神经生物学领域的办法和进展。文章须用英文撰写，不超过 1000 字。

一封一页纸的推荐信，可以来自导师或其他资深的同事。

一份个人简历，包括：引用的论文、曾经获得的奖项、相关的职业经历、发表的文章及申请表(需要下载)

如果你有意向参加此活动，请登陆 [www.eppendorf.com/prize2009](http://www.eppendorf.com/prize2009)，了解更加详细的信息，及下载申请表。

获奖者简介

目前已获得这一奖项的 7 名神经学家，有一名是旅美的中国科学家。来自德克萨斯州大学西南医学中心的徐平西博士因昆虫外激素 (pheromone) 识别的分子生物学机理研究方面的杰出成就，获得了 2005 年度神经生物学奖。2008 年度的奖项是颁发给美国得克萨斯州贝勒

( Baylor ) 医学院神经科学系的 Mauro Costa-Mattioli 博士。Mauro Costa-Mattioli 博士揭示了在长久记忆形成过程中翻译调控的重要性，这项研究将最终协助开发大脑失调(包括衰老和神经退行性疾病中的记忆功能损伤)的新疗法。

## 历届获奖者

### 2008 Prize Winner

Mauro Costa-Mattioli, Ph.D.

Baylor College of Medicine, USA

### 2007 Prize Winner

Rachel Wilson, Ph.D.

Harvard Medical School, USA

### 2006 Prize Winner

Doris Tsao Ph.D.

University of Bremen, Germany

### 2005 Prize Winner

Pingxi Xu Ph.D.

University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, USA.

### 2004 Prize Winner

Miriam B. Goodman Ph.D.

Stanford University, California, USA.

### 2003 Prize Winner

Michael Ehlers Ph.D.

Duke University, North Carolina, USA.

### 2002 Prize Winner

Anjen Chenn Ph.D.

Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, USA.

# 各大生物芯片公司最新动向

2009 年对于芯片制造商来说是繁忙的一年，各家芯片厂商都在推出新的芯片产品和平台，同寻找与自己技术相补充的公司和技术，同时致力于推动新的用于分子诊断的芯片产品。

占有表达谱研究以及基因分型研究较大市场的芯片厂家，如 Affymetrix、 Illumina、 Agilent 以及 Roche NimbleGen 都已承诺在今年推出新产品或进行潜在的收购，巩固芯片制造的基础设施，并铺设建立一个进入诊断的渠道。

## Affymetrix

例如，Affymetrix 今年计划推出一些新的芯片产品。

在 2008 年 10 月，Affymetrix 推出了 GeneTitan 系统，这是一种用于提供芯片杂交和数据分析的全自动仪器，同时推出的还有一种新的芯片格式“peg array”，这种芯片可以使客户同时在一次实验中在微量板上进行 24、48 或 96 个阵列的实验。

Affymetrix 的第一个 GeneTitan 产品是针对 HT 3'IVT Express Assay 的全基因组表达谱研究，Affy 声称该产品的优点是精简的 protocol 和能够使用较少量的样品。目前，Affymetrix 推出的 peg array 版本的产品有人、大鼠、小鼠等。

在其 2008 年第三季度 10 月份的盈利报告中，Affymetrix 声称它计划在今年年中推出基于 GeneTitan 系统的 peg array 用于基因分型研究，在新的基因分型 peg array 上的内容，将不是基于目前的 Affymetrix 产品，而是推出新的产品。

Affymetrix 首席执行官 Kevin King 说：“这些新的产品将为药物研究提供比目前更高标准的产品，尤其是这些产品同时会降低样品的单位成本，而且将提供样品和样品间的重复性”。

Kevin King 补充说：“我们希望这些技术的应用能从容进行，但是在短期内，临床实验部分中药物研究的部分的增将不能抵消医药研究部分下滑的部分。”

虽然 Affy 推出了新的针对基因分型的产品，而且它也具备了“集成 USB”接口，真材实料，Panomics，这是 Affy 在 2008 花费了 1.73 亿美元收购的第三家公司。上个月，Affymetrix 首席财务官 John Batty 暗示 Affymetrix 在 2009 年将有 3.15 亿美元的现金和等价物来收购更多的公司，从而为其提供更广泛的基因组研究工具。

Batty 说：“在这一点上，我们有大量的基石，我们必须执行我们的计划。而且我们将立即获得流动资金，我们可能在明年获得更多的机会。

特别的是，Batty 说 Affy 可能会收购小型私人公司，这样能够使得整合大型的运营良好的母公司得益。“这是非常清楚的，对于小型公司来说资金变得非常困难，能够被公司选择收购，例如 Affymetrix，能被这个具有全球品牌和销售通路的公司，将十分引人注目”Batty 说。

Affy 也期待 FDA 能够清楚一些基于其平台的检测。一些 Affy 的合作者使用使用“Affymetrix 授权”的计划，例如 Almac 诊断公司，Skyline Ventures，以及 Ipsogen 已经宣布计划今年进行 510(K) 认证。

## Illumina

Affy 的竞争对手 Illumina 正在为扩展其在分子诊断市场而奠定基础。

在 2008 年 11 月，Illumina 宣称它希望它的一个试剂盒在 2009 年年中能够通过 FDA 的认证。

虽然 Illumina 计划通过美国监管机构认证的第一个试剂盒是基于数字化微珠技术的，但是它们希望他们的 CLIA 实验室可以提供基于测序和微阵列的服务。

谈及 Illumina 的诊断计划，Greg Heath，Illumina 高级副总裁兼总经理说，肿瘤研究是分子诊断中一个美好的增长点，他同时还谈及了在即将开展的卵巢癌及胃癌研究。

公司首席执行官 Jay Flatley 还透露，这种基于微阵列的服务，Illumina 希望能通过实验室为它的合作者 23andMe 公司和 Decode 公司提供自样品处理开始的服务。Flatley 说当这种由其合作者提供的直接面对客户的遗传服务目前是一个“富人和名人”的市场，而且被 Illumina 视为未来收入的来源。

“我们相信未来将有巩固的个人诊断市场：Flatley 说，”到那一天，诊断和个人市场将进行区分，它们将成为独立的市场。

除了诊断和个人诊断市场，Illumina 最近讨论了作为农业生物学研究工具的机会，Illumina 将为农业研究客户推出更多的芯片产品。而迄今为止 Illumina 已经可提供牛、马、狗的 SNP 芯片。

Illumina 同时表示，将增加两个款新的用于农业研究的成品芯片，同时 Illumina 将雇佣更多农业领域的专家来满足客户的需求。

### Agilent

2008 年，Agilent 就开始准备推出高密度的新一代芯片平台。它们将推出格式为 1 百万的微阵列芯片，这对于目前格式为 244K 的微阵列芯片来说是一个飞跃。

在 2008 年 6 月，Agilent 推出了新版本的基因芯片扫描仪，该扫描仪的分辨率达到 2um。这种扫描仪可用于扫描 Agilent 目前的 65-micon 的芯片产品，它也可用于格式为 1 百万的 300micron 的产品，并且可配合原先的 48 张芯片扫描传输装置。

Agilent 新推出扫描仪的同时也配合了生物信息学的升级。2008 年 9 月，Agilent 推出了 GeneSpring GX10.0 版本，这是 Agilent 的新一代生物信息学研究平台。GeneSpring GX10.0 将提供系统层次的数据解释、pathway 分析。该产品可帮助用户进行基因表达谱、小 RNA、可变剪切、

定量 PCR 实验的数据分析。

Agilent 基因组高级营销主任 Chris Grimley 表示，Agilent 将继续发展其基因表达的组合产品，基于福尔马林固定样品、石蜡包埋样品的 protocol 将于近期上市。

### Roche NimbleGen

Roche NimbleGen 在 2008 年为了使若干不同的应用可使用了它的新的 HD2 平台而进行了升级。在每个微阵列上包含 2.1 million 个探针（其先前产品每个微阵列上包含 385K 个探针）

Nimblegen（2007 年被罗氏以 27.2 亿美元收购）在 2008 年 11 月推出了针对染色质免疫沉淀研究的 HD2 芯片和服务。这套芯片包括了人 Deluxe 启动子芯片，这款产品为研究者提供了所有已知和覆盖范围在 10K 的可变起始位置启动子，同时也覆盖所有注释的 CpG 岛和小 RNA 启动子。Nimblegen 也同时推出了人、大鼠、小鼠和其它物种的全基因组 tilling 芯片。

在随后的一个月，Nimblegen 紧接着推出了人 CGH 12x135K 全基因组 Tilling 芯片 2.0 版本，这款芯片被用于研究 DNA 拷贝数变化，同时 Nimblegen 还会推出 2.5 版本的扫描仪，软件包括 protocol 用于提高日后芯片的分析能力。

这周 Nimblegen 的发言人 Kary Staples 说 Nimblegen 还计划将其 DNA 甲基化 Tilling 芯片升级到 2.1M。

该公司还计划推出人 exome 产品用于配合 HD2 序列捕获产品。该款产品针对几乎所有人类蛋白编码外显子进行人类基因组变异研究。

2009 年，Nimblegen 的序列捕获系列产品将包括产品的优化、简化针对下一代测序序列捕获样品的处理，获得更高的通量，同时这些改进将进一步降低每个样本的成本并加速样品的处理能力，同时大大促进下一代测序研究。

同时，2009 年 Nimblegen 还计划推出新的 MS 200 芯片扫描仪，该扫描仪可扫描标准的 1x3 英寸，格式为 385K 以及 2.1 millio 的芯片，分辨率为 2 或者 5 micron。