

EBIOTECH

生物通技术周刊

第60期

2009年4月30日

全文下载

〔技术前沿〕

干细胞解禁，你准备好了吗？

膜蛋白抽提新技术

转染原来如此简单！

〔新品速递〕

Invitrogen推出新一代T细胞培养基

BioTek推出微孔板数据分析新软件

赛默飞世尔推出三款高内涵筛选试剂盒

GE推出一套双向电泳的新产品

〔应用指南〕

应用高分辨率LC-MSn分析复杂样品

KingFisher磁珠纯化系统在多肽和蛋白质生物标记物（Biomarker）研究中的应用

〔行业动态〕

Sephadex填料是如何诞生的？

华大基因再添12台新一代测序仪

干细胞解禁，你准备好了吗？

2009年3月9日，美国总统奥巴马在白宫签署行政命令，宣布解除对用联邦政府资金支持胚胎干细胞研究的限制。而在1月，加州一家小型生物技术公司——杰龙公司得到了美国FDA的批准，将开始首次使用人胚胎干细胞(hESC)来治疗因脊柱受损而导致截瘫患者的临床试验。历时8年之久，干细胞终于解禁了。美国学者为之欢欣鼓舞，而中国学者也不禁快马加鞭，恐为人后。

然而，hESC的研究仍面临巨大的挑战，其中最关键的是干细胞的培养试剂。地球人都知道，干细胞的培养可不像普通的永生化细胞那么简单。它们具有多能性，必须维持其未分化的状态。而且干细胞很挑剔，长得过密，或培养条件略有不同，这些家伙就会开始分化。因此，干细胞需要你每天精心的呵护。

起初，hESC是在滋养层细胞（通常是小鼠胚胎成纤维细胞，MEF）上生长，且培养基中添加了胎牛血清和生长因子。这样的条件带来了两个问题。第一，生长培养基的组成是一个黑盒子，你不清楚里面有什么，而且血清和MEF的批次间差异永远无法避免。其次，这些成分不明、动物来源成分的使用将会为未来监管带来问题，阻碍了胚胎干细胞的临床应用。因此，开发出成分完全确定、无动物来源成分的培养基是相当必要的。

现在市场上涌现出许多hESC特异的培养基，包括：Invitrogen的STEMPRO hESC SFM（无血清、无滋养层的培养基）、Millipore的HEScGRO、STEMCELL的mTeSR 1等等。许多是完全确定的，不需要血清，有些还能实现无滋养层的生长。mTeSR 1还能支持iPS细胞的生长，据STEMCELL公司多能干细胞的高级产品经理Clive Glover介绍，WiCell的iPS细胞库就完全使用了mTeSR 1来维持。

在血清方面，国内有很多干细胞研究人员使用

了Invitrogen的KnockOut血清替代物（大家通常简称为KnockOut SR）来替代胎牛血清。KnockOut SR是维持未分化hESC同时保留细胞多能性的金标准试剂，目前全球80%的hESC实验室正在使用它。今年初，Invitrogen在KnockOut SR的基础上，新推出了第一款无异源成分的血清替代物—KnockOut SR XenoFree。其中所有的动物蛋白都被去除，更适合于临床的研究。

光是培养基和血清还不够，加利福尼亚大学hESC核心设施的主管Karl Willert除了从Invitrogen采购Knockout SR和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)外，还向培养基中添加了人血清白蛋白（购自拜耳）。他觉得FGF的费用是培养hESC的主要消耗，“你必须天天喂养细胞，每天加入新鲜的FGF”。

此外，滋养层细胞在hESC培养中也扮演了双重角色。它们同时提供了生长底物和生长因子。后者我们能用外源的生长因子来替代。至于前者，一些研究人员也开始用基底膜替代物来取代，如BD的Matrigel或Invitrogen的Geltrex。Invitrogen同时提供无外源的CELLstart底物。

在培养的过程中，我们既要评估hESC培养物的多能性，又要随时注意有无分化的倾向。BD公司就提供了一个荧光标记抗体试剂盒，针对TRA-1-81、SSEA-1和SSEA。前两个是多能性的标志物，后者是分化的标志物。利用这个试剂盒，

研究人员既能评估 hESC 培养物的多能性程度, 还能在细胞分选仪的帮助下富集多能(或分化)的细胞。Millipore 的 FlowCelect hESC 表面标志物鉴定试剂盒也根据 HESCA1、SSEA1 和 SSEA4 的表达, 进行类似的分析。

此外, 研究人员也可以通过 RT-PCR 来评估干细胞的特性, 如 Invitrogen 的 StemPro EZChek 多重 PCR 试剂盒, 包含了测定 Oct4(多能标志物)、AFP、ACTC1 和 Sox1(分别为内胚层、中胚层和外胚层的标志物) 及 GAPDH(内参) 表达的多重分析。

如果你想让 hESC 分化, 可以试试 STEMCELL 的 AggreWell 板。AggreWell 板试图用一种方法来统一 hESC 分化, 将细胞簇从培养皿上手工刮下来, 并进行悬浮培养。AggreWell 板从本质上说就是一种修饰的 24 孔板, 孔中包含了 1200 个微小的倒置微孔, 能捕获单个 hESC 或 hiPSC, 并将它们培养成单个拟胚体。hESC 和 iPSC 的分化都需要拟胚体的形成。Glover 称这个过程不比传统方法更快, 但能控制拟胚体的大小, 减少分化的可变性。

在干细胞的功能分析方面, 赛默飞世尔科技应该能满足你的需求。它通过 Dharmacon 和 Open Biosystems 两大产品线, 提供了 siRNA、shRNA、cDNA、ORF、microRNA 抑制剂和 microRNA 模拟物的文库, 来提高或降低细胞中几乎所有基因或调节性 RNA 的表达。此外, 赛默飞世尔的 Pierce 和 Abgene 产品线也提供了通过抗体和 PCR 检测分化标志物的方法。

赛默飞世尔科技基因组集团的研发主管 Devin Leake 通过一个间充质干细胞(MSC)的例子来解释这些工具的用途。他说道: “通过使用 miRNA 抑制剂或模拟物, 我们发现了 3 个 microRNA 能诱导 MSC 分化成骨细胞。利用 microRNA 来控制干细胞分化, 让研究人员能更好地研究分化过程及骨细胞生物学。”

为了将核酸导入干细胞, 研究人员有几个选择。他们能利用慢病毒载体(详见[生物通 2008 技术点评: 慢病毒载体](#))、化学的转染试剂(比如鼎鼎大名的 Lipofectamine 或 Fugene 系列)或电穿孔(例如 BioRad 的电穿孔仪或 amaxa 的 Nucleofector)。另外, Invitrogen 最近也刚推出一款电穿孔仪-Neon System, 适于干细胞的转染, 使用也很简单。赛默飞世尔的 Accell siRNA 则更牛, 无需借助任何仪器或试剂, 自行进入细胞。

最后谈到 hESC 的冻存, 研究人员也有一些选择, 包括 STEMCELL 的 mFreSR 冻存培养基。mFreSR 是成分完全确定, 不需要添加血清的培养基, 对于无血清培养干细胞的用户来说是一个好选择。“如果你想完全排除不确定的成分, 那么最好不要在血清中冻存。”Glover 解释道。

尽管越来越多的新产品在涌现, hESC 的研究人员仍在为许多关键的问题而头疼, 包括标准的培养条件、分化成目标细胞类型的步骤及报告细胞系。要解决这些问题, 干细胞研究人员任重而道远。

(生物通 余亮)

膜蛋白抽提新技术

简介

哺乳动物跨膜蛋白承担各种生物功能，在疾病的发生、发展过程中扮演重要角色。已知的许多针对人类疾病研发的药物的靶标是膜蛋白或膜关联蛋白（综述：Landry 2007），而成功的药物设计很大程度上依赖于人们对膜蛋白的结构与功能数据的正确把握。膜蛋白的蛋白质组学分析是被大家看好的辨识新的药物靶标和/或疾病的生物学标记的好方法，并已得到广泛应用。然而，多年的蛋白质组学研究支撑技术的显著进步，也没能解决膜蛋白的抽提和增溶困难的问题。同时，膜蛋白样品的制备并不是孤立的，还需要充分考虑到与下游的胶分析及质谱分析等应用配套，这使膜蛋白样本制备成为一个难以逾越的挑战。虽然膜蛋白研究的重要性众所周知，到目前为止有效的样本制备技术方法仍然非常缺乏，极大地限制了膜蛋白蛋白质组学的进展。

跨膜蛋白通过许多疏水氨基酸残基锚定在膜结构里面，很难溶解在水性缓冲液系统中。为了制备膜蛋白样品，传统的方法是使用去污剂和表面活性剂增溶。去污剂处理会使膜蛋白丧失其天然结构，因而妨碍了膜蛋白的功能研究。

根据其明显的疏水性特点，人们常用“去污剂+机械处理”的操作方法获取膜蛋白，用于增溶的去污剂有离子型（如 SDS）和非离子型的（如 Triton®-X）等。SDS 会使多数蛋白完全变性，限制了很多下游分析。非离子型的去污剂较为温和，但抽提膜蛋白（特别是有多个跨膜区的膜蛋白）的效果往往很差。发展一种有效的膜蛋白抽提方法，使其既能保持膜蛋白的天然结构（或至少是活性结构），又有较高的产量和纯度等优点，已经成为研究者们的急切要求。

Novagen 新近研发上市的 ProteoExtract 跨膜蛋白抽提试剂盒（简称 TM-PEK）是一种基于化学而非去污剂方法的高产膜蛋白制备试剂盒（操作参见图 1）。其简便的两步法操作可以高效地富集膜蛋白和膜关联蛋白。试剂盒包括两种试剂，TM-PEK 试剂 A 和 TM-PEK 试剂 B，分别用于制

备抽提缓冲液 2A 和抽提缓冲液 2B。使用者通过实验摸索，可以根据特定目的蛋白的特点从中灵活选择最适缓冲液。用 ProteoExtract TM-PEK 试剂抽提得到的蛋白适合用于常见的各种蛋白分析方法。从以下的报告中，列举了 TM-PEK 制备的跨膜蛋白和多次跨膜蛋白样品在免疫印迹、活性分析及 2D 电泳等方面的实例。

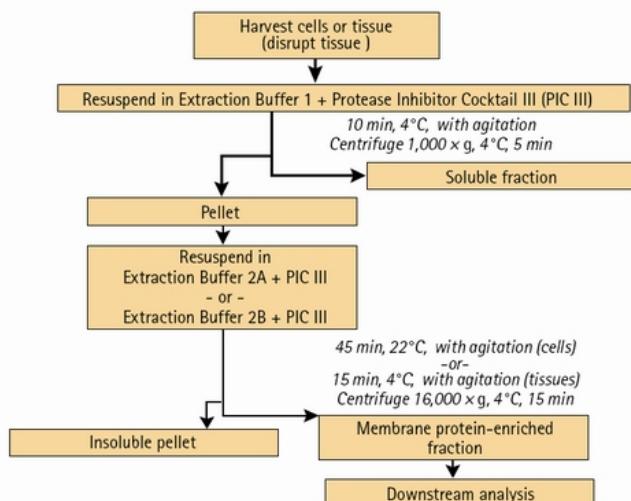


图 1 TM-PEK 的操作流程

带 7 个跨膜区的蛋白的抽提结果与讨论

为了验证 ProteoExtract 跨膜蛋白抽提试剂盒

抽提多次跨膜蛋白的有效性, 我们用免疫印迹比较了 Frizzled-4, CELSR-3 (cadherin-EGF-lag seven-pass receptor-3)和 EGFR(表皮生长因子, 只有一个跨膜区)的样本制备效果。Frizzled 和 CELSR 是 WNT/ PCP (平面细胞极性) 通路的重要组成成分, 而这个重要的通路则控制了组织的极性和细胞的迁移。Frizzled 蛋白与 GPCRs 有远源关系, 但是除开都具有 7 个跨膜区的结构外, 它们的结构和功能存在很大差异 (参见 Huang 2004)。血浆膜定位 Frizzled 蛋白是 Wnt 分泌蛋白和其它多种配基的受体 (参见 Huang 2004, Planutis 2007)。在人体内, Frizzled-4 与家族性渗出性玻璃体视网膜病变 (familial exudative vitreoretinopathy) 有关, 这个疾病导致视网膜破坏及听力持续下降。CELSR-3 和 CELSR-2 的功能是控制神经元接触位点的相互作用和神经突触的生长。CELSR-3 抑制生长, 而 CELSR-2 促进生长 (参见 Shima 2007)。关于 CELSR-3 的数据很有限, 反映出要制备完整的 CELSR-3 非常困难。Western blot 分析 (图 2) 比较了 Triton-X 100 和新发明的 TM-PEK 试剂 A 的抽提效果, SDS 抽提的作为目的蛋白大小的阳性对照。结果表明, 对于仅具单跨膜区的 EGFR, Triton- X 100 和 TM-PEK 试剂 A 的抽提效率相同。Triton-X-100 抽提 Frizzled-4 效果很差, 相反, TM-PEK 试剂 A 得到的 Frizzled-4 在 western blot 中获得了明显的信号 (图 2B)。而 TM-PEK 试剂对 CELSR-3 的抽提效果非常令人惊喜, 这种全长的 358kD 蛋白只有 TM-PEK 试剂 A 才能获得, 而 SDS 或 Triton X-100 效果都使人失望 (图 2)。

[点击索取更详细的膜蛋白抽提技术资料!](#)

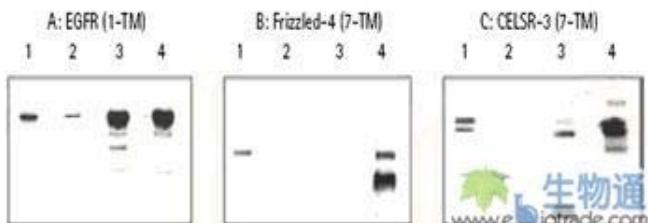


图 2 培养 MDA-MB-468 乳腺癌细胞的跨膜蛋白抽提

按照 Novagen 操作手册 TB477, 以 TM-PEK 跨膜蛋白抽提试剂盒抽提 MDA-MB 468 细胞跨膜蛋白。第一步, 两份 1×10^7 个细胞用 TM-PEK 1 处理, 获得细胞质可溶蛋白。不溶部分再用 TM-PEK 抽提缓冲液 2A(即 TM-PEK 2A)或 0.5% Triton X-100 处理。样品的 1/10 体积 (相当于 1×10^6 个细胞获得的抽提物) 跑 10% SDS-PAGE 胶, 再转到硝酸纤维素膜。膜封闭, 并以 EGFR 一抗孵育 (A 板), Frizzled-4 (B 板) 或 CELSR-3 (C 板)。用 HRP 标记二抗和化学发光底物显色。第 1 道 0.5% SDS 抽提 (总细胞抽提物); 第 2 道可溶组分 (TM-PEK 1); 第 3 道膜组分 (Triton X-100); 第 4 道膜组分 (TM-PEK 2A)。箭头显示全长蛋白的迁移。 SDS 抽提 (总细胞裂解物) 作为阳性对照。

活性膜蛋白的抽提

图 3 显示内源的糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白碱性磷酸酶的活性通过以 p-硝基苯基磷酸盐为底物的方法测定, TM-PEK 试剂 B 抽提的蛋白活性较 Triton X-100 的高 70%。

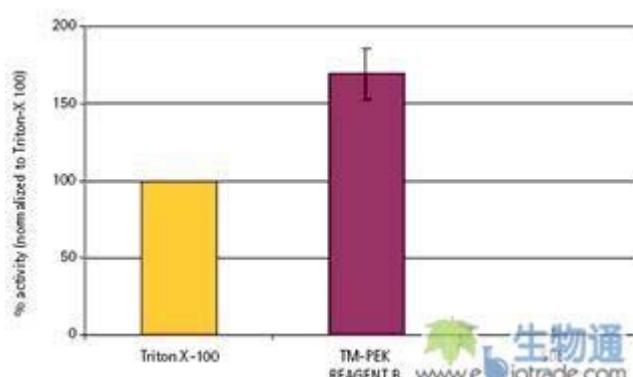


图 3 Triton X-100, TM-PEK 试剂 B 和 SDS 抽提的膜组分的碱性磷酸酶活性检测结果比较

以 p-硝基苯基磷酸盐为底物, 在 A405 测每分钟代谢率。反应缓冲液为 0.1M 氨基乙酸, 1mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂, pH10.4。数据根据 Triton X-100 的效果做标准化处理, 做了 4 个独立的重复实验。

膜蛋白质组的抽提效果

发现受体介导的信号通路中新的生物学标记的第一步是抽提膜蛋白。然而，无论是样本制备还是膜蛋白分离还都困难重重。目前最为主流的方法是 2D 电泳分离蛋白加质谱分析。可惜，传统的 2D 电泳对膜蛋白非常不适用，疏水的膜蛋白在等电聚焦时常常会发生积聚（参见 Braun 2007）。同时，膜蛋白也难以从疏水固定的 pH 梯度胶进入第二向的 SDS 胶（参见 Braun 2007）。正如图 4 的数据所显示的，用 ProteoExtract 跨膜蛋白抽提试剂盒从 A431 细胞制备的蛋白进行 2DGE 分离时获得了与 Triton X-100 处理不同的结果，而且 TM-PEK 得到的蛋白组的代表性也明显较好（图中胶的右侧）。

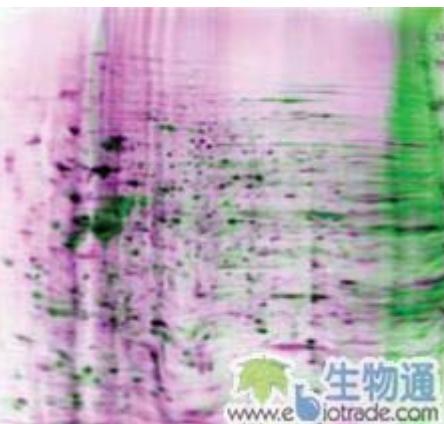


图 4 A431 细胞 Triton X-100 抽提（洋红色）和 TM-PEK 试剂 B 抽提（绿色）效果比较

2D 电泳每种样品上样量为 200 μ g。黑色为重叠的同种蛋白。第一向为 IEF, pH 3-10 (左至右); 第二向是 4-15% Tris-HCl SDS-PAGE。

结论

以上数据表明 ProteoExtract 跨膜蛋白抽提试剂盒能够非常有效地抽提膜蛋白。其温和的非去污

剂设计使抽提产物适用于各种蛋白质组研究方法，包括酶活分析（如激酶活性检测），非变性胶电泳，1D 和 2D SDS-PAGE, western blot 以及 ELISA 等。1D 或 2DGE 后，样品经胰酶消化可以做 MS 分析。此外，可以按起始材料按比例放大或减少试剂用量，以及可优化选择试剂配方的抽提操作，又进一步提高了这个试剂盒获取完整膜蛋白和生物条件下的膜关联蛋白的效果。ProteoExtract 跨膜蛋白抽提试剂盒重现性极好，易与下游实验配套。与其它方法不同，这个方法不需要超声，长时间高强度涡旋，超速离心和高温孵育等破坏蛋白的处理，从而使蛋白的降解和次级修饰的风险降到最低。

产品信息

ProteoExtract Transmembrane Protein Extraction Kit 货号 71772-3 (详细情况请参考 www.merckbio.com)

[点击索取更详细的膜蛋白抽提技术资料！](#)

参考文献

- Braun, R. J., et al. 2007. Anal. Bioanal. Chem. 389, 1033.
- Huang, H-C., and Klein, P. S. 2004. Genome Biol. 5, 234.
- Landry, Y., and Gies, J.P. 2007. Fund. Clin. Pharm. 22, 1.
- Planutis, K., et al. 2007. BMC Cell Biol. 8, 12.
- Shima, Y., et al. 2007. Nature Neurosci. 10, 963.

转染原来如此简单！

Neon™ 转染系统的优势：

高效——在多数细胞类型中获得超过 75% 的转染效率，包括难转染的细胞，如原代细胞和干细胞(表 1)

1)

灵活——每次可轻松转染 2×10^4 — 6×10^6 个细胞

简单——通用的试剂盒适用于所有细胞类型

多功能——开放的系统，可轻松调整转染参数

简单易用的三步操作

Neon™ 转染技术可高效地将核酸导入所有测试过的哺乳动物细胞类型，包括难转染的细胞、原代细胞和干细胞。这个开放而灵活的核酸导入系统包含了一个小型的台式电穿孔仪、一个电子移液器吸头架、专利的电子移液器吸头，以及专用的试剂。

即插即用

转染步骤简单到不能再简单了(图 1)。(1) 将细胞和质粒混合物吸入 Neon™ 移液器吸头中，(2) 插入到移液器吸头架上，并按“开始”。(3) 然后，只需将转染过的细胞加入你的培养容器中。既不需要将样品加入或移出电击杯，也不需要加盖和开盖。转染发生在 Neon™ 移液器吸头中。



图 1-Neon™ 系统使用简单的 3 步转染程序。

新颖的移液器吸头（电反应室）

与传统的电击杯一类的电穿孔反应室不同，Neon™ 系统利用了生物兼容的专利移液管反应

室，从而产生更均匀的电场(图 2)。这种设计能更好地维持生理条件，与传统的电穿孔相比，细胞存活率非常高。

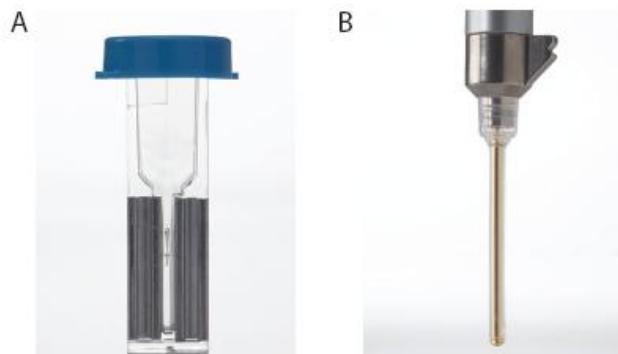


图 2. 标准的电击杯反应室与 Neon™ 移液器吸头的比较。(A) 标准的电击杯。(B) Neon™ 移液器吸头。在我们全新的移液器吸头设计中，电极的设计已表明能产生能均匀的电场。最终结果是细胞毒性更小，转染效率更高。

杰出的效率

Neon™ 转染技术专为操作简单易用的高效率基因导入而设计(图 3)。经过一次防故障的优化实验，即可在任何细胞类型中将导入效率最大化，同时将毒性最小化(表 1)(在毒性最小化的条件下获得最大的导入效率)。利用 Neon™ 细胞

数据库中的验证步骤作为起点，来优化你的实验。

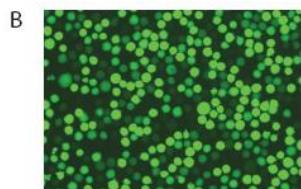
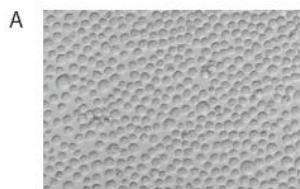


图 3. 利用 Neon™ 转染系统来高效转染 Jurkat 细胞。

(A) 利用 Neon™ 转染系统转染 Jurkat 细胞 24 小时后，编码 EGFP 的报告载体的细胞内吸收。(B) A 图的对应荧光图像。

表 1-Neon™ 转染系统成功转染的细胞系。对于成功转染过的细胞系的完整列表、操作步骤和更多的参考文献资料，请访问 www.invitrogen.com/neon。

细胞系	细胞类型	转染效率* (%)	活细胞 (%)
原代星形胶质细胞	脑神经元	76	88
原代树突状细胞	血液	50	70
Jurkat	T细胞白血病	94	97
KG-1a	血液	76	83
原代小鼠胚胎成纤维细胞	胚胎	80	75
小鼠胚胎干细胞	胚胎	88	96

* 转染效率是根据活细胞和死细胞的全部群体来计算的。

对任何细胞类型的转染----简单至极。

如欲了解更多，请访问
www.invitrogen.com/neon。

Invitrogen 推出新一代 T 细胞培养基

Invitrogen (现属于生命科技公司) 又添一种新的培养基, GIBCO® OpTmizer™ T-cell Expansion SFM。这个新一代的产品能在不添加血清的情况下培养及扩增人 T 细胞, 并实现最优、最经济的结果。人 T 细胞在基础和临床研究、以及生物技术和制药公司中广泛研究。OpTmizer SFM 能帮助科学家研究 T 细胞在人免疫反应中的主要作用。

从产品名称中我们就推断出, OpTmizer™ T-cell Expansion SFM 是一种无血清培养基, 专门用于人 T 细胞的生长和扩增。市场上许多 T 细胞培养基都需要添加人血清, 才能获得理想的结果, 而 OpTmizer™ 则不同, 它在无血清条件下同样出色。

此外, 无血清的 OpTmizer™ 与其他添加了 5% 人血清的培养基表现相当, 如果再添加 1-2% 的人血清, 将进一步提高 OpTmizer™ 培养基的表现。更重要的是, 用 OpTmizer™ 培养的 T 细胞维持了最佳的功能, 此培养基支持了 T 细胞表面关键效应器分子的诱导, 如 CD8+ 及 GM-CSF。α、TNF- γ T 细胞的 CD25 MFI、CD4+ T 细胞的 CD154 MFI、INF-

OpTmizer SFM 同时也是无异源成分的, 这意味着它不包含非人源的物质, 进一步增加了其安全

性, 同时减少了批次间差异造成的结果变异。此产品实在 cGMP 的管理下制造的, 目前只能用于科研。OpTmizer SFM 扩展了 Invitrogen 的免疫学研究方案。此方案还包含了畅销的 AIM-V, 它也是唯一通过 FDA 510(k) 认证的 T 细胞培养基, 以及各种无血清和无异源产品。

Invitrogen 原代及干细胞系统的副总裁 Joydeep Goswami 表示: “OpTmizer 是市场上第一个无异源成分的 T 细胞培养基, 能以完全无血清的方式支持 T 细胞的大量扩增。这将使我们的客户从科研轻松转化到临床应用, 因为监管障碍更少, 而 T 细胞扩增的处理步骤更简单。”

如果您正在从事 T 细胞培养, 欢迎[点击索取更多资料](#)。

(生物通 余亮)

BioTek 推出微孔板数据分析新软件

BioTek 仪器公司近日推出了新的微孔板数据分析软件-Gen5™，进一步提高了 BioTek 微孔板检测仪器的性能和可靠性。Gen5 1.08.4 版本的新特征是增强了企业用户的管理和系统通知。



Gen5 Secure 和 Gen5CL 现在提供了 Windows 验证选项，让用户在进入 Gen5 时无须再登录。此特征能更有效地管理和验证用户身份，同时用户也不必为记住多个密码而困扰。

1.08.4 版本的另一个特征是在日常使用中，用户可在某个事件发生时设定 Gen5 警报。举个例子，当读板过程结束的时候，或数据已经成功输出的时候，用户会收到通知。Gen5 Secure 和 Gen5CL 都具有 e-mail 通知选项，并能根据实验室需求来定制。这个特征尤其适用于自动的读板系统，或读板系统不在身边。

至于增强的数据输出能力，Gen5 1.08.4 版本扩展了数据组，能被定义成输出表格或矩阵，其中包含了系统或用户产生的数据对象。这种灵活性让 Gen5 能快速导出用户所需的数据。

Gen5 数据分析软件有 5 种型号，分别适用于不同的客户。Gen5 适用于生命科学研究、药物和生物技术实验室；Gen5 ELISA 能快速分析定性或定量的终端分析；Gen5 RC 简单的读数控制界面提供了轻松的数据收集和输出；Gen5 Secure 适用于需要安全性的客户；Gen5CL 则综合考虑了使用方便性和安全性，对临床诊断分析尤为合适。

Gen5 数据分析软件的特征：

强大的数据分析，包括 5 参数、4 参数逻辑选项和许多其他的曲线拟合选项

平行线分析以及相对效力和 EC50 计算

独有的快速导出功能，能迅速将数据直接输出成 Excel 的格式

卓越的读数控制、步骤定义以及数据分析能力

增强的数据浏览，包括数据显示、报告和输出选项的色彩渐变

总部设在美国佛蒙特州的 BioTek 仪器公司，是一家全球领先的设计、制造和销售微孔板仪器及软件的公司。BioTek 的仪器可以加速药物研发的进程，推动基因组学和蛋白质组学的探索，并协助改进生命科学的研究。

(生物通 余亮)

赛默飞世尔推出三款高内涵筛选试剂盒

赛默飞世尔科技公司近日推出了三款高内涵筛选 (HCS) 试剂盒，分别研究突触发生 (Synaptogenesis)、有丝分裂-凋亡 (mitosis-apoptosis) 和 mTOR 的磷酸化。

为了了解突触活性与神经病理生理学之间的关系，以及参与突触发生和突触调节的分子机制，突触连接的显微结构被广泛研究。全新的突触发生试剂盒能利用荧光同时检测神经元群体、神经突起、突触前囊泡、突触后小管以及突触。单个的靶标，包括核标志物，都是利用 4 种荧光染料来检测的。它能够用于神经发育的通路、神经系统疾病以及化合物的神经毒性研究。

多重的有丝分裂-凋亡试剂盒能同时定量核 DNA 的含量、BrdU 的掺入，以及具有活性的 caspase 3 和 p53 蛋白。该试剂盒利用免疫荧光检测来系统测量细胞增殖和凋亡。其中主要用到了 DAPI 这种 DNA 结合染料来确定细胞核的形态，并根据 DNA 含量来确定细胞周期。蛋白检测则利用了特异性好的一抗。

Phospho-mTOR Activation Kit 则测量了 mTOR 的磷酸化。mTOR (mammalian target of rapamycin) 参与了核糖体生成和蛋白翻译，是一类对细胞生长和增殖至关重要的激酶。两类主要的信号通路调节了 mTOR 的激活，它们分别是 PI-3 激酶和 AMPK。该试剂盒中包含了抗 phospho-mTOR 的单克隆抗体、结合了 DyLight 549 荧光基团的二抗以及其他试剂和缓冲液。在血清或胰岛素的短暂刺激下，磷酸化的 mTOR 被激活，导致细胞质内亮度的增加。通过这种方法，能定量磷酸化的 mTOR。

这些试剂盒已经在 Thermo Scientific ArrayScan HCS Reader 上优化过。高内涵分析系统上会进行自动的板处理、聚焦、细胞图像获取/处理以及数据管理，以便分析待测化合物。除了高

内涵筛选仪器，标记过的细胞也可以在其他荧光显微镜下观察和分析。这些试剂盒都具有两种规格：5 x 96 孔板或 50 x 96 孔板。

除此之外，赛默飞世尔还提供了一整套完整的试剂盒用于高内涵分析或筛选。如需了解更详细的产品资料或列表，请[点击此处索取](#)。

关于赛默飞世尔科技

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 105 亿美元，拥有员工约 3 万 4 千人，在全球范围内服务超过 35 万家客户。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所遇到的从常规测试到复杂研发的各种挑战。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、安全和教育领域的客户提供一系列实验室装备、化学药品及其他用品和服务。赛默飞世尔科技将努力为客户提供最为便捷的采购方案，为科学发展的飞速发展不断改进工艺技术，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。更多信息，请浏览公司网站：www.thermofisher.com (英文) 或 www.thermo.com.cn (中文)。

(生物通 余亮)

GE 推出一套双向电泳的新产品

GE Healthcare (通用电气医疗集团) 近日宣布推出一套双向 (2D) 电泳的新产品, 来简化从样品制备到分析的整个电泳流程, 并进一步增强蛋白表达研究中的定量。

这一套新产品包括: 预制的低荧光 DIGE 胶和 DIGE 缓冲液试剂盒, 能改善胶与胶之间的可重复性; 重新包装的 CyDye™ DIGE Fluor 染料, 更符合实验设计; 以及更改了配方的 IPG 缓冲液和 IPG 胶条 (Immobiline™ DryStrip gel), 能增加斑点的分辨率。

IPG 胶条 (Immobiline™ DryStrip gel) 用于等电聚焦 (IEF), 可作为双向电泳中的第一向或单独应用。改良的 IPG 胶条具有更好的稳定性、重复性和蛋白点清晰度, 并改善了数据分析中的斑点定量。目前有一整套重叠的 IPG 胶条, 长度各异, 覆盖了宽、中等、窄的 pH 范围。这些胶条每个单独包装, 并带有条形码, 使用及追踪样品都很方便。



DIGE 胶是专为 2D DIGE 开发的 12.5% 的预制聚丙烯酰胺凝胶, 置于低荧光的玻璃板中, 用于第二向的双向电泳。DIGE 缓冲液试剂盒中包含了浓缩的电泳缓冲液, 以及将胶条粘在聚丙烯酰胺胶上方的封口液。缓冲液的缓冲能力相当于我们常用的 Laemmli (Tris-Glycine) 缓冲液, 而 DIGE 胶的分离能力相当于 12.5% 的 Laemmli 胶。不过, DIGE 胶及缓冲液除了拥有 Laemmli 系统的性能外, 重复性更好, 使用更方便, 且节约时间。



全新的即用型产品显著提高了双向电泳实验中的数据质量, 从而降低了蛋白表达分析的费用和时间 (2D DIGE 的费用至少节省 3 倍, 时间节省 6 倍)。这些产品能单独使用, 也能作为一个完整的解决方案将双向分析的结果最大化, 并与 2D DIGE 完全兼容。

如欲了解更多关于双向电泳的信息, 请[点击此处](#)获取资料。

关于 GE Healthcare

通用电气医疗集团提供的革命性医疗技术和服务为患者护理开辟了一个新时代。该公司在医疗显像和信息技术、医疗诊断、患者监护系统、性能改善、药物开发和生物制药生产技术方面的技能正在帮助全球的医生重新考虑预测、诊断、告知、治疗和监测疾病的新方式, 这样他们的病人可以充分地享受生命。

通用电气医疗集团丰富的产品和服务使医疗保健供应商能更好、更早地诊断和治疗癌症、心脏病、神经疾病及其他疾病。该公司未来的目标是实

现专注于早期诊断、发病前检测和疾病预防的新的关怀“早安心”模式。通用电气医疗集团总部位于英国，是通用电气公司（纽约证券交易所代码：GE）旗下部门，资产达 170 亿美元。该集团在全球拥有 47000 名员工，致力于为 100 多个国家的医疗

保健专家及其病人提供服务。有关通用电气医疗集团的更多信息，请访问
<http://www.gehealthcare.com>。

（生物通 余亮）

应用高分辨率 LC-MSn 分析复杂样品

在高度复杂的样品，如食品提取物，动物饲料，农药，真菌毒素和兽用药品中确定和量化分析物是质谱分析中的一项重大的挑战。准确筛选这些样本在环境监管，如食品和动物饲料的分析中至关重要。

三重四极杆质谱仪已在这些实验中有所应用，然而这种方法有一些局限性，包括在数据采集完成后无法重新质询数据，无法检测未知化合物以及每次分析只能检测有限的化合物。飞行时间 (TOF) 质谱仪也被应用于这一领域，但该技术的分辨率较低 (15000) 导致质量测量受到背景基质干扰而不准确。

越来越多的成功实验已经表明，有能力实现高分辨率 LC-MSn 质谱分析对于实现高度复杂样品检测中准确的质量分析、元素成分分析及确定、和非常专化的定量分析是关键性的。

虽然高分辨率质谱的优势已经很明显，科学界对于如何建立质谱高分辨方法仍然有相当大的分歧。本文将试图澄清在高分辨率质谱领域应用的术语，技术和方法，并通过一个简短的案例来深入的阐释高分辨率 LC-MSn 的应用。

定义“高分辨率”

高分辨率技术在质谱领域和摄影领域的应用在本质上是相同的：高分辨率照片能显示出更多细节，而低分辨率照片则一片模糊。然而，“高（质量）分辨率”和“准确质量”往往被（不正确）的混用了。高分辨率对于不同峰的分离是非常必要的，并确保在某个特定测量中只有同种离子。而被测量的参数既可以是精确的质量也可以是高度专化的数量。

高分辨率在涉及复杂混合物的实验中格外重要，例如一些从某种基质中提取的样品（如生物或

环境样品）。因为这些样品中通常会包含大量的背景离子，在这种情况下，高分辨力将使结果大大不同。例如，能否在同位素基质的掩蔽效应干扰下依然检测出低浓度的分析物。

由于“分辨率”和“分辨能力”这两个词被用来描述质谱仪，看看他们的定义是很有必要的。

国际纯粹与应用化学联合会 (IUPAC) 将质谱的“分辨能力”定义为：

区分质核比之差非常小的离子的能力。这种能力可用其在两处的峰宽来表征—具体为在百分之五十和百分之五最大峰高处的峰宽，峰宽则以质量单位测量，表达为质量的函数。

国际纯粹与应用化学联合会 (IUPAC) 将质谱的“分辨率”定义为：

百分之十峰谷定义：若质量分别为 m 和 $m - \Delta m$ 的两个等高的峰由一个峰谷分开，且该峰谷的最低点为任何一峰的百分之十。而对于质量大于 m 的类似的高峰，峰谷的最低点大于（以任何数量）任何一峰的 10%，则分辨率为 $m / \Delta m$ 。 $m / \Delta m$ 之比应以 m 的倍数表示。

峰宽定义：对于质谱图中一个由质量为 m 的单电荷离子组成的单峰，分辨率可以用 $m / \Delta m$ 表示。其中 m 为指定峰高处的峰宽。建议为百分之五十最大峰高处，百分之五最大峰高处或百分之零点五最大峰高处三者之一。对于一个孤立的对称峰，若某种记录系统的线性范围在百分之五和百

分之十的峰高处之间，那么百分之五峰高处的峰宽定义在技术上与百分之十峰谷的定义是相当的。一个通用的标准是将分辨率定义为半峰高处的全峰宽，有时缩写为半高宽(FWHM)。最好在第一次使用这个缩写词的时候定义它。

“分辨率”一词与“分辨能力”基本上是可以互换使用的。事实上，分辨率和分辨能力的定义都是 $R = (m / \Delta m)$ 。而其差别在于如何界定 m 。

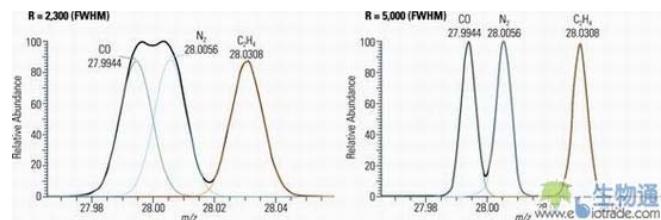
磁场质谱仪的分辨率通常由百分之十峰谷定义给出。其中 m 被定义为由百分之十峰谷分开的两个峰的质量差异。

所有其他关于分辨率的定义都是基于单一峰值的。由于分辨率可以有多种方法定义，在比较数值之前要注意其定义。举例来说，在百分之十峰谷定义中 m 是基于真正的峰的分离；而百分之五峰高处的峰宽定义中 m 则是基于一个单一的峰值测量，但就分辨率定义来说两者是相当的，下面也会谈到这点。

对于四极杆质谱，回旋共振，Orbitrap 和飞行时间质谱仪来说，最常用的分辨率衡量方法遵循半高宽的定义，即使用百分之五十峰高处的峰宽来衡量 m 。

而使用半高宽的定义取得的数值自然总是大于使用“百分之五峰高处峰宽”（百分之十峰谷）定义取得的数值。事实上，按照百分之十峰谷的定义，要达到百分之十峰谷标准，半高宽定义下的分辨率的数值大约是百分之十峰谷定义下的分辨率数值的两倍左右。这意味着 20000 的半高宽分辨率相当于 10000 的百分之十峰谷分辨率。

一台分辨率为 10,000 (FWHM) 的仪器能够分离 m/z 为 500.0 和 500.1 的离子，然而不能分离质核比为 1000.0 和 1000.1 的离子。



(图一)

在上面的例子中，分辨率数值是根据半高宽半高宽定义给出的，在右图中可以看到一氧化碳和氮气的基线分离。要达到这种分离标准，根据百分之十谷定义则只需要 2300 的分辨率。然而，在一个分辨率只有 2300 (半高宽) 的仪器上，单个的一氧化碳和氮气峰（绿色和蓝色）则被合并起来给出粗黑线勾勒的信号。仪器的分辨率要至少达到 5000 (半高宽) 才能单独和准确测量每一个单峰的质量。

仪器类型和质量分辨率

在以下所有例子中，“分辨率”和“分辨能力”将作为同义词应用，而所有数值皆是基于半高宽的定义。

在四极杆离子阱（如赛默飞世尔科技的 LTQ 系列）和传输四极杆（例如，赛默飞世尔科技的 TSQ 系列）仪器中，仪器的分辨率随质量线性增加，即如果仪器设置为进行整数分离（例如分离 100 和 101），那么在核质比为 100 时分辨率为 200，而当核质比为 1000 时，分辨率相应增加到 2000。这种分辨率设置就叫做“单位质量分辨率。”

飞行时间和双聚焦质谱仪（例如，TS DFS）的分辨能力是固定的。这意味着，整个质量范围的分辨率都是一样的。

赛默飞世尔的回旋共振和 Orbitrap™ 系列质谱仪运行中的分辨能力是不断变化的。在回旋共振的质谱仪中，分辨率随质量增加而线性递减，而对于 Orbitrap 质谱仪来说，分辨率则是随质量的平方根增加而线性递减的。例如：

Orbitrap 质谱：在 m / z 400 时分辨率为 100000，而在 m / z 1600 时分辨率则变为 50000

回旋共振质谱：在 m / z 400 时分辨率为

100000, 而在 m/z 1600 时分辨率则变为 25000

高分辨率的重要性: 一个案例研究

高分辨质谱通常用来测量准确质量(从而使测定元素组成成为可能), 或者进行非常专化的定量分析。在这两种情况下被测的都是一个峰的质量中心。在定量实验中, 想要得到明确的结果, 必须要有足够的分辨能力把目标分析物从任何可能的干扰信号中分离出来。如果仪器的分辨率达不到要求, 则会导致假阳性或假阴性的信号反应。

为了说明高分辨率质谱的应用和澄清这一分析在实践中是如何展开的, 注入了 116 种农药混合物的马饲料提取液被用来作为一个基质极其复杂的样品进行分析。这项工作展示了分辨率高达 100000 全扫描方法的应用。实验揭示了高分辨率仪器在分辨共同洗脱的等分子量目标化合物, 并确定其元素组成方面的优势。

一个从 2 到 250 ppb (每一种化合物) 的稀释系列被分别在两个不同的分辨率设置下进行测量。此外, 一个 100 ppb 的相同混合物样品在 50000 分辨率下进行分析以确定这种方法最多可同时检测的物质数目。

方法

一套非混合单级 Orbitrap 质谱仪 (Exactive™, 赛默飞世尔, 不来梅, 德国), 和超高效液相色谱仪 (赛默飞世尔 Accela, 赛默飞世尔, 圣何塞, 美国) 联用的仪器被用来分析一个极为复杂的混合了 116 种不同浓度的杀虫剂, 霉菌毒素及植物毒素的样品。流动相为水/乙腈混合液, 固定相为于 50×2 毫米反相碳十八柱(赛默飞世尔 Hypersil GOLD 1.9 微米颗粒, 赛默飞世尔, 麦迪逊, 美国), 进行 12 分钟梯度洗脱。

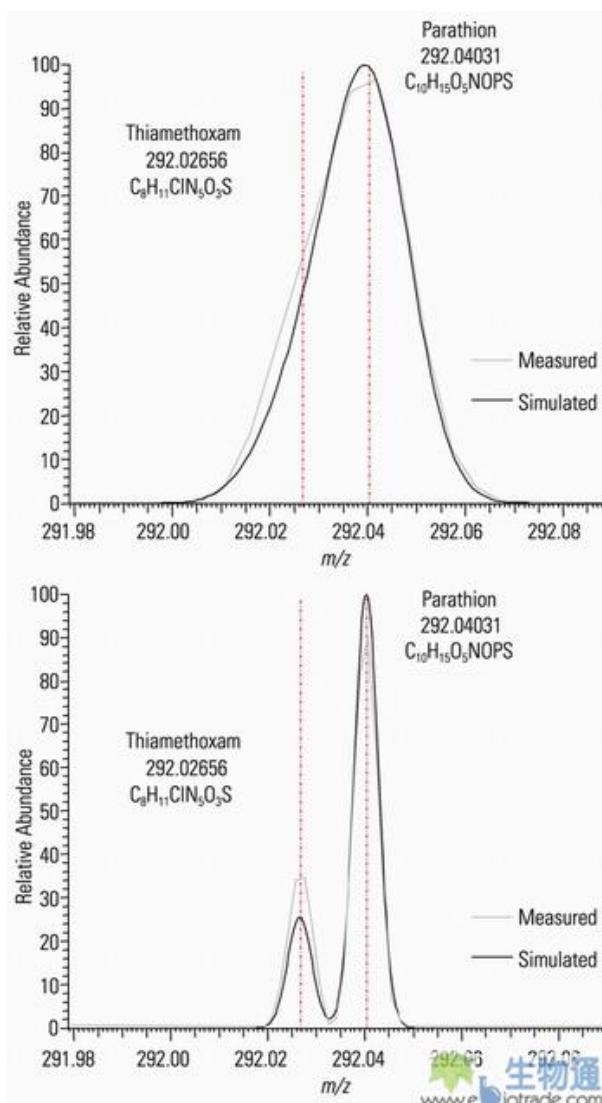
该方法的灵敏度, 选择性和线性度用标准溶液和动物饲料提取液进行了评估。质谱测量分别在不同的分辨率设置 ($R=15000$ 和 $R=50000$) 下进行, 因而可以对用飞行时间质谱仪获得的数据进行比较, 并证明超高灵敏度的优势。Orbitrap 检测则使用自动化控制来控制进入检测器的离子数量

(自动增益控制, 指标值= 106)。

结果

等分子量杀虫剂的分离

在等分子量化合物共同洗脱的情况下, 如果质谱的分辨率不足以分离这些化合物, 则会导致质量准确度和元素组成产生偏差。图 2 显示了两种杀虫剂噻虫嗪 ($C_8H_{10}ClN_5O_3S$) 和对硫磷 ($C_{10}H_{14}NO_5PS$), 两者的质子化分子离子质量分别为 292.02656 和 292.04031。高于 40000 的分辨率对于彻底分离这两种化合物的质子化分子离子是必须的。这对于在有高浓度组分存在的情况下分析低浓度化合物是一个先决条件。图 2 中的示例显示了对大约比例为 1:3 的两种农药的检测的和拟合的。



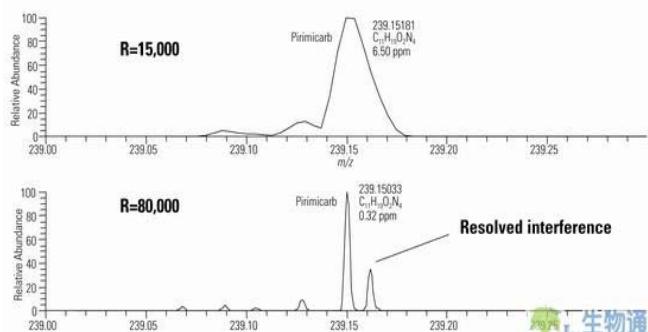
(图二)

元素组成检测方面的影响

有限的 15000 分辨率导致两个主要的局限性。

首先，检测未分离的双峰可能导致超出 Exactive 仪器特征精确度规范的重大质量误差。因此，在较低的分辨率设置下测定元素组成的质量窗口必须增大，造成对未知或目标化合物可能的元素组成建议数目过多。

这一点可以从图三的例子中看到，图三为抗蚜威在 m/z 239.1503。由于存在一个等分子量干扰物，239 处的峰显示出质量误差为百万分之 6.5。在 15000 的分辨率下，干扰物的存在造成质量明显偏高，而在更高的分辨率（此处 80000）下，双峰被很清楚的分离开来，而质量精确度绝对在仪器规范之内。

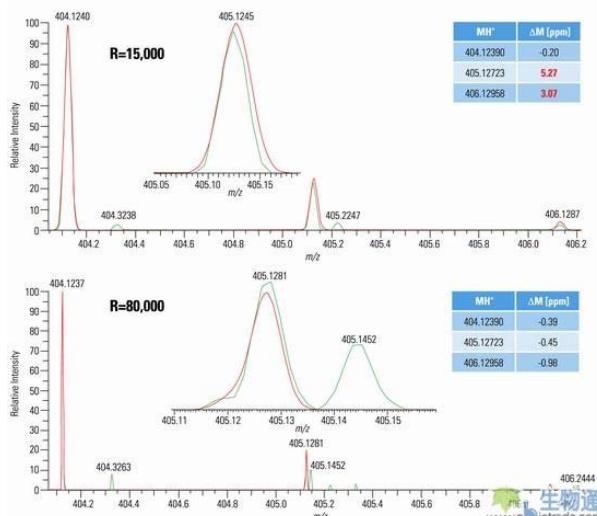


(图三)

为了将可能的元素组成结果的数量限制在一个单一的可靠结果上，我们使用了一个先进的算法软件。它考虑到单一同位素峰的峰高和质量精度及其同位素峰。然而，为了正常运行，所有同位素峰的准确质量值都必须在规定的限度内。只有使用高分辨率才能确保没有干扰峰（图 4 中可以看出）。在这里，杀菌剂嘧菌酯显示在分辨率 15000 和 80000。中等分辨率图谱显示出很好的单一同位素峰的质量准确度，但 $A+1$ 和 $A+2$ 离子质量误差却高得异乎寻常。

这是由于一个 m/z 405.1452 的干扰物在中等分辨率不能得到分离而造成的。而高分辨率谱图

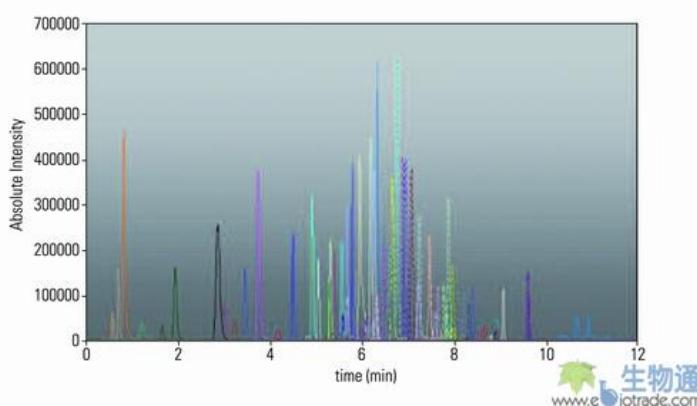
对所有三个测量的同位素都显示出极好的质量精度。利用在 ~ 15000 分辨率下取得的数据来确定元素成分将导致误导性或不正确的数据。只有足够的高分辨率才能准确测得完整的分子离子簇质量，从而使自动分析出一个高可信度的元素分子式成为可能。



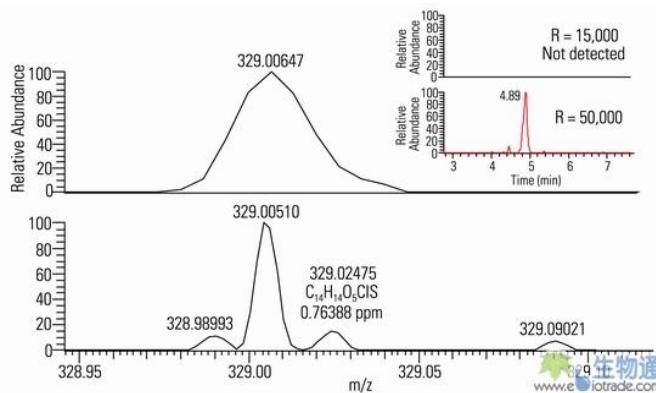
(图四)

LC - MS 法对添加农药的饲料提取样品分析显示出 116 个化合物中的 95 个在基质中浓度达到 100ppb。图五显示出重叠的所有 116 个离子谱图（3ppm 窗口）浓度在基质中均为 50ppb。在不同浓度下检测到的农药数量如图五所示。这些数据表明，分辨率设置越高，在 3ppm 提取窗口内检测到的化合物数目就越多（灵敏度更高）。图 6 体现了这一点，其中显示了在 15000 和 50000 分辨率下提取的浓度为 50ppb 的 Sulcotrion 离子谱图。分辨率更高的谱中显示出两个峰，其中较小的一个才是 Sulcotrion。

杀虫剂信号在较低分辨率的峰下被完全覆盖了。Sulcotrion 存在的唯一标志是一个稍宽的峰或者说峰肩和干扰离子的质量向高偏移。如果只在分辨率 15000 进行分析。这将导致假阴性结果。这也是造成在 15000 分辨率下所检测到的组分数目相对于更高分辨率下检测到的组分数目减少的不成比例的主要原因（图 6）。



(图五)



(图六)

出于这一原因,一个稀释系列在更高的分辨率下进行测定: 2 ppb, 10 ppb, 50 ppb, 和 250 ppb。结果表明线性度非常好的好并直至 2 ppb, 检定出从本质上几乎无法区分的峰。

结论

高分辨率 LC-MSn 分析 (使用 Orbitrap 技术能取得高达 100000 的分辨率) 为复杂样品分析提供准确的质量精度, 并为复杂基质样品的多残留筛选分析提供出色的灵敏度, 线性度和选择性, 正如以上级别的高分辨率仪器所证明。飞行时间质谱仪固有的低分辨率大大增加了由未分离的背景基质造成质量测量不准确的重大风险。一个在环境

监管中的关键问题是假阴性结果可能造成严重的健康后果。

###

Thermo Scientific 是服务科学、世界领先的赛默飞世尔科技公司的一部分。

关于赛默飞世尔科技 (**Thermo Fisher Scientific**, 原热电公司)

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 105 亿美元, 拥有员工约 3 万 4 千人, 在全球范围内服务超过 35 万家客户。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所遇到的从常规测试到复杂研发的各种挑战。

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、安全和教育领域的客户提供一系列实验室装备、化学药品及其他用品和服务。赛默飞世尔科技将努力为客户提供最为便捷的采购方案, 为科学的研究的飞速发展不断改进工艺技术, 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。更多信息, 请浏览公司网站: www.thermofisher.com (英文) 或 www.thermo.com.cn (中文)。

KingFisher 磁珠纯化系统在多肽和蛋白质生物标记物 (Biomarker) 研究中的应用

生物标志物 (Biomarker) 是指可供客观测定和评价的一个普通生理或病理或治疗过程中的某种特征性的生化指标, 通过对它的测定可以获知机体当前所处的生物学过程中的进程。检查一种疾病特异性的生物标志物, 对于疾病的鉴定、早期诊断及预防、治疗过程中的监控可能起到帮助作用。寻找和发现有价值的生物标记物已经成为目前研究的一个重要热点, DNA, RNA, 蛋白质, 小分子多肽, 糖类作为分子标记物已经大量用于基础和疾病诊断研究和应用, 基于多肽和蛋白质生物标记物的蛋白组表达模式诊断是一种很有前景的疾病早期检测。

Thermo Scientific 联合马赛诸塞州综合医院

建立了 Biomarker Research Initiative in Mass Spectrometry (BRIMS) 中心, 该中心建立了基于磁珠的色谱分离技术研究血清中的分子标记, 以一种简单、有效和可重复的方式每天处理上百的样品。采用基于疏水相互作用的反相 RPC 磁珠 (Reverse Phase Chromatography, Dynabeads RPC18) 可以从血浆样品中结合多肽片段, 经乙腈洗脱, 获得高质量的肽段表达谱。通过比较不同条件下肽段表达图谱的差异, 以寻找潜在的可能血浆生物标志物。

本文介绍 BRIMS 中心基于全自动磁珠的色谱分离技术从人血浆中分离鉴定内生多肽谱标记物的研究, 发展一种自动化、基于 vMALDI 技术和计算软件的从人血浆中内生肽差异分析。

前言

近十年来, 对生物标记物的兴趣经历爆发性的过程, 越来越多的研究开始关注多肽组质谱图特征性的变化作为不同疾病变化指示剂在医疗方面的潜在应用。在人血浆多肽组中含有约 5000 个独特的肽段。开发一种能准确鉴定多肽组中相关成分的强大的方法势在必行, 不仅可以加快对疾病生物学状态的了解, 也加强开发这些疾病生物标记的能

力。

方法和流程 (见图 1)

① 基于磁珠的样本制备; ② vMALDI 质谱采集; ③ 数据库检测和软件分析。其中 KingFisher 96 磁珠纯化系统参与血浆中多肽样品的制备。通过疏水反向 RPC 磁珠, 选择性的分离和富集人血浆中发现的内生多肽。经过 vMALDI 质谱采集以及一种新的差异表达分析的软件 (BioSieveTM), 该软件能自动鉴定经 vMALDI MS 质谱检测的、在统计学上具备明显变化相关信号强度的变化。这种结合和检测多肽水平变化的方法, 可以精确检测加有 6 种人工合成多肽标准品的人血浆样品。

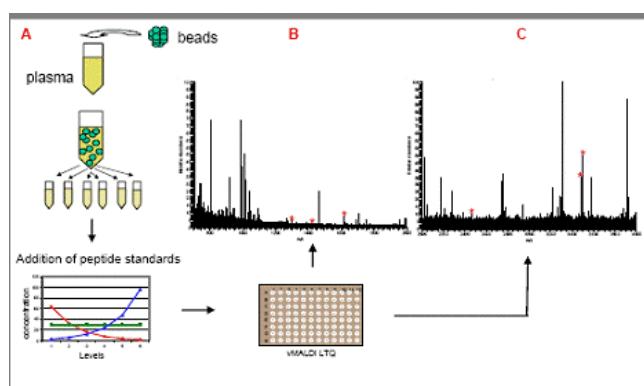


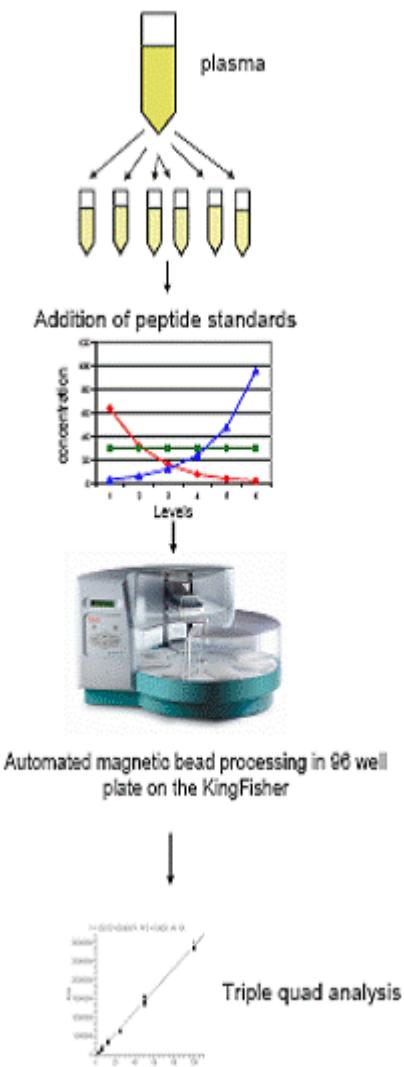
图 1: (A) 工作流程, (B) 常规质量范围 (700-2000 m/z) 和 (C) 高质量范围 (2000-4000 m/z) vMALDI 人血浆质谱图, 血浆经疏水相互作用的反相 RPC 磁珠富集, 星号标记的是加入的多

肽标准品。

实验过程和结果

一、样品自动化准备

为了模拟在人血浆中的时间流程试验, 血管紧张素 I (Angiotensin I), 纤连蛋白片段 (fibronectin fragment) (1377-1388), 蛙皮素 (bombesin), ACTH 片段 (18-39) 胰血糖素 (glucagon) 和氧化的胰岛素 B 链 (oxidized insulin B chain) (Sigma, St. Louis, MO) 等 6 种多肽标准品按以下不同浓度被加入到解冻的人血浆中: 两个多肽浓度按 2 倍递减, 【Angiotensin I (640-20fmol/μL), glucagon (64-.2pmol/μL)】 , 两个多肽浓度按 2 倍递增【fibronectin (30-960fmol/μL), ACTH (80-2560fmol/μL)】 , 两个多肽浓度固定【bombesin (300fmol/μL), Insulin B chain oxidized (1600fmol/μL)】 , 产生 6 种不同的血浆样本。将加有多肽的血浆样品置于冰上直至分层。将所有 6 种经处理的样品各取 25ul 加到 96 孔板中, 并设置未加多肽标准品的血浆作为阴性对照, 含血浆样品的 96 孔板放入 KingFisher96 磁珠分离系统进行处理, 通过专利的磁珠转移技术, 将磁珠从一个孔收集后转移到另一个孔, 再释放磁珠, 自动富集血浆中的内生多肽和多肽标准品。在磁珠分离富集过程中, 每个样品孔中加入 50ul 反相 RPC 磁珠, 结合 2 分钟后, 吸取磁珠, 转移到洗涤液中, 共洗涤三次, 每次 30 秒钟。洗涤后洗脱磁珠上的多肽片段, 洗脱液为 25ul 含 0.1% 甲酸的 50% 乙腈溶液中, 并将磁珠转移, 得到富集的血浆多肽溶液。得到的样品可以直接点样到 vMALDI 板上, 通过 Finnigan™ LTQ™ linear ion trap fitted with a vMALDI™ source 和 Finnigan TSQ Quantum™ HR triple quadrupole MS (Thermo Scientific, San Jose, CA) 进行快速 LC-SRM 分析。



样品自动化准备: KingFisher 磁珠纯化和富集人血浆多肽及检测流程图

二、软件的数据处理分析

通过磁珠纯化富集, 在人血浆中加入 6 中人工多肽标志物, 其中 ACTH (80-2560fmol/μL) 按 2X 递增, glucagon (64-.2pmol/μL) 按 2X 递减, Insulin B chain oxidized (1600fmol/μL) 浓度保持不变, 产生 6 种不同的血浆样本检测水平 (见图 1)。每种水平的样品点样 11 次, 产生 66 个质谱数据。vMALDI MS 的数据收集起来通过 BioSieve™ 分析, 自动从多重 LC/MS 样品套数据中分析 MS 图谱相关变化, 结果见图 2 和图 3。

FIGURE 2. (A) Calibration curve used for the LC-SRM quantitation of fibronectin on the Finnigan TSQ Quantum (679.15 m/z , 2 \pm 619.41 m/z , -21 V, 1.5 mTorr). (B) Increasing recovery of fibronectin peptide from plasma with increasing concentration of spike.

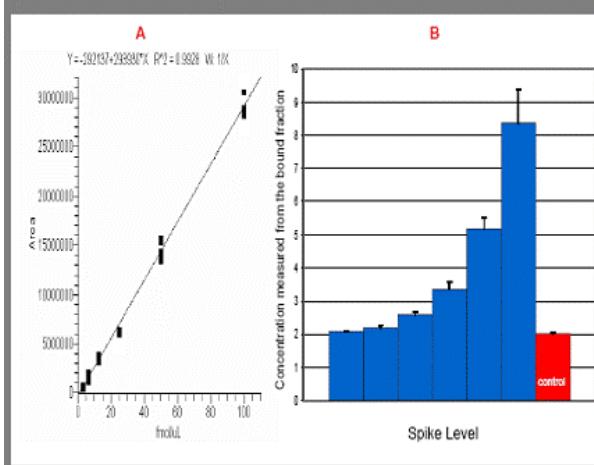
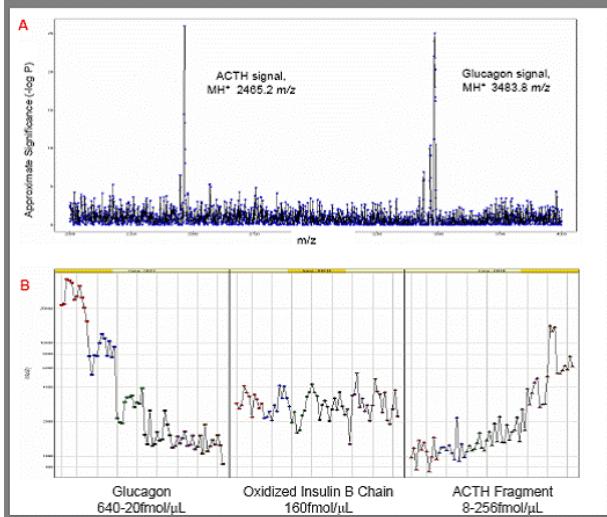


FIGURE 3. (A) Differential analysis of the sixty-six vMALDI spots showing the automatic identification of frames indicating statistically significant changes in relative signal intensity. Values above an intensity threshold triggered framing around 1 m/z -wide windows to calculate a p-value for the significance in the change in signal within that frame across the entire sample set. In this example, 66 runs produced 2988 frames (blue squares) in which the two frames scoring the highest significance corresponded to the two peptides spiked at varying levels. (B) Trend analysis of the three spiked peptides across the sixty-six vMALDI spots.



总结

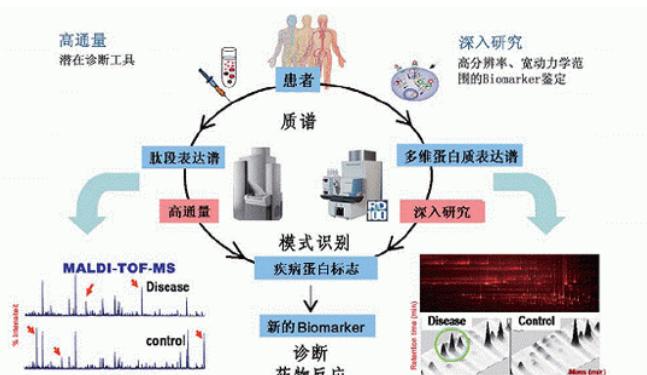
- 采用基于疏水相互作用的反相 RPC 磁珠和 KingFisher96 全自动磁珠纯化系统的自动化样品处理过程，可以从血浆样品中可重复的富集多肽片段，这种富集方法保留了相关的丰富的信息，完全满足高通量差异分析的需求。
- 可以精确鉴定和检测一个单一扫描样品在统计学上的显著变化，检测范围达到 25-50fmol 每个样品点的水平，这个变化来自于在一系列标准品加入到一个复杂的混合物中（通过

磁珠富集血浆中的多肽）的反应。

- 通过这个平台，可以进行差异和趋势分析，以追踪单个多肽在复杂混合物中的水平改变。

结论

生物标记物的研究和开发，尤其是与人类疾病相关的标记物的研究，已经成为热点。在多肽和蛋白质的标记物研究过程中，样品的前处理成为一个很重要的环节，磁珠富集法已经成为蛋白质组表达谱研究中制备样品的强有力工具，适合血清、血浆、尿液、脑脊液、关节腔滑液、支气管洗脱液、细胞裂解液、组织提取物和各种分泌物等样本。Thermo Scientific 的 KingFisher 磁珠纯化系统，以创新专利的磁珠分离技术，在不同的纯化阶段——磁珠与样品结合、清洗以及目标物洗脱等过程中采用磁棒通过磁珠转移纯化对象，避免了液体处理过程，提高了自动化程度，使之成为一种可靠和强大的分离纯化技术；可以从各种来源的材料如全血，细胞培养液，组织裂解液，土壤，排泄物等中间提取纯化目标分子，包括 DNA, RNA, 蛋白质，多肽片段，细胞等。



KingFisher 磁珠纯化系统提供一个开放的平台，所有商业化的磁珠如表面标记疏水、亲水、阳离子、阴离子、弱阳离子、弱阴离子、金属离子螯合（如 Cu、Fe）、带有 ConA 和蛋白 G 的磁珠都可以在该仪器上运行，自动富集多肽片段，以满足高通量多肽和蛋白质生物标记物研究的样品制备。

Thermo Scientific 为生物标志物的开发提供从样品处理, 分离, 鉴定等一系列研究仪器和相关分析软件的整体解决方案, 包括离心机, 移液器, 磁珠纯化系统, 样品处理耗材, 质谱及分析软件等。



参考文献:

1、T. Richmond¹, M. Askenazi¹, J. Sutton¹,
L. Bonilla¹, Automated Profiling and Identification
of Endogenous Peptidomic Markers in Human

Plasma

2 、 Villanueva, Anal. Chem. 2004, 76, 1560-1570

3、Angelo Depalma, Biomarkers: Biologists Best Friends, 《Drug Discovery & Development》

4 、 Ana Villar Garea, Matthias G, Axel I. Biomarker discovery from body fluids using mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2007, 849:105 114

5、Aldred S, Grant MM, Griffiths HR. The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research[J]. Clin Biochem, 2004, 37:943 952

Sephadex 填料是如何诞生的？

1959 年是 GE Healthcare (通用电气医疗集团) 生命科学历史上值得骄傲的一年。这一年 GE 生命科学令人尊敬的科学家、诺贝尔奖获得者、凝胶过滤 (Gel Filtration) 概念提出者 Arne Tiselius 教授领导的团队正式推出了划时代的第一个凝胶过滤介质——Sephadex。以此为开端, GE Healthcare 一直不断研发创新, 50 年来推出无数广泛使用、耳熟能详的填料介质, 成为蛋白质纯化领域当之无愧的领导者。

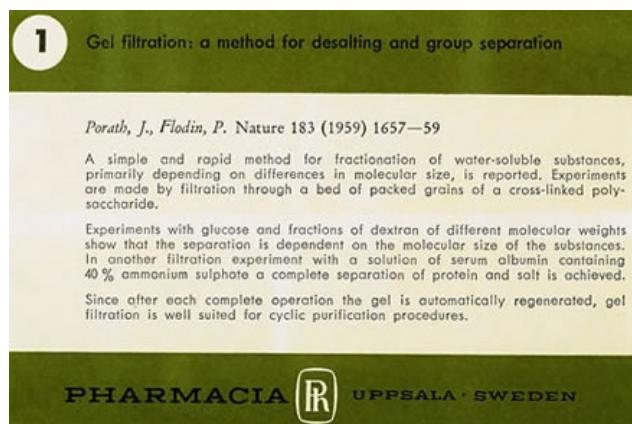
Sephadex 诞生的故事要追溯到 1925 年, 那时 Arne Tiselius 刚成为瑞典乌普萨拉大学物理化学系 Svedberg 教授的个人助理。在那里, Tiselius 开发出蛋白电泳移动界面。1937 年他被任命为生物化学教授, 并于 1948 年获得了诺贝尔化学奖。

Svedberg 和 Tiselius 建立了一个研究传统, 吸引了许多具有创新精神的青年科学家。1941 年, 化学家 Bjorn Ingelman 作为一个研究生, 加入 Tiselius 的研究小组。Ingelman 的研究包含了葡聚糖, 一种分子量很高的多聚葡萄糖, 后来被 Pharmacia 商品化作为血浆增容剂。化学家 Jerker Porath 和 Per Flodin 大约 10 年后也加入这个小组。

1950 年, Ingelman 被任命为 Pharmacia 的研究主管, 四年后, 他邀请 Per Flodin 来负责公司的葡聚糖研究。Porath 和 Flodin 继续保持紧密的联系, 1957 年初, Porath 报告说, 他在填充了交联葡聚糖凝胶的玻璃柱中观察到基于大小的分子筛以及几乎定量的回收。此外, 这种分离快速, 简单并可靠。双方立即意识到, 这一发现具有重大的科学和商业价值。

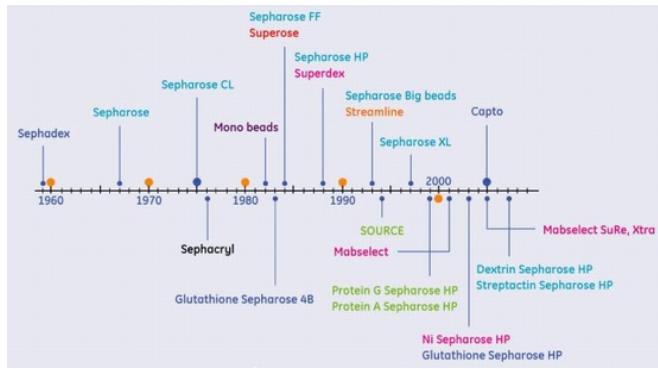
经过 Pharmacia 与 Tiselius 的协商, 立即申请了专利, 并开始产品研发。1959 年 6 月 13 日,

《Nature》杂志刊登了描述 Sephadex 凝胶过滤的论文, 很快, Pharmacia 推出了 Sephadex G-25 和 Sephadex G-50。



不久之后就发表了更多文章, 并推出了更多产品。Pharmacia 推出了一系列改进的凝胶过滤介质, 包括 Sephadex 离子交换。从 60 年代中期开始, Sepharose 琼脂糖介质对公司的发展产生了重要的影响。在以后的几十年, Protein A Sepharose 的亲和层析, 以及疏水相互作用层析逐渐普及。

如今, 五十年过去了, 层析技术成为了生命科学领域最重要的技术之一。GE Healthcare 的多种层析产品, 如工业规模的 MabSelect 蛋白 A 填料和 Chromaflow 样品栏, 以及实验室规模的 HiTrap 样品栏和 ÄKTA 系统正成为世界各地研究、开发和生产领域的主要特征。



为了庆祝 Sephadex 诞生 50 周年, GE Healthcare 推出了一系列活动, 包括层析填料优惠、满额送、有奖调查、Sephadex50 周年论文集等。如果你正在从事蛋白纯化, 那就赶快登陆 <http://www.ebiotrade.com/custom/Ge/090326/index.htm> 参加吧。

(生物通 薄荷)

华大基因再添 12 台新一代测序仪

根据 Illumina 公司的消息，华大基因再次购买了 12 台 Illumina 的新一代测序仪 Genome Analyzer。其中 8 台将安装在华大基因的香港实验室，另外 4 台将放在深圳。此次购买的价格仍未透露。华大基因将总共拥有 29 台 Genome Analyzer。

有了这些新仪器，华大基因的测序能力将进一步增强，以支持正在进行及酝酿中的项目，包括千人基因组计划、中国癌症基因组计划、生命树计划，以及其他农业、生物医学和生物燃料的研究计划。

据华大基因测序部门的主管张秀清介绍，在不久的将来，他们将进行多个阶段的扩张，此次购买 12 台 Genome Analyzer 只是扩张计划的第一步。“随着香港分部的开张，我们希望以最好的测序技术来武装我们的科学家团队”。

华大基因是世界领先的科研机构，去年底首个亚洲人的基因组图谱就诞生在那里。除了承担多个科研项目，华大基因还向全世界提供测序等服务。目前它拥有深圳、北京、香港 3 个分部，最近它还计划在中国开 5 个分部，在美国和欧洲各开 1 个，这些分部将同时承担科研项目，并提供测序服务。

最近新一代测序仪的火爆销售估计会让 Illumina 公司笑逐颜开。除了华大基因，著名的麻省理工学院和哈佛大学 Broad 研究院再次采购了 22 台 Genome Analyzer，Illumina 测序仪的数量达到 47 台。

正如早前宣布的，Illumina 计划在今年底之前大大增加 Genome Analyzer 的通量，实现每次运行得到 95GB 的高度准确的 DNA 序列数据，相当于整个人类基因组的 30 倍覆盖度。

相关阅读：

[Illumina 公布测序仪发展大计](#)

[Sanger 研究院再购 11 台 Illumina 测序仪](#)

[新加坡基因组研究院再购 4 台 Illumina 测序仪](#)

(生物通 余亮)