

EBIOTECH

生物通技术周刊

第61期

2009年5月7日

全文下载

【技术前沿】

凋亡：细胞的绝唱

形形色色的凋亡检测

以更SMART的方式合成cDNA

【新品速递】

一步法实现mRNA的分离和cDNA的合成

【甲型H1N1流感专题】

如何检测猪流感？

QIAGEN快速检测试剂为猪流感病毒检测做出贡献

美国FDA和CDC推荐使用ABI 实时荧光定量PCR仪进行H1N1猪流感病毒的检测

【行业动态】

Agilent和基因共同签署2100生物分析仪中国市场合作协议

ATCC呼吁采取行动-鉴定人源细胞系

凋亡：细胞的绝唱

（上篇）

生老病死是大自然的规律。对于每一个细胞而言，它也是注定要死亡的。细胞死亡的方式，目前认为可分为两大类型：细胞坏死（necrosis）和程序性细胞死亡（Programmed cell death, PCD）。对于程序性细胞死亡而言，一般又分为两类：凋亡（apoptosis）和自噬（autophagy）。apoptosis 这个词源自希腊语，意思是树叶或花瓣的落下。花落叶落都是自然的生理现象，类似地，细胞凋亡是生物体内绝大多数细胞在一定的发育阶段中都会发生的正常现象。它能及时有效地清除体内过量或有潜在危险性的细胞，用于维持体内各种类型细胞数目的平衡。这种平衡对于促进器官形成以及维持机体内环境的稳定都是至关重要的。对于一个 8-14 岁的儿童来说，平均每天有 200-300 亿个细胞发生凋亡。在胚胎发育时期，手指和脚趾的形成也是因为指间的细胞凋亡了，我们才有了手指而不是鸭蹼。

凋亡的发现史

早在 100 多年前，科学家们就发现了细胞凋亡现象。细胞病理学的祖师爷 Rudolph Virchow 就观察到细胞死亡的方式有两种，一是细胞坏死（necrosis），一是细胞渐进性坏死（necrobiosis）。然而直到 1965 年，这个话题才重新热起来。昆士兰大学的病理学家 John Kerr 在利用电镜研究组织时，将细胞凋亡与坏死区分开来。后来，Kerr 获邀进入英国阿伯丁大学。1972 年，他与 Alastair Currie、Andrew Wylie 一起，在《英国癌症杂志》上发表了里程碑式的论文，题为“Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics。”他们在亚伯丁大学希腊文教授 J. Cormack 的建议下，将细胞的自然死亡过程被称为凋亡，与细胞坏死相区别。近二十年来，随着现代分子生物学技术的应用，细胞凋亡领域取得了飞速的进展，从而让我们能更深入地了解凋亡的分子机制，以及凋亡与疾病的关系。2002 年的诺贝尔生理或医学奖就授予了在细胞凋亡方面做出突出贡献的三位科学家，分别是：Sydney Brenner、John E. Sulston 和 Robert

Horvitz。

自杀与他杀

如果说程序性细胞死亡是细胞在一定的生理或病理条件下，遵循自身的程序，自我结束生命的死亡方式，那么细胞坏死则可以看作是他杀。杀手多为高温、缺氧、营养不良及多种物理或化学因素。自杀和他杀当然存在着明显不同的特征，这里主要是指形态学方面。

细胞凋亡会使细胞质、细胞核和细胞膜发生一系列生物化学和物理上的变化。在细胞凋亡早期，细胞膨胀变圆，与邻近细胞的联系断绝并且脱离后皱缩。在细胞质中，内质网肿胀积液形成液泡。在细胞核内，染色质逐渐凝集成新月状，附在核膜周边，嗜碱性增强。最终细胞核裂解为由核膜包裹的碎片。在细胞膜上，细胞结点不再相连，细胞膜变得更活跃进而发生内陷。这些变化都将导致细胞裂解为由细胞膜包裹细胞内容物的凋亡小体。在生理条件下，细胞膜上发生特定的调节作用，可以使吞噬细胞识别并吞噬凋亡小体，但不产生炎症反应。

自噬则是利用溶酶体对细胞自身体内的部分

细胞质和细胞器进行一系列降解的过程。它的显著特征是形成大量自体吞噬小泡，内质网弥散和染色体发生中度凝集。自噬过程中的细胞骨架虽然解聚，但并不像凋亡过程那样发生明显的细胞骨架降解。

细胞坏死将导致细胞器如线粒体肿胀，细胞膜破损，大量细胞内容物渗漏，并伴随着周围组织的炎症反应。在一些情况下，细胞凋亡与细胞坏死能被很好地区分开来，但在某些情况下，即使是福尔摩斯，也难以判定细胞究竟是自杀还是他杀，因为濒死的细胞同时具备凋亡和坏死的特征。

细胞为什么要自杀？

是生存压力大，还是人言可畏？主要有两类原因：一是正常发育的需要，例如前面提到的手指发育。蝌蚪在发育成青蛙时，尾部的细胞就发生凋亡。子宫内膜的定期脱落也正是因为凋亡。二是需要摧毁对生物体有潜在威胁的细胞。在细胞感染病毒时，细胞毒性 T 淋巴细胞通过诱导凋亡杀死被病毒感染细胞。当细胞调节的免疫反应减少，效应细胞就必须被清除，以防止它们攻击自身。凋亡机制

的缺陷就会带来自身免疫疾病，如红斑狼疮和风湿性关节炎。过量的细胞凋亡也会导致机体失衡，正常生命活动受到破坏，例如在艾滋病病毒的攻击下，不该死亡的 T 淋巴细胞如 CD4 阳性细胞大量死亡，从而使人的免疫力下降，引发艾滋病。放疗和化疗也会诱导某些类型的癌细胞凋亡。

细胞凋亡的机制

细胞凋亡的机制很复杂，涉及到多个分子。目前普遍认为有两条主要的凋亡诱导途径：死亡受体介导的凋亡途径或外部途径，线粒体凋亡途径或内部途径。虽然两条凋亡通路的上游事件不同，但是它们最终大都导致 caspase 的激活。细胞凋亡过程受到严格的调控，在正常细胞中 caspase 处于非活化的酶原状态，凋亡程序一旦开始，caspase 被活化，随后发生级联反应，引发不可逆的凋亡。

（生物通 余亮）

相关阅读：

[凋亡：细胞的绝唱（下篇）](#)

[形形色色的凋亡检测](#)

（下篇）

外部途径

外部途径的活化是通过特定的死亡配体（如 Fas 配体、TNF α 和 TRAIL）与细胞表面的死亡受体（肿瘤坏死因子超家族成员）的相互作用而介导的。尽管不同死亡受体激活的信号通路存在一些差异，但大致的凋亡信号通路是类似的。死亡配体与受体的结合导致神经酰胺的产生。神经酰胺的释放被认为促进了脂筏的融合，让死亡受体大规模聚集。这种聚集放大了凋亡信号。虽然在某些细胞如淋巴细胞中，不发生受体聚集，也能引发凋亡，但在大多数情况下，信号通路的放大是激活整个凋亡反应所必需的。

配体结合之后，受体的胞内结构域发生了构象变化，暴露出“死亡结构域”，并招募不同的凋亡蛋白。这个形成的蛋白复合物被称为 DISC（诱导死亡信号复合物）。最后一个步骤是招募到一种 caspase，通常是 caspase-8 前体，导致 caspase-8 的激活和凋亡的起始。

TNF α 与受体 TNFR-1 的结合导致受体的三聚化以及胞内死亡结构域的聚集。TNFR-1 变构后，招募到一种胞内的接头蛋白 TRADD（TNFR-associated death domain）。TRADD 随后招募到多种不同的蛋白，如下游的 TRAF2（TNF-associated factor 2），并激活 NF- κ B 和

JNK 通路。TRADD 也能与 FADD (Fas-associated death domain protein) 结合, 并通过蛋白间相互作用招募到 caspase-8 前体, 形成 DISC。在 DISC 形成过程中, caspase-8 前体自动裂解成有活性的 caspase-8, 并释放到细胞质中, 起始下游的级联反应。FADD 参与的凋亡通路被 FLIP (Flice-inhibitory protein) 所抑制。FLIP 是一种缺乏蛋白水解活性的 caspase-8 同源近似物, 通过抑制 FADD 与 caspase-8 前体的相互作用从而抑制凋亡。

Fas 的配体 (FasL 或 CD95) 激活凋亡的途径与 TNF 类似。配体的结合促进了受体的聚集、DISC 的形成以及 caspase 级联反应的激活。不过, Fas 受体的信号通路更简单些。接头蛋白 FADD 直接与 Fas 受体的死亡结构域结合, 而无需 TRADD 的参与。Fas 受体似乎只在凋亡中发挥作用, 而不像 TNF 受体一样参与其他的信号通路。同样, 这个过程也被 FLIP 所抑制。

在对 Fas 应答的细胞中, 一型细胞 (type I), 如胸腺细胞, 其 caspase-8 有足够的活性, 被 Fas 活化后导致细胞凋亡, 在这类细胞中高表达的 Bcl-2 不能抑制 Fas 诱导的细胞凋亡。在二型细胞 (type II), 如肝细胞中, Fas 介导的 caspase-8 活化不能达到足够的水平, 因此这类细胞中的凋亡信号需要借助凋亡的线粒体途径来放大。活化的 caspase-8 将胞质中的 Bid 剪切, 形成活性分子 tBid (truncated Bid), tBid 进入线粒体, 导致细胞色素 c 释放, 使凋亡信号放大。

在很多细胞内, TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) 能与受体 DR4 或 DR5 结合, 引发快速的凋亡。不过有意思的是还存在一些诱骗受体, 与 DR4 和 DR5 受体竞争。这些诱骗受体称为 DcR1 和 DcR2。它们都能与 TRAIL 配体结合, 但是不会起始凋亡, 因为 DcR1 没有胞内的结构域, 而 DcR2 的死亡结构域截短了, 招募接头蛋白所必需的 6 个氨基酸中有 4 个缺失。

NF- κ B 是凋亡的抑制剂。通常 NF- κ B 与抑制

蛋白 I κ B 结合, 存在于胞质中。在 TNF 的诱导下, I κ B 被磷酸化, 随后被泛素降解。而自由的 NF- κ B 二聚体被释放, 并转位到细胞核中。NF- κ B 诱导了一系列基因的表达, 如 FLIP、cIAP1 和 cIAP2 等, 而这些表达产物抑制了凋亡。凋亡抑制蛋白 XIAP (X-chromosome-linked IAP) 也由 NF- κ B 调节, 它通过 BIR 结构域和 NH₂ 末端接头抑制了 caspase-3 和-7, 从而抑制凋亡。

内部途径

凋亡内部途径是脊椎动物最普遍的细胞死亡途径, 能被多种刺激因素活化, 包括生长因子撤退、热休克基因激活、DNA 损伤剂、活性氧、胞内钙离子过多及其他的细胞应激。这些因素导致线粒体外膜透化, 及一些促凋亡蛋白的释放, 如凋亡诱导因子 (AIF)、细胞色素 c、Smac/DIABLO 等。细胞色素 c 从线粒体中释放出来不依赖于线粒体膜表面电位下降和线粒体膜通透性的增加。Smac/DIABLO 是凋亡抑制蛋白 XIAP 的抑制因子。而 AIF 不依赖 caspase 途径, 同样诱导细胞凋亡。它进入胞浆之后被转运到细胞核中, 或许是与核酸内切酶 G 一起, 引发染色质的凝集和高分子量 DNA (50 kb) 的片断化。

细胞色素 c 从线粒体中释放出来是凋亡中的大事件。一旦细胞色素 c 释放到胞浆, 它就与凋亡激活因子 Apaf-1 结合, 并进一步招募到 caspase-9 前体, 形成多蛋白复合物, 称为凋亡小体 (apoptosome)。活化的 caspase-9 进一步导致下游的 caspase-3 及 caspase-7 的活化。

线粒体外膜通透性的增加是由于膜通透性转换孔 (PTP) 的改变或经 Bcl-2 家族中促凋亡分子活化。PTP 复合物主要由位于线粒体外膜的电压依赖性阴离子通道 (VDAC)、位于线粒体内膜的腺嘌呤核苷酸转位蛋白 (ANT) 以及线粒体基质中亲环蛋白 D (cyclophilin D) 组成。胞浆内高水平的钙离子能触发 PTP 的开放, 使得水分子及 1.5 kD 的溶质分子从胞浆自由扩散到线粒体基质, 导致线粒体肿胀及跨膜电位的崩解。线粒体外膜通透

性增加的另一种机制就涉及到 Bcl-2 家族。

Bcl-2 蛋白家族分成两派，Bcl-2 和 Bcl-XL 是抗凋亡蛋白，而 Bad、Bax 及 Bid 是促凋亡的。细胞对凋亡刺激的敏感性依赖于这两派之间的平衡。当促凋亡蛋白过量时，细胞对凋亡敏感。反之，当抗凋亡蛋白过量时，细胞更倾向于有抗性。线粒体表面过量的 Bcl-2 促凋亡蛋白被认为是 PTP 形成的重要因素。

Bcl-2 家族中的促凋亡蛋白时常在胞浆中巡逻，它们充当了细胞损伤或应激的感应器。在细胞应激时，它们转位到线粒体表面抗凋亡蛋白的所在点。促和抗凋亡蛋白的相互作用破坏了抗凋亡蛋白的正常功能，导致 PTP 的形成和其他分子的释放。于是又导致了凋亡小体的形成和 caspase 级联反应的激活。

Bid 还是联系死亡受体和线粒体途径的纽带。Bid 通常以无活性的形式存在于细胞质中，被激活后转位到线粒体膜上，与抗凋亡 Bcl-2 蛋白对抗，促进凋亡。在某些细胞类型中，Bid 在死亡受体激活后由 caspase-8 剪切，形成活性分子 tBid。tBid 快速结合到膜上，之后 tBid 与 Bax 相互作用，导致 Bax 插入膜中，并寡聚化，膜开始变得有通透性，接下来细胞进入凋亡程序。Bcl-XL 可阻止 tBid 与 Bax 结合，抑制细胞凋亡。Bid 还能由其他酶如颗粒酶 B 和溶酶体的蛋白酶激活。

凋亡过程的主要执行者

Caspase 是凋亡过程的主要执行者之一。它们属于半胱氨酸蛋白酶，在细胞中以无活性的酶原形式存在。在凋亡过程中这些酶原被切割，形成具有活性的酶。凋亡的外部途径会导致 caspase-8 或 caspase-10 的激活。这些 caspase 在级联反应中激活其他的 caspase。级联反应最终导致效应 caspase 如 caspase-3 和 caspase-6 的激活。效应 caspase 负责切割关键的胞内蛋白，如细胞骨架蛋白，导致细胞发生典型的形态学改变。

Caspase-3 被认为是最重要的执行者，它由上

游的 caspase (caspase-8、caspase-9 或 caspase-10) 激活。Caspase-3 特异性地激活核酸内切酶 CAD (caspase activated DNase)。在增殖细胞中，CAD 通常与 ICAD (CAD 的抑制剂) 组成没有活性的复合物。在凋亡过程中，ICAD 被 caspase-3 切割，释放出 CAD。随后出现 DNA 的迅速片断化。

除了死亡受体之外，caspase 级联反应的激活还存在其他机制。颗粒酶 B (Granzyme B) 也能由细胞毒性 T 淋巴细胞运送至细胞内，并直接激活 caspase-3、7、8 和 10。线粒体也是 caspase 级联和凋亡的关键调节器。线粒体中释放的细胞色素 c 能导致 caspase-9，继而是 caspase-3 的激活。这个过程通过凋亡小体的形成来调节。

多聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP) 是最早鉴定出的 caspase 的底物。PARP 通过催化多聚 (ADP-核糖) 的合成，与 DNA 链的断裂结合并修饰核蛋白，参与了 DNA 损伤的修复。caspase-3 能切割 PARP，从而阻止其修复。核纤层蛋白 (Lamin) 是维持细胞核形状，并调节染色质与核膜间相互作用的核内蛋白。caspase-6 对核纤层蛋白的降解会导致染色质凝聚及核片断化。

尽管我们一直以来都将目光聚焦在凋亡和 caspase 上，但它们并不能代表一切。在清除有瑕疵或存在潜在威胁的细胞方面，还有其他酶在执行着程序性细胞死亡，包括钙蛋白酶 (calpain)、组织蛋白酶 (cathepsin)、核酸内切酶及其他蛋白酶。它们在一些细胞器如线粒体、溶酶体和内质网的指导下，独立上阵或通力合作。这些非 caspase 介导的细胞死亡途径，在 caspase 途径失败的时候，同样能成为生物体的守护天使，并为癌症治疗带来曙光。

(生物通 余亮)

相关阅读:

[形形色色的凋亡检测](#)

形形色色的凋亡检测

以前，我们只关心细胞是死是活。现在，研究者的兴趣已不再局限于此，大家更关心细胞到底是怎么死的，哪条通路受到了影响，观察到的是凋亡的哪个阶段，甚至如何阻止它。

既然凋亡是一个相当复杂的信号级联，那么我们就有很多机会来评估参与其中的蛋白活性。随着凋亡相关蛋白的不断发现，我们也有了越来越多的检测对象。然而，凋亡和坏死的许多特征相互重叠，即使是福尔摩斯也难以分辨，因此有必要采用两种或更多不同的方法来验证细胞的死亡方式。一种检测早期凋亡事件，而另一种则瞄准晚期事件。多重分析现在也变得越来越普及，它能从同一个样品中获得两组或以上的数据。虽然可供选择的方法很多，但没有一种是放之四海而皆准的，每一种都有优点和缺点。因此，在选择凋亡检测方法时，了解每种分析的优缺点很关键。

了解每个模式系统中细胞死亡的动力学同样很关键。某些蛋白，如 **caspase**，表达的时间很短暂。正在经历凋亡的体外培养细胞，最终也必然会经历坏死。而且凋亡细胞会很快地死亡并消失。凋亡从开始到结束一共才 2-3 小时。因此，如果分析得太早或太晚，就难免出现假阴性。此外，凋亡可能以很低的频率出现，或只是出现在器官、组织中的特定位点。在这种情况下，快速地通览全局就很有用。总的来说，如果你需要细胞死亡机制的详细信息，那么毒素暴露的时间、待测化合物的浓度以及分析终点的选择就变得很重要。

随着凋亡检测工具的日益丰富，我们能利用显微镜、酶标仪、流式细胞仪和发光检测仪等各种各样的工具来检测各种细胞中的凋亡。检测的参数也是五花八门，有 **caspase**、磷脂酰丝氨酸、线粒体膜电位、DNA 片断化、细胞色素 c 等等，令人目不暇接。一般来说，凋亡检测可分为 5 大类：

1. 细胞膜的改变

2. DNA 片断化

3. Caspase 的检测

4. 线粒体的分析

5. 细胞形态学的改变

细胞形态学的改变

在正常情况下，活性染料不能进入具有完整细胞膜的细胞，当细胞发生晚期凋亡或坏死时，膜结构被破坏，这些染料就可以进入细胞，故利用活性染料可以评价细胞膜的完整性。任何活细胞/死细胞分析试剂盒，如台盼蓝或碘化丙啶（PI）都能挑出已经凋亡及坏死的细胞。不过，那些正在经历凋亡的细胞还能阻止这些染料进入，因此不会被挑选出。那么，这些分析就要与其他检测凋亡的分析来共同印证。

细胞膜的改变

细胞膜的重排发生在凋亡的早期。在许多凋亡细胞中，这种重排导致磷脂酰丝氨酸（PS）从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面，暴露在细胞外环境中。这一事件可通过 **Annexin V** 的染色来检测。**Annexin V** 是一种 **Ca²⁺** 依赖的磷脂结合蛋白，在 **Ca²⁺** 存在的情况下，与 PS 有很高的亲和力，可与凋亡细胞膜上外翻的 PS 相结合。荧光（如 GFP、FITC）标记的 **Annexin V** 一旦与凋亡细胞结合，就可以通过荧光显微镜观察到。这种方法的特点是灵敏，能检测单个凋亡细胞。但是坏死细胞的膜也会被标记上。因此，对于 PS 阳性的细胞，一定要验证膜的完整性。很多公司都提供了双重染色的试剂盒，来同时评估膜的完整性和 PS 外翻。但是也

有一些例外需要注意。目前已知有些细胞类型在细胞表面组成型表达 PS，因此 Annexin V 染色有可能导致假阳性的结果。

DNA 片断化

DNA 片断化是凋亡晚期的一个重要特征。普通的琼脂糖凝胶电泳就能检测 DNA 的片断化。我们可将 DNA 提取出来，进行电泳。凋亡细胞就会产生阶梯状的电泳条带，间隔大约是 180 bp。这种方法简单易行，灵敏度约为 1×10^6 个细胞，对于凋亡细胞数量多的实验来说很有用。但换句话说，如果凋亡细胞的数量少，就不推荐使用了。而且并非所有发生凋亡的细胞（如神经细胞、肝细胞、胚胎成纤维细胞）都会检测到 DNA ladder。另外，DNA 片断化发生在凋亡的晚期，如果你没有检测到 DNA 片断化，那也不排除细胞正处于凋亡的早期。

目前更为常用的 DNA 片断化检测方法是 TUNEL 法。脱氧核糖核苷酸末端转移酶（TdT）将生物素或荧光标记的 dUTP 加在 DNA 片断的 3' 末端，并通过一定的显色系统使之显示出来。很多公司都提供 TUNEL 检测试剂盒。这种方法较电泳法来说更为灵敏，荧光显微镜能检测到单个细胞，流式细胞仪也能检测约 100 个细胞。这种方法也很快，3 小时内能完成。但它的费用也比电泳法高不少，而且可能会存在坏死细胞或其它细胞的假阳性。基于这些理由，我们还需要另外一种分析。

Caspase 的检测

无论是内部途径，还是外部途径，最终都汇集 caspase 上，因此 caspase 成为凋亡检测的大热门。市场上有很多 caspase 检测试剂盒，来检测多种 caspase 的活性。我们可以通过荧光标记的底物来检测有活性的 caspase，也可以利用荧光标记的 caspase 抑制剂来标记。你也可以通过免疫组化分析来检测切割的底物如 PARP。当然，很多公司也有 caspase 的抗体。这些方法都能够快速

定量凋亡细胞。但是有些方法需要裂解细胞，释放出 caspase，这样就不能在组织中定位凋亡事件。此外，另一个缺点是 caspase 的激活并不是一定表明凋亡的发生。而且，caspase 家族成员在底物偏爱性上有着很大的重叠，影响了分析的特异性。

如果你想要评估待测样品与对照之间基因表达的差异，就可以考虑芯片。芯片是一种相对较新的凋亡检测方法，它能够同时描绘出凋亡中多种蛋白的表达差异。我们通过芯片能绘制出编码配体、受体、细胞内调节器及转录因子的基因表达图谱。参与了抗凋亡的基因也能用这种方法评估。

线粒体的分析

线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件。目前比较流行的分析方法是染料法。通过阳离子染料在线粒体的聚集来检测线粒体膜电位。常用的染料有 JC-1。在线粒体膜电位较高时，JC-1 聚集在线粒体的基质中，形成聚合物，产生红色荧光；在线粒体膜电位较低时，JC-1 不能聚集在线粒体的基质中，此时 JC-1 为单体，产生绿色荧光。这样就可以很方便地通过荧光颜色的转变来检测线粒体膜电位的变化。常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。但是，这些染料并不能说明细胞凋亡的机制，应与其他凋亡检测方法如 caspase 分析共同使用。

在活细胞和固定细胞中，从线粒体中释放的细胞色素 c 能利用荧光和电子显微镜来分析。不过，细胞色素 c 一旦释放到细胞质中，就变得不稳定。因此，我们必须使用非凋亡的对照，来确保染色条件能够检测任何细胞色素 c。

凋亡检测领域仍在不断发展，将来可能会出现更多更快速的检测方法。但正如本文所强调的，我们必须采用两种或以上的方法来验证细胞的死亡方式，这样，我们的结论才更有说服力。究竟是自杀还是他杀，我们要给细胞一个说法！

（生物通 余亮）

以更 SMART 的方式合成 cDNA

想当年，Clontech 的 SMART 技术那可是风靡全球啊，建文库、做 RACE 的没有不知道 SMART 的。后来，随着 Clontech 被收购，市场份额想必也下降了不少。不过，如今 Clontech 卷土重来，推出了 SMART 的升级产品 SMARTer cDNA 合成试剂盒。想想也是，人家 SuperScript 已经推出第 III 代了，如果还是恒久不变的 SMART，怎么与别人抗衡。

SMART 技术的原理估计大家都清楚了，这里就不赘述了。如果有同学不太了解，请阅读《[SMART 技术回顾](#)》。

SMARTer 系列试剂盒中的升级产品包括 SMARTer II A 寡核苷酸及 SMARTScribe™ 逆转录酶。在与新的 SMARTer 寡核苷酸共同使用时，SMARTScribe 逆转录酶的模板转换能力增强了；你更有可能合成高质量、全长的 cDNA，而不管模板的大小或丰度。

如果你的起始样品非常少，那么 SMARTer cDNA 合成试剂盒尤其适合你。那些从激光捕获显微切割样品，或流式细胞仪分选出的细胞中提取出的 RNA 总是少得可怜，以前的 SMART cDNA 合成试剂盒根本没法用，而 SMARTer 试剂盒则能从最少 2 ng 总 RNA 中合成第一链 cDNA。

以往，很稀的 RNA 是不能用于常规的 cDNA 合成的。于是，Clontech 设计出 SMARTer Pico PCR cDNA 合成试剂盒，能从 50ul 浓度低至 20 pg/ul 的总 RNA 合成 cDNA。它通过增加反应体积，以及额外的柱纯化步骤，将纯化的单链 cDNA 全部用于扩增。SMARTer 和 SMARTer Pico 的双链 DNA 产量都在 1-2 ug，它们的步骤比较请看下表。

Table I: Comparison of SMARTer Protocols*

SMARTer	SMARTer Pico
• 2-1000 ng total RNA	• 1-1000 ng total RNA
• Template volume up to 3.5 µl	• Template volume up to 50 µl
• Total RNA template concentration as low as 0.6 ng/µl	• Total RNA template concentration as low as 20 pg/µl
• SMARTer first-strand cDNA synthesis • Volume = 10 µl	• SMARTer Pico first-strand cDNA synthesis • Volume = 106 µl
• Dilute 1:5 with TE Buffer • Volume = 50 µl	• Purify with NucleoSpin® Column • Column Elution Volume = 80 µl
• Use 10 µl cDNA for SMARTer PCR amplification	• Use 80 µl cDNA for SMARTer Pico PCR amplification
• 100 µl reaction	• 100 µl reaction
• Cycle optimization and scale-up	• Cycle optimization and scale-up
• Purify PCR products with NucleoSpin	• Purify PCR products with NucleoSpin
• Yields 1-2 µg ds cDNA	• Yields 1-2 µg ds cDNA

* Differences between protocols appear in bold.

SMARTer RACE 也比原始的 SMART RACE 更灵敏、更特异，而背景更低。SMARTer RACE 的起始样本只需要 10ng 总 RNA，而 SMART RACE 需要 50 ng。

SMARTer RACE 的特点：

- 极其易用：单管就能完成两步操作。全部的手工操作时间仅需要 4 小时。
- 仅需要 10 ng 总 RNA：SMARTer RACE 能利用少量的样品，包括活检、组织切片、胚胎及稀有疾病组织。优化的步骤能显著降低非特异背景，这种降低在处理极少量样品时就显得很重要。
- 特异富集 5'端：改进的 SMARTer Oligo 能优先杂交到 cDNA 的 5'端，因此与旧版的 Oligo 相比，整体产量有所提高。
- 无需 RNA 预处理：SMARTer RACE 的方法无需用 DNase 预处理 RNA。直接用总 RNA 进行反应即可，哪怕有基因组 DNA 污染也没关系。

如果你想了解 SMARTer cDNA 及 RACE 试剂盒的更详细信息，请[点击这里](#)。

(生物通 余亮)

一步法实现 mRNA 的分离和 cDNA 的合成

与 RNA 打交道本来就不是一件容易的事，更何况是 mRNA。在 RNA 提取过程中，经常会遇到降解或 DNA 污染等问题。尤其是在沉淀和洗涤步骤，会损失相当多的 mRNA。如果你的细胞足够多，那可能不算什么大问题，反正不差细胞。但如果你的细胞数目在两位数甚至个位数，高效的 mRNA 提取方法就显得相当重要了。

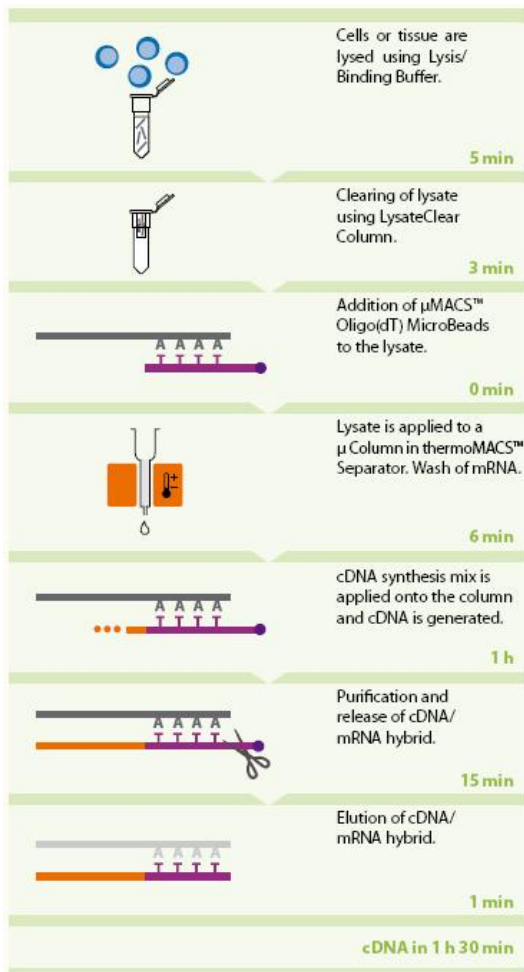
分离 mRNA，不外乎都是利用 poly A 这个小尾巴。但磁珠有差异，结果自然分高下。德国美天旎公司以磁珠起家，MACS 技术更是深入人心。50 nm 的超顺磁化 μ MACSTM 微珠与细胞裂解物混合后，微珠立即与目的 mRNA 结合。随后过一个置于 MACS 分选器中的 MACS 柱子，磁性标记的 mRNA 即被分离纯化。逆转录可在同一个柱子中进行。彻底洗涤后，洗脱得到纯的 cDNA。整个过程如图 1 所示。

图 1. MACS 技术用于一步法 mRNA 分离和 cDNA 合成的原理

从图 1 可以看出，mRNA 纯化后无需洗脱下来，用 μ MACSTM One-step cDNA 试剂盒和 thermoMACSTM 分选器，cDNA 合成可直接在柱上进行。该分选器是永久磁铁，可被加热到 37°C 或者 42°C。革命性的柱内 cDNA 合成大大的降低了 mRNA 和 cDNA 的损失。第一链合成后，不需要的组分被洗掉而 cDNA 留在柱内。这项独特的技术确保每个步骤如 mRNA 分离、cDNA 合成和纯化都在同一个柱内进行，最大限度的保留了样本。因此，当起始样本数很小，如只有五个细胞时，仍然可得到可靠的 cDNA 合成。

MACS 技术用于一步法 mRNA 分离和 cDNA 合成的其他优势：

- 高纯度：MACS®技术可实现完全的柱内清洗，得到优质的 mRNA 而不会有基因组 DNA 的污染。
- 高回收率：避免离心、缓冲液去除过程中的损失
- 可重复性好，结果可靠：一步法 cDNA 合成可很容易的实现自动化
- 速度快：从细胞、组织或者血液样本中得到 mRNA 只要 15 分钟。再需要 75 分钟即可得到合成好的并在同一个柱子上纯化好的 cDNA。



如果你的样品不太多，可以选择以手动方式处理，那么你需要以下三大件：

1、 μ MACSTM Oligo(dT)微珠

- 超顺磁化的颗粒—只在磁场中才会有磁性
- 尺寸很小—直径只有 50 纳米
- 不会沉降，极高的反应动力—立即与目的 mRNA 结合

优点：出色的敏感性—mRNA 可从极少的样本中分离出来，甚至单个细胞

2、MACS®柱子

- 填充有铁珠，可增强磁场—滞留结合目的 mRNA 的纳米大小的 μ MACS 微珠
- 缓冲液由重力作用自然流过，因此不需要离心和缓冲液去除步骤。避免损失
- 彻底的洗涤过程

优点：高回收率，高纯度

3、MACS®分选器

MACS®分选器是永久磁铁。可加热的 thermoMACSTM 分选器（图 2）是专为柱中进行如 cDNA 合成这样的酶反应而设计的。一步法避免了管与管之间移液造成的损失。

优点：高回收率



图 2. thermoMACSTM 分选器可被加热到 37°C 或者 42°C

客户反馈：德国马尔堡大学的 Mack 认为“它相当可靠，而且能产生大量的超纯产物。与其他技术相比，在磁珠分离的所有样品中都未检测到基因组 DNA 的扩增。”

当然，如果你有几十个甚至上百个样品，也很容易将该流程放大在 96 孔板上进行，并用 MultiMACS 96 分选器进行分选。只需要 45 分钟，即可从细胞和组织中平行地进行多样本的 mRNA 纯化。结合机械加样系统，可以实现整个流程的完全自动化。另外，还有可加热的 MultiMACSTM 96thermo 分选器可供选择，因此一步法 mRNA 分离和 cDNA 合成可被放大到完全自动化的，平行的 96 样本处理，并拥有 MACS 技术的所有优势。

客户反馈：瑞士苏黎世理工学院的 Wolfrum 教授谈到：“我们通常处理几十个样品。现在，有了 MultiMACS 96thermo 分选器，我们能够平行进行最多 96 个样品的 cDNA 合成，节省了大量的时间和经费。”

如何检测猪流感？

面对来势汹汹的猪流感，如何快速准确地检测已成为各国 CDC 目前最关心的问题。显然，连最权威的美国 FDA 也有点措手不及。27 日，FDA 发布紧急授权令，允许一种尚未批准的实时定量 RT-PCR 试剂盒（rRT-PCR Swine Flu Panel）用于猪流感病例的鉴定。FDA 并没有说明此试剂盒是由 CDC 内部开发的，还是由某个厂家制造的。

尽管好几个分子诊断制造商发表声明称，他们的产品能够检测猪流感，但迄今为止都没有获得 FDA 的授权。

经过进一步证实，FDA 授权的实时定量 PCR 分析是利用 TaqMan 探针在 ABI 的 7500 Fast Dx 或 7500 Fast 实时定量 PCR 仪上进行的，后者只能用于科研。生命科技公司的首席运营官 Mark Stevenson 表示，他们已经运送了几台 7500 Fast 和 7500 Fast Dx 实时定量 PCR 仪到美国的几家政府机构，用于检测流感病毒株，同时他们也在验证流感试剂盒，以确保它能够鉴定这种致命的新毒株。

Stevenson 还表示他们接到了许多来自其他国家的订单。比如重灾区墨西哥已经订购了 10 台 Fast Dx 实时定量 PCR 仪。同时，其他国家的不少临床实验室也在直接联系生命科技公司。Stevenson 并没有指明由于这次的猪流感公司卖出了多少台仪器，但他表示新加坡的制造基地正在扩大生产，以满足仪器的需求。

日前，世界卫生组织也公布了用实时定量 RT-PCR 来检测猪流感的 CDC 操作步骤。它利用了一组引物和双标记水解探针（Taqman）来体外检测和鉴定猪流感病毒。其中，InfA 引物和探针组是通用检测 A 型流感病毒，swInfA 引物和探针组是特异检测所有猪流感 A 病毒，swH1 引物和探针组是特异检测猪 H1 流感病毒。此操作步骤可在 WHO 的网站上下载。

目前国内尚无猪流感的病毒样本，而引物、探针、血清、抗原等流行病学信息，中国 CDC 也仍未获得。因此，中国 CDC 已与美国 CDC 联系共享资源，开始根据美国公布的全基因序列自行合成 H1N1 全基因序列，并设计检测引物。下一步，中国 CDC 将优化检测技术，下发引物等检测试剂，对既往分离猪流感病毒进行全基因测序和比对分析，并开展人群猪流感病毒感染状况血清学调查。

猪流感检测步骤与禽流感相似，可参考《[如何检测禽流感](#)》。

（生物通 余亮）

QIAGEN 快速检测试剂为猪流感病毒检测做出贡献

近期，猪流感疫情已经蔓延到多个国家和地区，墨西哥、美国、英国、法国、新西兰、以色列、香港等都出现了确诊或疑似病例。由于目前尚无治疗人类感染猪流感的特效药，对疑似症状人群进行快速准确的猪流感病毒检测并对确诊者进行隔离治疗成为控制疫情快速蔓延的必要手段。

QIAGEN 公司提供的探针一步法检测试剂盒 QuantiTect Probe RT-PCR Kit在病毒检测领域久负盛名，这次又被国际上多个实验室用于猪流感病毒的检测，荣登CCTV新闻国际时讯（CCTV视频链接：<http://space.tv.cctv.com/act/video.jsp?videoid=VIDE1240924682911270>），不得不赞叹此试剂盒品质实在是“牛”，它到底有哪些出色的表现呢？



QuantiTect Probe RT-PCR Kit

- 一步法检测，快速且避免了交叉污染
- 相比其他试剂盒灵敏度更高
- 产品性能非常稳定

QuantiTect Probe RT-PCR 试剂盒在近几年来多次传染性疾病的监控中都发挥了重要的作用，从 SARS、高致病性禽流感病毒 H5N1、手足口病致病病毒 EV71 到现在的猪流感病毒检测，

在全球多个国家的疾病控制领域包括中国都有很高的知名度。

QIAGEN 公司不仅提供 QuantiTect Probe RT-PCR 试剂盒，在病毒快速检测领域，QIAGEN 提供经优化的全套实验方案，包括样品的收集、样品中核酸的抽提到后续的 PCR/定量 PCR 检测。同时提供全自动操作平台，降低操作者的风险，提高应对大规模流行病爆发的能力，帮助各疾病监控实验室在大规模爆发的疫情面前做出快速响应。

关于 QIAGEN

荷兰控股公司 QIAGEN N.V.（凯杰生物）是全球领先的样本制备和分析技术的供应商。样品制备技术用来分离和处理从血液或组织等样品中提取的 DNA、RNA 和蛋白，而分析技术使这些分离的分子可被检测，便于生物学研究和疾病检测。QIAGEN（凯杰）已经开发了 500 多种全面的产品组合，包括试剂和自动化解决方案。QIAGEN（凯杰）产品的主要客户包括学术研究领域，分子诊断实验室、制药和生物技术公司，应用检测用户（例如法医鉴定，兽医研究，生物安全以及工业应用）。QIAGEN 的检测技术包括全球现有的应用最广泛的分子诊断平台。该平台包括 digene HPV Test，它被视作高危型人乳头瘤病毒 (HPV) 检测的“金标准”—— HPV 是引发女性宫颈癌的元凶。QIAGEN（凯杰）在全球拥有 3000 多名员工，产品在 80 多个国家通过专业的销售团队和全球化的分销网络进行销售。更多关于凯杰的信息请登陆 www.qiagen.com。

美国 FDA 和 CDC 推荐使用 ABI 实时荧光定量 PCR 仪进行 H1N1 猪流感病毒的检测

纽约(GenomeWeb 消息)– 继昨天报道了美国食品药品监督管理局 (FDA) 授权 (紧急使用授权, EUA) 一种分子诊断分析试剂盒紧急用于目前爆发的猪流感病例的鉴定之后, GenomeWeb 每日新闻已证实 FDA 在上周日发布的紧急授权令中所引用的 CDC 检测将在 Applied Biosystems 的仪器平台上运行。

根据 FDA 发送至美国疾病预防控制中心 (CDC) 的信函, 被授权用于猪流感 A 诊断的 rRT-PCR Swine Flu Panel 是一种利用 TaqMan 探针的荧光定量分析试剂盒, 将由符合指定资格的实验室在 Applied Biosystems 7500 Fast Dx 实时定量 PCR 仪或 7500 实时定量 PCR 仪上进行。

随着猪流感病毒的蔓延, 美国及全球其他国家的病例不断增多, 多家分子诊断技术供应商正在对现有产品进行升级或开发新产品以帮助鉴定及辨别病毒。尽管一些分子诊断制造商发表声明称他们已将流感毒株添加到现有的产品中或检测过现有检测产品能够鉴定猪流感, 但到目前为止 CDC 检测是唯一获 FDA 授权的。

FDA 的执行委员 Joshua Sharfstein 在他的信件中指出, 授权“仅限于对已经诊断为由一种 FDA 现有许可方法无法确定其亚型的流感 A 病毒所感染定的个体, 使用授权的 rRT-PCR Swine Flu Panel 来进行猪流感 A (H1N1) 病毒感染的推定性诊断。”

生命科技公司 (Life Technologies) 的总裁及首席运营官 Mark Stevenson 在昨天该公司第一季度收益的电话会议上提到, 公司已经“向一些政府机构运送了 7500 和 7500 Fast Dx 实时荧光定量 PCR 仪, 用于流感毒株的检测, 我们也正在验证本公司的一个流感试剂盒可用于鉴定这种致死的流感病毒新毒株。”

Stevenson 今天告诉 GenomeWeb: “CDC 小心谨慎所做的是确保检测的标准化及只有一种授权的检测。当你遇到一个疑似病例时, 自然很希望能确认所鉴定的正确毒株。有一些检测不能够挑出这种新毒株。”

Stevenson 表示公司早已与美国疾病预防控制中心

制中心 (CDC) 进行合作并支持他们, “在去年我们就联合向 FDA 提交了一个禽流感分析检测的申请以进行审批。CDC 开发了一种分析试剂盒, 而我们同时向 FDA 提交了 7500 Fast Dx 实时荧光定量 PCR 仪 (申请), 最后获得了许可。”

他还表示公司正与 CDC 一起为美国公共卫生流感检测网络配备一种仪器。上周, CDC 联系了生命科技公司, 并要求该公司“能够快速响应他们在仪器和人员上的某些需求, 并快速周转一些可用于他们试剂盒的某些试剂。”

“我们已经完成了这个公共卫生网络以确保不仅 CDC 能进行此项检测, 更重要的是, 全世界公共卫生实验室都有能力对疑似病例进行这个标准检测。”

他表示这套系统和试剂的分销将部分由 CDC 进行推广, 但公司也收到了一些实验室, 特别是美国以外的实验室的订单。例如, 他提到在该公司墨西哥当地的团队以及 CDC 共同协助下, 墨西哥政府订购了 10 台 7500 Fast Dx 实时荧光定量 PCR 仪。同时, 他表示世界其他国家的当地卫生实验室也直接联系了生命科技公司。

Stevenson 没有说明在这次的流感爆发其间公司出售了多少台仪器, 但他提到生命科技公司已经在其新加坡的制造基地扩大生产, 以便能跟上全球对其仪器以及 CDC 试剂盒组分的需求。

他说: “我们设想它将会是一场马拉松, 而不是短跑。因此, 我们正在为此而做好准备。”

相关阅读:

[ABI 实时定量 PCR 仪获 FDA 正式批准与美国疾控中心新流感检验试剂配套联用](#)

[了解更多关于 ABI 实时定量 PCR 仪的信息!](#)

Agilent 和基因共同签署 2100 生物分析仪中国市场合作协议

基因有限公司与安捷伦科技有限公司正式签订中国大陆（CDC 除外）Agilent2100 生物分析仪总代理协议，自 2009 年 4 月 1 日起，基因有限公司全权负责安捷伦科技有限公司 Agilent 2100 生物分析仪在中国大陆（CDC 除外）的推广和销售工作。

安捷伦科技公司和基因有限公司将合作为广大客户提供高品质的产品及高水准的服务。

基因有限公司是一家专业性的生命科学仪器、试剂供应商，代理逾七十家欧美等地专业生产厂家具有国际先进水平的高科技产品，涵盖分子、细胞、免疫、诊断等多个研究及应用领域。公司的服务网络遍及全国各地，拥有包括仪器、试剂、专项产品、市场与技术支持、售后服务、后勤等多个部门组成的完整服务体系。

安捷伦科技有限公司（NYSE: A）是全球领先的测试与测量公司，是通信、电子、生命科学和化学分析领域的技术领导者，公司的 19,000 名员工在 110 多个国家为客户提供服务。在 2008 财政年度，安捷伦的业务净收入为 58 亿美元。

安捷伦科技有限公司进驻中国 20 多年，建立了完备的市场，销售，技术和售后服务体系。要了解安捷伦科技的信息，请访问：www.agilent.com.cn。

ATCC 呼吁采取行动-鉴定人源细胞系

在过去的 45 年里，细胞生物学方面的数据一直在发表，但是应用于生物医学研究领域的哺乳动物细胞被错误辨识和交叉污染的问题，一直是一个普遍存在的突出问题。导致细胞交叉污染的原因和预防措施也已经被公布，使得大家用各种各样的方法来鉴定细胞。然而，问题却一直有增无减，研究人员继续发表从错误辨识和交叉污染的细胞系所获取的数据。据估计，15-25%的研究论文因为使用了被错误辨识和交叉污染的细胞而导致错误的结论。这造成数以百万美元的研究经费的浪费，并产生了大量使人误导的无效数据。这一情况呼吁广大研究人员一定要对细胞系进行鉴定并且确认鉴定的结果。伦敦大学学院的教授 John R.W. Masters 和美国天主教大学的荣誉退休教授 Roland M. Nardone 向 ATCC 提出倡议，提议 ATCC 致力于人源细胞系的鉴定工作，并制定鉴定的标准程序。新的鉴定标准正在建立阶段，我们寻觅有志于此的科学工作者加入到这个团队。

新标准的目标是建立规范化，价格低廉和普遍适用的，用于鉴定新的和已确定的人源细胞系的方法标准，以及它们的使用标准。这一新标准适用于下列研究者：

- 将人源细胞系用于研究和生产的用户，包括但不限于以下领域：医学，遗传学，药物开发，疫苗研制，生物技术和制药行业，再生医学，基础科学，HIV 的检测和治疗以及细胞生物学。

- 各大细胞保藏库
- 科技期刊的同等评审
- 学术团体
- 政府部门和私营机构

综述（项目简介）：

1. 目标描述：

- 寄存到细胞库的新的人源细胞系所推荐使用的标准鉴定程序

- 已经建立的细胞系所推荐使用的标准鉴定程序(这些细胞系不是直接溯源于信誉良好的生物资源中心)，被用于作为研究刊物同行评审的基础，或者被用于治疗等等

- 辨识/鉴定的方法应该是尽量详细的标准工作组，要结合基因型和表型的方法

- 选择的鉴定方法应该能够确认导出或鉴定出该细胞系

- 细胞的传代次数和需要再次检测的潜在因素也应考虑在内

2. 有必要认清鉴定中遇到的各种不同的情况，同时必须制定相应水准的鉴定方法。

这个团队的负责人是 John R.W. Masters 博士，伦敦大学学院泌尿外科研究所的实验病理学教授。加入 ATCC SDO（标准化组织），要求成为其中一员，请您发邮件至 standards@atcc.org。