

EBIOTECH

生物通技术周刊

第62期

2009年5月21日

全文下载

【技术前沿】

凋亡检测之默克篇

凋亡检测之Promega篇

通用电气为双向电泳提供新的协同解决方案

【新品速递】

世界上最快的细菌转化

PIERCE推出新磁珠，简化蛋白纯化

MACSelect系统—转染后的明智之选

GE推出IN Cell Analyzer 2000细胞成像系统

【应用指南】

如何富集和检测分泌IL-17的活T细胞？

剑桥大学发表利用SOLiD进行单细胞转录组分析的新方法

【行业动态】

Illumina测序仪在试剂和软件上大升级

SOLiD 3单次运行可产生50 Gb人基因组序列数据

赛默飞世尔KingFisher技术快速高通量检测A型H1N1流感病毒

凋亡检测之默克篇

一谈起默克，大家首先想到的可能是默克医药，但是我们要说的是默克化工。百年之前，他们曾是同一家公司，但自从一战后分家，两个默克除了名字相同，再也没有任何关系。为了不让大家混淆，默克化工在北美地区的业务以 EMD 的名义开展，在其他地区则为 MERCK。因此我们经常看到 EMD，其实这就是默克。默克的产品线很广，除了我们知晓的生化产品，很多日常生活品中都用了默克的化工产品，如家喻户晓的六神花露水，其中含有的 IR3535 驱蚊剂就是默克生产的。在西安秦始皇陵兵马俑的色彩保护中，默克的高纯度试剂更是功不可没。世界上第一个维生素 C 也是来自默克。

言归正传，今天我们要讨论的是默克的凋亡检测产品。默克旗下的 Calbiochem 品牌一直以抑制剂及各类生化试剂闻名，殊不知它在凋亡方面也有着很全面的产品。在凋亡的每一个阶段，Calbiochem 都有相应的产品提供。下面生物通就来一一介绍。

凋亡的激活

Calbiochem 提供了多种特异性凋亡激活剂，如 Fas、TRAIL、TNF α 等。此外，它还提供了更多的化学诱导剂，如放线菌素 D、A23187、Doxorubicin 等。

凋亡线粒体改变的检测

线粒体膜电位降低是细胞凋亡后最早发生的胞内事件。MitoCapture Apoptosis Detection Kit 用一种基于荧光的简便方法来区分正常细胞和凋亡细胞。它的基本原理如下：MitoCapture 是一种阳离子型染料。在正常细胞中，它可在线粒体中积累并聚合，其聚合体发红色荧光；在凋亡细胞中，由于线粒体膜电位的改变，它不能在线粒体中积累并以单体形式存在于胞浆中，其单体发绿色荧光。因此很容易通过荧光显微镜来区分，也能用流式细胞仪进行定量检测。

线粒体的改变还涉及到多种蛋白，包括著名的 Bcl-2 家族、细胞色素 c、AIF 等。Calbiochem 提供了几十种抗体，来检测这些蛋白。对于细胞色素

c 的检测，除了有抗体和 ELISA 试剂盒外，Cytochrome c Release Apoptosis Assay Kit 还提供了独特的试剂，从胞浆中富集线粒体组分，然后通过 WB 检测可观察到细胞色素 c 从线粒体到胞浆的转位。

Caspase 的检测

Caspase 的活化是凋亡的典型特征。Calbiochem 提供了两种方法，来检测 caspase 的活性。一种是基于底物的检测试剂盒。通过荧光素（AFC、AMC）标记的底物或发色团（pNA）标记底物来检测细胞裂解液中 caspase 活性。当活化的 caspase 降解标记的底物多肽后，发色团或荧光素被释放出来，引起显色或发光反应，并由相应的仪器检测。一般说来，荧光底物更灵敏，但需要特殊的仪器。而发色底物通过分光光度计或酶标仪就能检测。

另一种是利用带荧光素（如 FITC）标记的抑制剂来检测活化的 caspase。抑制剂包括一段特异的 caspase 识别序列，其上连接一个功能基团如醛基（CHO）、氯甲基（CMK）或氟甲基（FMK），能以可逆或不可逆的方式结合到 caspase 的活性部位。C 端连接的化学基团决定了 caspase 抑制剂可逆与否。一般而言，带 CHO 基团的 caspase 抑制剂是可逆的，而 CMK、FMK 或 FAOM 基团能与 caspase 间形成共价键，故这类基团的 caspase 抑制剂能不可逆地抑制 caspase 活性，其中带

FMK 基团的抑制剂特异性更好。

Calbiochem 提供了 50 多种 caspase 抑制剂，其中最热销的是 Caspase Inhibitor I 【Z-VAD(Ome)-FMK】，它具有细胞通透性，是广谱的 caspase 抑制剂，能抑制所有的 caspase，但不能抑制纯化的 caspase。而 Caspase Inhibitor VI (Z-VAD-FMK) 也是畅销产品之一，它的细胞通透性虽然不如 Inhibitor I 好，但可以抑制纯化的 caspase。

凋亡细胞膜改变的检测

细胞凋亡中，最早改变的是细胞膜。在正常活细胞中，磷脂酰丝氨酸 (PS) 位于细胞膜内侧，一旦细胞发生凋亡，可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。PS 的转位发生在凋亡的早期阶段，体内的吞噬细胞可通过识别磷脂酰丝氨酸来清除凋亡细胞，不伴随局部的炎症反应。

Annexin V 是一种 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合蛋白，在 Ca^{2+} 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，因此 Annexin V 是检测细胞早期凋亡的灵敏指标。当 Annexin V 被荧光素标记时，可经流式细胞仪或荧光显微镜检测到早期凋亡的细胞。

Calbiochem 的 Annexin V 试剂盒中特有的 RAPID™ Media Binding Reagent 可直接将 AnnexinV-FITC 快速标记于培养液中的细胞上，避免了额外的离心、清洗等可能造成细胞膜机械性破坏的操作，从而减少假阳性实验结果的可能，并缩短操作时间。此外，一旦细胞离开培养环境，细胞凋亡即成为渐进性的动态过程，会持续于整个实验操作，过于繁琐的操作步骤往往会错过检测早期凋亡的最佳时间，RAPID™ Media Binding Reagent 能简化操作，在检测早期凋亡细胞中的优势凸显。

凋亡细胞核改变的检测

DNA 片断化是凋亡的一个重要特点。提起

DNA 片断化的检测，大家自然会联想到 TUNEL。TUNEL 技术的原理是染色体 DNA 断裂时产生大量的粘性 3'-OH 末端，而生物素或荧光素标记的 dNTP 在脱氧核糖核苷酸末端转移酶 (TdT) 的作用下掺入到 DNA 的 3'-末端，并通过一定的显色系统使之显示出来。

说到这里，Calbiochem 的两个明星产品就要闪亮登场了。它们都是 FragEL DNA 片断化检测试剂盒，只是显色方法有所不同，一种是显色法 (目录号: QIA33)，另一种是荧光法 (目录号: QIA39)。这两个试剂盒在凋亡用户中口碑极佳，也常年占据 Calbiochem 的 Top 10 销售排行榜，非常值得推荐。试剂盒中的组分齐全，含阳性及阴性对照片、蛋白酶 K、显色系统等，即买即用，无需再准备其他试剂。而且 QIA33 试剂盒还提供中文说明书，使用起来极为方便。

此外，Calbiochem 还新推出了 BrdU 版的 TUNEL 试剂盒——Apo-BrdU Kit。此试剂盒中，Br-dUTP 取代了生物素或荧光素标记的 dNTP，在 TdT 酶的作用下掺入到凋亡 DNA 片段的 3'-末端。因为溴分子比荧光素、生物素或地高辛标记等标记物要小得多，因此 Br-dUTP 更容易掺入凋亡细胞的 DNA 片断中，而最后的检测信号也更强。同时，试剂盒还提供流式细胞仪阳性和阴性对照。

除了上文所介绍的，默克的细胞凋亡产品还有很多，据粗略统计，共有五、六十种之多，本文当然也不可能一一介绍。要在这么多产品中选择最合适的产品，估计你又开始犯愁了。其实非常简单，默克有一份很清晰的凋亡检测试剂盒选择指南，你可以根据样本类型、检测对象、所需设备和凋亡阶段来轻松选择。默克还特别制作了一本中文版的《凋亡研究实用工具及技巧》，除了包含选择指南，还有详细的操作步骤，Q&A 等等，很实用，而且在实验室中非常抢手。如果你正在或将要进行凋亡研究，那就赶快[点击索取](#)吧。

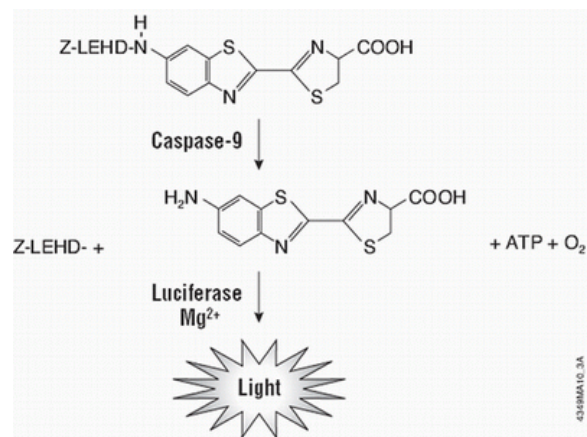
(生物通 余亮)

凋亡检测之 Promega 篇

Promega这个老牌的生物公司，近来也愈发展现出青春的活力，还将经典的《操作步骤和应用指南》搬上了iPhone，让大家耳目一新。在细胞分析方面，Promega的产品还真不少，覆盖了凋亡、增殖、ADME(吸收、分布、代谢、排泄)、毒性等多个方面。前段时间，生物通还发表了Promega专家所撰写的《[在合适的时间点检测凋亡](#)》一文，其中列出了一些可能影响凋亡的因素，如细胞系、诱导剂、处理时间及培养条件，并详细阐述了在合适的时间段检测凋亡的重要性，非常适于新手阅读。

细胞发生凋亡时，除了形态学变化以外，还会发生一系列生化事件。其中，caspase酶的依次激活无疑是凋亡中重要的生化改变。而它们也成为凋亡检测中很好的靶点。检测caspase酶的方法不外乎底物、抑制剂和抗体。

Proemga公司的Caspase-Glo®检测试剂盒是一种检测caspase活性的均质发光检测方法。试剂盒中提供了一种经过修饰的氨基荧光素发光前体底物(含相应的caspase蛋白酶识别序列)和耐热荧光素酶，专利的缓冲液也特别为caspase活性、细胞裂解和荧光素酶活性而优化过。细胞发生凋亡时，caspase酶系即处于活性状态，这些具有活性的caspase酶在遇到氨基荧光素发光前体底物后，在其特异性识别的氨基酸序列处进行切割，释放出游离的氨基荧光素底物，然后，此游离的荧光素底物即可被荧光素酶催化而发光。在缺乏有活性的caspase时，caspase的氨基荧光素前体底物也不能作为荧光素酶的底物，因此不发光。加入Caspase-Glo®试剂后，细胞裂解，随后caspase将底物裂解。释放出的游离氨基荧光素与Ultra-Glo™重组荧光素酶作用，产生一种“辉光型”的发光信号(图1)。该信号的强弱与caspase的活性成正比。



此试剂盒最大的特点是利用了荧光素酶，而不是常规的荧光来检测caspase的活性，因此更为灵敏，且不易被其他化合物的固有荧光信号所干扰，信噪比更高。另外，Caspase-Glo®检测试剂盒使用起来也特别简单，只需将缓冲液和冻干的底物冻干粉混合，再以1:1的比例加入样品中即可，连常规的细胞裂解步骤都省了。整个过程只是“加样-混合-读数”三步而已。Caspase-Glo® 3/7,8和9试剂盒可以用多孔板模式，既可用于纯化的酶的测定，也可直接在用于测定培养的细胞培养体系中的caspase酶胞中应用。Caspase-Glo® 2和6试剂盒则主要用于检测纯酶制备。

不过，由于涉及到荧光素酶的检测，实验中就需要能读96孔板的发光检测仪(Luminometer)来完成最后的读数。如果你们实验室已经有了这台发光检测仪，那自然皆大欢喜。但由于生物发光还未像荧光那样普及，因此很多实验室可能缺乏这个

检测仪器，那只能忍痛割爱，舍弃这个又简单又灵敏的好东西。此时，基于荧光法的 caspase 检测试剂盒就成了最好的替代。Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 检测试剂盒是根据对罗丹明标记底物的切割来检测 caspase-3/7 活性的。此试剂盒的用法也同样简单，与上面的“加样-混合-读数”三步曲相同。总的孵育时间取决于样品中不过，在有活性的 caspase-3/和-7 的量，较为轻微的凋亡诱导效果以及细胞数量较低时，需要延长孵育时间。推荐的最长孵育时间是 18 小时。存在时，荧光 R110 产物会持续积累，因此将最后的孵育时间延长到 18 个小时能提高信噪比，实现更高的灵敏度。当然，你也可以采用化学发光的方法来检测 caspase，或用 FITC 标记的抑制剂来原位检测 caspase 的活性。

除了监测 caspase 的活性，Promega 还有一些试剂来监测线粒体中的凋亡指示剂，如细胞色素 c。当然，也少不了检测 DNA 片断化的 TUNEL 法。DeadEnd™ 检测系统就是改良的 TUNEL 法。在此系统中，细胞经过处理，变得通透性增加，以便标记 DNA 片断的试剂能够进入细胞。之后，片断化 DNA 的 3'OH 端分别加上了荧光素标记（荧光系统）或生物素标记（显色系统）。该系统很适合对组织切片和培养细胞中的凋亡细胞的胞核进行标记，同时还能进行用于形态学评估。《[DeadEnd\(TM\) 比色法凋亡检测系统：在病理学中的应用](#)》一文就详细介绍了 DeadEnd™ 检测系统在凋亡的细胞模型、

动物模型和多种病理组织切片中的应用。

此外，Promega 的专家还建议使用两种或更多的检测方法来验证凋亡。发生凋亡的细胞将最终发生继发性坏死。经过持续的孵育，凋亡细胞最终关闭新陈代谢，失去细胞膜的完整性，并将内含内容物释放到培养基中。凋亡的标志物如 caspase 活性也只是在某一阶段内短期表达。因此，为了确定凋亡是否是细胞死亡的主要机制，了解细胞死亡过程的动力学非常关键。我们应该从同一个样品中获得多组数据，来进行共同验证。另外，我们也可以将凋亡与细胞活力、毒性分析结合起来，共同评估细胞的状态。

说了这么多，你应该对 Promega 的凋亡产品有了大致的了解吧。另外，还有个东西也值得一提。Promega 的凋亡小助手（Apoptosis Assistant, <http://www.promega.com/apoasst/>) -- 在线的帮助软件能协助你从文献中查找相关的实验信息，连实验优化的时间也节省了。只要你选择诱导剂、细胞类型和凋亡检测试剂，凋亡小助手就会找出文献中曾提到过的凋亡试剂的浓度和诱导时间，以及文献的具体信息。你可以有的放矢地去找寻相关信息，而不再是大海捞针。这样的小工具是不是也特别实用呢？

Promega 的产品一向以质优价廉著称，凋亡产品也不例外，相信会是普通实验室的明智之选。

[欢迎点击索取技术资料和报价！](#)

通用电气为双向电泳提供新的协同解决方案

蛋白质组学的研究终究离不开双向电泳，无论你喜欢与否。但双向电泳中的不确定性却一直困扰着研究人员，让人颇为烦恼。通用电气医疗集团的生命科学部拥有着市场上最多的双向电泳用户，无疑也就有了最丰富的疑难排解经验。据介绍，其实绝大部分问题源自于实验结果中不可控的系统误差。怎么办？可不能让这些系统误差扼杀了我们的研究成果。

为了解决这些问题，通用电气医疗集团生命科学部推出了一系列用于改进和简化整个双向电泳工作流程的新产品，其中包括了从样品制备，到双向电泳本身，再到结果分析，尤其强化了蛋白表达研究的定量。这些简单易用的产品极大地改善了双向电泳实验的数据质量，同时缩减了在蛋白表达分析方面的费用支出并节省了大量时间----采用 2-D DIGE 至少可以节省 3 倍的费用和 6 倍的时间！



在样品制备方面，一系列样品制备试剂盒已正式推出。可别小看了样品制备，要想在双向电泳中获得高质量的结果，细胞裂解和蛋白抽提那可是关键。新上市的 2D 蛋白抽提体验试剂盒含 6 种不同配方，便于用户筛选最合适的样品抽提缓冲液。这 6 种蛋白抽提缓冲液皆源自对可靠而有效的蛋白抽提缓冲液的升级改良，以求进一步提高 2D 凝胶分析中的点分辨率。而哺乳动物细胞蛋白抽提液采

用温和的去垢剂，可以用于贴壁细胞和悬浮细胞的蛋白抽提；酵母蛋白抽提试剂盒无需玻璃珠，采用酶法温和抽提酵母细胞可溶性蛋白，抽提的蛋白可保持生物活性。

在双向电泳方面，新品辈出啊。首先是 IPG 胶条改良了，稳定性、重复性和蛋白点清晰度更佳。IPG 缓冲液的配方同时也改进了。另外，还要欢迎 Ettan 2D 系统中的两个新成员：IPGbox™ 和 IPGbox Kit。IPGbox 的设计经过改进，底座和上盖可以分离，更加友好和稳定，且不透明的盖子让水化在暗处进行，完全适合光敏感的 CyDye DIGE 荧光染料。上盖和插片的设计可保证胶条在水化过程中不会变干，无需再用覆盖油，你再也不用为油而烦恼了。同时一次性使用的水化盘和插片，也保证样品之间没有交叉污染。水化盘经过重新设计后，高疏水性材料保证溶胀液不会粘附在盘上，且水化液均匀分布在盘内，确保 IPG 胶条水化的一致性。

为了进一步简化 DIGE 实验流程，减少系统误差，提高定量准确性，通用电气医疗集团生命科学部还推出了 DIGE 预制胶及 DIGE 胶电泳缓冲液。DIGE 预制胶为 12.5% 胶浓度的低荧光凝胶，灌制在低荧光玻璃板中间，厚度为 1mm，面积为 25x20cm。DIGE 预制胶采用 PPA 缓冲体系。配合相应电泳缓冲液，DIGE 预制胶可以为用户呈献高分辨率、高重复性的结果。此外，CyDye DIGE

荧光染料也换了新包装，分别用于饱和标记和最小标记，更加适合实验设计。



实验是前提，后面的数据分析则更为关键。最新版的 DeCyder 2D 软件是 Ettan DIGE 平台中的核心部分，DIGE 独特的内标和实验设计均精巧地体现其中，使得 DIGE 技术能够为用户检测到微小的差异表达信息并得到准确的定量结果。其自动化的软件设计，极大地减少了用户手工操作的时间，保证了不同用户、实验室之间结果的重复性和可比性。而胶内采用共找点的检测方式，极大地提高了结果的准确率，避免了错误匹配。DeCyder 软件仍然采用 Oracle 作为数据库基础，保证数据交换

的顺畅和数据的安全。同时有了较大程度的改进，界面更加友好，安装更加简单；软件中增加了图像编辑的功能；胶间匹配时增加了“warping”功能，进一步提高了匹配的准确性；增加了更多手工编辑的功能；最值得提及的是，在新版 DeCyder 软件中，EDA 模块作为标准配置添加在 DeCyder 2D 中，无需额外负担任何费用，即可完成多因素的统计分析，寻找分子标志物！

对于流程复杂、对技术要求高的蛋白质组研究而言，通用电气医疗集团所提供的整体解决方案能让工作事半功倍。你无需考虑产品的兼容问题，更专注于实验和结果分析本身。而这些新产品在最大限度地减少系统误差的同时，也将为你带来革命性的双向电泳新体验。

有了这么多利器在手，你再何惧双向电泳？

想了解更多关于双向电泳的技术和产品信息吗？请[点击这里](#)！

（生物通撰稿）

世界上最快的细菌转化

细菌转化的操作已经成为最常规的实验了，不肖多说，生物人都知道。但是，转化过程也是在不断地进化。从前，大家都是自己制备感受态细胞，但转化效率不太高，而且每次的差异较大。渐渐地，一部分先富起来的实验室开始购买商业化的感受态细胞。商业化的感受态细胞也有很多种，今天我们要介绍的是能够实现快速转化的 ECOS 感受态细胞。

ECOS 感受态细胞是由台湾 Yeastern Biotech (益生生技) 开发的，目前由 Sigma-Aldrich 公司代理销售。ECOS 是 E.Coli. One-Step transformation 的缩写，换言之，它是一步法的转化。与传统的转化过程相比，最大的不同是省却了复苏的步骤。一般的转化都需要复苏，整个过程约需 1-2 小时。而 ECOS 跳过了复苏这一步，在 1 分钟转化过后直接涂板，因此过程大大简化。

如果你希望转化效率更高，可以选择 45 秒的热击，不用冰浴，马上涂布在预冷的平板上；如果你赶时间的话，连热击都可省略。

与传统的市售感受态细胞相比，ECOS 感受态细胞的优势在于：

革命性的 1 分钟转化，取代了原先的 1-2 小时
操作步骤大为简化

无需添加 LB/SOC

根据你对效率和便利性的要求，可选择不同的
操作步骤

严格的质控过程，确保每个批次的效率

[点击索取ECOS感受态细胞的更多资料！](#)

ECOS 系列感受态细胞有 5 种，分别适合于不同的应用，比如大质粒、单链 DNA 的克隆，蓝白斑筛选和蛋白表达。DH5a、BL21 这些都是耳熟能详的，而 ECOS C41 和 C43 是后来推出的，因为这两种菌株在毒性蛋白的表达方面比 BL 21 更佳。具体的选择指南详见下表。



克隆应用	ECOS 101 (DH5a)	ECOS 9.5 (JM109)	ECOS Blue (XL1-Blue)	ECOS 21 (BL 21)	ECOS C41/C43
大质粒 > 6 kb	最佳选择	*	*	*	*
亚克隆	最佳选择	合适	合适	*	*
cDNA 文库	合适	合适	合适	*	*
单链DNA	*	最佳选择	*	*	*
快速生长	*	合适	*	合适	合适
突变	合适	*	*	不行	不行
蛋白表达	*	*	*	最佳选择	最佳选择
毒性蛋白的表达	不行	不行	不行	不行	最佳选择
蓝白斑筛选	合适	最佳选择	最佳选择	最佳选择	不行

*表示可应用于此范围，但表现未必最佳

(生物通 余亮)

PIERCE 推出新磁珠，简化蛋白纯化

赛默飞世尔科技近日推出了全新的 Thermo Scientific Pierce Streptavidin Magnetic Beads (链亲和素磁珠)，简化了生物素化分子的分离和纯化，而无需过柱或离心。这种超顺磁的铁氧化物颗粒与市场中的很多磁珠相比，结合能力更高，而非特异结合更低。

磁珠的平均直径为 1 μm ，有 1 ml 和 5 ml 两种规格。每毫克磁珠能结合约 55 μg 生物素化的兔 IgG，或者约 3500 pmol 生物素化荧光素。Pierce 链亲和素磁珠已经过优化，证实能与高通量的磁性仪器共同使用，如 KingFisher 96 和 KingFisher Flex 仪器共同使用。当然，这些磁珠也能用在手动的纯化过程中。

磁珠的表面共价结合了单层的重组链亲和素蛋白。此蛋白分子量为 53 kDa，有着接近中性的等电点。链亲和素与生物素有着高亲和力的相互作用，只有非常苛刻的条件，如在上样缓冲液中煮沸或 8 M 盐酸胍才能将它们有效解离。因此，样品混合物中的其他分子能被洗脱，而保留生物素化的组分。

除了链亲和素磁珠，Pierce 还提供了谷胱甘肽磁珠，用于 GST 融合蛋白的快速有效纯化；蛋白 A 和蛋白 G 磁珠，用于免疫沉淀或抗体的纯化；以及利用二氧化钛磁珠从复杂的生物样品中富集磷酸肽段，用于蛋白质组研究。

如果你还想了解更多关于磁珠及蛋白纯化的信息，[欢迎点击索取资料](#)。

此外，Pierce 的蛋白预制胶正在进行买一赠一的大优惠。即日起至 2009 年 6 月 30 日，凡购买任一种预制胶，均可免费获赠相同产品一个。多多赠，很优惠哦。

Pierce 蛋白预制胶的特点：

- 保质期长：可达 18 个月，最佳使用期 12 个月
- 快速：仅需 45 分钟即可完成电泳
- 高性能：分离能力强，分辨力高
- 上样量大：10 孔胶-50 μl ，12 孔胶-30 μl ，15 孔胶-25 μl
- 易染色：适用于考染和银染，灵敏度高
- 易转膜：90 分钟内蛋白可被高校转移到 NC 膜或 PVDF 膜上
- 兼容性好：与大多数市售电泳槽相容

详情请登陆生物通特价专栏或 <http://www.ebiotrade.com/custom/ThermoFisher/090505/>。

MACSelect 系统—转染后的明智之选

光阴荏苒，岁月如梭，做实验的时光总是过得特别快。转染后的细胞筛选，动辄几个星期，多则数月，真是急得人直跳脚。MACSelect 的登场，让一切问题都迎刃而解了。

德国美天旎公司推出的 MACSelect™ 系统，是一种转染细胞分选系统，可以磁性富集已转染的哺乳动物细胞。无论是原代细胞或难转的细胞系，也不论是贴壁或悬浮细胞，在常规转染后都能分选。高比例的阳性细胞和最小的非转染细胞的背景，增加了下游的分析显著性和可靠性。

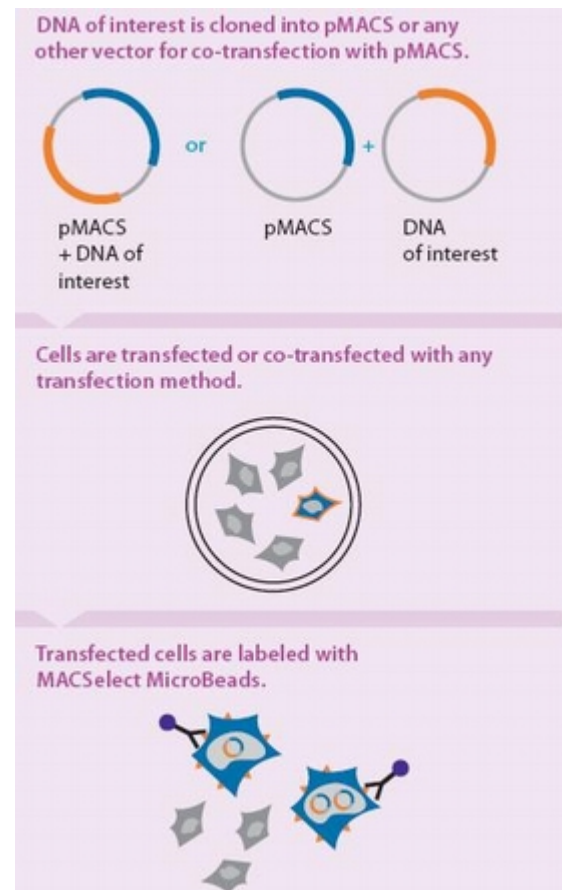
与耗时的抗生素筛选相比，使用 MACSelect 技术，仅需 3 小时就能挑选出转染阳性细胞。重复的 MACSelect 挑选，可得到稳定表达的细胞系。温柔的 MACS 磁珠极小，直径仅有 50 nm，对细胞无毒性，不影响细胞功能，还能降解。筛选出的细胞能直接进行功能研究或细胞培养。同时，你也无需改变转染方法。只要加入 MACSelect 的筛选标志，任何转染方法：电转、磷酸钙、脂质体或核转染都 OK。

MACSelect 是一个聪明的系统。选择标志物共表达在细胞表面，已转染的细胞可通过磁性标记从未转染的细胞中分选出来。所有的 pMACS 载体编码的表面标志物都删除了胞内 domain。使用 pMACS 载体和表达载体的共转是最简单的 MACSelect 系统使用方法。当然，也可以把基因克隆到 pMACS 载体进行单转。

美天旎提供的筛选标志有三种：CD4、H2-KK、LNGFR。MACSelect 4 系统使用修改的人 CD4 分子作为选择标志物。它适用于 CD4 阴性细胞系。MACSelect KK 系统使用修改的小鼠 MHC I 分子 H-2KK 作为选择标志物。仅有极少的鼠系细胞表达 H-2KK，因而其可用于几乎任何哺乳动物细胞。

MACSelect LNGFR 系统使用的人低亲和度神经生长因子受体 (LNGFR) 分子经过修改。表达 LNGFR 分子的细胞有：中枢和外周神经系统细胞，骨髓成纤维细胞，滤泡树突状细胞和一些间充质细胞。因此，载体也有常规和双顺反子两类。

几个小时后，转染后的细胞就被 MACSelect 磁珠标记上，并通过磁性作用在 MACS 的柱上进行分离。如果是手动操作，MS 或 LS 柱加 MACS 分离器就行，如果是高通量的分析，autoMACS 将是个不错的选择。



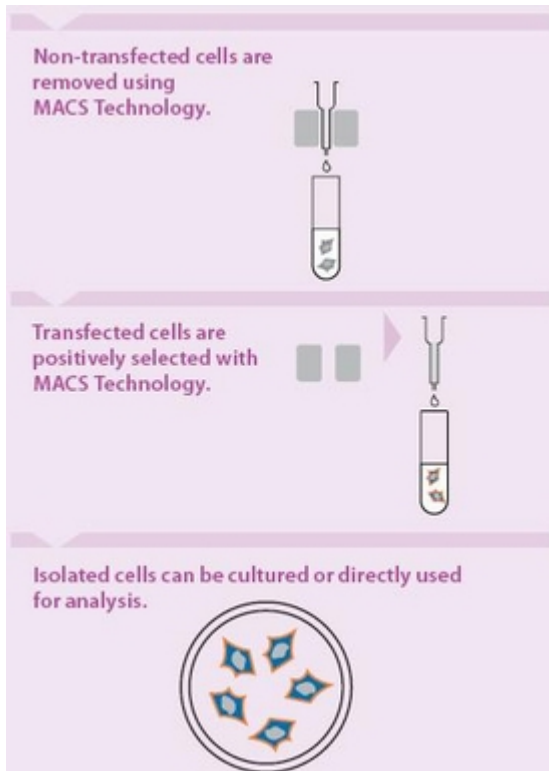


图 1. MACSelect 的步骤

无论你进行功能基因分析、药筛、报告基因检测，还是 RNAi，转染都是必不可少的步骤。那么，试试 MACSelect 吧，3 小时筛选出转染细胞，花最少的时间获得最大的结果！

GE 推出 IN Cell Analyzer 2000 细胞成像系统

通用电气医疗集团 (GE Healthcare) 近日推出了 IN Cell Analyzer 2000 — 适用于高内涵分析的细胞成像系统。该系统的灵活性让研究人员用单个仪器就能完成过去具挑战性的实验：从显微观察到自动化筛选，以及细胞器、细胞、组织和整个生物体的成像。

IN Cell Analyzer 2000 有着硬件和软件的独特组合，能够非常快速地获取图像，是筛选的理想选择。该仪器是利用六西格玛原理来设计的，结构坚固，能确保它在多用户环境中高通量应用的可靠性。

该系统有着一些新特征，包括：

在获取图像之前对样品的选定区域进行快速的预览扫描

高性能大芯片 CCD 照相机加上宽视野光源，确保在统计学上更可靠的结果

全孔成像在单张图像中捕获整个孔的信息，提高对稀有事件成像的能力

宽范围的物镜 (2x-100x)，满足多种灵敏度的要求

6 种图像复原模式，确保对于任何样品类型获得高质量的图像和准确的数据

利用预览扫描和直观的图形用户界面快速获取图像

GE Healthcare 的项目经理 Leighton Howells 表示：“IN Cell Analyzer 2000 的开发是为了满足整个高内涵成像流程的需要：结合直观的软件，以及专业的仪器和应用支持，即使是最具挑战性的高内涵分析现在也变成常规的事情。细胞分析变得更简单。IN Cell Analyzer 2000 的上市兑现了我们为细胞成像科学家持续开发领先方案的承诺。”

该仪器在上个月底法国里尔的生物分子科学学会 (SBS) 第 15 届年会上展出。更多信息，请访问：www.gehealthcare.com/incell。

号外号外！2009 年第 3 期 GE Healthcare Bioprocess Newsletter 新鲜出炉啦。在本期你将阅读到完整的单克隆抗体解决方案、详尽的抗体纯化手册，以及抗体生产中应用的新产品和新技术。前 20 名阅读后填写信息反馈表的读者还将获赠 4G 优盘一个，先到先得哦。[阅读请进](#).....

关于高内涵分析

高内涵分析 (HCA) 和高内涵筛选 (HCS) 是生命科学研究的许多领域及药物筛选中必不可少的工具。HCA 以高通量成像和分析形式进行细胞分析，让研究人员能完成更复杂的实验，从而提出更多的问题，同时还减少了实现结果所需的时间。与其他方法如显微镜、western blotting 或流式细胞仪相比，HCA 是非破坏性的，所需时间更少，科学家能更轻松更有效地研究胞内进程。它让研究人员能在更短的时间内获得更佳的数据以及关于细胞系统的更多知识。

关于 GE Healthcare 的 IN Cell Analyzer

IN Cell Analyzer 是模块化的成像系统，用于快速、自动化的高内涵分析。这个先进、高灵敏的平台能让科学家在科研和药物开发中在真实的生物背景下研究细胞进程。它提供了高通量显微成像，再加上现代细胞分析和机械化操作，能进行自动的细胞成像和分析。IN Cell Analyzer 是市场上最多功能的 HCA 产品之一，在模块性、完整性和易用性方面尤为突出。它曾获得 2007 Frost & Sullivan 技术创新奖。关于 IN Cell 系列的更详细信息，请访问 www.gehealthcare.com/incell。

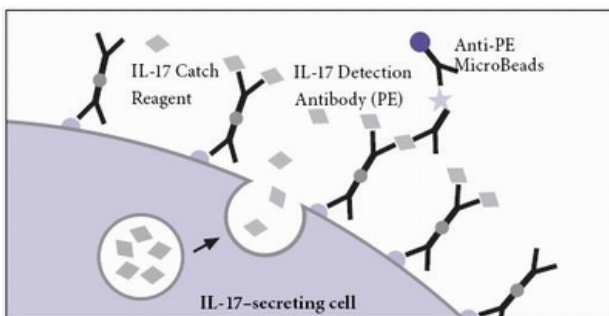
(生物通 余亮)

如何富集和检测分泌 IL-17 的活 T 细胞？

白介素 17 (IL-17) 是 IL-17 家族 (IL-17A-F) 中的一员，是二硫键相连接的同型二聚体糖蛋白。人 IL-17 包含了 155 个氨基酸，分子量约为 35 kDa。IL-17 是由 CD4⁺ T 辅助性 T 细胞产生的。IL-17 在细胞抵御细菌和真菌感染以及自身免疫病中扮演了重要的角色。为此，德国美天旎公司开发了 IL-17 分泌分析产品，用于富集和检测分泌 IL-17 的活 T 细胞。

IL-17 分泌分析的原理

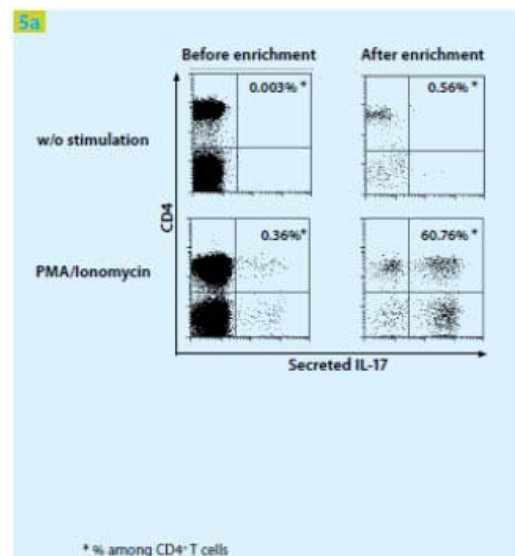
分析的起始材料为全血、外周血单核细胞 (PBMC) 或其他包含单层细胞的白细胞。T 细胞以多克隆刺激物短暂刺激后，细胞被 Catch Reagent—双特异性的抗体 (CD45/IL-17) 所标记。在 37°C 再培养细胞 45 分钟，使得 IL-17 分泌。分泌出来的 IL-17 则被细胞表面的双特异性的抗体所结合。然后，加入抗 IL-17 的荧光抗体，分泌 IL-17 的细胞就可以被流式细胞仪检测出来。再加入抗荧光抗体的微珠，即可进行分选。磁性标记的细胞保留在 MACS 柱中，而未标记的细胞则被洗脱。将柱子移出磁场，分泌 IL-17 的细胞则洗脱成为阳性选择的细胞组分。这些细胞现在可用于培养或分析。



范例

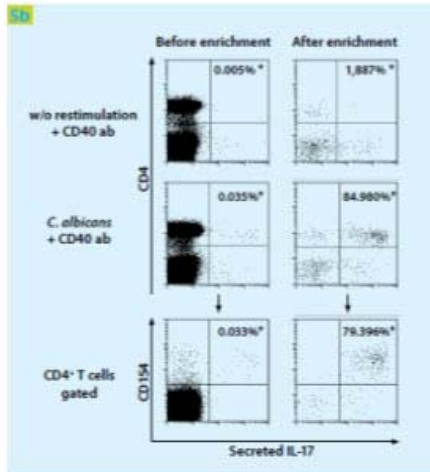
一、小鼠脾脏细胞用 PMA/Ionomycin 刺激三个小时，分泌 IL-17 的 T 细胞被检测，加入抗 PE 的微珠，从而可用 MACS 技术富集。经过刺激的样本，分泌 IL-17 的 CD4⁺T 细胞富集后，表达频

率从 0.36% 上升到 60% 以上，从 106CD4⁺T 细胞中回收了 1444 个细胞 (=0.14%)。而未经过刺激的样本在富集前，分泌 IL-17 的 CD4⁺T 细胞仅有 0.003%，富集后的表达频率有 0.56%，从 106CD4⁺T 细胞中仅回收了 6 个分泌 IL-17 的细胞。



二、人 PBMC 在 CD40 抗体存在下经过抗原再刺激 13 小时。分泌的 IL-17 被检测，再标记抗 PE 的微珠从而被磁性富集。经过刺激的样本，0.035% 的 CD4⁺T 细胞分泌 IL-17。经富集后纯度可达到 85%，从 106CD4⁺T 细胞中回收了 248 个分泌 IL-17 的细胞 (=0.025%)。而未经过刺激的样本，富集前仅有 0.005% 的 CD4⁺T 细胞分泌 IL-17。富集后纯度为 1.89%，从 106CD4⁺T 细胞中仅回收了不到 1 个分泌 IL-17 的细胞。富集的

IL-17+CD4+T 细胞有 97% 共表达活化标志 CD154，从而证实了该检测和富集方法的特异性。



应用

- 检测并富集分泌 IL-17 的活白细胞
- 检测并富集分泌 IL-17 的活 T 细胞，用于表型鉴定、扩增和功能鉴定
- 监测并分析抗原特异的 T 细胞免疫，如细菌和真菌免疫、自身免疫和其他炎症紊乱
- 分离和扩增抗原特异的 T 细胞
- 分析或克隆抗原特异 T 细胞的 TCR 库

剑桥大学发表利用 SOLiD 进行单细胞转录组分析的新方法

纽约 (GenomeWeb 消息) - 剑桥大学以及美国应用生物系统公司 (Applied Biosystems) 的研究人员近日发表了一篇利用 mRNA 测序对单细胞的全转录组进行分析的论文。该论文今天发表于《Nature Methods》(《自然-方法》) 在线版。

通过修改现有的单细胞 DNA 扩增方法, 研究小组解决了利用美国应用生物系统公司的 SOLiD 测序对单个细胞进行数字化的基因表达分析。当他们将此方法应用于单个小鼠卵裂球时, 研究人员发现他们可以测定几乎所有芯片技术所能检测到的基因的表达, 此外还包括芯片未能检测到的近 5200 个基因。该方法还揭示了 1800 个以前未曾检测到的剪接点。

利用同样的方法, 研究人员发现在缺乏 Dicer 或 Ago2 (二者均为 microRNA 加工机制的元件) 的小鼠卵细胞中上千个基因的表达上调或下调。

文章的第一作者, 剑桥大学的研究人员 Azim Surani 与他的合作者们表示: “这种单细胞 mRNA-测序分析方法将大大增强我们在研究哺乳动物发育过程中——尤其是胚胎发育早期和干细胞这种体内稀有群体中——对单个细胞中转录组复杂度的分析能力。”

文章作者提到, 高通量转录组测序方法在过去就已开发, 但是需要相当大量的 RNA, 这就需要从多个细胞中收集。而且这种合并的分析不能反映单个细胞中发生的事件, 或许那才是生物相关的。

《GenomeWeb 每日新闻》的姐妹刊物《测序》在去年 11 月报道过, Surani 和他的同事们通过选择性扩增带有 polyA 尾巴的 RNA 来解决这个问题——这种方法在挑出 mRNA 的同时也挑出了一些非编码 RNA。他们还略微调整了构建 RNA 文库的方

法以改善其重复性, 然后才进行 RNA 测序、以及将读数定位于小鼠 RefSeq 数据库的转录本。

在今天发表的研究中, 研究小组在单个的小鼠卵裂球中检验了 mRNA-Seq 方法, 卵裂球是胚胎干细胞的前体, 可从小鼠胚胎的四细胞期中分离。然后将上万个 35-50 bp 的读数定位于已知的 RefSeq 转录本上。

他们的结果与之前研究人员利用 Affymetrix 芯片检测 80 个四细胞期小鼠胚胎混合物的表达结果非常相似。对于芯片所鉴定的 94% 以上的基因, 用测序方法都可检测到五个或更多的读数。

此外作者还提到了 mRNA-Seq 方法还发现了 5270 个芯片未检测到的基因, 其中包括 1000 多个芯片上还没有探针可供检测的转录本。

尽管芯片分析还检测出了近 400 个 mRNA-Seq 所未能发现的基因, 但研究小组通过实时定量 PCR 进行的后续分析表明, 这些基因中的大多数是假阳性, 或只是在芯片所评估的混合胚胎中的个别胚胎中表达。

Surani 及合作者们表示: “也有可能是某些低表达的基因, 它们的表达可能在单细胞中随机开启或关闭, 而在我们用 mRNA-Seq 分析的单个细胞中这些基因或许未表达。”

随后的实验显示 mRNA-Seq 检测到多个已知在胚胎发育中发挥作用的基因的表达。

当研究人员聚焦于单个卵裂球中获得的 50 bp 数据时，他们发现了数千个新的剪切拼接：约 6700 个拼接由至少两个读数代表，而 1753 个由五个或更多的读数代表。在卵裂球中，研究人员还检测到大约 19% 的表达基因有着两种以上的不同转录本。

在单个的成熟小鼠卵母细胞或卵细胞中，研究小组发现了有着两个以上读数的约 9000 个剪接，以及有着五个以上读数的近 2100 个剪接。

接着，研究小组利用 mRNA-Seq 方法来研究缺乏 Dicer 或 Ago2 的小鼠卵细胞中的基因表达情况与野生型的卵母细胞相比之下的变化----Dicer 和 Ago2 是 microRNA 加工机制中的元件。

他们发现，在缺乏 Dicer 的卵母细胞中，有 1696 个转录本上调。在缺乏 Ago2 的卵母细胞中，

1553 个基因上调，其中 619 个在 Dicer 突变体中表达也明显升高。Dicer 或 Ago2 的敲除分别导致 1571 或 1121 个基因的表达下降，其中 589 个基因在两种突变体中都下调。

尽管研究小组极力赞扬新的 mRNA-Seq 方法是测量基因表达和发现新剪接异构体的新方法，无偏向性的同时背景噪音也极低，但他们也承认仍存在着局限。

例如，他们提到由于采用了 poly(T)引物，目前的 mRNA-Seq 方法只能检测带有 poly(A)尾巴的转录本，这样就错过了组蛋白和其他 mRNA。他们还提到此方法不能检测 3000 个碱基以上的 mRNA 的 5'端，也不能分辨正义链和反义转录本。

(ABI 供稿，生物通翻译)

Illumina 测序仪在试剂和软件上大升级

Illumina 近日宣布，其测序平台的软件有了突破性的改进，能进行实时分析，并显著降低了计算机运行设施的需求。这些软件改进，再加上新的 Genome Analyzer IIx，让研究人员相对 Genome Analyzer II 而言，测序产量能提高 65%。然而，与当今数据越多，所需的计算能力也要相应提高的趋势截然相反，Illumina 正通过实现仪器控制工作台的碱基检出和质量评估，来简化计算和数据处理。

Illumina 进一步优化了图像处理和数据分析，来支持测序产量的提高。软件改进包括改良的簇检测，每个流动池的读长增加 40%，更低的错误率。算法优化上的突破让标准的仪器控制台能将实时的碱基检出和数据处理相整合，而无需转移大的数据文件，并将数据存储的需要最小化。

最新的 Genome Analyzer IIx 创新实现了数据产量和质量的显著提高，代表了 Genome Analyzer 开发道路上一个重要的里程碑。新产品简化了从样品制备到数据分析的流程，增加了数据产量和质量，并扩展了 Genome Analyzer 的应用。

Genome Analyzer IIx 有两个核心特征：其一是更大的试剂冷却器，支持超过 100 个测序循环，进一步提升了系统的易用性和自动化；其二是全新的流动池支架，让每轮运行所得的高质量数据增加 20%。依靠这些软件和试剂的改进，Genome Analyzer IIx 现在能够 100 bp 以上的配对末端读长，并在每次运行中产生超过 20 GB 的高质量数据。Genome Analyzer II 的用户只需订购 Genome Analyzer IIx Upgrade Kit，就能轻松升级到全新的系统。

Illumina 的首席信息官 Scott Kahn 认为：“研究人员利用 Illumina 技术所产生的测序产量正在

迅速增加。研究人员将在年底实现每轮运行获得 95GB 数据，而这些 Genome Analyzer II 信息学上的改进则象征了此道路上的最新里程碑。有了数据产量的增加，计算设施也要相应地增加。但我们扭转了这个趋势，将每轮运行所能提取的序列信息最大化，同时将计算方面的负担最小化。结果是简化了数据管理过程，并支持生物学的持续发展。”

关于 Illumina

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

(生物通 余亮)

SOLiD 3 单次运行可产生 50 Gb 人 基因组序列数据

美国应用生物系统公司(Applied Biosystems)今日宣布该公司研究人员已成功在 SOLiD 3 测序仪的单次运行中产生了高达 50 Gb (gigabase) 的人类基因组序列数据, 相当于人类基因组的 17 倍覆盖度。

这次的配对末端数据是在与贝勒医学院人类基因组测序中心 (HGSC) 合作的研究项目中产生的, 贝勒医学院人类基因组测序中心提供了测序样本, 它来自一位患有某种遗传病的个体。

作为与贝勒医学院人类基因组测序中心 (HGSC) 合作的第二个项目的一部分, ABI 研究人员利用 SOLiD 对来自人脑癌症样品进行测序, 在单次运行中产生了 30 Gb 数据, 相当于人类基因组 10 倍的覆盖度。

美国应用生物系统公司表示, 在这些项目中使用的 SOLiD 系统已安装了全新的微珠搜获和定量基因组分析软件。

该公司发言人表示, 人类基因组测序中心的成员 David Wheeler, 他同时也是一位分子和人类遗

传学的副教授, 将于今天晚些时候在冷泉港实验室的基因组生物学年会上展示这些项目的数据。

根据美国应用生物系统公司的说法, 人类基因组测序中心目前已经拥有 10 台 SOLiD 系统, 用于包括癌症和遗传病在内的多种人类疾病的研究项目。

一年前, 人类基因组测序中心宣布购买了 6 台 SOLiD 仪器, 计划将其用于千人基因组计划。(详情请看 [In Sequence 4/29/2008](#))

[点击索取 SOLiD 系统的更详细资料!](#)

(ABI 供稿, 生物通翻译)

赛默飞世尔 KingFisher 技术快速高通量检测 A 型 H1N1 流感病毒

赛默飞世尔推出 A 型 H1N1 流感病毒 RNA 提取的快速方法，通过专利的 KingFisher 系列磁珠提取纯化技术，结合一些专业磁珠试剂盒，如 Macherey-Nagel 公司的 NucleoMag Virus kit, Invitex 公司的 InviMag Virus RNA kit, Ambion (ABI)MagMAX Viral kit, Roche 公司 Magna Pure RNA or total NA kit, chemagen 公司的 Chemagic Viral Kit 等，可在 15-30 分钟内快速提取 96 个样品的病毒 RNA，提取的高质量 RNA 可直接进行 real-time RT-PCR，确诊样品是否含有 A 型 H1N1 流感病毒。世界卫生组织 (WHO) 于 2009 年 4 月 28 日公布的 CDC qRT-PCR 检测方法中推荐磁珠法纯化病毒 RNA 作为 A 型 H1N1 流感病毒快速诊断实验步骤中核酸提取的方法之一。

赛默飞世尔的 KingFisher 系列磁珠分离技术已经通过美国国家兽医服务实验室 (NVSL) 认证可用于 AI/ND 病毒，并成功用于禽流感病毒，新城疫病毒，牛腹泻病毒等传染性疾病的检测和诊断，总体时间约 4 个小时。详细情况请参考[赛默飞世尔公司参与推出禽流感快速高通量检测新技术](#)。该技术同样适用于 A 型 H1N1 流感病毒快速高通量检测。

KingFisher 可以从生物体液和无细胞样品中，如血清、血浆、口腔拭子和细胞培养液中，提取病毒 RNA。从无细胞样品中分离纯化 RNA 比从组织和培养细胞中分离纯化 RNA 更具挑战性。这是因为低的病毒滴度、大的操作体积和样品的复杂性，且操作步骤必须适合实时定量 RT-PCR。使用 KingFisher 自动化磁珠提取方法可满足上述各项要求，赛默飞世尔公司的 KingFisher 专利磁珠提取技术，不需有机溶剂或 RNA 沉淀步骤，消除了基于滤膜的方法经常碰到的问题，如滤膜堵塞、大的洗脱体积和不稳定的产率，同时保证了 95% 以上的磁珠回收率，保证痕量样品 RNA 的充分提取。而结合后续的实时定量 RT-PCR，可仅检测到低至 10 拷贝的病毒 RNA，极大提高了 A 流感病毒检测的灵敏度。

基于 [KingFisher 磁珠纯化系统](#) 的 A 型 H1N1 流感病毒 RNA 提取的快速方法优势如下：

极高灵敏度：可从 100-400ul 样品中分离到至少 10 拷贝的病毒 RNA

检测速度快：对于 96 个样品，整个磁珠提取纯化病毒 RNA 过程为 15-30 分钟，整个 A 型流感检测过程不超过 4 个小时

衡量样品的极佳检测：真实反映痕量病毒样品的含量，避免假阴性

线性纯化效率低至 50 转录子

经美国国家兽医服务实验室 (NVSL) 认证可用于 AI/ND 病毒

此外，赛默飞世尔科技还提供与 A 型 H1N1 流感病毒 RNA 检测相关的整体解决方案，包括从取样，传送，分离，病理学确认，分子生物学鉴定，样品保存。从耗材到仪器包括：低温保存系统：液氮罐和超低温冰箱，取样传送的耗材：Nunc/Nalgene 的取样瓶，试管，带滤芯的 TIP 头，各种移液器等，Nanopure UF 和 Nanopure UV/UF 超纯水仪提供无核酸酶的纯水，具备生物安全认证的 Pico&Fresco17 /Micro17&17R 微量离心机等，如需要更多信息，欢迎访问www.thermo.com.cn或

致电 800-810-5118。

相关文章：

[利用KingFisher技术快速和高通量检测A型H1N1流感病毒的原理与方法](#)

[KingFisher全自动磁珠纯化系统快速检测猪流感病毒](#)

[赛默飞世尔推出 4 小时快速检测禽流感的新技术](#)

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）。