

EBIOTECH

生物通技术周刊

第65期
2009年8月6日
全文下载

[技术前沿]

没有P的qPCR
荧光蛋白的研究进展
微孔板细胞仪在高通量化高内涵RNAi筛选中的应用

[新品速递]

一种新型的简易蛋白芯片
如何快速准确地滴定杆状病毒?
新一代萤光素酶报告基因载体
Millipore又推出三款荧光干细胞系
GE推出生物素捕获试剂盒，用于Biacore系统分析
Invitrogen推出细胞资源中心和干细胞改造工具
罗氏Innovatis推出Cedex HiRes，实现高分辨率的细胞数字成像

[应用指南]

冷泉港发布7月份实验手册
4个步骤，玩转HaloTag多能融合标记蛋白
IN Cell Analyzer 2000：让最具挑战性的高内涵分析高效完成

[行业动态]

揭秘Illumina的个人基因组测序服务
罗氏宣布454 10GB资助计划的获奖者
赛默飞世尔启动RNA干扰研究/药物筛选资助项目
TTP LabTech助力TTP集团荣获极具声望的企业女王奖

没有 P 的 qPCR

qPCR 中的 P 代表什么？Polymerase，聚合酶。如果 qPCR 少了聚合酶，你一定觉得这是在开玩笑，巧妇难为无米之炊，没有聚合酶，定量 PCR 还怎么做。

一直以来，研究人员在尝试创造自我复制的酶。实现这个目标的方法之一是用 RNA 酶来催化 RNA 分子的复制，包括 RNA 酶本身。这已经通过交叉催化（cross-catalytic）系统来实现了，它包括两个 RNA 酶，它们能利用四种底物成分来催化彼此的合成。

“R3C”就是一种能自我复制的 RNA 酶，但不是从核苷酸到核苷酸，而是通过碱基配对将两个 RNA 核苷酸连在一起。但是，这个过程效率很低，因为底物形成了无生产力的复合物，限制了指数级的增长，而倍增时间长达 17 小时。美国斯克里普斯研究所（Scripps Research Institute）的 Gerald Joyce 和他的同事就一直在研究并改进“R3C”连接酶。

他们将 R3C 转变成交叉催化的形式，在那里正链酶将两个 RNA 分子组合起来，产生非常相似的负链酶，这个负链酶反过来又连接两个底物，形成正链酶。随后，Joyce 他们利用体外演化（*in vitro evolution*）来改善这种 RNA 酶的催化性质。在他们的努力下，当加入新鲜的寡核苷酸和镁离子之后，这些酶能够在 42°C 的恒温下以指数方式自我扩增，倍增时间缩短至 1 小时。

Joyce 认为：“这种复制品的最大应用是它是分子事件的信号放大器。”他指的是将催化结构域和配体结合结构域（适体，aptamer）结合起来，产生“适酶（apatazyme）”，这样扩增就成为配体依赖型。在配体存在时，适体序列是有序的，“适酶”的催化结构域也是，从而实现了指数级的扩增。

但是当缺乏适当的配体时，整个分子就变得不稳定，连接酶活性也丧失。RNA 的指数增长率取决于配体的浓度，这就能确定样品中配体的浓度。这个过程与定量 PCR 是相似的，但是适用性更广。多种目标都受用，包括与诊断和环境监测相关的蛋白和小分子。

随着适体开发成为一种常规的方法，该系统能用于检测从蛋白到代谢物的所有分子。同时，研究人员也在对适酶系统进行改进，Joyce 认为一年内倍增时间将缩短至 10 分钟。根据这种分子的动力学特性，他认为 1 分钟也是完全可行的。（生物通薄荷）

原文检索：

Lam, B.J. & Joyce, G.F. Autocatalytic aptazymes enable ligand-dependent exponential amplification of RNA. *Nat. Biotechnol.* 27, 288–292 (2009).

Lincoln, T.A. & Joyce, G.F. Self-sustained replication of an RNA enzyme. *Science* 323, 1229–1232 (2009).

生物通编者注：

什么是适体？适体是与特异靶分子结合的寡核苷酸或肽段分子。它们通常从大的随机序列库中挑选而出，天然的适体也存在于核糖开关中。适体可用作基础研究，或作为高分子药物应用于临床。适体可分为核酸适体（DNA 或 RNA 适体）及蛋白适体。

荧光蛋白的研究进展

自从上世纪 60 年代在水母中发现 GFP 以来，荧光蛋白的发展非常迅速。去年，诺贝尔化学奖也授予了荧光蛋白的发现者和改造者。钱永健先生便是其中之一。正是由于他的努力，如今天然和改造的荧光蛋白才能比彩虹还要绚丽。

荧光蛋白的主要作用是以绚丽的颜色标记细胞结构和监测胞内过程，它还用于细胞群体的体内示踪，如肿瘤细胞。迄今为止，在活体动物中成像的最好工具是远红外荧光蛋白，因为在可见光谱的远红外部分，自体荧光和动物组织的光吸收都是最小。然而，要产生远红外荧光，这些蛋白需要被 600 nm 左右或以下的光激发，但这些光在到达深处的组织之前，就已被血红蛋白大幅度减弱。因此，到现在为止还未开发出激发光谱在 700 nm 附近的荧光蛋白。

钱永健的实验室最近采用一种新的方法来开发体内成像的荧光蛋白。他们没有像惯常的一样，从红色荧光蛋白开始，将它们改造得更亮，而是从一种新的骨架来开发红外荧光蛋白。他们从一种耐辐射奇球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的细菌光敏色素骨架入手，这种光敏色素吸收 700 nm 左右的光。它还结合了一种名为胆绿素的辅因子，作为发色团。文章的第一作者 Xiaokun Shu 介绍到：“目前已获得截短的光敏色度晶体结构，它利于蛋白质工程。我们的目标是固定结合的胆绿素，以便减少非辐射性衰减，这样吸收的 700 nm 光子就能够随荧光发出。”

利用饱和突变和 DNA 改组 (DNA shuffling) 来改变胆绿素发色团的蛋白残基，钱永健及他的同

事们发现了一种光稳定的红外荧光蛋白突变单体，它的激发波长是 684 nm，发射波长是 708 nm。当他们利用腺病毒载体在小鼠肝脏表达这种突变体时，观察到强烈的红外荧光。

除了体内成像应用，红外荧光蛋白还能用于细胞成像。它的颜色与目前存在的荧光蛋白不同。而且，红外区域的细胞自体荧光几乎是不存在的，因此提供了更清晰的图像。红外荧光蛋白还能在荧光共振能量转移 (FRET) 中发挥作用。

红外荧光蛋白应该不会局限于耐辐射奇球菌的光敏色素，还存在许多种细菌光敏色素，它们的吸收最大值在 650 到 750 nm 之间。因此，Shu 博士表示，这些也是红外荧光蛋白的有力候选，它们能用于多色成像、以及体内 FRET 成像的供体或受体。（生物通 余亮）

原文检索：

Shu, X. et al. Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science* 324, 804–807 (2009).

[QIAGEN新一代非脂质体转染试剂Attractene优惠体验中！](#)

微孔板细胞仪在高通量化高内涵 RNAi 筛选中的应用

从最初对 RNAi 的晦涩理解，到如今 RNAi 技术突飞猛进，虽然只有短短的十年，而 RNAi 技术一日千里。如今，RNAi 药物已经从实验室迈入临床阶段。不得不说，RNAi 技术渗透到了生命科学领域的每个角落。而科学家们也不再满足于单个基因的 RNAi 研究，在这个高通量、讲效率的年代，基因组范围的 RNAi 研究才能让我们更快地了解更多新基因的功能。此外，RNAi 在基因沉默上的巨大威力让它迅速成为药物筛选的新宠，在药物靶点基因的鉴定上发挥着重要的作用。

如何进行高通量化高内涵的 RNAi 筛选？这恐怕要从微孔板读数仪说起。微孔板读数仪经过不断演化，已经从检测每个孔平均信号的光电倍增管进化到了解单细胞特征的显微镜样成像系统。目前的微孔板读数仪在读板速度和提取的信息量上差异很大。有的读数仪非常快，1 分钟就能捕获板上的所有信息，但它们只能测量每孔中细胞群体产生的总体信号。而另一方面，高内涵筛选成像仪为每个孔提供了丰富的数据，但是，它们的扫描速度较慢，产生很大的数据文件，不利于高通量的大规模筛选。如何做到鱼和熊掌兼得？TTP Labtech 公司开发出一种独特的激光扫描微孔板细胞仪 Acumen Explorer™，满足了筛选用户的急切需求。

Acumen Explorer™能够对荧光标记细胞进行快速高内涵的筛选。它可配置单色、双色或三色激光，有 205nm、488nm、633nm 三种激光模式可供选择，确保能与广泛的荧光探针兼容。Acumen 通过大视野广角镜头以激光扫描微孔板或玻片的底部，且读取数据的速度不受板密度的影响，因此无论是 24 孔板还是 1536 孔板，每块板的分析都只需要 10 分钟。为了适应分析开发、分析验证和筛选科学家的不同要求，Acumen 产生的数据能以 3 种细节层次进行收集。在分析开发模式下，Acumen 收集微孔板准中每一个细胞的多维信息，为分析方法的建立提供全面的数据；在高通量筛选模式中，在对所有细胞的信息分析完成后，软件仅

报告所有的群体统计数据，将文件大小降低到 50 KB，既便于管理，也省去了购买数据存储服务器的需要。Acumen 能对贴壁及悬浮细胞，活细胞和固定细胞进行筛选，与所有符合 SBS (Society for Biomolecular Screening) 标准的平板兼容。这些特征说明 Acumen 非常适于 RNAi 库的表型筛选。本文就列举了 Acumen 微孔板细胞仪在高通量化高内涵 RNAi 筛选中的应用。

I. Acumen 能够快速可靠的用于细胞周期相关基因的初筛

德国马普学会细胞生物学和遗传学部门的 Ralf Kittler 等专注于细胞分裂必需基因的研究，近来一篇使用 Acumen 用于细胞周期相关基因研究的文章发表在 Nature 的 Cell Biology 上¹。由于细胞分裂调节的缺陷会引发多种疾病，特别是白血病和其他癌症，因此，对人类细胞中细胞分裂必需基因的整体纵览不仅能加深基础生物学过程的了解，还可能为癌症带来全新的诊断和治疗靶点。

他们利用 RNAi 库进行基因组范围的整体研究。不过，他们使用的 RNAi 库可不是一般的 siRNA，是由内切核酸酶制备的小干扰 RNA，简称为 esiRNA。与普通的单个 siRNA 对应单个基因不同，esiRNA 集合了数百个针对单基因靶点的 siRNA。这种新型武器能避免有效 siRNA 的反复筛选过程，迅速实现基因沉默，并确保脱靶效应最低。

并且该方法的有效性在另一篇筛选HeLa细胞增殖必须基因的研究文章中被证明过²。

为了鉴定 HeLa 细胞中的细胞分裂基因, Kittler 等使用 Acumen 开发出一种快速可靠的高通量 DNA 含量分析方法, 作为细胞周期逃逸和倍体表型改变的最初检测 (图 1)。他们用靶定 17828 个基因的 esiRNA 库来转染 384 孔培养板中的细胞。72 小时之后固定细胞, 并用 PI (Propidium Iodide) 染色。随后用 Acumen Explorer 微孔板细胞仪进行扫描。通过分析 Acumen Explorer 软件生成的 DNA 含量直方图, 定量细胞数目和 subG1、G1、S、G2/M 期、4N-8N 和 8N DNA 含量细胞的百分比。之后对获得的 DNA 含量直方图进行打分。如果与阴性对照差异显著, 就归为阳性 (hit)。利用这些标准, 他们找到了 2146 个改变细胞周期或倍体的基因。当然, 筛选通常会由于实验误差而产生假阳性。而脱靶效应会让 RNAi 筛选的假阳性更多。为此, 研究人员开发出三步的验证步骤, 即通过荧光成像显微镜、流式细胞仪和时间延时摄像显微镜进一步分析。最终, 利用初筛+三步验证, 研究人员发现了 1351 个参与细胞分裂过程的基因, 其中包括已经发现但还未报道与细胞周期有直接关系的 882 个基因, 尚未被基因组数据库确定的 252 个基因, 以及 217 个已经报道与细胞分裂有关的基因。而且这 1351 个基因中囊括了两个控制胞质分裂的进化保守的转录调控网络。

传统的使用 CCD 成像原理的细胞周期分析并不适用于这个分析, 由于它只能获取每孔中极小部分细胞, 因此在分析过程中无法使用全细胞数进行均一化, 所获得的数据可靠性下降 (例如由于细胞培养过程中的细胞分布不均匀的情况), Acumen 的全孔扫描方法则有效的避免了这一缺陷。基于流式细胞仪的实验方法由于其实验方法的复杂性 (例如, 细胞需要重悬), 整个实验时间可能需要 7 个月。而基于 Acumen 方法无需重悬细胞, 实验周

期只有 7 天, 其中使用 Acumen 进行扫描和数据分析仅仅占了 2.5 天, 并且获得了高质量的数据。而且基于模板式的分析方法避免了人工干预对实验结果的影响。可见 Acumen 在用于全基因组范围的高通量化高内涵 RNAi 筛选研究时, 能够有效的提高速度和结果的可靠性。

[点击索取Acumen微孔板细胞仪的更多资料!](#)

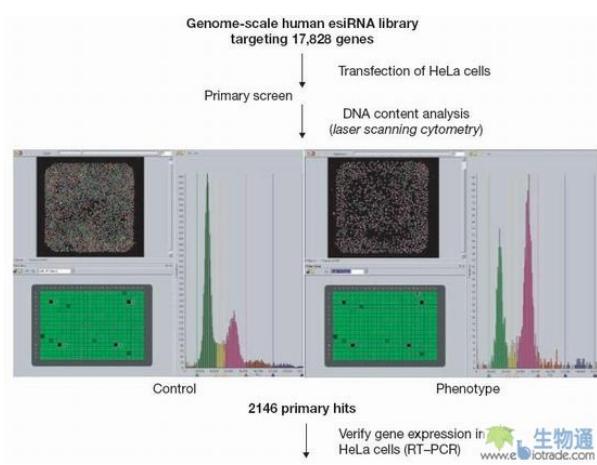


图 1. 筛选策略 (部分)

II Acumen 用于细胞分裂基因的初筛

TTP 的研究人员与 Ambion 公司合作利用 Acumen 来筛选 HeLa 细胞中 siRNA 和 miRNA 库的表型图谱^{3,4}。研究方法与上文相似, 是用通过 PI 染色和 Acumen Explorer™ 激光扫描荧光微孔板细胞仪来确定总细胞数, 获得的数据用来显示细胞的增殖情况。相对于酶标仪实验方法而言, Acumen 获得的数据更加可靠。因为传统的方法依靠的是酶与底物作用, 但是在筛选中被测试的样品例如化合物就有可能干扰酶的活性, 从而产生假阴性。Acumen 则是直接扫描获得染色后的细胞核, 通过对细胞核的计数来确定细胞的数量, 其结果更加可靠。

HeLa 细胞中的 siRNA 活性分析

研究人员利用 Silencer CellReady-96 siRNA 库平板对 HeLa 细胞进行筛选, 并研究细胞增殖的

变化。他们根据推荐的操作步骤，利用 NeoFX 将 siRNA 库中每个 CMGC 激酶的三个设计序列分别或共同转染 HeLa 细胞。转染后 72 小时收集细胞，并将细胞固定，用 PI 染色来观察细胞增殖的变化。染色之后，用 Acumen Explorer 激光扫描荧光微孔板细胞仪来进行细胞计数。

图 2 显示了 siRNA pool 相对单个 siRNA 的干扰结果。3 个 siRNA 中有 2 个起作用就作为阳性 (hit)。并将该结果与 siRNA pool 转染的结果比较，发现大约半数 (48%) 的 siRNA pool 的结果与两个单个 siRNA 的结果不一致。此外，siRNA pool 与单个 siRNA 分子相比，产生了更多的假阳性。

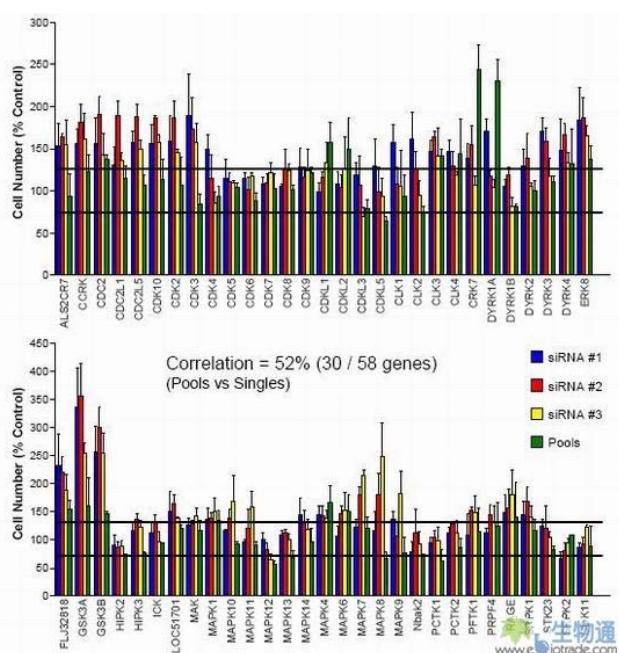


图 2. siRNA pool 相对单个 siRNA 的干扰结果

HeLa 细胞中的 miRNA 活性分析

microRNA (miRNA) 是一类小分子 RNA，在哺乳动物体内通过阻遏 mRNA 的翻译来调节 mRNA 基因表达。miRNA 的研究这两年一直很火。在 96 孔板中，研究人员利用 siPORT Neo-FX (Ambion) 将 miRNA 抑制剂 (5 pmole) 反式转染 HeLa 细胞，每个重复三次。转染后 72 小时，细胞用 4% 多聚甲醛固定，再用 0.1% Triton

X-100 透化处理，接着用 PI 染色。平板用 Acumen Explorer 微孔板细胞仪扫描，来确定细胞总数。采用全孔扫描模式，时间为每块板 10 分钟。为了了解 miRNA 功能抑制所引起的细胞形态变化，HeLa 细胞再用 β -actin 抗体和 DAPI 进行染色。

从大量的 Acumen Explorer 的筛选结果中，研究人员发现了 miR-31、miR-190 和 miR-216 的抑制会导致细胞增殖下降，而 miR-21 和 miR-24 的抑制则使细胞增殖增加（图 3）。转染了 miR-31 抑制剂的细胞则被拉长，并表现出类似神经生长的膜突起（图 4）。

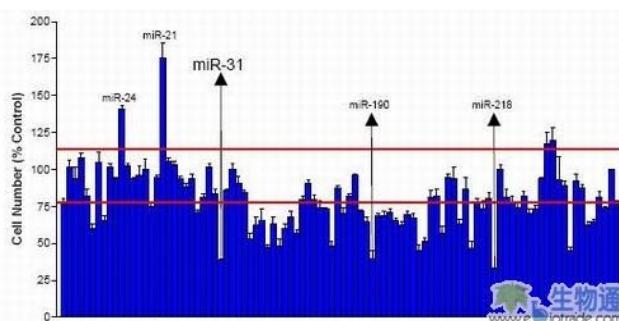


图 3. 改变细胞增殖的 miRNA 的鉴定

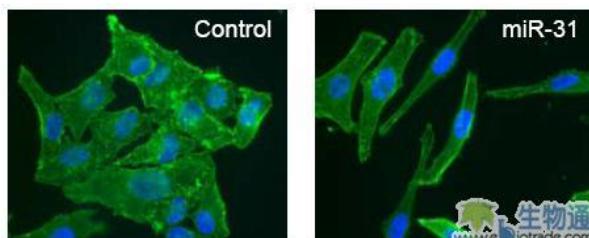


图 4. miR-31 转染对细胞形态的影响

III 总结

以上研究显示了 Acumen 微孔板细胞仪在高通量化高内涵 RNAi 筛选中的高速、有效和精确的应用特点，说明在未来的 RNAi 研究技术发展中，Acumen Explorer 将成为有力的研究工具，为科研工作者提供更便利研究过程和更可靠的研究结果。

Acumen 在研究中的优势：

- 荧光标记细胞的高通量化高内涵筛选
- 全孔的 4 色同时分析

- 可同时筛选贴壁及悬浮细胞，活细胞和固定细胞
- 扫描和数据处理同步进行（低至每块板 5 分钟）
- 数据文件大小从最详细的 350 MB（分析开发）到最快速的 50 KB（筛选）
- 与所有符合 SBS（Society for Biomolecular Screening）标准的平板兼容

这些特征与 RNAi 筛选研究高度兼容，表明在高通量化高内涵的 RNAi 筛选应用中，Acumen Explorer 正发挥着其他仪器所无法比拟的优势。

参考文献：

1. Ralf Kittler, et al. Genome-scale RNAi profiling of cell division in human tissue culture cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 1401-12 (2007).
2. Kittler, R. et al. An endoribonuclease-prepared siRNA screen in

human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* 432, 1036–1040 (2004).

3. Wayne Bowen, et al. High Throughput Profiling of siRNA and miRNA Libraries using Microplate Cytometry. TTP application note.
4. Angie M. Cheng, et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Research*, 2005, Vol. 33, No. 4

阅读英文原稿：

[Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis](#)

[Genome-scale RNAi profiling of cell division in human tissue culture cells](#)

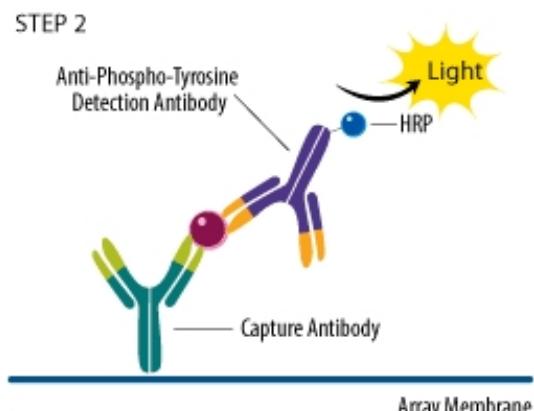
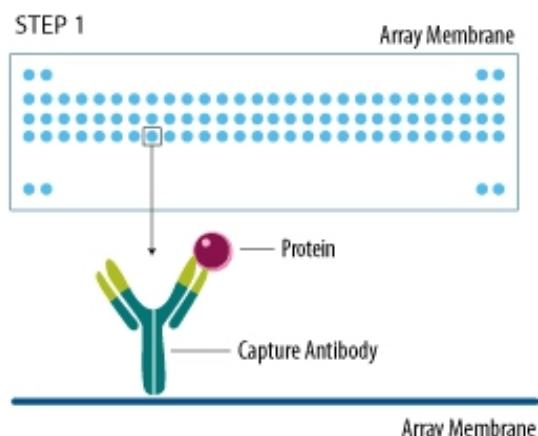
[High Throughput Profiling of siRNA and miRNA Libraries using Microplate Cytometry](#)

一种新型的简易蛋白芯片

一说起蛋白芯片，大家会立马想到大阵势，点样、杂交、检测，每一步似乎都是费时费力，还费钱。其实不然，R&D Systems 就推出一种不需要任何特殊仪器的新型蛋白芯片-Proteome Profiler 抗体阵列，6 小时内最多能检测 59 种蛋白。

作为一种快速、灵敏而又经济的工具，Proteome Profiler 抗体阵列能同时检测单个样品中多种分析物的相对水平。这些阵列的使用不需要任何特殊的仪器，也取代了多次免疫沉淀/Western blot 实验。每个阵列在设计时都利用了精心挑选的捕获抗体，它们在硝酸纤维素膜上重复点样两次。

下面以 Proteome Profiler Phospho-RTK Antibody Array 为例，介绍其操作步骤，其实就相当于多个 Western blot 集中在一张膜上。高度特异的捕获抗体点样在 NC 膜上（STEP 1）。捕获抗体识别磷酸化和非磷酸化受体酪氨酸激酶（RTK）的胞外结构域，随后 HRP 结合的 anti-Phospho-Tyrosine 抗体特异检测磷酸化的 RTK（STEP 2）。之后，利用化学发光检测试剂来检测蛋白，产生的信号与结合的分析物呈正比。



美国 Dana Farber 癌症研究所和哈佛医学院的研究人员就曾利用 Phospho-RTK Antibody Array 来鉴定脑部肿瘤多形性胶质母细胞瘤（GBM）中磷酸化的 RTK，以确定为什么针对单个 RTK 的肿瘤疗法总是失败。他们发现，在 GBM 细胞系和原代 GBM，以及其他实体瘤比如肺和胰腺癌细胞类型中，不是一个，而是几个 RTK 都激活了。即使在血清饥饿和肿瘤细胞移植的条件下，大部分磷酸化的 RTK 仍然激活，表明 RTK 磷酸化不可能是由培养基中的因子诱导的。更重要的是，此研究发现同时靶点多个 RTK 能抑制神经胶质瘤细胞中的癌症表型。

这些研究显示，抗体阵列能简化鉴定蛋白所需的筛选过程。通过监控蛋白水平和一些蛋白翻译后修饰的变化，能迅速靶定目标分子，以便进一步的研究。除了 Phospho-RTK 和 Phospho-MAPK 试剂盒，R&D Systems 还提供了另一些与癌症相关的抗体阵列，比如血管生成和凋亡。下表列出了目前所有的抗体阵列试剂盒。在用蛋白芯片进行筛选

之后，你还可以用 R&D Systems 可靠的 Quantikine ELISA 试剂盒来量化你的结果，而更多的抗体和蛋白可为实验提供更丰富的资源。（生物通 余亮）

[如果你还想了解Proteome Profiler抗体阵列的更多信息，请点击索取详细的产品资料。](#)

名称	描述	目录号
Human Phospho-RTK Antibody Array	检测特定位点 42 种受体酪氨酸激酶的相对磷酸化水平	ARY001
Human Phospho-MAPK Antibody Array	检测特定位点 19 种胞内丝氨酸/苏氨酸激酶的相对磷酸化水平	ARY002
Human Phospho-Kinase Antibody Array	检测 45 种胞内丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶的相对磷酸化水平	ARY003
Human Phospho-Immunoreceptor Antibody Array	检测 59 种 ITAM/ITIM 相关免疫受体的相对磷酸化水平	ARY004
Human Cytokine Antibody Array, Panel A	检测 36 种细胞因子、趋化因子和急性时相蛋白的相对表达水平	ARY005
Mouse Cytokine Antibody Array, Panel A	检测 40 种细胞因子、趋化因子以及更多因子的相对表达水平	ARY006
Human Angiogenesis Antibody Array	检测 55 种血管生成有关蛋白的相对表达水平	ARY007
Rat Cytokine Antibody Array	检测 29 种细胞因子、趋化因子以及更多因子的相对表达水平	ARY008
Human Apoptosis Antibody Array	检测 35 种凋亡有关蛋白的相对表达水平	ARY009
Human Pluripotent Stem Cell Antibody Array	检测 15 种多能干细胞标记物的相对表达水平	ARY010
Mouse Obesity Antibody Array	检测 38 种肥胖症相关蛋白的相对表达水平	ARY013
Mouse Phospho-Receptor Tyrosine Kinase Array	检测 39 种受体酪氨酸激酶的相对表达水平	ARY014
Mouse Angiogenesis Antibody Array	检测 53 种血管生成有关蛋白的相对表达水平	ARY015

如何快速准确地滴定杆状病毒？

杆状病毒的滴定过去常采用空斑分析，不过此方法耗时约1个星期，实在是有些漫长。为此，Clontech公司推出了 BacPAK™ qPCR Titration Kit，作为空斑分析的替代，来快速准确地滴定 AcMNPV 类型的杆状病毒。

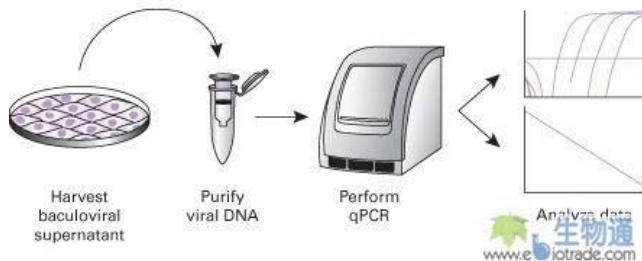
此试剂盒采用快速的 DNA 纯化步骤，并利用 qPCR 和 SYBR Green 检测来确定病毒 DNA 基因组的含量。由于 qPCR 滴定非常快速，目的细胞的感染和病毒粒子的收获就可在同一天进行，也就避免了反复冻融对病毒感染效率的影响。这种方法能够让你以已知的感染复数 (MOI) 感染细胞，从而获得更准确、一致的结果。

以往，耗时的滴定方法、延长的病毒储存时间和反复冻融都影响了病毒储存液的感染效力，研究人员在若干天后获得的只是感染力和 MOI 的近似值。qPCR 滴定方法比空斑分析要快得多（详见下表），因此在收获病毒粒子的当天就能感染目的细胞。这样快速的周转最大限度地保持了病毒活力。

表 1. BacPAK qPCR Titration Kit 与其他滴定方法的比较

滴定方法	空斑分析	BacPAK Rapid Titer Assay	BacPAK qPCR Titration Kit
简介	计算感染后单层细胞的空斑	对感染后细胞单层的 Gp64 进行免疫染色	利用 SYBR qPCR 来测定病毒 DNA，用标准 DNA 作为对照
耗时	一星期	48 小时	2-4 小时
优势	传统、可见	简单、可见	快速、准确

BacPAK qPCR Titration Kit 的操作过程如下：收集病毒上清，利用病毒 DNA 纯化试剂盒从少量上清中提取基因组 DNA。将病毒 DNA 样品连续稀释，进行定量 PCR，来确定每个浓度的 Ct 值，再根据对照模板的标准曲线计算出样品中的 DNA 基因组拷贝数。



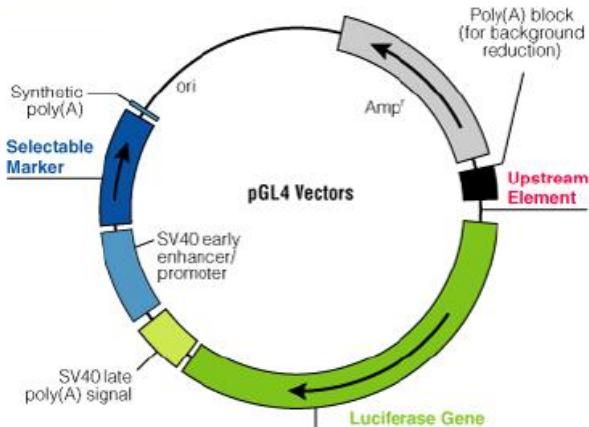
一旦基因组拷贝数确定，它就能与病毒感染力相关联，从而确定拷贝数/PFU 的关系。这个比例的确定能让你标准化每次实验所使用的样品量，得到更为一致的分析间结果。

介于其简单、重复性好、处理时间短，BacPAK qPCR Titration Kit 成为确定杆状病毒滴度的理想选择。另外，Clontech 还提供了 BacPAK Rapid Titer Kit，利用 AcMNPV 衣壳蛋白 Gp64 的抗体对病毒感染过的细胞进行免疫染色。此过程虽不如定量 PCR 那么快，但也比空斑分析快很多，且结果较为直观。（生物通 余亮）

[点击索取杆状病毒滴定的更多资料！](#)

新一代萤光素酶报告基因载体

pGL4 萤光素酶报告基因载体是新一代的报告基因载体，专门为在哺乳动物细胞中表达进行了优化。



特点——提高了灵敏度和生物相关性

- 提高了报告蛋白的表达水平：优化了密码子，使之更适合哺乳动物蛋白的表达。
- 减少了本底表达水平，降低了表达假象的风险：去除了隐秘的 DNA 调节元件和转录因子的结合位点。
- 增强了“实时”反应性：采用去稳定的萤光素酶基因 luc2P 和 luc2CP，实现了快速反应——Rapid Response 技术。

现有的、带有反应元件的 pGL4 载体

载体名称	反应元件	信号通路
pGL4.29[luc2P/CRE/Hygro]Vector (Cat.# E8471)	cyclic AMP Response Element	cAMP/PKA
pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro]Vector (Cat.# E8481)	Nuclear Factor of Activated T-Cells (NFAT) Response Element	Calcium/Calcineurin
pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro]Vector (Cat.# E8481)	Nuclear Factor of Activated T-Cells (NFAT) Response Element	Calcium/Calcineurin
pGL4.31[luc2P/GAL4UAS/Hygro]Vector (Cat.# C9351)	GAL4 upstream activating sequence	Varies (requires binding and activation by GAL4-DNA Binding domain)
pGL4.32[luc2P/NF- κ B-RE/Hygro]Vector (Cat.# E8491)	Nuclear Factor κ B Response Element	NF- κ B
pGL4.33[luc2P/SRE/Hygro]Vector (Cat.# E1340)	Serum Response Element	MAP/ERK
pGL4.34[luc2P/SRF-RE/Hygro]Vector (Cat.# E1350)	Serum Response Factor Response Element	RhoA

应用

- 转录调节
- 病毒细胞相互作用

- 化合物筛选
- 翻译后加工
- GPCR 信号通路
- 细胞信号转导
- 启动子分析

还没找到你需要的反应元件吗？

Promega 与 SwitchGear Genomics 形成了战略合作伙伴关系，以促进将报告基因系统用于活细胞调节通路的深入研究。SwitchGear 使用 Promega 的 pGL4 载体技术，构建了一系列即用型筛选载体，包括了上千种人类基因组启动子、UTR 以及其它调节元件。

希望得到现成的稳定细胞系？

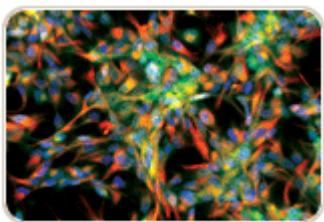
没问题！Promega 提供 GloResponse 萤光素酶报告基因细胞系——一系列的 HEK293 细胞系，能够稳定表达带有反应元件的 pGL4 载体。

[欢迎点击此处申请pGL4 载体的免费试用！](#)

(本文摘自 [Promega eNews 2009 年 7 月刊](#))

Millipore 又推出三款荧光干细胞系

Millipore 公司近日推出三款新的 MilliTrace™ 干细胞系，这些细胞系在各种胚胎和神经干细胞标记物的控制下表达绿色荧光蛋白（GFP）。由于那明亮的绿光，科学家们就能非侵入性地监测特定干细胞群体的行为，了解它们的增殖、迁移和分化。



新细胞系的特征是能在 **nanog** (小鼠胚胎干细胞) 或 **nestin** 和 **Sox-2** (人神经干细胞) 转录因子的控制下，表达 GFP 报告基因。在分化时，这些干细胞标记物的丧失会导致 GFP 的下调，从而轻松辨认出未分化的细胞。**MilliTrace CX Nestin GFP** 报告基因人神经干细胞中 GFP 的表达就受到 **nestin** 启动子的控制。一旦分化，**nestin** 下调，GFP 表达就关闭。另外两种新细胞系是组成型表达 GFP 的神经干细胞系。

[点击索取MilliTrace干细胞系的更详细资料](#)

在 2008 年，Millipore 就推出了五种人和啮齿动物的 MilliTrace 细胞系，它们是市场上最早的表达 GFP 的核型正常干细胞系。

在电穿孔转染了人源 GFP 之后，每种 MilliTrace 细胞系都经过 GFP 高水平表达、干细胞标记物表达和多能性的验证。这些细胞还附带了优化过的扩增培养基，以维持转基因的表达。FACS 分析显示在正常的增殖条件下传代 10 后，仍有 90% 以上的细胞表达高水平的 GFP。总之，MilliTrace 细胞能改善多个应用的重复性和数据质量，包括单个的分析和高通量筛选。

Millipore 干细胞产品经理 Louise Rollins 认为：“MilliTrace 细胞非常适合于在共培养环境下研究细胞与细胞的相互作用。有了这些新细胞系，研究者们又多了一些非侵入的工具可供选择。”

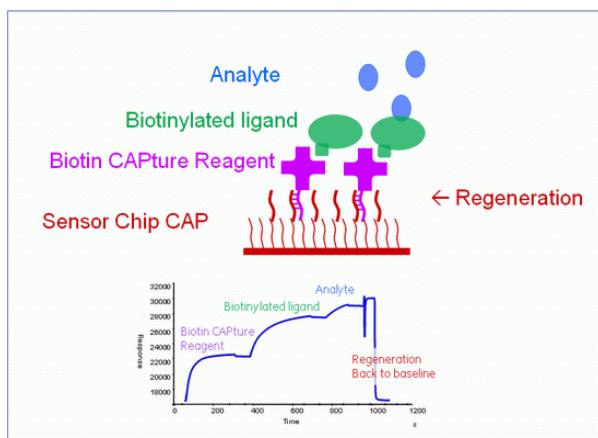
(生物通 余亮)

GE 推出生物素捕获试剂盒， 用于 Biacore 系统分析

通用电气医疗集团近日推出了 Biotin CAPture Kit，能在传感器芯片上可逆捕获生物素化的分子，用于 Biacore 系统的相互作用研究。作为直接固定或生物素-链亲和素固定的替代，Biotin CAPture Kit 的优势是有着标准化的再生步骤，若不同实验需要更换配体，也无需更换传感芯片。

该试剂盒是基于新颖的捕获概念，能实现生物素化分子的可逆捕获。传感器芯片- Sensor Chip CAP-是基于羧甲基化葡聚糖基质，它上面预固定了单链 DNA 分子。Biotin CAPture 试剂包含了与单链 DNA 分子互补的链亲和素结合物。Biotin CAPture 试剂注射并杂交到表面，接着注射并捕获生物素化配体，随后注射分析样品。传感芯片表面的再生过程也很简单，只需打断杂交的 DNA 寡核苷酸，即可用于下一次的循环。

Biotin CAPture Kit 可逆捕获生物素化配体的过程如下：



如果你没有时间去开发配体的固定/再生条件，或者很难找到生物素化配体的再生方法，那么 Biotin CAPture Kit 很适合你。它对于建立新分析有着明显的优势：

- 速度及便利性：在研究相互作用时，无需了解或建立固定方法或再生步骤。只需要生物素化的配体。
- 实验范围扩大：研究不稳定的配体或再生步骤尚未确立的配体。由于传感芯片是利用标准化的步骤再生的，所以这个过程可以实现。
- 经济：当你需要更换实验的配体时，可保留相同的传感芯片，省时省力又省钱。

此试剂盒有两个版本：Biotin CAPture Kit & Biotin CAPture Kit Series S，分别适用于 Biacore 系统的每种传感芯片形式。它们与大部分样品和分析物兼容，适用于 Biacore 系统的大部分应用的分析。不过，如果实验中包含 DNA-结合蛋白、寡核苷酸或降解 DNA 的酶，那这个 kit 就不太适合，因为它其中包含了寡核苷酸。此外，血清或血浆样品可能产生传感芯片表面的非特异性结合。而在样品中加入低分子量的双链 DNA 有时可以阻止此类结合。

[点击索取通用电气Biacore系统的更多资料！](#)

新的 Biacore X100 2.0 系统将于 9 月上市，到时它将会有一个内置的预设程序流程来支持这个试剂盒。（生物通 余亮）

Invitrogen 推出细胞资源中心 和干细胞改造工具

Invitrogen（现属于生命科技公司）最近推出了生命科学行业第一个关于细胞生物学技术的综合在线资源中心。Invitrogen Cell Resource Center 囊括了细胞生物学方面的教育资源，以及推进细胞研究的最近技术。该网站能够让科学家快速获取与细胞研究相关的技术和广泛产品线。

Cell Resource Center 的特色是拥有多种原代细胞和干细胞（包括胚胎干细胞）的介绍和产品推介，其中包括了目前炙手可热的 iPS 细胞和重编程技术。另外，资源中心还含有 200 多种验证过的分析，用于基础研究、药物开发和筛选，涉及磷酸化分析、GPCR 报告基因分析、核受体报告基因分析等方面。

如果你正在从事干细胞研究，你可能对细胞培养比较在行，但是你可能还要花很多时间才能找到干细胞分化相关的产品。现在有了 Cell Resource Center，你只需选择所研究的干细胞，就会出现与它相关的培养基、生长因子、抗体、分化产品，以及标记和检测试剂等，相当方便。

斯坦福大学干细胞与生殖生物学的实验室高级主管 Cynthia Klein 表示：“Invitrogen Cell Resource Center 是一个很有用的向导，能在同一个地方找到多个细胞培养系统的一切。它提供了细胞以及培养基的信息，比如这些细胞能用于哪个类型的研究，你怎样才能成功培养。”

在 Cell Resource Center 推出的同时，Invitrogen 还推出了全新的 GIBCO® 大鼠神经细

胞产品系列，包括神经干细胞、神经元和神经胶质细胞。这些细胞已经用 Neurobasal™ 培养基、B27 添加剂和 StemPro® NSC SFM 等培养基及试剂验证过。

另外，Invitrogen 还首次推出了细胞改造工具，能将 emGFP、碱性磷酸酶等报告基因定向、稳定地整合到多能干细胞和原代细胞的基因组中，以便后期的分析和筛选。

StemPro® TARGET™ hESC BG01v Kit 能利用 MultiSite Gateway 技术构建出多个片段的克隆，并利用这个重组子将多个遗传片段（报告基因）插入人胚胎干细胞的染色体靶位点。此试剂盒曾入围 2008 CONNECT 最具创新性新产品大奖的候选名单，可惜最后没有获奖。

[点击索取干细胞改造产品的详细资料！](#)

Invitrogen Cell Resource Center 的网址为 <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/Cell-Resource-Center.html>。（生物通 余亮）

罗氏 Innovatis 推出 Cedex HiRes， 实现高分辨率的细胞数字成像

罗氏 Innovatis 最近推出 Cedex HiRes，最新一代的图像型 Cedex 细胞计数和分析系统，用于自动化的细胞培养分析。Cedex HiRes 利用台盼蓝排斥方法测量细胞密度、活力、聚集结团率、细胞形态和细胞碎片，并进行高分辨率的数字图像识别。卓越的图像质量能让你更深入了解细胞培养中最微妙的变化，比如通过测量细胞直径的改变来监测蛋白生产中的杆状病毒转染。Cedex HiRes 为了适用于工业生产，其软件的大量数据管理和控制性能完全符合目前所有的 cGMP 章程，同时严格恪守质量方针。



新仪器的特征阐释了为何操作时间缩短，而分析准确性增加。多通道进样器最多能处理 20 个 300 μl 的不同样品，每个 300 μl 。细胞染色和混合的工作是全自动的，焦距条件同样也是自动的。Cedex HiRes 产生了 0.8 μm 像素分辨率的图像，能够区分间距小于 2 μm 的物体。可检测的细胞直径范围在 2 μm – 40 μm ，物体直径范围在 1 μm – 90 μm 。数字图像识别实现了已获得数据的永久储存。

Cedex HiRes 是在与客户密切合作下开发的，它特有 Cedex 2 软件，能简化大部分复杂数据组的可视化、传输与储存，以便真正实现 cGMP 管理环境中的自动化。通过它的系统适合性测试 (SST)，罗氏 Innovatis 提供的耗材和维护步骤，用户能够自行选择设置常规验证和记录系统质量，并确保测量性能。

[点击索取Cedex HiRes细胞计数系统的详细资料](#)

罗氏 Innovatis 是专注于开发、制造并支持自动化细胞培养分析的全球领先技术供应商。无论是研究、开发或生产，罗氏 Innovatis 都为生物医药研究界提供了系统和服务，来实现有效疫苗及疗法的开发。这些系统包括 Cedex，生物技术和制药行业领先的细胞分析仪；CuBiAn，细胞培养的无膜

自动生化分析仪；Cellavista，多模式细胞图像捕获系统；CASY，小巧的细胞计数和活力分析系统。服务则包括分析硬件、软件和接口的实施，以便与现有的工艺控制企业无缝整合。罗氏 Innovatis 让全自动系统符合验证环境中的监管标准。

关于罗氏应用科学部

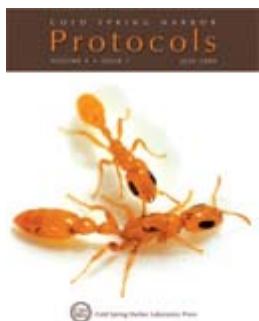
罗氏的诊断部门在成功收购德国宝灵曼公司 (Boehringer Mannheim GmbH.) 后，成立了专业服务于科学研究领域用户的罗氏应用科学部 (Roche Applied Science)，凭借半个多世纪在生命科学研究领域积累的经验，罗氏应用科学部已成为在此领域中具领先地位的试剂及系统供应商之一。从耗时少的，全自动的样本制备系统 (MagNA Lyser 和 MagNA Pure)，到快速精准的卡盘式 LightCycler® 2.0 和 模块式高通量 LightCycler® 480 系列荧光定量 PCR 仪，以及创新的超高通量基因组测序系统 Genome Sequencer FLX System 和 NimbleGen. 高密度 DNA 芯片，罗氏应用科学部研究和开发了多种应用于分子生物学相关研究领域的产品——广泛地应用在基因组学和蛋白组学研究中；罗氏应用科学部产品家族最新的 xCELLigence System 和 Innovatis 细胞分析系统，为细胞学基础研究和药物研发提供了新型的、高通量筛选和检测平台。此外，罗氏应用科学部也提供用于生物医药和诊断行业方面的试剂，为用户需求提供完整的解决方案。

此新闻中使用或提及的所有商标均受到法律保护。

CEDEX、CUBIAN 及 CELLAVISTA 是罗氏的注册商标。

冷泉港发布 7 月份实验手册

冷泉港于近日发布了 7 月份的实验手册，当然，其中有两个是免费的。它们分别讲述了如何利用 FISH 和数码图像分析来定量样品中不能培养的微生物；以及快速高效地制备有粘性的微单元，来控制单个的细胞形状和粘附模式。



其一：[Use of Fluorescence In Situ Hybridization and the daime Image Analysis Program for the Cultivation-Independent Quantification of Microorganisms in Environmental and Medical Samples](#)

在测量微生物丰度时，传统的方法是培养，但这种方法显然不适合未培养的微生物，而这种微生物在很多环境或医学样品中占了大部分。现在，问题已经解决了。奥地利维也纳大学微生物生态系的 Holger Daims 利用荧光原位杂交（FISH）、rRNA-靶定的探针和数码图像分析来定量微生物。通过测量随机记录的图像对中探针标记的生物量的面积，能毫无偏向性地估计出目的群体的相对生物量。这种方法以“生物量分数”（相对于整个微生物群体的

总生物量）来表达丰度。这个数值相当于目的群体的生物反应空间，因此比绝对的细胞数目更具有生态相关性。另一个优势在于这种方法完全不依赖于微生物的形态。不管目标微生物是以何种形式存在，这种不依赖培养的方法都能测定复杂微生物群体的组成。

其二：[Adhesive Micropatterns for Cells: A Microcontact Printing Protocol](#)

这篇文章描述了如何快速高效地制备有粘性的微单元，来控制单个的细胞形状和粘附模式。整个过程可分为三步。首先，制作一个硅的母板，上面包含了感兴趣的微特征。其次，制作一个聚二甲基硅氧烷（PDMS）的模具。这一步不需要任何特殊的设备。PDMS 模具与细胞外基质蛋白相连。蛋白印在底物上，而未印制的区域就回填多聚赖氨酸聚乙二醇，它能够排斥细胞粘附。后面的部分描述细胞的沉积。此份实验手册是由法国居里研究所的 Manuel Théry 和 Matthieu Piel 提供的。

（生物通 余亮）

4 个步骤,玩转 HaloTag 多能融合标记蛋白

HaloTag 是一种多功能的融合蛋白标签，该标签能够提高蛋白可溶性和表达量，同时，此类融合蛋白还能够进行多种应用：

- 蛋白表达与纯化
- 蛋白-蛋白、蛋白-DNA 相互作用
- 荧光细胞成像（活细胞或固定细胞）
- 如果您对上述 HaloTag 技术的应用感兴趣，而又不知从何入手—这一篇文章刚好适合您：

4 步法应用 HaloTag 技术：

1 设计

您需要考虑如下因素：

1. 我希望把 HaloTag 蛋白用于什么样的下游实验？
2. 我希望使用什么样的蛋白表达系统（体外表达还是体内表达，原核系统还是真核系统？
3. 我希望把 HaloTag 标签融合到目的蛋白的 N 端还是 C 端？

选择合适的载体

Expression Systems				Vector Names/ Catalog Numbers						Comments	
Cell-Free		Cell-Based		N-Terminal HaloTag® Protein			C-Terminal HaloTag® Protein				
Prokaryotic	Eukaryotic	E. coli	Mammalian	Vector	Amp	Kan	Vector	Amp	Kan		
T7	NR	T7	NR	pFN18	G275I	G268I				Best for high-level E. coli expression in vivo and in vitro; lacks regulatory elements for eukaryotic expression.	
T7	T7, SP6	T7	NR	pFN19	G189I	G184I	pFC20	G168I	G169I	Good for E. coli and in vitro expression; lacks regulatory elements for mammalian cell-based expression.	
NR	T7	NR	CMV	pFN21	G282I	G283I	pFC14	G965I	G966I	Strictly for eukaryotic expression in vivo and in vitro; maximum yield in mammalian cells. Lacks regulatory elements for prokaryotic expression.	
T7	T7, SP6	T7	CMV&I	pFN22	G284I	G285I	pFC15	G161I	G160I	Good expression in E. coli and mammalian in vivo and in vitro; promoter deletion series to optimize mammalian expression levels (4).	
T7	T7, SP6	T7	CMV&2	pFN23	G286I	G287I	pFC16	G159I	G157I		
T7	T7, SP6	T7	CMV&3	pFN24	G288I	G298I	pFC17	G155I	G132I		

2 克隆

选定了合适的载体后，你还需要克隆目的蛋白的编码序列。

- 设计引物时，加入了适当的限制性内切酶位点，以方便扩增 ORF
- PCR 扩增产物需经过纯化
- 在进行连接反应前，载体和 PCR 产物需经过酶切和纯化
- 将连接后的产物转化细菌，挑选阳性克隆，摇菌复制
- 纯化质粒

3 确认

通过测序来确认插入的基因序列是否正确

注意：如果你使用的是 Promega 公司的 Flexi 载体，请注意核酸序列从一个 Flexi 载体转移到另外一个 Flexi 载体的过程是高度保真的，因此，你只需要进行一次测序！

检测全长蛋白的表达、折叠与活性

注意：使用无细胞蛋白表达系统、HaloTag 荧光标记以及 SDS 凝胶电泳，你仅需一个下午的时间就能完成 HaloTag 融合蛋白的确认工作！

4 检测

现在，你就可以将 HaloTag 系统用于蛋白相互作用研究、蛋白表达以及细胞成像了！

[点击索取Promega eNews 2009 年 7 月刊的完整版本](#)

IN Cell Analyzer 2000：让最具挑战性的高内涵分析高效完成

Jeanette George, Albie Santos, Angela Williams, Rhian Martin, Val Millar*, Liz Roquemore & Gary Sarkis

英国英格兰白金汉郡安玛西亚镇通用电气医疗集团；电话：+44 (0)29 2052 6445；传真：+44 (0)29 2052 6230；e-mail：val.millar@ge.com

摘要

药物开发的高内涵分析的本质在于：活性化合物在细胞、组织和整个生物体中作用，能够通过高通量荧光成像再加上自动化分析，来检测和定量那些相对于对照样品所发生的强度或者形态上的变化。IN Cell Analyzer 平台提供了一整套从自动化图像获取到数据的定量和深度分析以及可视化的强大工具，来协助整个高内涵分析过程。IN Cell Analyzer 2000 是一种全新的高性能成像系统，灵活地设计足以应对多种需求——从全自动显微镜到自动化的高内涵筛选。IN Cell Analyzer 2000 提供了强大性能，如预览扫描、快速的载玻片成像、大芯片 CCD 照相机配件、3 种透射光模式和高级图像背景噪音去除（去卷积）配件的选择，来确保提供在横向和纵向上定量最准确的图像。

我们展示了 IN Cell Analyzer 2000 在多个生物应用中的性能评测结果，说明了这个多功能系统产生了高质量的图像，适合于定量分析及提取准确、信息量丰富的数据。

[点击索取IN Cell Analyzer 2000 系统的详细资料](#)

介绍

IN Cell Analyzer 2000 是一个模块化的系统，包含了 200W 宽视野照明源、8 对激发和发射滤光片、一个 4 方位的自动化物镜转盘、10 种可供选择的物镜及自动的校正环调整、3 个自动的四波

段多色分光器和标准或大的 CCD 照相机等多项选择。仪器的光路如图 1 所示。

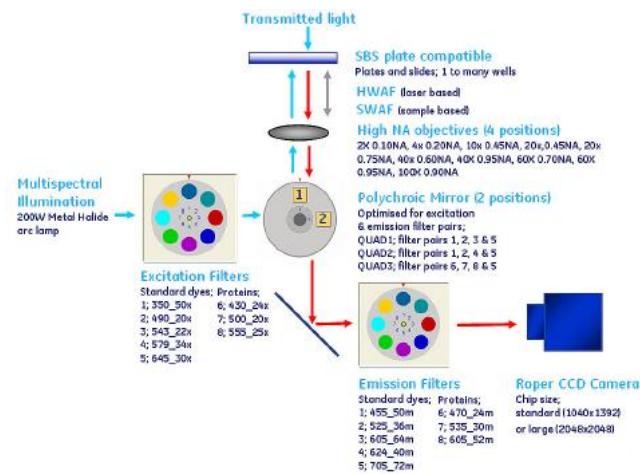


图 1. IN Cell Analyzer 2000 的光路

就此次评估而言，仪器的配置包括所有 8 个激发和发射滤光片；分光器 QUAD1 和 QUAD2; 4×、10×、20×和 40×尼康物镜；及标准芯片 CCD 照相机。

实验方法

全面评测包括多个表型各异的样品和检测的成像与分析，每一个代表了其本身的成像和分析挑战。我们展示了来自四个分析的性能评估的精选数据：(a) 神经生长 [1], (b) GPCR 受体内化 [2], (c) 微核形成 [3], (d) AKT1-EGFP 和肌动蛋白成丝的多重分析 [4]。分析性能是通过一些指标来评

估的，包括 EC₅₀ 或 IC₅₀，以及分析质量的指示剂如 Z' 和严格标准化平均差异 (SSMD, [5])。所得计算值都尽可能和已发表的结果来比对。

神经生长分析&预览扫描特征

神经生长在胚胎发育、神经分化和神经系统功能上扮演着重要的角色。高内涵神经生长分析能够直接筛选不同处理的形态结果。为了诱导神经生长，经血清饥饿的 N2a 细胞与递增浓度的视黄酸共同孵育。细胞固定、透化，并用抗-微管蛋白的一抗和荧光染料 (FITC、Cy3TM、Texas RedTM 或 Cy5TM) 结合的二抗来染色。细胞核用 HoechstTM 33342 来染色。IN Cell Analyzer 2000 获取的图像就特征分辨率而言，有着高的图像质量 (图 2)。

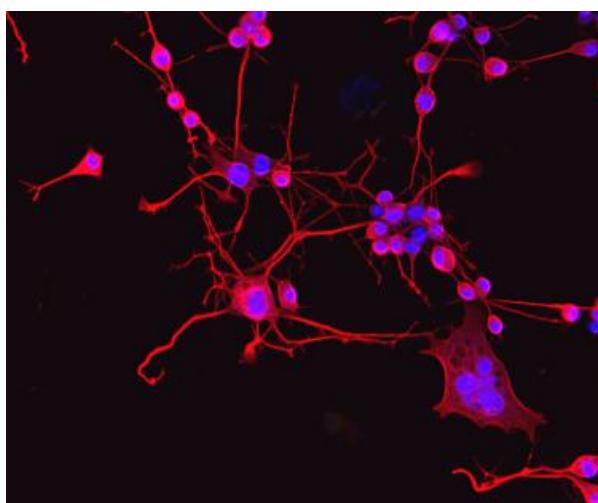


图 2. 小鼠视网膜母细胞瘤 Neuro-2a 细胞用视黄酸处理来诱导神经生长后，利用 IN Cell Analyzer 2000 所获得的合并彩色图像。细胞体和神经用荧光染料结合的羊抗小鼠 IgG 标记，图示的例子为 Cy5 (红色)。细胞核用 Hoechst 33342 染色 (蓝色)。成像条件：尼康 10× 0.45NA 物镜以及与每个荧光基团匹配的滤光片组：350_50x & 455_50m (Hoechst)、490_20x & 525_36m (FITC)、543_22x & 605_64m (Cy3)、579_34x & 624_40m (Texas Red) 及 645_30x &

705_72m (Cy5)。分光器 QUAD1 用于所有抗体，但 Texas red 除外，此时分光器切换到 QUAD2。

在更高的药物浓度下，许多细胞逐渐分离，剩余的细胞集中在孔边缘。“预览扫描”特征能够对全孔进行快速预览，并在平板成像之前互动选择所需的成像位置(图 3(a))，随后在 IN Cell Investigator 中以用户定义的步骤来分析图像库，并对所有四种标记抗体的研究数据进行了比较(图 3(b))。生成的剂量-反应曲线显示了每个实验皆产生了相当的动力范围、曲线形状和 X-Y 轴偏离位置。

利用 CypHer5ETM 来监测 GPCR 内化

GPCR 代表了新药开发的重大机遇，也是大约三成处方药的主要靶点 [6]。GPCR 受体的激动剂活化导致了细胞内从质膜到内体通路的内化。此过程可以通过 pH 敏感的荧光染料 CypHer5E 来观察，它在碱性 pH 下荧光最弱，而酸性 pH 下荧光最强 (图 4)。IN Cell Analyzer 2000 产生的数据以及 IN Cell Investigator 中利用多目标分析模块 (MTA) 进行的分析得到了 9.5 的 SSMD 和 0.63 的 Z'，这表明分析是可靠的，适于高内涵筛选。

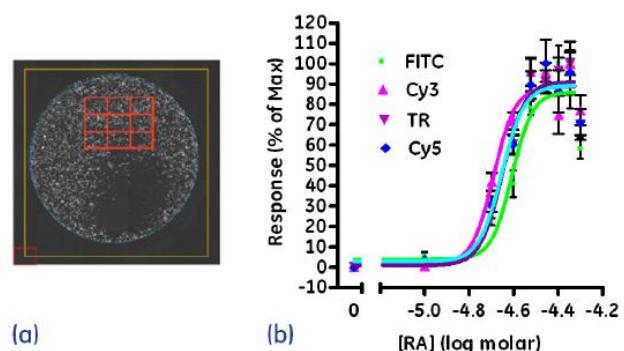


图 3. (a) IN Cell Analyzer 2000 中预览扫描功能的利用能让用户优化成像位置，预览图像 (4×) 显示全孔区域的 Hoechst 染色细胞核，(b) 分析数据的图形一览显示出每个细胞中标准化的平均神经长度对视黄酸 (retinoic acid) 浓度函数的曲线，利用荧光基团结合的羊抗小鼠 IgG 对处理的 N2a 细胞中抗-?-微观蛋白单克隆抗体进行染色，数据来自染料标记的羊抗小鼠 IgG (a) FITC：峰

[RA]=40 μM , SSMD=5.6; (b) Cy3: 峰[RA]=30 μM , SSMD=6.9; (c) Texas Red: 峰[RA]=30 μM , SSMD=7.6 ; (d) Cy5 : 峰 [RA]=35 μM ; SSMD=4.2。

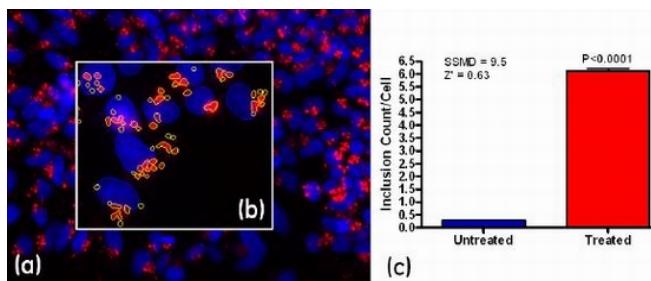


图 4. IN Cell Analyzer 2000 利用 20 倍物镜、滤光片组 350_50x & 455_50m (Hoechst) 及 645_30x & 705_72m (Cy5) 所获得的图像，显示了异丙肾上腺素激动剂刺激后, VSV-G β -2 肾上腺素受体在 HEK293 细胞中表达。受体内化的合并彩色图像是用 CypHer5E 标记的抗-VSV-G 抗体以红色信号强度的增加来显示的（红色）。细胞核是以 Hoechst 33342 染色来显示的（蓝色）。(b) 显示了分析后的分段特征。(c) 数据显示；平均内含物计数/细胞+/-SD, n=48 孔?处理；SSMD=9.5 Z'=0.63。

微核形成 & 灵敏度提高

微核引入是遗传毒性化合物的关键生物标志物。对 DNA 链断裂或染色体分离干扰而产生的微核形成的快速自动分析，是候选新药毒理筛选中的重要组成部分。在这个例子中，用依托泊昔 (etoposide) 和丝裂霉素 (mitomycin) 来处理 CHO-K1 细胞以产生微核。固定细胞，用 Hoechst 33342 染色，并成像。系统的灵敏度让核通道的曝光时间只需 18 毫秒，在快速获取图像的同时提供宽广的灰度动态范围。两种处理及未处理群体的核图像都有着高的光学质量，显示出极佳的特征分辨率和整个视野中均一的低背景荧光（图 5）。利用 Investigator 软件的微核分析模块来进行分析，报告每个处理组中微核和细胞数的百分比。本实验采

用的细胞增殖及微核百分比的多重分析法 将死细胞或垂死细胞中的微核计数降至最低。数据显示了微核形成的药物依赖性增加，并伴随着细胞数的下降（图 6）。在 50% 增殖时的微核百分比与发表的文献值一致 [3]。

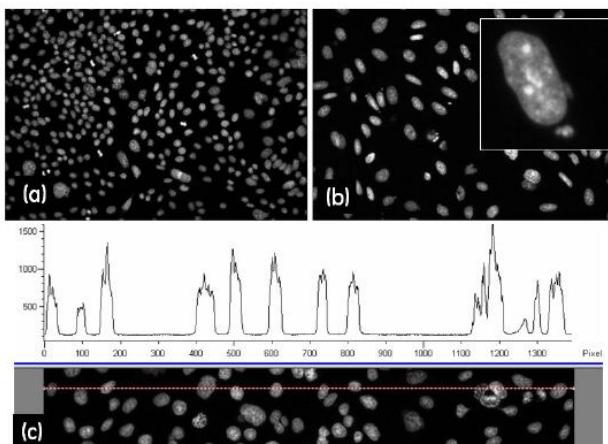


图 5. IN Cell Analyzer 2000 利用 20 倍 0.45NA 物镜、350_50x & 455_50m 滤光片组、分光器 QUAD2，对依托泊昔处理前(a)后(b) 的 CHO-K1 细胞所获得的图像，内图显示了微核相对母细胞核的放大图像。(c) 像素的线轮廓 vs 视野内的灰度水平值显示了低背景荧光以及光照的均质性。

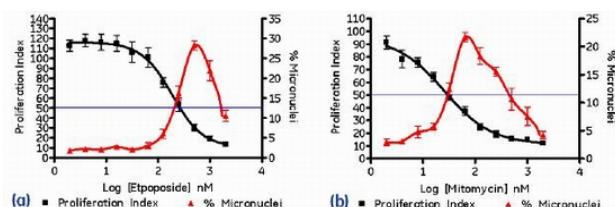


图 6. CHO-K1 细胞用递增浓度的(a)依托泊昔和(b)丝裂霉素处理，以诱导微核形成；剂量反应数据显示；平均值+/-SD, n = 8 孔，每种浓度 4 个视野。

利用 2D 去卷积进行 AKT1/肌动蛋白多重分析

AKT1-EGFP 分析包含了稳定表达 AKT1-EGFP 融合蛋白的 CHO 母细胞系。当胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 刺激内源人胰岛素受体时，AKT1-EGFP 发生转位，从细胞质移到质膜上的分散褶皱。PI3K/AKT 通路的失调是癌症病理中

的普遍现象，因此这条通路是治疗型药物开发的主要靶点。肌动蛋白是 AKT 的下游信号靶点。为了诱导 EGFP-AKT1 报告基因从细胞质转到质膜，细胞用 IGF-1 处理。在固定和用 Hoechst 33342 对细胞核进行染色之后，分析平板用 IN Cell Analyzer 2000 成像，并用 IN Cell Investigator 中的 MTA 模块进行分析。图像有着高质量，为转位事件发生后有效分离细胞核及细小的褶皱提供了足够的分辨率。激动剂的剂量反应滴定所产生的数据表现出典型的 S 形反应，而 EC₅₀ 与之前报道的数值相当（图 7）[7]。

在进一步的实验中，对照和 IGF1 处理细胞用 Texxa Red 标记的鬼笔环肽(phalloidin)来染色，以鉴定丝状的肌动蛋白 (F-actin)。为了提高分辨率和对比度，利用“2D 去卷积获取”成像模式进行了高质量的图像还原。IN Cell Analyzer 2000 成像平台提供了高级的图像还原配件，以确保获得定量最准确的图像。

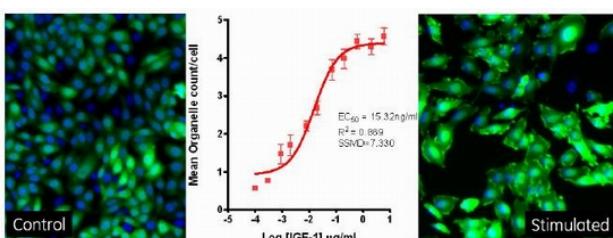


图 7. 稳定表达 AKT1-EGFP 的 CHO-hIR 细胞单独（对照）或与 IGF-1（刺激）孵育在 96 孔 Matriplate 中，之后固定并用 IN Cell Analyzer 2000 在尼康 10×/0.45 NA 物镜、滤片组 350_50x & 455_50m 和 490_20x & 525_36m、分光器 QUAD2 的条件下成像。细胞核用 Hoechst 染色（蓝色通道）；AKT1-EGFP 报告基因在绿色通道发荧光。中间的图像，用 IGF-1 滴定；剂量反应曲线；每孔 3 个视野；平均+/-SD，每个数据点 n=8 重复。质量度量 SSMD 是利用最低和最高剂量点的数据计算而出的。

如图 8 所示，在去卷积图像中，能观察到目标的对比度和分辨率均有所增加，使分段特征增强。

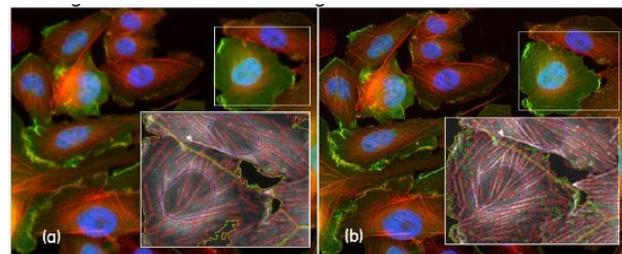


图 8. 稳定表达 AKT1-EGFP 的 CHO-hIR 细胞与 IGF-1 共同孵育，并利用 40 倍物镜、滤光片组 350_50x & 455_50m, 490_20x & 525_36m, 579_34x & 624_40m 以及分光器 QUAD2 在 IN Cell Analyzer 2000 上成像。细胞核用 Hoechst 33342 染色（蓝色通道）；肌动蛋白丝用 Texas Red-鬼笔环肽染色（红色通道）；AKT1-EGFP 则在绿色通道发荧光。（a）在标准模式下获得的图像以及（b）利用“2D 去卷积”模式对同一个目的区域获取的图像，内图对应了高光框的放大，应用用户定义的步骤来测量质膜褶皱和肌动蛋白成丝，强调了与(b) 标准 2D 成像模式相比，(a) 肌动蛋白丝的有效分段。

总结

一系列富有挑战性的 HCA 应用都已在 IN Cell Analyzer 2000 上评估。这其中包括神经生长、GPCR 受体内化、微核形成和 AKT1-EGFP 活化及肌动蛋白成丝的多重分析。

IN Cell Analyzer 2000 一系列全新的特征包括：预览扫描、大照相机配件、灵敏度增强和图像背景噪音去除（去卷积）等配置。这些特征使工作流程改善，提高了速度，并获得极佳的图像质量。

结论

IN Cell Analyzer 2000 是一个多功能的用户友好系统，能够实现多个不同的生物学应用，并产生共聚焦一样的图像，对于高内涵分析应用可谓非常理想。

[点击索取IN Cell Analyzer 2000 系统的详细资料](#)

[参考文献](#)

1. Application note, GE Healthcare, code number 28-9538-32 AA.
2. Application note, GE Healthcare, code number 28-9538-31 AA.
3. Ovechkina, Y; Content GenoTox Screening using IN Cell Analyzer 1000, presented at SBS 12th Annual Conference & Exhibition, September 17-21, 2006.
4. Application note, GE Healthcare, code number 28-9545-14 AA.

5. Zhang, D. H. A pair of new statistical parameters for quality control in RNA interference hightthroughput screening assays. *Genomics*. 2007; 89(4):552-61.
6. Physiological relevance of GPCR oligomerization and its impact on drug discovery. *Drug Discovery Today* (2008) 13:1056-1066.
7. Product brochure; GE Healthcare, code number 11-1114-03AA.
8. Wallace, W, Schaefer, L, Swedlow, J. R, A Workingperson's Guide to Deconvolution in Light Microscopy, *BioTechniques* 31:1076-1097 (November 2001).

揭秘 Illumina 的个人基因组测序服务

Illumina 公司 6 月 10 日宣布将向客户提供高质量的个人基因组测序服务，价格为 48000 美元。该服务将利用 Illumina 的 Genome Analyzer II 测序仪，在最近认可的 CLIA 实验室中开展。它将会为客户列出基因组中的 SNP 和结构变异，如插入、缺失和重排。

但 Illumina 不提供数据阐释的服务，比如疾病风险评估、谱系分析或遗传性状的信息。因此，它与直接面向客户的基因组学公司 23andMe、Navigenics、Decode Genetics 和 Knome 合作。客户可从这些合作伙伴中选择，来分析他们的数据，但需要支付额外的费用。

Illumina 并不是第一家向个人提供全基因组测序的公司。Knome 在 2008 年初就已经提供了这项服务，包括数据阐释，目前收费 99500 美元。Medomics 也提供“诊断基因组”服务，价格暂未透露，但目前生意仍未开张。不过，Illumina 是第一家向客户提供此项服务的专业测序技术供应商。

Illumina 的总裁 Jay Flatley 也承认目前的市场很小，但公司的主要目标是为以后铺路，将未来所需的设备投入到位，这样当测序费用下降时，市场自然会增长。“我们相信现在是时候去开发 Illumina 内外的设备，使它能很好地起作用。”这包括构建一个医生的网络、数据分析的“生态系统”、以及解决监管和临床验证的问题。

48000 美元的价格并不便宜。Flatley 也知道这一点，目前只有一小部分人能承受，但他认为价格会持续下跌。Flatley 表示：“我们认为有相当一部分人会希望成为世界上前 10 个命名的基因组，或者前 100 个、前 1000 个，所以这也是个市场。”

Illumina 会从客户提供的血液或唾液样品中提取 DNA，并利用 Genome Analyzer II 的配对末端技术，来进行测序，覆盖度大约是 30 倍，并将读数与人类参考基因组进行配对。它还会利用芯片技术对 DNA 进行基因分型，作为一致性匹配的验证。

[索取 Illumina 最新一代测序系统 Genome Analyzer 的详细资料，请点击！](#)

一旦分析结束，Illumina 会将结果发给客户指定的医生，客户可通过苹果电脑上的 GenomeStudio 基因组浏览器软件来查看 SNP 和结构变异，但是这个软件更像是一个研究工具，它没有用户友好的界面。

客户一旦收到他们的序列数据，就可以从 4 个合作伙伴中选择 1 个来解释这些 ATGC 的含义。当然，你还需要再支付一笔费用，才能了解到疾病风险、谱系及其他性状。不过，具体的费用是多少，几家公司都还未最后确定。

Knome 将采用它自身的基因组测序服务所采用的 KnomeXplorer 基因组浏览器软件来进行分析。而且，还会根据客户的要求提供定制的报告。客户还可以选择每年的更新服务。Knome 本身也提供 99500 的基因组测序和 24500 的外显子测序和分析服务，其中测序工作是由北京基因组研究所完成的。

(生物通 余亮)

罗氏宣布 454 10GB 资助计划的获奖者

生物通报道，罗氏应用科学部近日宣布了 454 生命科学的 10 GB 基因组测序资助计划的获奖者，他们分别是北美和欧洲的两个研究小组。

北美的奖项是授予埃默里大学、威斯康星大学和华盛顿大学的研究人员，他们计划对南美切叶蚁基因组以及相关的真菌和细菌基因组进行测序。

威斯康星大学的 Cameron Currie、埃默里大学的 Nicole Gerardo 和华盛顿大学的 George Weinstock 是这个研究小组的领导者，该研究小组还包括美国能源部五大湖生物能源研究中心、华盛顿大学基因测序中心以及威斯康星大学和埃默里大学的研究人员。

大约五百万年以来，切叶蚁一直靠养殖真菌来获取食物。就像人类的耕作一样，这个古老的系统很复杂，包含着切叶蚁、真菌、益生菌和有害的病原体之间的共生关系。研究人员一直都对切叶蚁及相关真菌和细菌之间的共生关系很感兴趣。通过基因组测序，他们希望能理清共生和共同进化背后的遗传作用，并了解协助切叶蚁将纤维素转化成燃料的微生物酶。

Nicole Gerardo 表示：“根据以往的生态学和进化研究，我们将利用基于 Genome Sequencer FLX 系统宏基因组学、转录组学和基因组学来探索这种关系下蕴藏的分子进程。”

同时，欧洲的 10 GB 资助是奖励给瑞士热带研究院和英国格拉斯哥大学的研究小组，他们正在研究布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)的一个亚种，而布氏锥虫是引起非洲睡眠病的元凶。此疾病存在于撒哈拉沙漠以南的非洲大陆，如果未能得到治疗，将会是致命的，而且已经出现了抗药性菌株，让情况更加恶化。他们的测序计划旨在鉴定布氏锥虫中与疾病和药物抗性相关的突变和遗传变异。

瑞士热带研究院的研究人员 Pascal Maser 表示：“10 GB 资助计划所产生的数据将让我们有可能开发出 DNA 检测，来诊断睡眠病的药物抗性。”

罗氏的 10GB 资助计划将支持从事 DNA 或转录组测序的研究人员、研究机构或公司。每个获胜的小组将获得罗氏 454 Genome Sequencer FLX 系统所测得的最多 10 GB。

[点击索取 454 新一代测序仪的详细资料！](#)

罗氏 454 生命科学的总裁 Chris McLeod 表示：“一个获奖的小组将利用测序来加深我们对于最古老、最复杂的共生关系的了解，而另一个则致力于改善一种致命性疾病的治疗。科学界发现 GS FLX 新应用的能力让我们欢欣鼓舞。”（生物通 余亮）

赛默飞世尔启动 RNA 干扰研究/ 药物筛选资助项目

作为基因分析方案的领先者，赛默飞世尔科技为了促进 RNA 干扰技术在科学研究与药物发现领域的发展，日前启动了 RNA 干扰研究/药物筛选资助项目。在当前这个经济困难时期，这对广大研究人员无疑是一个特大喜讯。该项目将为生命科学研究者免费提供**价值高达 US\$400000** 的 RNA 干扰试剂。

具体的资助内容包括由 Thermo Scientific Dhamacon 和 Open Biosystems 提供的全基因组 siRNA, shRNA 以及 microRNA 试剂。

欢迎生命科学研究者向该资助项目提交基于 RNAi 筛选的项目申请，赛默飞世尔科技将提供 3 类总共 5 套 RNAi 筛选试剂给那些具有潜在的重大科学影响的项目。**截止日期为 2009 年 9 月 7 日。**

用于资助的 3 类 RNAi 筛选试剂如下：

1、全基因组 RNAi 筛选套装（1 套）

- 包括你选择的全基因组 siRNA 或 shRNA 文库
- 对照和用于转染的支持试剂
- 全球 RNAi 俱乐部成员资格
(www.rnaiglobal.org)

2、基因家族和通路筛选套装（2 套）

- 包括你选择的 siRNA 或 shRNA 子文库
- 对照和用于转染的支持试剂

3、全基因组 microRNA 筛选套装（2 套）

- 包括合成的 microRNA 模拟物和阻遏物
- 对照和转染试剂

在申请时，你需要提交以下资料：

- 研究计划的摘要和描述
- 目前已有的筛选能力和设施
- 申请者的简历

赛默飞世尔组织的科学顾问委员会将会根据以下几点，对资助申请进行评估：

- 申请项目的科学价值
- 实验室的设施和筛选能力
- 对科学和医学的影响

如果你正准备开展一个 RNAi 筛选的大项目，不妨先申请赛默飞世尔的这项资助吧。如果能被选中，那将会节省很大一笔经费呢。

详细内容，请查看：

<http://www.ebiotrade.com/custom/ThermoFisher/090727/>。

RNAi 文库资料链接：

<http://www.thermo.com.cn/Product4087.html>

microRNA 资料链接：

<http://www.thermo.com.cn/Product4235.html>

siRNA 转染试剂链接：

<http://www.thermo.com.cn/Product4242.html>

[如需更多资料，请点击索取！](#)

TTP LabTech 助力 TTP 集团 荣获极具声望的企业女王奖

为表彰它的杰出成就，领先的独立技术及产品开发公司——TTP 集团被授予 2008 年度企业女王奖（Queen's Award for Enterprise）之国际贸易奖。TTP 集团很荣幸能被授予此项极具声望的商业奖项。

企业女王奖是英国享有最高声望的奖项，用于表彰在业绩、知名度和贡献度上获得杰出成就的公司。每年，英国女王在首相的建议下，并由政府、工商业和工会代表所组成的顾问委员会协助，颁布该奖项。此次 TTP 集团获得该奖项得益于其高度革新的技术，以及高价值的技术服务和技术产品创造了超过 2000 万欧元的年度出口贸易总额，成为靠技术创新而获得企业战略制高点的技术型公司的发展典范。

TTP 集团的主要业务之一是为全球客户提高提供专业的产品和技术的专项研发服务，同时 TTP 也活跃的投资并开发自有技术孕育新的公司，如 TTP LabTech (TTP 集团的全资子公司) 为药物研发行业和生命科学研究领域开发的一系列仪器和流程。TTP LabTech 的产品专为提高生物制药研究中的效率、效能、灵活性及整体能力而设计，包括化合物存储 (comPOUND®)、小体积移液操作 (mosquito®) 和荧光检测 (Acumen® eX3)。

[点击索取纳升级移液系统mosquito的技术资料！](#)

这是 TTP 集团第二次荣获女王奖。在 1999 年，它曾因 ChemScan 仪器而获得技术成就奖。ChemScan 是由 TTP LabTech 开发并制造的，能快速检测水和食品中的细菌。TTP LabTech 的营业额占了 TTP 集团的三分之一，其中绝大部分是来自国外，海外市场开拓中优秀的表现也为这次获得女王奖作出了卓越的贡献。

如欲了解更多关于 TTP LabTech 公司及其产品线，请访问 www.ttplabtech.com。（中国地区也可访问 www.ttplabtech.com.cn）

关于 TTP 集团的更多信息，请访问 www.ttpgroup.com。



1999 年 4 月 ChemScan 获技术成就女王奖

2001 年 3 月 荣获商业投资类别优秀商业大奖 (Business Investment (2000) category of the Business Excellence Awards)

2006 年 9 月 卓越创新及设计大奖
Innovation & Design Excellence Awards

(此前亦作产品设计和开发奖 Product Design and Development Awards)

之消费者产品创新大奖 Consumer Product Innovation Award 2006

2008 年 8 月 企业女王奖 Queen's Award for Enterprise



2008 年 9 月 卓越创新和设计大奖
Innovation & Design Excellence Awards

之最佳设计顾问奖 Best Design Consultancy
Award

关于 TTP LabTech 公司

总部位于英国剑桥附近的TTP LabTech公司
隶属于TTP集团，是世界上最成功的技术公司之

一。TTP LabTech的使命是将最好的科学和一流的
工程学相结合，为制药和医疗保健行业提供实用且
创新的解决方案。TTP LabTech的产品专为提高生
物制药研究中的效率、效能、灵活性及整体能力而
设计，包括化合物存储管理（comPOUND®）、
小体积移液操作（mosquito®）和荧光检测
(Acumen® eX3)。关于TTP Labtech的更多信
息，请访问www.ttplabtech.com。（中国地区也可
访问www.ttplabtech.com.cn）

阅读英文原稿：

[TTP LabTech helps TTP Group win the
prestigious Queen's Award for Enterprise in
International Trade](#)

[TTP Group AWARDS from 1999](#)