

# EBIOTECH

生物通技术周刊

第75期

2010年4月22日

全文下载

## 【技术前沿】

高分辨率熔解HRM的应用前景

GFP亮不亮，纳米抗体说了算

原位微量BCA蛋白定量法

## 【新品速递】

强者恒强 Illumina新测序仪通量高达200Gb

值得期待 ABI SOLiD 4测序仪即将登场

Life Technologies加入第三代测序大战

安捷伦科技发布新一代实时定量PCR试剂盒

GE推出最新的相互作用分析系统Biacore 4000

安捷伦靶向序列富集系统最新支持样本条形码标记及索引

## 【应用指南】

均相时间分辨荧光（HTRF）技术在药物筛选中的应用

（视频）如何高效转染原代细胞

冷泉港发布2月实验手册

## 【行业动态】

Sigma推出生命科学新网站

全球50家最具创新力企业之生物公司

博奥生物成为罗氏NimbleGen中国首家认证服务商

赛默飞世尔科技收购高效PCR产品供应商Finnzymes

# 高分辨率熔解 HRM 的应用前景

高分辨率熔解 (High-resolution melting, 简称 HRM) 分析是一门新兴的技术。它仅仅通过 PCR 之后的熔解曲线分析, 就能检测 PCR 片段的微小序列差异, 从而应用在突变扫描、序列配对和基因分型等多个方面。凭借其速度和简便性, 高分辨率熔解这种方法正在迅速普及。

其实双链 DNA 的熔解分析可追溯到上世纪六十年代, 当时是通过紫外吸收来监测的。分析需要几微克的 DNA, 而样品以  $0.1-1.0^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$  的速率缓慢加热, 常常要花上几个小时才能完成。后来, LightCycler 定量 PCR 仪的出现, 让荧光熔解分析变得流行。样品量因毛细管而缩减至纳克级, 且熔解速率更快, 达  $0.1-1.0^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ , 这样熔解时间缩短至几分钟。当时使用的染料是 SYBR® Green I。

然而, 这种熔解分析只能区分在片段大小和 GC 含量上差别较显著的 DNA 序列, 比如检查 PCR 扩增产物中是否存在引物二聚体及其他非特异性的扩增。如果要区分 SNP, 分辨率还不够。为什么呢? 这里有必要先介绍一下饱和染料和非饱和染料。SYBR Green I 就属于非饱和性染料, 由于它对 PCR 的抑制作用, 在实验中的使用浓度很低, 远未将 DNA 双螺旋结构中的小沟饱和。这样, DNA 双链高温变性时, 单链部分的荧光染料分子发生重排, 荧光染料分子重新结合到双链 DNA 的空置位点, 造成荧光信号没有变化, 因此出现假阴性, 特异性下降。

于是, 饱和染料问世了。为什么称为饱和染料呢? 因为它们即便在饱和浓度 (荧光最大) 下, 也不会抑制 PCR。故高浓度的染料饱和了 DNA 双螺旋结构中的小沟, 在 DNA 解链过程中就不会发生重排, 这样熔解曲线才有了更高的分辨率。目前市场上的饱和染料主要有 LC Green、LC Green Plus、SYTO 9 等几种。光有染料还不够, 仪器也要相应升级呢。

扩增子的熔解曲线完全取决于 DNA 碱基序列。序列中如有一个碱基发生了突变, 都会改变

DNA 链的解链温度。但是这个差异极小, 只有零点几摄氏度, 如果仪器的分辨率不高, 是根本无法检测的。

那么什么样的分辨率才是高分辨率呢? 根据仪器现有的功能测试, 在熔解操作时每摄氏度至少要获得 10 个数据点, 这是对仪器的最低要求。此外, 温度均一性也同样重要。如果两孔之间温度相差  $0.1^{\circ}\text{C}$ , 就很可能导致最终的熔解温度相差  $0.1^{\circ}\text{C}$ , 这样就无法保证 HRM 分析结果的准确性。大多数常规定量 PCR 仪的孔间温度差在  $0.3-0.5^{\circ}\text{C}$ , 这也决定了它们无法胜任 HRM。

目前市场上有多个厂家提供 HRM 分析的仪器, 包括 Idaho Technology、Corbett (QIAGEN)、Roche 等, 有些是专供 HRM 的仪器, 有些则是附带 HRM 功能的定量 PCR 仪。HRM 的发明者—美国犹他大学医学院的 Wittwer 实验室曾评估了市场上多台仪器在基因分型和突变扫描上的性能<sup>1</sup>。他们发现, 对于大部分仪器的准确基因分型来说, 主要限制在于平板上的空间温度差异 ( $T_m$  的标准偏差为  $0.020-0.264^{\circ}\text{C}$ )。其它差异如数据密度、信噪比和熔解速率, 也会影响杂合体的扫描。经过比较发现, 空气加热型仪器以及样品温度单独控制的仪器有着更低的  $T_m$  标准偏差 ( $0.018-0.065$ ), 而加热块型仪器则在  $0.092-0.274$ 。

在拥有饱和染料和高分辨率仪器之后, HRM 分析就可以开始啦。这个过程其实很简单, 就是对 PCR 的扩增子进行加热, 温度从  $50^{\circ}\text{C}$  逐渐上升到  $95^{\circ}\text{C}$ 。在此过程中, 扩增子逐渐解链, 在到达熔解温度 ( $T_m$ ) 时, DNA 链完全分开。在 HRM 分析的初期, 荧光强度很高, 随着温度升高, 双链 DNA

逐渐减少，荧光强度也就下降了。HRM仪器通过照相机，记录下荧光变化的整个过程。通过对数据的作图，就生成了熔解曲线。[索取更详细的技术资料](#)

果然够简单吧，连探针也无需设计，只要在常规 PCR 中加一个饱和染料即可。HRM 既可以对未知突变进行筛查、扫描，也可以对已知突变进行分析。相对于传统的突变分析而言，操作步骤大大简化，时间和成本也降低了不少。而且样品经 PCR 扩增后直接进行 HRM 分析，无需转移，真正实现了闭管操作，降低了污染的风险。

正是凭借这些优势，HRM 近年来广泛用于突变扫描、序列配对、基因分型和甲基化分析等应用中。

### 序列配对

序列差异分析常用的方法包括单链构象多态性、变性梯度凝胶电泳、变性高效液相色谱、测序等，这些方法都需要分离样品，之后进行多步反应，操作繁琐，耗时长，且 PCR 产物有污染的风险。而 HRM 在 5 分钟之内就能完成，无需额外的步骤，也容易开发成高通量筛选，且是唯一的闭管操作，增加了分析的可靠性，这些优势对于分子诊断分析而言，格外重要。

在器官移植中，医生通常会检测兄弟姐妹的 HLA，以便了解主要组织相容性是否匹配。利用 PCR 产物的熔解曲线，能快速配对 HLA 序列。与熔解温度 ( $T_m$ ) 不同，那只是熔解曲线上的一个点，高分辨率熔解是分析整个熔解曲线。利用熔解曲线的形状作为指示剂，来显示杂合 DNA 所形成的异源双链的序列匹配。之后将两个 DNA 按 1: 1 的比例混合，重新熔解，并将新曲线与原先的曲线进行比较，来验证序列的匹配。如果两个样品的序列不是完全相同的，那么混合后异源双链的熔解曲线形状会改变。

瑞典乌普萨拉大学的 Olof Gidlöf 等曾开发出线粒体基因组中两个超变区 HVI 和 HVII 的 HRM 分析，以分辨不同个体的 DNA，作为法医鉴定中

测序前的预筛选<sup>2</sup>。研究表明，线粒体 DNA 中 HVI 和 HVII 所存在的序列变异确实产生了熔解曲线形状的差异，能辨别不同个体的 DNA，这样就能排除不匹配的法医材料，从而节省线粒体 DNA 测序的时间和费用。另外，与其它技术相比，HRM 操作简单，价格低，能同时筛选大量的样本。

### 突变扫描

单碱基改变、插入、缺失都能通过 HRM 来检测。在灵敏度和特异性方面，高分辨率熔解也高于 dHPLC 在内的传统方法。当变异体为低等位基因片段时，它甚至比 DNA 测序还灵敏。测序只能检测低至 20% 的变异体，而 HRM 能检测的变异体低至 2%。而且，测序所花的时间、费用和精力，与 HRM 是不可同日而语的。

对于 400 bp 以下的 PCR 产物，扫描单碱基变化的灵敏度和特异性皆为 100%。对于 400 到 1000 bp 的 PCR 产物，灵敏度为 96.1%，特异性为 99.4%。PCR 产物中变异的位置不影响扫描准确性。尽管 HRM 是为检测杂合体（一个等位基因发生突变）而设计的，但它也能检测纯合体（两个等位基因都有突变）。对于半合子变异体（X 连锁或 Y 染色体），最好将未知样品与已知野生型的样品混合。

LMNA 基因的突变会导致多种失调，现在称之为核纤层蛋白综合征。由于待研究的个体颇多，故必须用一种特别灵敏且特异的方法来进行突变扫描。于是，Gilles Millat 等就开发出适合 LMNA 突变扫描的 HRM 分析<sup>3</sup>。他们同时用了 HRM 和 dHPLC 两种方法，对 64 位患有扩张性心肌病的病人进行筛选。结果表明，凡是 dHPLC 或直接测序能检测出的基因变异，HRM 分析也能轻松鉴定，且速度比 dHPLC 快 2 倍，还更为经济。研究人员认为，HRM 分析是鉴定 LMNA 遗传变异的高灵敏、高通量的廉价方法。

### 基因分型

传统的基因分型方法不仅耗时费力，还需要购买价格不菲的探针。相比之下，HRM 分析则是优

势多多，无需扩增和制备，排除了污染的风险；探针的钱也省了；还能检测未知的变异体，这一点探针可无能为力。有了饱和染料，PCR 产物全程被标记，因此所有的熔解区域都能检测到。对于同一扩增子内的不同杂合体，通过曲线形状的差异也能区分开。HRM 大约能分辨 93% 的杂合体。大部分纯合体也能通过熔解来分辨，但不是全部。大约有 4% 的人单碱基变异体有着相同的  $T_m$ ，且图像对称。在这种情况下，可以将已知的纯合体与未知的纯合体混合，再进行分析。

Lasse Kristensen 等曾为参与甲基代谢的关键基因 (MTHFR、MTR 和 DNMT3b) 开发出 HRM 分析，对它们进行基因分型，并在 Rotor-gene 6000 等仪器上进行检测<sup>4</sup>。他们认为，与基于 TaqMan 探针的基因分型相比，HRM 分析更经济。无需使用探针，分析所需的优化也更少，成功率更高。与焦磷酸测序、SNP 芯片等多种技术相比，HRM 是最佳选择。

### 甲基化分析

HRM 分析还为 DNA 甲基化状态的检测另辟蹊径。DNA 样品通过亚硫酸氢盐的处理，将未甲基化的胞嘧啶转化成尿嘧啶。这样，原先未甲基化模板所产生的 PCR 产物比甲基化模板的  $T_m$  要低。HRM 还能确定特定样品中甲基化的比例。将不同比例的甲基化和未甲基化 DNA 混合，制作出标准曲线，将样品的熔解曲线与之相比较，从而确定样品中甲基化的比例。

异常的甲基化模式往往与癌症相关联，于是 Eric Smith 等开发并验证了快速定量 DNA 甲基化状态的 HRM 分析<sup>5</sup>。他们利用数学方法来标准化加热 DNA 所产生的原始荧光数据，从这些数据中计算出熔解开始和结束的温度，从而反映模板分子的甲基化水平。之后，他们还用已知甲基化水平的寡核苷酸及 DNA 进行了验证。他们发现，通过 HRM 分析这种快速单管的方法来定量甲基化是可靠的，引物容易设计，且无需专门的软件。所获得

的参数提供了标本中甲基化的客观描述和定量，能用于标本之间的统计学比较。

综上，HRM 技术应用广泛，操作简单又经济，结果精确且可靠，适合任何实验室使用。市场上有一些专供 HRM 分析的仪器，不过，那些带有 HRM 功能的定量 PCR 仪则更实用。QIAGEN 的 Rotor-Gene Q (Corbett Rotor-Gene 6000) 就是全球第一台将实时扩增与 HRM 分析技术相结合的实时荧光定量分析装置。Rotor-Gene Q 的温度均一性为  $0.01^{\circ}\text{C}$ ，温度分辨率为  $0.02^{\circ}\text{C}$ ，解决了温度均一性、精确性和分辨率的问题，实现了定量扩增与 HRM 的合二为一。(生物通 余亮)

### 参考文献:

1. Herrmann MG, et al. Expanded Instrument Comparison of Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping. *Clin Chem.* 2007, 53(8):1544-1548.
2. Olof Gidlöf, et al. Complete discrimination of six individuals based on high-resolution melting of hypervariable regions I and II of the mitochondrial genome. *BioTechniques.* 2009, 47:671-678.
3. Gilles Millat, et al. Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the LMNA gene. *Clinical Biochemistry.* 2009, 42 (9): 892-898.
4. Lasse S. Kristensen, Alexander Dobrovic. Direct Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms in Methyl Metabolism Genes Using Probe-Free High-Resolution Melting Analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2008, 17(5): 1240-47.
5. Eric Smith, et al. Quantitation of DNA methylation by melt curve analysis. *BMC Cancer.* 2009, 9:123 doi:10.1186/1471-2407-9-123.

# GFP 亮不亮，纳米抗体说了算

在细胞生物学研究中，荧光蛋白几乎无处不在，因此科学家对它的改造也在层层升级。eGFP 应该是大家最熟悉的一种增强型变体，与野生型的 GFP 相比，亮度更强，光稳定性更好。

然而，科学的探索是永无止境的，研究人员还在寻觅更好的荧光蛋白。这不，德国慕尼黑大学的 Ulrich Rothbauer 和他的同事就另辟蹊径，采用一种独特的方法来改变 GFP 的特性。文章发表在近期的《Nature Structural & Molecular Biology》上。

他们的秘密武器是纳米抗体（nanobody）。这些来源于骆驼科动物的单结构域肽段与抗体相似，都有着与抗原结合的性质，不过它们的稳定性更好，体积更小。根据这一性质，研究人员尝试筛选出能调节 GFP 构象及光谱性质的纳米抗体。利用噬菌体展示筛选，他们鉴定出 7 种能与 GFP 结合的不同纳米抗体。

其中一个纳米抗体与 GFP 结合后，荧光比 eGFP 本身增强了 4 倍，后来他们将之命名为 Enhancer。结构分析表明，在 GFP-Enhancer 的复合体中，发光基团带有负电荷。而 Enhancer 与 eGFP 的结合只让荧光增强了 1.5 倍，于是作者们推测 Enhancer 的结合行使着与 eGFP 的突变类似的功能，从而提高了荧光强度。实际上，Enhancer-GFP 的吸收光谱与 eGFP 相似。

同时，研究人员还发现了另一个纳米抗体，在结合后能将 GFP 的荧光强度降低 5 倍，他们称其为 Minimizer。

Enhancer 和 Minimizer 的调节不仅发生在体外，在活细胞内也能重演。作者们将 Enhancer 用于一系列体内应用中，包括带 GFP 标签的雌激素受体在 Hela 细胞中的运输。在激素诱导下，重组子转位到细胞核，在那里它与核定位的 Enhancer 结合，让 GFP 的荧光增强。

这项研究表明，纳米抗体能够在体外和体内操控蛋白的构象。Rothbauer 还表示，他们正在研究用于高分辨率显微镜的 GFP 特异的纳米抗体。他们也在筛选其它荧光蛋白的纳米抗体。因此，在不远的将来，生物学家应该有越来越多的工具可供选择。（生物通 余亮）

相关文献：

Kirchhofer, A. et al. Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 133–138 (2009).

[康为世纪 核酸抽提试剂盒、PCR试剂、Marker 等多个试用装等着你来拿！](#)

# 原位微量 BCA 蛋白定量法

Peter Brescia, MSc. and Peter Banks, Ph. D., BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT

关键词：原位微量 BCA、Mini-BCA、传统标准 BCA

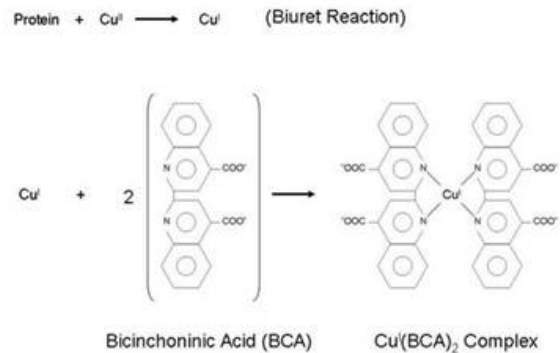
## 简述：

传统标准的BCA蛋白定量分析方法常规均使用试管或者微孔板进行检测，通过对传统方法进行改进，可使用BioTek公司的Take3™ 超微量多体积检测板进行原位微量BCA法蛋白定量分析。待测蛋白样品和BCA工作缓冲液按照顺序直接加在Take3™板的微量定量孔处、温浴，使用Epoch™微孔板分光光度计进行检测。和传统标准BCA方法（BCA工作缓冲液和蛋白质样品体积比为 20： 1）相比，该方法的蛋白检测灵敏度有明显的提高。相比与Mini-BCA分析方法，原位分析方法更加精确。

## 介绍

BCA 法是十分常用的蛋白质比色定量方法，很多试剂供应商都提供基于比色皿和微孔板的 BCA 蛋白定量试剂盒。BCA 蛋白定量法相对于其它比色定量法具有操作简单、稳定、灵敏度高等优点。相对于蛋白质的固有的 280nm 吸收峰检测，BCA 检测法提高了蛋白检测灵敏度和特异性，消除了核酸的干扰，核酸干扰在对细胞裂解物或其他生物样品进行蛋白定量时总是一个难以避免的干扰。在碱性条件下，蛋白将  $\text{Cu}^{2+}$  还原为  $\text{Cu}^+$ ， $\text{Cu}^+$  与 BCA 试剂形成紫色络合物，如图 1。其吸光值与蛋白浓度成正比。测定在 562nm 处的吸收值，并与标准曲线对比，即可计算待测蛋白的浓度。

图 1. BCA 法蛋白质定量。Cu (BCA) 2 络合物在 592nm 有一很强的吸收值，7700L/mol/cm。



近几年开发的一些精密的检测仪器，都可以使用短光程、微量体积的样品进行比色定量，例如 NanoDrop (ThermoFisher Scientific)。这个仪器内置了蛋白质 280nm 直接定量法，这种方法可以有效地避免浪费样品且操作简单。在直接蛋白定量的基础上，这些仪器还发展了蛋白质比色定量法，例如 BCA 法。通过调整蛋白质和 BCA 工作缓冲液的相对体积比，由原来的 20： 1 调整为 1： 1，这种微量定量方法转换校准曲线的工作范围，使之更适合于微孔板或短光程检测，这种方法叫 Mini-BCA 法。然而对于这些通过把样品加在检测基座上的仪器来讲，蛋白质和 BCA 工作缓冲液必须先在一个额外的试剂槽里进行混匀和温浴，然后才能滴加到检测基座上进行检测。这样会增加操作的复杂性，增加了样品的浪费。

这里我们介绍一下如何使用 Take3 超微量多体积检测板进行原位微量 BCA 蛋白定量法。使用 Take3 超微量多体积检测板进行 Mini-BCA 法检测操作步骤简单，整个流程和使用典型的 96 孔微孔板检测相似，直接把 BCA 工作缓冲液和样品滴

测操作步骤简单，整个流程和使用典型的 96 孔微孔板检测相似，直接把 BCA 工作缓冲液和样品滴加在 Take3 板的微孔处，不需要先在其它容器混匀进行颜色反应。这样做的好处是可以提高操作的便捷性，每次检测只需要 2ul 样品，非常节约样品。

### 实验材料和方法

BCA 检测试剂盒（Sigma-Aldrich 公司）、小牛血清（BSA）（Sigma-Aldrich 公司）。我们使用两种实验方法来进行 BCA 检测。

第一种方法是按照 NanoDrop 技术手册推荐的“Mini-BCA”法。其简要流程是：BCA 检测系统混合好的 10ulBCA 工作缓冲液和 10ul 的标准蛋白或待测的 10ul 样品（1：1）在试管中混匀，37℃ 温浴 30 分钟后进行检测。

第二种方法是使用 Take3 超微量多体积检测板进行原位检测。其简要流程是：直接按照顺序滴加 2ul 标准蛋白或样品，然后再滴加 2ul BCA 工作缓冲液到 Take3 板的检测孔上，标准蛋白和检测样品每个 2 份，室温（~22℃）孵育 25 分钟后进行样品的定量检测。如图 2。

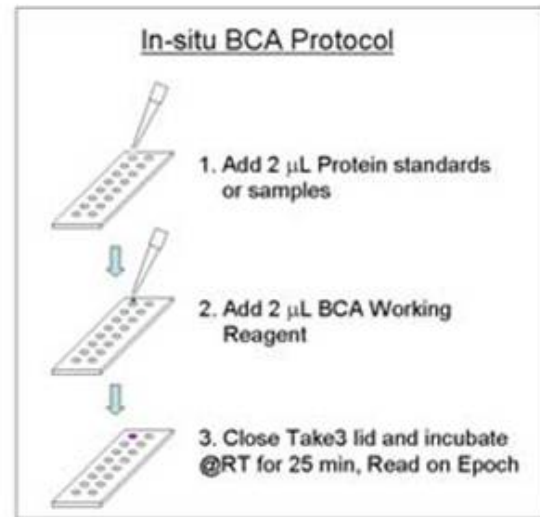


图 2. Take3 微量定量板上的 16 个检测孔的上下石英表面相当于原位 BCA 法反应和检测管路，加样完成后合上 Take3 板，室温放置 25 分钟后，使用 Epoch 微孔板分光光度计检测。

小牛血清标准蛋白按照 1：3 或 1：2 系列稀释成 7 个点，浓度范围分别在~0.01—2mg/ml 或 0.01—3mg/ml。1：2 系列稀释的样品用于比较两种方法的灵敏度。为了比较两种方法的精确性，我们根据图 3 制定了一个 Take3 板布局，使用 6 个点 1：3 系列稀释的样品，浓度范围在 0.01—1.0mg/ml。在 Take3 板上进行微量体积原位 BCA 分析，推荐使用下面的布局。

	1	2	
A	○	○	Blank
B	○	○	0.012 mg/mL
C	○	○	0.037 mg/mL
D	○	○	0.11 mg/mL
E	○	○	0.33 mg/mL
F	○	○	1.0 mg/mL
G	○	○	Unknown Sample 1
H	○	○	Unknown Sample 2

图 3. Take3 板布局给出 BSA 标准蛋白的位置和浓度以及多达四个未知浓度标准品。这个布局提供了 6 个标准蛋白浓度点用于制作标准曲线，这个 6 个点位于 A-F 行，每个点有两个重复，浓度

范围为 0.01-1.0mg/ml，还有 4 个检测孔用于放置未知样品，位于 G、H 行。在原位 BCA 法和 Mini-BCA 法都是用这种布局，来比较试验的准确性。

空白对照是 1: 1 体积的 BCA 工作缓冲液和去离子水。BCA 法蛋白定量的检测波长为 562nm。BSA 的实际浓度是使用 Take3 和 1cm 标准光程的 BioCell 石英比色杯在 Epoch 分光光度计上检测得到的。

## 结果&讨论:

### 反应动力学

典型的 BCA 法检测方案需要体积比为 20: 1 的 BCA 缓冲液和蛋白样品，NanoDrop 技术手册使用的是 4ul 蛋白质样品加到 80ulBCA 缓冲液中。即使在标准曲线的高浓度端（例如： 2mg/ml BSA），BCA 工作缓冲液的活性成分的摩尔量明显超过参与反应的蛋白质（见表 1）。同样也超过双缩脲反应的结合位点（肽键，半胱氨酸，胱氨酸，色氨酸，酪氨酸），但是这浓度的差异也是有一定限度的，因为蛋白质的三维结构会阻碍  $\text{Cu}^{2+}$  和 BCA 的进入这些位点，形成大体积螯合物。因此减少蛋白质样品和 BCA 工作缓冲液的稀释比例应当保持反应的动力学并且保证标准曲线的工作范围能够覆盖到低蛋白浓度。

表 1.蛋白标准品和 BCA 工作缓冲液体积比为 20: 1 时，其中 BSA 标准品和 BCA 工作缓冲液的有效成分的浓度和摩尔量的比。

[BSA] (mg/mL)	[CuSO <sub>4</sub> ] (% w/w)	[BCA] (% w/w)	[Cu <sup>2+</sup> ]/[BSA] (mol L <sup>-1</sup> /mol L <sup>-1</sup> )	[BCA] <sub>2</sub> /[BSA] (mol L <sup>-1</sup> /mol L <sup>-1</sup> )
2.0	4	1	2,100	8,500

Mini-BCA 推荐的是 1: 1 体积混合的 BCA 工作缓冲液和蛋白质样品，这里我们使用 10ul 蛋白质样品和 10ulBCA 工作液进行混合反应。大大减少蛋白质样品的稀释比例，并且也改变了 BCA 分

析方法的动态范围，将检测浓度降低到 0.01mg/ml。

我们修改了实验方案以适合原位微量 BCA 检测，2ul BSA 标准品或样品，然后再滴加 2ul BCA 到 Take3 微量板的检测孔上，合上检测板室温孵育，图 4 显示了 1mg/ml BSA 标准蛋白的反应进程。

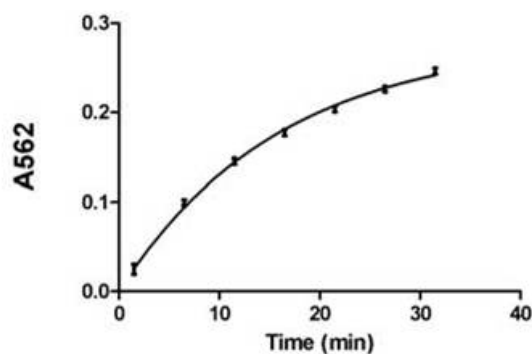


图 4. 562nm 处检测原位微量 BCA 的反应进程，BSA 的浓度为 1.0mg/ml，孵育室温为 22℃

目前大部分的 BCA 蛋白定量法在室温下需要 2 个小时进行颜色反应或提高温度（37℃或 60℃）以缩短反应时间。这里我们使用了 20 分钟就达到满意的颜色反应。我们选择 25min 孵育时间使最大程度的颜色反应和 4ul 反应体系的最小程度蒸发达到一个平衡。

### 1: 1 反应体系灵敏度增强

图 5 显示了使用反应体系为 1: 1 的原位微量 BCA 法和反应体系为 20: 1 传统的 BCA 法进行比较，原位微量 BCA 法的灵敏度要高于传统 BCA 方法。

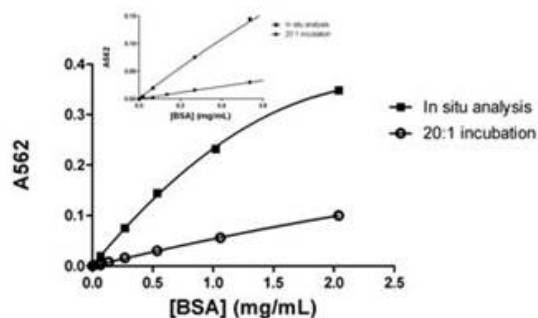


图 5. 使用 Take3 超微量多体积检测板检测分析比较原位法检测和先在离心管以 20: 1 体积混匀再滴加到 Take3 板上进行检测

原位微量 BCA 法灵敏度的增加和显著减少蛋白质在 BCA 工作缓冲液中的稀释有关，把动态检测范围延伸到更低的蛋白浓度，直至定量的极限 10ug/ml BSA。和传统的 20: 1 的反应体系相比，当蛋白浓度  $\geq 2000\text{ug/ml}$  时，检测的线性会受到一定的影响。这是因为稀释比例的降低将  $\text{Cu}^{2+}$  的摩尔浓度相对于 BSA 浓度的过量被减少了 100 倍。鉴于这里有超过 650 个可能反应位点在 BSA 的一级结构中，蛋白质成为双缩脲反应的限制因素。当我们把标准曲线外推至 3000ug/ml（数据没有显示）时，曲线则已经呈现平坦趋势。有鉴于此，我们推荐原位微量 BCA 法的标准曲线范围在 10ug/mL—1000ug/mL。

提高了定量的准确性

Take3 板上有 16 个用于检测微孔，可以同时完成标准品和未知样品的原位定量检测，类似于微孔板中进行的实验。这样可以减少由于孵育时间和温度变化的原因带来的定量误差—已知可以影响 BCA 分析的变量。使用 Take3 板按照上图 3 进行排列样品，原位定量法和“Mini-BCA”法相比，原位定量的准确性有明显的提高。参见表 2

表 2. 使用原位 BCA 法和“Mini-BCA 法”检测两个 BSA 样品，比较两种方法的精确性。负的%精确度表示 BSA 浓度被低估，相反，正的%精确度表示 BSA 浓度被高估了。用来计算每个样品做 3 次。

[Actual BSA] (mg/mL)	% Accuracy	
	In-situ	Mini-BCA
0.037	-0.99	-5.6
0.34	-1.5	-12

结论:

原位微量 BCA 法和 Mini-BCA 相对于传统的 20: 1 反应体系的 BCA 法，都使蛋白检测浓度范围向下延伸一个数量级。从蛋白样品和 BCA 工作缓冲液的角度来看，相对于 Mini-BCA 法，原位微量 BCA 法更为简单、快捷、经济。此外，原位微量 BCA 法在同一微量板上同时进行标准蛋白和未知样品的检测，进一步提高了定量精确性。

[点击索取原位微量 BCA 蛋白定量法的更多技术资料](#)

参考文献:

1. Brenner, A.J. and Harris, E.D. (1995). A Quantitative Test for Copper using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* 226(1), pp. 80-84.
2. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual, 2009 Thermo Fisher Scientific Inc., Revised 03/09.
3. Smith, P.K., et al. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* 150 pp.76-85.
4. NanoDrop Technical Support Bulletin T010, Protein Measurements on NanoDrop Spectrophotometers. 2007 NanoDrop Technologies, Inc. Rev 5/07.

# 强者恒强 Illumina 新测序仪通量 高达 200Gb

在新一代测序的三国之争中，Illumina 在销售额上一直占上风，世界顶尖研究院都拥有多台 GA 测序仪。长江后浪推前浪，在竞争如此激烈的测序市场上，哪怕稍一停滞，都相当危险。好多家公司，好多种技术，好多个产品都在纷纷赶超。Illumina 当然明白这个形势。在 1 月中旬，HiSeq 2000 的突然上市，让我们刮目相看。



HiSeq 2000 是市场上第一台能够让研究人员在单次运行中获得两个人类基因组的测序仪，每个基因组的覆盖度约为 30 倍，且费用低于 1 万美元。HiSeq 2000 每次运行能获得多达 200 Gb 的序列数据，读长为 2×100 bp。这样一来，在测序通量上，Illumina 又战胜了之前一直遥遥领先的 ABI (SOLID 3)。

凭借 Illumina 久经考验且广泛采用的可逆终止法边合成边测序试剂，再加上创新的制造工艺，HiSeq 2000 实现了目前行业最高的测序产量和最快的数据产生速率。除了前所未有的产量，HiSeq 2000 测序系统还带来了突破性的用户体验。多个创新的设计特征，让 HiSeq 2000 成为超易用的新一代测序系统。这些特征如下：

- 流动槽很容易上样到真空控制的上样站中。

- 预先配置的即插即用试剂放入仪器冷冻室的架子上，足够 200 个循环使用，而手工操作时间只需要 2 分钟。

- 简单的触摸屏用户界面，包括屏幕上每一步的操作指示和嵌入的多媒体协助，简化了运行设置。

- 实时的进展指示提供了一目了然的状态，而远程监控让单个用户能够互联网互动电话的浏览器检查多个系统的进展。

- HiSeq 2000 能够在单个或两个流动槽模式下操作，赋予了无可比拟的实验灵活性和仪器可扩展性。

- 可独立操控的流动槽让需要不同读长的应用能同时运行。

- 内含 Illumina 高效且可扩展的数据分析方案，能将数十亿个碱基的原始测序数据转化成可发表的，在生物学上有意义的结果。

通量升高了，费用却降低了。在单次运行中，HiSeq 2000 能以~30 倍的覆盖度对两个人类基因组进行测序，每个基因组的费用不到 1 万美元，或绘制 200 个基因表达谱，每个样品不到 200 美元。

如此高性能的系统，难怪华大基因会大手笔一次购进 128 台。这也是 Illumina 迄今为止签下的最大一笔订单。至于 HiSeq 2000 测序仪的价格，涉

及到仪器、配件和试剂，生物通也难用一两个数字来概括，感兴趣的用户[请联系 Illumina 索取报价和资料](#)。

HiSeq 2000 测序系统目前可应用在多个领域，包括：DNA 测序、基因调控分析、测序法转

录组分析、SNP 发现与结构变异分析、细胞遗传学分析、DNA-蛋白质相互作用分析 (ChIP-Seq)、测序法甲基化分析以及小 RNA 的发现及分析。

(生物通 余亮)

# 值得期待 ABI SOLiD 4 测序仪 即将登场

罗氏 454、Illumina 不久前分别宣布推出了新测序仪，生命科技公司当然也不甘落后。1 月底，SOLiD™ 4 测序系统的神秘面纱被揭开。

据生命科技公司介绍，Applied Biosystems 的 SOLiD 4 系统目前每次运行能产生 100 GB 可定位的序列数据，每个基因组的测序费用降至 6000 美元。该系统将于 2010 年第一季度上市，作为 SOLiD 安装的升级。同时，该公司还宣布，SOLiD 4 系统将在第二季度再度升级，SOLiD 4 hq package 将使每次运行产生 300 GB 可定位的序列数据，并带来 99.99% 的准确率，让客户以 3000 美元的费用完成高质量的全基因组测序。

此外，为配合 SOLiD 4 系统的上市，Applied Biosystems 还推出了 EZ Bead™ 系统，它将样本制备的流程自动化，并降低了整体的测序费用。该系统显著提高了样本制备的效率，让手工操作和仪器周转时间降低了九成。

## [点击索取 SOLiD 4 系统的技术资料 and 报价！](#)

多伦多大学 McLaughlin 中心的主管 Stephen Scherer 博士评价道：“对于即将转化成临床诊断分析的测序来说，它必须是精确、重复性好且经济的。SOLiD 4 是第一台综合了这些特性的测序系统，它有望影响科学和诊断的应用。”

位于美国弗吉尼亚州的 Ignite 个性化医疗研究所 (Ignite Institute of Individualized Health) 成为首个尝鲜的机构。它近日宣布将于生命科技公司合作。作为合作协议的一部分，Ignite 研究所将购

进 100 台 SOLiD 4 测序系统，安装在新的实验室内。

Ignite 研究所去年成立，它的创始人是翻译基因组研究所 (TGen) 的前副主任 Dietrich Stephan。Ignite 将生物医学研究、开发、商业化和临床关怀整合为一体。它的研究主要集中在癌症、代谢疾病如糖尿病、神经学失调如阿尔茨海默症、心血管病和儿科疾病如自闭症。

生命科技公司还宣布，它将在接下来的三年内斥资约一亿美元，来应对生物信息学的挑战——全基因组测序所产生的海量数据的分析和阐释。这对于研究人员来说真是一个好消息，数据分析是目前新一代测序中最棘手的一环。作为该计划的第一步，它推出了 BioScope™ 软件方案。此软件能够开展行业领先的 SNP 检测和转录组分析，让研究人员将序列数据导出为标准的碱基序列形式，将分析时间降低了 80%。之后，生命科技公司还将投资在改善测序信息的存档、分析和交换。

上个月，生命科技公司还在 2010 年摩根大通保健品大会上宣布，将于今年下半年启动单分子测序仪的早期试用计划。如此看来，新一代测序仪再加上单分子测序仪，测序市场上的竞争将变得越来越激烈。如欲了解测序市场的最新动态，敬请关注生物通的报道。

(生物通 余亮)

# Life Technologies 加入第三代 测序大战

生命科技公司近日在 2010 年基因组生物学技术进展年会 (AGBT) 上宣布了其单分子测序 (SMS) 技术的早期结果。该项技术有望综合连续的长读长和无以伦比的准确性, 在几小时内带来定向的基因组序列数据, 让测序早日成为全世界科研实验室和临床机构的寻常工具。

无需克隆或扩增, 单分子测序将实现基因组信息的分析, 在几小时内生成数据, 而不是现在的几天或几个星期。尽管新一代测序技术, 比如 Applied Biosystems 的 SOLiD 系统, 将继续成为全基因组测序和表达图谱的首选技术, 生命科技公司的单分子测序技术有望在临床分析, 比如癌症和免疫学的临床相关基因的分析上开辟新天地, 并破译 RNA 的结构, 病毒和甲基化模式。

这项单分子测序技术使用 Qdot 纳米晶体作为核心的测序引擎。Qdot 是纳米大小的半导体晶体, 非常适合细胞成像研究和单个蛋白分子的检测。与传统的有机染料分子所介导的荧光检测相比, Qdot 产生的信号强 100 倍, 实现了简单的单分子检测。单分子测序系统利用特别为测序而设计的纳米晶体, 与 DNA 聚合酶分子相连。

该系统监测核苷酸实时掺入到增长的 DNA 链中。随着核苷酸的掺入, Qdot 纳米晶体的光子转移提供能量, 产生了特有的彩色荧光。单分子测序锥形系统记录了发光的时间和颜色, 以确定每条 DNA 链的 DNA 序列。最终, 这种方法将寻找与 Qdot 信号减弱相关的发光, 以改善单分子数据的错误图像。

系统的特别之处在于试剂更换, Qdot 聚合酶及合成的模板都移除, 并用新的来取代。这样, 固定的单个 DNA 模板就能以循环的方式测序数次, 实现高度准确的读取, 且样本制备极少。此外, 试剂更换让多个读数能够相互连接, 实现几乎没有限制的读长。这可是它最大的与众不同之处。

J. Craig Venter 研究所的创立者 Craig Venter 博士称: “循环测序 (recursive sequencing) 所实现的长读数和准确性的结合有望让生命科技公司的单分子测序平台成为我们多个测序项目的主力军。在 JCVI, 我们渴望将这项技术应用在多个项目上, 包括人类基因组的单体型定相, 环境测序及传染病的快速序列鉴定。”

生命科技公司计划在 2010 年第四季度与几个合作者合作。单分子测序系统的商业化会在今年晚些时候宣布, 预计在 2011 年上市。生命科技公司 2009 年的研发经费达 3 亿美元, 其中大约三分之一是用在这个新平台及 SOLiD 技术上。(生物通余亮)

[我想了解单分子测序技术的新进展!](#)

# 安捷伦科技发布新一代实时定量 PCR 试剂盒

圣克拉拉,加利福尼亚,2010年2月24日——安捷伦科技公司(纽约证交所:A)今天发布了 Brilliant III Ultra-Fast QPCR / QRT-PCR Master Mix 试剂盒,能够显著缩短循环时间和提高灵敏度,并且不影响核酸定量的准确性和重现性。

Brilliant III Ultra-Fast QPCR / QRT-PCR Master Mix 试剂盒能够在任意一款实时定量 PCR 仪上实现最快的循环时间。该试剂盒主要应用了最新优化的 Taq 酶,基于一种新型热启动技术,能够提供更快的延伸速度,最大限度降低非特异扩增。这个超快速试剂可以在不到 40 分钟内完成实时定量 PCR 实验,使研究者在不影响数据的重现性和质量基础上更快地获得试验结果。

“与市面上其他快速 QPCR 试剂相比,该试剂盒具有更高的灵敏度,最低的非特异产物和副产物形成,能够实现更准确的定量”,安捷伦公司产品经理 Nick Price 博士说,“对研究者来说,能够缩短试验结果所需的时间变得越来越重要,我们很高兴这款 Brilliant III 超快速实时定量 PCR 试剂盒为广大用户带来新的体验。”

这个试剂盒适于多种多样的 QPCR 应用,包括基因表达分析,病原菌检测和单核苷酸多态性

(SNP)基因分型等。这款试剂特别就一系列快速、实时定量 PCR 系统和大多数模板和靶标进行了优化,更早的阈值循环数检测使各种模板浓度条件下的定量更加可靠。[免费索取更多技术资料!](#)

Brilliant III Ultra-Fast QPCR / QRT-PCR Master Mix 试剂盒的问世代表了安捷伦第三代实时定量 PCR 试剂的正式商业化。

## 关于安捷伦科技

安捷伦科技公司(纽约证交所:A)是全球领先的分析仪器公司,同时也是通信、电子、生命科学和化学分析领域的技术领导者。该公司拥有 16000 名员工,服务超过 110 个国家的客户。安捷伦科技公司在 2009 财年的净收入为 45 亿美元。有关安捷伦科技公司的更多资讯请访问公司官网 [www.agilent.com](http://www.agilent.com)。

# GE 推出最新的相互作用分析系统 Biacore 4000

通用电气医疗集团 (GE Healthcare) 即将推出最新型的无标记相互作用分析系统——Biacore™ 4000。它为大规模的分子相互作用分析提供了完整的方案，从早期筛选到鉴定，主要应用在药物开发的关键应用领域如抗体筛选和小分子量药物开发。



Coming soon!

Biacore 4000 为各种类型的筛选和鉴定分析提供了全面支持，包括是否结合、动力学分析、亲和力分析、浓度和特异性分析。在抗体分析中，Biacore 4000 能直接从原始的上清或裂解液中筛选抗体和抗体片段，并对其进行详细的鉴定，包括特异性、亲和力和浓度。在小分子量药物开发中，它用于 LMW 化合物的筛选，以及从阳性验证到先导物优化的鉴定。

Biacore 4000 使用 4 个独立的流动槽，每个含有 5 个检测点。每个流动池都有自己的针，能实现平行注射。流体动力选择让多个相互作用物能固定在单个流动槽中不同的检测点，实现不同的分析配置。这种创新的流动系统设计增加了样品通量，能平行检测几个实验条件，从而加速了分析开发。它能够在 24 小时内分析最多 4800 个相互作用，或者每个循环最多检测 16 种相互作用。

在关键的研究领域如抗体筛选和小分子量药物开发，Biacore 4000 有专门的软件包支持。Biacore 4000 与 LMW Extension Package software 共用，提供了片段筛选、先导物选择和优化所需的灵敏度、通量和高质量数据。系统快速识别非典型的结合物，并提交定制的数据评估。生成的数据能轻松输出，用于定制的分析和流程整合。

Antibody Extension Package 让 Biacore 4000 的用户在抗体分析应用上最有效地利用此系统，节省生物药品开发的时间和试剂。高通量动力学研究和表位作图专用的软件工具实现了候选物的快速鉴定。

爱尔兰都柏林城市大学生物医学诊断研究所的 Paul Leonard 博士表示：“我对 Biacore 4000 评估软件印象深刻。它如此强大，却易于使用，它为大规模 SPR 分析打开了新方向。过去我们花费几个星期才能完成的分析，现在只需数日。Biacore 4000 已经成为我们机构筛选抗体的重要工具。”  
(生物通 余亮)

Biacore 4000 的主要优势在于：

- 它提供了全面的高质量分子相互作用数据
- 平行的流动系统——同时分析最多 16 个靶点
- 高分析容量——24 小时内最多 4800 个相互作用
- 为大规模分析而优化的硬件——60 小时无人值守的运行时间
- 大规模研究中数据处理的创新软件方案
- 自动化的样品及数据处理和高级的 LIMS 整合方案
- 验证过的软件符合 21 CFR Part 11

[免费索取 Biacore 4000 的 latest 技术资料!](#)

# 安捷伦靶向序列富集系统最新 支持样本条形码标记及索引

马科岛,佛罗里达州,基因组生物学技术进展年会 (AGBT), 2010 年 2 月 24——安捷伦科技公司(纽约证交所: A) 于日前宣布: 安捷伦 SureSelect 靶向序列富集系统, 可以根据用户所选择的不同新一代测序平台, 实现每泳道 12-16 个样本的并行 DNA 测序, 从而降低测序成本并提升测序高达 16 倍。

“我们最初设计安捷伦 SureSelect 靶向序列富集系统的目的, 就是通过只对感兴趣基因组区域测序帮助遗传学家高效地分析更大量的样本, ”安捷伦新兴基因组学应用市场经理 Fred Ernani 博士说, “安捷伦 SureSelect 系统最新支持的多样本并行技术进一步扩大了这一优势, 在不牺牲数据质量的前提下, 显著减少了成本并提高了通量。”

这一方法非常实用并易于开展, 能够实现一次实验分析多个样本, 但对所得数据又可以进行分析。这一试剂盒针对 Illumina 基因组分析仪和 Applied Biosystems SOLiD 平台分别进行了优化。Illumina 系统每泳道可测序 12 个样本, 所以一次运行共可测序 96 个样本。SOLiD 平台每四分之一或八分之一玻片能测序 16 个样本, 因而最多一次运行能测序 256 个样本。

首批具有多样本并行技术的安捷伦 SureSelect 产品是使用 eArray——安捷伦微阵列和 SureSelect 产品在线设计工具——完成的定制试剂盒。此试剂盒以多种不同的规格进行包装, 每个定制试剂盒可分别进行 10-5000 个反应。不同规格的试剂盒, 使研究者能够采用同一技术进行小规模初步研究以及后续的大规模筛选, 而且这些试剂盒都具有相同的产品格式并易于自动化。预计, 支持多样本并行技术的预制试剂盒将会于今年早些时候上市。

“一些客户正在测试这一安捷伦 SureSelect 新产品, 他们对测试结果非常满意” Ernani 如是说。

安捷伦 SureSelect 靶向序列富集系统, 采用哈佛-麻省理工的 Broad 研究所授权的技术方法, 目前已成为适用多种不同的测序应用和平台的最佳选择。它支持 Illumina 系统的单末端测序和双末端测序方案, 以及 SOLiD 系统的片段文库测序方案。用户使用安捷伦 eArray 在线设计工具, 可以轻松设计出在单个试管中捕获任意感兴趣基因组的定制产品, 从而有效提高研究效率。

想了解更多关于安捷伦 SureSelect 靶向序列富集系统的信息, 请访问 [www.opengenomics.com/SureSelect](http://www.opengenomics.com/SureSelect), 或[点击此处索取技术资料](#)。

## 关于安捷伦科技

安捷伦科技公司(纽约证交所: A) 是全球领先的分析仪器公司, 同时也是通信、电子、生命科学和化学分析领域的技术领导者。该公司拥有 17000 名员工, 服务超过 110 个国家的客户。安捷伦科技公司在 2009 财年的净收入为 45 亿美元。有关安捷伦科技公司的更多资讯请访问公司官网 [www.agilent.com](http://www.agilent.com)。

# 均相时间分辨荧光 (HTRF) 技术在药物筛选中的应用

Bagnols-sur-Cèze 法国-2009 年 11 月 5 日 -Cisbio Bioassays ([www.htrf.com](http://www.htrf.com))公司是 IBA 旗下的子公司，也是药物研究和药物筛选领域 HTRF (均相时间分辨荧光)技术的发明者。今天 Cisbio 公司宣布，其在中国和韩国已建立了自己的销售团队，以便进一步开发亚洲市场。本土销售团队将能让 Cisbio 为这两个迅速增长的生物制药市场的客户提供 GPCR 和激酶研究的 HTRF 平台、生物标志物检测以及其他相关的服务。

Cisbio Bioassays 公司所销售的基于 HTRF 技术的产品包括：IP1, cAMP, Cellul'erk 以及 Tag-lite™ 细胞表面受体平台。这些业务将会通过 IBA 集团旗下的 IBA 中国分公司 ([www.htrf-china.cn](http://www.htrf-china.cn))来操作。为了在亚洲市场拓展应用于癌症诊断和治疗方面的放射药物产品、仪器和方法, IBA 集团于 2007 年建立了 IBA 中国公司。韩国的销售业务则由位于首尔的代理商 JCBio 公司 ([www.jcbio.co.kr](http://www.jcbio.co.kr))负责。JCBio 公司专注于为制药和生物技术实验室提供相关商品。

“在过去的 10 年里，我们一直致力于在欧洲、北美和亚洲建立本土化的团队，针对特定市场并拓展我们在当地的业务。” Cisbio Bioassays 市场部主管 François Degorce 说道，“我们的目标是成为一个客户至上的服务性公司，并让业务遍及全球。我们在中国和韩国的团队将帮助我们促进与该两个重要市场的客户的关系。”

作为 2009 年度 Frost & Sullivan 北美技术创新奖项的获得者，Cisbio Bioassays 凭借着其专利技术 HTRF 领先于均相荧光方法领域。HTRF 是一种很灵敏且稳定的技术，主要应用于药物研发的高通量筛选阶段。除了基于 HTRF 的一些产品外，Cisbio 还能提供一系列的定制服务，其包括：为客户特定的实验蛋白，抗体或化合物等进行标记，为客户设计和研发实验方法，以及为客户提供 HTRF

技术培训。Cisbio Bioassays 总部在法国，同时在 Bedford, Massachusetts(美国)也有基地；在日本和印度则通过独家代理来销售商品。

## HTRF 技术介绍

HTRF(均相时间分辨荧光)是用来检测均相体系中待测物的一种最常用的方法，是用来研究药物靶标的理想的平台。这种技术结合了荧光共振能量转移(FRET) 和时间分辨技术(TR)。在 TR-FRET 实验中，当供体和受体相离很近时，在供体和受体之间会有荧光共振能量转移而产生信号。采用双波长检测能够显著减小缓冲液和培养基的干扰，最终的信号跟产物形成的量成比例。

HTRF 技术被广泛应用于基于细胞实验和生化实验的药物研发的不同阶段，从实验开发，lead 到 hit，高通量筛选 (HTS)，到临床前研究。这是一种很灵敏且稳定的技术，可以使用 384 和 1536 孔板。自从 10 年前 HTRF 技术进入药物研发领域以来，研究者采用该技术加快了很多基于抗体的研究，包括 GPCR (配体结合，受体二聚化，cAMP 和 IP-1 的检测，以及磷酸化 ERK 的定量)，激酶，细胞因子和生物标志物，生物过程 (抗体和蛋白生产)，以及蛋白和蛋白，蛋白和多肽，蛋白和 DNA/RNA 相互作用的实验。HTRF 技术也可以取代大部分 ELISA，因为 HTRF 具有同等的检测

范围和检测极限，而且更节省实验时间，并且不需要洗板的步骤。

HTRF 也是基于 TR-FRET 的化学技术,但它的许多特点把它与其他 TR-FRET 产品区分开来。其中一个特点就是由于使用了镧系元素,从而具有非常长的半衰期(铕和铽),镧系元素与络合的穴相结合,这种结合的穴状物与其他所有 TR-FRET 产品使用的螯合技术相比能增加实验的稳定性,另外使用专利化的比值测量能矫正干扰因素。其他 HTRF®技术的特点包括:

- 均质性(不需要洗板)
- 低背景
- 实验体积的小型化很简捷
- 化合物和培养基的干扰小
- 对一些添加剂如 DMSO 和 EDTA 的耐受性
- 与许多读板机相兼容

总体而言, HTRF 在生物分子检测和定量方面是相当灵敏和稳定的技术,可以广泛应用于药物研发领域。[点击索取 HTRF 技术的更多技术资料!](#)

### 详细技术特点

#### 穴与螯合物

穴的形成是将一个阳离子纳入到一个立体笼中。笼能收集光然后将能量转移到核心的镧系元素。这个大环的这些性质有利于跟镧系元素紧密相连,这种不可破的连接会形成异常稳固的复合体。这种穴结构能抵抗一些特殊的实验条件如大量存在的阳离子( $Mg^{2+}$ 和  $Mn^{2+}$ 等),螯合物(EDTA),溶剂或者温度。从 HTRF 能应用到临床诊断(TRACE®技术和 Kryptor®工作站技术)就能看

出它也适用于浓度高的血清(50%)。在读板前或者孵育时加入氟离子能增强实验对大量化合物的抗干扰性。

以铕氨基丁三醇穴(TBP 铕)为例,双吡啶的一部分增加活化参数达到大约 25-30kcal/mole 的  $\Delta G^*$ 。因此穴结构分子能被用于恶劣的化学条件,例如在固相肽类合成过程中,穴结构分子在三氟乙酸存在的固相化学和反相色谱中非常稳定,而不用考虑铕会从笼中分离。作为对比的是螯合物跃迁很容易达到 0-10 kcal/mole 的  $\Delta G^*$ ,例如羧酸根部分质子化。这就解释了为什么螯合物跟穴结构分子不一样,在酸性介质中不稳定,稀有金属离子容易被介质中的离子如锰置换。

#### 时间灵活和实验安全

如果仪器坏了,在一段时间之后仍然可以读板。HTRF 结果能持续 7 天以上保持稳定且较大的实验窗口。

#### 动力学研究

穴没有光漂白性,多次读数后信号没有损失。因此能按照需要的次数去读,这就给许多实验的动力学检测提供了可能。

#### 灵活的实验模式

许多化学和生物添加剂,如带血清的培养液,牛血清白蛋白,二甲基亚砷,去污剂,酶的淬灭剂(EDTA),对实验测量没有干扰因而给实验提供了很大的灵活性。

作者: 谢兵, 周时勇

联系邮箱: [shiyong.zhou@iba-group.com](mailto:shiyong.zhou@iba-group.com) 和 [yin.zhou@iba-group.com](mailto:yin.zhou@iba-group.com)

## (视频) 如何高效转染原代细胞

如何高效转染原代细胞？这可是个难题，研究人员一直在苦苦探索。在转染试剂不太管用的情况下，电穿孔兴许是更为有效的方法。Bio-Rad 公司近日发布了一段教育视频，手把手教您如何利用 Gene Pulser Mxcell 电穿孔系统高效转染原代细胞。这段 12 分钟的视频详细介绍了细胞的准备、仪器的设置及电转过程，并附上了转染后细胞的图像。

通过观看这段名为“利用 Gene Pulser Mxcell 电穿孔系统高效转染原代细胞”的视频，您将了解到如何通过简单的实验来快速鉴定目的细胞的最佳转染条件。此视频中使用的是小鼠胚胎成纤维细胞。视频中还有小窍门，教您如何在开展实验的同时进行优化。科学家还讨论了一些导致电穿孔实验成功或失败的关键因素。他们特别提醒，在实验过程中，应使用新鲜分离的健康细胞，并使用与电穿孔缓冲液匹配的电穿孔条件。

另外，视频中还展示了科学家如何更换反应体系，而无需重新优化，将 96 孔电穿孔板中鉴定出的最佳条件应用在标准的电穿孔比色皿中，快速轻松地转换，而维持相同的电穿孔效率。这一点值得好好学习，不仅省时，还特别方便。

Bio-Rad 的 Gene Pulser Mxcell 电穿孔系统以及专利申请中的 Gene Pulser 电穿孔缓冲液是专为将核酸导入哺乳动物细胞及难转染的细胞而设计的。缓冲液的成分与细胞质相仿。与其他系统相

比，该系统的一个重要优势是除了预设的程序，每个关键的参数都可设置，从电压到脉冲数，让研究人员能为自己的细胞找到最理想的条件。[索取电穿孔系统的技术资料 and 报价。](#)

Bio-Rad 公司负责转染的全球产品经理 Michelle Collins 表示：“根据科学论文和报告，以及客户反馈，显然，电穿孔是将质粒 DNA 或 siRNA 导入原代细胞的最有效途径。”

您可在 Bio-Rad 公司的网页 [www.bio-rad.com/mefvideo](http://www.bio-rad.com/mefvideo) 上看到这段视频，也可在可视实验杂志 (Journal of Visual Experiments) 的网页 <http://www.jove.com/index/details.stp?ID=1662> 上观看。后者还附有详细的操作步骤和结果图片。

[www.bio-rad.com/transfectionprotocols](http://www.bio-rad.com/transfectionprotocols) 上还有全世界科学家提交的电穿孔操作步骤，欢迎查看。(生物通 余亮)

# 冷泉港发布 2 月实验手册

2 月初，新一期的冷泉港实验手册发布，其内容同样是涉及生物学的方方面面，包括干细胞、发育生物学、免疫学、分子生物学、植物学等。按照惯例，其中两篇 protocol 是可以免费查看的，分别讲述了基因调控和 DNA 合成的高通量分析。点击以下文章标题，可查看详细 protocol。

## [DNase-seq: A High-Resolution Technique for Mapping Active Gene Regulatory Elements across the Genome from Mammalian Cells](#)

这一篇 protocol 是由美国杜克大学的 Lingyun Song 和 Gregory Crawford 提供的。一直以来，定位 DNase I 的超敏位点都是鉴定遗传调控元件（比如启动子、增强子等）的标准方法。这些序列是核小体去除的，据推测是让转录因子进入，它们被 DNase I 选择性消化。传统的低通量方法是利用 Southern blot 来鉴定这些超敏位点，而本文作者提供了一种名为 DNase-seq 的新方法。

DNase-seq 是一种鉴定全基因组内 DNase I 超敏位点的高通量方法，它捕获了 DNase 消化的片段，并利用新一代测序技术进行分析。在单次实验中，DNase-seq 能鉴定出任何物种、任何细胞类型中最活跃的调控区域。

## [Genome-Wide Analysis of DNA Synthesis by BrdU Immunoprecipitation on](#)

## [Tiling Microarrays \(BrdU-IP-chip\) in Saccharomyces cerevisiae](#)

在 DNA 复制、修复及其它方面的 DNA 代谢研究中，让 BrdU 掺入到新合成的 DNA 链中是一种常用的方法。这一次，美国南加州大学的 Oscar Aparicio 及其同事将 BrdU 免疫沉淀与罗氏 NimbleGen 的 DNA 芯片结合起来，实现了 BrdU 标记的染色体 DNA 的全基因组鉴定。

他们研究的对象是酿酒酵母。酵母细胞的培养基中加入 BrdU，它掺入复制的 DNA 中。收获细胞，分离出基因组 DNA，并随机剪切，然后将 BrdU 标记的 DNA 免疫沉淀。免疫沉淀后的 DNA 经过 PCR 扩增，标上荧光基团，并与 DNA 芯片上的参考样品杂交。随后将数据标准化，并鉴定出掺入 BrdU 的染色体区域。定量 BrdU 峰高，并比较不同基因组位点或不同实验条件下的峰高。BrdU-IP-chip 已经用在复制区域的鉴定，复制叉进程的研究等方面。（生物通 余亮）

[免费申请罗氏的实时定量 PCR 技术原理概要](#)

# Sigma 推出生命科学新网站

Sigma-Aldrich 近日宣布正式推出 Sigma 生命科学新网站,旨在提升该公司在生命科学领域的关注,同时为研究人员提供全新的网站,通过该网站研究人员可获得生命科学领域的最新信息以及各种市场领先的产品。Sigma 新的生命科学品牌 **where bio begins** ([www.wherebiobegins.com](http://www.wherebiobegins.com)) 品牌的推出提供了一个崭新的平台,让研究人员能更快捷地获得行业领先的技术和产品信息,从而帮助研究人员进一步探索生命科学领域。

Sigma 生命科学的使命在于帮助研究人员揭示存在于细胞、组织、器官和有机体之间的复杂的生物分子相互作用。新品牌和新网站有望提升 Sigma 生命科学的知名度,为研究人员提供各种科研产品,以帮助研究人员更快地了解疾病发生机理和分子之间功能。

Sigma 生命科学近年来提供了不少创新性的产品,包括屡获大奖的 CompoZr 锌指核酸酶技术(去年被生物通评为 2009 生命科学十大创新产品),6100 余种经过验证的 Prestige 抗体,MISSION siRNA 试剂以及“Your Favorite Gene”搜索引擎。

Sigma-Aldrich 公司科研生物技术部门的总裁 David Smoller 表示:“我们新的 Sigma 生命科学品牌帮助我们向客户讲述 Sigma 生命科学部门发展历程—Sigma 拥有该行业众最全的生命产品和技术。Sigma 始终致力于帮助广大的生命科学研究人员,我们的生命科学产品的价值已经超过 7.5 亿美元。在过去的 50 年中,正是因为 Sigma 产品的高质量、优质服务以及最全的产品,全世界的生命科学领域研究人员一直依赖于我们所提供的各种生物试剂产品,包括:生物化学产品、氨基酸、抗

体、缓冲液、碳水化合物、酶、法医工具、血液学、组织学以及细胞培养产品。在过去的几年中,我们的不断努力奠定了开发创新技术和产品的基础,这将让我们成为生命科学市场上真正的领导者。”

Sigma-Aldrich 公司科研生物技术部门的副总裁 Helge Bastian 博士表示:“在过去的几年中,我们始终不断努力聚集各种人才,这些人才热衷于帮助全球生命科学领域科学家更好地认识生命科学以及解决生命科学领域难题。我们之前所作的这些努力让我们生命科学部门转变成为一个不断创新的部门,不断为市场提供创新性的产品。我们获奖的生命科学产品搜索引擎 'Your Favorite Gene'、Prestige 抗体、具有革命性意义的 CompoZr ZFN 技术以及基因敲除大鼠等产品都证明了 Sigma 生命科学部门未来的目标:提供高质量的创新技术和产品来加快生命科学研究,进而更好地了解生命科学,为疾病治疗提供更有效药物。我们将继续支持生命科学研究人员的研究。对于研究人员来说,Sigma 生命科学也是新的生命科学研究开始的地方。”

[Sigma 抗体 75 折促销, 点击索取详细资料](#)

# 全球 50 家最具创新力企业之生物公司

近日，美国麻省理工学院（MIT）的《技术评论》（Technology Review）杂志编辑部从全球众多的科技企业中，甄选出 50 家最具创新能力的企业。这是第一届，以后将每年举行。评审人员关注的是每家公司所具备的最有前景的技术，无论是商业巨头，还是初出茅庐的新创企业。他们审视这些公司的商业模式，审视他们的应用和拓展这些技术的战略，以确定他们成功的可能性。评审人员的评语是：“在过去的一年中，这些企业显示了他们在技术创新上的超强能力，并将这种能力用于自己的业务成长，以改善我们的生活。”

这 50 家最具创新力的企业分为能源、网络、材料、生物医药和计算五大类，再细分成上市公司和私营公司。这 50 强中，不乏我们熟悉的 google、IBM、Twitter、Apple 等公司，而生物医药公司中，测序公司则占了重要一席，Illumina、Complete Genomics 和 Pacific Bioscience 均有上榜。

《技术评论》对 Illumina 的评价是：增长最快的基因组学公司。在市场方面，Illumina 的芯片和测序仪器被研究中心、制药公司、科研机构和生物技术公司所采用。尽管目前市场主要在科研领域，但随着测序价格的下降，它有望拓宽。越来越多的制药和农业公司将基因组信息纳入产品开发。Illumina 在测序市场上占据重要地位。它还是个性化基因组学舞台上唯一一家大型公司，提供 48000 美元的测序服务。为了维持领先地位，Illumina 投资了 Oxford Nanopore 技术，一项来自牛津大学的新型纳米孔测序技术。这项协议给了 Illumina 独家授权，将 Oxford Nanopore 的 DNA 测序技术推向全世界。

Complete Genomics 的创新在于“按订单测序人类基因组”。Complete Genomics 生产能快速廉价地测序人类基因组的机器，但他们不出售机器，只售卖服务，并且只面向研究机构如科研实验室和制药公司，不针对个人。目前一批 8 个人类基因组，

每个约花费 2 万美元。只关注人类基因组，让 Complete Genomics 能更高效地经营这项服务。且一切工作都是在内部完成，公司也就无需花时间和精力让仪器变得客户友好。Complete Genomics 仍需要改善技术和流水线，以在 2010 年前实现每个基因组 5000 美元的目标。

《技术评论》对 Pacific Biosciences 的评价是：实时的准确测序。与其他测序技术不同的是，Pacific Biosciences 的技术能读取更长的 DNA 分子链。这将让序列拼接更加容易。该公司的测序仪定在 2010 年下半年上市，它预计，到 2013 年，个人基因组的测序能在 15 分钟内完成，费用低于 1000 美元。Pacific Biosciences 所开发的单分子测序不仅应用在 DNA 测序方面，还包括甲基化测序、RNA 测序和蛋白翻译的实时观察。

以下是上榜的生物医药公司。关于每家公司的更详细介绍，请参看《技术评论》杂志的网页：<http://www.technologyreview.com/companywatch/tr50/>。

（生物通 余亮）

## 上市生物医药公司

AInylam

AthenaHealth

GlaxoSmithKline

Illumina

Medtronic

Nanosphere

私营生物医药公司

BIND Biosciences

Complete Genomics

Fate Therapeutics

FluidigmPacific Biosciences

# 博奥生物成为罗氏 NimbleGen 中国首家认证服务商

(2010年3月4日,北京) 博奥生物与罗氏 NimbleGen 今天共同对外宣布,博奥生物正式加入罗氏 NimbleGen 认证服务商(CSP)计划,在中国正式建立了经 NimbleGen 全球质量认证的芯片服务实验室,博奥生物的加入使 NimbleGen 芯片技术更贴近中国科研人员的需求,进一步推动中国芯片研究应用领域的发展。同时,博奥生物引进 NimbleGen 芯片技术服务,借助 NimbleGen 芯片高度灵活、高密度、高通量的优异产品特性,使博奥生物的芯片服务延伸到更广的领域。

认证揭牌仪式在位于北京中关村生命科学园的博奥生物报告厅隆重举行。博奥生物运营副总裁许俊泉先生和罗氏应用科学部全球总监曼弗雷德(Manfred Baier)博士等双方人员共同出席了揭牌仪式。揭牌仪式后,双方就未来进一步的业务合作进行了探讨。



罗氏诊断应用科学部全球总监 Dr. Manfred Baier 与博奥运营副总裁许俊泉为认证服务商揭牌

经过严格的实验室操作认证程序和实验数据考核后,博奥生物获得罗氏 NimbleGen 认证服务商资质。对基因组研究拥有丰富经验的博奥生物可使用罗氏 NimbleGen 的芯片技术平台进行基因表达分析、比较基因组杂交(CGH)/拷贝数变异(CNV)分析和 DNA 甲基化服务,由此成为罗氏 NimbleGen 在亚太地区(基于以上三种服务)的首家认证服务商。



博奥生物运营副总裁许俊泉先生说:“很高兴能通过这一严格的认证程序和实验标准,成为罗氏 NimbleGen CSP 计划的一份子。加入罗氏 NimbleGen CSP 计划意味着博奥生物在为中国市场提供高端高通量芯片服务的努力中迈出了一大步。今后,我们可采用全套 NimbleGen 单色(基因表达)或双色(CGH/CNV 和 DNA 甲基化)芯片分析进一步拓宽客户服务。”

罗氏 NimbleGen 市场副总裁安德里亚先生(Andreas Görtz)表示,“我们非常高兴博奥生物成为罗氏 NimbleGen 在亚洲的首家集基因表达、CGH/CNV 和 DNA 甲基化芯片应用为一体的认证服务商。凭借博奥生物一直以来在中国基因组研究领域的卓越声望,加上 NimbleGen 产品的优异性能,将有力地帮助我们共同在中国这一快速发展的市场上获得巨大增长。”

博奥生物将采用罗氏 NimbleGen 的全套芯片平台,包括最新研发的 2 微米分辨率的

NimbleGenMS 200 芯片扫描仪、NimbleGen 高通量杂交仪和干燥仪来进行芯片杂交、处理和扫描，为客户提供罗氏 NimbleGen 芯片平台全面优化的实验工作流程，从而加快技术服务的进度，为客户带来更好更优质的服务。



罗氏诊断一行人员参观博奥实验室

### [罗氏通用荧光定量试用装火热申请中](#)

关于博奥生物

博奥生物有限公司暨生物芯片北京国家工程研究中心（简称“博奥生物”）位于北京，是中国首屈一指的诊断生物芯片、微阵列相关仪器和微阵列服务的开发商与营销商。公司成立于 2000 年，现有员工 400 余名。博奥生物在 DNA 和基因组分析服务、蛋白和转录因子检测服务以及 CRO 服务上有着广泛的服务专长。此类服务在各种基础医疗研究及相关研究、生命科学研究和公共卫生研究中得到了普遍应用。其下属的研究设施和服务实验室均通过了 ISO 13485 和 ISO 9001 认证，服务实验室获得了中国合格评定国家认可委员会（CNAS）的 CNAS L2451 认证，建立起规范的质量环境。有关更多信息，请访问：[www.capitalbio.com](http://www.capitalbio.com)。

关于罗氏

总部设在瑞士巴塞尔的罗氏公司是以研发为主的医疗业翘楚，在制药和诊断领域均表现卓越。罗氏是全球最大的生物技术公司，在肿瘤学、病毒学、炎症、代谢和 CNS 领域都推出了独具创新的药物。罗氏还是全球体外诊断、基于组织的癌症诊断上的佼佼者，并在糖尿病管理上走在前列。罗氏的个性化医疗战略旨在提供先进的药物和诊断工具，实质性地改善病人的健康和生活质量，提高存活率。

2009 年，罗氏在全球员工数超过 8 万人，研发投入将近 100 亿瑞士法郎。罗氏集团公布的当年销售额为 491 亿瑞士法郎。美国 Genentech 公司是罗氏集团的独资子公司。罗氏还是日本中外制药株式会社的控股方。有关更多信息请访问：[www.roche.com](http://www.roche.com)。

Roche NimbleGen 是具有专利的 DNA 微阵列、耗材、仪器和服务的领先创造者、生产商和供应商。Roche NimbleGen 生产长寡核苷酸探针的高密度微阵列，为基因组和表观基因组变异的研究提供了更多的信息和更高质量的数据。这种性能的提高是通过 Roche NimbleGen 专利的无膜芯片合成（MAS）技术，该技术使用了数字光处理和快速、高产的光化学技术，以极高的灵活性合成长寡核苷酸、高密度的 DNA 微阵列。关于 Roche NimbleGen 的更多信息，请访问公司网站 [www.nimblegen.com](http://www.nimblegen.com)。

# 赛默飞世尔科技收购高效 PCR 产品供应商 Finnzymes

2010年2月22日，中国上海——BUSINESS WIRE 近日报道，全球科学服务领域的领导者赛默飞世尔科技（纽约证交所代码：TMO）于2010年2月1日宣布，已经正式签署了收购 Finnzymes 的协议。Finnzymes 是知名的分子生物学分析工具供应商，产品包括试剂、仪器、耗材和试剂盒。Finnzymes 的总部在芬兰的 Espoo，拥有 90 名员工，2009 年的销售额是 2 千万美元。

Finnzymes 为高效的 PCR、RT-PCR 和 qPCR 提供全面的解决方案。其在 DNA 聚合酶方面的专业技术显著提高了 DNA 聚合酶的性能，使 PCR 的过程更快速更精确。其所具备的快速、可重复地扩增和定量特殊 DNA 序列的能力施惠于各种应用领域，包括基因组学基础研究、遗传检测、法医鉴定以及食品检测等。

赛默飞世尔科技通过对 Finnzymes 的收购，增加了 DNA 聚合酶、Phire™ 和 Phusion™、迷你 PCR 仪、新型 PCR 管和 PCR 板等产品，扩大了用于分子生物学研究和诊断试剂市场的试剂和耗材产品线。这些新增产品很好地补充了赛默飞世尔最近发布 Thermo Scientific Solaris qPCR 基因表达分析产品，并与后者一起为客户提供完整的解决方案。来自于 Thermo Scientific 的基于 MGB® 的基因特异性探针和来自于 Finnzymes 先进的酶技术结合在一起，将进一步提高 qPCR 分析技术。

“Finnzymes 创新的酶产品和独特的 PCR 仪器平台的加盟进一步扩大了我们的生命科学试剂与耗材的产品覆盖范围，提高了我们的专业诊断产品的供应能力。”赛默飞世尔科技的首席执行官 Marc N. Casper 说：“这次合并使分子生物学和诊断学的一些关键技术也整合到了一起，让我们有能力为我们的客户创造更高的价值。”

Finnzymes 的主体将被合并到赛默飞世尔科技的“分析技术集团”，而一些设备和耗材产品线将被并入到“实验室产品与服务集团”。这些整合工作

预计在今年第一季度结束。公司确信整合工作不会对本年度的财务结果造成实质性影响。

## 关于赛默飞世尔科技（Thermo Fisher Scientific）

赛默飞世尔科技有限公司（Thermo Fisher Scientific Inc.）（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变得更健康、更清洁、更安全。公司年度营收达到 105 亿美元，拥有员工 35,000 多人，为 350,000 多家客户提供服务。这些客户包括：医药和生物技术公司、医院和临床诊断实验室、大学、研究院和政府机构以及环境与工业过程控制装备制造制造商等。该公司借助于 Thermo Scientific 和 Fisher Scientific 这两个主要品牌，帮助客户解决从常规测试到复杂的研发项目中所面临的各种分析方面的挑战。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工作流程综合解决方案。Fisher Scientific 则提供了一系列用于卫生保健，科学研究，以及安全和教育领域的实验室装备、化学药品以及其他用品和服务。赛默飞世尔科技将努力为客户提供最为便捷的采购方案，为科研的飞速发展不断地改进工艺技术，并提升客户价值，帮助股东提高收益，为员工创造良好的发展空间。欲获取更多信息，请登陆：[www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)（英文），[www.thermo.com.cn](http://www.thermo.com.cn)（中文）。