

# EBIOTECH

生物通技术周刊

第77期

2010年6月13日

全文下载

## 【技术前沿】

定量PCR中SYBR Green I的替代  
如何让干细胞不分化 新型培养基来帮忙  
染色体步移技术的改进

## 【新品速递】

轻松，替代繁琐的BrdU: Click-iT Edu  
BD发布新一代流式细胞仪FACS Aria III  
芯片测序二合一 HiScanSQ上市  
Illumina推出性价比极高的OmniExpress芯片  
快速检测90种支原体污染的Myco Scan试剂盒  
OpenArray实时定量PCR系统 让定量分析更快更经济  
GE推出富集多种蛋白的Mag Sepharose磁珠

## 【应用指南】

PAXgene系统——组织形态与分子分析的完美结合  
利用ÄKTA avant 25和UNICORN™ 6实现快速安全的方法优化和工艺开发

## 【行业动态】

赛默飞世尔特约之2010实验室创新技术大奖评选活动拉开帷幕  
Sanger microRNA数据库(miRBase)升级至15.0版  
联川生物推出Degradome Sequencing服务——协助您快速发现miRNA靶基因  
收购无止境 三大公司再度扩张  
参与Eppendorf“南非世界杯竞猜”赢取精美奖品!

# 定量 PCR 中 SYBR Green I 的替代

定量 PCR 一般有两路，一条是探针，另一条是染料。因染料是普遍适用的，无需特异设计，费用也相对低廉，故用者更多。定量 PCR 中的染料通常是 SYBR Green I，但它也并非完美。SYBR Green I 对 PCR 有抑制作用，在实验中的使用浓度很低，且与富含 GC 的序列优先结合。因此，后续的熔解分析只能判断 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，而不适合 HRM 分析。

于是，研究人员也在不断尝试新品，来替代 SYBR Green I。南澳大利亚大学药学和医学院的高级讲师 Paul Monis 在定量 PCR 中一直使用 SYTO 9。他谈到：“我早在 2000 年就开始使用 SYTO 9。它比 SYBR Green 更好。它不会引起 PCR 抑制，对 DNA 熔解曲线分析更佳。我们也评估了一些新染料，但它们都不及 SYTO 9。”

2005 年，Monis 等还发表了一篇比较 SYBR Green I 与 SYTO 9 的文章，认为后者对 PCR 的抑制更少，且产生了重复性更高的 DNA 熔解曲线<sup>1</sup>。然而，市场上绝大多数定量 PCR 试剂盒所使用的染料仍是 SYBR Green。人们似乎一时还难以转变。丹麦的另一个研究小组也找到了 SYBR Green 的替代品 SYTO 82 和 SYTO 13<sup>2</sup>。它们不会抑制 PCR，也不会与富含 GC 的序列优先结合，即使在高浓度下也不影响熔解温度。此外，SYTO 82 的检测极限要低 50 倍。

看了这些研究结果，您或许也想试试新的染料。以上的 SYTO 系列都来自 Invitrogen 旗下的 Molecular Probes 品牌。SYTO 82 和 SYTO 13 都为 250  $\mu$ l (5 mM)，2725 元。相比之下，SYTO 9 的价格较贵，100  $\mu$ l (5 mM) 为 2772 元。

此外，Bio-Rad 公司也推出了一款新的 qPCR 试剂，其中使用了 EvaGreen 染料，作为 SYBR

Green 的替代。据 Bio-Rad 公司的产品经理 Viresh Patel 介绍，EvaGreen 是第三代的双链 DNA 结合染料，与 SYBR Green 相比有几个优势。它对 PCR 的抑制更少，能在饱和条件下使用，产生更亮的荧光信号。既然是饱和染料，也就与 HRM 分析兼容。Bio-Rad 将 EvaGreen 与 Sso7d 融合聚合酶以及优化的缓冲液组合，形成了新一代的 [SsoFast EvaGreen Supermix](#)，在 qPCR 应用中表现更佳。

近些年，定量 PCR 正朝着通量越来越高、反应体积越来越小、速度越来越快这个方向努力，相信新试剂、新仪器的不断涌现，会帮助我们走得更远。

## 参考文献：

1 Monis PT, et al. "Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis." *Anal Biochem*, 340: 24 – 34, 2005.

2 Gudnason H et al. "Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature." *Nucleic Acids Res.* 35: e127, 2007.

# 如何让干细胞不分化 新型培养基来帮忙

生物通报道，以色列耶路撒冷哈达萨大学的研究人员近日开发出一种新的干细胞培养基，能让干细胞在更长时间内不分化。这项研究是由哈达萨人类胚胎干细胞研究中心的主管 Benjamin Reubinoff 领导的，发表在近期的《Nature Biotechnology》上。作者们相信这项技术将对临床应用所需的大量 hESC 特别有用。

为了保持 hESC 存活且具有多能性，研究人员通常在滋养层细胞（也就是一层小鼠胚胎成纤维细胞）上培养，或者在微载体上成簇培养。但是在这些基质上培养干细胞是相当昂贵的，而且培养物不能在很长时间内保持未分化状态，尽管所有必需的生长因子都存在。

Reubinoff 的研究团队正在研究 hESC 簇分化成神经细胞，他们一直在使用 Invitrogen 的 Neurobasal 培养基。这种培养基能够在无滋养层的条件下长时间维持神经细胞的生长和正常表型。在研究过程中，研究人员注意到并非所有细胞都分化了。他们怀疑是培养基的选择导致了这种现象，于是他们开始集中精力研究培养基如何促进干细胞生长并抑制分化。

为了验证他们的理论，研究小组定制了培养基。他们在 Neurobasal 培养基中加入了血清替代物，还加入了干细胞生长所需的蛋白，包括细胞外基质组分、神经营养因子、成纤维细胞生长因子 2 和活化素 A。研究人员在常规的无血清培养基和定制培养基中培养了 hESC。三个星期之后，定制培养基中存在更多的未分化 hESC 细胞。

使用这种新的培养基，研究小组检验了三种不同的 hESC 系。他们利用荧光激活细胞分选

(FACS) 在 7 周和 20 周后分析了培养物，发现 90% 的细胞仍维持多能性。这项突破为在计算机化的自动系统中大规模扩增胚胎干细胞创造了可能性。此外，通过改变培养条件，还可能进一步指导干细胞长成特定的细胞类型，用于研究或病人的移植。

然而，研究小组也承认，他们的方法并不完美。在细胞传代过程中，他们丢失的细胞数是滋养层培养方法的近 3 倍。他们还将继续完善这种技术，以确保培养产量尽可能地高。（生物通 余亮）

原文检索：

Derivation, propagation, and controlled differentiation of human embryonic stem cells

Debora Steiner, Hanita Khaner, Malkiel Cohen, Sharona Even-Ram, Yaniv Gil, Pavel Itsykson, Tikva Turetsky, Maria Idelson, Einat Aizenman, Rita Ram, Yael Berman-Zaken & Benjamin Reubinoff

Nature Biotechnology 28: 361–364 (2010)  
doi:10.1038/nbt.1616

# 染色体步移技术的改进

染色体步移 (genome walking) 是一种克隆方法, 可以获得与已知序列相邻的未知基因组区域。在过去 20 年研究人员开发出多种染色体步移的方法, 大体可分为三类: 反向 PCR, 连接介导的 PCR 和随机引物 PCR。最近, 韩国生物科学技术研究所 (KRIBB) 的一个研究小组对传统的连接介导 PCR 方法进行了改进, 文章发表在近期的《Analytical Biochemistry》上。

KRIBB 的首席科学家宋正勋 (Jung-Hoon Sohn) 认为染色体步移是一种很有效的基因克隆方法。“一旦你得到部分的基因组片段, 你就能通过 PCR 不断获得侧翼片段。如果不使用 PCR, 从 DNA 文库中克隆不但单调, 而且困难。”

然而基于 PCR 的染色体步移方法面临着多种问题: 特异性和效率低, 步移距离短, 且方法复杂。宋博士解释道, 尽管 PCR 一般需要两个起始位点, 而连接介导的 PCR 染色体步移只需要单个起始位点。通过与缺乏 5'端磷酸基团的框 (cassette) 连接, 产生了第二个起始位点。这种方法的问题在于往往非特异扩增了许多 DNA 片段。宋博士及其同事开发的“模板锁定 (template-blocking)”方法降低了这种非特异的扩增。

在这种新方法中, 研究人员用双脱氧 NTP (ddNTP) 填补了限制性酶消化的基因组片段的 3'-OH, 并与正确设计的框连接。这样, 侧翼伴有框的基因组 DNA 片段就作为靶基因扩增的模板, 扩增引物分别为基因特异的引物和框引物。基因组 DNA 的末端被 ddNTP 锁定, 从而大大降低了非特异性扩增, 并产生了简单快速的染色体步移。宋博士称: “模板锁定的 PCR 显示出高特异性。它既不需要特殊设计的引物, 也不需要巢式 PCR。”

研究人员通过克隆毕赤酵母的一个 PGK1 新启动子和青霉菌的两个纤维素酶新基因, 来检验了

这种模板锁定 PCR。这两种生物的完整基因组序列目前都还没有。

宋博士解释道: “真菌纤维素酶对于降解纤维素物质产生糖和生物能量非常重要。我们从腐烂的木头中分离出这种真菌, 用于新纤维素酶的克隆。它只是模板锁定 PCR 的一个例子, 说明在未知基因组信息的情况下, 从微生物中克隆基因也很简单。”

对于基因组测序已经完成的少数物种 (如人、小鼠、线虫、水稻、拟南芥等) 来说, 可以轻松地从数据库中找到已知序列的侧翼序列。但是, 对于大多数生物而言, 在不了解它们的基因组序列以前, 想要知道一个已知区域两侧的 DNA 序列, 只能采用染色体步移技术。

尽管全基因组测序技术正在迅猛发展, 获得多个物种的全基因组序列变得更加容易, 但宋认为染色体步移的改善对于实验室日常工作仍很关键, 因为很多种感兴趣的生物都未完成基因组测序, 或只完成了部分。(生物通 余亮)

原文检索:

**Template-blocking PCR: An advanced PCR technique for genome walking**

Jung-Hoon Bae & Jung-Hoon Sohn

Analytical Biochemistry Volume 398, Issue 1, 1  
March 2010, Pages 112-116

# 轻松，替代繁琐的 BrdU: Click-iT EdU

早期测定活性 DNA 的合成需要在其中掺入放射性的 $[3H]$ 胸腺嘧啶脱氧核苷。后来这种方法逐渐被非放射性的核苷类似物溴脱氧尿苷 (BrdU) 检测所取代, BrdU 检测是一种利用抗 BrdU 抗体对掺入的 BrdU 进行免疫检测的方法。由于抗体分子量大, 难于掺入并被有效检测, 因此 BrdU 检测需采用 DNA 酶或 HCl 或加热使 DNA 变性; 这些处理方法会破坏抗原识别位点, 此外许多细胞周期分析的染料都需要 dsDNA, 这种处理方法也使得同一样本无法同时进行细胞周期分析。对于植物细胞等有细胞壁的分析, 采用抗体检测还需要消化细胞壁, 细胞壁消化酶常含有一些杂质, 会导致检测的可靠性降低, 同时 BrdU 检测则需要进行长时间的孵育--几个小时甚至过夜。

Invitrogen 新推出的 Click-iT® EdU 检测也是以检测新合成 DNA 中掺入的核苷类似物为基础, 但该方法所采用的核苷类似物是 EdU (5-乙炔-2'-脱氧尿苷), 而且不是通过抗体检测, 而是基于一个 click 反应--铜催化的叠氮化物和炔烃之间的共价反应。在 Click-iT® EdU 检测中, EdU 核苷中含有炔烃, 而荧光检测试剂含有叠氮化物。荧光叠氮化物 (分子量 $\sim 1,000$ ) 的体积小于抗 BrdU 抗体 (分子量 $\sim 150,000$ ), 这种小分子特性使得 EdU 可在温和条件下掺入并被有效检测 (图 1)。Click-iT®检测避免了 BrdU 检测所需的苛刻处理条件, 可避免 DNA 变性, 维持样本的形态, 因而提供了一种更可靠且更简单的方法。

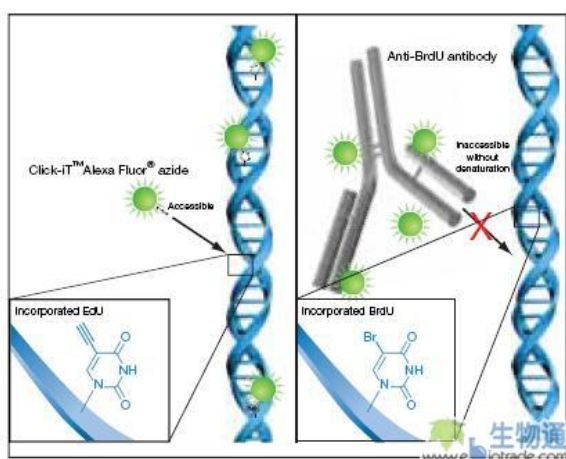


图 1. 采用 Alexa Fluor®叠氮化物检测掺入的 EdU 与采用抗 BrdU 抗体检测掺入的 BrdU 相比较。

Alexa Fluor®叠氮化物的小分子特性使得 DNA 无需变性即可让检测试剂与核苷结合。

## 方法简单 结果出色 耗时更少

高效的 Click-iT® EdU 实验方案可通过三个简单的步骤完成细胞增殖检测:

1. 用 EdU 处理细胞。
2. 固定并透化细胞。
3. 用 Click-iT® 检测混合物检测 30 分钟, 清洗, 然后分析。

采用基于抗体的 BrdU 检测则需要 DNA 变性并消化细胞壁, 需要进行长时间的孵育--几个小时甚至过夜。细胞壁消化酶常含有一些杂质, 会导致检测的可靠性降低。相比之下, 采用 Click-iT® EdU 检测, 即便是检测植物细胞, 也只需要一个温和的固定和透化步骤, 而无需消化细胞壁 (图 2)。因而细胞壁不再是细胞增殖检测的障碍。对于组织样本采用 Click-iT® EdU 检测试剂盒只需不到 80 分钟即可完成, 无需二次检测或信号扩增。

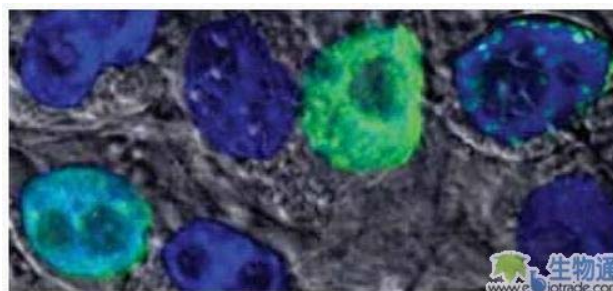


图 2. EdU 直接检测与 BrdU 间接检测的比较。大鼠静脉注射雌二醇 (160  $\mu\text{g/g}$  体重) 三天后, 采用 EdU 或 BrdU 脉冲标记 2 小时。采用 Click-iT® EdU Alexa Fluor® 594 成像试剂盒(C10084)中的 Alexa Fluor® 594 叠氮化物通过 click 反应 (左) 或采用抗 BrdU 抗体和 Alexa Fluor® 594 羊抗鼠 IgG 二抗 (A21125) (右) 检测增殖细胞 (以红色标记)。细胞核用蓝色荧光的复染剂 Hoechst 33342 (H1399) 染色。在 BrdU 检测方法中, 采用 HCl 进行 DNA 变性导致核信号变弱。

### 适用于各种平台 任何样本中的新合成 DNA 检测

Click-iT® EdU 细胞增殖检测可以直接并准确地检测出新 DNA 的合成。这种检测不仅能够测定单个细胞的增殖, 还可以通过任何平台 (表 1) 检测出细胞、组织或整个有机体中的增殖细胞 (图 3, 4)。Click-iT® EdU 检测也是多重分析的理想选择。检测前只需采取极温和的固定和透化步骤, 从而可保护 dsDNA 和抗原识别位点。尽管我们推荐采用与 BrdU 正常使用量相等的 EdU 开始实验, 但研究人员通常只需用较少量的 EdU 或较短的孵育时间, 依然可以获得与 BrdU 检测试剂盒相同甚至更好的信号 (图 4)。

表 1. Click-iT® EdU 检测平台

平台	样品数	说明
流式细胞仪	50 次检测 (每次 0.5 mL)	包括可与检测荧光基团同时使用的两种细胞周期染料
高通量成像系统	2 x 96 次检测 (2 块板) 10 x 96 次检测 (10 块板)	包括 CellMask™ Blue, 用于细胞分割或细胞周期分析
荧光显微镜	50 个盖玻片	包括蓝色荧光的细胞核复染剂 Hoechst 33342
酶标仪 (HTS)	以 96 孔板形式进行 400 次检测	比色法或荧光读数。包括终止液, 能使信号稳定达 24 小时

\* 2 块板检测。† 10 块板检测。

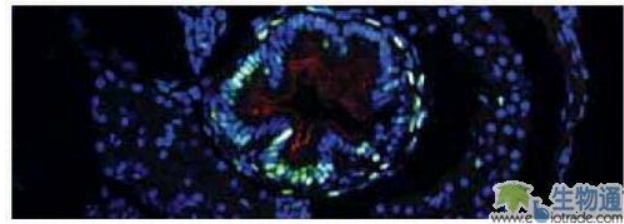


图 3. 斑马鱼幼虫中肠横切面图。用 400  $\mu\text{M}$  EdU 对 5 天大的斑马鱼幼虫进行长达 16 小时的脉冲标记, 然后固定、用石蜡包埋, 切成 7  $\mu\text{m}$  的切片后处理, 再利用 Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 成像试剂盒 (C10337) 检测。用 Alexa Fluor® 568 大豆凝集素 (SBA) 和 TO-PRO®-3 染料 (T3605) 先后对其染色。增殖的细胞核经 Alexa Fluor® 488 叠氮化物 (绿色) 和 TO-PRO®-3 染料 (蓝色) 标记后呈白色。肠球中的杯状细胞经 Alexa Fluor® 568 SBA 标记后呈红色。采用共聚焦显微镜上的 CoolSNAP™ 照相机 (Princeton Instruments) 捕捉 20x z- 切面图, 然后用 Photoshop® 软件 (Adobe, Inc.) 处理 (包括伪彩色)。图片由俄勒冈大学分子生物学研究所的 Sarah Cheesman 提供。



图 4. 采用 Click-iT® EdU 试剂获得的结果一般优于 BrdU 检测的结果。(A) 采用新型 Click-iT® EdU 检测方法获得的结果, 显示了 Click-iT® Alexa Fluor® 488 叠氮化物与 7-AAD 细胞周期染色对比的双参数曲线图。(B) 采用标准酸变性法对掺入的 BrdU 进行基于抗体检测的结果, 显示了抗 BrdU Alexa Fluor® 488 与 7-AAD 细胞周期染色对比的双参数曲线图。

真正无忧的细胞增殖检测

→ 无需抗体, 无放射性

- 避免 DNA 变性，可维持样本的形态
- 体验简化、可靠的检测
- 适合所有平台或样品使用

Click-iT® EdU 细胞增殖检测适用于新合成 DNA 的检测和定量，比传统的检测方法更胜一筹。

[点击此处索取Click-iT® EdU细胞增殖检测的说明书!](#)

(感谢Invitrogen供稿。如需投稿，请发送至投稿邮箱[ebtservice@sina.com](mailto:ebtservice@sina.com))

# BD 发布新一代流式细胞仪 FACSAria III

生物通报道，美国 BD 公司的生物科学部门近日宣布推出新一代的流式细胞仪——BD FACSAria™ III 细胞分选系统，它能够利用 6 根激光运行复杂的多色实验。自 2003 年首次推出 BD FACSAria 以来，这一系列仪器开创了细胞分选的复杂世界，让受众更多，应用范围更广。如今新上市的 BD FACSAria III 系统更加强大、可靠，且更易用。

BD 生物科学细胞分析的总裁 James Glasscock 表示，新的 BD FACSAria III 系统为研究人员提供了配置系统的灵活性，以满足他们今天的应用需求和预算，同时具备稍后扩增性能以满足未来需要的能力。

BD FACSAria III 细胞分选系统的创新包括：

- 为了获得更高的灵敏度，BD FACSAria III 使用了新一代的石英杯流动检测池。它的专利设计确保激光精确集中在样品束上，这样能产生最大的信号，并收集到大量的发射光。固定光路校准技术让启动时间最短，无需每日调整光路，仪器随开随用，改善了实验之间的重复性。更重要的是，它还改善了收集效率，并优化了多色应用所需的分辨率，即使是在高速分选设置下。

- 光学系统的创新让信号检测最大化，并大大提高了多色分析中每种颜色的灵敏度与分辨率。灵敏度与分辨率提高意味着即使模糊的细胞群也能轻松鉴定并分选。光学系统允许对多色分析进行优化，以获得更佳的结果。激发和收集光学系统的创新设计减少了激发损失，并显著改善了收集效率，从每个样品中得到更佳的信息。

- 对于很多用户而言，细胞分选器的性能是根据其灵活性来界定的，而灵活性又与可同时检测的参数数量有关。BD FACSAria III 采用新的可扩展结构，支持 6 种激光波长：633 nm、561 nm、488 nm、445 nm、405 nm 和 375 nm，以及最多 20 个探测器位置，能同时测定 18 种颜色。

- 向后兼容的结构让用户能升级现有的仪器到最新的 BD FACSAria III 平台。通过现场升级，拥有 BD FACSAria 或 BD FACSAria II 系统的实验室也能享用 BD FACSAria III 的最新性能。

- BD FACSAria 软件有效控制了 BD FACSAria III 工作站的设置以及数据的获取和分析。BD FACSAria 软件是多个 BD 细胞分析仪和细胞分选仪共用的。研究人员享受到应用灵活性，因为很容易将分析设计和优化从一个平台移到另一个平台，比如从分析到分选。

关于 BD FACSAria III 细胞分选系统的更多信息，请访问：[www.bdbiosciences.com/aria](http://www.bdbiosciences.com/aria)。

（生物通 余亮）

# 芯片测序二合一 HiScanSQ 上市

illumina 公司本月发布了 HiScanSQ 新平台，它是第一个既能开展芯片实验，又能进行 DNA 测序的产品。芯片和测序这两项热门的技术催生了性状和疾病研究方面大量开创性的发现。HiScanSQ 整合了基因分型、基因表达和甲基化阵列的高通量性能，以及新一代测序的力量和分辨率，为实验设计带来了前所未有的灵活性。



仪器特有两个不同的组件：**HiScan Reader**——一台高性能的扫描仪（上图左），以及 **SQ Module**——一个附加的流体学设备（右），能够实现基因组规模的测序。**HiScan Reader** 作为一台适用于 **Illumina BeadArray** 产品的高速精确的芯片扫描仪，独立地发挥作用。有了 **SQ Module**，系统迅速地转换到执行 **Illumina** 的边合成边测序技术，即世界上最广泛采用的新一代测序技术。

**HiScan Reader** 有着两种激光，波长分别为 532 nm 和 660 nm。其时间延迟积分（TDI）扫描和两个 CCD 传感器具有高分辨率的性能和快速率。而 **HiScanSQ** 作为一台测序仪，目前每一轮能产生多达 50 GB 的高质量数据，每天最少能产生 6 GB 的高质量过滤数据。每个流动槽通道能运行 1-12 个样品，这样每个流动槽能运行 8-96 个样品。

芯片和测序技术的相互促进，为遗传学发现和验证提供了一种有力的方法，实现了广泛的应用，具有无限探索的潜能。

**HiScanSQ** 预计在第二季度开始发售。**Illumina** 的总裁 **Jay Flatley** 表示：“我们认为，对于希望从芯片应用转换到 DNA 测序的客户来说，这将是一个理想的系统。”[询价](#)

优势：

## 为灵活性而设计

将芯片的高通量处理与新一代测序的力量和分辨率相结合。

## 久经考验的性能

享用目前最成功、最值得信赖的阵列和测序技术。

## 一种简化的方案

通过多个前沿的用户界面让仪器手工操作时间最小化，特有自动化且简化的实验设置和处理步骤。

# ILLUMINA 推出性价比极高的 OmniExpress 芯片

ILLUMINA 公司近日在适合全基因组关联研究 (GWAS) 的 Omni 芯片家族中加入了新成员——HumanOmniExpress BeadChip 芯片 (OmniExpress)。这款 OmniExpress 芯片为全基因组关联研究注入了强大的力量，以行业最佳的价格提供了高样品通量和全面的基因组内容。

OmniExpress 上可容纳 12 个样品，芯片拷问每个样品的 70 多万个变异，这样，单张芯片上总共有超过 800 万个数据点。再结合 ILLUMINA 的 iScan 系统，OmniExpress 每周能够处理 1400 多个样品，通量无人能及。

OmniExpress 上的标志物是 ILLUMINA 的 GWAS 旗舰产品 HumanOmni1-Quad 内容的一部分，再加上从国际 HapMap 计划所有三个阶段中选择的优化 SNP 标签组合。有了最高的数据质量和最佳内容，包括对拷贝数变异 (CNV) 应用的全面支持，这种强大的基因分型工具让您能够实现更有意义的探索，并更快发表文章。

ILLUMINA 公司的 CEO Jay Flatley 表示：“OmniExpress 是 Omni 芯片家族的延伸，提供了与 Omni1 相同的数据质量，且价格是行业中最具竞争力的。OmniExpress 融入了 ILLUMINA 的第三代芯片技术，为研究人员带来了更多内容、更多形式和更多的稳定性。”

此外，OmniExpress BeadChip 芯片还可接受定制，再加入最多 20 万个变异，这样每个样品的变异总数超过 90 万个。这种新的 OmniExpress+ BeadChip 芯片凭借久经考验的 iSelect 定制基因分型框架，为研究人员提供无比的灵活性。您可以加入疾病或通路相关的定制内容，来自千人基因组计划的稀有变异，或其它内容。

HumanOmniExpress+ BeadChip 芯片是多功能的定制基因分型产品，有着行业标准的数据质量，灵活的内容设计和多样品 BeadChip 芯片所支持的高通量能力。与目前使用 iSelect 的研究人员相似，OmniExpress+ 用户也能够使用 ILLUMINA 的分析设计软件，进行准确的内容设计，确保分析的最大成功率。

OmniExpress BeadChip 芯片还是 2010 GWAS 产品规划的基础，2010 GWAS 产品规划将为研究人员提供优惠的定价，并且能在今后了解每个样品的五百万个变异，包括千人基因组计划鉴定出的覆盖范围广的稀有变异。

多样品形式，验证过的分析以及智能选择的内容，这些特征让 OmniExpress 有用如下优势：

- 杰出的基因组覆盖度——超过 70 万个 SNP 标签提供了高加索和亚洲群体中高达 90% 的基因组覆盖度。
- 上乘的数据质量——行业标准的 Infinium HD 分析提供了 >99% 的平均检出率和 >99.9% 的重复性。
- 行业最佳的通量——使用 iScan 系统，研究人员每周可处理数千个样品。

关于 HumanOmniExpress BeadChip 芯片的更多信息，请访问：<http://www.illumina.com/OmniExpress>，或[点击此处索取资料](#)。（生物通 余亮）

# 快速检测 90 种支原体污染的 Myco Scan 试剂盒

支原体污染常常被称为宝贵细胞系的“秘密入侵者”或“沉默的杀手”，它在许多实验室中很常见，是涉及哺乳动物细胞培养的科学家面临的主要问题。由于支原体感染能影响几乎每一个细胞参数，所以很多研究都强调了常规筛选研究细胞系的需要，以确保观察到的结果不被污染所损害。

研究表明，支原体感染能耗尽营养物，促进代谢积累，导致 pH 改变，诱导或抑制细胞因子表达，并改变培养细胞的代谢、增殖特征及形态。支原体很难检测，因为细胞体积小，种类繁多，培养的混浊度以及对加富培养基的需求有限。此外，某些种类/菌株可能是细胞侵入性的。基于上述原因，开发一种针对支原体的快速可靠的分子检测颇具挑战性。

欧洲细胞库（ECACC）规定，“支原体感染比细菌和真菌感染更为隐蔽。支原体污染很难检测，需要使用专门技术。这些检测应当成为常规和定期质量控制筛查步骤中的一部分。”美国国立卫生研究院（NIH）在一封关于细胞错误鉴定和交叉污染的公开信中，推荐实验室遵守细胞培养良好规范（GCCP）指南。这包括在实验室引入新细胞系时，需要检测支原体的质量保证制度，接着进行常规筛查，以确保它们无支原体污染。

**Applied Biosystems® MycoSEQ™支原体监测试剂盒**或 **Myco Scan 试剂盒**，是利用实时定量 PCR 检测支原体污染的快速方法。通过密集的生物信息学和高度优化的多重引物设计，分析能实现高度特异且全面的支原体种类检测，并协助阻止其它密切相关种类的检测。在 5 小时内提供结果，此试剂盒是检测基础研究中所使用的宝贵细胞系的真实性的关键工具。

Myco Scan 试剂盒的成分包括：Power SYBR® Green 预混合液、分析混合液、抑制对照、

阳性对照、阴性对照以及检测建立和数据分析的完整方案。

Myco Scan 试剂盒有着轻松的流程，能在 5 小时内获得结果（图 1），便于细胞系的常规筛查。此外，试剂盒在设计扩增引物和反应条件时利用了密集的生物信息学分析，能够检测超过 90 种支原体种类。Myco Scan 试剂盒在每个反应的检测极限低于 10 个拷贝（图 2）。解离曲线实现了结果的多参数分析。它是支原体特异的，不会检测从相近或不相近的物种中纯化而来的 DNA。

[点击索取Myco Scan试剂盒的更多资料](#)



图 1. 轻松的流程。Myco Scan 试剂盒在 5 小时内带来结果。

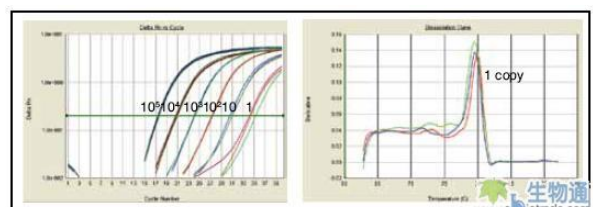


图 2. Myco Scan 试剂盒提供了低于 10 CFU/mL 的检测水平。解离曲线分析实现了结果的多参数分析。

Myco Scan 试剂盒是为与 PrepSEQ™ 1-2-3 支原体样品制备试剂盒的共用而优化的，后者采用磁珠分离技术从哺乳动物细胞系中提取支原体 DNA。PrepSEQ™ 1-2-3 试剂盒能从科研细胞系、干细胞系及细胞和组织治疗样品中提取支原体基因组 DNA。在 PrepSEQ™ 1-2-3 试剂盒的实验方案中，采用快速的步骤从待测样品的总裂解液中回收 DNA。

Myco Scan 试剂盒的主要特征包括：

- 快速、高回收率的样品制备方案
- 灵敏度水平低于 10 CFU/mL
- 超过 90 种的检测
- 单个步骤检测
- 上样即运行，无人值守的自动化
- 无需凝胶电泳
- 实验室设施和空间的最低要求

（感谢 Applied Biosystems 供稿。如需投稿，请发送至投稿邮箱 [ebtservice@sina.com](mailto:ebtservice@sina.com)）

# OpenArray 实时定量 PCR 系统 让定量分析更快更经济

去年生物通给大家介绍了 [TaqMan OpenArray 基因分型系统](#)，该系统以基于PCR的方式对成千上万个样品中的几十个甚至几百个靶点进行SNP分析。系统流程相当地简单，一个人在一天内就可进行9万多个基因分型分析，而用户操作极少，也无需机器人的协助。一年后，Applied Biosystems带来了同样快速经济的OpenArray®实时定量PCR系统。此平台加速了基因组探索、验证和检测，实现了前所未有的基因覆盖和样品通量。一个用户仅在一个工作日内就能以快速灵活的形式轻松获得30,000个数据点，让很多项目能在几天内完成，而不是几个星期。平板有五种分析/样品形式（图1），能上样预设计或定制TaqMan® 或SYBR® 分析的任意组合。



OpenArray® 平台与类似平台相比，性能更佳，且更易使用。您选择的分析预先加入OpenArray® 平板的指定通孔中并脱水干燥。只需将您的样品与预混合液混合，上样到OpenArray® 平板，密封，循环并成像。OpenArray® 实时定量PCR系统的简单流程让一个人每天能处理最多576个样品，而无需使用机器人。

对于每个数据点，OpenArray® 平台的自身测定、纳米射流设计仅使用33 nL反应体积，让每个TaqMan® 或SYBR® 分析合成能提炼出更多反应，并帮助节省您的经费。OpenArray® 平台同时提供了高性能和重复性（表1），因此您能确信您的结果。

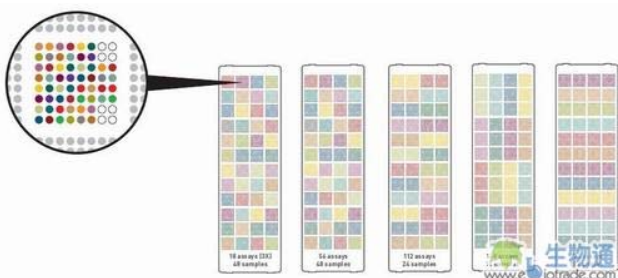


图1. OpenArray® 实时定量PCR平板有这几种形式。选择最适合您的分析-样品配置，或联系我们，以设计出满足您的研究目标的布局。平板可容纳最多48个样品及最多224个分析。18-assay的形式提供了18个分析，重复三次，通过技术重复的使用以获得最佳的统计分析。

## OpenArray® 平台加速多个实时应用

OpenArray® 实时定量PCR系统在过去无法达到的规模简化了基因组探索和验证，病原体检测及生物标志物的鉴定和筛选。它促成了一种简单的方法，来剖析miRNA，检测并定量病原体，验证芯片结果并开展基于表达的生物标志物筛选——这些应用已被我们广大的客户群所评估，获得了重大成功。

## 药物靶点的验证

因其高度灵活的形式，对验证研究而言非常理想。当您需要检测10-1000个样品的10-1000个基因时，OpenArray® 系统是最快的捷径。最近，一个制药公司使用OpenArray® 实时定量PCR平台验证了表达谱实验的靶点。从靶点验证的传统微滴定板方法转换过来，能缩减大笔费用，节省时间，并实现一个更高效的流程。

## 药物开发

TaqMan® 试剂通常用于生物标志物和毒理学项目中验证芯片结果和筛选大量样品的分析。

OpenArray® 实时定量 PCR 系统最近用于药物开发环境中，以简化开发和验证的工作。

## 农业分子检测

最近，著名的国际植物研究机构 and 大型动物兽医检测实验室开始使用 OpenArray® 实时定量 PCR 系统来检测病毒、真菌和细菌病原体。

OpenArray® 平台的灵活性让农业诊断学研究人员能非常快速地在打击名单中加入新的病原体，并在一天内检测超过 500 个样品，每个重复三次。

## MicroRNA 图谱分析

OpenArray® 实时定量 PCR 平台提供了一种流畅而不复杂的方法，用于 miRNA 图谱分析。研究人员能够使用探索的方法或者定向的方法，关注少数作为生物标志物的 miRNA 并筛选多个样品。

表 1. TaqMan® OpenArray® 实时定量 PCR 的性能参数。

基于无模板对照的特异性	无明显扩增
利用标准曲线方法的效率	90-110%
100 个拷贝的重复样品的精确度	标准偏差 < 0.25 Ct
反应密封性，定义为空的孔中无扩增	>99%的孔
三块 OpenArray® 平板的上样时间（8064 个反应）	<30 分钟
从纯化的 DNA 到实时定量数据的时间	~3 小时
一天内一个技术员的通量	>30,000 个反应（576 个样品）

[点击索取 OpenArray 实时定量 PCR 系统的技术资料及报价！](#)

OpenArray® 实时定量 PCR 系统的优势：

- 更多重复——每块板产生超过 2500 个数据点，实现技术重复，以获得最佳的统计能力

- 实现更快速的结果——一个人每天能产生超过 30,000 个基因表达数据，无需机器人，加快结果的获得

- 简单的流程让直接劳动降至最低——每块 OpenArray® 平板带有您选择的分析——只需加入样品和预混合液，循环并成像

- 促进了实验灵活性——选择预设计或指定您自己的定制分析，并选择最适合项目需求的样品/分析形式

- 可靠且经济——使用熟悉的分析试剂，包括 TaqMan® 或 SYBR® 分析，纳米射流设计降低试剂用量

### 附：OpenArray® 平台技术

OpenArray® 平台技术是广泛应用的纳升射流技术平台，用于小体积液态反应。使用这项技术的研究人员将得益于微阵列的并行性和液态反应如 PCR 的数据质量。

OpenArray® 平台技术利用显微镜载玻片大小的平板，上面有 3072 个通孔。每个通孔的直径为 300 μm，深度也为 300 μm。平板以 48 个子阵，每个 64 通孔的形式排列。分析（最多 48 个样品）预装在平板上并脱水，一旦到货，可立即使用。

平板表面经过专利处理的包被，是疏水的，而通孔内部是亲水且生物兼容的。处理中，通过表面张力的作用，3072 个通孔中的每一个都含有 33 nL 液体。

（感谢 Applied Biosystems 供稿。如欲投稿，请发送至投稿信箱 [ebtservice@sina.com](mailto:ebtservice@sina.com)）

# GE 推出富集多种蛋白的 Mag Sepharose 磁珠

Protein A Mag Sepharose, Protein G Mag Sepharose 和 NHS Mag Sepharose 是为简化免疫沉淀或 pull-down 应用中目的蛋白的富集而设计的磁珠。固定在 Mag Sepharose 磁珠上的抗体或其它蛋白用于目的蛋白的捕获，随后利用磁性装置收集磁珠。

Mag Sepharose 磁珠的主要优势在于：

- 可见且密度大，易于辨认和收集结合的目的蛋白
- 非附着的磁珠避免了剪切作用和聚集物形成。使用时无需去污剂。
- 轻松捕获小体积或大体积样品中的目的蛋白（低至微升，高至毫升）
- 为富集/免疫沉淀目的蛋白而优化过的容量——只需少量的抗体
- 灵活的步骤，洗脱条件为电泳和质谱分析而优化

每种磁珠目前都有两种包装规格：1×500  $\mu$ l 浆体，适合 20 个样品；4×500  $\mu$ l，适合 80 个样品。再加上 MagRack 6，一种处理微量离心管中磁珠的分离工具，每次能平行处理最多 6 个样品。

目的蛋白的可靠捕获

Protein A Mag Sepharose和Protein G Mag Sepharose是亲和层析填料（树脂），带有蛋白A或蛋白G配体，这两者对单克隆或多克隆抗体都有着高亲和力。Mag Sepharose填料的蛋白A或蛋白G配体上固定的抗体可用于免疫沉淀中目的蛋白的捕获。NHS Mag Sepharose是为任何含有自由氨基的蛋白或生物分子的共价偶联而设计的，可用于多种类型的pull-down实验。[点击索取说明书](#)

简化的操作

磁珠形式有着适合小规模实验的杰出性质。磁珠的高密度允许磁性装置的快速捕获，而磁珠的可见性确保了免疫沉淀/pull-down 应用中所有结合的目的蛋白的可靠收集。这实现了低丰度目的蛋白样品的浓缩，从毫升降至微升。从 25 ml 样品起始，可以获得体积低至 2.5  $\mu$ l 的富集产物。填料的特征总结在表 1。

所有产品都提供了为下游分析（如 MALDI-ToF 和 LC-MS）的样品制备而优化的操作步骤。

MagRack 6 最多能够制备 1.5 ml 微量离心管所捕获的 6 个样品。当离心管放置在架子上时，磁珠在几秒钟内被吸引到磁铁上。这样能轻松去除上清，而磁珠保留在管内。对于更大的样品体积，在结合目的蛋白时可使用 50 ml 塑料管。在目的蛋白的初次捕获之后，推荐使用磁力贴，将磁珠转移至更小的管中。或者可利用外摆式的离心机让磁珠旋转下沉。

为了操作更方便，还有 Protein A/G SpinTrap Buffer Kit 和 NHS SpinTrap Buffer Kit 可供选择。这些缓冲液试剂盒省去了耗时的缓冲液制备，从而促进了快速、重复性高的蛋白富集。

表 1. Protein A Mag Sepharose, Protein G Mag Sepharose 和 NHS Mag Sepharose 的特征

Protein A Mag Sepharose

- 基质 顺磁、高度交联琼脂糖的球形颗粒
- 配体 天然的蛋白 A
- 结合能力 8-17 mg 人 IgG/ml 凝胶
- 颗粒大小 37-100  $\mu\text{m}$
- 工作温度 室温
- 储存液 20%乙醇
- 储存温度 4-8  $^{\circ}\text{C}$

### Protein G Mag Sepharose

- 基质 顺磁、高度交联琼脂糖的球形颗粒
- 配体 蛋白 G
- 结合能力 13-22 mg 人 IgG/ml 凝胶
- 颗粒大小 37-100  $\mu\text{m}$
- 工作温度 室温
- 储存液 20%乙醇
- 储存温度 4-8  $^{\circ}\text{C}$

### NHS Mag Sepharose

- 基质 顺磁、高度交联琼脂糖的球形颗粒
- 配体 N-羟基琥珀酰亚胺
- 结合能力 8-14  $\mu\text{mol/ml}$  凝胶
- 颗粒大小 37-100  $\mu\text{m}$
- 工作温度 室温
- 储存液 2-丙醇
- 储存温度 4-8  $^{\circ}\text{C}$

灵活的操作步骤

对于 Protein A Mag Sepharose 或 Protein G Mag Sepharose, 有两种蛋白富集的操作步骤可供选择: (1) 交联步骤, 其中目的蛋白被洗脱, 而抗体仍通过交联剂共价结合在基质上, (2) 经典步骤, 其中目的蛋白与抗体一起洗脱。

NHS Mag Sepharose 是预先激活的, 来自不同物种的蛋白、抗体和适体 (aptamer) 可通过主要的氨基共价偶联。在第二步中, 目的分子被亲和捕获, 并在交联步骤中洗脱。

蛋白富集的最佳参数取决于样品中存在的生物分子的特定组成。因此针对每种特定组成, 需要优化缓冲液, 以便获得最佳结果。产品操作说明中列出了推荐的缓冲液。

重复性好的蛋白富集: 标杆分析

为了展示效率和重复性, 通用电气医疗集团的实验室通过运行 9 次重复, 评估了 Protein A Mag Sepharose。用 Dynabeads™ Protein A (Invitrogen 公司) 设立了平行实验, 作为比较。

利用兔抗人转铁蛋白的多克隆抗体, 从非标记的大肠杆菌蛋白背景下富集用 Cy™5 染料标记的人转铁蛋白。对于两种填料, 都采用了交联步骤, 并根据产品附带的操作指南处理每种填料 (表 2)。洗脱的组分用 SDS-PAGE (ExcelGel™) 来分析, 用 Deep Purple™ 总蛋白染料进行后染, 并用 Ettan™ DIGE Imager 扫描。

Protein A Mag Sepharose 与 Dynabeads Protein A 相比, 显示出明显更高的回收率, 两者的回收率分别为 53% 和 20% (图 1)。纯度与纯度平均值几乎是相同的, Protein A Mag Sepharose 为 52%, Dynabeads Protein A 为 50%。

表 2. 实验条件

	Protein A Mag Sepharose	Dynabeads Protein A
分离填料	25 $\mu$ l 凝胶浆体, Protein A Mag Sepharose	50 $\mu$ l 凝胶浆体, Dynabeads Protein A
样品	5 mg/ml 大肠杆菌蛋白, 含有 7.5 $\mu$ g/ml 人转铁蛋白	5 mg/ml 大肠杆菌蛋白, 含有 7.5 $\mu$ g/ml 人转铁蛋白
样品体积	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
抗体	兔抗人转铁蛋白的多克隆抗体	兔抗人转铁蛋白的多克隆抗体
结合缓冲液	Tris 缓冲盐 (TBS): 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5	0.1 M 磷酸钠, 0.01% Tween™ 20, pH 8.2
洗涤缓冲液	TBS, 2 M 尿素, pH 7.5	磷酸盐缓冲液 (PBS)
洗脱缓冲液	2 $\times$ 50 $\mu$ l 0.1 M 甘氨酸/HCl, 2 M 尿素, pH 2.9	2 $\times$ 50 $\mu$ l 0.1 M 甘氨酸/HCl, pH 2.9

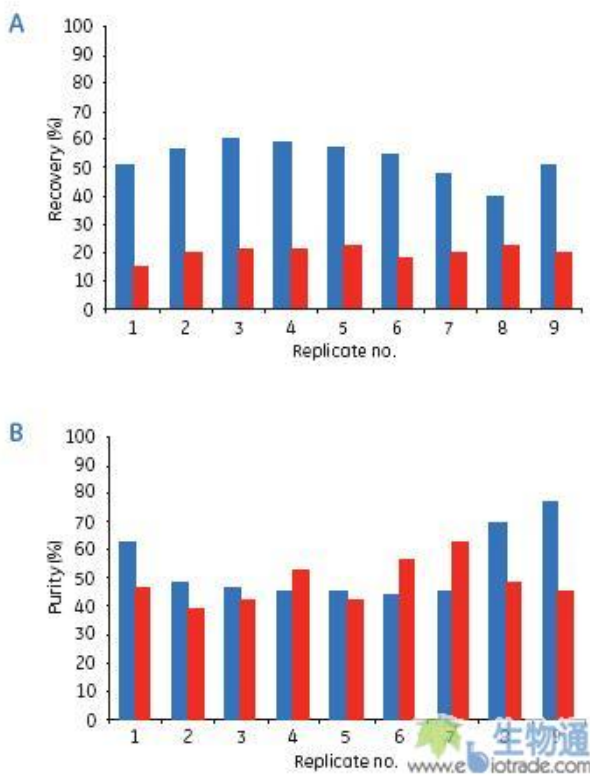


图 1. Protein A Mag Sepharose (蓝色) 和 Dynabeads Protein A (红色) 之间关于人转铁蛋白的(A) 回收率和(B) 纯度的比较。

在复杂的混合物中发现低丰度的酪氨酸磷酸化蛋白

活跃在信号通路中的蛋白一般不会在无样本制备的情况下被 SDS-PAGE 或质谱分析检测到, 因其丰度低。

Protein G Mag Sepharose 填料及固定的抗-pTyr 抗体用于富集和浓缩酪氨酸磷酸化的蛋白, 并以适合质谱分析的体积洗脱。

CHO细胞 ( $7 \times 10^7$ ) 用 100  $\mu$ M 过钒酸盐预处理 3 小时, 之后收集并裂解。裂解液, 包括蛋白酶和磷酸酶抑制剂, 通过离心来澄清, 并稀释两倍, 再与 Protein G Mag Sepharose 上固定的抗-pTyr 抗体在室温下共同孵育 60 分钟 (滚动)。用 2 $\times$ 100  $\mu$ l 100 mM 磷酸苯酯洗脱酪氨酸磷酸化的蛋白。在 LC-MS/MS 分析之前进行胰酶消化。制备未处理的细胞, 作为对照。

质谱鉴定得到 76 个潜在酪氨酸磷酸化蛋白的 hits, 其中 54 个只在过钒酸盐处理过的细胞中发现 (数据未显示)。这些蛋白中的大部分属于焦点的粘附相关的通路。未处理的细胞只得到 22 个 hits, 大部分是高丰度酶和核糖体蛋白。

结合抗-pTyr 抗体, Protein G Mag Sepharose 是一种很有力的工具, 能从大量起始样品中捕获参与了不同信号通路的低丰度蛋白。

从人血浆中富集血纤维蛋白溶酶原 (plasminogen)

NHS Mag Sepharose 显然是血浆样品进行免疫沉淀的首选, 因为内源的免疫球蛋白可能会与 Protein A Mag Sepharose 或 Protein G Mag Sepharose 上剩余的自由配体结合。此外, 一些抗体比如小鼠 IgG1, 众所周知在正常条件下与 Protein A 和 Protein G 的结合不佳。

人血浆中含有大量蛋白, 因蛋白浓度的范围广, 可能很难处理。这个免疫沉淀实验显示, 利用

NHS Mag Sepharose 上偶联的小鼠单克隆抗体，能有效地从血浆样品中富集血纤维蛋白溶酶原。

利用 NHS Mag Sepharose 上共价偶联的抗血纤维蛋白溶酶原小鼠 IgG1 单克隆抗体，从人血浆中富集血纤维蛋白溶酶原。在平行实验中，相同的抗体被 Protein A Mag Sepharose 捕获。抗体首先与 1.2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 混合，以便增加小鼠 IgG1 抗体与蛋白 A 配体的亲和力，然后抗体交联。

为了去除内源的 IgG，样品在 HiTrap™ Protein A HP 柱上澄清。两个富集实验的组分都在 SDS-PAGE 上分析（图 2）。血纤维蛋白溶酶原进一步由 LC-MS/MS 鉴定。

两种实验设置确保了目标蛋白的高水平富集。操作步骤稍作改动后，可克服小鼠单克隆 IgG1 与蛋白 A 的亲和力差。

#### A. NHS Mag Sepharose

B. • 亲和填料：25 μl NHS Mag Sepharose

C. • 样品：人血浆

D. • 样品体积：6 ml

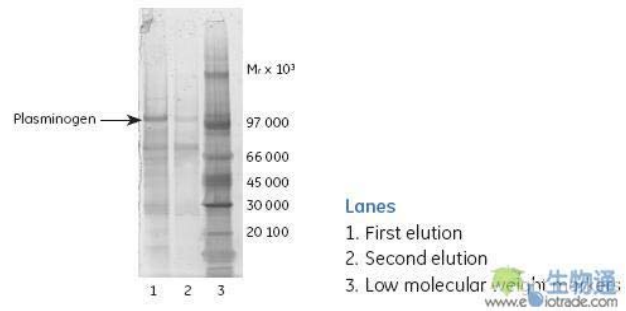
E. • 抗体：抗血纤维蛋白溶酶原的小鼠单克隆 IgG1

F. • 偶联缓冲液：0.15 M 三乙醇胺，0.5 M NaCl, pH 8.3

G. • 结合缓冲液：Tris 缓冲盐（TBS：50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH7.5）

H. • 洗涤缓冲液：TBS, 2 M 尿素, pH 7.5

I. • 洗脱缓冲液：2×50 μl 0.1 M 甘氨酸 /HCl, 2 M 尿素, pH 2.9



#### B. Protein A Mag Sepharose

• 亲和填料：25 μl Protein A Mag Sepharose

• 样品：人血浆

• 样品体积：10 ml

• 抗体：抗血纤维蛋白溶酶原的小鼠单克隆 IgG1

• 结合缓冲液：1.2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 9（增加小鼠 IgG1 和蛋白 A 的亲和力）

• 洗涤缓冲液：TBS, 2 M 尿素, pH 7.5

• 洗脱缓冲液：2×50 μl 0.1 M 甘氨酸/HCl, 2 M 尿素, pH 2.9

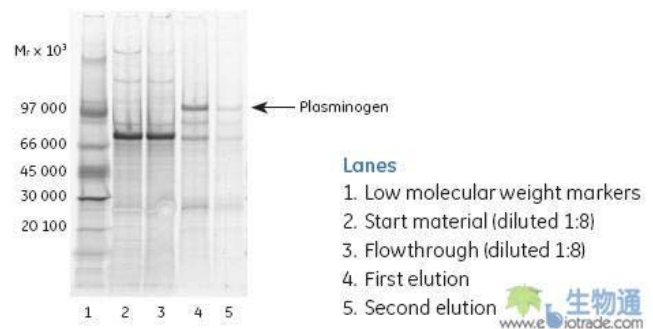


图 2. 从人血浆中富集血纤维蛋白溶酶原。(A) NHS Mag Sepharose 的 SDS-PAGE 结果。(B) Protein A Mag Sepharose 的 SDS-PAGE 结果。凝胶用 Deep Purple 蛋白染料后染，并用 Ettan DIGE Imager 扫描。箭头指示出血纤维蛋白溶酶原的位置。

# PAXgene 系统——组织形态与分子分析的完美结合

对于众多与人类或动物组织打交道的实验室来说，他们面临的挑战是如何将有限的样品用在多个分析之中。保留组织形态的常用方法是甲醛固定，接着石蜡包埋。虽然这种方法对组织形态学来说是 OK 的，但不适合生物分子的提取。因为含有甲醛的固定剂会使生物分子形成交联，修饰核酸和蛋白。在组织固定、储存和处理过程中，交联引起核酸降解。因此，DNA、RNA 和 miRNA 的完整性受损，影响了下游的分子分析，例如定量 PCR 或 RT-PCR。其它的稳定剂如 RNAlater 虽保留了组织中的核酸，却不能保留组织形态。鱼和熊掌，怎可兼得？

为了既保持形态，又稳定分子，QIAGEN 和 BD 的合资公司 PreAnalytiX 开发出的 PAXgene 系列产品 2009 年又推出新品：PAXgene Tissue System。该系统由两部分组成：采集、稳定、储存和运输人类组织样品的组织采集装置-PAXgene Tissue Containers 以及分别纯化总 RNA 或 DNA 或 miRNA 的 PAXgene Tissue 系列试剂盒。

PAXgene Tissue Containers 是一种双腔容器，预装 2 种试剂，分别用于组织的固定和稳定。第一个腔 PAXgene Tissue Fix 快速渗入并固定组织，时间为 2-4 小时（最多 12 小时）。固定之后，从 PAXgene Tissue Fix 中取出组织并转移到第二个腔 PAXgene Tissue Stabilizer 中，进行生物分子和形态学的稳定。当组织储存于 PAXgene Tissue Stabilizer 时，组织的核酸和形态在室温下可稳定 3-7 天，在 2-8°C 条件下可稳定 2-4 周，稳定时间取决于组织类型。也可在 -20°C 的条件下至少保存 3 个月，甚至在 -80°C 保存数年，对组织形态和核酸完整性没有任何不良影响。稳定的样品可包埋到石蜡中，可以后续进行染色，或者免疫组化反应，用于组织形态学研究。当然，在石蜡包埋前后，都可从稳定样品中分离核酸。这相当于替代了福尔马林在固定组织切片的功能。第一次为这种传统方法提供了其他代替方案，并能更好地兼顾面向未来的分子生物学的进展！

PAXgene Tissue Containers 既能固定组织，用于组织病理学研究，又能从同一个样品中纯化高品质核酸，用于分子分析，可谓鱼和熊掌皆可得。也许有人会担心 PAXgene 的固定质量不及甲醛。H&E 染色结果很好地说明了一切（图 1）。将人腭扁桃体的横切面一分为二。一半用 PAXgene Tissue Container 固定，另一半用甲醛固定。之后用石蜡包埋，切片，并用苏木精和曙红染色。图 1 表明 PAXgene Tissue Container 保留了完整的组织形态，其染色模式与甲醛固定组织相当。就免疫组化分析而言，PAXgene Tissue Containers 固定组织的染色强度也与 FFPE 组织相当（图 2）。

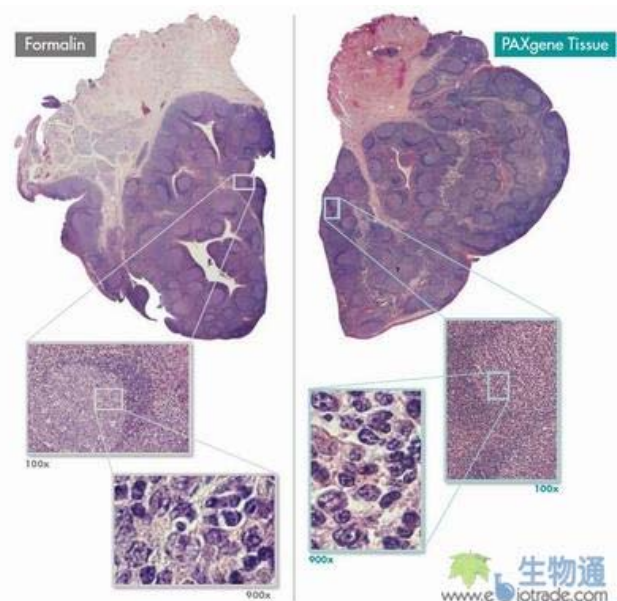


图 1. PAXgene Tissue System 的 H&E 染色结果与甲醛固定组织相当。

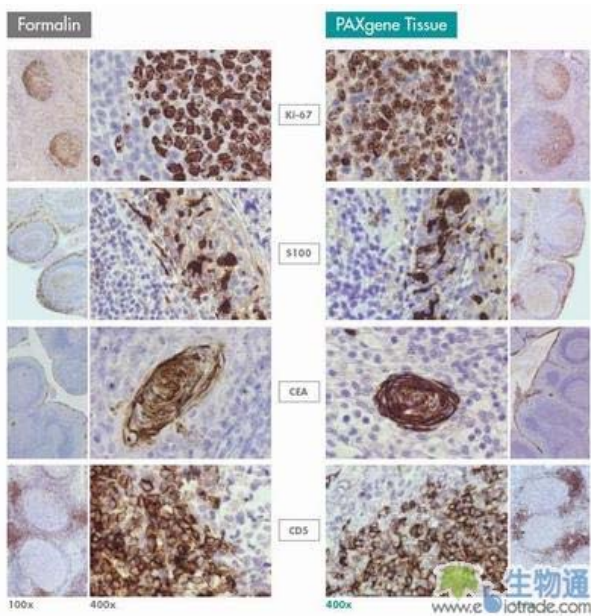


图 2. PAXgene Tissue System 的免疫组化结果与甲醛固定组织相当。人腭扁桃体组织用 PAXgene Tissue Containers 固定，或甲醛固定，石蜡包埋，采用 LSAB 方法染色。切片用苏木精复染。对于甲醛固定的样品，所有抗原都需要抗原修复，而 PAXgene Tissue System 中只有 CD5 需要。

组织形态分析完毕，下一步就轮到核酸纯化了。目前有三种 PAXgene Tissue Kits 纯化试剂盒，从组织中分别纯化总 RNA、miRNA 或 DNA。

PAXgene Tissue RNA Kit 能从固定和稳定于 PAXgene Tissue Containers 中的组织中纯化总 RNA。其流程如下：首先进行组织样品的破碎和匀质化，离心之后去除细胞碎片，在裂解液中添加乙醇，确保合适的 RNA 结合条件。然后将样品上样到 PAXgene RNA MinElute 离心柱，总 RNA 结合到膜上，有效去除杂质。在两次洗涤步骤之间，用 DNase 处理膜，去除少量结合的 DNA。洗涤之后，用低盐洗脱液洗脱 RNA，并加热至 65°C 让 RNA 变性。

使用 PAXgene Tissue RNA Kit 纯化的总 RNA 纯度非常高，与 CsCl 梯度离心相当，其中基因组 DNA 的污染降至最低，纯化所得的 RNA 可

直接用于多种下游分析，包括 RT-PCR 及定量 RT-PCR，表达谱芯片分析，Northern、dot 和 slot blot 分析以及引物延伸等。该试剂盒可分离出所有大于 200 nt 的 RNA 分子，并选择性地分离出大部分小于 200 nt 的核酸（诸如 5.8S rRNA、5SrRNA 和 rRNA，这些占总 RNA 的 15-20%）。不过，对于专门的小 RNA 纯化，我们还是推荐使用 PAXgene Tissue miRNA Kit。

PAXgene Tissue miRNA Kit 的流程基本同上，不过它采用了优化的结合和洗涤条件，可分离出所有大于 18 nt 的 RNA 分子，特别适合目前热门的 miRNA 研究。纯化所得的 miRNA 和总 RNA 可直接用于下游分析，包括 Northern blot 分析、定量 RT-PCR 以及芯片分析等，未检测到 PCR 抑制。

至于基因组 DNA 的分离，PAXgene Tissue Containers 收集和稳定组织后，PAXgene Tissue DNA Kit 接下来进行 DNA 的分离和纯化。在裂解缓冲液中进行组织裂解，并利用蛋白酶 K 进行消化。结合缓冲液及乙醇的缓冲条件可调整，以确保提供最佳的 DNA 结合。然后将裂解液上样到 PAXgene DNA 离心柱上。在离心过程中，DNA 会选择性地结合到硅胶膜上，杂质则流过柱子。用洗涤缓冲液进行 2 次高效的洗涤，去除残留的杂质和酶抑制剂，最后低盐洗脱缓冲液洗脱，获得的 DNA 可直接用于下游应用，包括各种 PCR、Southern blotting 及 SNP 基因分型等。

### [了解PAXgene系统的更多信息!](#)

PAXgene Tissue DNA Kit 纯化所得的总 DNA 纯度非常高，A260/A280 比例达 1.7-1.9，同时吸光度扫描显示其在 260 nm 有对称峰，证实是高纯度的基因组 DNA。纯化过程中高分子量的基因组 DNA 得以保留，PCR 能扩增出 >21 kb 的条带，而 FFPE 样品则望尘莫及，只能是一条长长的拖尾

(图 3)，表明该试剂盒纯化出的 DNA 适合长片段 PCR。

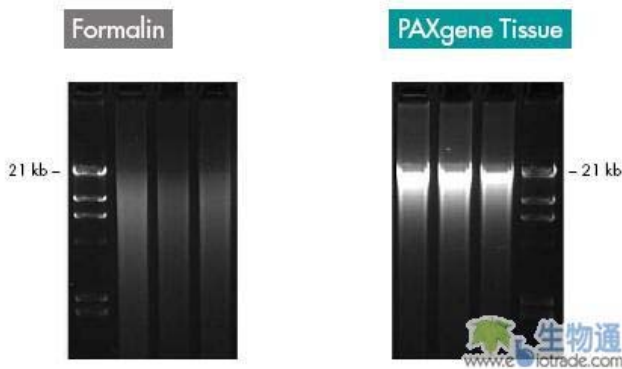


图 3. 基因组 DNA 扩增后的琼脂糖电泳图。人腭扁桃体标本分别用 PAXgene Tissue System 或甲醛处理。利用 PAXgene Tissue DNA Kit 提取石蜡包埋切片中的总 DNA；对于甲醛处理的扁桃体，则用一种市售的适合 FFPE 组织的 DNA 提取试剂盒。前者扩增出了 21 kb 的片段，而 FFPE 样本则降解。

让我们也借这个机会回顾一下 PreAnalytic 公司的 PAXgene 系列产品：

PAXgene Blood RNA Tubes 大家都不陌生，它们包含了裂解血细胞并立即稳定 RNA 的混合试剂。对于下游的基因谱表达分析而言，RNA 稳定相当关键。如果不稳定，RNA 会立即降解，转录本就会发生上调或下调。而 PAXgene Blood DNA 管中采集的血液样本可在室温下储存长达 3 天，或在  $-20^{\circ}\text{C}/-70^{\circ}\text{C}$  储存至少 50 个月，却没有明显的 RNA 降解或转录水平的改变。

稳定之后，下一步就是利用 PAXgene 硅胶膜技术 PAXgene Blood RNA Kit，简单的离心操作。纯化 18 nt 以上的总 RNA。只要是长于 18 个核苷

酸的 RNA 分子，这个试剂盒都不会放过，因此 miRNA 自然也难逃掌心。miRNA 可用 QIAGEN miScript PCR System 或其它的定量 RT-PCR 系统来分析，也可进行表达谱分析。

PAXgene 系统也提供 DNA 血液稳定和纯化的系列产品，但是目前看来，收集血液时候即加入抗凝剂是比较常见的操作，而加入抗凝剂的血不需要使用 PAXgene 的系统了。虽然，从保存核酸分子稳定的能力来看，PAXgene 系统确实独树一帜。

另外，骨髓的稳定和 RNA 纯化的任务有 PAXgene Bone Marrow 系统完成。收集在 PAXgene Bone marrow Tube 中后续用 PAXgene Bone Marrow RNA Kit 纯化。

随着 miRNA 研究的持续升温，与血液打交道的研究人员也急切盼望有一种标准化方法，从人血液样品中纯化小分子 RNA。为此，PreAnalytiX 公司新推出了 PAXgene Blood miRNA Kit。它与 PAXgene Blood RNA Tubes 的强强联手，整合了血液的采集、稳定和运输，以及随后 miRNA 的富集。纯化是利用硅胶 RNA 纯化技术在离心柱中进行的。纯化可手工进行，也能在 QIAcube 中自动开展。

组织形态，我所欲也，分子信息的获得和分子水平的分析，亦我所欲也。有了 PAXgene 系统，二者皆可得，不用再做困难的取舍。

**PAXgene 系统** 为您带来一个样品的两个美妙世界！

(生物通 余亮)

# 利用 ÄKTA avant 25 和 UNICORN™ 6 实现快速安全的方法优化和工艺开发

ÄKTA avant 25 是一台制备液相色谱系统，它融入了尖端的功能性，以实现快速安全的工艺开发。专为 ÄKTA avant 的使用而开发的 UNICORN 6 控制软件，有着全新的图形用户界面，让灵活性和可用性增加。作为 UNICORN 6 中包含的标准，整合的 Design of Experiment (DoE) 工具让您通过更少的实验获得更精确的信息。为方法开发而设计的 HiScreen™ 预填充柱，以及适合初筛的预填充 PreDictor™ 96 孔板也能提高您的生产效率，并实现轻松的放大。

ÄKTA avant 让您能在最短的时间内开发出可扩展的可靠层析工艺。生产效率的提高将缩短产品上市和文章发表的时间，并节省费用。完整的安全性意味着您能安全高效地工作，以获得可靠的数据，并得出精确的结论。

## 安全

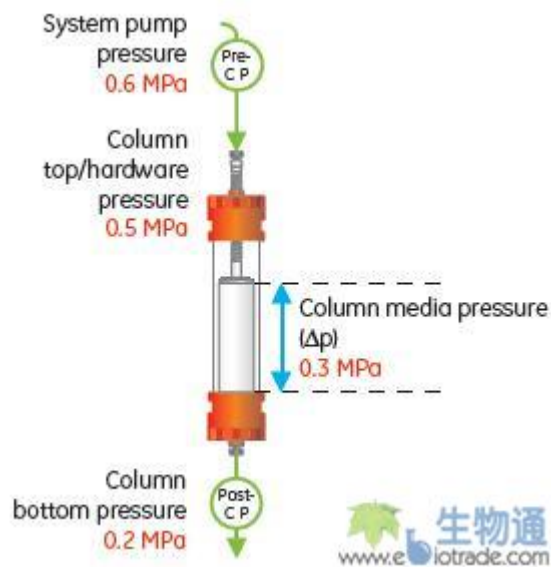
### 整合的组分收集器保证样品完整

内置的组分收集器提供了样品安全、灵活性和高通量。组分收集器是温控的，以预防样品过热，并防止灰尘落入纯化的样品中。目前有多种类型的管架（3、8、15 和 50ml）及深孔板架（24、48 和 96 孔）可供选择。用户可根据需要任意组合 6 个架子，上样到组分收集器中。上样后，传感器自动检测架子类型，并验证架子的配置。



### 测量压力差，保证操作和样品安全

为了确保您的柱子和样品受到保护，在运行中不断测量柱前压力 (Pre-C P) 和柱后压力 (Post-C P)，并自动计算出填充柱床的压力差 ( $\Delta p$ )。如果其中一个压力超过了预设的限度，运行暂停，或者当压力流调节模式激活时，流速自动降低。这些压力差的测量方式与大规模生产过程中所采用的仪器相当。



### 利用柱日志带来完整的可追踪性

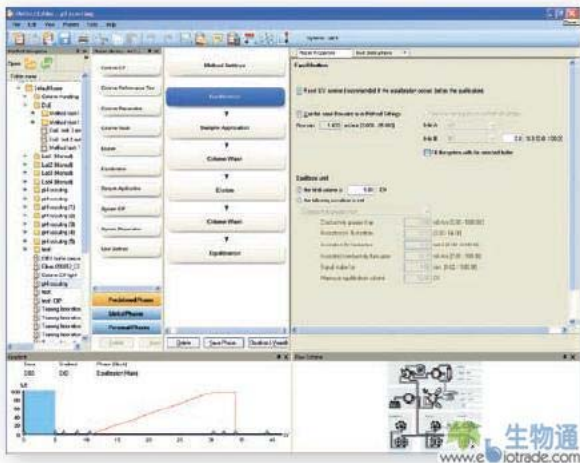
为增加操作安全性，柱日志记录了重要的柱和运行数据。大部分预填充柱比如 HiScreen 柱，都标有条形码。利用二维条形码扫描仪识别每个柱，或将信息手工输入至 UNICORN 6 中。目前有预印有二维条形码的 UniTag 贴纸标签，适合那些未预

先标记的柱（例如自行填充的柱）。通过追踪单个柱，记录下每次运行的信息，如运行总数和最大的压力差。可设定通知限度，例如定义柱在两次清洗之间的运行次数，在需要柱维护时用户会收到通知。

## 速度

### Method Editor 带来的易用性和灵活性

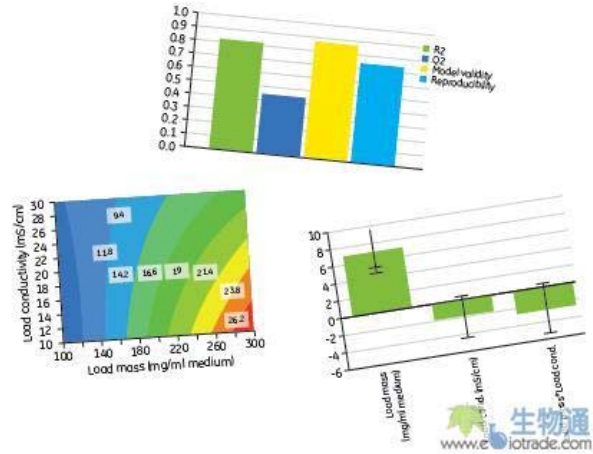
Method Editor 是方法编程的捷径，它简单、非常直观，但又足够灵活，初学者和熟练用户均可使用。Method Editor 包含预先设定的方法，适合不同的层析技术和维护步骤。目前有预先设定的阶段库，通过在阶段库中拖动和舍弃阶段，来创建或编辑您自己的方法。



### DoE 让效率增加

UNICORN 6 还带有一种整合的功能，称为 Design of Experiments (DoE)，这是一个强大的工

具，能从最少量的实验中获得最大量的信息。过去，最佳条件的确定是每次改变一个参数，而保持其他参数不变。有了 DoE，因素可同时变化，减少了所需的实验量，并节省了时间和费用。



### 用 BufferPro 进行快速的方法优化

BufferPro 的自动化在线缓冲液配制避免了耗时的缓冲液配制，对于需要改变 pH 的实验，也避免了手工滴定。BufferPro 特有真正的缓冲液配制，利用共轭的酸/碱溶液进行滴定。这模拟了手工配制缓冲液的方法，增加了缓冲能力和可扩展性。BufferPro 还能自动补偿梯度内的盐浓度，以获得更稳定的 pH 值。缓冲液成分可从缓冲液库中选择，以轻松改变 pH 范围，并创建出所需的 pH 洗脱条件。

关于 ÄKTA avant 和 UNICORN 6 的更多信息，请访问 [www.gelifesciences.com/aktaavant](http://www.gelifesciences.com/aktaavant) 或 [点击此处索取最新技术资料](#)。

# 赛默飞世尔特约之 2010 实验室创新 技术大奖评选活动拉开帷幕

实验技术的进步，加速推进了生命科学研究进展。日新月异的各种试剂盒和仪器，其创新之处，实际上皆源自您身边每个普普通通的实验，源自实验人对操作方法的点点创意，小小改进。

## 分享创意 赢取大奖

相信，您的日常实验多多少少都采用了这样的“小技巧”，或“秘笈”--可以得到更漂亮结果、节省点试剂和经费、节约点时间，或者节省点劳力.....要知道，省时省力的小聪明小创意小点子咱们中国学生可是从来都不缺乏的。如果你乐于与大家一起分享，那么生物通主办的“[赛默飞世尔特约之 2010 实验室创新技术大奖](#)”正是为你而设的！生物通秉承推动实验室创新技术普及的传统，在连续两年举办“生命科学十大创新产品评选”活动，向读者介绍最具创新性的实验产品之余，再度推出实验室创新技术大奖，正是让大家分享实验小创意，激发实验的灵感

## 无论是一大步还是一小步，都是推动实验前进 的脚步

只要是对实验室标准方案做了改进--哪怕只是小小的一点--只要它能提高实验效率，或提高实验精确度，能过去所不能，或能节省经费或试剂，或节约时间或劳动力，都可以记录下来，发给生物通，与广大读者分享。通过读者投票和专家评选，我们将评选出最具创意的“2010 实验室创新技术大奖”，给予金奖 5000 元的现金奖励。

还犹豫什么，赶快来参加吧，万元大奖等你拿！

活动细则及参与方式请查看活动页面：

[赛默飞世尔特约之 2010 实验室创新技术大奖](#)

# Sanger microRNA 数据库 (miRBase)升级至 15.0 版

2010年4月25日，Sanger microRNA 序列数据库(miRBase)升级至 15.0 版。在新版本中，发夹前体序列升至 14197 条，新增 3377 条；成熟 miR 和 miR\*产物共 15632 条，新增 4022 条；报道序列涵盖 133 个物种。

新增 microRNA 序列主要集中在动物物种，最具代表性的有 *Homo sapiens* (人)，*Pongo pygmaeus* (猩猩)，*Bombyx mori* (家蚕)，*Ciona intestinalis* (玻璃海鞘)，*Drosophila pseudoobscura* (拟暗果蝇)，分别新增 219 条，504 条，396 条，298 条和 138 条。植物物种中增长最为显著的是 *Medicago truncatula* (蒺藜苜蓿)，新增 267 条。

此外，新版本中首次收录的物种共有 18 个，包括：

9 个动物物种：*Taeniopygia guttata* (斑胸草雀) (220)，*Oryzias latipes* (青鳞) (16)，*Acyrtosiphon pisum* (豆无网长管蚜) (10)，*Aedes aegypti* (埃及伊蚊) (102)，*Culex quinquefasciatus* (致倦库蚊) (72)，*Nasonia vitripennis* (丽蝇蛹集金小蜂) (53)，*Brugia malayi* (马来丝虫) (32)，*Caenorhabditis remanei* (109)，*Pristionchus pacificus* (124)；

8 个植物物种：*Ricinus communis* (蓖麻) (63)，*Arachis hypogaea* (花生) (23)，*Glycine soja* (野生大豆) (13)，*Gossypium arboreum* (中棉) (1)，*Citrus Clementine* (克莱门氏柑桔) (5)，*Citrus reticulata* (柑桔) (4)，*Citrus sinensis* (橙) (10)，*Citrus trifoliata* (枳) (6)；

1 个病毒物种：*Bovine herpesvirus 1* (I 型牛疱疹病毒) (10)。

联川生物—LC Sciences 中国公司全球首家提供最新 **15.0 版 microRNA 微阵列芯片检测服务** ([欢迎索取最新资讯](#))，为您分析最全面的 microRNA 表达谱。获取更多信息，请您登陆 [www.lc-bio.com](http://www.lc-bio.com) / [www.lcsciences.com](http://www.lcsciences.com) 或拨打免费技术热线 800-857-1452。

## 关于 miRBase

miRBase 序列数据库是一个提供包括 miRNA 序列数据、注释、预测基因靶标等信息的全方位数据库，是存储 miRNA 信息最主要的公共数据库之一。miRBase 提供便捷的网上查询服务，允许用户使用关键词或序列在线搜索已知的 miRNA 和靶标信息，详情请访问 <http://www.mirbase.org/>。

## 关于 LC Sciences 与联川生物

LC Sciences (美国) 是一家专业提供基因组及蛋白质组产品与服务的生物技术公司，提供全方位的 DNA, RNA 及多肽微阵列服务，可用于核酸/蛋白表达谱与功能分析，生物标记发现和新药筛选，研发应用于诊断和生物传感的微型实验设备。基于专利的  $\mu$ Paraflo® 微流体技术，LC Sciences 可提供具有高度灵活性和定制化的创新产品来满足客户快速变化的需求。联川生物作为 LC Sciences 在中国成立的全资子公司，随时为您提供最新的生物技术服务和前沿信息。

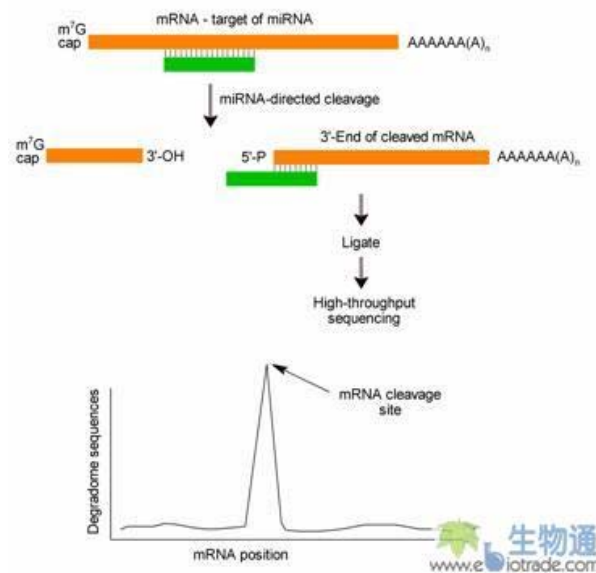
# 联川生物推出 Degradome Sequencing 服务——协助您快速发现 miRNA 靶基因

microRNA (miRNA) 是一类长度约为 22 nt 的内源性非编码 RNA, 几乎参与了动植物体内所有重要的生命活动, 调控相关基因的表达。通常, miRNA 通过与靶基因 (mRNA) 部分或完全配对, 引起基因的翻译抑制或是基因的内切酶剪切来实现对基因的表达调控, 在动物体内以基因的翻译抑制居多, 在植物体内则以靶基因被剪切占多数。利用成熟的 miRNA 微阵列芯片或是 qPCR 技术可以高效快速地筛选出动植物体内差异表达的 miRNA, 而找出差异 miRNA 作用的靶基因成为研究其重要生物学功能的关键。

不同于动物, 植物 miRNA 通常与靶基因进行完全或接近完全的配对引起靶基因的剪切从而调控基因的表达。最初科研人员利用这一特征对植物 miRNA 的靶基因展开了生物信息学预测, 并获得了许多有意义的研究成果。然而, 由于预测方法无法区分预测靶基因的真伪, 所有预测结果必须经实验证实以去伪存真。这极大地影响了靶基因的探索效率。同时在一些情况下, 如 miRNA 与靶基因间存在较高错配时, 预测方法可能会丢失许多真实的靶基因。

伴随下一代测序 (Next Generation Sequencing) 或称高通量测序 (High-throughput Sequencing) 的出现和发展, 近来出现了一种新的实验方法称为降解组测序 (Degradome Sequencing), 它结合了高通量测序技术与生物信息学分析各自的优势, 已成功应用于拟南芥<sup>1,2</sup>, 水稻<sup>3</sup>等植物的 miRNA 靶基因筛选。降解组测序的原理是, 在植物体内绝大多数的 miRNA 是利用剪切作用调控靶基因的表达, 且剪切常发生在 miRNA 与 mRNA 互补区域的第十位核苷酸上。靶基因经剪切产生二个片段, 5' 剪切片段和 3' 剪切片段。其中 3' 剪切片段, 包含有自由的 5' 单磷酸和 3' polyA 尾巴, 可被 RNA 连接酶, 连接产物可用于下游高通量测序; 而含有 5' 帽子结构的完整

基因, 含有帽子结构的 5' 剪切片段或是其他缺少 5' 单磷酸基团的 RNA 是无法被 RNA 酶连接, 因而无法进入下游的测序实验; 对测序数据进行深入地比对分析, 可以直观地发现在 mRNA 序列的某个位点会出现一个波峰, 而该处正是候选的 miRNA 剪切位点 (完整实验流程请您参见下图)。利用降解组测序, 科研人员摆脱了生物信息学预测的限制, 真正从实验中找到了 miRNA 的作用靶基因。



联川生物现已推出降解组测序服务 (Degradome Sequencing Services), 协助您高效快速地筛选出 miRNA 的作用靶基因。降解组测序服务的推出, 进一步丰富了我们的 miRNA 全方

位技术服务，使我们可为您提供从 miRNA 发现，miRNA 表达谱差异分析，到 miRNA 作用靶基因筛选的完整实验解决方案。[点击索取详细资料...](#)

参考文献：

1. Addo-Quaye C, Eshoo TW, Bartel DP, Axtell MJ. (2008) Endogenous siRNA and miRNA Targets Identified by Sequencing of the Arabidopsis Degradome. *Curr Biol.* 2008 18(10), 758-62.

2. German MA, Pillay M, Jeong DH, Hetawal A, Luo S, Janardhanan P, Kannan V, Rymarquis

LA, Nobuta K, German R, De Paoli E, Lu C, Schroth G, Meyers BC, Green PJ. (2008) Global identification of microRNA–target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nat Biotechnol.* 2008 26(8), 941-6.

3. Zhou M, Gu L, Li P, Song X, Wei L, Chen Z, Cao X. (2010) Degradome sequencing reveals endogenous small RNA targets in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Front. Biol.* 2010, 5(1), 67–90.

# 收购无止境 三大公司再度扩张

生物通报道，赛默飞世尔科技公司近日宣布已收购了丹麦 Proxeon 公司，具体金额未知。这家私营公司制造纳升级液相色谱系统、柱、离子源及生物信息学软件，用于复杂蛋白质组应用中的液相色谱/质谱分析。Proxeon 的主要产品是 Easy-nLC 纳升级液相色谱系统。

Proxeon 公司 2009 年收入约为一千万美元。该公司雇佣有近 40 名员工，将被整合到赛默飞世尔科技的分析技术部门。赛默飞世尔科技的总裁及 CEO Marc Casper 表示：“这些系统能被轻松整合到我们领先的离子阱和三重四级杆质谱系统中，与我们为高端研究和常规应用提供综合的 LC/MS 方案的策略一致。”

另外，PerkinElmer 公司也于近日收购了一家美国的诊断遗传检测公司 Signature Genomic Laboratories, LLC (以下简称 Signature)。此次收购让 PerkinElmer 加强了其在分子诊断市场的遗传检测服务，并为癌症诊断提供了更多的优势。

Signature 于 2003 年成立，有将近 120 名雇员，主要业务是对身体及发育残疾的个体开展染色体异常的细胞遗传学检测。Signature 目前还有芯片诊断技术，在产前和出生后对与遗传病相关的 DNA 改变进行鉴定。最近，Signature 还推出了一套服务，针对白血病患者的诊断。

PerkinElmer 的 CEO Robert Friel 表示：“我们很高兴 Signature 成为 PerkinElmer 团队的一部分。

在诊断传统遗传检测无法检测出的疾病方面，Signature 带来了很强的互补资产。”

上周，据一家德国的基因合成公司 GeneArt 透露，生命科技公司 (Life Technologies) 的德国子公司 Applied Biosystems Deutschland GmbH 已经购买了其 58% 的已发行股票，这样生命科技公司就成为了 GeneArt 的大股东。同时，GeneArt 还宣称 Applied Biosystems Deutschland 正在计划对其余股份进行自愿的公开收购要约。

根据其在网站上发布的公告，GeneArt 表示生命科技公司通过其子公司收购了 2,631,552 股的股份。收购要约试图以每股 13.75 欧元 (18.60 美元) 的价格收购其余 1,856,248 股，合计为 2550 万欧元。该公告没有说明生命科技公司最初收购 58% 股份时的每股价格。

GeneArt 今天宣布，其董事会和监事会已建议股东接受生命科技公司收购该公司所有已发行股票的出价。

(生物通 余亮)

# 参与 Eppendorf“南非世界杯竞猜”赢取精美奖品！



实验室的大门也挡不住足球的魅力！现在，Eppendorf 公司给了所有足球迷一个验证眼力的机会：参与“Eppendorf 南非世界杯”在线竞猜活动！

预热世界杯，2010 年 4 月 1 日起，Eppendorf“冠军竞猜”活动正式启动。ep-points 用户和新近注册的朋友均可以将您的“冠军竞猜”通过网站 [www.eppendorf.com/eppicup](http://www.eppendorf.com/eppicup) 传递给我们。随着冠军杯的举起，我们也将通过抽奖的方式，在猜中比赛结果的球迷中抽出三位幸运儿并赠送他们高达 5000 点 ep-points 积分！

2010 年 6 月 1 日起，南非世界杯将进入高潮，我们的竞猜活动也将正式开始！从这一刻起，您可在线投出预选赛的竞猜票。当比赛进入决赛阶段，猜中进入决赛队伍的竞猜票将被锁定。

竞猜参与者积分最高的三位，每人将获得一台崭新的苹果平板电脑 iPad。其余的参与者将得到 Eppendorf 公司提供的参与奖，奖品为 ep-points 积分，您可以用这些积分登录 Eppendorf 网站兑换精美的礼品。

从 2010 年 4 月 1 日起，直接登录 [www.eppendorf.com/eppicup](http://www.eppendorf.com/eppicup) 网页注册参赛，并可了解到关于本次竞猜的所有重要信息以及竞猜规则。本次竞猜游戏对所有参与者免费。

Eppendorf AG 祝所有活动的参与者好运并度过一个充满激情的足球之夏！