

# EBIOTECH

## 生物通技术周刊

第78期

2010年6月18日

全文下载

### 〔技术前沿〕

Science聚焦海洋中的生物发光  
快速纯化大量RNA的新方法  
一种构建重组质粒的简便方法

### 〔新品速递〕

神奇的样品处理器助你纯化蛋白  
优于芯片的数字基因表达谱技术  
ABI推出第七代实时定量PCR仪  
Promega定量PCR系列产品上市，更强更亮更灵敏  
分离调节性T细胞的利器  
Nunc发布体外受精新产品  
美天旎发布新一代的T细胞分离试剂盒  
移液无止境，Eppendorf Research plus移液器上市

### 〔应用指南〕

如何挽救Western阴性结果  
专家是如何富集低丰度蛋白的（一）（二）（三）  
GPCR 研究方案-多样化的HTRF细胞平台  
5月冷泉港实验方案聚焦活体成像和农杆菌转化

### 〔行业动态〕

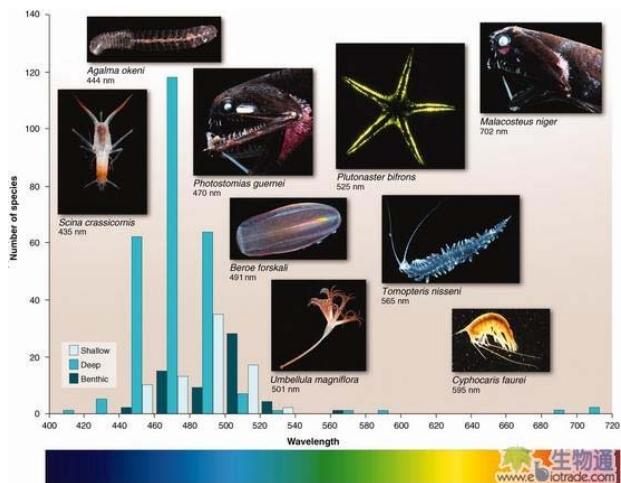
赛默飞世尔以2.6亿美元收购Fermentas  
赶快申请miRNA研究课题基金吧  
NIH新批准了13株干细胞系  
ATCC宣布推出有证标准物质

# Science 聚焦海洋中的生物发光

从细菌到鱼类，一大群海洋生物依靠生物发光来寻找食物，吸引同类以及躲避天敌。这些生物的栖息范围很广，从极地到热带，从地表水域到海底。不同的生物化学系统和多样的系统发育分布模式突出了生物发光的生态学优势，而遗传学分析为其进化机理提供了新见解。然而，有些生物发光系统的来源和功能仍不清楚。

在最新一期（5月7日）的《Science》杂志上，美国海洋研究与保护协会的E.A. Widder回顾了海洋中生物发光的最新进展，总结了生物发光的功能和生化可变性，并讨论了导致生物发光的进化过程。

生物发光的颜色各异，如同彩虹一般，且绚丽夺目。由于大部分生物发光是在开放海域中进化的，所以发射光谱主要是蓝色，波长在475 nm附近。其次是绿色，主要在深海和沿海物种中发现，这可能是因为水中混浊度的增加，散射了蓝光，并支持了更长波长的传播。紫色、黄色、橙色和红色都很稀少，而且它们的功能仍是一个谜。



（图片来自原作者）

生物发光有哪些功能？作者认为，了解生物发光在特定物种中的功能有助于了解环境施加了哪些选择压力。生物发光的许多功能反映了生物进化时所处的视觉环境的独特性质。开放海域是一个无

处可藏的地方，阳光直射下来，穿过海水，每75米强度减弱约10倍，直至1000米以下一片漆黑。为了躲藏，许多动物在白天垂直向下迁移，只有在夜幕降临时才冒险进入食物丰富的地表水域。

这种迁移的结果是，大部分开放水域的栖息者在昏暗的光线或黑暗处生活，而生物发光通过三种途径帮助它们生存下来。首先，它帮助定位食物；其次，它凭借物种特异的空间或时间发光模式，来吸引同类；再次，它还能作为防御天敌的武器。最后一点颇为常见，比如乌贼和水母，在遇到危险时，会向水中释放发光的化学物质，让敌人分心或看不见。

生物发光中的化学反应必须是能量充足的，以产生单重激发态分子，当单重激发态分子回到基态时，就产生可见光子。包含分子氧的氧化反应适合这一原则，这也解释了生物发光反应中的主要机制包括了过氧化氢键的断裂。通常将发光反应称为萤光素酶与萤光素之间的反应，即酶与底物的作用，但实际上这种反应也分为好几类。人们熟知的萤光素就有四种，分别为细菌萤光素、腰鞭毛虫萤光素、腔肠萤光素和 *Cypridina* 萤光素。

生物发光究竟是如何形成的呢？作者探究了几种进化适应。在深海琵琶鱼（*Linophryne coronata*）中，头部的生物发光是细菌来源的，而下巴触须的发光却不清楚。在章鱼中，它的吸盘是

发光器官。在被囊动物中，发光来自假定的细菌共生体。

作者还认为，随着原位传感器技术及其它观测平台的改善，此领域会有一些新发现，再加上实验室的基因组学和生物学研究的深入，能更好地理解海洋中生物发光的生态学重要性及适应值。（生物通 薄荷）

原文检索：

**Bioluminescence in the Ocean: Origins of Biological, Chemical, and Ecological Diversity**

Science 7 May 2010: Vol. 328, no. 5979, pp. 704 - 708

[Fermentas顶级转染、逆转录试剂上市，索取试用装！](#)

# 快速纯化大量 RNA 的新方法

RNA 的结构学研究, 比如 X 射线晶体衍射或者核磁共振( NMR ), 都需要制备毫克级的高纯度 RNA。

RNA 的大量合成一般是利用 T7 RNA 聚合酶对 DNA 模板进行体外转录, 不过随后的纯化非常困难且耗时。利用高速液相层析系统 ( FPLC ) 的分子排阻层析能够从 RNA 产物中有效去除未掺入的 NTP、中断的小转录本及模板 DNA, 但是需要多个准备步骤, 如酚/氯仿抽提, 以去除 T7 RNA 聚合酶, 以及脱盐和样品浓缩。

英国剑桥医学研究委员会分子生物学实验室的 Laura Easton 等开发出一种快速、大规模纯化结构上均一的 RNA 的新方法。这种方法利用的是弱阴离子交换层析, 它省略了上述这些繁琐的步骤, 更快速地纯化大量 RNA。文章发表在《RNA》杂志上。

整个过程如下: 利用 T7 RNA 聚合酶对线性的质粒 DNA 进行转录之后, 加入 EDTA 终止反应, 并直接上样到 DEAE-Sepharose FPLC 柱上。最初的流出液含有 T7 RNA 聚合酶及 rNTP。之后一次洗脱出短的中断转录本、期望得到的 RNA 和质粒 DNA。RNA 的纯度和均一性由分子排阻层析来验证, 而蛋白凝胶电泳证实了纯化的 RNA 中不含 T7 RNA 聚合酶。

利用这种新方法, 研究人员能够在 4 小时内纯化长度在 30-500 nt 的体外转录 RNA, RNA 的回收率达 90% 以上。如果单体 RNA 和低聚 RNA 有着足够的电荷差异, 那么也能将两者区分开。

此技术既排除了酚/氯仿抽提, 也不需要对 RNA 变性, 不仅简单省时, 还能省钱。因为同位素标记的 rNTP 能够很轻松地从柱流出液中回收利用, 这样又能节省一笔费用。 (生物通 余亮)

原文检索:

Easton et al. 2010. Rapid, nondenaturing RNA purification using weak anion-exchange fast

performance liquid chromatography. RNA 16(3):647–653.

摘要:

We present a simple and fast method for large-scale purification of RNA oligonucleotides suitable for biochemical and structural studies. RNAs are transcribed in vitro with T7 RNA polymerase using linearized plasmid DNA templates. After addition of EDTA, the crude transcription reaction is subjected directly to weak anion-exchange chromatography using DEAE-sepharose to separate the T7 RNA polymerase, unincorporated rNTPs, small abortive transcripts, and the plasmid DNA template from the desired RNA product. The novel method does neither require tedious phenol/chloroform extraction of the T7 RNA polymerase nor denaturation of the RNA, which is desirable especially for larger RNAs. In addition, isotopically labeled rNTPs can be easily recycled from the column flow-through and oligomeric RNA aggregates can be separated from the natively folded monomeric RNA product.

[买TRizol获免费产品/礼品, 详情请点击](#)

# 一种构建重组质粒的简便方法

克隆的道路有很多条，比如 TA 克隆、不依赖连接反应的克隆 (LIC) 、重组酶依赖的克隆等等。TA 克隆和 LIC 都需要末端修饰，而这种修饰不容易被凝胶电泳等技术检测。重组酶通常又是和克隆试剂盒捆绑销售的，因此研究人员也很难优化重组反应。于是，美国艾默里大学生物化学系的 Anton V. Bryksin 和 Ichiro Matsumura 开发出一种 PCR 介导的克隆方法-重叠延伸 PCR 克隆( Overlap extension PCR cloning )，相当简单且可靠。

克隆过程如下：一开始用嵌合体引物进行 PCR 扩增，产生了线性的插入片段，且片段两端都有载体序列。然后将载体和插入片段混合，变性并退火，随后将载体作为模板，用 Phusion DNA 聚合酶延伸杂交后的插入片段，直到聚合酶到达插入片段的 5' 端。在几轮 PCR 循环后，反应的终产物是带有两个缺口(每条链一个)的双链融合质粒。利用 *DpnI* 限制性内切酶消化，除去母板质粒，新质粒则转化到大肠杆菌中，DNA 修复酶将缺口封住。

研究人员在反应中使用的是 NEB 公司的 Phusion DNA 聚合酶，他们认为这很关键，因为此酶保真度高，且不拥有链置换活性。研究人员还比较了五种不同的 DNA 聚合酶，认为这个最好。反应中只需要 DNA 聚合酶，而不再需要操作多个限制性内切酶、重组酶、连接酶和糖基化酶等。

在原理验证的实验中，研究人员首先克隆了 *gfp*。他们认为，高浓度的插入片段和相对低的退火温度 (比计算出的退火温度低 5-10°C) 对于高效的重叠延伸是很重要的。转化后的重组子有 98% 以上呈绿色，说明克隆错误和原始载体的残留极低。

研究人员还比较了 PCR 循环数对克隆效率的影响。他们发现：在最初 15 个循环，重组克隆数量不断增加，在 17-18 个循环达到高峰。之后的循环导致克隆数量略微下降。随后，他们还比较了三种不同的载体：插入片段比例 (1: 5、1: 50 和 1: 250)。他们发现，1: 250 的比例产生了最多的重组克隆。

他们应用这种克隆方法克隆了 4 个基因：*gfp* (1 kb) 、 *gusA* (1.9 kb) 、 *lacZ* (3.2 kb) 和整个 *luxABCDE* 操纵子 (6 kb)。他们利用限制性酶切分析和报告蛋白功能来验证了所有重组质粒的正确结构。此方法的错误率低于 3%，而与片段大小无关。不过，研究人员观察到，随着片段长度的增加，转化后的克隆数量下降。曲线图暗示插入片段的上限是 6.7 kb。 (生物通 薄荷)

原文检索：

**Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids**

BioTechniques, Vol. 48, No. 6, June 2010

# 神奇的样品处理器助你纯化蛋白

一提到蛋白纯化，大家的感觉都是累啊，耗时耗力。Life Technologies 公司近日推出了一款神奇的样品处理器——MAGic™ Sample Processor，能将你从繁重的劳动中解放出来。你有没有想过在实验室例会之前启动蛋白纯化，而在结束之后去取出洗脱后的样品？一切听上去都是那么神奇！



MAGic™ Sample Processor 采用的是 Dynabeads 磁珠分离和微流体技术。这两种技术碰撞形成的火花是只要按下一个按钮，就能获得更干净的样品，更低的背景和改善的反应动力学。微流体技术让仪器能够处理少量的样品，这样珍贵的样品不会损失。仪器还带有加热/冷却功能，蛋白降解的几率更小。

手动操作实验时，实验之间的差异不可避免。MAGic™ Sample Processor 最多能平行处理 12 个样品，从而减少了因操作员移液，缓冲液制备和操作而引起的差异。每个夹盒 (cartridge) 容纳了 Dynabeads 及预混合的溶液，你只需加入 1 mL 样品，然后按“Run”就行了。

有了独特的夹盒系统，你就可以随心所欲地开展实验了。只有一个样品，那就用一个。有 12 个样品，那就用 12 个。想从 IP 转换到 ChIP，也没问题。需要快速分离重组蛋白？那就试试 MAGic™ His-tag 试剂盒吧。

Invitrogen 的仪器向来以简单易用取胜，MAGic™ Sample Processor 也不例外。打开盒子，取出仪器，读一读快速入门指南，只要 10 分钟你就能开始运行了。操作界面也很简单，让你选择合

适的实验条件，包括结合时间、结合温度和洗脱条件。你能将操作步骤保存下来，以便下次使用。当然，你也能通过 USB 接口将操作步骤导出到电脑上。

目前表达的重组蛋白中，His 标签蛋白可能占了大多数。对于 His 标签蛋白的纯化，MAGic™ Sample Processor 给出了最为简便的方案。你只需加入 1 mL 组织或细胞的裂解液，再不需要其它任何物质，就能在一小时内获得最多 80 µg 纯化蛋白。

MAGic™ Sample Processor 还能进行免疫沉淀 (IP) 和染色质免疫沉淀 (ChIP) 的样品制备。IP 的样品制备也只需加入细胞裂解液和抗体，再选择洗脱条件。ChIP 的操作步骤被公认为繁琐、耗时，且差异大。MAGic™ 仪器将免疫沉淀和核酸捕获这两部分都自动化。加入 50 µl 裂解液后，样品交联，染色质被打断，之后是免疫沉淀和 DNA 纯化，这一切都由 MAGic™ Sample Processor 自动完成，你只需取出纯化后的 DNA，就能进行下游的 PCR 或测序分析。这样，至少能节约 1 天的时间。

一切看上去都很神奇吧。这就是 MAGic™ Sample Processor。Invitrogen 曾在 2008 年表示将会致力于小型仪器的开发，看来确实如此。我们看到了越来越多的仪器上市，比如 Neon 转染系统，iBlot 转印仪，以及现在的 MAGic™ Sample Processor。不过，这样一台自动化的仪器，价格一定不便宜吧。（生物通 余亮）

[索取详细资料及报价！](#)

# 优于芯片的数字基因表达谱技术

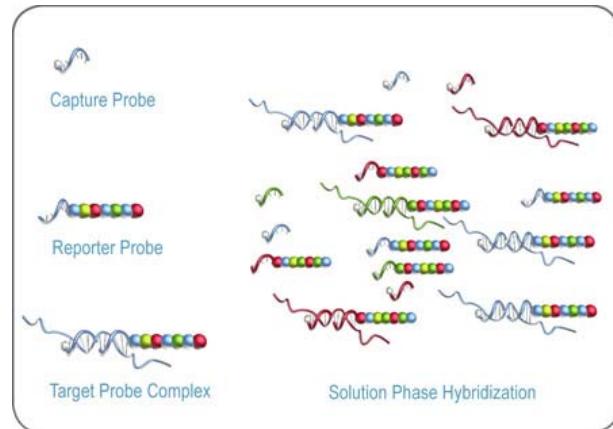
NanoString，一家名不见经传的小公司，但是它的技术却不容小觑。2008 年 3 月，《Nature Technology》杂志曾以封面文章的形式报道了 NanoString 的数字基因表达谱技术，可见其非同一般。生物通这就带大家走近这家公司，走近它的独特技术。

NanoString 技术最早诞生于著名的 Leroy Hood 博士创立的系统生物学研究所（Institute for Systems Biology, ISB）。当时，安贝尔•拉特克利夫（Amber Ratcliffe）、克拉申•季米特洛夫（Krassen Dimitrov）和德韦恩•达纳韦(Dwayne Dunaway)正在 ISB 学习和工作。拉特克利夫 2001 年离开去攻读工商管理硕士。但在离开之前，当时管理基因芯片实验室的季米特洛夫产生了关于分子条形码的点子。在季米特洛夫和达纳韦在实验室进行“原理验证”的同时，拉特克利夫以季米特洛夫的技术为基础准备了一份商业计划书，并把这份计划书作为其 MBA 课业的一部分。接著，她参加了一些全国性的商业计划书竞赛。在西北大学举办的竞赛中，她的计划书被评为“最佳高增长商业计划书”。在三次竞赛中，她一共赢得了 4.6 万美元。此外，这些年轻人还得到了来自 OVP Venture Partners（一家在西雅图非常知名的风险投资商）提供初始投资的承诺。很快，他们就得到了 800 万美元的风险投资，于是 NanoString 公司就成立了。

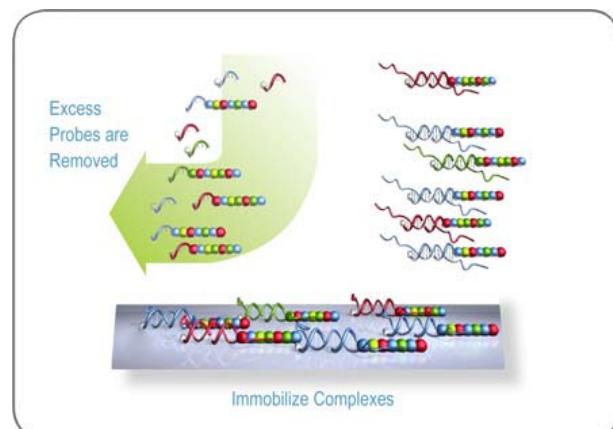
NanoString 的核心技术是 nCounter 分析系统，它运用了一种全新的分子条形码技术，对基因表达进行直接的多重测定，且具有极高的灵敏度和精确度。该技术应用分子条形码和单分子成像来检测并计数单个反应中的几百个转录本。该系统包含了一个全自动的样品制备工作站（sample prep

station）、一个数字分析仪（digital analyzer）、CodeSet（分子条形码）及其它试剂。

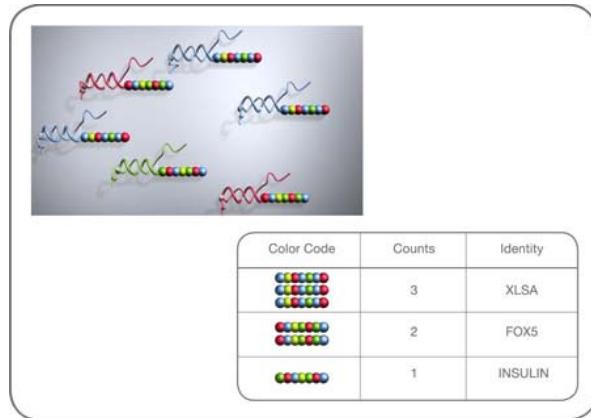
nCounter 技术原理如下：



1. NanoString 的技术采用两条长度约为 50bp 的探针与 mRNA 进行杂交。报告探针 (reporter probe) 携带信号；捕获探针(capture probe)用于杂交后的复合物固定，以供数据采集。



2. 杂交后，样品被转移到样品制备工作站，在那里过量的探针被洗掉，而探针和目的 mRNA 的复合物则被固定到 nCounter 的样品夹上。



**3. 将样品夹放置到数据分析仪上进行数据采集。样品夹上不同的颜色编码数将被计算出来，并代表每一种目的分子的数量。**

nCounter 分析系统无需使用酶，也不需要进行 PCR 扩增，从而减少误差的产生，因而在表达谱分析领域非常有优势。它能够高度灵敏地检测并定量多种样品类型的基因表达，包括纯化的总 RNA、细胞和组织裂解液、提取自 FFPE 样品的 RNA 以及血液。

根据那篇发表在《Nature Technology》的文章，其中将此平台与芯片、TaqMan PCR 和 SYBR Green 定量 PCR 进行了比较，发现 nCounter 系统比芯片更为灵敏，与实时定量 PCR 的灵敏度相似。研究证明 NanoString 技术在所有转录本水平的基因表达模式与实时定量 PCR 有着极佳的关联。

除了基因表达分析，NanoString 最近还推出了 miRNA 表达分析试剂盒。研究人员能在单碱基分辨率上开展多重的 miRNA 检测，而不需要 PCR 扩增。据 NanoString 介绍，研究人员能够对 700 余种人和人-病毒 miRNA 进行图谱分析，其灵敏度和特异性与 qPCR 相当，而价格却更为便宜。除了 miRNA 分析，该公司还在开发拷贝数变异分析。

NanoString 公司位于美国西雅图，目前在中国还没有设代理商或分支机构。如果你对它的技术感兴趣，可以访问 [www.nanostring.com](http://www.nanostring.com)。（生物通 余亮）

# ABI 推出第七代实时定量 PCR 仪

Life Technologies 公司近日宣布，实时定量 PCR 仪家族再添新成员，Applied Biosystems ViiA™ 7 实时定量 PCR 仪即将在 6 月上市。这款新的定量 PCR 仪无缝整合了多种定量 PCR 和基因分型应用，能够让研究人员进入高产率 PCR 的新时代。

ViiA™ 7 实时定量 PCR 仪没有延续以往 7500、7900 等定量 PCR 仪的名称，而是单名一个 7，且 Vii 也是罗马数字的 7，寓意为全新的第七代实时定量 PCR 系统。自 14 年前 Applied Biosystems 首次推出定量 PCR 仪以来，研究人员已经发掘出定量 PCR 的多个应用，越来越深入地了解疾病的分子基础。以六代实时定量 PCR 系统的金标准设计元素为基础，ViiA™ 7 实时定量 PCR 系统能让您更轻松获得所需的高质量结果。

ViiA™ 7 实时定量 PCR 系统综合了您所期望的高性能定量 PCR 仪的所有特征，这样您就能优化您的研究产率。有了简化的流程，直观的软件，触摸屏界面和一键式操作让失误降至最低，ViiA 7 系统提供了出色的重复性，不同孔之间、不同仪器之间的差异极小。另外，ViiA 7 与任何标准或快速循环 384 孔或 96 孔板及 TaqMan® 阵列微流体卡片和试剂完全兼容，让高产率实时定量 PCR 在任何规模的实验室均可实现。

ViiA™ 7 系统特有全新的 OptiFlex™ 系统，它提供了增强型荧光检测，实现了准确而灵敏的数据分析。高分辨率检测系统为 TaqMan® 阵列微流体卡片、384 孔板和 96 孔板带来了更为准确的读数。6 个去耦的激发滤片和发射滤片通道带来最大数量的染料组合和最大的多重分析能力。多个倾斜方

法检测形式为倾斜阶段的数据收集提供了更多的灵活性。

ViiA 7 系统的软件整合了标准的定量 PCR 应用，如核酸定量、SNP 的检测和拷贝数变异检测，还包含了高分辨率熔解、蛋白分析，以及跳过 RNA 纯化，直接在培养的细胞中进行基因表达分析。

ViiA 7 系统在实用性上也有提升，让研究更高效、更经济。轻松识别的图标通过流程指导您准确无误地设置运行和分析实验。图形界面让编辑 PCR 热循环条件很轻松。有了 ViiA™ 7 软件仪器控制台，您能检查运行状态，并从您的台式计算机实时远程控制最多四台仪器或实验。当您不在实验室时，您还可以收到电子邮件通知，告知您运行和仪器状态。

ViiA™ 7 实时定量 PCR 系统体现了 ABI 让定量 PCR 更轻松更高产量的承诺。有了全面的整合，仪器、软件、试剂及即用型分析这一切的通力合作，带来了您所需的一致可靠结果，以加速您的研究。

关于 ViiA™ 7 实时定量 PCR 系统或我们任何定量 PCR 产品的更多信息，请访问 [www.appliedbiosystems.com/viia7](http://www.appliedbiosystems.com/viia7) 或 [点击此处索取资料](#)。

(生物通 余亮)

# Promega 定量 PCR 系列产品上市，更强更亮更灵敏

Promega (普洛麦格) 的逆转录酶因质优价廉，一直以来颇受用户的欢迎。近日，它的 RT-qPCR 家族又有几位新成员闪亮登场。现在，我们就让它们一一亮相。

当当当当，第一位是 **GoScript 逆转录酶**。它是专为 qPCR 设计的，利用 M-MLV 和先进的缓冲液技术获得均衡稳定且可靠的 cDNA 合成结果，适合各种大小范围的低丰度和高丰度的转录子，即使存在抑制剂也不受影响。GoScript 的活性超高 (ultra-active)，Promega 称之为每一管反应都在省钱。

经过 Promega 的验证，GoScript 能够成功逆转录长度达 8.9 kb 的结肠腺瘤样息肉基因 (APC)。而且，与市面上几种畅销的逆转录酶相比，GoScript 逆转录酶在乙醇存在时能力下降最小，抗干扰能力最强。详细的对比研究报告请看 Promega 最新一期的电子期刊。GoScript 逆转录酶的价格为 100 个反应 5000 元，平均每个反应为 50 元，价格也是火辣辣的。

第二个上场的是 **GoTaq qPCR Master Mix**，严格地说，它不算最新产品，因为它在去年 8 月份上市。GoTaq qPCR 的特点在于使用了一种不同于 SYBR Green I 的荧光染料。这种新型染料通过与双链 DNA 结合，能够得到比 SYBR Green I 更明亮的信号，对 PCR 抑制剂的抗性也更强。这意味着即使目的基因的表达水平较低，也能获得出众的扩增结果。因此，使用新型的 GoTaq qPCR Master Mix 能够比 SYBR Green I 更早地获得循环阈值。

GoTaq qPCR 反应体系的组装与 SYBR Green I 相同，循环条件和检测通路也相同。GoTaq qPCR Master Mix 本身含有低水平的参比染料 (CXR)，检测 CXR 所使用的滤光片和仪器设置与 ROX™ 相同。此外，GoTaq qPCR Master Mix 可以用于任何能够检测 SYBR Green I 或 FAM™ 染料的实时定量 PCR 仪。

此外，GoTaq qPCR Master Mix 在室温和高温时都具有很高的稳定性，这一特点使之成为自动化应用的理想选择。在室温中放置 24 小时后，它仍然保持稳定。GoTaq qPCR Master Mix 的目录价为 2480 元/200 次反应，单次反应的价格为 12.4 元，如果碰上促销则更划算。

上面二者的结合，就诞生了 **GoTaq 2-step RT-qPCR System**。GoTaq 两步法 RT-qPCR 系统将 GoScript 逆转录酶的超强活性和 GoTaq qPCR Master Mix 的超强荧光亮度组合在一起，可对各种长度的 RNA 靶标进行优质、灵敏的定量检测。

Promega 的 RT-qPCR 新产品已经悉数登场了。如果您近期正欲开展逆转录、定量 PCR 实验，那不妨 GoGoGo，试试这些新产品吧。如果需要更详细的资料，[欢迎索取](#)。

(生物通 余亮)

# 分离调节性 T 细胞的利器

调节性 T 细胞 (Treg) 是抑制性 T 细胞的一种功能亚群。它们抑制了不需要的免疫反应，有可能在自体免疫疾病、癌症的治疗以及器官移植中发挥重要作用，因此也就成了目前研究的热点。

过去，由于 Treg 细胞表面缺乏特异的细胞表面标志物，且这些细胞在外周血中的频率低，Treg 的分离就成了一件困难的事情。过程漫长，且效率不高。然而，Treg 研究领域发展迅速，人们不断发现新的细胞表面标志物，将 Treg 与其他类型的 T 细胞区分开。这些标志物让 Treg 细胞的分离逐渐改善。最近上市的一些新产品或许能加速 Treg 的分离和纯化。

对于细胞分离，磁珠和抗体是最常见的选择。拥有金标准 MACS 技术的美天旎公司近期推出了两款 [Treg 分离试剂盒](#)，分别为 CD4+ CD25+ CD127dim/- Regulatory T Cell Isolation Kit II 和 CD25+ CD49d- Regulatory T Cell Isolation Kit。

CD4+ CD25+ CD127dim/- 调节性 T 细胞的分离是利用生物素化的抗体混合物和抗生物素的磁珠来进行的，分离过程中去除了非 CD4+ 和 CD127high 细胞，随后用 CD25 MicroBeads II 进行阳性筛选。CD127 是 IL-7 受体的  $\alpha$  链，它表达在大多数成熟 T 细胞上，且在增殖和分化中扮演了重要角色。然而，在调节性 T 细胞上，CD127 缺失。因此，CD127 可以作为另外的标记物，来区分人调节性 T 细胞和激活的 T 细胞。

CD25+ CD49d- 调节性 T 细胞的分离分为两步。首先，CD8+ 和 CD49d+ 细胞经过磁性标记，之后去除。其次，CD49d- 调节性 T 细胞被 CD25 磁珠标记，然后通过阳性选择而分离。第一步的去除除了污染的 CD25+ T 细胞，从而提供了高纯度的调节性 T 细胞。

StemCell 公司则综合了两个细胞分离平台——RosetteSep 和 EasySep，整合成完整的 Treg

分离试剂盒。Treg 细胞的分离分成两步，在 RosetteSep 上通过阴性选择预富集细胞，接着在 EasySep 上阳性选择 CD25+ 细胞。从全血或 buffy coat 中获得纯的 Treg，整个过程仅需要三个小时。这种不需要柱子的试剂盒使用简单，对细胞也很“温柔”，获得的 Treg 细胞能立即用于下游分析。

StemCell 上个月还发布了两款高效分离 Treg 细胞的试剂盒，分别为 the Complete Kit for Human CD4+CD127lowCD25+ T Cells 及 the Complete Kit for Human CD4+CD127lowCD49d-CD25+ T Cells。这两款试剂盒与上面美天旎的试剂盒原理类似，也是基于 CD127 的低表达，及 CD49d 的不表达。

也许你担心细胞上的磁珠或抗体可能会干扰下一步实验。Life Technologies 则提供了一种方案，能够分离出不带磁珠或抗体的人 CD25hiCD4+foxP3+ Treg 细胞。分离过程分为以下几步：首先从 PBMC 中阴性分离出 untouched 的人 CD4+ T 细胞，然后在这个细胞亚群中阳性选择出 CD25+ 的 T 细胞，再利用 DETACHaBEAD 从 CD4+CD25+ Treg 细胞中去除磁珠。

来自 Life Technologies 的科学家 Karoline Schjetne 表示：“有了这个产品，你就能同一个起始材料中分离出效应 T 细胞和调节性 T 细胞，用于抑制分析或扩增。”

在不久的将来，潜力巨大的 Treg 细胞将用于多种临床试验，比如自体免疫疾病、器官排斥等。如何将 Treg 细胞的分离与扩增与临床应用结合起来，这或许是研究人员面临的最大挑战。

(生物通 余亮)

# Nunc 发布体外受精新产品

赛默飞世尔科技旗下的细胞培养产品供应商 Nunc 近日发布了几款新产品，用于体外受精（IVF）。这几款产品分别为：Nunc IVF ICSI dish、IVF CenterWell petri dish、IVF 11ml 离心管和 IVF 1.8ml 冻存管。这些产品都经过 CE 认证，且通过小鼠胚胎分析（MEA）的检验。

除了这些新产品，Nunc 的体外受精产品还包括 IVF 四孔板、IVF 3.5 cm 培养皿、IVF 6.0 cm 培养皿和 IVF 9.0 cm 培养皿。所有这些体外受精产品都经过了最高标准的检验，并经过严格的质控，能带来一致的实验环境和可靠的结果。

作为重要的体外受精耗材，培养皿必须是无菌且无毒的，以确保最优的实验环境。这些培养皿设计有平坦的底部，以便传热最佳，确保维持了细胞生长所需的适当温度。Nunc ICSI dish 适合胞浆内精子注射步骤，它为体外受精提供了一个无毒素的环境。

Nunc 的耗材都经过小鼠胚胎分析的检验和认证，除此之外，新的 Nunc IVF 管还经过人精子存活分析的检验。这种高水平的检验确保它们适合体外受精，包括男性配子的储存。

体外受精新产品的表面未经任何处理。至于未处理的理由，Nunc 在网站上给出的解释是，细胞培养处理（表面的物理激活）不会对 IVF 产品有积

极影响。我们希望排除任何污染及性能差异的理论风险。

在 Nunc 的网站上还列出了一些关于体外受精产品的常见问答，感兴趣的用户可访问 <http://www.nuncbrand.com/en/page.aspx?ID=11386> 或 [点击此处索取资料](#)。

Thermo Scientific Nunc 产品线涵盖整个生命科学领域，其中细胞培养系列，酶标系列，细胞工厂系列和冷冻保存系列已经成为生命科学用户及生物制药用户的首选。Nunc 于 1953 年在丹麦建厂，一直致力于生产高科技含量，高品质保证的的实验耗材以满足生命科学研究者及生物制品生产厂家的不同需要。同时，也为全球知名的疫苗生产厂商和体外诊断试剂生产厂商提供高品质的塑料产品。质量贯穿于 Nunc 产品生产的每一个环节，产品全部符合美国 GMP 对医疗器械生产的质量标准。

（生物通 余亮）

# 美天旎发布新一代的 T 细胞分离试剂盒

生物通报道，德国美天旎公司近日发布了三个小鼠 T 细胞分离试剂盒，能从脾脏和淋巴结中分离 CD4+、CD8a+ 及全部 T 细胞，且目的细胞未标记任何东西，保持未触碰（untouched）的状态。

**CD4+ T Cell Isolation Kit II** 适合从小鼠脾脏细胞或淋巴结细胞悬液中分离 CD4+ T 细胞。利用生物素标记的抗体以及抗生物素的磁珠，间接标记非目的细胞，包括细胞毒性 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、树突状细胞、巨噬细胞、粒细胞等。这两个标记步骤之间不需要洗涤。之后将 MACS 柱放置在 MACS 分离器的磁场中，这样，磁性标记的非目的细胞保留在柱中，而未标记的 CD4+ T 细胞流出柱子。整个过程在 45 分钟内即可完成。

**CD8a+ T Cell Isolation Kit II** 能够从最多 109 个细胞中 CD8a+ T 细胞。它的分离原理与步骤同上面的 CD4+ T 细胞相似，只是抗体混合物有所不同。这个抗体混合物包含了针对 CD4、CD11b、CD11c、CD19、CD45R (B220)、CD49b (DX5)、CD105、Anti-MHC-class II 及 Ter-119 的抗体。**Pan T Cell Isolation Kit II** 则能去除掉所有非 T 细胞，且抗体混合物经过改善，让目的细胞的纯度更高。

未触碰的 T 细胞可用作功能研究，比如过继转移实验、T 细胞增殖分析、与树突状细胞共培养及细胞因子分析。分离后的 T 细胞可进一步磁性分离成 T 细胞亚群。

对于人调节性 T (Treg) 细胞的分离，美天旎也推出了多款试剂盒，包括 CD4+ CD25+ CD127dim/- Regulatory T Cell Isolation Kit II 和 CD25+ CD49d- Regulatory T Cell Isolation Kit。

CD4+ CD25+ CD127dim/- 调节性 T 细胞的分离也是利用生物素化的抗体混合物和抗生物素的磁珠来进行的，分离过程中去除了非 CD4+ 和 CD127high 细胞，随后用 CD25 MicroBeads II 进行阳性筛选。CD127 是 IL-7 受体的  $\alpha$  链，它表达在大多数成熟 T 细胞上，且在增殖和分化中扮演了重要角色。然而，在调节性 T 细胞上，CD127 缺失。因此，CD127 可以作为另外的标记物，来区分人调节性 T 细胞和激活的 T 细胞。

CD25+ CD49d- 调节性 T 细胞的分离分为两步。首先，CD8+ 和 CD49d+ 细胞经过磁性标记，之后去除。其次，CD49d- 调节性 T 细胞被 CD25 磁珠标记，然后通过阳性选择而分离。第一步的去除除掉了污染的 CD25+ T 细胞，从而提供了高纯度的调节性 T 细胞。

围绕着各种 T 细胞的分离及扩增，美天旎还有多种产品提供，如需更详细的资料，请[点击此处索取](#)。

(生物通 余亮)

# 移液无止境，Eppendorf Research plus 移液器上市

从 1961 年推出第一支工业化的气体活塞式移液器至今，Eppendorf 公司秉承近 50 年的生产经验和坚持高品质的执着，不断创新研发，旨在为全球科研临床用户提供最完美的移液器。近日，Eppendorf 移液器家族的新成员 Research plus 移液器全面上市！其卓越的人体工程学设计、广泛的应用范围以及高品质的工艺流程，为移液器行业建立了新标准！

移液操作虽不复杂，却也是个体力活，特别是在高通量应用中。一旦手酸胳膊疼，移液的准确度和精确度就很难保证了。Eppendorf 于 2003 年提出 PhysioCare 理念，提倡改变移液方式，关注人体健康。Research plus 移液器继承了这一理念，对设计构造进行了更为细致精密地改进。

Research plus 移液器轻巧耐用，即使长时间使用也不易疲乏。各项操作用力均降至最低，减少手指、手臂、肩膀等部位的用力，有效防止手部重复性劳损。其前端的吸嘴具有伸缩性，不但可使安装和脱卸吸头更加省力，还能保证吸头和移液器之间的气密性。尤其对于多道移液器，可以保证吸头位置一致，确保移液一致性。此外，体积调节旋钮转动圈数少，仅需数圈即可从最小体积调节到最大体积。你看，考虑得周到吧。



Research plus 移液器采用高科技材质，耐化学腐蚀、抗高温，同时，可以整支高温高压灭菌和紫外灭菌。独有的密度调节功能，可使 Research plus 移取与水密度不一致的液体。移液器的拆卸和维护也非常便捷。多道移液器可手动调节满足不同耗材的孔距。

## [点击索取Research plus移液器的报价](#)

现在，为庆祝 Research® plus 移液器的上市，Eppendorf 公司推出限时刮刮卡抽奖活动。您只需访问 [www.eppendorf.cn/win](http://www.eppendorf.cn/win)，登录您的 ep-points 账户，输入刮刮卡密码，就能赢取丰厚奖品。

移液过程光靠移液器可不行，吸头也很重要。现代实验室操作，经常需要移取含去垢剂的溶液样品。溶液较低的表面张力会对液体流动和进样量产生很大影响，导致难以使用此类样品完成高重复性的工作。

Eppendorf 全新 epT.I.P.S. LoRetention 吸头独有的高品质材质可以保证最大的样品回收率，显著提高实验的可重复性和灵敏性。使用此吸头移取含去垢剂溶液时，气泡明显减少。同时，epT.I.P.S. LoRetention 吸头表面未经硅化处理，不含添加剂，因而不会污染样品。在进行灵敏的实时荧光定量 PCR 操作时，可以明显提高实验的可重复性，最高可节省 5% 的昂贵试剂用量。

(生物通 余亮)

# 如何挽救 Western 阴性结果

Western blot 是最常用的实验方法，但意义并不寻常，其结果的有无往往决定着下一步实验的走向。当您辛辛苦苦地花费近两天时间提蛋白、电泳、转印、杂交之后，显色时却得到了“白板”一块，伤心沮丧之时，千万不要轻言放弃！请务必先试试我的建议：

1. 打开冰箱，看看有没有其他显色试剂
2. 走进隔壁，换换其他实验室的成像仪器

——也许，惊喜便这样悄然而至，幸福就在那转角处！

对实验而言，幸福各有不同，而不幸往往相似。这一切都是由于那该死的“灵敏度”！

最初的沮丧和险些的错过，并不完全是您的过错。千万别被实验折磨之余，再背负太多的自责，因为原因有很多。

## 1. 敌人太过狡猾

您研究的对象是蛋白质，这个敌人可不简单。其表达丰度变化跨度极大，据估计有 10<sup>6</sup> 之巨。不仅如此，真正执行功能的蛋白，其表达量往往极微，些许的丰度变化就能带来生命现象的斗转星移。面对这样的复杂而狡猾的蛋白质，我们却罕有大规模杀伤性武器，既没有 PCR 般的扩增技术，也没有成熟的测序方法。无奈，依靠印迹这个还算特异性好的常规武器，其杀伤力又往往受制于仪器和试剂。

## 2. 试剂良莠不齐

说到试剂，国产、进口，那叫一个林林总总，价格差别也很大。很多实验室老板“买得起马，配不起鞍”，最终选择便宜的试剂，当然，并不是便宜没好货，只是更多的时候，是一分钱一分货。殊

不知这一省，就省掉了一两个数量级的灵敏度差异。

## 3. 仪器表现迥异

我们科研工作者，多为生物学出身，对仪器硬件、光学电学有着天然的不亲近感。购买仪器时，更是坠入了诸多参数的谜团，面对几十项不知所云的陌生数字，最终要么是举手投降，简单地 copy 了其他实验室的选择；要么是眉毛胡子一把抓，本着“一个都不能少”的原则，教条地比较每一项参数，最后费尽心力地选他个所谓的“最好”。殊不知，参数有主次之分，其权重各异；即便参数相当，真真地做个对比实验，不同厂商的“最好”，也会比出个一两个数量级的灵敏度差别。因此，选择仪器时我个人认同那句话，“不认广告，认疗效”，也就是说只看关键指标，再加上实际使用效果的比较，相信错不了。

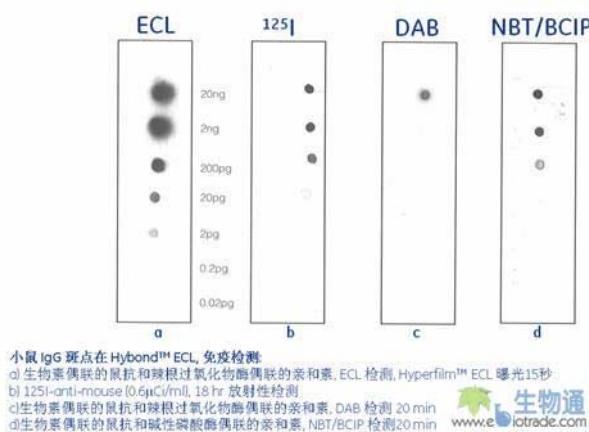
做蛋白的实验许多年，碰到过“白板”、比较过试剂，也选购过价格不菲的仪器，有些许的感受，这里和同行们做个分享。

### 1 选个灵敏的试剂

常用的 DAB、NBT/BCIP 等比色法，操作虽简单，不需仪器或胶片成像，但灵敏度和动态范围实在太差。用此法得到的阴性结果，绝对还有起死回生的余地。因此，最好选择化学发光或荧光的方法。

化学发光方法是由原 Amersham 公司发明并引入科研的，目前已经被广为使用。化学发光的灵敏度是比色法的 100-10000 倍，动态范围更是宽了 1-2 个数量级。之后不同厂家在此领域进行研发，经过底物的改良和试剂的优化，最终在灵敏度和持续发光时间上都有了显著的改善。选择高端试剂不仅可以提高一个数量级的灵敏度，还可使一抗的使用量降低到原来的 1/20。因此，在选择试剂的时候，要视情况而定，对灵敏度要求不高时，选用常规的试剂，经济实惠；但如果蛋白丰度低、一抗又极其珍贵，那就得毫不吝惜地选择高端试剂，要知道有时一抗是不可再生资源，那可是拿钱买不来的。

图 1：



如果再“不差钱”，还可以选择荧光，来个彩色 Western。结果好看在其次，关键是省事儿，目标蛋白和内参的杂交同时完成、成像一步到位。当然这是要付出经济代价的，荧光试剂可比 ECL 试剂贵不少。

## 2 选个可靠的仪器

随着 CCD 的发展，数码相机已经走进了每个人的生活，其便捷性已经促使我们告别了胶片时代。实验室也一样，做 Western 不用再费事地配显影液，不用在暗室小心地摆弄曝光夹。CCD 成像仪便可让一切变轻松，无需摸索曝光时间，只需把膜往里一扔，设定好时间间隔，仪器自动得到不

同累计时间的图像。我们要做的只是轻松地对着电脑，选择一张不明不暗、长相漂亮的图像就 ok 啦。

这事说着挺美，但是也得选个可靠的仪器才能实现，其中也有不少学问。这里先跟大家解释几个概念和参数：

### 何为 CCD？

CCD 可是个关键部件，没有它根本就不会有今天的数码成像。CCD 的全名叫“Charge Coupled Device”，说白了就是光信号的接收器，它能把光信号转变成电信号，最终变为我们数字化的图像。它的大小直接决定了图像的最高分辨率，也就是我们常说的几百万像素。CCD 可是个值钱的部件，面积大一点，价格没准会翻一番。

CCD 在成像仪中是非常重要的组成部分，在这个小小的器件上也有很大的技术革新，如让 CCD 像素做 45 度角的旋转，以便获得分辨率更好的图像等等。这类问题太专业，不是我们轻易可以理解的。因此在这个问题是，我的建议是“不求弄懂，只抓主流”，也就是认准的主流品牌，选择有研发和生产 CCD 能力的一线厂商的成像仪，如 Fuji、Kodak。道理很简单，自己给自己用的东西，肯定是质量又好又便宜。

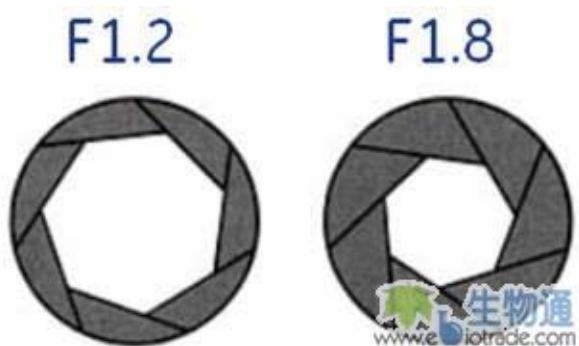
### 何为冷 CCD？

实验室用相机与家用相机不同，用到的是冷 CCD，也就是说需要给 CCD 降温到零下二三十度。这是为什么？原因有二，一是生物样本的发光量实在太少，信号太微弱，需要相对长的曝光时间；二是 CCD 等光电器件，都有不可避免的系统噪音，一旦曝光时间长，噪音累计起来，积少成多，会对本就微弱的样品信号造成干扰。而给 CCD 降温后，其系统噪音可大大降低。

### 何为 f 值？

对这个参数的深刻认识，得益于一次采购 Canon 单反镜头，同一系列 f1.2、f1.4、f1.8 的镜头，价格分别是人民币 14000、2500、700，这期间的巨大差别，当时绝对是“雷到”我了。回来后好好研究，才了解到这是一个表征镜头光圈大小的指标， $f$  值越小则镜头光圈越大，也就是说单位时间内进光量越大，镜头进光量与  $f$  值的平方成反。举个例子，f1.2 与 f1.8，虽然  $f$  值只小了 0.6，但是进光量面积却增加了一倍！(如图 2) 所以千万别小看了这个参数，它极大地影响着成像的速度和质量，怪不得不同参数的镜头价格，一个天上、一个地下。

图 2：



话说远了，回到成像仪上来。成像设备，镜头无疑是最重要的部件，而镜头的诸多参数中我认为这个最重要。因为刚才我们说到过，生物样本发光量低，为了能够检测到清晰的样品信号，我们连微小的系统噪音都得靠极端低温严加控制，那么对于最关键的采集信号的光学部件，这个参数的考量绝不能含糊！据我所知，目前化学发光成像仪最大的镜头是 f0.85，对于这种常用设备，千万别忽视了这个参数，否则发生之前提到的不幸一幕就不足为奇了。

综上所述，仪器一定要重视关键指标，试剂要低端高端择情选，不能“参数”渐欲迷人眼，“价格”障目不见山。最后，祝愿大家的 Western 实验都能获得漂亮的可喜的结果。

# 专家是如何富集低丰度蛋白的

## (一) (二) (三)

### 专家是如何富集低丰度蛋白的 (一)

鉴定与疾病相关联的蛋白难度颇高，因为样品中的少数几种高丰度蛋白在总蛋白中占了很大的比例。以临床研究中常用的血清和血浆为例，蛋白浓度范围跨越了 11 个数量级。而且，20 种最高丰度的蛋白占据了总蛋白量的 97-99%。如此一来，有价值的生物标志物就变得难以寻觅了。

如何打倒高丰度蛋白这个巨人，发现其身后躲藏的低丰度蛋白呢？Bio-Rad 公司开发出 ProteoMiner 蛋白富集技术，能够降低高丰度蛋白的水平，助您发现低丰度蛋白的秘密。关于此项技术，生物通之前曾做过详细报道，请看《[揭开低丰度蛋白的秘密](#)》这篇文章。如今，这项技术已经走向全球，应用在多个蛋白质组学实验室中。这一次，Bio-Rad 公司请来三位蛋白质组学方面的专家，谈谈他们是如何应用 ProteoMiner 技术的。

#### **Stefan Lehr 博士（德国）——发现糖尿病诊断的生物标志物**

德国糖尿病中心 30 多年来一直将最新的技术、研究行动与病人关怀融合，以求阐明疾病的方方面面。他们的目标是：了解疾病的生理机制，减少糖尿病相关的并发症，并改善患者的治疗。

正是这种从基础研究到临床应用的转化，吸引了 Stefan Lehr 博士在获得博士学位之后加入了该中心。Lehr 的研究生阶段是在科隆大学度过的，他的研究方向是信号转导和胰岛素受体的磷酸化。经过多年的锻炼，他对质谱、2-D 电泳以及亚细胞分部等复杂的实验室技术非常精通。Lehr 认识到 II 型糖尿病是一种发病率逐年提高的疾病，于是他建立了一个蛋白质组学实验室。

如今，Lehr 仍然在使用尖端技术来分析与 II 型糖尿病相关的蛋白模式。研究的一个方面是分析

人类血清样本，以了解疾病的分子发病机理。在使用 2-D 差异凝胶电泳时，他面临的干扰也是高丰度蛋白。“大的斑点遮蔽了小的斑点。传统方法需要好几步，有时可能会丢失蛋白，”Lehr 认为。

这个挑战激发了 Lehr 对 Bio-Rad ProteoMiner 蛋白富集技术的兴趣。之后，Lehr 就开始用人类血清来检验这项技术。初期检测表明人类血清也能进行蛋白质图谱分析。随后，研究小组设计实验，来评估重复性和变异性，以及与下游方法的兼容性。Lehr 强调关键是在重复性。

随着验证实验的成功完成，Lehr 计划将 ProteoMiner 蛋白富集技术融入他的流程之中，作为低丰度蛋白的一步分部法。他希望由此鉴定出 II 型糖尿病早期阶段的生物标志物。糖尿病的诊断通常是在发作几年后。Lehr 希望疾病的早期诊断能够预防相关的并发症，比如心肌梗塞和中风，并显著降低治疗的费用。（生物通 薄荷）

[点击索取ProteoMiner 低丰度蛋白富集系统的更多资料！](#)

### 专家是如何富集低丰度蛋白的 (二)

鉴定与疾病相关联的蛋白难度颇高，因为样品中的少数几种高丰度蛋白在总蛋白中占了很大的比例。以临床研究中常用的血清和血浆为例，蛋白

浓度范围跨越了 11 个数量级。而且，20 种最高丰度的蛋白占据了总蛋白量的 97-99%。如此一来，有价值的生物标志物就变得难以寻觅了。

如何打倒高丰度蛋白这个巨人，发现其身后躲藏的低丰度蛋白呢？Bio-Rad 公司开发出 ProteoMiner 蛋白富集技术，能够降低高丰度蛋白的水平，助您发现低丰度蛋白的秘密。关于此项技术，[生物通](#)之前曾做过详细报道，请看《[揭开低丰度蛋白的秘密](#)》这篇文章。如今，这项技术已经走向全球，应用在多个蛋白质组学实验室中。这一次，Bio-Rad 公司请来三位蛋白质组学方面的专家，谈谈他们是如何应用 ProteoMiner 技术的。

### **Jules Westbrook 博士（爱尔兰）——探究扩张性心肌炎背后的分子机制**

1997 年，蛋白质组学作为一个学科领域刚刚兴起，那时 Jules Westbrook 博士正在伦敦的布鲁内尔大学（brunel university）读书。Westbrook 在全球知名的心肺移植中心 Harefield 医院工作了 9 个月，在那里他意识到蛋白质组学在心血管疾病上的应用可能会彻底改变对心脏病的了解和治疗。毕业之后，Westbrook 加入了都柏林大学的移植蛋白质组学和神经蛋白质组学小组。

该小组的研究目标集中在了解心脏病中包含的分子过程，并鉴定出能作为诊断或预后的生物标志物或者治疗靶点。重点放置在会引起晚期心力衰竭的心脏病。Westbrook 表示他们对扩张性心肌炎特别感兴趣。

研究小组特别想了解患有扩张性心肌炎后，心脏的基因表达有何改变，并利用蛋白组学技术对正常和患病心脏进行了比较，鉴定出差异表达的蛋白。人血清、血浆和组织样品都是这些项目的主要研究材料。Westbrook 也表示，高丰度蛋白的遮蔽是很大的挑战。“目前也有一些方法来去除高丰度

蛋白，不过这种非特异性的结合也有丢失目的蛋白的风险。”

当 Westbrook 及其同事了解到 ProteoMiner 蛋白富集技术后，他们很渴望了解这项技术是否能高重复性地减低高丰度蛋白。Westbrook 谈到：“到目前为止，我们已经利用人血浆和血清检验了这个试剂盒。我们在比较了处理及未处理的样品后，印象极为深刻。”

结果清晰地显示，高丰度蛋白减少，低丰度蛋白得到富集。而且，重复性也得到验证。Westbrook 处理了同一样品的不同量，结果在 2-D 胶上产生了相同的蛋白图像，表明同一蛋白的保留程度相同。

研究小组正在对初步结果进行统计学分析，并将利用质谱来尝试鉴定新发现的斑点。Westbrook 认为，试剂盒将产生一些有趣的结果。

[点击索取ProteoMiner 低丰度蛋白富集系统的更多资料！](#)

### **专家是如何富集低丰度蛋白的（三）**

鉴定与疾病相关联的蛋白难度颇高，因为样品中的少数几种高丰度蛋白在总蛋白中占了很大的比例。以临床研究中常用的血清和血浆为例，蛋白浓度范围跨越了 11 个数量级。而且，20 种最高丰度的蛋白占据了总蛋白量的 97-99%。如此一来，有价值的生物标志物就变得难以寻觅了。

如何打倒高丰度蛋白这个巨人，发现其身后躲藏的低丰度蛋白呢？Bio-Rad 公司开发出 ProteoMiner 蛋白富集技术，能够降低高丰度蛋白的水平，助您发现低丰度蛋白的秘密。关于此项技术，[生物通](#)之前曾做过详细报道，请看《[揭开低丰度蛋白的秘密](#)》这篇文章。如今，这项技术已经走向全球，应用在多个蛋白质组学实验室中。这一次，

Bio-Rad 公司请来三位蛋白质组学方面的专家，谈谈他们是如何应用 ProteoMiner 技术的。

### Ben Herbert 博士 (澳大利亚) —— 探索无边界

Ben Herbert 博士的求学经历可有些与众不同。他最初毕业于一个专科学校，第一份工作是实验室技术员，负责检测新西兰食品行业的香肠含量。第一份工作及教育水平对与 Herbert 而言似乎已经足够了，直到他参与了一项鉴定食品蛋白的研究。这项研究突然激发了他对蛋白分离技术的兴趣，随后他继续求学，最终获得了生物化学博士学位。现在 Herbert 是悉尼科技大学蛋白质组技术中心的主任。

一开始当 Bio-Rad 让 Herbert 试试 ProteoMiner 蛋白富集试剂盒时，Herbert 显得颇不以为然。“我们并不是做很多血清和血浆的工作，我们只是试试它，验证它是否能行。”不过这些预实验的成功引起了他的兴趣，“我们还能用它做什么？”

很快，一项关于壁虱的研究成为了第一选择。这种小动物主要在澳大利亚的东海岸发现，别看它个头小，但它咬一口可能会引起瘫痪，甚至小猫小狗的死亡。研究使用的是饱食的壁虱。他们将它磨

碎，并将匀浆与 ProteoMiner 磁珠混合，从高丰度动物蛋白中分离出壁虱特异的蛋白。最终目标是分离并鉴定出壁虱在饱食与禁食下的蛋白含量差异，从而鉴定出引起瘫痪的蛋白。

在该中心的另一个实验室中，研究人员正在研究隐球菌 (*cryptococcus gattii*)，一种可能致命的真菌。研究正比较天然状态下发现的真菌蛋白与那些提取自感染的肺、肝和肾样品的蛋白有何差异。如果不使用 ProteoMiner 蛋白富集技术先处理一下组织样品，那么分离真菌蛋白将变得很困难。

对于蛋白质组技术中心来说，最大的挑战也许是利用 ProteoMiner 蛋白富集技术研究膜蛋白。这种研究的难点主要有两个，膜蛋白丰度极低，且它们是疏水的。Herbert 和同事使用增溶剂（甲醇和二硫醇）帮助溶解，然后利用 ProteoMiner 试剂盒捕获低丰度蛋白。据 Herbert 预测，大约 30% 的蛋白将是对细胞膜通透性很重要的蛋白。

### 结语

ProteoMiner 蛋白富集技术正在全世界的实验室中广泛使用。随着低丰度蛋白的不断发现，科学家人有望找到多种疾病的生物标志物。如果您也对 ProteoMiner 技术感兴趣，欢迎[索取详细的技术资料](#)。

# GPCR 研究方案-多样化的 HTRF 细胞平台

GPCR 的研究在药物研究领域中占有主导地位。Cisbio 为 GPCR 领域的实验优化、药物筛选提供了很多年领先的实验方案和良好的技术支持。目前 Cisbio 为 GPCR 研究提供的平台有：功能性实验平台，包括检测第二信使环化腺核苷一磷酸(cAMP) 和一磷酸肌醇(IP-1)，以及细胞水平的磷酸化 ERK 检测(Cell'ERK)；新的 Tag-lite™ 细胞表面受体研究平台，可用于检测 GPCR 的二聚化，同时这也是目前唯一的非放射性的配体结合实验方案，从而意味着 Cisbio 现在为 GPCR 药物研究领域的进展提供了先进的试剂和技术。

## 系列 (一) , cAMP 细胞水平检测

Cisbio 有三种试剂盒可用于检测 cAMP，这三种试剂盒都是采用了 HTRF 技术。而每一种试剂盒都是针对特定范围的 cAMP 浓度，从而确保了实验的灵敏度。这些试剂盒都适用于 96 孔，384 孔或者 1536 孔的细胞水平的药物筛选实验。



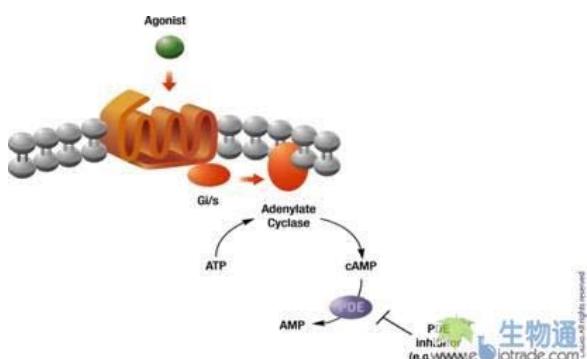
## 产品特点:

- 1, 适用于高通量筛选(HTS)的高效率的单板实验方案
- 2, 很低的假阳性和假阴性结果
- 3, 稳定的 EC<sub>50</sub>, 持续时间从半小时到 7 天
- 4, 实验体积可缩小到 10ul 以下
- 5, 新鲜细胞或冻存细胞都能使用

## 产品应用:

- 1, Gs 或 Gi 偶联受体
- 2, 激动剂和拮抗剂的筛选
- 3, 磷酸二酯酶(PDE)活性检测
- 4, 腺苷酸环化酶(AC)的活性评估

## 实验原理:

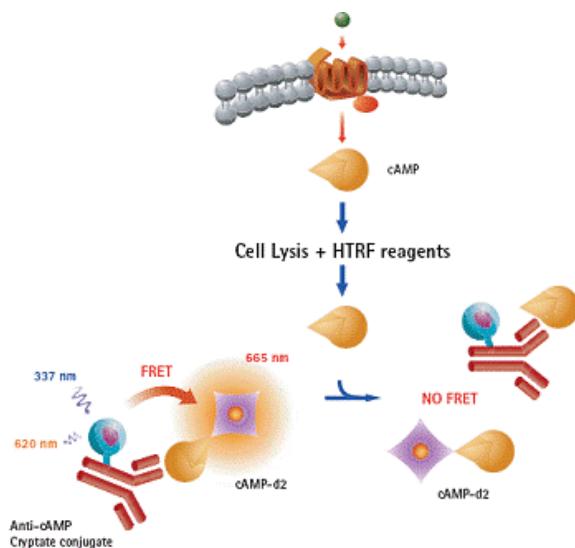


## IBMX: 3 Isobutyl-1-Methylxanthine

GPCR 同激动剂结合后会发生结构改变，从而活化腺苷酸环化酶 (AC)，进一步催化 ATP 生成 cAMP，同时 cAMP 又在磷酸二酯酶 (PDE) 作用下进一步降解成 AMP，而 IBMX 可以抑制 PDE 的活性，从而抑制 cAMP 降解成 AMP。因此可以通过在实验中加入 IBMX 检测累积的 cAMP 量，而 cAMP 的量可以直接反映化合物对 GPCR 介导的 AC 是活化还是抑制。

产品规格：

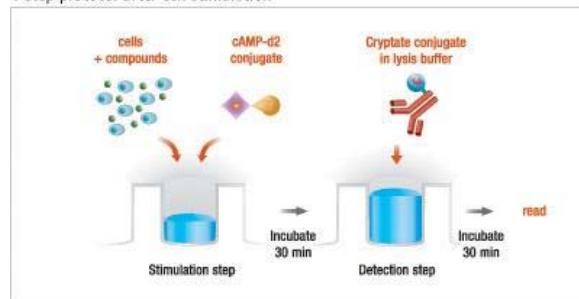
三组试剂盒涵盖了广泛的细胞水平的实验。



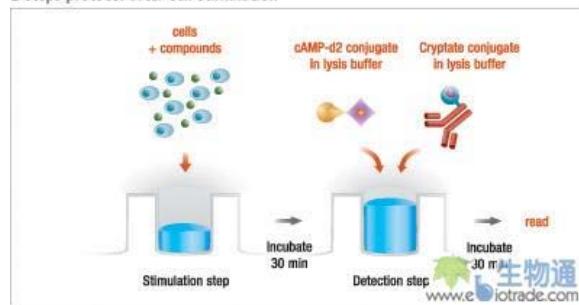
该试剂盒可直接对 cAMP 定量。其原理是基于 HTRF 技术。细胞所产生的 cAMP 和试剂盒所提供的标记了 d2 的 cAMP 之间进行免疫竞争抗 cAMP 抗体的抗原结合位点。当标记了铕或铽的单克隆抗体跟 d2 标记的 cAMP 结合后会有比较大的信号，随着细胞内产生的 cAMP 增多，信号逐渐减小。

为了满足各种自动化仪器操作，根据细胞活化后的步骤，每个试剂盒都提供了一步或两步加样方案。

#### 1 step protocol after cell stimulation



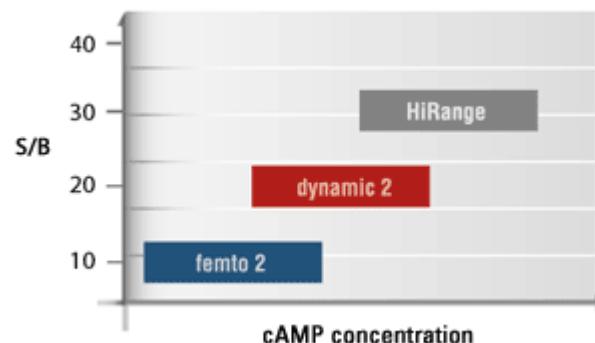
#### 2 steps protocol after cell stimulation



三组试剂盒涵盖了广泛的细胞水平的实验。

	Cryptate	S/B	EC20 nM*	EC50 nM*	EC80 nM*
cAMP femto 2 Kit	Eu <sup>3+</sup>	10	0.33	1.76	9.4
cAMP femto Tb Kit	Tb <sup>2+</sup>	10	0.33	1.76	9.4
cAMP dynamic 2 Kit	Eu <sup>3+</sup>	18	0.91	4.07	18.1
cAMP HiRange Kit	Eu <sup>3+</sup>	41	4.27	22.8	121

\* final cAMP concentration

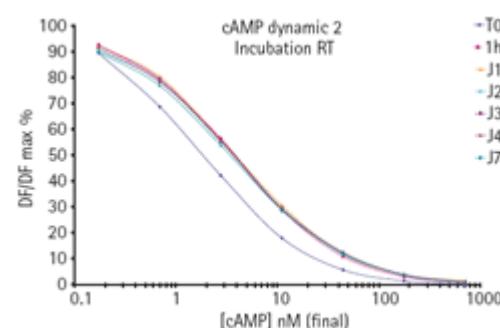



cAMP femto, 是最灵敏的 cAMP 试剂盒，目前有铕和铽标记的两种。这两种试剂盒都能检测到 28pM cAMP (0.6 fmoles/well in 20 $\mu$ l volume)。因而可以用很低的细胞密度，可以用 100 至 500 细胞/孔。

cAMP dynamic 2, 比较大的 cAMP 浓度检测范围，适合于大多数 Gi/s 实验。

cAMP HiRange, 拥有很大的信号-背景比值 ( $Z'>0.9$ )，适合于 HTS 和用制备的膜进行的实验。

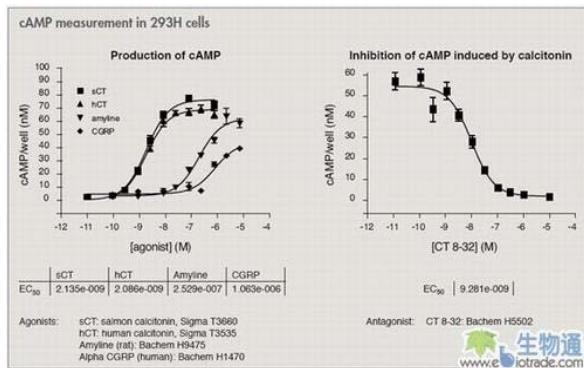
实验性能：



CHO-K1 cells were stimulated with Methylhistamine in the presence of 30  $\mu$ M forskolin (EC80). 20  $\mu$ l assays were performed in 384-well plates. Plates were read at times ranging from 1 hour to 7 days.

所有的 cAMP 试剂盒都不受培养基添加物如血清, 生物素, 有颜色的化合物的影响, 并且达到 5% 的 DMSO 耐受性。cAMP 实验可以采用新鲜的悬浮和贴壁细胞, 冻存细胞。用三种试剂盒测出的 IC<sub>50</sub> 在 7 天后依然很稳定, 这也是药物筛选中的一个显著优势。

#### 应用举例:



Identification of human endogenous calcitonin receptor in 293H cell by cAMP

四种激动剂和一种拮抗剂分别作用于降钙素受体 (Gs), 具体实验方法欢迎咨询 [shiyong.zhou@iba-group.com](mailto:shiyong.zhou@iba-group.com)

#### 订购信息:

所有的产品都包括 1000, 20000, 100000 test 的包装, 具体如下:

Description	Quantity*	Cat no.
cAMP <i>fermo</i> 2 kit	1,000 tests	62AM5PEB
	20,000 tests	62AM5PEC
	100,000 tests	62AM5PEJ
cAMP <i>fermo</i> Tb	1,000 tests	62AM7PEB
	20,000 tests	62AM7PEC
	100,000 tests	62AM7PEJ
cAMP <i>dynamic</i> 2 kit	1,000 tests	62AM4PEB
	20,000 tests	62AM4PEC
	100,000 tests	62AM4PEJ
cAMP <i>Hi/Range</i> kit	1,000 tests	62AM6PEB
	20,000 tests	62AM6PEC
	100,000 tests	62AM6PEJ

\* based on 20  $\mu$ l assay volume

作者: 谢兵, 周时勇

邮箱: [shiyong.zhou@iba-group.com](mailto:shiyong.zhou@iba-group.com),

[yin.zhou@iba-group.com](mailto:yin.zhou@iba-group.com)

# 5月冷泉港实验方案聚焦活体成像和农杆菌转化

5月号的冷泉港实验方案于近日发布。依照惯例，其中2个实验方案是供读者免费阅读的。第一个实验方案是由美国德克萨斯大学的学者们提供的，描述了非洲爪蟾胚胎的标记方法，以及用共聚焦显微镜对发育过程进行高放大倍数的时间延迟成像。第二个实验方案则描述了一种快速的农杆菌转化方法，用于瞬时的基因表达分析。

非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的胚胎是活体成像的理想模型。这种外表上发育的胚胎比内部发育的哺乳动物胚胎更适合活体分析，而且胚胎体积大，这让它们特别适合于组织水平的形态发生事件的时间延迟分析。此外，爪蟾胚胎中的单个细胞比脊椎动物模型中的细胞要大，这样也适合细胞行为和亚细胞过程的成像。爪蟾胚胎很容易进行基因功能的操作，比如 *knockdown* 和异常表达，即使是没有经验的研究人员，每天也能开展数百次操作。

尽管卵黄不透明可能会妨碍完整胚胎的深入成像，但早期胚胎的几乎所有细胞都能置于器官型培养，这样感兴趣的细胞能直接放置在盖玻片上。此外，固定组织的免疫染色和原位杂交也是活体成像技术的很好补充。本实验方案描述了爪蟾胚胎的标记方法，以及用共聚焦显微镜对发育过程进行高放大倍数的时间延迟成像。详细的实验步骤请点击标题链接。

## [High-Magnification In Vivo Imaging of \*Xenopus\* Embryos for Cell and Developmental Biology](#)

基因组测序已经鉴定出拟南芥及其他植物中多个基因。为了破译这些未知的基因功能，研究人

员开发出一些瞬时表达分析，作为转基因植物这个冗长过程的替代。在这些瞬时分析中，农杆菌介导的转化利用了农杆菌将外源 DNA 转移到带完整细胞壁的植物细胞的天然能力。不过，这种应用的成功例子不多，且可变性大。

在本实验方案中，美国田纳西大学的研究人员描述了一种快速的农杆菌介导的幼苗转化（简称 FAST）技术，用于瞬时的基因表达分析。在表面活性剂 Silwet L-77 存在的情况下，将植物幼苗与农杆菌共培养。幼苗很容易生长，且对农杆菌转化更为敏感。表面活性剂促进了植物细胞的转化。此方案提供了一种快速、高效且经济的植物基因功能分析，手工操作极少，且不需要复杂的设备。详细的实验步骤请点击标题链接查看。

[FAST Technique for Agrobacterium-Mediated Transient Gene Expression in Seedlings of \*Arabidopsis\* and Other Plant Species](#)  
[Fermentas顶级转染、逆转录试剂上市，索取试用装！](#)

# 赛默飞世尔以 2.6 亿美元收购 Fermentas

据来自美国纽约的消息，赛默飞世尔科技今天宣布它已经签署了最终协议，以 2.6 亿美元现金收购知名的试剂制造商 Fermentas 公司。

Fermentas 公司成立于 1975 年，其总部位于加拿大的安大略省，目前在全球拥有 9 家分支机构，雇员人数约为 500。2009 年，它的财政收入约为 5700 万加元（约合 5400 万美元）。

Fermentas 主要提供了核酸与蛋白纯化试剂、限制性内切酶与修饰酶、核酸与蛋白的分子量标准，以及其它的分子生物学研究工具。它还提供了逆转录、PCR 及定量 PCR 的多种试剂。因其产品质优价廉，在国内一直备受好评。该公司还于去年推出了一系列 FastDigest 内切酶，5-15 分钟内即可完成 DNA 消化。且所有酶切均使用同一种缓冲液，在同一个温度下完成，操作简单、快捷。

赛默飞世尔的总裁及 CEO- Marc Casper 表示，此次收购 Fermentas 将让赛默飞世尔更好地满足细胞及分子生物学家的需求，提供了完整的流程，能加速其研究和改善结果。此项交易预计在第

三季度结束，不会对赛默飞世尔 2010 年的财政收入产生实质性的影响。

今年 3 月，赛默飞世尔刚完成了对 Finnzymes 的收购。通过这次收购，赛默飞世尔增加了 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。

如今，这两家公司的收购，再加上赛默飞世尔最近发布的 Thermo Scientific Solaris qPCR 基因表达分析产品，一齐为客户提供了完整的解决方案。

美国投资公司 Thomas Weisel Partners 称此次交易为“相互促进的交易”，能提升赛默飞世尔在快速增长的 PCR 市场上的能力。

(生物通 余亮)

# 赶快申请 miRNA 研究课题基金吧

QIAGEN 在样品制备和下游分析技术上不断创新，即便是前沿的 microRNA 研究领域，QIAGEN 也提供全球领先的一整套实验方法，用于 miRNA 的差异表达和功能分析，这些先进的实验方法将推进人类对 miRNA 分子的探索。

为了激励国内的科研工作者在 miRNA 研究领域有更多的成果产生，QIAGEN 特别设立了“microRNA 研究课题基金”— **此项基金将资助两位研究人员价值各 15000 元的 QIAGEN microRNA 分析用试剂**，可从以下试剂中选择：



产品详细内容请点击进入>>

## “microRNA 研究课题基金”申请

请完整填写申请表，申请时间截止 6 月 30 日，  
QIAGEN 将在 7 月 10 日前通知获得资助的两位研

究人员，并订购其所需要的试剂，试剂金额以 2010 年 QIAGEN 网上公开价格为准。**其他所有申请者将获得精美纪念品一份。**



Swiss Wenger 背包



4G 迷你U盘



计时器

在 线 申 请 ， 请 访 问

<http://www.ebiotrade.com/custom/Qiagen/100426/index.htm>。

# NIH 新批准了 13 株干细胞系

美国国立卫生研究院 (NIH) 主席 Francis S. Collins 近日宣布, 该机构的 hESC 登记处新收录了 13 株人类胚胎干细胞 (hESC) 系, 围绕这些新批准的人类胚胎干细胞株系的研究也将获得联邦基金资助的资格。

在这 13 株人类胚胎干细胞系中, 有 4 株来自麦迪逊 WiCell 研究所。早在美国前总统布什执政期间, 这些细胞系就被批准用于 NIH 资助的研究项目, 但是它们没有包括在 NIH 的 hESC 登记处, 因为它们是去年创建的。这 4 株细胞系中的 2 株, 也就是 H7 和 H9, 已经在干细胞研究者中广泛使用。

其它的 9 株细胞系分别来自斯坦福大学 (1 株)、哈佛大学 (5 株) 和加州大学洛杉矶分校 (3 株)。到目前为止, hESC 登记处可获得联邦基金资助的细胞株已经达到 64 株。此外, 还有 100 株等待审批。

Collins 表示: “科学家们应该持续不断地开展研究工作, 我们保证这些宝贵的工作不会丢失。”

2009 年 3 月 9 日, 美国现任总统奥巴马在白宫签署行政命令, 推翻布什政府对联邦基金资助人类胚胎干细胞研究的限制。新政令允许联邦政府资助培育数以百计的新干细胞系, 而这类研究先前完全依赖民间资金资助。其后, NIH 制订了干细胞研

究的详细规范, 并于 2009 年 7 月 6 日公布了规范的最终版本, 对可以获得联邦政府资金资助的干细胞研究范围做出了界定。

尽管新政策带来了好消息, 然而, 美国一些干细胞库却面临倒闭。美国国立干细胞库 (National Stem Cell Bank, NSCB) 是在 2005 年由 WiCell 研究所建立的。这个干细胞库同时接受政府联邦基金的资助, 所以干细胞库给研究者提供价格适宜的细胞株。

2010 年 3 月, WiCell Institute 与 NIH 签订的干细胞库建立合同到期, 并且 NIH 停止继续签订新的合同。这导致这个旧的干细胞库倒闭。新的干细胞 Wisconsin International Stem Cell (WISC) Bank 顺势而生, 可是令人遗憾的是, 联邦资金并不提供经费给这个干细胞库, 因此 WISC 的运行成本升高, 这导致干细胞株的价格直线上升, 原来 500 美金一瓶的干细胞涨价至 1000 美金。

(生物通 薄荷)

# ATCC 宣布推出有证标准物质

弗吉尼亚州马纳萨斯, 2010 年 4 月 23 日—ATCC 宣布推出符合 ISO Guide 34 和 ISO 17025:2005 和 ISO 9001:2008 认证的实验室标准的有证标准物质(CRMs)。作为一个有证标准物质生产者, 多质量体系标准的认可向 ATCC 客户展现了最高水平的质量保证, 准确性和可追溯性。

有证标准物质 (Certified Reference Material, CRM) 是指附有证书的标准物质, 其一种或多种特性值用建立了溯源性的程序确定, 使之可溯源到准确复现的用于表示该特性值的计量单位, 而且每个标准值都附有给定置信水平的不确定度。ATCC 有证标准物质的目的是用来考验化验性能, 验证或比较测试方法, 并在化验验证或执行过程中建立灵敏度, 线性和特异性。

**Liz Kerrigan**, ATCC 标准和认证主管指出: “ATCC 有证标准物质是方法验证和结果验证的重要工具。他们还为在 ISO 17025 认证的实验室进行的检测和校准提供所需的一致性。”

**Rosemarie Pruden** 公共卫生学博士, ATCC 质量总监表示: “ISO Guide34 认证是对 ATCC 标准品一致性和质量的置信度客观的衡量。这扩展了 ATCC 生产生物研发所需的国际公认标准品包括有证标准物质的能力。”

根据 ISO Guide34 的认证要求, ATCC 有证标准物质通过了最高级别的质量控制标准。ATCC 有证标准物质:

1. 每一批次的同质性和一致性都达到了最优化。
2. 通过了多相表征的鉴定。
3. 达到了稳定的令人满意的可靠性。

详细的分析验证报告和有证标准物质一起提供, 除此之外, 所有有证标准物质具有高达五年以上的稳定性, 并且产品谱系可追溯到有证标准物质生产种子的批次。

**Raymond Cypess**, 公共卫生/兽医学博士、首席执行官、总裁指出: “我们的有证标准物质是不断更新的产品目录中的一部分, 产品目录展示了我们在建立参考标准和生产产品中的出色表现, 这也反映了我们专业的质量管理。”

-更多信息-

ATCC 质量体系确保执行行业质量认证最高级别 ---ISO Guide 34 标准品生产商, ISO17025:2005 测试实验室和 ISO 9001:2008 质量管理体系。

关于 ATCC 质量体系详情请登录  
<http://www.atcc.org/About/WhoWeAre/ISOAccreditations/tabid/1488/Default.aspx>

ATCC 鉴定参照物质包括细胞株, 细菌, 真菌和酵母。申请从 ATCC 获得标准品请联系  
[standards@atcc.org](mailto:standards@atcc.org).

关于 ATCC

ATCC 是一个私有的, 非盈利性的生物资源中心 (BRC) 和研究组织, 其使命专注于获取, 鉴定, 生产, 保存, 开发和分配用于生命科学领域研究的微生物, 细胞系和其他材料的标准品。ATCC 是世界领先的生物资源中心, 它成立于 1925 年。它的任务是获取, 鉴定, 保存, 生产, 开发和分享生物材料以促进科学知识的进步。

ATCC 为世界各地的政府机构, 工业实体, 教育单位, 卫生保健, 科研实验室, 提供这些核心服务。详情请登录[www.atcc.org](http://www.atcc.org).