

# EBIOTECH

生物通技术周刊

第70期  
2009年11月26日  
全文下载

## 〔技术前沿〕

〔新技术〕可视蛋白质组学  
RIP技术：研究肿瘤发生和转移中microRNA失调的有力工具

## 〔荧光专题〕

聚焦美妙的荧光：荧光知识充电站  
核酸荧光染料 不光灵敏，更要安全  
蛋白荧光染料大比拼  
五花八门的细胞器探针  
荧光蛋白的过去、现在和未来

## 〔新品速递〕

GE推出捕获Fab抗体片段的新品  
Bio-Rad推出新试剂，5分钟提取RNA  
Illumina推出cBot簇生成系统，简化新一代测序  
Promega公司推出HaloTag?蛋白纯化系统

## 〔应用指南〕

选对抗体 发好文章  
11月冷泉港实验手册关注高通量基因分型  
BioTek与Millipore联合发布应用指南 聚焦激素分析

## 〔行业动态〕

两大著名公司纷纷展开收购行动  
罗氏年终特惠一波接一波  
两大顶尖研究院升级测序装备

# [新技术]可视蛋白质组学

瑞士联邦技术学院的研究人员开发出一种在问号钩端螺旋体 (*Leptospira interrogans*) 这种病原体中定位蛋白复合物的新方法，称为“可视蛋白质组学”。文章发表在本期的《自然-方法学》上。

活细胞中的生化进程分为多个功能单元，它们在细胞内有着特定的时间和空间分布。一般来说，这些单元是相互作用蛋白形成的复合物。定量质谱常常用于确定蛋白复合物的组成，但这种方法需要多个细胞的裂解液，但这样一来，空间信息就损失了，特定细胞的特有性质也就看不到了。

低温电子断层扫描术 (cryoET) 是一种三维观察细胞的成像技术。在目前可实现的分辨率下，它能鉴定并定位冰冻含水标本中的大蛋白复合物。这是通过模板匹配来实现的，将代表特定蛋白复合物的信号与 cryoET 收集的信号联系起来。多个蛋白复合物的结构特点组合，就有可能描述出特定细胞的立体蛋白质组结构，这个过程就称为“可视蛋白质组学”。这种方法已经应用到无细胞系统中，它在完整细胞中的应用还只限于核糖体。主要局限在于难以将真正的模板匹配和假阳性区分开来，因为低温电子断层照片的信噪比相当低。

Ruedi Aebersold 及他的同事将两种方法结合起来，推进了细胞内蛋白复合物的观察。首先，研究人员利用质谱选择并定量合适的蛋白复合物，作为模板配对，然后利用 cryoET 来定位这些复合物。

为了消除假阳性，研究人员用多个动态范围的蛋白浓度和不同的噪音模式，来优化一种新的打分功能，并从断层照片上提取出多个交叉关联的特征，建立可靠的统计学模式来区分阳性和假阳性，还对大量断层照片中不同蛋白复合物的模板匹配进行了充分的统计学验证。通过这些努力，他们终于能够自信地检测并定位单细胞中的多个复合物。最终，他们在问号钩端螺旋体中定位出 9 个不同的蛋白复合物，分别具有不同的丰度水平和分子量。

尽管这种方法目前还局限在极小的生物如问号钩端螺旋体中，也只能检测相对大量的蛋白复合物，但是 cryoET 技术的进一步发展将会拓宽这种“可视蛋白质组学”方法的应用性。(生物通 余亮)

原文检索：

**Visual proteomics of the human pathogen *Leptospira interrogans***

**Nature Methods 6, 817 - 823 (2009)**

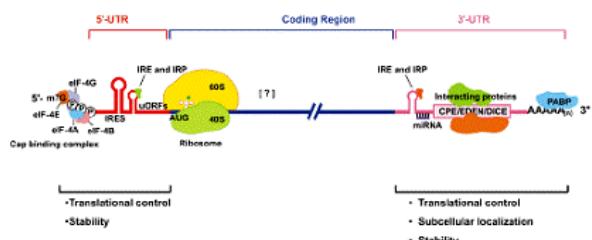
**Published online: 18 October 2009 | doi:10.1038/nmeth.1390**

# [推荐] RIP 技术：研究肿瘤发生和转移中 microRNA 失调的有力工具

作者：钟丹丹博士

microRNAs (miRNA) 是一种内源性非编码小分子 RNA，一般具有 18 到 25 个核苷酸，其序列在进化上高度保守，通过靶向特定 mRNA 来调节基因的表达。

miRNA 是越来越受关注的转录后调控网络 (post-transcriptional control) 中重要的调控因子。首先，miRNA 结合到核糖核蛋白 (Ribonucleoprotein, RNP) 复合物中，形成 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC)，然后通过不完全的碱基互补靶向到目标 mRNA 的 3'UTR 区，再通过引导酶切影响了 mRNA 的稳定性，或直接阻碍翻译过程，从而介导特异 mRNA 靶标的转录后基因沉默。



miRNA 参与转录后调控网络。miRNA 靶向到目标 mRNA 的 3'UTR 区，抑制靶 mRNA 的蛋白表达。（摘自 Chatterjee & Pal, Biol Cell. 2009）

miRNA 对许多生理过程产生重要影响，如细胞生长、凋亡、应激应答、干细胞分化潜能的维持以及新陈代谢等。据估计，脊椎动物基因组编码多达 1000 种不同的 miRNA，研究人员推测，这些 miRNA 可能调控至少 30% 的基因的表达。尽管研究人员目前已在人体内发现超过 530 种 miRNA，但仍需进一步研究以了解这些分子的确切的细胞学功能，及其在疾病发生中所扮演的角色。

对 miRNA 的研究表明，miRNA 表达量的上调或是下降都可能与致癌基因或是抑癌基因的调节有关，因此 miRNA 在癌症生成中起重要的作用。通常而言，与发生分化了的细胞类型有关的

miRNA 在肿瘤细胞中的表达减少，而那些在早期发育及干细胞中便有所表达的 miRNA 却保留下来。

一些在肿瘤中过度表达的 miRNA 通过下调抑癌因子而促进肿瘤发生，如：

- 在肝细胞癌中高表达的 miR-21，靶向抑癌基因 PTEN；
- 在淋巴瘤中高表达的 miR-17-miR-92 簇，靶向抑癌基因 E2F1；
- 在睾丸生殖细胞肿瘤中高表达的 miR-372 和 miR-373，靶向抑癌基因 LATS2。（摘自：Lujambio,A,Esteller,M Cell Cycle 2009）

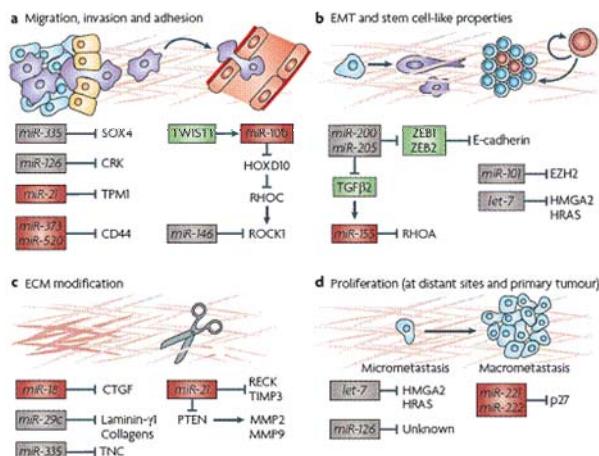
同时，一些在肿瘤中表达缺失的 miRNA 起着抑制癌症的功能，如：

- 在肺癌中中低表达的 let-7 miRNA 家族，靶向致癌基因 KRAS、NRAS、MYC 和 high mobility group A2 (HMGA2)；
- 在睾丸癌和套细胞淋巴瘤中低表达的 miR-15a-miR-16-1 簇，靶向致癌基因 cyclin D1。

值得注意的是，这些 miRNA 的作用是组织和肿瘤特异性的，例如 miR-155 在白血病和淋巴癌中是高度表达的，并起着原癌基因的作用，而 miR-155 在内分泌肿瘤中表达极大地下调，很可能对内分泌肿瘤具有抑制作用。

最新的研究发现，许多 miRNA 参与晚期癌症的特征--癌细胞扩散过程的调控，这些 miRNA 通过同时作用多条信号通路并靶向不同目标蛋白基

因而对癌细胞扩散起激活或抑制的功能（详见下图）。



肿瘤转移中 miRNA 调控的信号通路。在癌症恶化过程中，通常表达上升的 miRNA 以红色方框表示，而表达下降的 miRNA 以灰色方框表示。有助于上皮细胞-间充质转化的蛋白编码基因以绿色方框表示。EMT：epithelial-mesenchymal transition，上皮细胞-间充质转化；ECM：extracellular matrix，胞外基质。（摘自 Nicoloso etc., Nature Rev. Cancer 2009）

由于 miRNA 被发现在癌症机理中起重要的作用，尤其是与肿瘤转移相关联，因此对于 miRNA 的研究来说，最让人兴奋的是有希望应用于癌症治疗中的 RNA 抑制疗法或模拟 miRNA 表达疗法，尤其是对于出现肿瘤转移的癌症病人的治疗。

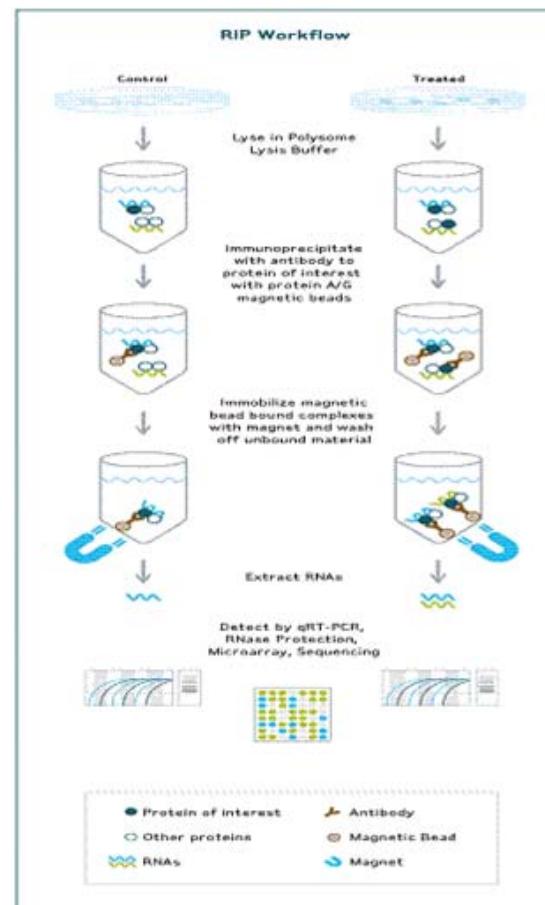
但是 miRNA 具有成百上千个靶标，所以要完全理解一个 miRNA 和靶标的特异性反应与肿瘤发生之间的联系，是一项非常具有挑战性的工作，尤其是在癌症研究中鉴别出 miRNA 的准确靶点仍然是一大难题。现已知道 miRNA 的调节功能是通过结合不同的蛋白质或 RNA 来实现的，因此研究 miRNA 与蛋白的结合情况对于揭示 miRNA 的功能及指导 RNA 疗法的研发具有重要意义。Robert Nakamura 博士是 Advanced Genetic Systems 公司的首席执行官，作为验证 RNA-蛋白复合物作为治疗靶点有效性的专家，他认为“我们知道 RNA 结合蛋白在不同的生理状态下会结合不同的 RNA。通过从细胞中分离完整的 RNA-蛋白复合物，我们

可以确认分子间的特异性相互作用，从而有希望为治疗疾病找到破坏这些相互作用的方法。”

**RIP 技术 ( RNA Binding Protein Immunoprecipitation, RNA 结合蛋白免疫沉淀)**，是研究细胞内 RNA 与蛋白结合情况的技术，是了解转录后调控网络动态过程的有力工具，能帮助我们发现 miRNA 的调节靶点。RIP 这种新兴的技术运用针对目标蛋白的抗体把相应的 RNA-蛋白复合物沉淀下来，然后经过分离纯化就可以对结合在复合物上的 RNA 进行分析。RIP 可以看成是普遍使用的染色质免疫沉淀 ChIP 技术的类似应用，但由于研究对象是 RNA-蛋白复合物而不是 DNA-蛋白复合物，RIP 实验的优化条件与 ChIP 实验不太相同（如复合物不需要固定，RIP 反应体系中的试剂和抗体绝对不能含有 RNA 酶，抗体需经 RIP 实验验证等等）。RIP 技术下游结合 microarray 技术被称为 RIP-Chip，帮助我们更高通量地了解癌症以及其它疾病整体水平的 RNA 变化。

[点击索取RIP技术的最新技术资料！](#)

### Millipore 基于磁珠的 RIP 实验流程



### RIP 实验基本原理:

- 用抗体或表位标记物捕获细胞核内或细胞质中内源性的 RNA 结合蛋白
- 防止非特异性的 RNA 的结合
- 免疫沉淀把 RNA 结合蛋白及其结合的 RNA 一起分离出来
- 结合的 RNA 序列通过 microarray (RIP-Chip) , 定量 RT-PCR 或高通量测序 (RIP-Seq) 方法来鉴定

延伸阅读: 95% 的人类基因组并不编码基因, 而是产生大量的非编码 RNA, 真正编码蛋白质的

基因只占人类总基因组的约 2%。这些非编码 RNA 在生命的生长发育的各个阶段都发挥着重要的调节作用, 与艾滋病、白血病、糖尿病、畸形等多种病变密切相关, 并且参与着干细胞和表观遗传学调控。而 RNA-蛋白复合物驱动了几乎所有细胞过程的基因表达的转录后调控, 包括剪接 (splicing) 、出核转运 (nuclear export) 、mRNA 稳定性以及蛋白转译过程, 因此, 对基因调控的了解就有赖于确定这些过程中 RNA 的结合的变化。因此, RNA 研究也被越来越多的科学家重视起来, 目前已经成为生命科学研究中心一个炙手可热的领域, 而 RIP 技术也逐渐成为 RNA 研究领域的一项常规方法, 帮助我们了解越来越受关注的转录后调控网络。

# 聚焦美妙的荧光： 荧光知识充电站

有了荧光，生物世界开始变得很美妙。由于只需物理方法（光照）即可检测，无需涉及化学反应，亦无同位素的危险，荧光技术早已成为研究生物微观世界中最方便、最重要的示踪工具之一。生物通 11 月聚焦绚丽多彩的荧光染料，为大家介绍常用的核酸染料、蛋白染料、细胞器染料以及荧光蛋白。在此之前，我们有必要先了解一些荧光的基本知识。

## 荧光激发三部曲

能够发出荧光并能作为染料的化合物称为荧光基团或荧光染料。有的荧光基团本身不发光，却能特异高效地结合某类生物大分子，并在结合后发出美丽的荧光，比如核酸染料；有的荧光基团本身可以在一定条件下发出荧光，我们需要将这个“明灯”以特殊的方法“挂”在某些可“指路”的生物大分子上，使这大分子变成“指路灯”，可用于定位生物标本中的特定区域或者示踪，这时我们通常称之为荧光探针。

除了荧光染料，还有一类蛋白质能被激发出各种颜色的美丽荧光，常用于蛋白表达标签而作为示踪或者定量的工具，如大名鼎鼎的绿色荧光蛋白就是其中之一，这个生物通将在后续的文章中另作介绍。

美丽的荧光从哪里来？请看图 1 的三部曲。

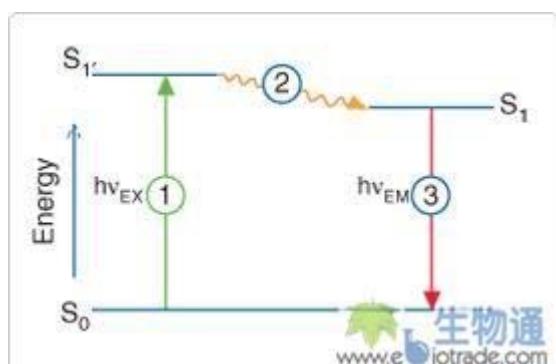


图 1. 荧光激发过程的示意图。（摘自 Molecular Probes: The Handbook）

## 第 1 阶段：激发

激发光源如白炽灯或激光提供了光子能量  $h\nu_{EX}$ 。荧光基团吸收能量后，到达单重激发态 ( $S1'$ )。此过程就将荧光和化学发光区别开来，因为后者的激发态是由化学反应引起的。

## 第 2 阶段：激发态的寿命

激发态的寿命很短暂，通常只有 1 到 10 纳秒。在这段时间内，荧光基团经历了构象的改变，并与它所处的分子环境发生了大量的相互作用。此过程有两个重要的结果：第一， $S1'$ 的能量部分损失，使荧光基团到达能量略低的  $S1$  单重激发态。第二，并不是所有被激发的分子最终都通过荧光发射回到基态 ( $S0$ )。碰撞淬灭、荧光共振能量转移 (FRET) 等过程也会使  $S1$  减少。

## 第 3 阶段：荧光发射

在这一阶段，荧光基团释放出光子能量  $h\nu_{EM}$ ，回到基态  $S0$ 。由于能量损耗，光子的能量减少，发射波长总是大于其激发波长，两者之间的差值叫斯托克斯位移 (Stokes shift)。在荧光分析中，就是利用斯托克斯位移现象，将激发光与荧光物质的发射光分离开来，只检测发射光，从而提高检测的灵敏度和选择性。有些荧光色素的斯托克斯位移较大，而有些荧光色素的斯托克斯位移较小。斯托克斯位移越大，其激发光谱和发射光谱的重叠就越少，有利于提高其分辨率。

## 荧光光谱

在我们选择荧光染料时, 荧光光谱是不可不看的, 激发波长和检测波长等重要信息都蕴含其中。激发光谱是通过测量荧光物质的荧光发射强度随激发波长变化而获得的光谱; 而发射光谱是在固定激发波长下扫描发射单色器所测得的光谱。在荧光分析中, 可利用激发光谱选择灵敏的激发光波长, 利用发射光谱选择灵敏的检测波长。

在激发光谱上可以看到在某一激发波长下, 该荧光染料具有最大的发射荧光强度, 则该激发光波长称为最大激发波长  $\lambda_{ex}$ 。在发射光谱上, 最大发射荧光强度所对应的波长称为最大发射波长  $\lambda_{em}$ 。通常会将一种染料的激发光谱和发射光谱放在同一张图上, 如图 2 所示。这是 Hoechst 33342 与 DNA 结合后的光谱图, 它的最大激发波长为 350 nm, 最大发射波长为 461 nm, 中间的差值即为斯托克斯位移。测定荧光时, 激发波长在  $\lambda_{ex}$ 、发射波长在  $\lambda_{em}$  的检测灵敏度最高。

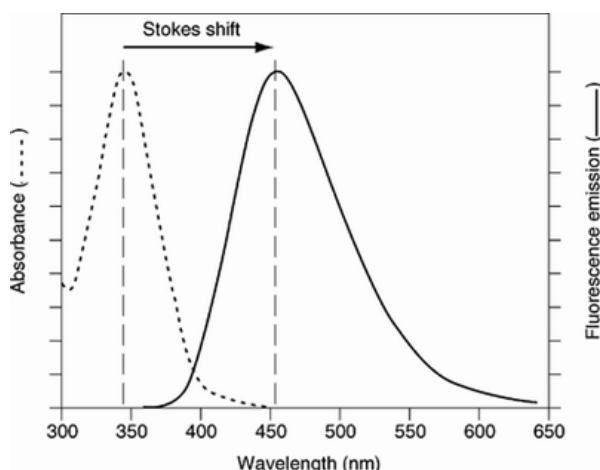


图 2. Hoechst 33342 与 DNA 结合后的荧光光谱。

## 荧光仪器

要想看到绚丽的荧光, 除了荧光染料, 检测系统也是必不可少的。荧光检测仪器有几个基本要素: 1) 激发光源, 2) 将发射光子与激发光子分开的滤光片, 3) 记录所产生的电信号或图像的探测

器。我们经常使用的仪器主要有 4 种类型, 每一种都提供了完全不同的信息:

- 荧光分光光度计和微孔板读数仪主要测量大量样品 (微升到毫升) 的平均性质。
- 荧光显微镜在二维或三维的空间坐标中解析微小物体 (直径小于 0.1 mm) 的荧光。
- 荧光扫描仪, 包括芯片扫描仪, 在二维的空间坐标中解析大物体 (如电泳胶、印迹和层析图) 的荧光。
- 流式细胞仪测量流动束中每个细胞的荧光, 鉴定并定量大样品中的亚群。

其他类型的仪器也能进行荧光检测, 如毛细管电泳装置、DNA 测序仪和微流体设备。每种仪器对荧光探针的要求都不尽相同。比如, 对荧光显微镜而言, 光漂白是一个大问题, 但是对于流式细胞仪来说, 这不算什么, 因为光源照射细胞的时间很短暂。

## 如何选择荧光染料

现在市场上的荧光染料也是越来越多, 光是著名的 Molecular Probes (03 年被 Invitrogen 收购), 目录就是厚厚一本, 相同用途的染料也分好多类, 真是眼花缭乱, 不知该如何下手。其实也不必这么纠结, 搞清楚以下几点就行了。首先, 你的用途是什么; 其次, 了解仪器的特性-激发波长和滤光片, 然后再结合光谱图来选择合适的染料。如果还是有多个选择, 那么可以比较一下它们的量子产率、光稳定性、pH 稳定性等等。一般说来, 荧光基团的量子产率要在 0.35 以上, 才能用于荧光分析。另外还要注意染料的通透性, 特别是细胞器染料, 会分为活细胞和死细胞两种, 一定要看清楚了。

**生物通小贴士:** 初次使用的人士还是多看看文献吧, 一来可以导购, 二来可作为实验的参考。荧光染料这种化学物质, 它的说明书一般都不会很详

细，只是泛泛地列出了使用的浓度范围，你千万别指望有质粒抽提试剂盒那样的 **protocol**。小编曾经就这个问题问过相关的技术人员，他的回答是，这东西就像酱油，只能告诉你做菜加一点，具体是加 5 滴还是一勺，那只能是自己摸索。

## 多色标记

当多重分析成为一种潮流，更多的实验也开始引入两种或以上的探针，来同时监测不同的生化功能。这种多色标记技术主要应用于流式细胞仪、DNA 测序、荧光原位杂交和细胞器标记中。在选择同时使用的几种荧光探针时，必须注意荧光染料的发射光谱需要足够分开，才能有利于信号分离和数据分析。一般选择发射光谱没有交叉或交叉小，发射峰值波长不同，荧光发射强度相当，在仪器上各荧光信号彼此能够分开的荧光探针标记样品。因此，那些光谱带宽窄的染料更受欢迎，比如 Molecular Probes 的 Alexa Fluor 系列。当然，最理想的组合是那些激发波长一致，而发射波长相去甚远的染料。但理想归理想，这样的组合往往不多见。

## 光漂白

提高激发光的强度可以提高荧光的强度，但是，激发光的强度不是可以无限提高的。因为激发光的强度超过一定限度时，光吸收就趋于饱和，并不可逆地破坏激发态分子，这就是光漂白的现象。

对于荧光显微镜和激光共聚焦显微镜而言，光源需长时间照射样品，光漂白现象就可能严重影响测量。

解决光漂白问题的最有效办法是增强检测灵敏度，这样就能降低激发光的强度。使用 CCD 照相机等低亮度的检测装置，以及高数值孔径物镜和最宽带通的滤光片，都能增强检测灵敏度。当然，最好是选择一些光稳定性更好的染料，例如 Alexa Fluor 488 染料就比 FITC 要强得多。另外，你也可以使用抗淬灭剂。目前市场上用得较多的是 Molecular Probes 的 SlowFade 和 ProLong 试剂，它们可以降低光漂白，不过不能用于活细胞。但需要注意的是，这些方法只是仅供参考，是否奏效还很难说，因为在某种程度上，光漂白速率还取决于荧光基团所处的环境。

本文只是对荧光染料的最基本知识作了简单介绍，属于扫盲班类别，如果你想更深入地了解它们，建议你向 Invitrogen 索取 大部头的《Molecular Probes: The Handbook》或一些中文版的书籍。后面我们将会介绍常用的核酸染料、蛋白染料、细胞器染料和荧光蛋白，敬请期待……

相关阅读：

[核酸荧光染料 不光灵敏，更要安全](#)

[蛋白荧光染料大比拼](#)

# 核酸荧光染料 不光灵敏，更要安全

由于只需简单温和的物理方法（光照）激发和检测，荧光染料是研究生物学微观世界特别是核酸时最常用的示踪工具之一。这里的荧光核酸染料主要指能特异结合核酸并改变发光特性的化合物，DNA电泳后检测凝胶的 EB 大概是最为人熟知的荧光核酸染料吧。除了染胶，荧光核酸染料还可用于荧光原位杂交中作为常见的复染剂，它们能以非共价键的方式与 DNA/RNA 结合从而显示原位杂交中的细胞背景信息。根据它们能否穿透细胞膜进入活细胞体内，还可分为两大类：通透性核酸染料和非通透性核酸染料。生物通在此简单比较一下在分子生物学实验和细胞学实验中常用的荧光染料。

## 分子生物学常用荧光核酸染料

荧光核酸染料在分子生物学最常见的应用无疑是电泳凝胶染色，以及定量 PCR。

### EB

EB（溴化乙锭）本身在紫外下不发光，能与单链、双链甚至三链 DNA 高效结合并发出明亮的橙色荧光。因其廉价且灵敏度高，一直是琼脂糖核酸电泳最常用的荧光染料。EB 的使用非常简单方便，电泳结束后染色可获得最佳效果，也可以在制胶时加入进行前染。前染有利于节约时间，但是易出现条带变形拖尾等问题。EB-DNA 结合物会导致染料的光漂白和 DNA 单链断裂，且具有潜在的诱变作用。虽说以前的实验室里总会有个别做起实验来“精神可嘉，行为可怕”的家伙，一时找不到手套他们敢徒手拿 EB 胶，但大多数人对 EB 还是“敬而远之”的，没事谁都不愿靠近实验室里跑胶、看胶那一块地方。偏偏对于搞分子生物学的人来说，跑胶就像吃饭一样平常，于是大家只能硬着头皮天天和 EB 打交道，盼望 EB 的替代品早点出现在实验室。生物通在此简单回顾一下这几年纷纷登场的 EB 替代品。

### SYBR 系列染料

说到 EB 的替代物，首先想到的是 Invitrogen 旗下 Molecular Probes 专利持有的 SYBR 系列。

自 1993 年 SYBR 核酸染料推出以来，就因其灵敏度和易用性而迅速大受欢迎，成为明星产品之一。这一系列包括 4 种染料：SYBR Safe、SYBR Gold、SYBR Green I 和 SYBR Green II。

赫赫有名的 SYBR Green I 荧光染料是最早上市的 EB 替代品，这种致畸性低而相对安全得多的新染料在标准 300 nm 的紫外透射光下，能检测低至 60 pg 的 dsDNA，比 EB 至少高了一个数量级。同时，SYBR Green I 染料-DNA 复合物的荧光量子产率约为 0.8，相当于 EB 的 5 倍。SYBR Green I 的使用和 EB 同样简单，而具有比 EB 更高的灵敏度，致变性也低得多（有个别宣传称之为几乎无毒），使之迅速成为替代 EB 的好选择----如果不是贵得多的话就更好了。色如其名，结合 DNA 后会发出美丽的绿色荧光，在拍照时需要配套的滤光片。SYBR Green I 亦即是定量 PCR 荧光染料法中广泛使用的荧光染料。为什么选择它，而不是灵敏度更高的 SYBR Gold 呢？那是因为 SYBR Green I 具有双链 DNA 的专一选择性。

SYBR Green II 与 SYBR Green I 则刚好相反，它是检测 RNA 或单链 DNA 的高灵敏染料。尽管它不是 RNA 特异的，但 SYBR Green II 与 RNA 结合的荧光量子产率（~0.54）高于 DNA（~0.36）。这个性质很特别，因为大部分染料都是与双链 DNA 结合时量子产率和荧光强度更高。

与 SYBR Green I 相似, SYBR Green II 也是在 254 nm 透射光下灵敏度最高。如果在 300 nm 透射光下, RNA 检测的金牌恐怕还要颁给 SYBR Gold。此外, SYBR Green II 染料-RNA 复合物的荧光不会被尿素或甲醛淬灭, 因此在染色之前不必将变性剂洗脱。SYBR Green II 可检测凝胶中低至 100pg 的 ssDNA 或者 2ng RNA 条带, 特别适合 SSCP 分析和 RNA 分析。

SYBR Gold 是这一系列中灵敏度最高的。它一旦结合核酸, 荧光会增强 1000 倍以上, 量子产率约为 0.6。而 EB 仅为 30 倍, 量子产量大约在 0.15。因此, 利用 300 nm 紫外透射仪和黑白成像, SYBR Gold 检测凝胶中 DNA 和 RNA 的灵敏度比 EB 高 10 倍以上。色如其名, 可以观察到金色的条带。SYBR Gold 染料可用于检测包括双链 DNA, 单链 DNA 和 RNA, 适用于琼脂糖凝胶电泳、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、单链构象多态性(SSCP)研究, 以及其他常规的分析。

SYBR Safe 既然名为 safe, 自然是安全第一。它的诱变性比 EB 要低得多, 但检测灵敏度与 EB 相当。使用方法也相同, 既可以在制胶的时候加入, 也可以在电泳后进行染色。SYBR Safe 的激发峰在 280 和 502 nm, 发射峰在 530 nm。因此, 核酸被染色后, 可通过标准的紫外透射仪、可见光透射仪或激光扫描仪来查看。大家都知道, 紫外光对 DNA 片段是有损伤的, Invitrogen 曾做过实验, 让 1.25 kb 的基因片段在紫外光下暴露 2 分钟, 再切胶回收、连接、转化, 结果发现平板上的克隆数几乎为零。如果你用 SYBR Safe 搭配蓝光透射仪, 就不会有这种问题, 也无需担心紫外线对眼睛的损伤。

生物通小贴士: SYBR 染料虽是 EB 的替代, 但用法和 EB 不尽相同, 染色时也有一些需要特别注意的地方。首先是 pH 值。Invitrogen 的专家发现 pH 是影响染色效率的重要因素。如果它高于 8.3 或低于 7.5, 你会发现灵敏度显著下降。另外一点也很容易忽视, Tris 缓冲液的 pH 值在 4°C 会比室温下明

显升高。如果在室温时你的缓冲液配制成 pH 8.0, 那么在 4°C pH 将会升高到 8.5。因此如果你要冷藏染色液, 那么它在室温下的 pH 值应是 7.5。

其次, 很多研究人员习惯于制备含有溴化乙锭染料的凝胶。SYBR Green 染料也能如此使用, 不过核酸的迁移率会受到影响, 灵敏度也会稍有下降, 因为背景荧光增加。在预制胶时, 染料应该在临灌胶之前, 液体足够冷却时加入熔化的凝胶中。沸腾和接近沸腾的温度会破坏 SYBR Green 染料染核酸的能力。注意: 不要在微波炉中加热 SYBR Green 染料。

Lonza 公司也有一种久负盛名的类似 SYBR Gold 的 GelStar 核酸荧光染料, 可高灵敏的检测凝胶中低至 20pg 的 dsDNA 或者 3ng 的 RNA, 使用起来和 EB 一样可以前染或者后染且无需脱色, 可让你更清晰地观察实验结果。

### UltraPower 核酸染料

百泰克公司最近也推出了一种取代 EB 的无毒花青染料- UltraPower 核酸染料。利用紫外凝胶透射仪来观测, 它的灵敏度比 EB 染色法高 5-10 倍, 如果配合百泰克 UltraPower™ 可见光透射仪, 则比 EB 染色法高 8-20 倍。样品荧光信号强, 无背景信号。操作也很简单, 可以采用胶染法(同 EB)、点染法、泡染法等染色方法, 无须脱色或冲洗。琼脂糖凝胶电泳和 PAGE 电泳均可使用, 价钱当然比进口试剂要便宜很多。目前, 百泰克还提供试用装, [欢迎大家申请](#)。

### GelRed & GelGreen

由中国留学生创立的美国 Biotium 公司提供的 GelRed 和 GelGreen 也是 EB 替代品。根据独立的测试服务公司的标准艾姆斯氏测试结果, 在 18.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (该浓度远高于推荐用于电泳后染色的约 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 3X 染色液) 浓度下, GelGreen 没有诱变性, 而 GelRed 也仅在 S9 代谢活化时有微弱的诱变性。GelRed 和 GelGreen 的特殊

化学结构使其难以穿透细胞膜进入细胞，正是这一特性降低了染料的细胞毒性。如果您使用的是紫外成像仪，可选择 **GelRed**；如果您使用激光成像仪或希望在可见光下观测，可选择 **GelGreen**。

### 插曲：争议

网络上关于 **EB** 替代品安全性的问题一直争论不休，虽然各品牌都有五花八门的证据，但 **EB** 替代品究竟安不安全？虽然 **EB** 为活细胞排斥，但还有具有一定的细胞膜通透性，**EB** 的致变性通常被认为来自于能稳定地插入到核酸中而导致核酸复制过程出错。每种荧光核酸染料都因其能稳定插入核酸内部从而改变荧光特性才得以成为可用的荧光染料，从理论上都是不安全的，新出的 **EB** 替代物的安全性恐怕还需要更长时间来验证。其实长期在实验室里工作真可谓“冒着生命危险”的，常常需要与 **EB** 啊，同位素啊，细菌病毒啊等各种致癌致畸的试剂打交道。2007 年生物通曾经联手赛默飞世尔公司发起过实验室安全调查，正是有感于短期内多次听到同领域多位人士患可怕重症的消息，调查结果也确实触目惊心。因此，无论用什么，请大家还是牢记----珍爱生命，请带手套。一时半会儿看不出问题，可年轻的你们，来日方长呢……实验室安全的问题，我们一直不够重视，但有关自己的健康，你还能忽视吗？还有各种染料染色后继的废弃试剂，请尽可能的规范处理，请做个负责任的实验人----通常的处理是活性炭吸附后焚化，就算没有条件也尽可能处理一下（比如强碱处理，多数荧光染料会变性）再废弃，我们的环境污染实在不需要我们雪上加霜了。

言归正传，荧光染料在分子生物学中另一个广泛应用就是定量PCR。关于荧光探针和荧光引物的选择及优缺点比较，那又是一门大学问，详情请看《[定量PCR选择之：荧光探针和荧光引物](#)》。

### 细胞生物学常用荧光染料

#### 固定细胞的染色

### PI

**PI**（碘化丙啶）与 **EB** 结构相似，**PI** 在水中的溶解度更高，而膜通透性比 **EB** 低，不过两种染料都会被活细胞排斥。**PI** 则常用于检测死亡或即将死亡的细胞数量，或了解细胞内染色体局部状况、**DNA** 结构和膜完整性。**PI** 作为红色荧光复染剂的首选，可与绿色荧光探针或二抗共同使用。

### DAPI 荧光染料

**DAPI** 大家应该也不陌生。它的学名为 4',6-二脒基-2-苯基吲哚，与 **DNA** 结合后发出蓝色荧光，与其他结构的绿色、黄色和红色荧光形成鲜明的对比。与 **Hoechst** 相似，**DAPI** 也是与双链 **DNA** 的小沟结合，特别是 **AT** 簇。当它与双链 **DNA** 结合时，荧光强度增强 20 倍，而与单链 **DNA** 结合无荧光的增强。它的荧光强度比 **Hoechst** 低，但光稳定性高于 **Hoechst**。不过，**DAPI** 在结合去污剂、磷酸盐及其他多聚阴离子之后，荧光并不会显著增强。**DAPI** 是一种极佳的核酸复染剂，能显示出染色体的清晰带型。**DAPI** 易溶于水，在 **PBS** 中溶解度有限。

### SYTOX 系列染料

**Invitrogen** 的 **SYTOX** 系列染料也很受欢迎，它们是非通透性的花菁染料，尤其适合于死细胞的染色。使用起来也比较简单，只需要加到细胞，然后观察即可，不需要额外的洗涤，因为它们在水溶液中没有荧光。**SYTOX** 染料适用于多个平台，包括荧光显微镜、流式细胞仪和酶标仪。整个系列目前有红、橙、黄、绿四种颜色。

**SYTOX** 绿色染料与核酸的亲和力是整个系列中最高的。一旦与核酸结合，荧光会增强 500 倍以上。哇，立马把 **PI** 比了下去。且它的碱基选择性最小，不像 **DAPI** 和 **PI** 那么挑剔，只认 **AT**。**SYTOX** 绿色染料可由常用的 488 nm 激光或其他的 450-490 nm 光源激发。它能轻松地透过质膜受损的细胞，但不能穿过活细胞膜。它还特别适合于

革兰氏阳性菌、阴性菌及某些病毒粒子的染色，因为它很亮。SYTOX 绿色染料能与红色、蓝色染料一起，进行多色分析。它还能与 SYTO 17 红色染料进行死细胞和活细胞的共同染色。

SYTOX 蓝色染料也是一种高亲和力的核酸染料，只能渗透质膜受损的细胞。它与核酸结合后的最大吸收峰约为 445 nm，能被汞弧灯的 436 nm 谱线所激发。与许多蓝色荧光染料不同，SYTOX 蓝色染料还能被卤钨灯有效激发。在定量膜受损的细菌细胞上，SYTOX 蓝色染料与绿色染料效果相当，同样也不会干扰细菌细胞的生长。不过蓝色和绿色的发射光谱有些重叠，因此 SYTOX 蓝色染料还是与橙色或红色探针一起使用，效果更佳。

SYTOX 橙色染料能清晰分辨死的细菌、酵母或哺乳动物细胞。它与 PI 相比，发射波长更短，它的光谱则更接近罗丹明的滤光片。此外，SYTOX 橙色染料的消光系数比 PI 要高得多，在结合 DNA 时荧光显著增强，表明它作为死细胞染料或核酸复染剂，有着更高的灵敏度。SYTOX 橙色染料还是利用流式细胞仪进行 DNA 片段筛选时的最佳染料。

### 活细胞的染色

#### Hoechst 荧光染料

大家耳熟能详的 Hoechst 系列染料是一种双苯甲亚胺（bisbenzimide）染料，主要有 Hoechst 33258 和 Hoechst 33342 等。它们是细胞膜通透性的小沟结合 DNA 染料，结合后发出明亮的荧光。Hoechst 33342 的膜通透性比 Hoechst 33258 略好，相当易溶于水，细胞毒性小。它们可被大多数常用的荧光光源所激发，表现出相对较大的斯托克斯位移（激发/发射波长约为 350/460 nm），因此适合于多色标记实验。在未结合 DNA 时，它们有着复杂的 pH 依赖光谱，在 pH5 时的荧光产量比 pH8 时要高得多。SDS 等表面活性剂还能使荧光增强。

Hoechst 染料普遍用于多个细胞分析，包括细胞周期和凋亡研究，而且它们还是常用的核酸复染剂。此外，Hoechst 33258 还有一个特殊的应用。由于它对疟原虫有毒性，因此可用于血液样本的流式筛选，并评估患者的药物敏感性。

#### SYTO 核酸染料

Invitrogen 的 SYTO 是活体核酸透性染料。这种染料对核酸的亲和力较低，可通过被动运输扩散透过大多数细胞的细胞膜。对活细胞和死细胞的 DNA 和 RNA 都可以进行染色。同时，也可用于革兰氏阳性和阴性细菌的染色。染料通过紫外光或可见光激发而发出荧光。目前有蓝、绿、橙和红等几种颜色。各种 SYTO 染料间的特性都不相同，包括细胞通透性、与核酸结合后荧光的增强度、激发和发射光谱、对 DNA/RNA 的亲和力等。与专门用于 DNA 染色的 DAPI 和 Hoechst 染料不同，SYTO 还可以对 RNA 进行染色，因此，经过 SYTO 染色的细胞在细胞核和细胞质中都可以观察到染色。

由于有些 SYTO 染料在中性 pH 条件下带正电荷，因此也可以对线粒体染色。死亡的酵母细胞经过染色后出现明亮的荧光，活的酵母细胞在线粒体和细胞核都可以观察到荧光。一些 SYTO 的染色还可以用于观察细胞凋亡。红色的 SYTO 染料可以用来作为绿色荧光蛋白、凝集素或者非通透性绿色 SYTOX 染料的复染剂。一些绿色的 SYTO 染料则是很好的细胞核复染剂。

此外，Invitrogen 还提供了很多种花菁染料，这里就不一一详述了。如果你想了解更多，或有特殊的应用，请[点击此处索取资料](#)。（生物通 余亮 吴青）

相关阅读：

[荧光知识充电站](#)

[蛋白荧光染料大比拼](#)

[五花八门的细胞器探针](#)

# 蛋白荧光染料大比拼

几十年来，聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）及相关的 blot 已经成为蛋白分析的主流技术。考马斯蓝染色和银染也就成了我们最熟悉的染色方法。不过，随着蛋白质组学的发展，定量蛋白质组和多重分析越来越流行，这些染料已经无法满足更高的要求。此时，荧光染料的优势就凸显出来。生物通这就带大家看看市场上主流的蛋白荧光染料，包括总蛋白染料、磷酸化蛋白和糖基化蛋白染料。另外，本文还会介绍一些特殊用途的荧光染料。

## 总蛋白染料

与传统的考马斯蓝染色相比，荧光染色可将检测的灵敏度降至 1 ng 以下，与银染相当；而与银染相比，荧光蛋白染料的线性范围比银染宽很多，一般可达 3 个数量级以上，且对不同种蛋白的染色强度变化小，与蛋白质量成清晰的线性关系，而不依赖于多肽序列及糖基化程度。目前的荧光染色法与后续的质谱分析和 Edman 测序等技术兼容，因此无论在 1D 还是 2D 电泳领域都日渐受到研究人员的青睐。蛋白荧光染料需要一个紫外光透射仪（下紫外）才能观察，当然，有激光扫描仪时效果更佳。

名气最大的总蛋白荧光染料当属 Invitrogen 旗下 Molecular Probes 公司持有专利的 SYPRO® 荧光蛋白染料系列。这一最早上市的荧光蛋白染料系列包括了 SYPRO® Ruby, SYPRO® Red, SYPRO® Tangerine 几种不同颜色。其中紫红色的 SYPRO® Ruby 最为著名，也有人翻译成 SYPRO 红宝石。它的检测极限为 0.25-1 ng，线性范围超过 3 个数量级。它与碱性氨基酸和多肽主链结合，因此不同蛋白之间的差异性小，可进行更为准确的定量。它的染色范围包括糖蛋白、磷酸化蛋白、脂蛋白、钙结合蛋白及其它难染色的蛋白，不会过度染色，也不干扰后续的质谱分析和 Edman 测序等技术。操作起来也很简单，固定两

次，染色过夜，脱色就 OK 了。如果你想快一点看到结果，可以用微波炉来快速染色，时间只需要 1 个半小时。SYPRO Ruby 是即用型的 1x 染料，使用方便，当然价格也不便宜。SYPRO Ruby 有两个激发峰-280 nm 和 450 nm, 发射峰为~610 nm。紫外透射仪、蓝光透射仪或激光扫描仪都可以观察染色后的蛋白。

简单而快速的 SYPRO Red 和 SYPRO Tangerine 通常用于 1D 电泳的凝胶染色。产品如其名，一种是鲜艳的正红色，一种是明亮的金橘色。以 Lonza 公司（即原来 FMC 王牌琼脂糖的电泳系列，卖给 Cambrex 后又被合并到 Lonza 旗下）的产品为例，取适量 5000x 浓度的原液稀释为 1x 浓度，遮光浸泡凝胶 40-60 分钟后即可上紫外透照仪，CCD 或者激光扫描仪进行检测，无需额外的固定步骤，检测下限可低至每条带 1ng 蛋白。稀释液在遮光 4° 条件下可以稳定保存至少 3 个月。SYPRO Tangerine 尤为值得推荐。这种荧光蛋白染料在整个使用过程中无须用到酸或者有机溶剂，染色可在 saline 或者 PBS 或 Tris-HCL 等多个体系的缓冲液中进行，不与蛋白共价结合也不影响抗体结合，无需洗脱即可直接转膜进行 Western Blotting，兼容后继的酶法分析或者 Western Blotting，特别适用于非变性胶的活性蛋白检测。

SYPRO Red 则需要用乙酸溶液稀释。这两种染料在长时间 UV 光照下会发生光漂白，这时只要重新染色即可。这两种染料价格差不多，500ul 的 5000x 原液价格在 2000 多人民币。

Bio-Rad 公司的总蛋白染料有个很好听的名字，火烈鸟-Flamingo Fluorescent Gel Stain。它的线性范围也超过 3 个数量级，灵敏度似乎比 SYPRO Ruby 更高，在激光扫描模式下它的检测极限能达到 30 pg。染色所需时间为 5 小时，且着色深浅对染色时间不敏感，无需脱色。Bio-Rad 没有提供快速染色的 protocol，虽然手工操作的时间很少，但 5 小时还是略嫌稍长。染过的凝胶在 2-8°C 下可保存 6 个月而无明显褪色。Flamingo 染料的最大激发峰和发射峰分别为 512 nm 和 535 nm，不过在 271 nm 有第二激发峰，也可用紫外光激发。

Pierce (现属于赛默飞世尔科技) 的 Krypton Protein Stain 名字虽不起眼，也是市场上很受欢迎的一款蛋白染料。就检测灵敏度和线性范围而言，它与前两款不分伯仲。它的一个明显优势就是染色时间较短，虽说步骤有些繁琐，但整个过程只需要 2 小时 40 分钟。另外，它也提供了快速染色的步骤，只要半个小时就能看到结果了，当然，时间快了灵敏度也会打折扣。Krypton Protein Stain 的性价比很高，在这三种荧光染料中，它是最便宜的。它与 Flamingo 都是 10x 的浓缩液，使用前需要用水稀释。

另外，PIERCE 还专门为红外激光成像开发了一款总蛋白染料 Krypton Infrared Protein Stain。它的灵敏度、检测时间都与 Krypton Protein Stain 相似，不过激发和发射波长更大，在 690 和 718 nm，适合于 LI-COR 的 Odyssey 及其它红外成像系统。

### 三款主流总蛋白荧光染料的参数对比

产品名称	SYPRO Ruby Protein Gel Stain	Flamingo Fluorescent Gel Stain	Krypton Protein Stain
制造商	Invitrogen <a href="#">索取资料</a>	Bio-Rad <a href="#">索取资料</a>	Pierce (Thermo Fisher Scientific) <a href="#">索取资料</a>
检测极限	0.25-1 ng	0.25-0.5 ng	≤0.25 ng
线性范围	>3 个数量级	>3 个数量级	3-4 个数量级
染色步骤 (标准)	1. 在甲醇、乙酸中固定 1 小时 2. 过夜染色 3. 在甲醇、乙酸中洗涤 30 分钟	1. 在甲醇、乙酸中固定 2 小时 2. 染色至少 3 小时 3. 在吐温 20 中洗涤 30 分钟	1. 在甲醇、乙酸中固定 1 小时 2. 水洗 5 分钟 3. 染色 1 小时以上 4. 在乙酸中脱色 5 分钟 5. 水洗 30 分钟
耗时 (标准)	~18 小时	5 小时	<b>2.7 小时</b>
耗时 (快速)	1.5 小时	无	0.5 小时
质谱兼容	是	是	是
规格*	1 L (1x)	100 ml (10x)	100 ml (10x)
参考价格	3347.00	2000.00	<b>1695.00</b>

\* 还有其他规格，请向当地经销商或厂家咨询。

除了最常见的凝胶染色，SYPRO® Ruby 还可用于等电聚焦 IEF，且只需进行一次 20 分钟的固定 (1D 不用固定，但等电点聚焦 IEF 则需要固定 3 小时)，染色 3 个小时 (IEF 需要染过夜)，脱色 30 分钟后即可观察。Lonza 这个产品 1L 的即用型原液价格要 3000 左右。值得注意的是 SYPRO® Ruby 在整个使用过程都要遮光，且应用聚丙烯类塑料盘染色，避免使用玻璃。SYPRO® Ruby 染色结果经过 2% 甘油浸泡后可以进行干胶永久保存，只是极低浓度的条带就可能看不到了。

另外还有个小秘密, **Lonza** 的说明书里提及由于甲醇和乙酸混合可能产生乙酸乙酯, 对后继的质谱可能有影响, 后面考虑做质谱的同学或许需要考虑用其他替代。

另外, **Invitrogen** 还有一种 **SYPRO Ruby protein blot stain**, 是专门染膜的, 作用就像丽春红。但它的优点是不与蛋白共价结合, 也就不影响后续的鉴定过程, 因此可用于免疫染色之前, 来定位分子量标准或看看样品的总蛋白图谱, 这样就免去了平行跑两块胶的麻烦, 轻松比较总蛋白和目的蛋白。它还与后续的测序和质谱分析兼容。只需染色 15 分钟, **SYPRO Ruby protein blot stain** 就能检测 PVDF 或 NC 膜上的 2-8 ng/条带。膜染料还有一种, 名字也相当好听, **SYPRO Rose Plus Protein Blot Stain**, 灵敏度与 Ruby 不相上下, 不过染色是可逆的。通过膜的洗涤, 染料很容易就被完全剥离, 这就很适合于临时的检测, 比如蛋白芯片中的质量控制。这两个膜染料的价位都在两千出头, 可用于  $1600 \text{ cm}^2$  的印迹膜。

## 2D DIGE

说到荧光, 又谈到 **2D**, 那怎么能忘了正流行的 **2D DIGE** 呢。荧光差异凝胶电泳技术是在传统双向电泳技术的基础上结合了多重荧光分析的方法, 可在同一块胶上同时分离多个分别由不同荧光标记的样品。由于不同的荧光标记样品有不同的激发波长, 可通过不同的滤光片记录互不干扰的胶图结果。由于有了多色荧光标记, 使得在同一块胶中分离并分析多个样本成为可能。这样有效避免了不同胶间的系统误差, 特别适合比较不同样本间差异。

荧光染料种类虽多, 但用于蛋白质组样品标记的荧光染料不同于普通荧光染料, 标记后的蛋白质不应该有等电点上的改变, 分子量上的改变也应该保持最小, 而且不同荧光染料导致的分子量的改变

应该一致。用于蛋白质预先标记的荧光染料分为两类, 最小标记和饱和标记。其中最小标记荧光染料包括三种, 分别是 **Cy2**, **Cy3** 和 **Cy5**。这三种荧光染料化学结构上相似, 分子量接近, 带有相同的活化基团—**NHS** 脂, 可以特异性的标记在赖氨酸残基的  $\epsilon$  氨基上, 由于三种染料均带有一个正电荷, 这样通过取代反应蛋白质的等电点不会发生改变, 保证了不同样品中的相同蛋白质可以泳动到相同的位置。不过要注意, 过多的染料标记会导致蛋白质的疏水性增加而不易溶解。保持 1~2 % 的蛋白质的赖氨酸残基被荧光标记修饰, 才可以维持被标记的蛋白在电泳时的溶解性, 因此, 在标记样品时, 保证合适的蛋白质和染料的摩尔数比例至关重要。通过调整合适的 pH 值、合适的染料和蛋白质的摩尔比, 可以保证每个蛋白质分子最多只标记上一个染料分子, 来保证蛋白质的分子量变化最小。

饱和标记的荧光染料包括两种, 标记蛋白质上的半胱氨酸残基, 主要用于一些来源和珍贵的微量样品的研究中。饱和标记可避免上述问题, 但是使用成本较高。在采用饱和标记分析蛋白质组样品时, 必须先进行染料量的滴定, 以确定合适的还原剂和染料的加量, 否则, 在 **DIGE** 胶图上很轻易造成水平链状的点或垂直拖尾。另外, 由于被标记了的蛋白质的分子量发生了改变, 饱和标记的胶图和银染的胶图有所不同。

**DIGE** 中的学问相当大, 简单几段话可说不清楚, 如果有同学想了解更多, 可以读读这一篇 [《定量蛋白质组学研究中的荧光差异凝胶电泳技术》](#)。

## 磷酸化蛋白

上面提到的是总蛋白染料, 它可不分蛋白类型, 只要是蛋白, 就通通不放过。有时, 你的目标仅仅是磷酸化蛋白, 那么需要特异的磷酸化蛋白染料。2003 年, **Molecular Probes** 公司的 **Wayne Patton** 等在 **JBC** 上报道了一种全新的荧光染料

Pro-Q Diamond, 它可对磷酸化基团（连接在酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基上）特异性染色。该方法方便、快捷且具有较高的灵敏性，线性范围超过 3 个数量级，与质谱鉴定兼容。之后他们又将一些蛋白质和肽段点样在蛋白芯片上，然后利用 Pro-Q Diamond 来检验芯片上的蛋白质及多肽的磷酸化水平，灵敏度可达到 312-625 fg，这种芯片与染料的结合为研究信号通路及磷酸酶抑制物提供了一个很好的平台。Pro-Q Diamond 染料还可与 SYPRO Ruby 共同使用，来检测总蛋白中的磷酸化蛋白。

### 糖基化蛋白

对于糖基化蛋白，Molecular Probes 则提供了 Pro-Q Emerald 300 和 488 糖蛋白染料。Pro-Q Emerald 300 能与高碘酸盐氧化的碳水化合物基团相互作用，让糖基化蛋白产生明亮的绿色荧光。这种方法能检测低至 0.5 ng 的糖蛋白，比酸性品红染料灵敏 50 倍。Pro-Q Emerald 300 的激发和发射波长分别为 280 nm 和 530 nm，可用紫外透射仪观察。它也能与 SYPRO Ruby 共用，来检测糖基化情况。另外，Pro-Q Emerald 系列还有另一个成员- Pro-Q Emerald 488，激发波长在 510 nm，也是发绿色荧光。它的灵敏度比前者稍逊，为 4 ng。它们俩都与质谱分析兼容。

PIERCE 也有一款糖基化蛋白的染料 Krypton Glycoprotein Staining Kit，能够检测 1-D 和 2-D 胶中的糖基化蛋白。与 Pro-Q Emerald 300 相比，它的灵敏度不算出众，仅为 15 ng。优势也是速度快，对于一般的迷你胶，染色过程 4 个小时，如果是那种很大的 2-D 胶，4.5 小时也可完成。它与质谱分析兼容，也能与前面提到的总蛋白染料 Krypton Protein Stain 共用。

### His 标签蛋白

目前的重组蛋白大多带有 His 标签，便于检测和纯化。怎么检测？不外乎是 Western blot。其实 Invitrogen 还有一种很方便的荧光染料，可以大大简化 His 蛋白的检测。InVision™ His-tag In-gel Stain 中的荧光染料是与 Ni<sup>2+</sup>: NTA 复合物结合在一起的。众所周知，Ni<sup>2+</sup>与组氨酸序列有着高度的亲和力，因此它能特异识别带 His 标签的蛋白。整个染色过程不到 3 个小时，比 Western blot 可快多了。如果你用微波炉来帮忙，快速染色只需 70 分钟。它的灵敏度也不赖，能够检测 0.5 皮摩尔 6×His 重组蛋白，假设蛋白分子量为 30 kDa，则检测极限为 15 ng。检测系统可以是紫外透射仪，也可以是激光扫描仪。对于经常表达重组蛋白的实验室来说，可真是个好东西，价格也还可以接受，500 ml/ 3882 元。用了这个，His 抗体和转印膜都能省了。

另外，Invitrogen 还有一款与这个类似的染料，染的是带 Lumio™ 标签的蛋白。不过 Lumio 标签用户不太多，这里就不详细介绍了。感兴趣的同学可读读《[使用 Lumio™ 技术快速检测体外表达的蛋白质](#)》。

蛋白染料看似很简单，原来也有这么多学问，希望大家看完没有头晕晕。至于染料的价格，本文没有一一列出，大家可到生物通商城查询。（生物通 余亮 吴青）

相关阅读：

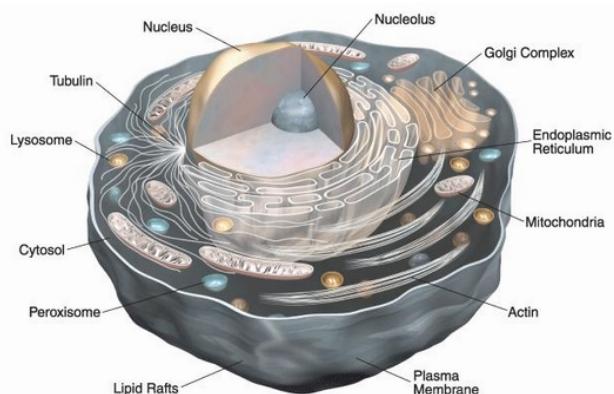
[荧光知识充电站](#)

[核酸荧光染料 不光灵敏，更要安全](#)

[五花八门的细胞器探针](#)

# 五花八门的细胞器探针

在细胞生物学领域, 由于荧光激发与检测对细胞形态及生理的影响较小, 因而当之无愧地成为研究细胞结构与功能首选的示踪方法之一。五花八门的细胞器荧光探针是细胞学研究中重要的一种工具, 大概有几百种之多。说到荧光探针, Molecular Probes 绝对是一块“谁与争锋”金字招牌, 2003 年被 Invitrogen 收归旗下。尽管宣传不多, 但分子探针这一块的销售额还是随着细胞学研究的进展而节节攀升。没办法, 跟着文献走, 文献中尽是它。下面这张漂亮的图上标出的细胞器, Invitrogen 都有相应的探针。篇幅有限, 生物通特意挑选了几个热门的细胞器, 介绍一些明星探针。还有更多精彩等着你来发现。.



## 线粒体

线粒体是细胞的能量工厂。因其参与了细胞凋亡, 这些年也成为研究的热门。线粒体的荧光探针主要有: JC-1、Rhodamine 123 等, Invitrogen 还推出专门的 MitoTracker® 系列探针。

JC-1 是用得最多的。它在浓度或线粒体膜电位低时, 以单体存在, 激发波长为 490 nm, 发射波长为 527 nm, 呈绿色荧光。当浓度升高或线粒体膜电位升高时, JC-1 形成 J-聚体, 呈橙色荧光, 此时激发波长为 490 nm, 发射波长为 590 nm。JC-1 最重要的应用是检测活细胞内线粒体的膜电位, 以及追踪凋亡细胞中的线粒体变化。

Rhodamine 123 是一种能渗透入细胞, 带阳离子的荧光探针。它的激发波长为 505 nm, 发射波长为 534 nm。活细胞摄取 Rhodamine 123 达到平衡的速度较快, 只需 5 分钟, 通过激光扫描共聚焦显微镜观察, 即可见到线粒体被 Rhodamine 123 染成绿色。当细胞被反复冲洗时, Rhodamine 123

通常不被细胞保留, 但许多癌细胞可较长时间保留这种染料, 因此, 它有助于某些癌症的诊断。

MitoTracker® 系列探针则是 Invitrogen 专为线粒体而设计的。MitoTracker 是细胞通透性的, 只要与细胞简单孵育, 就能被动渗透质膜, 在有活性的线粒体中积累。一旦线粒体被标记, 细胞就能用甲醛固定剂固定, 一些 MitoTracker 探针能在固定之后保留在线粒体内。这对致病细胞格外有用。而一些探针在随后的去污剂处理后还能保留, 这样就能用在免疫细胞化学或原位杂交中。尽管传统的线粒体探针如 Rhodamine 123 也很容易标记线粒体, 但是一旦线粒体的膜电位损失, 它们就很容易被洗掉。这就限制了某些应用。

MitoTracker 探针又分为好几种, 且有红色、绿色和橙色。其中还原态的 MitoTracker Orange CM-H2TMRos 和 MitoTracker Red CM-H2Xros 在进入细胞后不发出荧光, 直到它们被氧化成相应的线粒体选择性探针, 并聚集在线粒体内。红色的 MitoTracker 探针都适合于多色标记实验, 因为它们的红色荧光能与其他绿色荧光很好地区分开。尽管有些 MitoTracker 探针能实现固定细胞中的线粒体标记, 但这些染料还是只推荐给活细胞。如果你想要标记固定细胞, 可以选择 OxPhos 的抗体+荧光二抗。

## 内质网

内质网的功能有哪些？你还记得吗？复习一下，内质网是细胞中由膜围成的分支小管、小囊或扁平囊状结构连通而成的管道系统，可分为粗面内质网和滑面内质网两种。粗面内质网上附着有核糖体，是合成蛋白质的主要场所；滑面内质网则功能多样，比如在肝细胞中与解毒和糖代谢有关。

常用的 DiOC6(3) 及相似的 DiOC5(3) 都属于短链羰花菁染料，它们广泛用于内质网的研究，包括神经元、酵母中内质网的结构作用和动力学，以及不同细胞类型中内质网、线粒体和微管的形态关系。它们不仅可标记活细胞中的内质网，也可以用于甲醛固定的细胞。DiOC6(3) 进入细胞内与内质网结合，在激光激发下发出绿色荧光，根据内质网的形态学特征很容易识别。需要注意的是，在相对低浓度时，DiOC6(3) 聚集在线粒体中，而在高浓度时，则可聚集于其他膜性细胞器，包括内质网膜。

长链的羰花菁染料 DilC16(3) 和 DilC18(3) 也可以标记内质网膜。DilC16(3) 的激发波长为 550 nm，发射波长为 564 nm；DilC18(3) 的激发波长为 550 nm，发射波长为 565 nm，均呈黄色荧光。DilC16(3) 和 DilC18(3) 的分子结构与 DiOC6(3) 大致相同。DilC16(3) 有两个更长的碳链，使 Dil 不能透过膜。一旦 Dil 结合到膜内，它就保留膜中，在膜的两层内自由扩散。Dil 已经用来标记神经元细胞和肌细胞的内质网。

ER-Tracker 染料是 Invitrogen 开发的细胞通透性的活细胞染料，是 ER 高度选择性的。它们与常规的 ER 染料 DiOC6(3) 不同，很少会对线粒体染色，且低浓度下的染色不会对细胞带来毒性。ER-Tracker Blue-White DPX 属于 Dapoxyl 染料家族中的一员，因此有着相当大的斯托克斯位移，长发射波长，以及高的消光系数和量子产率。它的荧光对环境极其敏感，当溶剂极性增加，荧光发射峰会移向更长的波长-从 430 nm 到 640 nm，量子产率下降。Invitrogen 推荐用标准的 DAPI 或 UV longpass 滤光片来观察它的内质网染色。ER-Tracker Green 和 ER-Tracker Red 的激发/发射峰分别为 504/511 nm 和 587/615 nm。

真菌代谢物 brefeldin A (BFA) 是解析多个胞内进程的重要工具，包括参与运输新合成蛋白的囊泡形成及驱动蛋白分布。将细胞暴露在 BFA 中，会引起细胞内从内质网到高尔基体的蛋白转运的失常，最终导致高尔基体形态的丧失，而去除 BFA 后，这些作用会完全逆转。除了天然的 BFA 外，Invitrogen 还提供了绿色和橙红色的 BFA 衍生物。绿色的 BODIPY FL 和橙红色的 BODIPY 558/568 BFA 衍生物能够在几种细胞系中对内质网和高尔基体进行选择性染色。BODIPY 558/568 BFA 可与 NBD C6-ceramide 共同使用，来同时了解内质网和高尔基体。

### 高尔基体

高尔基复合体的功能主要是将由粗面内质网运来的蛋白类物质进行加工、浓缩、储存和运送，最后形成分泌泡排除。高尔基复合体的荧光探针主要有 NBD C6-Ceramide 和 BODIPY FL C5-Ceramide 两种。

NBD C6-Ceramide 呈绿色荧光，激发波长为 464 nm，发射波长为 532 nm，是目前应用较广泛的选择性染色高尔基复合体的探针。它适用于活细胞和固定细胞的染色。将荧光 ceramide 与 BSA 混合，有助于细胞标记，而无需使用有机溶剂来溶解探针。NBD C6-Ceramide 目前应用在以下方面的研究：检测 BFA 对高尔基复合体和内质网之间的蛋白转运的作用效果；一种遗传性脂代谢异常的疾病（Farber's 疾病）的研究；细胞内凝血酶受体的转运和标记等等。

另外，NBD C6-Ceramide 的荧光对高尔基体的胆固醇含量特别敏感，这个现象是 BODIPY FL C5-Ceramide 所没有的。如果含有 NBD C6-Ceramide 的细胞是胆固醇饥饿的，那么高尔基体中积累的荧光特别不稳定。不过，胆固醇合成的刺激会降低这种 NBD 光漂白。因此，NBD C6-Ceramide 在监测活细胞中高尔基体的胆固醇含量时很有用。

BODIPY FL C5-Ceramide 也呈绿色荧光，激发波长为 505 nm，发射波长为 511 nm。它比 NBD

衍生物更加明亮，且不容易衰减，因此在很多应用中都能够替代 NBD C6-Ceramide。BODIPY FL C5-Ceramide 表现出浓度依赖的荧光特性。在高浓度，非极性的 BODIPY FL 荧光基团形成受激准分子，使荧光基团的发射峰从 515 nm (绿色) 转移到 620 nm (红色)。反面高尔基体上的 BODIPY FL C5-Ceramide 积累足够形成受激准分子，而周围的细胞质不会。利用红光的滤光片就能选择性观察高尔基体。而且，这种二色性还能通过比例成像定量 BODIPY FL C5-Ceramide 的积累。

### 溶酶体

溶酶体为单层膜蛋白包围的内含一系列酸性水解酶的小体。溶酶体中含有多种酶，如糖苷酶、酸性磷酸酶、弹性蛋白酶、组织蛋白酶等等，是物质代谢的场所。

弱碱性胺选择性聚集在胞内低 pH 值的小室中，可用于研究溶酶体的生物合成和发病机理。其中最常用的就是 DAMP，它不发荧光，需要和抗 DNP 的抗体共同使用，来观察染色模式。中性红、吖啶橙等荧光探针也常用于酸性细胞器的染色，不过它们缺乏特异性。

LysoTracker 探针就是 Invitrogen 开发的向酸性荧光探针，用于标记和追踪活细胞中的酸性细胞器。这些探针有几个重要的特征：对酸性细胞器的高选择性，在纳摩尔浓度下能对活细胞有效标记。而且，LysoTracker 探针有几种不同的颜色，适合多色标记。

LysoTracker 探针是细胞膜通透性的，一般聚集在球形的细胞器中。研究人员发现探针在极低浓度 ( $\sim 50 \text{ nM}$ ) 下选择性最佳。此外，较大的酸性细胞器在 LysoTracker Red DND-99 染色后，经过甲醛固定仍保留其染色模式。

对于那些想研究溶酶体生物发生动力学的研究人员来说，LysoSensor 探针可谓量身定做。LysoSensor 染料是向酸性的探针，由于质子化作用聚集在酸性细胞器中。质子化也缓解了染料的荧光淬灭，使荧光强度增加。因此，LysoSensor 在

酸化的环境中表现出 pH 依赖的荧光强度增加，而 LysoTracker 探针的荧光则没有明显变化。

Invitrogen 提供了 5 种 LysoSensor 试剂，pKa 不同，颜色各异。LysoSensor Blue DND-167 和 LysoSensor Green DND-189 的 pKa 值很低，处于酸性环境中才会发出荧光，而 LysoSensor Green DND-153 在中性 pH 下就发出很强的荧光。LysoSensor Yellow/Blue DND-160 很特别，具有双激发和双发射峰，是 pH 依赖的。在酸性细胞器中，它主要发黄色荧光，而在弱酸性细胞器中，荧光则为蓝色。LysoSensor Yellow/Blue DND-160 曾与 fluo-3 AM 共用，来同时测量兔胃腺中  $\text{H}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$ ，以确定类胆碱和 cAMP 依赖通路激活后胃酸分泌的动力学。

除了上面这些传统的荧光探针，Invitrogen 的 Organelle Lights™ 荧光蛋白也是一个不错的选择。Organelle Lights 是即用型的荧光蛋白载体，融合了信号肽，能将表达的荧光蛋白定位到亚细胞器中，如核、质膜、内质网、高尔基体和过氧化物酶体等等。颜色有青、绿、橙、红几种。它通过改造的可用于哺乳动物细胞的杆状病毒 (BacMam virus) 将荧光蛋白导入胞内，不仅安全，而且适合多种细胞类型，包括原代细胞和神经细胞。你只需要将试剂加到细胞中就行了，既不需要转染，也不需要对细胞做任何处理，用起来相当方便。

讲了这么多，还只是冰山一角。毫无疑问，花样繁多的荧光探针为我们在细胞学研究中提供的更多的选择，不单止美丽，不单止有趣，更照亮了研究的前进之路。如果你希望了解更多其他细胞器的荧光探针，可以[点击此处](#)向 Invitrogen 索取相关的资料。各种细胞器探针的超详细分析，不怕找不到，总有一款合适你吧。更多精彩等着你来发现…… (生物通 余亮)

相关阅读：

[荧光知识充电站](#)

[核酸荧光染料 不光灵敏，更要安全](#)

[蛋白荧光染料大比拼](#)

# 荧光蛋白的过去、现在和未来

2008 年 10 月 8 日，诺贝尔化学奖揭晓。日本科学家下村修、美国科学家马丁·查尔非和钱永健因发现和改造绿色荧光蛋白 (GFP) 而获奖。因诺贝尔奖和钱永健，荧光蛋白再次成为我们关注的热点。1962-2009，这 47 年来，荧光蛋白也在不断进化。不过这种进化不是出于自然选择，而是成像上的压力。

让我们先来了解一些关于始祖 GFP 的基本情况。GFP 由 238 个氨基酸组成，分子量为 26.9 kDa，最初是从维多利亚多管发光水母 (*Aequorea victoria*) 中分离出来的，在蓝光照射下会发出绿色荧光。来源于水母的野生型 GFP 在 395 nm 和 475 nm 分别有主要和次要的激发峰，它的发射峰在 509 nm，处于可见光谱的绿色区域。来源于海肾的 GFP 只在 498 nm 有单个激发峰。

GFP 是典型的  $\beta$  桶形结构，包含  $\beta$  折叠和  $\alpha$  螺旋，将荧光基团包含在其中。严密的桶形结构保护着荧光基团，防止它被周围环境淬灭，内部面向桶形的侧链诱导 Ser65-Tyr66-Gly67 三肽环化，导致荧光基团形成。

1962 年，下村修和约翰森从维多利亚多管水母中分离生物发光蛋白-水母素 (aequorin) 时，意外地得到了一个副产物。它在阳光下呈绿色、钨丝下呈黄色、紫外光下发强烈绿色。其后他们仔细研究了其发光特性。1974 年，他们得到了这个蛋白，当时称绿色蛋白，以后称绿色荧光蛋白 (GFP)。GFP 在水母中之所以能发光，是因为水母素和 GFP 之间发生了能量转移。水母素在钙刺激下发光，其能量可转移到 GFP，刺激 GFP 发光。这是物理化学中已知的荧光共振能量转移 (FRET) 在生物中的发现。

研究者们并没有意识到 GFP 的应用前景，慢慢就将其遗忘了。这一晃就是 20 年。直到 1992 年，道格拉斯·普瑞舍克隆并测序了野生型的 GFP，文章发表在《Gene》杂志上。但具有讽刺意味的

是，基金评审委员会认为普瑞舍的工作没有意义，不愿提供经费。普瑞舍一气之下，离开了科学界，将 GFP 的 cDNA 送给了几个实验室。很多人尝试用 GFP 的基因来表达蛋白，但都失败了。马丁·查尔非就考虑只用它的编码区域来表达。他用 PCR 的方法扩增了 GFP 的编码区，将它克隆到表达载体中，通过 UV 或蓝光激发，在大肠杆菌和线虫细胞内均产生了很美妙的绿色荧光。这才是 GFP 作为荧光指示剂的真正突破，文章发表在《Science》杂志上。

尽管野生型 GFP 发出很绚丽的荧光，但它还是有不少缺点，比如有两个激发峰、光稳定性不好，在 37°C 不能正确折叠。

1996 年 Remington 小组最先在《Science》上发布了 GFP 的 S65T 突变体的晶体结构。一个月后，Phillips 小组也在《Nature Biotech》上发布了野生型的 GFP 结构。正是这些晶体结构的探明，才使人们更好地了解发光基团的组成，以及与周围残基的相互作用。研究人员通过定点或随机突变，不断地改造这些残基，得到了我们今天使用的 GFP 衍生物。

首个重大改变就是钱永健在 1995 年完成的单点突变 (S65T)。这个突变显著提高了 GFP 的光谱性质，荧光强度和光稳定性也大大增强。突变后的 GFP 激发峰转移至 488 nm，而发射峰仍保持在 509 nm，这和常用的 FITC 滤光片匹配，提高了 GFP 的应用潜力。而 F64L 点突变则改善了 GFP

在 37°C 的折叠能力，综上就产生了增强型 GFP，也就是我们常见的 EGFP。

荧光蛋白的改造遵循这样一个宗旨，那就是越红越好。普遍认为，长波长光子的激发对细胞和组织的光毒性小，且自体荧光和动物组织的光吸收都是最小。这些因素意味着红色的荧光基团对比度提高（因为背景应该降低），且更适合于体内成像。于是，荧光蛋白的改造慢慢向红色偏移。最初是黄色荧光蛋白，1999 年人们在银莲花中发现了橙红色的荧光蛋白同源物，称之为 DsRed（发射峰在 583 nm）。DsRed 的出现让研究人员认识到荧光蛋白的多样性，同时也有了更丰富的改造模板。之后，更长波长的荧光蛋白也陆续出现，如 mStrawberry、mCherry (2004)、mApple (2008)、mRuby (2009)，它们的名字也都相当动听。

对于活体动物成像而言，最好工具是远红外荧光蛋白。然而，要产生远红外荧光，这些蛋白需要被 600 nm 左右或以上的光激发，但这些光在到达深处的组织之前，就已被血红蛋白大幅度减弱。因此，到现在为止还未开发出激发光谱在 700 nm 附近的荧光蛋白。远红外荧光蛋白的开发遇到了瓶颈。

实际上，大自然蕴含的丰富资源已经解决了这个问题，只是我们不知道而已。钱永健的实验室最近揭开了谜底。他们没有像惯常一样，从红色荧光蛋白开始，将它们改造得更亮，而是从一种新的骨架来开发红外荧光蛋白。他们从一种耐辐射奇球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的细菌光敏色素骨架入手，这种光敏色素吸收 700 nm 左右的光。它还结合了一种名为胆绿素的辅因子，作为发色团。

利用饱和突变和 DNA 改组 (DNA shuffling) 来改变胆绿素发色团的蛋白残基，钱永健及他的同事们发现了一种光稳定的红外荧光蛋白突变单体，它的激发波长是 684 nm，发射波长是 708 nm。当他们利用腺病毒载体在小鼠肝脏表达这种突变体时，观察到强烈的红外荧光。

除了体内成像应用，这种红外荧光蛋白还能用于细胞成像。它的颜色与目前存在的荧光蛋白不同。而且，红外区域的细胞自体荧光几乎是不存在的，因此提供了更清晰的图像。此外，它还能在荧光共振能量转移 (FRET) 中发挥作用。钱永健实验室的研究人员表示，红外荧光蛋白应该不会局限于耐辐射奇球菌的光敏色素，还存在许多种细菌光敏色素，它们的吸收最大值在 650 到 750 nm 之间。这些也是红外荧光蛋白的有力候选，它们能用于多色成像、以及体内 FRET 成像的供体或受体。

绿色荧光蛋白不再是孤独的，它有了橙色、红色等多种荧光蛋白的陪伴。然而，要找到个“门当户对”的伴侣也不容易。就融合应用、亮度、光稳定性而言，与 EGFP 相似的还真没有。而且，一些红外荧光蛋白仍保留了基本的绿色荧光组件，因此不可能与 EGFP 一起应用于两色成像。科学家的近期目标是开发出与 EGFP 各方面都匹配的红色荧光蛋白。当然，红色荧光蛋白变异体的改造仍在持续。

荧光蛋白已经给生物学带来了很多惊喜。通过常规的基因操纵手段，用荧光蛋白来标记其他目标蛋白，这样就可观察、跟踪目标蛋白的时间、空间变化，提供了以前不能达到的时间和空间分辨率，而且可以在活细胞、活体动物中观察到一些分子。荧光蛋白甚至协助了 HIV 研究。

德国的研究人员就开发出一种光转变荧光蛋白 (photoconvertible fluorescent protein)，能观察 HIV 在感染的细胞中如何装配及释放。这种名为 EosFP 的光转变蛋白发出强烈的绿色荧光，在紫外照射下会转变为红色。紫外光通过打断发色团旁边的肽骨架而改变了蛋白的发射波长。这样 EosFP 就称为一种极佳的失踪标记。研究人员将 EosFP 与 HIV 的结构蛋白-Gag 相连，实时追踪了病毒颗粒在感染的细胞膜上如何装配并释放。光转变荧光蛋白让研究人员又多了一种选择。

荧光蛋白的下一个惊喜将会是什么？我们无法回答，但我们期待着。

# GE 推出捕获 Fab 抗体片段的新品

通用电气医疗集团近日推出了一种新的试剂盒 Human Fab Capture Kit, 能在 Biacore 仪器上快速可靠地筛选人 Fab 抗体片段。此试剂盒能够处理细胞裂解液、周质提取物或纯化的 Fab 片段。



Human Fab Capture Kit 包括 Human Fab Binder、固定化缓冲液和再生溶液。它还需要其它一些试剂，如传感芯片 CM5、胺偶联试剂盒和运行缓冲液，这些可从通用电气医疗集团购买。Human Fab Binder 是单克隆抗体混合物，能识别含有 kappa 和 lambda 亚型的 Fab 轻链片段。它特异结合人抗体的 Fab 区域，而不会与 Fc 区域结合。它识别 kappa 和 lambda 轻链的大部分亚型，但不与其他物种的 Fab 交叉反应。

首先利用固定化缓冲液和胺偶联试剂盒将 Human Fab Binder 固定在传感芯片表面。Fab 片段也注射在表面，被固定的 Human Fab Binder 捕获。同时研究 Fab 片段与抗原的相互作用。最后，利用试剂盒中提供的再生溶液去除芯片表面捕获的 Fab 及其他分子。

利用 Human Fab Binder 的广泛特异性，确保 Fab 片段被快速可靠地筛选，且有着高的捕获效率和稳定性，能确保长期分析运行过程中得到可靠的结果。此试剂盒中的试剂经过预先优化，无需寻找试剂，也将分析开发和验证最小化，从而节省了时间和费用。此外，在不同项目之间只需要很少的调整，因为固定和再生条件都是非抗原依赖的。

[点击索取Human Fab Capture Kit的更多资料！](#)

特点：

- Human Fab Capture Kit 中的预优化试剂能够在 Biacore 系统上筛选及鉴定 Fab 片段
- 高分辨率的 off-rate 排名，在工艺早期提供了必要的信息
- 新颖的 Human Fab Binder 有着高的捕获效率和好的稳定性
- 广泛的特异性实现了人 IgG Fab 片段的 kappa 和 lambda 亚型的捕获
- 高质量试剂经过预先优化，能节约宝贵的时间及费用

(生物通 余亮)

# Bio-Rad 推出新试剂，5 分钟提取 RNA

Bio-Rad 公司近日推出一种新试剂- iScript™ RT-qPCR Sample Preparation Reagent, 只需 5 分钟, 就能分离出反转录和实时定量 PCR 即用的总 RNA.

常规的 RNA 纯化方法不外乎有机提取或柱纯化, 要么使用有机溶剂, 要么用磁珠, 通常需要裂解、结合、洗涤等若干步才能将 RNA 与基因组 DNA 分离, 至少需 30 分钟才能完成。iScript™ RT-qPCR Sample Preparation Reagent 采用一种全新的方法来纯化 RNA, 是快速、高通量基因表达分析 (比如 RNAi 结果的验证) 的理想工具。

iScript RT-qPCR Sample Preparation Reagent 采用细胞膜的选择性裂解, 同时保留核膜完整, 在 5-10 分钟内获得无 DNA 污染的 RNA。单个的缓冲液配方包含了裂解细胞、稳定 RNA 和去除基因组 DNA 的所有成分, 实现了高、中、低拷贝数目的基因的灵敏检测。它还能够实现最多 4 个目标的多重实时检测, 而起始细胞量最低只要 10 个。

操作过程如下: 将细胞置于 iScript™ RT-qPCR Sample Preparation Reagent 中, 温和涡旋 30 秒, 完成细胞破碎和裂解。试剂同时稳定了 RNA, 有效抑制了细胞内的 RNase。之后是两分钟的高速离心, 得到总 RNA, 收集上清, 而基因组 DNA 在沉淀中被除去。RNA 的制备过程就这

么简单, 不需要再做进一步处理, 就可立即进行下游的反转录和 PCR/qPCR。

Bio-Rad 公司负责 PCR 试剂的高级产品经理 Viresh Patel 认为: “相对于反转录和定量 PCR 的费用, RNA 样品制备的费用是相当高。对于那些想进行高通量基因表达分析研究人员来说, 这个试剂是更加经济的选择。”

分离得到的 RNA 可存放在 -20°C, 6 个月之内稳定。该试剂可与多种 PCR 或定量 PCR 试剂兼容。如果你想了解更多信息, [请点击此处索取资料](#)。

## 特点:

- 5-10 分钟内快速去除基因组 DNA, 稳定 RNA
- 对细胞裂解液中的高、中、低拷贝数目的基因进行灵敏检测
- 实现最多 4 个目标的多重实时检测, 而起始细胞量最低只要 10 个
- 分离的 RNA 在冷冻状态下至少稳定 6 个月

(生物通 余亮)

# Illumina 推出 cBot 簇生成系统， 简化新一代测序

在上个月举办的美国人类遗传协会的第 59 届年会上，Illumina 公司推出了全新的 cBot 系统，有助于新一代测序流程的自动化。cBot 自动化系统能从单分子 DNA 模板中产生克隆簇，为 Genome Analyzer 的边合成边测序做准备。

cBot 是一种即插即用，用户可自行安装的系统，用于测序文库的克隆扩增。它的自动化设计排除了用户干预，能够在四小时内完成克隆扩增，而手工操作时间仅为 10 分钟。cBot 的创新设计还包括即用型的试剂、简单的触摸屏操作和基于浏览器的远程监控。智能传感器通过监控仪器性能，来确保高质量的结果，新的试剂和流程也实现了更高密度的簇，提供了测序准确性。

Illumina 专利的簇生成过程就简便性和操作时间而言，优于乳液 PCR 等方法。cBot 进一步简化了流程，让测序操作更高效。在使用 cBot 时，用户只需插入配制好的试剂架，以及流动槽和样品，按下开始键即可。

cBot 应用广泛，可用于 DNA 测序、基因调控分析、基于测序的转录组分析、SNP 发现和结构变异分析、细胞遗传分析、DNA-蛋白相互作用分析（ChIP-Seq）、测序法甲基化分析、小 RNA 发现和分析等。

目前，Illumina 的测序已经实现了 2×100 bp 的长读长，相对于之前的 2×50 bp 已经翻了一番，

且单次运行能产生 50 GB 以上的数据。根据 Illumina 年初制定的测序仪发展蓝图，它计划在今年实现每次运行获得 95 GB 以上的高质量数据。距离年末还有两个月的时间，让我们拭目以待！

在这次大会上，Illumina 公司还宣布了 2010 年 Infinium 全基因组基因分型平台的蓝图。它计划开发出新的产品，能够分析每个样品中多达 500 万个变异体。这些产品将包含来自千人基因组计划的高价值内容。（生物通 余亮）

## cBot 簇生成系统的优势：

- 高效-4 小时完成自动化簇生成，手工操作时间不到 10 分钟
- 易用-即用型的试剂，预包装成 96 孔板形式，简单的触摸屏仪器操控，基于网络浏览器的远程监控
- 高质量的结果-智能传感器监控性能，改进的试剂及步骤，能获得更高密度的簇及更高的测序准确性

# Promega 公司推出 HaloTag® 蛋白纯化系统

——使难表达蛋白的纯化更为简单

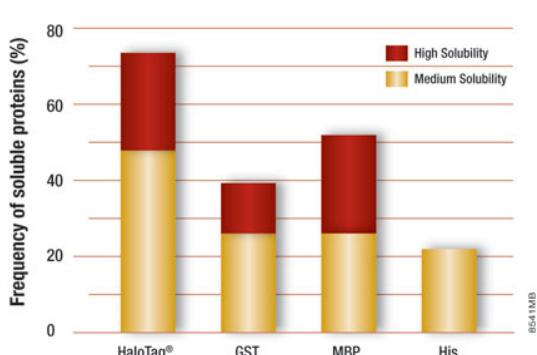
Madison, WI USA. (2009年11月12日) Promega公司新近推出了HaloTag®蛋白纯化系统，旨在解决重组蛋白纯化中的常见难题，即获得高回收率、高纯度的可溶性重组目的蛋白。新型的HaloTag蛋白纯化系统能够帮助用户持续地得到可溶性蛋白，性能好于常用的蛋白标签（如His6Tag、GST以及MBP）纯化方法。

参与该产品测试的研究人员认为，对科学家而言，HaloTag蛋白纯化系统是进行“难表达蛋白”研究的一个令人兴奋的新选择。这些测试者特别指出，这个简单、快速、易于操作的系统避免了其它表达方法所带来的难题：蛋白产量低或得不到蛋白、蛋白纯度差，等等。

在设计HaloTag蛋白时，力求其在结构上与其共同构成融合蛋白的目的蛋白保持兼容，同时，还具有以下优势：

- 在E. coli表达系统里，与传统的亲和标签（如His6Tag、GST以及MBP）相比较，HaloTag蛋白纯化系统能够得到更多的可溶性蛋白。
- 在多种系统中蛋白表达均有改善。
- 更高的产量和纯度。

请查阅scientific poster，获得更多信息。



HaloTag蛋白纯化系统是Promega提供的蛋白研究工具中的最新补充，这类产品仅需构建一个基因结构即可用于研究生化和细胞环境下蛋白质的功能。HaloTag技术基于一种独特的蛋白标签，是从细菌脱卤素酶经过基因工程改造而来，可与合成的一系列配基发生共价结合（比如带有荧光染料的配基）用于成像领域的研究；这些配基也可以与树脂或磁性颗粒结合，用于蛋白相互作用的研究。

更多信息，请访问 [HaloTag Protein Purification online resources](#).

## 关于 Promega 公司

普洛麦格公司在为生命科学领域提供创新的解决方案和技术支持方面处于领先地位。公司的2000余种产品使全世界的科学家加强了在基因组学、蛋白质组学、细胞分析、分子诊断和遗传鉴定等方面的知识。公司成立于1978年，总部坐落在美国威斯康辛州的麦迪逊市，在14个国家设有分公司，拥有超过50家全球性的经销商。关于普洛麦格公司的详细信息请访问[www.promega.com](http://www.promega.com)。

[更多相关技术资料>>>](#)

# 选对抗体 发好文章

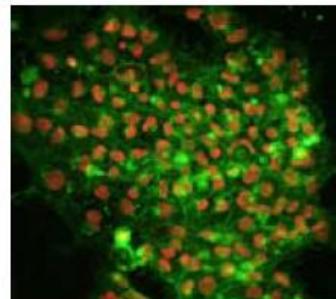
慢性肉芽肿病 (chronic granulomatous disease, CGD) 是一种影响儿童感染康复生存几率的遗传性疾病。患者的吞噬细胞缺乏NADPH氧化酶活性，不能产生活性氧分子，尤其是超氧阴离子，致使细菌和真菌感染反复发生。然而，这种过激炎症反应的确切机制仍不清楚。根据《Nature》杂志发表的一篇文章，意大利佩鲁贾大学的研究人员通过研究，表明在患有致命肺部曲霉病的CGD小鼠中，犬尿氨酸代谢通路中色氨酸代谢的过氧化物依赖步骤被阻断，导致 $\text{V}\gamma 1^+ \gamma\delta$  T细胞活性不受控制，大量产生IL-17，并伴随急性炎性肺部损伤。研究人员发现有效的治疗方法是在通路阻断的另一侧用天然的犬尿氨酸替换治疗，并同时注射重组干扰素- $\gamma$ ，来恢复下游的免疫活性代谢物，并促进 $\text{V}\gamma 4^+ \gamma\delta$  和 $\text{Foxp3}^+ \alpha\beta$  调节性T细胞的生成。

在本研究中的一个关键步骤，研究人员使用了R&D Systems的IL-17单克隆抗体(MAB421)在CGD小鼠体内中和IL-17后能有效提高CGD小鼠生存率，从而验证IL-17在CGD小鼠感染模型中扮演的角色。别小看这个抗体，只有用天然或重组的完整蛋白免疫动物，才能最好地筛选出针对蛋白的活性区域结合的中和抗体----很多品牌都没有这个抗体，就是因为没有天然或重组的完整蛋白免疫动物。

R&D Systems的抗体自主生产，绝大多数的免疫原选用具备活性结构区域的天然或重组蛋白，有效保障抗体的高特异性和高亲和力。R&D Systems的多抗经过抗原亲和纯化，从而比单抗更容易有阳性信号，而又能降低非特异性，广泛应用于免疫组化、Western Blot等实验。比如人Nanog多抗AF1997在干细胞iPS研究中的应用发表在Cell等刊物。R&D Systems的抗体都经过严格的实验验证，应用范围明确标注，方便科研人员根据实验要求选购。[索取更多资料](#)



Nestin in Human Neural Progenitor Cells.



Alkaline Phosphatase and Oct-3/4 in Human BG01V Cells.

## 如何正确选择抗体？

抗体的种类繁多，各种来源和标记令人眼花缭乱，供应商也参差不齐。如何选择合适的抗体确实是个令人头痛的问题，不妨从下面几个方面着手选择：

1 特异性：抗体能否特异性地结合特定的抗原，自然是选择正确抗体的关键。同时还需要关注抗体特异识别抗原的部位，交叉反应性和抗原抗体结合的亲和力。特异性与抗体制备时使用的抗原和抗体纯化工艺密切相关。

2 来源和标记：通常单克隆抗体来源于小鼠，多克隆抗体来源于兔和山羊；以生物素，各种酶和荧光素标记，可根据实验需要来选择。

3 应用：不同的抗体能应用于不同的实验，如  
**ELISA, IHC, FC, WB** 和体内功能性实验等等，  
往往需要通过相应的实验来验证，实验时根据样本  
和目的不同来选择。

### 部分畅销产品介绍

相关发表文章	货号	种类	品名	抗体应用	包装
<b>nature</b> Lugrina, R et al. (2008) <i>Nature</i> 451:211.	MAB421	单抗	Mouse IL-17 MAb (Clone 50104), Rat IgG2A	中和/阻断 Western Blot	500 µg
<b>Cell</b> Takahashi, T et al. (2007) <i>Cell</i> , 131:861.	AF1997	多抗： 经抗原亲和纯化	Human Nanog Affinity Purified Polyclonal Ab, Goat IgG	免疫纯化 Western Blot	50 µg
<b>nature neuroscience</b> Miyawaki, T et al. (2009) <i>Nat Neurosci</i> 12:618.	AF887	多抗： 经抗原亲和纯化	Phospho-Akt (S473) Pan Specific Affinity Purified PAb, Rabbit IgG	流式、免疫纯化 Western Blot	100 µg
<b>nature</b> Schattner, T et al. (2008) <i>Nature</i> 451:345.	FAB9381P	流式抗体： 检测癌细胞表面蛋白	Human VE-Cadherin Phycoerythrin MAb (Clone 123413), Mouse IgG2B	流式	100 Tests
<b>nature cell biology</b> Tian, C et al. (2009) <i>Nat Cell Biol</i> 11:580.	IC1259P	流式抗体： 检测癌细胞内蛋白	Human Nestin Phycoerythrin MAb (Clone 196908), Mouse IgG1	流式	100 Tests
<b>Science</b> Stormer, J M et al. (2007) <i>Science</i> 318:287	HAF1355	HRP-p53抗体	Human/Mouse/Rat p53 HRP Affinity Purified Polyclonal Ab, Goat IgG	Western Blot	100 µL
	ARY001	磷酸化蛋白芯片	Human Phospho-RTK Array Kit 检测42种受体酪氨酸激酶激酶 (内含4张芯片)	检测42种磷酸化	1 Kit

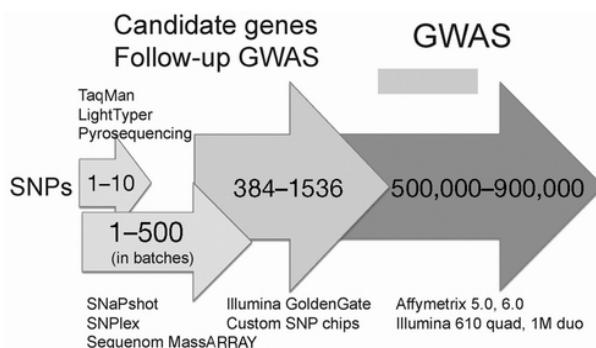
# 11月冷泉港实验手册关注高通量基因分型

每月，冷泉港实验手册都会发布若干实验手册，聚焦生物学实验的方方面面，不过是要收费的。但他们每次也会挑出 2 篇 protocol，作为范例，供大家免费下载。11 月的免费 protocol 是关于高通量基因分型和双分子亲和纯化（BAP）。

## Protocol 1 : Laboratory Methods for High-Throughput Genotyping

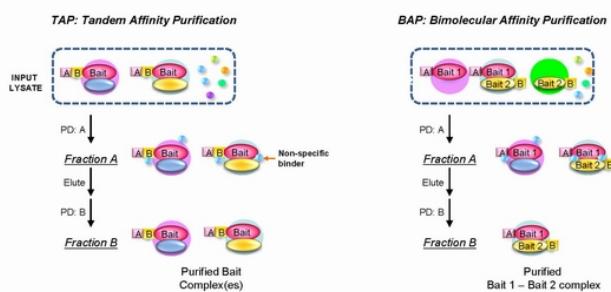
近年来，高通量实验方法的引进大大加速了复杂疾病遗传学的研究。它能准确高效地确定多个个体的基因型，从而让遗传研究覆盖多个变异数体，而不是仅仅关注一两个变异数体。芯片法基因分型分析，再加上对连锁不平衡（LD）模式的了解，刺激了复杂疾病的全基因组关联研究（GWAS）。近年来，GWAS 成功鉴定出多个影响患病风险的基因，显示出这项技术的巨大潜力。高通量基因分型中的关键问题是根据你的目标和实验阶段选择合适的技术。

本文介绍了高通量 SNP 基因分型中常用几种方法，适合遗传研究的不同阶段，并简要回顾了一些高通量测序方法。简单说来，文中讨论了三类研究：候选基因、连锁分析和 GWAS。不同的技术适合不同的项目和规模，请看下图。技术不同，通量不同，每个 SNP 基因型的费用也有差异。详细内容请点击标题查看。



## Protocol 2 : Bimolecular Affinity Purification (BAP): Tandem Affinity Purification Purification Using Two Protein Baits

串联亲和纯化（TAP）技术首先在酵母中运用，以纯化和鉴定蛋白复合物。尽管亲和纯化较易操作，但非特异的蛋白相互作用会影响真实模式的鉴定。为了缓解这个问题，人们开始在 TAP 过程中采用两步连续的亲和纯化。最初在酵母中实践，慢慢地这种技术经过修改，也延伸到其他的物种，包括哺乳动物。在这个实验手册中，作者们对 TAP 技术有了一些改动，将亲和部分放置在复合物中的两个不同蛋白上，以检测或分离复合物中的成分。他们将此称之为双分子亲和纯化（BAP），适用于纯化有两个已知成分的复合物。BAP 与 TAP 的比较请看下图。



# BioTek 与 Millipore 联合发布 应用指南 聚焦激素分析

BioTek 仪器公司近日联合 Millipore 公司，发布了一份应用指南-“代谢激素分析中的自动化磁珠洗涤”，应用到 BioTek 新出的 ELx405 Magnetic Bead Washer 和 Millipore 的 MILLIPLEX™ MAP Metabolic Hormone Assay Panel。此份指南详细描述了 ELx405 Magnetic Bead Washer 如何应用在 MILLIPLEX MAP 分析的各个自动化洗涤步骤中。

谈到代谢综合症，它是目前关注度极高的一类疾病，包括冠心病、心血管疾病和 II 型糖尿病。代谢综合症的患者会表现出较低程度的炎症，据推測是由促炎症因子和抗炎症因子的失调而引起。因此，这方面的研究覆盖了多个分析物，具体有细胞因子、急性期蛋白、糖尿病生物标志物、肥胖相关激素等。

Millipore 的 MILLIPLEX MAP 试剂盒可以让研究人员利用传统的免疫检测技术快速、精确和大量地同时在同一样品中检测多达 14 个生物标志物。分析过程中会使用到微米大小的磁珠，且磁珠须洗涤多次，ELx405 Magnetic Bead Washer 保留了微孔板每个孔中的磁珠，能快速高效地完成洗涤。荧光标记的分析物分子上结合有一抗，可用 Luminex 平台进行检测。

BioTek 新推出的 ELx405 Magnetic Bead Washer 是专为使用磁珠技术的应用而设计。它拥有的第二送样器可将磁板定位至贴近微孔板底部的位置，并在关键的抽取环节中对磁珠加以保护。所有 ELx405 系列洗板机均配有 BioTek 独有的 AutoPrime™ 和 AutoRinse™ 功能，不仅性能可靠，而且可通过 BioTek 简单易用的 ActiveX™ 组件与标准的自动化系统相集成。

完整的应用指南可在 BioTek 的网站上下载，地址为：

<http://www.bioteck.com/resources/articles/metabolic-hormone-assay.html>。

(生物通 余亮)

# 两大著名公司纷纷展开收购行动

今年的生物行业比较沉寂，没有发生像去年 Invitrogen 收购 ABI 那样吸引眼球的大事，只有前段时间的安捷伦收购瓦里安，让大家热议了一把。随着目前经济的复苏，Qiagen 和 Life Technologies 也陆续展开了收购的行动。

Qiagen 前日宣布，它以 9000 万美元收购了一家名为 SABiosciences 的私人控股公司。这家公司位于美国马里兰州，是一家开发及生产疾病和通路相关的 PCR 分析试剂盒的公司，拥有百余雇员。它的主要产品线包括 100 多个实时定量 PCR 分析试剂盒，分析生物通路中的 DNA、RNA、表观遗传和 microRNA 靶点，这些通路与癌症、糖尿病等疾病相关，也涉及到凋亡、信号转导和毒理学。

Qiagen 表示这些分析试剂盒将用于生物医药研究和未来药物的开发。CEO Peer Schatz 认为，在收购完成之后，将会为 Qiagen 在药物和诊断学上的策略创造重大价值。Qiagen 打算扩大试剂盒的种类，并将 SABiosciences 的所在地作为生物制品开发的中心。

Qiagen 预计收购将会在 2009 年 12 月结束，它将会为明年的销售额带来约 2400 万美元的收益。

今天，Life Technologies 公司也宣布收购了一家基因组学技术公司 Biotrove，具体收购金额未透露。这项收购协议为 Life Technologies 带来了一项 OpenArray 高通量基因表达和基因分型的系统。该系统将用于新一代测序和 PCR 研究。

这两家公司自 2007 年起开始合作，Biotrove 的 CEO Al Luderer 称这次合并是完美的结合。“这次合并将让我们的客户在基因表达和基因分型流程上有更好更灵活的选择。”Life Technologies 也表示，OpenArray 平台的加入也为高密度分析形式提供了更好的分析内容。

ABI 将会开发 OpenArray 平台上的 TaqMan 基因表达和基因分型分析，品牌仍为 ABI。Life Technologies 预计此次收购不会对今年的收益产生重大影响。（生物通 余亮）

# 罗氏年终特惠一波接一波

又到了年末的疯狂打折季，罗氏应用科学部也举办了精彩的 2009 年终特惠系列活动，有产品打折、服务特价和新品试用，让所有的新老客户共同体验品质优异、性能卓越的罗氏产品带来"轻松实验、快乐生活" 新主张！

## 第一波：经典产品打折又送礼

罗氏应用科学部此次精选了多款经典试剂产品，不仅优惠幅度最大，还有精彩好礼相送。比如著名的 Fugene 6 和 Fugene HD 转染试剂，现在都是 75 折；蛋白酶抑制剂也是 75 折；逆转录和定量 PCR 试剂是 7 折；而标签抗体、Western blot 和免疫沉淀试剂更是低至 6 折。不仅折扣力度大，送的礼品也相当吸引。订单满￥3,000，送可爱的蛋糕毛巾！订单满￥20,000，送全年《瑞丽》、《ELLE》等热门杂志！订单满￥39,000，送冰箱或上网本！

更多优惠产品，请看：

<http://www.ebiotrade.com/custom/Roche/091111/index.htm>。

## 第二波：细胞分析仪免费试用

1999 年，Innovatis 制作出全球第一台自动化细胞计数仪。10 年来一直致力于细胞计数、分析、细胞质量控制的相关技术研发和仪器生产，全球有超过 2500 台仪器服务于科研，药物研发机构，是国际著名的细胞计数分析仪生产厂商。罗氏应用科学部已于今年成功收购 Innovatis 并结合 xCELLigence 实时细胞分析系统，为全球客户提供独具特色与高效的细胞分析技术平台。

Cedex 系列产品 (XS/HiRes) 采用传统酞酚兰排斥法进行细胞死活判别，集合高品质成像技术进行细胞计数和分析。让你可以更加准确、便捷知道样本的细胞数量/浓度，细胞活率，细胞直径，细胞成团能力，细胞圆度的多种信息，让你在计数

同时更加了解细胞的特性，使得细胞质控易于掌握。

CASY 系列产品采用独特的电脉冲分析技术，突破传统的二维细胞成像分析技术和染色法的局限，提供更精确的无需标记细胞计数和细胞分析功能。让你了解你细胞浓度，细胞活率，细胞直径，细胞体积变化等多种信息，超宽的动态范围使得检测对象可以扩展至细菌、酵母、细胞、颗粒。

现在你还有机会免费试用这两款仪器哦，请浏览 <http://www.ebiotrade.com/custom/Roche/091111/index2.htm>，申请样机使用。

## 第三波：NimbleGen 序列捕获芯片服务 45 折优惠

罗氏 NimbleGen 于去年底推出了革命性的序列捕获芯片，大大便利了新一代测序研究。高密度 NimbleGen 2.1M 芯片可为下游测序直接捕获所有编码外显子，为孟德尔遗传疾病研究鉴定致病突变。NimbleGen 385K 芯片富集由 GWAS 研究鉴定出的疾病相关区域，针对研究样本的罕见致病变异进行探索。

现在，你只要在 12 月 18 日之前将基因组 DNA 寄送到罗氏 NimbleGen 实验室，让 NimbleGen 服务实验室专家为你捕获感兴趣的区域，就可以享受目录价格的 45 折，还免收芯片处理费。你将收到富集的 DNA 样本，可立即在第二代测序系统上进行测序。

详细信息请浏览：

<http://www.ebiotrade.com/custom/Roche/091111/NimbleGen.htm>。

# 两大顶尖研究院升级测序装备

英国 Wellcome Trust Sanger 研究院是世界顶级基因组研究中心之一。根据该研究院 2008/09 的年度回顾，它计划在未来的一年里升级测序装备。目前 Sanger 研究院的硬盘容量为 3 petabyte (拍字节，相当于 GB 的百万倍)，它计划在明年再增加 800 TB (terabyte)。另外，它还计划将 300 个服务器虚拟成不到 20 个刀片计算机，大大降低空间和能源的损耗。

Sanger 研究院还表示，它将会把测序的重心从千人基因组计划和癌症基因组计划等大规模项目转移到临床研究，致力于从病人样品中获得序列信息。“主要的挑战在于了解变异的重要性，以及它对个体来说意味着什么。”

Sanger 明年的计划还包括：探索云计算等新兴技术；开发新的统计学策略以确定对人类疾病很关键的通路及网络；继续大规模功能研究中的精选基因发现；将千人基因组计划和其他研究的大规模测序数据组整合；利用模式生物进行特定疾病基因和通路的功能研究。

根据年度回顾，Sanger 研究院每年的花费在 8-9 千万欧元，约合 1.325-1.49 亿美元。其中 1430 万欧元来自 Wellcome Trust 信托基金会本身，其他资金来自欧盟、英国医学研究理事会、英国癌症研究院和美国 NIH 等其他机构。

几乎同时，美国著名的麻省理工和哈佛大学 Broad 研究院从 Illumina 公司购买了 30 台

Genome Analyzer，这样该研究院中 Illumina 测序仪的数量升至 89 台。

Broad 研究院测序部门的主管 Robert Nicol 提到，新购买的仪器将用于全基因组、全外显组和全转录组的测序分析。他表示，Broad 研究院对该技术的准确性、易用性和可扩展性很满意，而且持续的系统改良让他们能够在多次运行中产生 50 GB 以上的高质量序列数据。

近日，Broad 研究院也发布了一项历时 3 年的测序成果。他们所领导的研究小组对一匹名叫“黎明”的雌性“纯种马”进行了基因组测序。他们发现，“纯种马”基因组共有 25 亿至 27 亿个碱基对，比家养狗的基因组碱基对稍多，但低于人类以及牛的基因组碱基对数量。该项研究发表在 11 月 6 日出版的新一期《科学》杂志上。

(生物通 余亮)