

EBIOTECH

生物通技术周刊

第71期

2009年12月25日

全文下载

【技术前沿】

[新技术]组织特异的miRNA海绵
关联代谢组和基因组的新型芯片
miRNA表达谱——肿瘤的生物标记物

【新品速递】

ABI推出第一台声波聚焦流式细胞仪
罗氏454即将推出新的测序仪
揭开低丰度蛋白的秘密
在活细胞内实时观察细胞周期
新型微流体miRNA表达谱芯片
康成生物最新推出lncRNA芯片技术服务
Pierce体外表达试剂盒让翻译和修饰更准确

【应用指南】

Acumen eX3在肿瘤学研究中的应用
从组织到细胞的快速途径
磷酸化蛋白质组的研究工具
12月冷泉港实验手册聚焦荧光蛋白
使用阵列式SPR传感器ProteOn XPR36系统进行受体功能研究
使用ProteOn XPR36系统进行蛋白和小分子化合物之间相互作用的分析

【行业动态】

TTP LabTech拓展了高通量筛选设备的液体处理能力
GE BioProcess News第四期精彩内容抢先看
寻找中国所有的MACS用户！

主办：



生物通版权所有 谢绝转载 本期责编:余亮 制作:吴春红
广告联系电话:020-87511980 欢迎访问:www.ebiotrade.com

[新技术]组织特异的 miRNA 海绵

众所周知，miRNA 是基因表达的重要调节器，但大部分 miRNA 与靶点相互作用的功能仍然是难以捉摸的。为此，哈佛大学医学院的研究人员开发出一种有力的 miRNA 海绵（miR-SP）技术，能在精确的时空分辨率下剖析每个 miRNA 的功能，文章发表在近期的《Nature Methods》在线版上。

尽管基因组技术大大促进了 miRNA 的快速鉴定，但对 miRNA 的功能了解仍受到现有技术的限制。比如，多个 miRNA 的功能都来自异常表达（misexpression）研究。在果蝇中，miR-7、miR-iab-4-5p 和 miR-315 的过表达暗示了这些 miRNA 分别参与了重要的信号通路，如 Notch、Ubx 和 wingless。由于每个 miRNA 都可能与许多 miRNA 相互作用，那么异常表达会导致原本因时空限制不受调控的基因变得沉默，从而产生新的表型。基于这个原因，大部分 miRNA 的功能获得实验都需要功能丧失数据的验证。

现有的 miRNA 功能丧失分析工具都不是特别理想。经典的基因敲除非常耗时，不能够同时沉默序列冗余的 miRNA，在时空分析上灵活性不佳。化学修饰的合成寡核苷酸可沉默 miRNA 个体和家族，但是不大适合发育或生理研究。近两年出现的 miRNA 海绵（miRNA sponges，一种从质粒或反转录病毒载体中表达的修饰反义寡核苷酸）为深入了解 miRNA 功能带来了希望，但它主要局限在细胞培养系统或移植组织中。如何实现有效的体内导入和靶定，这是一个挑战。

时空特异性转基因表达的可靠方法是基于外源 DNA 重组酶 Cre 或转录因子 Gal4 的表达系统。Carlos Loya 及其同事于是将修饰的 miRNA 互补寡核苷酸置于上游激活序列（UASs）的下游，产生了转基因的 miRNA 海绵。miR-SP 能鉴定组织特异性的 miRNA 功能丧失表型，确定效应器的空间调节，并了解 miRNA 与其他基因之间的相互作用。

研究人员发现这种构建体与 Gal4 的组合能表达出足够的 miRNA 沉默物，在完整的果蝇中实现 miRNA 的时空抑制。利用 miR-SP 系统，他们鉴定出保守的 miRNA miR-8 在神经肌肉结点形成上的重要作用。miR-SP 系统有望阐明任何物种中 miRNA 的内源功能。

原文检索：

Transgenic microRNA inhibition with spatiotemporal specificity in intact organisms

Nature Methods

Published online: 15 November 2009 |
doi:10.1038/nmeth.1402

关联代谢组和基因组的新型芯片

即使新一代测序平台为科学家们带来了快速准确的基因组测序，但基因注释和功能鉴定的路依旧漫长，而且它们之间的缺口越来越大。众多基因组计划产生了大量的酶，但无从得知它们的作用，最多也只是从序列比较中推断其功能。比如全球海洋取样计划发现了 2700 万个开放读码框，编码 570 万个非冗余蛋白序列，但只有一小部分得到了鉴定。

为了揭开代谢组学的秘密，全面了解生物样品中发生的代谢过程，西班牙马德里催化研究所（Institute for Catalysis）的 Manuel Ferrer 和同事根据酶-底物的相互作用开发出一种新型芯片，称之为反应组芯片（Reactome Array）。他们将大量已知的代谢物和酶的底物系在芯片上，然后暴露在细胞裂解液中。每个目标分子掺入了一个 Cy3 标记，最初受到分子内淬灭；一旦酶结合和催化，底物释放，淬灭也就解除。

据 Ferrer 介绍，每个 spot 所获得的荧光信号为裂解液中存在的酶活性提供了定量信息，而芯片结果的生物学分析对抽样时细胞中的代谢网络有了整体了解。底物还能捕获反应的酶，这样感兴趣的芯片结果可用质谱进一步分析。

此种芯片的主要优势在于关注生物化学相关的相互作用，是不依赖于物种的。芯片中包含的分子是所有物种通用的。因此，它适用于所有样品，从单细胞到环境样品，到组织、血液等等。

在初期试验阶段，研究小组鉴定了恶臭假单胞菌（*Pseudomonas putida*）的反应组，发现他们

的酶-底物图谱和预测与京都基因与基因组百科全书（KEGG）中对该物种的注释有着强关联。他们还能直接指出多种酶的功能，并定义它们的功能注释。

研究环境样品中的生态系统具有相当的难度，一克土壤中含有数百万个反应、酶和微生物。不过，鉴于反应组芯片的物种不依赖性，它能够从多个环境中挖掘出信息量丰富的代谢组数据。例如，他们发现一个矿物质丰富的地热池中，生物体内铁和硫氧化的酶活特别高。

此项技术在基础研究和应用研究上都有许多潜在应用，包括生理变化的鉴定，了解是什么导致了癌症或感染，或分析转基因植物的代谢改变。

原文参考：

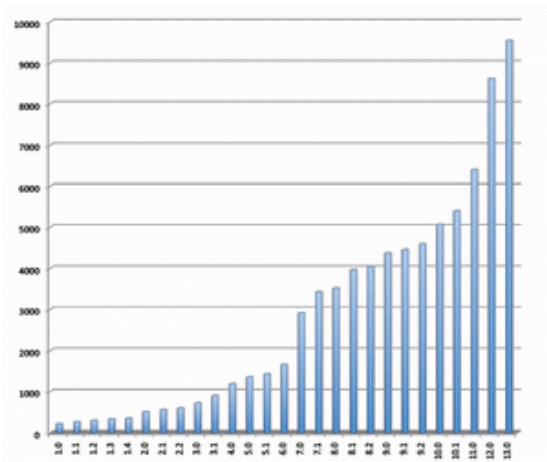
Reactome Array: Forging a Link Between Metabolome and Genome

Science 9 October 2009:

Vol. 326. no. 5950, pp. 252 - 257 DOI: 10.1126/science.1174094

miRNA 表达谱——肿瘤的生物标记物

2009 年 9 月 15 日, Sanger microRNA 序列数据库(miRBase) (<http://www.mirbase.org/>) 升级至 14.0 版。新增 1580 条 miR 序列。至此, miRBase 中的 microRNA 序列信息已超过 10,000 条。14.0 版本共收录 10,581 条成熟 miRNA 序列信息, 通过验证的 microRNA 发夹前体从 9,539 条增至 10,883 条, 共涵盖 115 个物种。收录于 miRNA 序列数据库的 miRNA 序列数量越来越多 (见图), 有关 miRNA 研究的文章和出版物也层出不穷, 由此表明, miRNA 的研究已经成为目前生命科学领域最重要的研究课题之一。



发行于不同版本 miRNA 数据库的 miRNA 的数量变化示意图

更为重要的是科研工作者的研究必须与迅速增长的 microRNA 数据库保持一致, 这是确保研究者不错失相关信息的关键。获得 miRBase 最新数据更新是确保完成 miRNA 表达谱系分析的唯一途径。对生物标记物研究来讲, 评估单个 miRNA 起着重要的作用。在疾病诊断方面, 进行 miRNA 独特生物标记的多重分析, 对于疾病 (例如癌症) 的分类或预后具有重要意义。

然而, 一个单独的生物标记物往往在特异性及灵敏度方面受限, 而 miRNA 表达谱具有高特异性, 因此它可以反映肿瘤的进化谱系和分化。这样, 为了将 miRNA 作为诊断标记, 有必要对其进行多样性分析。由于高通量技术的使用例如微点阵分析,

能够区分单个 miRNA, 并可以高度精确性地完成 miRNA 标签信息的收集。

最近, 与德国癌症研究中心 (DKFZ) 合作的, 德国 Febit 公司通过应用 Geniom 生物芯片系统, 发现在胰腺癌病例存在有 miRNA 生物标记物 (和文献报道一致)。应用微点阵观察结果显示, 与从较老版本的 miRNA 序列数据库获取资料相比, 使用升级版数据库 (12.0 版本代替 11.0 版本) 能够多获得 25% 的信息。在借助生物标记物来评估胰腺癌的过程中, 使用了新的 miRNA, 而这种 miRNA 只能从 12.0 版本的 miRNA 序列数据库获得。这也说明生物医药应用与不断增长的数据资料保持一致的重要性。

Geniom 生物芯片提供研究者最新的 miRNA 生物芯片。微流体微点阵系统, 具备灵活性以迅速地适应新的序列信息。基于最新数据资料, 最佳化的捕获探针的合成, 是直接在生物芯片的微通道内完成的, 从而保证了芯片的生产和最新 microRNA 同步的独一无二优势。吉奥生物和德国 Febit 联合推出了和 Sanger miRBase 14.0 同步的 [miRNA 表达谱芯片](#)。

如果需要, Geniom 生物芯片探针能够很容易地根据研究人员的需要而定制。样本检测所需时间短, 能够迅速提供可以直接用于发表的数据, 因此

在竞争激烈的生物医药研究领域,具有不可替代的地位。

[点击索取Geniom生物芯片的更多资料!](#)

什么是 miRNA(microRNA)?

miRNAs 是一类内源性、约 22 个核苷酸长度的非编码 RNA, 具有稳定的特异性序列以调节基因表达。2001 年, miRNAs 作为线虫生长发育过程中的调节器而被发现, 在病毒、植物和动物体中, miRNAs 已被公认为主要的调控基因家族之一, 通过 mRNA 靶向作用降解或抑制其翻译。

与蛋白编码基因谱相比, 用 miRNA 表达模式来划分癌症类型的可靠性出乎意料(Lu et al., 2005; Rosenfeld et al., 2008)。此外, 在常规收集的、福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 的临床组织标本中, miRNAs 的表达具有特异性和稳定性, 更进一步证明其作为诊断性生物标记的巨大潜能(Li et al., 2007)。

在哺乳动物基因组中, 约有 70% 的 miRNA 基因定位于特定转录单位。他们经常存在于蛋白编码基因的内含子处, 并且优先排列在与其具有相同靶 mRNA 的结构处(Kim and Nam, 2006)。另一种情况, miRNA 基因可能定位于非编码转录单位的内含子或外显子处。组织特异的 miRNA 表达的调控至今没有完全阐明。

然而, 目前的研究清楚地显示 miRNAs 表达与多种人类恶性肿瘤相关, 提示它们代表着一种新型癌症生物标记信号。在特定癌症中找出相关的 miRNA, 能够提供给我们有用的诊断信息, 从而为疾病分类, 以及制定出可行的治疗方案打下基础。

产生机制及分子学功能

miRNAs 产生过程的第一步(Liu et al., 2008): 在 RNA 聚合酶 II 介导下转录生成一条长的原始 miRNA 分子, 称为 pri-miRNAs。此前体物在细

胞核中被所谓的微处理器切割, 这种微处理器由 RNA 聚合酶 III 的主要成分 Drosha 和双链 RNA 结合蛋白即称为 DGCR8/Pasha 的辅助因子组成, 在其剪接下形成长约 70nt 的具有茎环结构的中间体, 称为前体 miRNA(pre-miRNAs)。随后 pre-miRNA 由核内转移到胞质, RNA 聚合酶 III 的核酸内切酶 Dicer 将其剪切产生约为 22 个核苷酸长度的 miRNA:miRNA 双链。接下来 miRNA 的装载过程为 miRNA:miRNA 双链展开, 成熟的 miRNA 结合于 Argonaute (Ago) 蛋白。大多数的情况下, miRNA 被降解, 而 miRNA/Ago 则形成 miRNP 复合物的核心成分, 介导 miRNA 的功能发挥。

miRNA 下调基因表达发生在转录后水平(Liu et al., 2008)。miRNP 复合物与特异的 mRNA 通过碱基配对相互作用, 其二者的结合位点在 mRNA 的 3'端非翻译区, 他们的 Ago 结合蛋白就沉积在 mRNA 靶点处。miRNA 通过去稳定作用或者核内裂解 mRNA 介导翻译阻抑, 这种阻抑作用依赖于 miRNA 与靶 mRNA 之间的互补性。miRNA 确切的分子功能也依赖于 Ago 蛋白动员。

如果与 Ago2 蛋白结合的成熟 miRNA, 与靶 mRNA 完全互补结合, 则引起靶 mRNA 的降解(在植物中比较常见)。mRNA 裂解片段通过细胞旁路被清除, 而剩下完整的 miRNA。靶 mRNA 的分裂是 miRNA 调节的优化机制(Jones-Rhoades et al., 2006), 动物 miRNAs 有减退靶蛋白水平的趋势而无核内裂解 mRNA(Filipowicz et al., 2005)。另外, 成熟的 miRNA 与只有部分互补序列的靶 mRNA 结合, 随后的翻译抑制可能发生在起始、延长或终止阶段, 但是详细机制仍待阐明(Wu and Belasco, 2008)。由于完全互补的靶结合能力不同, 每个 miRNA 可以结合于多种不同的靶基因发挥不同的功能, 从而调节多种编码基因。详细的 miRNA 靶点预测仍然是一个挑战, 但是已有许多生物信息手段应用于成熟 miRNA 序列的前 2-8 个核苷酸即所谓的“miRNA 种子”来进行预测。目前, Vasudevan

等人指出,多种 miRNAs 不仅能抑制翻译,而且也能增强翻译,是抑制还是增强翻译依赖于细胞周期所处状态。

miRNAs 在癌症中起重要作用

miRNAs 充当基因调节器作用,能够调控细胞生长、分化和凋亡。在许多人类肿瘤病例中,都发现 miRNA 表达异常,要么是在成熟的 miRNAs,要么是在前体 miRNAs,或者二者皆有。因此,miRNAs 表达水平的改变在肿瘤形成中也起重要作用。与正常组织相比,虽然在肿瘤组织中大多数 miRNAs 表达都下降,但是也有高表达的 miRNAs 被发现。鉴于此,miRNA 基因被认为既充当肿瘤抑制基因也充当癌基因角色(Zhang et al., 2007)。

例如,研究发现肺癌病人的 miRNAs let-7 表达水平降低(Takamizawa et al., 2004)。在动物体内,let-7 的表达依赖于动物的生长发育周期,在发育早期 let-7 低表达,而分化成熟的组织 let-7 高表达。下调 let-7 的表达水平致使分化失败,从而导致了癌症的发生。另外,实验表明,RAS 癌基因是 miRNA let-7 的直接靶点,说明在肺癌发生过程中,let-7 通过调节 RAS 的表达发挥抑癌基因作用。第二种情况,通过作用于抗凋亡基因 BCL2 靶点,下调 miR-15 和 miR-16 在慢性淋巴瘤的表达。另一方面,致癌的 miRNAs 通过负调控抑制抑癌基因或调节细胞分化或细胞凋亡,从而促进肿瘤生长。例如,miR-17-92 在许多癌症如肺癌或淋巴瘤的表达明显增加,它的形成可以增加肺癌细胞的生长。进一步研究表明,到目前为止,参与肿瘤形成的 miRNAs 中,至少 50%的 miRNAs 基因定位于癌症相关基因组区域(Calin et al., 2004)。

通过研究 miRNAs 表达谱来进行癌症分类

基于 miRNAs 表达谱研究,我们可以就肿瘤发育形成和分化程度对其进行分类。较传统的基于 mRNA 表达研究的分类方法,具有更高的精确度(Lu et al., 2005; Rosenfeld et al., 2008)。在包含多种人类癌症的系统性研究中,几乎所有的

miRNAs 都显示出不同的表达,这使得将其用以鉴定不同发育起源的肿瘤成为可能。这种人类癌症的分类方法,通过测定相关的大约 200 条小数量 miRNAs 的表达来完成,而如果通过 mRNA 基因表达方法的话,即使使用几千个 mRNA 也不能得到同样结果。另外研究显示,miRNAs 的表达与特异的病理学特点如肿瘤期或增殖指数具有强相关性。相比之下,由于 mRNA 转录后修饰发生在从 DNA 转变成蛋白质的过程中,因此,其表达谱常常不能直接得出生物学或者具有临床意义的结果,而 miRNAs 能较为直接的反映基因功能水平。

使用 miRNAs 为肿瘤分类的另外一个巨大益处:将大大改善临床研究中常规收集保存的,通过福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)组织的稳定性。较长的 mRNAs 在甲醛固定和加工处理期间最可能被降解和化学修饰。而 miRNAs 很小,蛋白质又受 RISC 络合物的保护,故其固定方法较持久,能够长期保持。通过广泛的 Snap Frozen Cells 研究发现,使用 FFPE 样本做 miRNAs 表达谱具有很高的可靠性(Li et al., 2007)。

miRNAs 是诊断疾病和判断预后的稳定和可靠的生物标记物

miRNAs 除了显著的组织特异性外,还具有诊断癌症和判断预后的作用。由于它们的基因调控灵活,将 miRNAs 用于癌症治疗的潜力显而易见。所谓的抗-miRNAs 寡核苷酸类物质(AMOs),与致癌的 miRNAs 互补,能够特异抑制肿瘤组织中 miRNAs 的活性。另一方面,起肿瘤抑制基因作用的 miRNAs 的高表达可能对肿瘤的治疗有益。

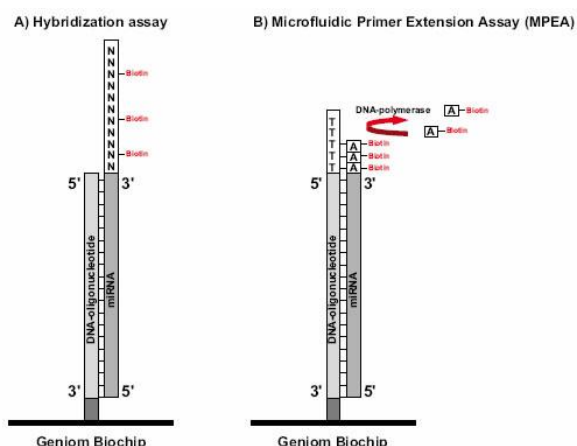
miRNAs 不仅为癌症,也为许多其他疾病如病毒感染性疾病、心血管疾病等提供可行的治疗方案,在这些疾病治疗中也涉及 miRNAs 的基因调控。

对 miRNAs 基因调控的研究是诸多研究的焦点,有关 miRNAs 自身基因表达调控机制的知识仍待进一步扩展。另外,miRNAs 被认为受控于渐成

机制，而不是仅仅局限于自身组织和肿瘤表达模式。实际上，若干 miRNAs 被 DNA 甲基化调控。应用去甲基化处理治疗人类膀胱癌，Saito et al. 发现大约 5% 的人类 miRNAs 的表达水平提高了至少了 3 倍。最显著的效应是 miR-127，其对应的基因嵌入 CpG 岛。通过表观遗传学方法复性后，其靶基因之一卟啉-癌基因 BCL6 的表达是下调的，从而得出 miR-127 可能发挥肿瘤抑制基因的作用。这样，通过表观遗传学途径来进行抗癌治疗将变得可行。

基于 miRNA 的基因表达微阵列方法

对 miRNAs 表达水平高通量分析的最普遍的方法是使用寡核苷酸微阵列(Liu,C.-G. et al., 2004), 在大样本的研究中, 使用这种方法能够同时测量成百上千 miRNAs 的基因表达。另外一种微阵列方法叫作微流引物延伸检测 Microfluidic Primer Extension Assay (MPEA), 这种检测方法以 Febit Geniom®微阵技术的使用为基础, miRNA 在高度灵敏的微阵列杂交前, 不需要标记。接着, DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段直接加入微量流动芯片的通道中, 相应的 miRNA 得以特异延伸。此方法将杂交检测的特异性与酶延伸的高辨别能力相结合(Vorwerk et al., 2008)。



MPEA 相对于现有的其它微阵列方法, 显示出突出优势。由于 miRNA 不需经过富集、PCR 扩增或标记等预处理而直接导入, 这样就确保避免了实验误差的产生(见图, A 为常规杂交方法, B 为微

流引物延伸)。传统的杂交检测最适合鉴别杂交靶点中心位点上的错配, 相比之下, MPEA 提供了更高水平的灵敏度, 由于酶催化的延伸仅在 3' 末端几乎完全配对时才会发生, 因此很少会出现交叉杂交信号。与传统的 RNA-预处理, Klenow 延伸阵列检测(RAKE)相比, MPEA 也显示出几点主要优势(Nelson et al., 2004)。RAKE 微阵列通过与其相应的寡核苷酸的 5' 末端结合于表面, 而 MPEA 阵列的寡聚核苷酸捕获探针与其 3' 末端相连。MPEA 的这种结合方式不仅排除了探针的自身延长, 尤其重要的是说明这种延长作用远离微通道管腔表面而没有任何位阻。由于微流体通道的使用, 也大大降低了所需 RNA 样本量。MPEA 具有高度的灵敏性, 无需扩增, 就足以检测出来源于福尔马林固定样本, 组织针孔吸取样本或激光捕获显微分离样本的纳克级的总 RNA。

参考文献

- Bartel, D.P. (2004) Cell 116: 281-297
- Calin G.A., Sevignani, C., Dan Dumitru, C., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M. And Croce, C.M. (2004) Proc Natl Acad Sci U S A 101: 2999-3004
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F.A. and Pillai R.S. (2005) Curr. Opin. Struct. Biol. 15: 331-341
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S. and Enright A.J. (2008) Nucleic Acids Res. 36 (Database Issue): D154-D158
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Bartel, B. (2006) Annu. Rev. Plant Biol. 57: 19-53
- Kim, N. V. and Nam, J.-W. (2006) Trends Genet. 22: 165-173

- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001) *Science* 294: 853-858
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. and Bartel, D.B. (2001) *Science* 294: 858-862
- Lee, R.C. and Ambros, V. (2001) *Science* 294: 862-864
- Li, J., Smyth, P., Flavin, R., Cahill, S., Denning, K., Aherne S., Guenther S.M., O'Leary J.J. and Sheils O. (2007) *BMC Biotechnol.* 7: 36
- Liu C.G., Calin, G.A., Meloon, B., Gamliel, N., Sevignani, C., Ferracin, M., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Zupo, S., Dono, M., Alder, H., Bullrich F., Negrini M. and Croce C.M. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(26):9740-4.
- Liu, X., Fortin, K. and Mourelatos Z. (2008) *Brain Pathol.* 18: 113-121
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A. et al. (2005) *Nature* 435: 834-838
- Nelson, P.T., Baldwin, D.A., Searce, L.M., Oberholtzer J.C., Tobias, J.W. and Mourelatos Z. (2004) *Nature Methods* 1: 155-161
- Rosenfeld, N., Aharonov R., Meiri, E., Rosenwald, S., Spector, Y., Zepeniuk, M., Benjamin, H., Shabes, N., Tabak, S., Levy, A. et al. (2008) *Nature Biotechnol.* 26: 462-469
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman J.M., Chuang, J.C., Coetzee G.A. and Jones P.A. (2006) *Cancer Cell* 9(6): 435-443
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T. and Takahashi T. (2004) *Cancer Res.* 64: 3753-3756
- Umbach J.L., Kramer, M.F., Jurak, I., Karnowski H.W., Coen, D.M. and Cullen, B.R. (2008) *Nature* 454 (7205): 780-3
- Vasudevan, S., Tong, Y. and Steitz, J.A. (2007) *Science* 318: 1931-1934
- Wu, L. and Belsaco J.G. (2008) *Mol. Cell* 29: 1-7
- Vorwerk, S., Ganter, K., Cheng, Y., Hoheisel, J., Stähler, P.F. and Beier, M. (2008) *New Biotechnology* 25 in press
- Zhang, B., Pan X., Cobb, G.P. and Anderson, T.A. (2007) *Dev. Biol.* 302: 1-12

ABI 推出第一台声波聚焦流式细胞仪

2009 年 12 月 7 日，来自美国加利福尼亚的消息——生命技术公司（纳斯达克代码：LIFE）旗下美国应用生物系统公司今日宣布它正式进入流式细胞仪市场，首次推出 Attune™ 声波聚焦流式细胞仪（Attune™ Acoustic Focusing Cytometer），这是第一台用声波精确控制细胞移动的流式细胞计数系统。该公司凭借在仪器制造上的专长，再加上长期以来在流式细胞仪试剂上的领先供应商地位，创造出这种新技术新产品，让客户在一系列细胞生物学应用中得到更高的样品通量、灵敏度和准确性。

流式细胞仪的原理在于让细胞穿过激光检测设备，从而使科学家们得以对细胞进行计数和检测。每秒钟可计算数千个细胞的速度可实现对整个细胞群体的快速鉴定。流式细胞仪在细胞生物学领域的应用范围也在快速增长，包括细胞表达蛋白的研究（免疫分型）、定量细胞中的 DNA、细胞计数及其它。

Attune 声波聚焦流式细胞仪可帮助科学家们实现对细胞群体中大量异质细胞进行统计学数据的采集，以便研究包括大小、复杂性、表型和健康情况在内的细胞群体参数。Attune 的专利技术可让科学家们获得更高的灵敏度，通过增加通量来节约时间，并可用于体积小的样品。此外，Attune 在提供这些升级性能的同时，还凭借紧凑的声学技术而实现了体积小，以及开展实验所需的消耗品量更少等优势。这些独特的特征将有助于实现传统细胞仪系统所无法实现的科研应用，从样品分离制备到微珠为基础的样品分析。[点击索取更多技术资料！](#)

生命科技公司细胞系统的总裁 Nicolas Barthelemy 表示：“Attune 技术将某些实验的时间缩短了一个数量级并大大提高了灵敏度，从而加速了研究流程。这种独特仪器的推出，正是生命技术公司综合利用世界顶级仪器制造经验和细胞生物学上的专长，为生命科学研究者推出创新技术方案的另一范例。此仪器非常适合细胞信号分析和灵敏

度极其重要的稀有细胞学应用，它也是各种细胞分析实验室的极好补充。”

生命科技公司流式细胞仪的主管 Mike Olszowy 表示：“在流式细胞仪方面，声学聚焦技术同时实现了更长的通过时间和更高的通量，因而能够在对样品中每一个细胞进行更好分析的同时对更大量的细胞进行分析。Attune 的推出使得生命科技公司朝着‘数字生物学’的蓝图又迈进了一步，凭借‘数字生物学’科学家们将跨越异质细胞混合群体的整体分析而推进到在单细胞水平对分子表型进行更为精确的定量分析。”

如果想了解更多产品信息，请点击网站链接：
http://www3.appliedbiosystems.com/AB_Home/applicationstechnologies/Flow_Cytometry/AttuneAcoustic_Focusing_Cytometer/index.htm。

关于生命科技公司

生命科技公司（纳斯达克代码：LIFE）是一家致力于改善人类环境的全球生物技术公司。我们的仪器、耗材和服务能让研究者加速科学探索与开发，让生命变得更美好。我们的客户在生物学领域努力工作，不断加速个性化药物、再生科学、分子诊断、农业和环境研究以及 21 世纪的法医鉴定。公司 2008 年的销售额超过 30 亿，全球雇员达 9500 人，分布在 100 多个国家，并拥有 3600 多

项知识产权专利及专有许可证。生命科技公司由Invitrogen公司和应用生物系统公司合并而成。更多关于我们如何起作用的信息，请访问网站<http://www.lifetechnologies.com/>。在Facebook和Twitter上追随生命科技公司（@LIFECorporation）。

前瞻性声明

本新闻稿包含前瞻性声明，涉及带有风险与不确定性的预期结果。本新闻稿中所包含的某些信息，包括但不限于，行业趋势和生命科技公司的计划、目标、预期和其商业策略的陈述，可能导致的

实际结果与前瞻性声明中明示或暗示的风险和不确定性将存在差异。任何声明都不是历史事实的陈述，而是前瞻性声明。在措辞上，使用“相信”、“计划”、“试图”、“预期”、“制定目标”、“估计”、“期望”等，并/或使用将来时或条件结构句（“将”、“可能”、“能够”、“应该”等），或类似的表述可分辨出某些前瞻性声明。那些可能导致实际结果与这些前瞻性声明中的描述大相径庭的重要因素，在生命科技公司提交给美国证券交易委员会的各种文件中有详细说明。生命科技公司不承担更新或修订任何前瞻性声明的义务，以反映后期事件或环境。

罗氏 454 即将推出新的测序仪

为了满足日益增长的新一代测序需求，罗氏旗下的 454 生命科学公司近日宣布将在 2010 年推出新的普及型测序平台-GS Junior System。

GS Junior System 的大小与普通的激光打印机差不多，它的性能和特征会更适合小型-中型实验室的需求。此平台将会与长读长的 GS Junior Titanium 试剂共同上市，测序读长约为 400-500 bp。测序系统还会带有一台电脑，专为 GS Junior 的运行和下游数据分析而优化。

根据目前公布的数据，GS Junior System 的通量为每次运行产生 35 Mb 以上的高质量碱基。平均读长为 400 个碱基，每次运行平均产生 10 万个读数。400 个碱基的准确率为 99%。文库制备仅需半天，测序需要 10 个小时，然后 2 小时处理数据。测序原理与 GS FLX 相似。

454 生命科学的总裁 Christopher McLeod 预计 GS Junior 系统将会像个人电脑在大众中普及一样，在测序实验室中普及。他表示：“这项技术是几乎所有实验室都能拥有的。同时，我们仍将继续扩展我们的旗舰平台-GS FLX 系统的性能。”

该公司还宣布即将推出 GS FLX 系统的一些新试剂盒、操作步骤和软件升级。这些新产品将让两个主要领域（转录组测序和 PCR 扩增子测序）

利用 400-500 bp 的长读长以及 GS FLX Titanium 系列试剂的更高密度。另外，Rapid Library Preparation Kit 将节省一半的文库制备时间，且需要的 DNA 量要少得多。

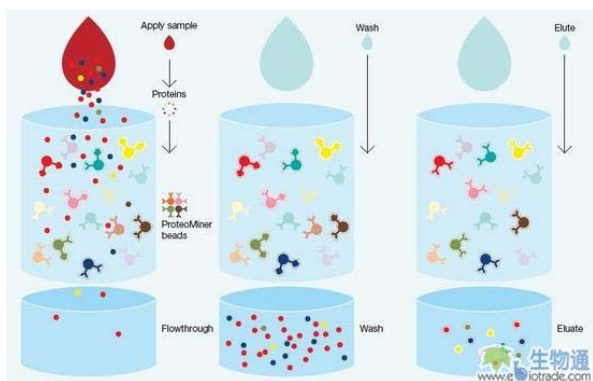
GS 数据分析软件也经过了重大改进，有了全新的 GS De Novo Assembler software，能够处理来自人筛分基因组（3Gb）和转录组的数据组。新的 cDNA 测序步骤和拼接软件为新物种转录组测序和分析提供了完整的方案，几乎所有物种，即使是过去未曾鉴定的物种都能获得基因空间的综合图像。

最新的 GS FLX Titanium Kit 为定向扩增子测序提供了新方案，它支持 400 bp 长扩增子的超深度测序。近年来 GS FLX 系统的扩增子测序为多项医学研究铺平了道路，包括对 HIV 感染个体中低频率药物抗体变异体的检测，以及高分辨率的 HLA 测序和分型。GS FLX Titanium 扩增子测序将继续推进这些研究，且每次运行的克隆读数会超过 100 万个。（生物通 余亮）

揭开低丰度蛋白的秘密

生物样品中高丰度蛋白的存在，掩盖了更具研究意义的低丰度蛋白。比如，血清或血浆中的白蛋白或免疫球蛋白让其它蛋白的检测变得极具挑战性。Bio-Rad 公司的 ProteoMiner protein enrichment kit 能克服这种挑战，帮你揭开低丰度蛋白的秘密。ProteoMiner 低丰度蛋白富集系统是一种新型的样品制备手段，它能极为有效地减少复杂生物样品中蛋白浓度的动态范围。

ProteoMiner 技术是如何富集低丰度蛋白的呢？下面这张图可以形象地说明。它是基于复杂样品与高度多样的六肽配基之间的相互作用。每个 ProteoMiner 珠子上都有不同的六肽配基，它们与某种蛋白具有特定的亲和性。当一个复杂的蛋白质样品与大量六肽配基共同孵育时，样品中的蛋白质会相应地找到其结合位点而被珠子捕获。由于珠子的结合能力有限，高丰度蛋白迅速饱和了相应配基（红色和黄色珠子），而多余的蛋白就被洗掉。与此相反，低丰度蛋白通过与特定配基（粉色和绿色珠子）的结合而富集。通过这种方式，低丰度蛋白相对得到了富集与浓缩。

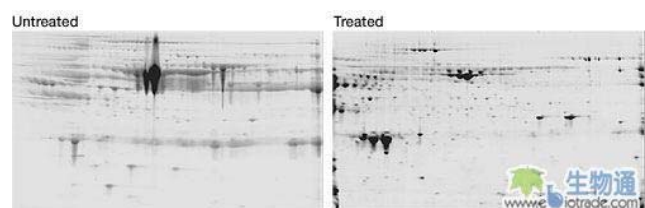


ProteoMiner 系统采用了组合的六肽文库方法，而不是传统的免疫去除方法，这就最大限度地减少了对已知抗体的依赖，并防止某些与高丰度蛋白相结合的低丰度蛋白质的去除。某些低丰度蛋白无法通过传统方法检测，也能借此有效富集和浓缩。ProteoMiner 系统适合处理多种类型的样品，比如血清、血浆、尿液、胆汁和血小板，与各种主

流的下游蛋白分析技术兼容，包括 1-D 或 2-D 凝胶电泳，层析，SELDI 及质谱。

根据起始样品蛋白量的不同，ProteoMiner 低丰度蛋白富集系统分别提供了小容量和大容量两种试剂盒。小容量试剂盒适合处理有限的样本材料，建议至少 10 mg 蛋白；大容量试剂盒则适合处理 50 mg 以上的蛋白。ProteoMiner 系统采用离心柱形式，操作方便，且一次性的离心柱避免样品的残留污染。试剂盒中包含了富集低丰度蛋白过程中所需的所有必要试剂。小容量和大容量试剂盒分别可处理 2 个或 10 个样本。

[点击索取 ProteoMiner 低丰度蛋白富集系统的更多资料！](#)

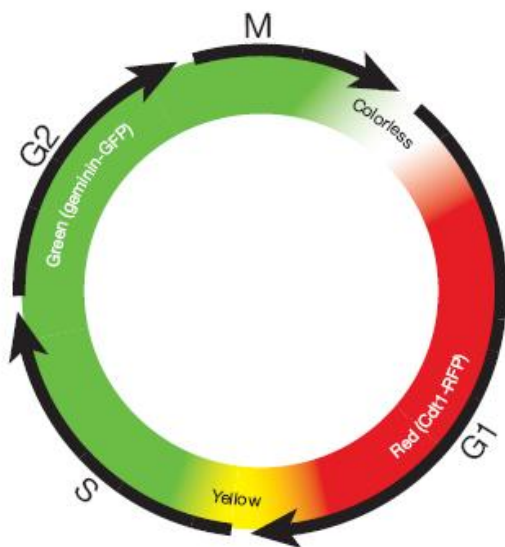


利用 ProteoMiner protein enrichment kit 富集低丰度血清蛋白。取等量的总蛋白进行 2-D 电泳，从图中可以看出，ProteoMiner 珠子处理后凝胶的分辨率大大改善。高丰度蛋白大大减少，右图中可看见更多的蛋白点。100 μ g 蛋白样品在 11 cm ReadyStrip pH 5–8 IPG 胶条上等电聚焦，然后在 Criterion 8–16% Tris-HCl 预制胶中进行第二向的电泳。（生物通 余亮）

在活细胞内实时观察细胞周期

2008 年，日本科学家 Miyawaki 等开发出荧光泛素化细胞周期指示剂（缩写为 FUCCI），这是一种基于荧光蛋白的探针，它将红色荧光蛋白（RFP）和绿色荧光蛋白（GFP）与不同的细胞周期因子 Cdt1 和 geminin 融合。这样，Cdt1 和 geminin 就被泛素连接酶 E3 泛素化，继而降解。泛素连接酶的时间调节产生了 Cdt1 和 geminin 的双相周期。

在 G1 期，geminin 降解，只能看到带有 RFP 的 Cdt1，因此 G1 期的细胞显示出红色荧光核。在 S、G2 和 M 期，Cdt1 降解，只剩下带 GFP 的 geminin，因此细胞核呈绿色荧光。在 G1/S 过渡期，随着 Cdt1 水平下降和 geminin 水平升高，两种蛋白都存在，绿色和红色的叠加产生黄色荧光。红色-黄色-绿色，这种动态的颜色变化呈现出细胞周期和分裂的过程。



Invitrogen 将上述研究成果商业化，并结合了强大的 BacMam 基因导入系统，开发出使用更为方便的 Premo™ FUCCI Cell Cycle Sensor。这种预包装的试剂是即用的，避免了纯化质粒的麻烦，也省去了脂质体等转染试剂。

BacMam 生物通以前介绍过，是一种改造过的杆状病毒，能将荧光蛋白导入胞内，不仅适合多种

细胞类型，包括原代细胞和神经细胞，而且无明显的细胞毒性。另外优化起来也相当容易，只需增加或减少病毒就能控制表达水平。到目前为止，已有 90 多种细胞类型经过实验，可被 BacMam 技术有效转导，不过造血细胞和巨噬细胞除外。想要了解 BacMam 适用的细胞列表，请登陆

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Drug-Discovery/Target-and-Lead-Identification-and-Validation/Pathway-Biology/cellular-pathway-analysis/bacmam-system/bacmam-compatible-cells.html>。

整个流程也很简单：在细胞中加入试剂，放置 1-2 小时，再用 BacMam 增强剂（试剂盒中已提供）处理 1-2 小时。洗涤后过夜孵育，让荧光蛋白表达，然后就可以利用传统的荧光显微镜观察细胞周期了。

Premo™ FUCCI Cell Cycle Sensor 可用于细胞周期进程的成像，并可评估药物、siRNA 或其他因素对细胞周期的影响。Cdt1-RFP 和 geminin-GFP 的荧光可耐受 4% 甲醛的固定及 0.1% Triton X-100 的通透处理，因此标记后的细胞可用抗体等来处理。如果你想了解此产品的更多信息，请[点击索取](#)。

（生物通 薄荷）

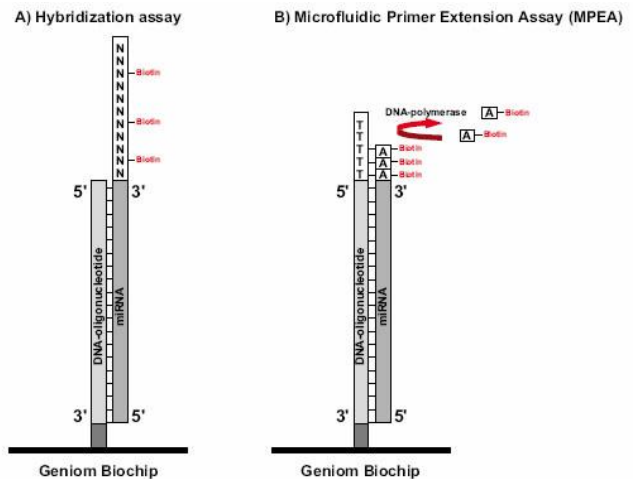
新型微流体 miRNA 表达谱芯片

近年来，非编码小 RNA 逐渐从配角变成了主角。miRNA 这个不起眼的小分子原来是基因表达的重要调节器。它们还与多种癌症相关，也就理所当然成为药物靶点。另外一种在细菌中鉴定出的 piRNA 也是反式作用的小干扰 RNA，虽然现在研究得较少，但也是前途无量。

随着检测方法的成熟，miRNA 的数量呈爆炸式增长。在 2004 年，总共只有 719 个，但到了今年 9 月，miRBase 数据库中的 miRNA 序列信息已超过一万条。miRNA 变化如此之快，如果没有最新最全面的工具，我们如何能跟得上它的脚步？

目前市场上高通量检测 miRNA 的平台是芯片，它能同时测量成百上千个 miRNA 的表达。不过这些芯片大多需要事先标记。而德国 Febit 公司采用了另一种微阵列方法，叫作微流引物延伸检测（Microfluidic Primer Extension Assay, MPEA），这种检测方法以 Febit Geniom®微阵技术的使用为基础，miRNA 在杂交前无需标记。接着，DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段直接加入微量流动芯片的通道中，相应的 miRNA 得以特异延伸。此方法将杂交检测的特异性与酶延伸的高辨别能力相结合。

MPEA 相对于现有的其它微阵列方法，显示出不少优势。由于 miRNA 不需经过富集、PCR 扩增或标记等预处理而直接导入，这样就确保避免了实验误差的产生（见图，A 为常规杂交方法，B 为微流引物延伸）。传统的杂交检测最适合鉴别杂交靶点中心位点上的错配，相比之下，MPEA 提供了更高水平的灵敏度，由于酶催化的延伸仅在 3'末端几乎完全配对时才会发生，因此很少会出现交叉杂交信号。



与传统的 RNA-预处理，Klenow 延伸阵列检测（RAKE）相比，MPEA 也显示出几点主要优势。RAKE 微阵列通过与其相应的寡核苷酸的 5'末端结合于表面，而 MPEA 阵列的寡聚核苷酸捕获探针与其 3'末端相连。MPEA 的这种结合方式不仅排除了探针的自身延长，尤其重要的是说明这种延长作用远离微通道管腔表面而没有任何位阻。由于微流体通道的使用，也大大降低了所需 RNA 样本量。MPEA 具有高度的灵敏性，无需扩增，就足以检测出来源于福尔马林固定样本，组织针孔吸取样本或激光捕获显微分离样本的纳克级的总 RNA。

最近，吉奥生物和德国 Febit 联合推出了和 Sanger miRBase 14.0 同步的 miRNA 表达谱芯片。芯片采用独特的 Geniom 微流体技术，即时酶标方法，以及全自动化的芯片处理，以极少量样本实现高灵敏度、高重现性的精确检测。微流体微点阵系统，具备灵活性以迅速地适应新的序列信息。基于最新数据资料，最佳化的捕获探针的合成，

是直接在生物芯片的微通道内完成的，从而保证了芯片的生产和最新 **microRNA** 同步的独一无二优势。

Geniom RT 分析仪融入了自动化微阵列处理的高精度的微流体技术，使得分析真正实现了全自动化。统一的杂交环境促使了结果的高重现性以及检测的快速性。自动流程包括：自动化样本装载，动态的温度控制，低体积的主动运动杂交（20ul），自动洗涤，自动动态成像，以及数据分析。

miRNA 表达谱芯片与 **Sanger miRBase 14.0** 同步，所检测的 **miRNA** 数量最全。芯片具有有效和优化的探针设计。因此，任一 **miRNA** 生物标记会也不会从检测过程中漏掉。专利技术对样本量要求少，标准只需 1—2ug 总 RNA，最少需要 130ng 总 RNA。

研究人员利用这种全自动的 **miRNA** 表达谱芯片，分析了 17 个非小细胞肺癌患者的血液样品和 19 个正常对照的血液样品。他们发现，与对照相比，有 27 个 **miRNA** 在肺癌患者中显著下调。他

们还用 **qRT-PCR** 对部分 **miRNA** 进行了验证。他们认为这种方法能用于肺癌的检测。

当然，**miRNA** 芯片也可根据您的要求灵活定制，包括预期的，突变，或者特殊要求的 **miRNA** 序列。从样本到即可用于发表的数据，吉奥生物提供了一整套服务。目前，**miRNA** 芯片检测正在促销中，[点击索取详细信息](#)。

德国 **Febit Geniom** 生物芯片的特点：

- 微流生物芯片，对重复性杂交及洗涤环境有着精确的流体控制
- 封闭的间隔消除了蒸发，并提供了高温杂交环境
- 8 个分开的微通道，每个含 15,624 阵点
- 每张芯片含 124,992 阵点
- 可以平行地进行 8 个样本的杂交检测

康成生物最新推出 lncRNA 芯片技术服务

长链非编码 RNA(lncRNA)是一类转录本长度超过 200nt 的 RNA，它们本身并不编码蛋白，而是以 RNA 的形式在多种层面上（表观遗传调控、转录调控以及转录后调控等）调控基因的表达水平。随着近年来 lncRNA 不断的被发现，人们开始关注 lncRNA 在各种生物学过程以及疾病中所起到的作用。通过 lncRNA 芯片，研究人员能够快速高通量的获得与特定生物学过程或者疾病相关的 lncRNA 的表达变化。

LncRNA 芯片服务

康成生物为您提供 Arraystar 公司 lncRNA 芯片的全程技术服务，该芯片覆盖目前所有权威数据库所注释的长链非编码 RNA，是目前市面上唯一一款以 lncRNA 为主，覆盖最全面的 lncRNA 芯片。

Arraystar 公司 lncRNA 芯片产品列表：

服务名称	物种	描述
Human lncRNA Microarray Service	<i>Homo sapiens</i>	覆盖 Refseq~20,000 条蛋白编码 mRNA，以及 NCBI Refseq, UCSC Known Gene, NRED, RNAdb, H-InvDB 等多个数据库的~22,000 条 lncRNA
Mouse lncRNA Microarray Service	<i>Mus musculus</i>	覆盖 Refseq~20,000 条蛋白编码 mRNA，以及 NCBI Refseq, UCSC Known Gene, NRED, RNAdb, Fantom3 等多个数据库的~16,000 条 lncRNA

可靠的数据来源

lncRNA 芯片覆盖所有来自 Refseq, UCSC Known Gene, NRED, RNAdb, H-InvDB, Fantom3 等权威数据库注释为 lncRNA 的转录本，并在此基础上收录了相关文献中报道的 lncRNA，是目前覆盖最为全面的 lncRNA 芯片。

优质的探针设计

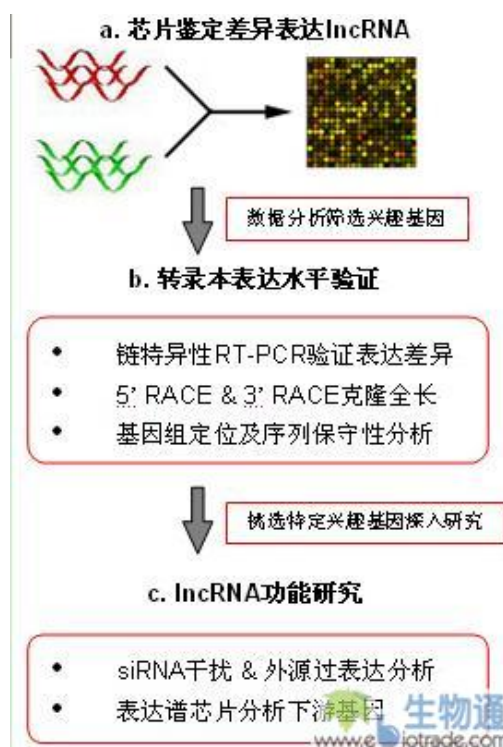
Arraystar lncRNA 芯片设计探针为~60mer 的长寡核苷酸，这些长寡核苷酸探针在高严谨杂交条

件下可得到高灵敏度及高特异性的理想实验结果。同时针对每条序列都设计了多条探针，增加了信号的可靠度。

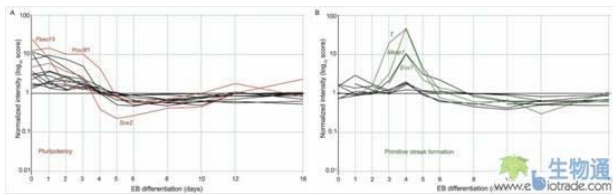
与 mRNA 表达相结合

lncRNA 芯片还覆盖最新的 Refseq 数据库中所有注释为 mRNA 的转录本。因此，在一次杂交实验中，可以同时检测 mRNA 和 lncRNA 的表达水平，并根据相关的 mRNA 表达水平变化将鉴定出的 lncRNA 与已知的信号通路联系起来。

常规 lncRNA 芯片研究流程



下图是 Marcel E. Dinger 及其同事利用 lncRNA 芯片分析在小鼠胚胎肝细胞分化过程中，利用多能性标记基因（Pou5f1, Sox2 等，图 A）以及原条（Primitive streak）形成过程的标记基因（T, Mesp1, Evx1，图 B）筛选与其表达水平变化显著相关的 lncRNA，进而得到和这两个过程密切相关的 lncRNA，为进一步探究相关 lncRNA 的功能提供了思路（Marcel E. Dinger, et al. Genome Research. 2008）。

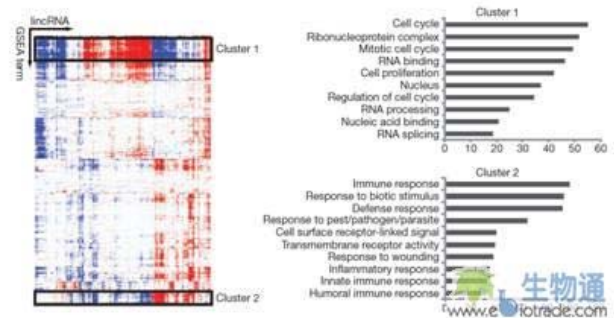


结合相关蛋白编码基因表达水平，分析未知 lncRNA 的功能

利用 lncRNA 芯片筛选出的 lncRNA，能够根据其表达水平显著相关的蛋白编码基因集合进行基因集合富集度分析（Gene Set Enrichment

Analysis, GSEA），进而根据与其表达水平显著相关的基因集合推测 lncRNA 所参与的生物学过程。

下图是 Mitchell Guttman 及其同事将鉴定出的 lincRNA（large intervening non-coding RNA, lncRNA 的一类）与已知的蛋白编码基因的表达数据结合，对 lincRNA 表达水平显著相关的基因集合做 GSEA 分析，并对 GSEA 结果进行双向聚类（bicluster）后，得到了相关 lincRNA 所参与的特定生物学过程，为进一步探究相关 lincRNA 的功能提供了思路（Mitchell Guttman et al. Nature. 2008）。



Pierce 体外表达试剂盒让翻译和修饰更准确

以往的体外表达试剂盒大都基于细菌、麦胚芽提取物或者兔网织红细胞裂解液，虽说后者是真核系统，但在表达人类蛋白上，总感觉不尽如人意。于是，赛默飞世尔旗下的 Pierce 推出两款与众不同的体外表达试剂盒，分别是 Human In Vitro Protein Expression Kit 和 Human In Vitro Glycoprotein Expression Kit。

与众不同之处在哪？这两款试剂盒没有采用常规的细胞裂解液，而是用全新的人细胞裂解液作为蛋白合成的元件。这样，蛋白不仅能够准确翻译，还能有效地进行翻译后修饰。试剂盒中提供的人细胞裂解液含有蛋白体外表达所需的全部必要元件，包括核糖体，起始因子和延伸因子，以及 tRNA。再加入辅助蛋白、ATP 和能量再生系统后，这些提取物就能高效地合成几乎所有靶蛋白。

除了更准确地翻译和修饰，Human In Vitro 蛋白表达系统的优势还在于能与微孔板规模的反应兼容。这样就能在微孔板上同时表达多个突变变异体，或者大量表达单个蛋白，以供后续研究之用。小规模蛋白表达也能避免蛋白聚集形成包涵体，这在大肠杆菌表达系统中常常遇到，也是个颇为令人头疼的问题。

如果你想获得糖基化的蛋白，Human In Vitro Glycoprotein Expression Kit 能帮上你的忙。它能产生正确的 N-糖基化模式，让你得到与体内相同

的蛋白修饰。而且，产生的糖基化蛋白主要以单一形式存在，这对下游应用很关键，比如质谱分析，这与昆虫细胞裂解液相比，算是一个很大的进步。

这两款试剂盒都在 90 分钟内完成蛋白表达，产量比常用的体外表达系统高 4 倍。而且，你也能将蛋白合成延长到 6 小时，让产量更高。几乎所有物种的所有基因都适用。蛋白表达完毕后，可用于相互作用研究、质谱分析和酶活分析。它们还用于毒性蛋白的表达，以及突变克隆的筛选。澄清的细胞裂解液也能用于比色检测。

Human In Vitro Protein Expression Kit 和 Human In Vitro Glycoprotein Expression Kit 都能使用 DNA 和 RNA 作为模板。试剂盒的规格有两种：10 次和 50 次。如果你想尝尝鲜，10 次的规格刚好。如欲了解体外表达的更多信息，[请点击此处索取资料](#)。

（生物通 余亮）

Acumen eX3 在肿瘤学研究中的应用

1. 简介

根据卫生部 2008 年发布的调查报告，恶性肿瘤已成为我国城市的首位死因，且我国恶性肿瘤死亡率属于世界较高水平。如何擒拿这个“头号杀手”？这给肿瘤学的研究人员布置了一道难题。好在，我们有很多工具可以利用，比如近来渐趋流行的高内涵分析。肿瘤学研究很容易采用高内涵分析，因为它与多个高内涵的应用直接相关。例如，任一种癌症治疗的主要目标都是杀死癌细胞，那么也就离不开细胞毒性、细胞增殖与凋亡等分析。传统的分析工具包括流式细胞仪和显微镜成像系统，然而，激光扫描微孔板细胞仪却有着更多的优势。

就拿肿瘤学中常见的细胞周期分析来举个例子。TTP LabTech 公司出品的 Acumen eX3 高通量化高内涵筛选平台有着流式细胞仪无法比拟的通量。整个 384 孔板的读取只需要 10 分钟，这其中还包括了多重分析，比如有丝分裂指数的确定。流式细胞仪只能分析细胞悬液，而 Acumen eX3 则能够在原位分析贴壁细胞，保留了细胞在处理过程中所发生的形态变化。光这两点就已经很有吸引力了，当然，Acumen 的应用也不仅是细胞周期分析，还包括肿瘤学研究中的多个应用，如蛋白激酶图谱分析、细胞增殖、克隆形成、细胞毒性、凋亡、细胞粘附、血管生成等等。本文就详细描述了 Acumen 在几个关键领域的应用。

2. 蛋白激酶图谱分析

蛋白激酶在许多信号通路如增殖、分化和凋亡中起了重要的调节作用。目前已鉴定的人类激酶有 518 种，这表示我们有很大的机会去发现新的激酶通路。过去，研究激酶通路常采用体外分析法，也就是利用放射性标记的 ATP 来检测结合事件。这些方法非常灵敏，但局限于通量低，且使用不讨人喜欢的同位素。另一个问题就是蛋白从体内分离出来后，它起作用的方式可能会改变。反应中可能会

缺少了某些对整个细胞功能很关键的成分，比如支架蛋白（scaffold protein）。

研究显示，支架蛋白将激酶通路中各个组分拉到一块，从而实现了特异的细胞内相互作用。（如图 2.1）。JIP-1（JNK 相互作用蛋白-1）就是这样一种哺乳动物的支架蛋白，它是 MLK、MKK7 和 JNK 特异的，能促进这些酶的活化。在全细胞的环境中，通路激活所需的所有成分都是以天然的数量存在，自然也就排除了理论配比失衡。利用全细胞分析，就有可能鉴定出在接头蛋白位点起作用的化合物，从而有助于新药的开发。

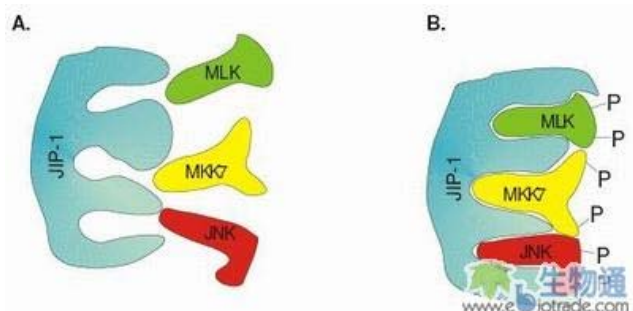


图 2.1 JIP-1 充当支架蛋白，将 MLK、MKK7 和 JNK 拉到一起。

A. 接头蛋白未受刺激，激酶就不能停靠，因此不足以局部化形成激酶级联。

B. 一旦支架蛋白激活, 就发生构象改变, 允许激酶级联的组分结合到接头蛋白上, 让它们足够接近并激活。

在大多数化合物都被排除之后, 基于细胞的高内涵分析广泛应用于第二轮的激酶活性图谱分析。由于现有技术的低通量, 它们在高通量筛选中的应用面临巨大的挑战。对于高内涵激酶分析而言, 也有一个额外的难题, 那就是免疫检测所需的固定步骤有很多步, 非常耗时。

激光扫描高通量化高内涵筛选平台, 如 Acumen eX3, 将 CCD 成像仪的目标识别能力与荧光读板机的快速读取能力相结合, 从而突破性地将对细胞水平的筛选应用到初筛领域, 如蛋白激酶及它们对细胞周期调控的初筛(图 2.2、图 2.3)。此外, 利用激酶的抗体或 GFP 标签蛋白还能直接定量激酶活化所产生的蛋白转位(图 2.4、图 2.5)。而 Acumen 对细胞数量的要求也不高, 每孔中 1000-2000 个细胞均可, 降低了对细胞培养的要求。

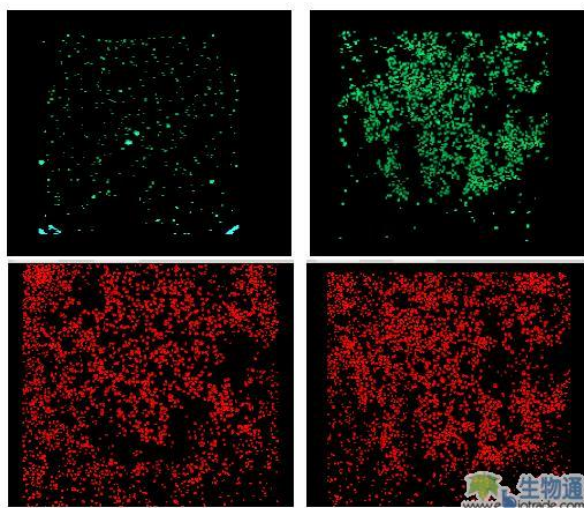


图 2.2 CHO 细胞暴露在茴香霉素中 5 分钟, 然后固定。利用抗磷酸化-p44/42 MAP 激酶抗体和羊抗兔 TIFC 二抗来检测 ERK 的激活。左为对照细胞, 右为处理细胞。上图 FITC 只显示出活化的细胞, 下图 Syto64 显示出总细胞数。

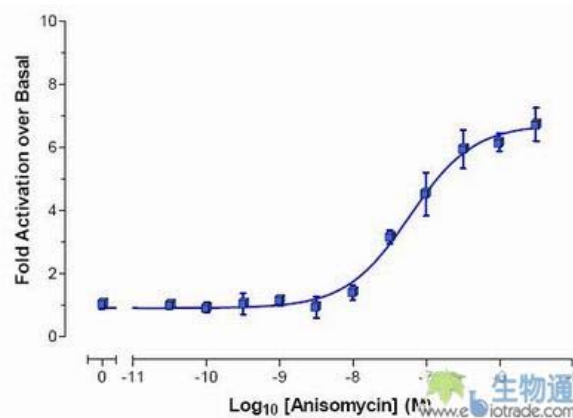


图 2.3 CHO 细胞暴露在茴香霉素中 35 分钟, 然后固定。利用抗磷酸化-p54 JNK 抗体和羊抗兔 TIFC 二抗来检测 JNK 的激活。EC50 = 450 nM

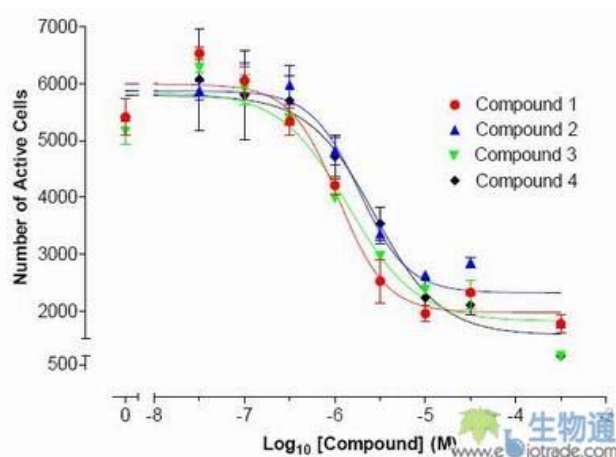


图 2.4 NFkB 蛋白转运分析。使用 Alexa Fluor 488 标记的 NFkB 抗体检测, 使用 PI 对细胞核进行染色。

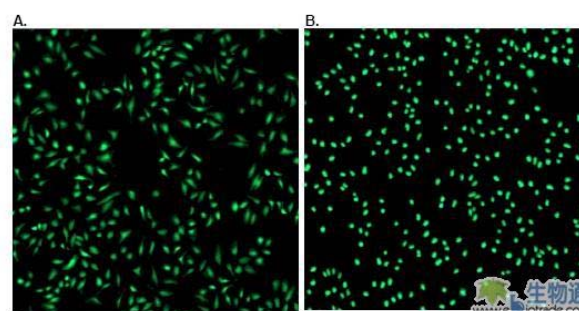


图 2.5 Acumen eX3 软件显示 GFP 偶联的蛋白激酶在细胞质与细胞核之间的转运。A. 对照; B. 激活。

Acumen eX3 的全孔扫描能力能够在高通量的前提下对每个孔中的每个细胞进行高内涵分析。这种对全体细胞进行分析的模式(而非像其它仪器

的每孔取点采样分析模式)对于激酶图谱分析来说益处良多。首先,综合所有细胞,可以它能够克服免疫染色后细胞随机分布的问题,产生统计学上可靠的数据;其次,全孔扫描还能够可以得出全体细胞数,计算出生物反应对细胞总数的比例,从而实现归一化分析,故可以算出所测定细胞生物反应在全体细胞中百分比从而实现数据的均一化分析每个细胞生物反应的标准化,对每次检测可以非常方便地得出给出一个简单的毒性或增殖的读数。而 Acumen eX3 仪器的多道激光(405nm, 488nm 和 633nm)和多通道检测(每道激光最高四通道同时检测,这意味着理论上可进行 12 通道色实验)进一步扩大了荧光探针和蛋白的范围,让激酶图谱分析也能多重化。

3. 细胞周期分析

细胞周期代表了真核细胞中最基本也是最重要的过程之一。此过程被细胞质中的蛋白严格调控,主要是细胞周期蛋白(cyclin)和 cyclin 依赖的激酶,让细胞有序地从 G1、S、G2 一直发展到 M 期。细胞周期调控的缺陷是肿瘤细胞的典型特征,在癌症中经常会发现参与细胞周期调控的基因发生了突变。这也为开发抗癌药物的新靶点提供了很好的机会。因此,研究人员对细胞周期调控异常的兴趣日益增长。

不断加速药物开发进程的迫切要求催生了多种高通量筛选技术。这也让通过初筛的化合物数量显著增加,而在某些研究领域复筛成了瓶颈,因为复筛由于当时技术和设备的限制只能应用低通量的分析。细胞周期分析就是其中一个。传统的方法是利用流式细胞仪来定量细胞中总的 DNA 含量。DNA 含量的测定是流式细胞仪最早的应用之一,至今仍是最普遍的应用之一。这要归因于流式细胞仪固有的高灵敏度,以及科研和临床应用中有那么多久经考验的操作方法。然而对于筛选来说,流式细胞仪并不完美。因为它通量低,需要大量细胞,

而且不能在原位分析贴壁细胞系,需要重悬细胞,耗时费力。

传统的方法是用荧光染料对固定细胞的核进行染色,来测量 DNA 含量的变化。随后,流式细胞仪根据荧光强度将细胞分为 G1、S 和 G2/M 期。由于 G2 和 M 期的细胞有着相同的 DNA 含量,因此光凭 DNA 染色不能分辨它们。最常用的染料是碘化丙啶(PI),它插入 DNA 双螺旋,并发出强烈的红色荧光。它是由 488 nm 的光激发,因而适用于大部分流式和微孔板细胞仪。PI 不能渗透完整的细胞膜,因此细胞在一开始就必须经过透化处理。PI 还会对双链 RNA 进行染色,这样还需要用到 RNase。

基于以上的种种不便, TTP LabTech 开发出一种全新的利用 Acumen eX3 的细胞周期分析方法,能够在 10 分钟以内读取整个 96、384、1536 孔板(Acumen 特有的按面积扫描模式使得 96、384 与 1536 孔的扫描时间基本相同)。这种方法的另一个最主要优势是能够在原位分析贴壁细胞,而不像流式细胞仪那样需要将细胞悬浮。原位读板保留了药物处理过程中可能发生的形态改变,还能够分析外形,并确定细胞核的定位。这些信息能看见有丝分裂晚期的多个细胞核,将 G2 期的细胞分辨出来。此外,它还能进行细胞周期和有丝分裂指数的多重测定。固定细胞用 PI 和抗磷酸化组蛋白 H3 的抗体染色后,利用 488 nm 的光激发,能同时分析两种参数(图 3.1)。

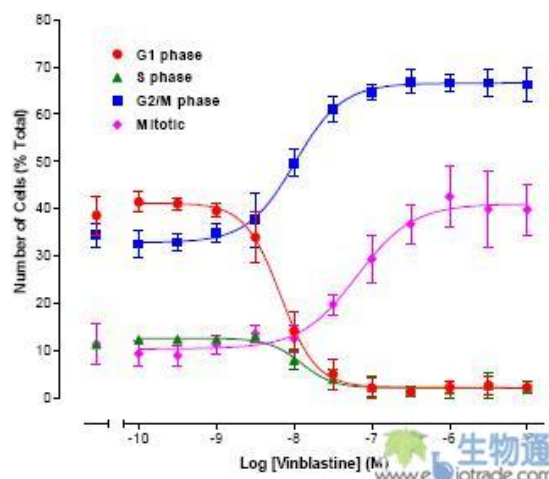


图 3.1 固定细胞用 PI（细胞周期分析）和抗磷酸化组蛋白 H3（FITC 结合，有丝分裂指数）染色，两个分析在 Acumen eX3 上同时进行。

激光扫描的优势在于它能产生荧光物体的三维模型，包括细胞核。研究人员已经开发出数学模型，从单个的 DNA 柱状图来计算细胞周期中不同时期的细胞比例（图 3.2）。对于筛选应用，Acumen eX3 的通量是无可比拟的，它几个小时就能完成流式细胞仪一个星期才能做完的工作。所有的细胞处理都是在微孔板中进行，因此也很容易上升到自动化。曾有报道指出，利用 Acumen eX3 高通量化高内涵筛选平台一天能筛选 300000 个化合物。因此，它也非常适合于基因组范围的 RNAi 图谱分析。今后，TTP 将会开发多重细胞周期分析的验证步骤，将常规的周期分析与有丝分裂指数和蛋白转位分析结合起来，而后者已经超出了流式细胞仪的能力范围。

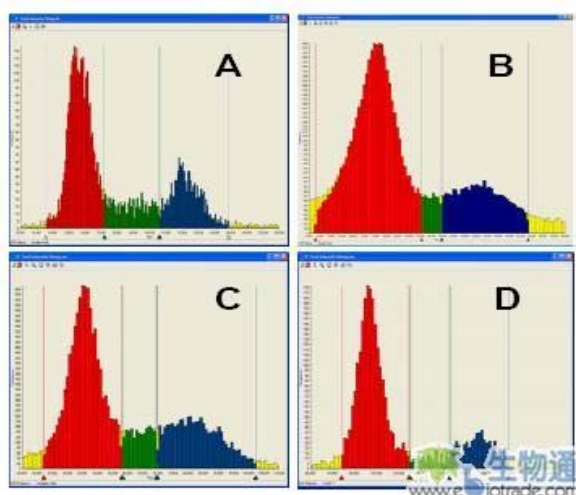


图 3.2 HeLa 细胞（每孔 2,000 个细胞）原位标记用于细胞周期检测。A, PI 染色（10 μ M）； B, Hoechst 34580 染色（10 μ M）； C, Vybrant DyeCycleTM Orange 染色（5 μ M）； D, TO-PRO-3 染色（0.5 μ M）。在一台 Acumen eX3 上分别使用 405, 488 and 633 nm 激光激发。

4. 细胞克隆形成

作为细胞毒性的参数，细胞克隆形成被认为比细胞活力更为灵敏，因为克隆形成是在细胞处于增殖状态时评估的，所以更易受毒性作用的影响。过去，克隆计数是在半固体的琼脂糖双层系统上进行的，还要在显微镜下一个一个地数。当然，这其中就会有主观因素的影响。后来，出现了更高级的图像分析系统，但是由于它的景深有限，不能准确分辨大体积的克隆；而且它的成像面积较小，通常为 1 mm \times 1 mm，因而不能对全孔进行克隆计数；最后由于需要多点成像，导致检测速度很慢。

现在，研究人员转而利用 Acumen eX3 来确定细胞生长抑制剂-星形孢菌素对 HT1080 细胞克隆形成的影响。Acumen eX3 能够自动地对 24 或 96 孔板进行高内涵的全孔扫描。它的软件应用体积算法来确定克隆数量。这种算法利用扫描目标之间的最大和最小距离来估计细胞的体积。研究表明体积更能代表体内细胞克隆的形成，因为它与肿瘤生长的相关性更好。

[点击索取 Acumen 微孔板细胞仪的更多资料！](#)

利用 Acumen eX3，细胞培养物在经过 calcein-AM 染色后，可在选定的时间点来监测克隆形成。对照孔内含有指定数量细胞的克隆。这种技术的主要优势之一是用户能区分细胞簇和克隆，从而可靠地确定细胞数量。一般来说，目的细胞克隆被认为含有 20 个以上的细胞（图 4.1，红色），而细胞簇不足 20 个细胞（图 4.1，绿色）。传统的格子计数法对于某些克隆来说就会显得无计可施（如图 4.1 中的克隆 2）。而 Acumen eX3 鉴定了孔中的所有荧光目标，这也意味着所有克隆都能被准确地鉴定和分类。在表 4.1 中显示了图 4.1 中标记的 3 个克隆的面积和体积测量结果（表 4.1）。通过比较可以发现，使用面积作为测量参数相对于使用体积作为测量参数，低估了克隆的尺寸。例如，

克隆 2 的体积/面积比要远远大于克隆 1 和克隆 3，这可以归咎于克隆的形状和其在孔中的分布方向。

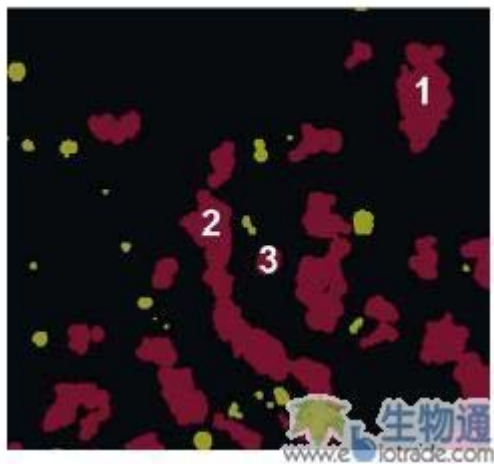


图 4.1 Acumen eX3 软件的全孔观察显示出细胞克隆的鉴定及分类。

表 4.1 图 4.1 中的 3 个克隆的数据以及体积/面积比。

Colony number	Area (μm^2)	Volume (μm^3)	Volume:Area Ratio
1	14256	1718643	121
2	30524	29877492	979
3	1870	62022	33

5. 血管生成

癌症研究人员在研究癌症转移所必需的条件时，发现其中一个必要的事件就是新的血管网络的生成，这个过程也称为血管生成（angiogenesis）。肿瘤的血管生成是指血管网络的增殖，这些血管渗透到癌生长物中，为之提供营养和氧气，并带走废物。肿瘤的血管生成实际上始于肿瘤细胞所释放的分子，它们向周围的正常组织发送信号（表 5.1）。这些信号激活了宿主组织中的某些基因，它们再生成蛋白来促进新血管的生长。研究人员已经鉴定出十几个这样的蛋白和一些小分子。在这些分子中，有两种蛋白似乎对维持肿瘤生长最为重要，它们分别是血管内皮生长因子（VEGF）和碱性成纤维细

胞生长因子（bFGF）。多种癌细胞和某些类型的正常细胞都产生 VEGF 和 bFGF。

根据以上研究结论，药物研发人员自然会想到去干扰肿瘤的血管生成，作为癌症治疗的有力手段。利用 Acumen eX3 能够筛选调节血管生成的化合物，这个过程相当简单。仪器的大视场能分析多种规格的微孔板，当然最常见的是 24 或 96 孔板。在生长因子刺激后，细胞用 calcein-AM 染色，而血管生成的数量就可轻松确定。如果是初筛，可选择细胞仪模式，会得到总的血管面积；如果是二次筛选，则选择成像模式，除了血管面积，还能了解总的血管长度以及数量（表 5.2、图 5.1、图 5.2）。

表 5.1 自然状态下激活 angiogenesis 的因素。

蛋白	小分子
<ul style="list-style-type: none"> ● Acidic fibroblast growth factor ● Angiogenin ● Basic fibroblast growth factor ● Epidermal growth factor ● Granulocyte colony-stimulating factor ● Hepatocyte growth factor ● Interleukin 8 ● Placental growth factor ● Platelet-derived endothelial growth factor ● Scatter factor ● Transforming growth factor alpha ● Tumour necrosis factor alpha ● Vascular endothelial growth factor (VEGF) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Adenosine ● Butyryl glycerol ● Nicotinamide ● Prostaglandins E1 and E2

表 5.2 在 Acumen eX3 上进行 angiogenesis 实验所使用模式的总结

分析模式	细胞计数	成像
Application	Primary Screening	Secondary Screening
Staining	Calcein-AM	Calcein-AM
Readouts	Total tube area	Total tube area Total tube length Number of tubes

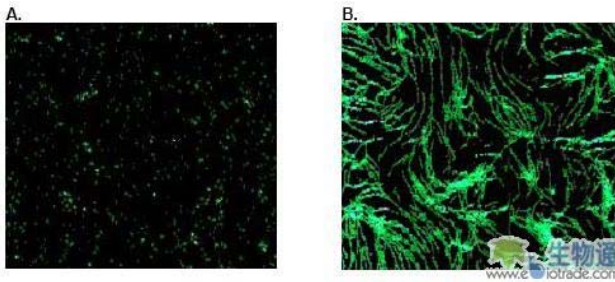


图 5.1 细胞计数模式下, Acumen eX3 软件显示的 angiogenesis 结果。A. 对照; B. 生长因子刺激。

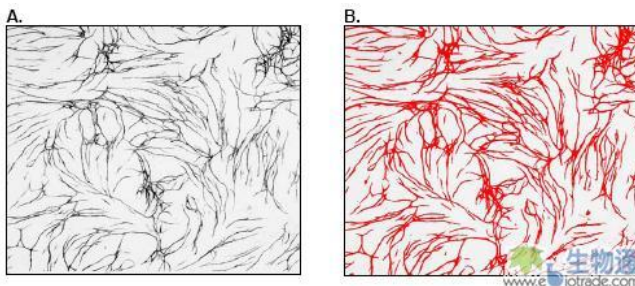


图 5.2 成像模式下的数据分析。A. Acumen eX3 软件的原始 TIFF 图像。B. 利用 Image Analysis 软件对血管进行分类。

6. 细胞迁移

细胞迁移是高度综合、多个步骤的过程。调控异常的细胞迁移涉及到癌症、黄斑退化和糖尿病伤口愈合。了解细胞移动的过程能为多种疾病状态的管理提供重要的视角。

近年来, 研究人员设计出越来越精细的方法, 来研究微孔板中细胞的运动, 以取代 Boyden 小室。一些方法关注于细胞向无细胞领域的移动。研究人员开发出两种微孔板的方法, 都与 Acumen eX3 兼容, 尤其考虑到它的大区域扫描功能。

划痕分析

在这个方法中, 细胞培养在微孔板中, 直到出现汇合的单层, 然后将孔中心长方形或十字形区域的细胞移走。这是通过适当的工具如移液管吸头的细胞移走。这是通过适当的工具如移液管吸头“划痕”单层细胞来实现的。一些研究人员使用机器人的 96 SBS 形式移液头, 同时处理 96 个孔。然

后加入活细胞染料如 calcein-AM, 并用 Acumen eX3 扫描来进行分析, 以确定划痕的闭合程度。

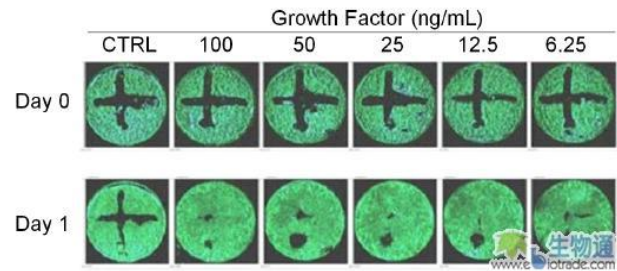


图 6.1 BCPC3 细胞培养在 96 孔板中, 形成单层, 并用 CMFDA 活性染料来染色。利用 96 浮动针头工具划痕单层细胞。随后用 Acumen eX3 扫描平板, 以确定 0 时的划痕区域。添加生长因子, 继续培养细胞 16 小时, 让细胞填充划痕区域。再次用 Acumen eX3 扫描平板, 以确定填充的比例。数据来自礼来公司的 Mark Uhlik。

Oris 细胞迁移分析

Oris 细胞迁移分析 (www.platpustech.com) 利用独特的细胞接种塞来产生一个能观察细胞迁移和侵袭的检测区域。硅胶塞插入 96 孔板的每个孔中, 接种后 4-18 个小时贴壁细胞形成一个环。去除硅胶塞, 可见单层细胞的中心有均一的圆形检测区域 (直径 2 mm), 细胞会向此区域迁移。

TTP LabTech 与 Platpus Technologies 合作, 实现了 Acumen eX3 的分析。考虑到仪器的大视场和细胞计数分析, 这变得相当简单。

Platpus Technologies 现在还提供了此试剂盒的细胞侵袭版本, 以便研究细胞通过细胞外基质的迁移。

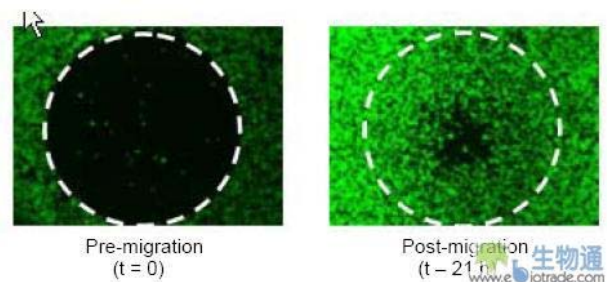


图 6.2 利用 Oris 细胞迁移分析进行的细胞迁移分析, 并在 Acumen eX3 上分析。

7. 组织扫描

TTP LabTech 还将 Acumen eX3 应用于载玻片上的组织切片扫描。这项工作的目标是对标记了荧光染料的组织样品进行自动化的病理分析。

研究人员已经实现了几个关键突破。首先是准确定位载玻片上的组织样本，让它们位于 Acumen eX3 的扫描区域内。有两种方法可以实现，如图 7.1 所示。A 是一种定位架，用户可利用上面刻着的网格来定位样品。B 则是一种印好的载玻片，有两个扫描区域。研究人员预计，印好的载玻片会更适合高通量荧光免疫组化研究，因为它们能浸泡在水浴中以便于组织切片的回收。

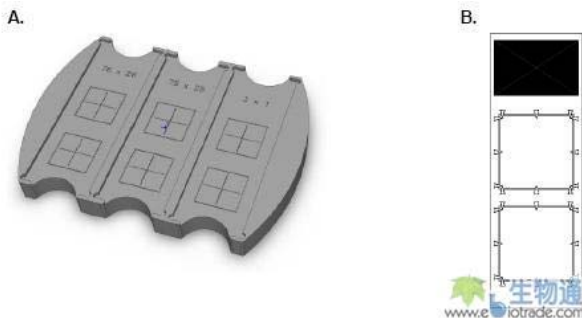


图 7.1 定位载玻片中组织的装置。

此外，研究人员还设计出两种新颖的载玻片支架，能对 4 块载玻片进行扫描（图 7.2）。这两种支架分别从顶部（A）或底部（B）插入载玻片，如果有平板操作机器人的话，还能自动将支架放入 Acumen eX3。这样，用户就能对 4 块玻片上的 8 个指定区域进行扫描。Acumen eX3 的软件（3.3 版）已经过升级，能确保兼容性。

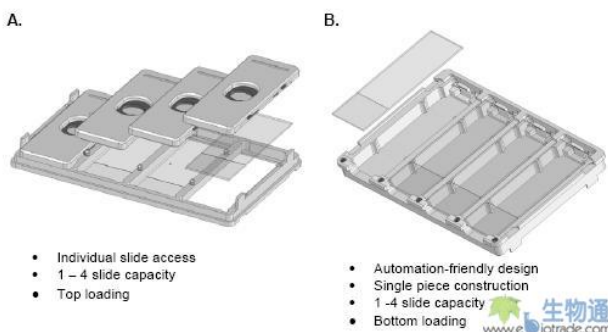


图 7.2 利用 Acumen eX3 进行玻片扫描的支架。

Acumen eX3 已帮助研究人员获得染色后组织切片的定性图像。数据能作为 TIFF 图像导出，用于下一步的病理学分析。最近，礼来等公司还用它进行了肿瘤组织切片中的生物标志物检测。肿瘤组织经抗磷酸化组蛋白 H3 抗体（有丝分裂指数）以及 PI(DNA)的染色，如图 7.3 所示。标准 Acumen eX3 软件所产生的高内涵数据甚至可与商业化的图像处理软件相媲美。

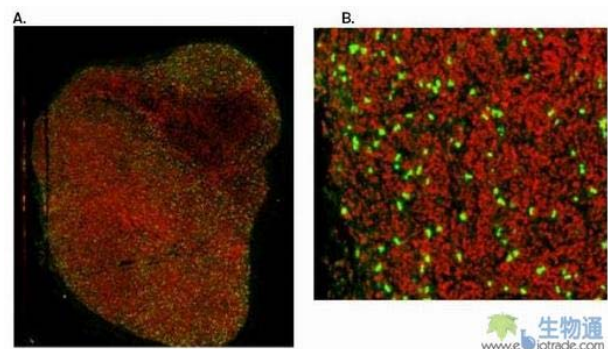


图 7.3 利用 Acumen eX3 来分析实体瘤的有丝分裂指数。A. 整个肿瘤切片的视图。B. 呈现特异有丝分裂细胞染色的组织切片的放大。

总结

当然，高通量化高内涵筛选平台在肿瘤学中的应用还远不止以上这些。它还能对玻片上的组织切片进行扫描和成像，也可以利用蛋白抗体来确定激酶从胞质到核的转位，研究其激活。另外，也可以监测带有 GFP 标签的蛋白，从而实现更简单的自动筛选。至于细胞凋亡、增殖、毒性分析，那更是不在话下。Acumen eX3 高通量化高内涵筛选平台以其快速、原位及多重分析的优势，正在肿瘤学中发挥着日益重要的作用。

[点击索取Acumen微孔板细胞仪的更多资料！](#)

背景资料

著名的实验仪器厂商 TTP LabTech 公司将创新的 Acumen eX3 推向全球市场以来, Acumen 已经成为对高涵量药物筛选进行高通量分析的市场领先者, 主要安装在多个跨国制药企业研发中心和国家级的科研机构, 其中中国办事处自 2008 年设立以来一年内就已经在国内市场售出了 5 台。Acumen 现在发展到的第三代产品已为那些需要进行多重荧光分析和提高细胞荧光分析通量的机构建立了可靠的行业标准, 并使这些分析更容易进入初筛领域。

Acumen 高内涵高通量平台的应用

TTP LabTech 的 Acumen eX3 为基于细胞的分析筛选提供了非常灵活的方法。这种技术产生了高通量、高涵量及高度多元化的数据, 广泛适用于各种生物分析。

Acumen eX3 已被应用于药物开发进程的各阶段, 并凭借它的灵活性优势被广泛应用于多种生物学应用中的定量分析中, 包括毒性检测、病毒感染性、细胞周期、细胞增殖、蛋白激酶活性和报告基因分析。

技术应用范围包括:

脂肪生成	凝集素结合
血管生成	脂肪累积
凋亡	有丝分裂指数
细胞粘附	迁移
细胞周期分析	P-糖蛋白
线虫分型	吞噬作用
细胞分化	磷脂沉积
细胞增殖	蛋白激酶图谱
细胞伸展	蛋白转位
克隆形成	蛋白酶体分析
细胞毒性	报告基因激活
GPCR 筛选包括:	RNAi 文库图谱
--- Bioimage 公司 Redistribution®	脂肪变性
高涵量路径分析中侦测细胞内蛋白	干细胞分型
质转位的专利技术	
--- Transfluor® GPCR 药物开发技术	组织扫描和成像
--- β-内酰胺酶	
杂交瘤筛选	病毒感染性

TTP LabTech Ltd.公司的国内联系方式:

名称: TTP LabTech 中国代表处

地址: 上海市张江高科技园区蔡伦路 7 8 0 号
3 楼 J 座

电话: 021-50793390/50793991

传真: 021-50793992

邮箱: china@ttplabtech.com

网址: www.ttplabtech.com.cn

从组织到细胞的快速途径

从神经组织解离到建立原代细胞培养通常需要几天，甚至数周。这个过程不仅繁琐，还很单调。其实还有一种捷径，跟着美天旎三步走，几个小时就能实现从神经组织到体外培养细胞系的产生。这个无缝的流程让研究人员充分利用了宝贵的样品，同时还有宝贵的时间。本文就举个例子，说明一下从组织样品到细胞培养的每一步。

步骤 1：神经组织解离

神经组织的解离是第 1 步。Neural Tissue Dissociation Kit 能够将胚胎、新生或成体来源的组织温和解离成单细胞悬液。两步的酶解过程只需要不到一个小时，就能产生大量下游分析即用的活细胞。解离过程可以手工完成，也能由 gentleMACS™ Dissociator 来自动完成。

解离过程如下：

将脑组织切成小块，收集在 HBSS 中，300×g 离心 2 分钟 → 加入预热的酶混合物 1，37°C 孵育 → 再加入酶混合物 2 → 解离（手工解离或自动解离）→ 加到 30 μm 细胞滤器中，用 HBSS 洗涤两次

步骤 2：髓磷脂碎片的去除+神经细胞的分离

获得了单细胞悬液之后，下一步就是目的细胞的分离。在细胞分离方面，MACS 技术无疑是金标准，目前发表的文献已达 12000 多篇。别急，在细胞分离之前还有一个小插曲。那就是去除对后续免疫标记有干扰的髓磷脂（myelin）。美天旎最近推出的 Myelin Removal Beads 能够从神经细胞悬液中去除髓磷脂，标记+分离的全过程只需要 35 分钟。

可能你会觉得，髓磷脂也没什么大不了的，不去除也行吧。美天旎就做过实验，将步骤 1 得到的

细胞悬液分成两组，一组用 Myelin Removal Beads 处理，一组不处理。然后利用 Anti-Prominin-1 MicroBeads 分别从两组中分离神经前体细胞。第一组（处理过）的回收率达 95%，第二组（未处理）只有 80%。瞧，这就是差别。

除了 Anti-Prominin-1 MicroBeads，美天旎还提供了多种磁珠，能识别各种免疫球蛋白亚型、亲和标签和荧光基团，而且多种抗体通过间接的磁性标记，也能用于 MACS 细胞分离。

步骤 3：神经细胞培养

分离到了你想要的神经细胞，下一步就是原代培养了。美天旎的 MACS Neuro Medium 和 MACS Supplement B27 PLUS 这时就派上用场了。MACS Neuro Medium 是化学成分限定的无血清培养基，专门为免疫磁珠分离的神经细胞而优化。

上面 3 步简单说明了如何更快更省力地分析神经细胞。其实不止是神经细胞，只要你所感兴趣的细胞表达特定的表面标志物，且有相应的抗体，MACS 技术就能协助你分离细胞。如果你想进一步了解 MACS 技术，或需要技术支持，可以[联系美天旎](#)哦。

（生物通 余亮）

磷酸化蛋白质组的研究工具

可逆的蛋白磷酸化是最重要的翻译后修饰之一，也是研究的热点。磷酸化调控了细胞进程，包括细胞周期、生长、凋亡以及信号转导通路的关键事件。为了更好地了解这种调控机制的分子基础，研究人员常常需要鉴定蛋白的磷酸化位点。

赛默飞世尔科技旗下的蛋白质专家 Pierce 提供了一整套磷酸化蛋白质组的研究工具，包括纯化、富集和检测。蛋白磷酸化的检测可不是件容易的事，因为磷酸基团相当不稳定。磷酸化蛋白的低丰度也让检测难度陡增，并且市场上磷酸化特异抗体的选择也不多。

对于磷酸化蛋白的富集，目前有多种方法。对于选择性富集，常借助于磷酸化抗体来进行免疫沉淀。近来出现了一种新方法，就是利用金属螯合层析（IMAC）富集磷酸化蛋白，并结合质谱分析，大大提高了磷酸化蛋白质组的分辨率。金属螯合层析也是一种很有效的方法，它利用了磷酸基团与某些金属（如镓）的亲合力。二氧化钛层析是一种相对较新的技术，它通量高，柱准备时间也少得多。

磷酸化蛋白的富集

Pierce Phosphoprotein Enrichment Kit 能够从哺乳动物细胞裂解液和组织提取物中高效富集磷酸化蛋白。此试剂盒采用方便的离心柱形式，简单快速，整个富集过程仅需 1.5-2 小时。独特的树脂和缓冲液配方让产量更高，而非特异结合几乎可忽略。此试剂盒与多种下游应用兼容，包括质谱分析、Western blotting、蛋白芯片和双向电泳。产量一般为上样总蛋白的 10-25%，不过这只是概括而言，细胞类型以及处理方式都会影响产量。注意：磷酸化蛋白的结合取决于蛋白等电点和缓冲液的 pH 值，必要的时候，你需要调整一下缓冲液的 pH。

磷酸化肽段分离

从复杂的蛋白裂解液中鉴定特定的磷酸化肽段是很有挑战性的。非目标肽段的去除对于简化下游鉴定过程很重要。Phosphopeptide Isolation Kit 采用易用的离心柱形式，让磷酸基团与固定的镓结合。每个镓圆盘可结合大约 150 µg 的磷酸化肽段。整个操作过程十分快速，仅需 15 分钟。纯化后的磷酸肽段可用经典方法分析（比如薄层层析、高压液相色谱等），也可交给更高通量的 LC-MS 和 MALDI-MS 分析。操作手册中提到了多种结合、洗涤和洗脱缓冲液，适合不同的应用。比如，在碱性条件下（如 0.1N 碳酸氢铵）来洗脱磷酸化肽段后，下游可直接用质谱分析，而无需额外的样品处理。

高通量的磷酸化肽段分离

Pierce Magnetic Titanium Dioxide Phosphopeptide Enrichment Kit 适合于复杂样品的高通量纯化。TiO₂ 配体选择性结合含有磷酸化丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基的肽段，而与酸性残基的非特异性结合极少，能够从蛋白酶消化的样品中富集磷酸化肽段。TiO₂ 包被的磁珠可用于高通量的磁性平台，如 Thermo Scientific KingFisher 96 和 Flex 仪器，当然也能用于普通的台式操作。试剂盒中附带了两个 Thermo-Fast 96 Robotic PCR Plate，一次能处理 1-96 个样品，如果用 KingFisher Flex 仪器分析，整个过程只需要 15 分钟。此方法比传统的 IMAC 灵敏 1000 倍以上，能富集 100 fmol 的磷酸化蛋白。

酪氨酸磷酸化蛋白的捕获

大家都知道，蛋白磷酸化指的是丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基的磷酸化。尽管在所有磷酸化事件中，酪氨酸的磷酸化只占了 0.1-1%，但却是研究最多的，因为磷酸化酪氨酸信号的调控异常与多种人类疾病有关。包含 SH2 结构域的蛋白能够识别许多信号蛋白的特定磷酸化酪氨酸残基，并调节酪氨酸激酶的功能。

Pierce 的 SH2 Domain Phosphotyrosine Capture Kit 就利用这一特性，能从哺乳动物的细胞裂解液中纯化具有活性的酪氨酸磷酸化蛋白。分析过程采用带 GST 标签的 SH2 结构域肽段及谷胱甘肽琼脂糖树脂来捕获特定的结合物，代替了传统的磷酸化抗体所进行的免疫沉淀。它能以非肽段的形式，鉴定全长的内源蛋白。SH2 Domain Phosphotyrosine Capture Kit 让研究人员能监控特定的酪氨酸磷酸化事件，并鉴定 SH2 结构域蛋白-蛋白相互作用网络。纯化产物可用 Western blot 或质谱进行分析。

每个试剂盒中含有 600 µg GST-SH2 结构域和足量的试剂（包括阴性对照），能够进行 6 次 pull-down 反应，每次约 500 µg 细胞裂解液。针对不同的蛋白，有不同的捕获试剂盒，详细信息可[向赛默飞世尔索取](#)。

丝氨酸、苏氨酸磷酸化蛋白的检测

至于丝氨酸、苏氨酸磷酸化蛋白的检测，

Phosphoprotein Phosphate Estimation Assay Kit 是一种简便易用的方法，能快速确定纯化蛋白的磷酸化水平。在分析过程中，先将丝氨酸和苏氨酸残基上的磷酸碱性水解，再利用孔雀石绿和钼酸铵定量释放的磷酸。这种方法能够鉴定出包含磷酸化丝氨酸和磷酸化苏氨酸的未知蛋白，并确定其磷酸化的程度。纯化的蛋白样品再与特定浓度的卵黄高磷蛋白（phosvitin）标准品进行比较，其中卵黄高磷蛋白的磷酸化水平已知，来计算每摩尔纯化蛋白的磷酸摩尔数。分析可在 EP 管中进行，若追求高通量，也可以在微孔板上进行。

若想在 SDS-PAGE 胶上对磷酸化蛋白进行特异染色，Pierce Phosphoprotein Staining Kit 可以实现。在钙离子存在的情况下，0.5 N NaOH 能水解磷脂键。凝胶中新形成的磷酸钙用钼酸铵处理，产生不溶的硝基磷酸-钼酸盐复合物，最后用甲基绿进行染色。整个过程大约需要三个小时，不过就流程来看，似乎不如生物通最近介绍的 Pro-Q Diamond 染料更方便。

除了上面介绍的这些试剂盒，Pierce 还提供了 300 多种磷酸化特异抗体，应用于免疫荧光、高内涵分析、ELISA、免疫沉淀、Western blot 等多个领域。详细的抗体列表可[查看Pierce的目录](#)，或[向赛默飞世尔索取](#)。

（生物通 余亮）

12 月冷泉港实验手册聚焦荧光蛋白

随着几代科学家的努力，荧光蛋白已经从最初的GFP衍生到现在的OFP、RFP，也更亮更稳定，它们为活细胞成像注入了新的力量。生物通 11 月的荧光专题也给了荧光蛋白一个特写，谈了谈[荧光蛋白的过去、现在和未来](#)。

巧的是，12 月的冷泉港实验手册（CSH Protocols）也聚焦了荧光蛋白的结构和颜色变异体。其中一篇免费的 protocol 就介绍了目前广泛使用的各种荧光蛋白。文中简要介绍了荧光蛋白的历史，还谈了它们的结构特点和突变改造。

绿色荧光蛋白的突变产生了多种颜色的绚丽荧光蛋白，从蓝色到黄色，覆盖 80 nm 的光谱范围。新的橙色和红色荧光蛋白是来自珊瑚礁和银莲花，它们经过改造，也能用于哺乳动物系统。这些荧光蛋白都带有更多样的发色基团，荧光发射覆盖 200 nm 以上的光谱范围。除了颜色多样外，荧光蛋白的亮度、耐酸性、低聚物特征以及光稳定性都有增强，改善了它们的整体应用。文中还详细介绍了多个不同荧光蛋白变异体，并强调了一些重要的应用要点。

[Fluorescent Protein Tracking and Detection: Fluorescent Protein Structure and Color Variants](#)

另外一篇免费的 protocol 介绍了细胞动力学的计算机图像分析。从活细胞图像中获取定量的数据，是检验分子和细胞过程的机械论假说的关键。

目前公认的方法是利用计算机图像来实现这一任务。不过，在实践过程中，研究人员常常会碰到障碍，使细胞生物学中的计算机图像处理陷入困境。

首先，还不太清楚哪种测量是鉴定分子系统所必需的，而且也不知道这些测量对于分子过程的鉴定是否足够。第二，即使很好地定义了测量要求，要找到一种软件工具来提取这些数据也是相当困难的。一种解决办法就是研究人员自行开发软件工具。有了商业化和开放源代码的软件包的协助，这在某些应用下是可行的。另一种方法就是研究人员与计算机方面的科学家合作。这样的合作需要计算机专家和生物学家密切配合，共同优化数据获取和分析步骤。本文介绍了一些基本概念，让计算机图像处理在活细胞图像中的应用更成功。

[Computational Image Analysis of Cellular Dynamics: A Case Study Based on Particle Tracking](#)

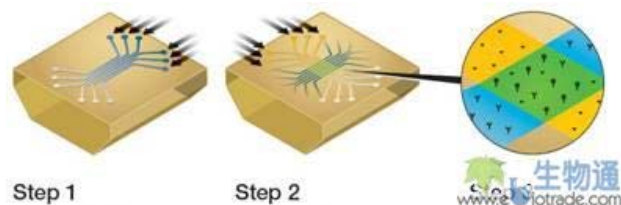
这两份 protocol 都是节选自冷泉港出版社出版的第三版的《Live Cell Imaging》，目前这本书正在印刷中，明年会出版。

（生物通 余亮）

使用阵列式 SPR 传感器 ProteOn XPR36 系统进行受体功能研究

在复杂的生命活动中，蛋白质能够传递特定的信号，组合成多蛋白复合物，控制酶的活性，并调节细胞的活动。这些工作大多需要特定的蛋白与蛋白之间的相互作用来完成。现在越来越多的研究是围绕着蛋白-蛋白相互作用的机制、反应亲和力的差异以及抑制剂对蛋白复合物形成的影响等方面展开的。深入了解这些相互作用的机理或是强弱关系，对于认识生命的过程的，揭示疾病的发生发展过程，乃至对药物开发提供靶点和候选物，都有非常重要的意义¹。

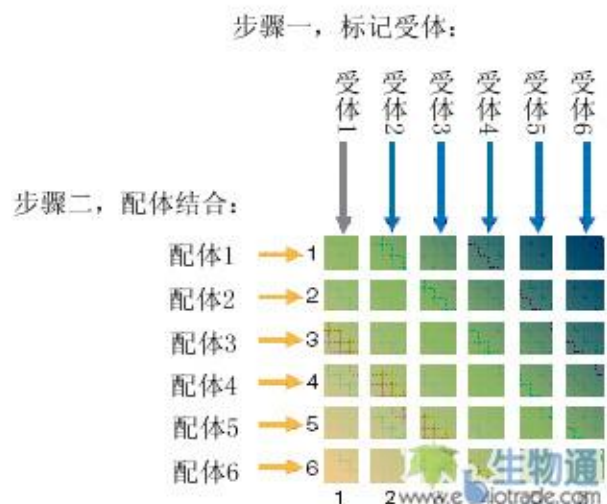
表面等离子体共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 技术是一种快速进行体外生物分子间相互作用分析的工具，而且具有非标记、实时性和精确定量的优点。目前，利用这一技术进行生物分子相互作用分析的仪器种类很多，美国 Bio-Rad 公司最新推出的一款 ProteOn XPR36 蛋白相互作用阵列系统，就是其中的优秀代表。如下图所示，这款仪器的芯片上有 36 个相互作用位点，排成 6×6 的阵列形式，可以同时标记 1-6 种不同的配体分子，平行地检测 6 个不同分析物或分析物的 6 个浓度，因而可以平行分析多对相互作用²。这种分析方式对于当今生命科学研究非常有价值，正如美国加州大学 Irvine 分校的 Robert Corn 所说：“要进行严格意义上的蛋白质组学研究，你需要同时研究多对蛋白之间的相互作用”³，因为多蛋白平行分析，不仅带来了效率的提高，更给出了在严格



相同条件下检测的结果可靠性和重复性。

利用这种分析方法，研究者可以非常方便地进行配体和受体研究。现在受体功能的研究已经从传统的观察受体和配体的结合与否，深入到受体生物学功能的产生机理上。因此，常常需要观察天然存在的配体和不同亚型的受体之间的相互作用强弱

关系，或者用突变制造一些人工配体，通过研究突变型和野生型配体与受体之间结合特性的差异，来揭示受体生物学功能的产生机制，从而为疾病的机理研究或药物发现提供理论基础。利用 Bio-Rad 公司 ProteOn XPR36 系统进行这方面研究，可以极大地简化实验步骤。只需要在芯片的不同通道上偶联不同亚型的受体，然后不同浓度的配体同时流过芯片，只需一次就可以测出配体和多个受体的亲和力。也可以不同配体同时流过不同通道，根据反应曲线即可判断不同配-受体间相互作用的快慢和大致强弱关系，如下图所示。



关于这方面的研究，以色列 Weizmann 研究所的研究小组给出了一个出色的例子^{4,5}。以往的研究发现，IFN α 主要表现出明显的抗病毒作用，但抗肿瘤增殖的作用却比较弱，相反 IFN β 的抗肿瘤增殖比较强。两种干扰素都结合受体 IFNAR，

那么功能差异的原因是什么呢？这个小组的研究人员将 IFN α 受体的两个亚基固定在 ProteOn XPR36 系统芯片的不同通道上，分别测定这两种干扰素和受体两个亚基的亲和力，发现 IFN β 与其受体各亚基的亲和力明显强于 IFN α 。是不是亲和力强弱决定了 I 类干扰素的抗肿瘤作用呢？研究人员用噬菌体展示技术筛选得到了 IFN α 的几个突变体，这些突变体与 IFN 受体的亚基 I (IFNAR1) 亲和力强于 IFN α ，表现出的抗肿瘤增殖作用也强于后者，而且表现出明显的对应关系，即亲和力越强，抗增殖作用也就越明显。所以作者初步认为，抗肿瘤增殖的作用取决于干扰素与 IFNAR1 的亲和力。

然而进一步的研究却并不支持这一结论，很多 IFN β 的突变体虽然亲和力强于 IFN α ，但抗肿瘤增殖效果却并不相应增强。于是作者进一步分析内在的机制。SPR 技术不仅可以测定两种分子间的亲和力，而且可以测定表征结合和解离速率的动力学数据—— k_{on} 和 k_{off} 。作者仔细测定了所有这些突变体的动力学数据后，发现配体-受体复合物越稳定 (k_{off} 数值越小)，配体的抗肿瘤增殖作用越明显。因此，复合物的解离动力学数据比单纯的亲和力更加重要。

定量研究蛋白相互作用的亲和力和动力学，可以帮助科研人员更深入地研究蛋白功能。SPR 技术是测定反应动力学和复合物亲和力的最佳手段。而 Bio-Rad 公司 ProteOn XPR36 系统能够帮助科研

人员更快速方便，更准确地测定生物分子间的相互作用数据。[点击索取更多技术和应用资料！](#)

参考文献：

1. Chen Katz, et al.; Molecular basis of the interaction between the antiapoptotic Bcl-2 family proteins and the proapoptotic protein ASPP2. Proc Natl Acad Sci., 2008, vol. 105, no. 34, 12277–12282.
2. Rich RL and Myszkas DG, Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis, Anal Biochem 361, 1–6 (2007)
3. Nathan Blow. Proteins and proteomics: life on the surface. 389-393, nature methods, vol.6 No.5, May 2009.
4. Kalie E et al., An Interferon alpha2 Mutant Optimized by Phage Display for IFNAR1 Binding Confers Specifically Enhanced Antitumor Activities, J Biol Chem. 2007 Apr 13;282(15):11602-11
5. Eyal Kalie, et al.; The Stability of the Ternary Interferon-Receptor Complex Rather than the Affinity to the Individual Subunits Dictates Differential Biological Activities; JBC., Nov 2008; 283: 32925 – 32936.

使用 ProteOn XPR36 系统进行蛋白和小分子化合物之间相互作用的分析

很多小分子化合物具有特殊的活性基团，可以结合某些特定的蛋白或核酸，激发或者抑制生物大分子的活性，从而影响生命的过程。人体内种类繁多的维生素类、辅酶等物质就是这些活性小分子化合物。在药物方面，有很多药都是一些有着特殊活性的小分子化合物，分子量从 200 Dalton 到数千 Dalton。因此，小分子药物筛选、优化和药物机理研究成为了制药和药理学研究的重点。目前关于这方面研究的手段，从不同的目的出发有不同的方法。但如果要测定某些化合物和靶蛋白之间的相互作用动力学和亲和力，最好的办法非 SPR 技术莫属。

ProteOn XPR36 蛋白相互作用阵列系统是 Bio-Rad 公司 2007 年隆重推出的新一代 SPR 生物传感器。它具有 6×6 的芯片格式，可以在芯片上同时或分次固定 6 种蛋白 (ligand)，然后化合物 (analyte) 以 6 种不同的浓度平行地流过所有 ligand，36 对相互作用的反应曲线同时记录，同时分析。只需一次进样就可以分析一种药物和多种不同靶蛋白之间相互作用的动力学和亲和力常数。这种分析方法不仅大大提高了分析速度，而且由于分析的时候多个浓度、多个不同的 ligand 和 analyte 是在完全相同条件下反应的，得到的结果最准确，重复性也最好。[点击索取更多技术资料！](#)

ProteOn XPR36 系统分析小分子化合物采用灵敏度最高的 GLH 芯片。这种芯片的基质较长，羧基位点较多，因此能结合较多的 ligand 蛋白，而且蛋白活性保持较好。这样的芯片能够产生较高的反应信号，非常适合分析小分子化合物。以下是使用该款芯片分析蛋白和小分子化合物相互作用的几个例子：

CAII 蛋白和小分子抑制剂的相互作用：

首先将 CAII 蛋白标记在 GLH 芯片上。采用氨基偶联，将 CAII 蛋白用 pH 5.0 的 NaAc 溶解，标

记在芯片上，可达 21,200 RU。待基线稳定后再上小分子抑制剂溶液。待反应全部结束后，用 ProteOn Manager 软件分析结果。这些小分子抑制剂的名称、分子量、反应最高浓度和结果等信息见下表，反应曲线见下图：

名称	MW	反应最高浓度 (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	R_{max} (RU)
Sulpiride	341	250	2.52×10^3	0.26	1.0×10^{-4}	188
Sulfanilamide	172	50	2.40×10^4	0.12	4.8×10^{-5}	112
Furosemide	331	50	5.15×10^4	0.04	7.1×10^{-7}	180
CBS	201	50	2.83×10^4	0.03	1.2×10^{-5}	105
Dansylamide	250	10	1.33×10^5	0.09	6.5×10^{-7}	105
1,3-benzene-disulfonamide	236	10	1.11×10^5	0.09	8.1×10^{-7}	99
Benzenesulfonamide	157	50	1.17×10^5	0.12	1.0×10^{-5}	114
7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamide	217	2	4.64×10^5	0.01	2.8×10^{-8}	82
Acetazolamide	222	2	9.28×10^5	0.02	2.6×10^{-8}	99
Methylsulfonamide	95	2,500	-	-	3.2×10^{-4}	22

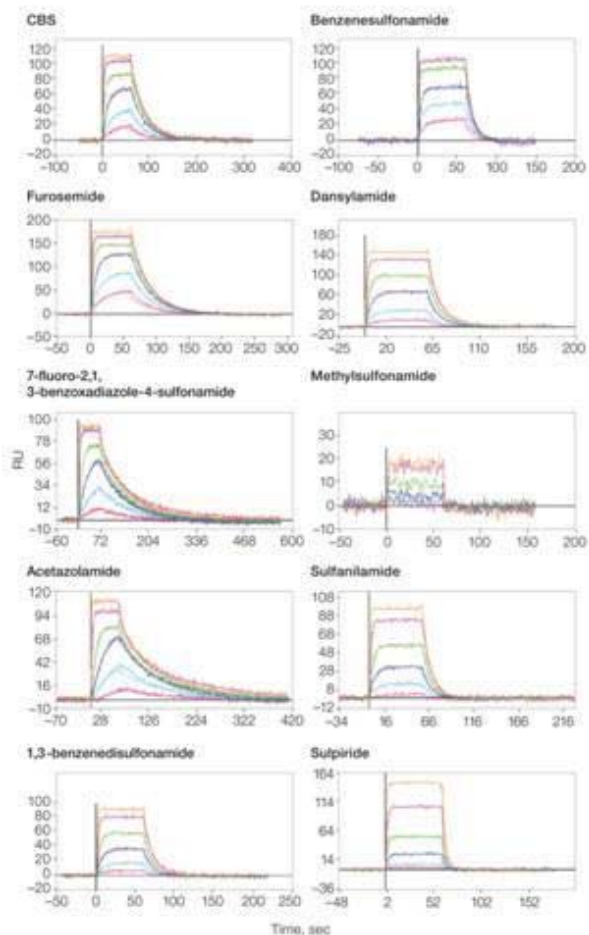


Fig. 3. Sensorgrams and analysis fit from each of the kinetic studies of CAII (20,000 RU) and the pertinent inhibitor. The kinetic parameters are shown in Table 2.

以上实验用的小分子化合物分子量非常小，因而信号比大分子蛋白要低很多。GLH 芯片通过增大标记量，有效地提高了反应的信号，而且得到的结果与前人用传统的芯片分析得到的结果均相符。同时需要指出，所有这些反应，都是在一两天的时间内完成的，大大缩短了分析时间。

Anti-DNP 抗体和 DNP 标记氨基酸的相互作用分析：

如果作为 ligand 的蛋白分子非常大（超过 100kD），那么这些分子在标记的时候用于空间位阻的关系，会占据基质的多个结合位点，导致标记效率下降。为此，很多人用 ligand 和 analyte 分子量之比来衡量芯片或仪器的灵敏度。GLH 芯片可以达到 400 倍的检测灵敏度，也就是说，即使 ligand 分子比 analyte 分子的分子量高 400 倍，也依然可以检测到相互作用。为此，我们设计了一个

小分子抗体（约 150 KD）和几个抗原之间的相互作用实验。每个实验的具体信息和反应曲线见下表和下图：

名称	M W	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	R_{max} (RU)
DNP-glycine	241	1.99×10^6	0.095	4.77×10^{-9}	36
DNP-valine	283	1.24×10^6	0.098	7.90×10^{-8}	41
DNP-tryptophan	370	7.14×10^5	0.251	3.52×10^{-7}	75

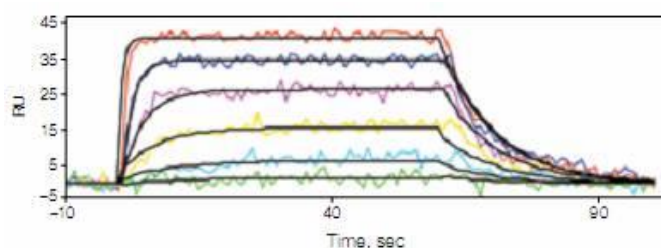


Fig. 4. Sensorgrams and analysis fit from the kinetic study of anti-DNP antibody (18,550 RU) and the DNP-valine analyte. The kinetic parameters are shown in Table 3.

上面的例子都是检测分子量仅有二、三百的小分子化合物，而抗体分子量很大。实验中抗体标记了 18550RU，因此可以检测到分子量相差如此之大的 analyte。

CAII 蛋白的标记活性测定

在小分子化合物检测中，作为 ligand 的蛋白活性对于检测的灵敏度影响非常大。很多人在做 SPR 实验的时候往往都会忽视这个问题，因为许多实验都不像 SPR 对蛋白活性如此敏感。在上面两个实验中，如果蛋白活性丧失超过 1/2，很难想象还如何检测到这么小分子量的化合物。可问题在于，氨基偶联几乎不可避免地会造成蛋白活性的降低，主要原因可能是部分蛋白的活性位点被芯片上的基质所覆盖。为此，我们又设计了一个实验，就是根据许多化合物和 CAII 相互作用的 R_{max} 值，推算 GLH 芯片上有活力的蛋白信号，最后和标记时直观看到的标记信号做一个比较，就可以计算出蛋白标记后的活力占总蛋白的比例。

这个实验的方法是，把 CAII 蛋白标记在 GLH 芯片和一种传统基质的芯片上，分别测定一系列化合物反应的 R_{max} 值，然后根据两个分子的分子量和结合比，推算出蛋白的活性。每一个实验测得的蛋白活性都不完全一样，对这些数据进行线性回归，可以得到活性的平均值。见下图：

上图中，我们可以看到，GLH 芯片上蛋白活性较高，达到了 85%，而传统芯片上蛋白活性只有 46%，也就是说，一大半蛋白在标记的过程中丧失了活性。GLH 芯片上的蛋白活性高，意味着能结合 **analyte** 的分子更多，产生的信号更高，灵敏度也就更高。

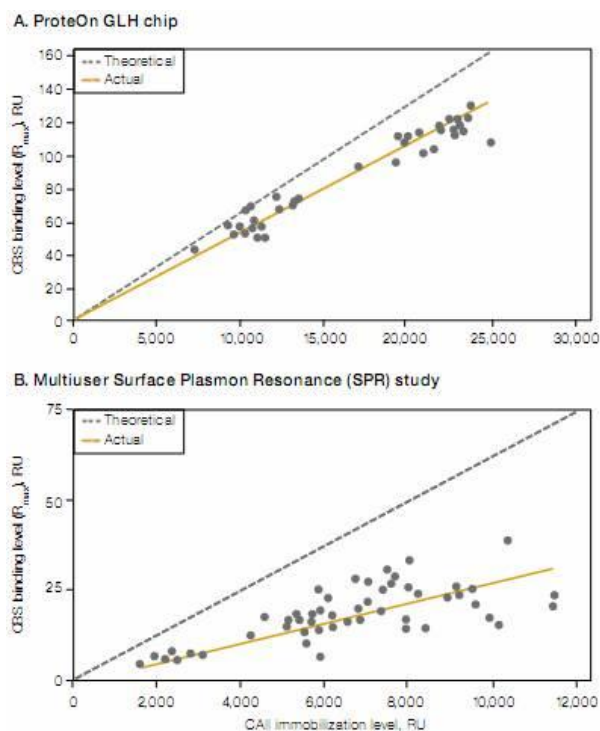
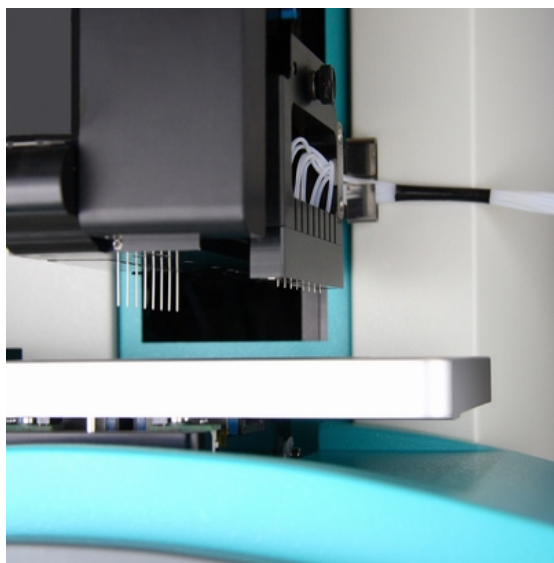


Fig. 6. Analytical response of CBS binding vs. the amount of CAII immobilized onto the sensor chip. A, ProteOn GLH chip; B, conventional chip (Myszka et al. 2003). The black dotted line shows the theoretical maximal response, assuming that 100% of the bound ligand molecules are active. The gold line is a linear fit of the actual response values. Actual ligand activity of theoretical for the GLH chip and 46% for the conventional chip.

TTP LabTech 拓展了高通量筛选设备的液体处理能力

来自英国 Royston 的消息，TTP LabTech 已经开发出大体积分液器，作为其自动化纳升级液体处理器 mosquito®的延伸。新添加的头部提供了 8 个独立通道的大型液体分配，通过将化合物精确移液到 384 孔板上来实现分析小型化。有了一次性、容积替换式加样针来确保零交叉污染和低死体积，大体积分液器将久经考验的具有纳升级液体处理能力的 mosquito 转变成高度灵活的系统，用于高通量筛选实验室。



全新的大型分液器头部可由TTP LabTech的工程师在本地安装，它与mosquito HTS移液头直接相连，从烧瓶/试管/试剂瓶中吸取液体，分配到放置在mosquito托盘位上的微孔板的一部分或者全部孔。每个“通道”都由一个独立的管道供应，因此可将不同的液体分配到指定板的特定行。准确的吸取和分配性质意味着mosquito HTS是进行单步骤连续稀释和制备分析即用型平板的理想选择。有了多种可选的管直径和高度精确的蠕动泵，mosquito HTS大型分液器为不同的分析、平板类型、体积和液体分布提供了高度的灵活性。在标准的mosquito用户界面中还整合了易于操作的软件，让非接触式大体积分液操作与移液操作能够联合开展。 [点击此处索取mosquito的更多资料！](#)

更多信息请访问

www.ttplabtech.com/products/mosquito/index.html

关于 TTP LabTech 公司

总部位于英国剑桥附近的 TTP LabTech 公司隶属于 TTP 集团，是世界上最成功的技术公司之一。TTP LabTech 的使命是将最好的科学和一流的工程学相结合，为制药和医疗保健行业提供实用且创新的解决方案。TTP LabTech 的产品专为提高生物制药研究中的效率、效能、灵活性及整体能力而设计，包括化合物存储（comPOUND®）、小体积移液操作（mosquito®）和荧光检测（Acumen® eX3）。

关于TTP Labtech的更多信息，请访问

www.ttplabtech.com。

TTP LabTech Ltd.公司的国内联系方式：

名称：TTP LabTech Ltd. 中国代表处

地址：上海市张江高科技园区蔡伦路 7 8 0 号
3 楼 J 座

电话：021-50793390/50793991

传真：021-50793992

邮箱：china@ttplabtech.com

网址：www.ttplabtech.com.cn

GE BioProcess News 第四期精彩内容抢先看

GE Healthcare BioProcess Newsletter 第四期新鲜出炉，本期精彩内容如下：

生物工艺开发中超滤和洗滤的最优化

超滤（UF）步骤是生物制药工艺中的关键操作之一。开发高效的超滤操作需要细致平衡各种工艺条件，以通过最小的过滤膜面积达到最高的滤过液流量，并且对蛋白完整性的影响最小。通过实验设计（Design of Experiments, DOE）的结合通用电气医疗集团的 ÄKTAcrossflow 设备的使用，这项工作可以自动化的实验方式实现。

即用型的技术

生物药品的制造工艺如细胞培养、收获及下游纯化正引起广泛的重视，因为这些工艺中工艺可靠性和产品安全性的保证正受到严格的考量。本文洞察了精益概念和即用型技术，它们能让生物药品的制造工艺更为杰出。

新品推荐：ÄKTA™ avant

GE Healthcare 集合了半个世纪的蛋白研究成果和 20 年的纯化经验，并对欧美及亚洲多家知名生物制药公司如葛兰素史克、礼来、惠氏等进行调研，开发出新一代的适合现代工艺开发的 ÄKTA 设备——ÄKTA avant。ÄKTA™ avant 立志加速您的工艺开发。

一种全新用于纯化人 IgG 的亲亲和层析树脂的鉴定

对于生物制药行业来说，从不同的原料中纯化 IgG 是非常重要的一环。鉴于对回收率和安全性的要求不断提高，选择层析技术进行血浆分离制备抗体的需求日益增多，还出现了利用转基因技术开发人源抗体生产的新方法。亲和层析的应用有可能缩减获得高纯度 IgG 所需的操作步骤。因此，通用电气医疗集团的定制设计填料最新开发出 IgSelect，

将一种全新的亲和配体固定于现代高性能的琼脂糖基质上。这种人 IgG 特异的配体是由 Bio Affinity 公司(BAC)开发的，对全部四种 IgG 亚型均有亲和性。通过以下从人血清中纯化 IgG，以及在转基因制备抗体应用中去除宿主蛋白的案例中可以证明新树脂的有效性。

MDCK 细胞流感疫苗 在 WAVE 波浪生物反应器中生产

近年来波浪生物反应器在众多生物技术领域成功应用，但微载体细胞制作疫苗的技术尚未普及。疫苗生产多使用 MDCK、VERO 等贴壁细胞，急需微载体大规模培养技术突破。本海报描述了 MDCK 细胞贴附 CYTODEX™ 微载体在 WAVE 波浪生物反应器中悬浮培养流感病毒。WAVE 生物反应器使用预消毒的塑料细胞袋 CELLBAG™ 和集成控制器 WAVEPOD™，全自动控制细胞培养的溶氧、温度、CO2 浓度、pH 及传质混合。

利用 PreDictor 板高通量筛选 Capto MMC 的洗脱条件

生物制药行业的需求增加以及时间和费用的限制为早期工艺开发中的传统层析柱带来了挑战。层析条件的高通量筛选能大幅度降低此过程所需的时间和样品量。本文描述了 PreDictor™板（预

装了层析填料的 96 孔过滤板) 在平行筛选多模式阳离子交换填料 Capto™ MMC 的洗脱条件上的应用, 其中利用了统计学的 Design of Experiments (DoE)。并将结果与层析柱所产生的数据进行了比较。同时比较了两种不同形式下开展研究所需的时间和样品。

本期还介绍了 VIIISelect 亲和填料、PeadyMate DAC 一次性无菌连接器等新产品和全新上市的 WAVE 服务。

另外, 还有几个特别有用的应用文献, 如抗体纯化手册、中空纤维膜操作手册, 欢迎大家下载。

更多内容请看:

<http://www.ebiotrade.com/emgzf/gebioprocess/4/GE200910.htm>。如果您在阅读完之后填写信息反馈表, 对于前 20 名提供完整信息的用户将寄送**精美礼品 (4G优盘)**一份。

寻找中国所有的 MACS 用户！



miniMACS separation unit



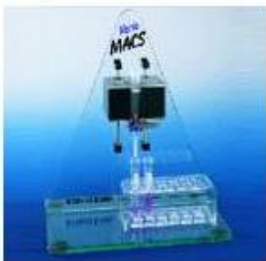
midiMACS separation unit



octoMACS separation unit



quadroMACS separation unit



varioMACS separator



µMACS separator



autoMACS separator



autoMACS Pro separator

只要您的实验室拥有以上设备的任何一种，即日起[下载填写表格](#)并发送至 macs@miltenyibiotec.com.cn，即可**获得精美礼品**一份！