

EBIOTECH

生物通技术周刊

第72期

2010年1月22日

全文下载

[2009年技术回顾]

2009年最值得关注的技术：定向蛋白质组学

2009年最值得关注的技术：无标记成像

2009年最值得关注的技术：甲基化检测

2009年最值得关注的技术：PCR

2009年最值得关注的技术：基因组的三维结构

[技术前沿]

金子在细胞内发光

MIT开发出新的RNAi导入技术

[新品速递]

聚焦ABI的流式细胞仪

大片段DNA的回收不再是难题

牛校牛人牛团队，造就超牛新定量

固定化的胰蛋白酶

R&D推出分选NK细胞的试剂盒

BioTek推出Synergy H4全功能酶标仪

PerkinElmer新推细胞信号通路和生物标志物分析No Wash Alpha系列

[应用指南]

如何高效地转染胚胎干细胞？

元月号冷泉港实验手册讲述FISH和ELISPOT

用阵列式SPR传感器ProteOn XPR36系统进行抗体开发和研究

赛默飞世尔科技质谱技术帮助识别儿童急性阑尾炎的生物标志物

2009 年最值得关注的技术：定向蛋白质组学

《Nature Methods》今年将 Method of the Year 授予 iPS 技术，也属意料之中。iPS 技术红火已久，期间发文无数，属生命科学领域发展最快的技术之一，业内也多次预测 iPS 之父日本科学家山中伸弥将获得诺贝尔奖。除了 iPS，今年还涌现出多个新技术。谁将会是明年或后年的 Method of the Year 呢？

《Nature Methods》整理出 2009 年最值得关注的技术，定向蛋白质组学就是其中之一。

在典型的蛋白质组分析中，蛋白混合物消化成肽段，并在质谱上分析。这样做在理论上能发现样品中所有蛋白，而实际上是极具挑战性的，且需要大量的资源。对于许多类型的实验来说，研究人员并不需要发现新蛋白，而是想了解在不同条件下少数蛋白的相对变化。

对于这些实验，定向的方法如选择反应监控（SRM，或多个反应监控 MRM）提供了更高的灵敏度和更快的分析速度。开发和验证 SRM 分析是一个漫长的过程，但是一旦建立，这种质谱分析就能在复杂样品中准确鉴定并定量某种蛋白。

尽管 SRM 方法已经出现了很多年，但直到最近它才在蛋白质组学中崭露头角。瑞士苏黎世理工学院 ETH 的 Ruedi Aebersold 小组是推动这项技术的功臣。今年 8 月，他们在《Cell》杂志上发表了一篇文章，应用基于 SRM 的定向蛋白质组学方法来检测并定量酿酒酵母中浓度低于 50 个拷贝/细胞的蛋白¹。检测范围可扩展到几个拷贝的蛋白，这些蛋白用普通方法无法检测。他们还快速测定了跨越整个丰度范围的蛋白网络，以展示这种技术的威力。

在最近一期的《Nature Methods》上，Ruedi Aebersold 小组展示了粗制合成的肽段库也能用于 SRM 分析的高通量开发²。SRM 未能广泛应用于蛋白质组学，因为需要开发出高质量的 SRM 分析。分析开发包括两步：第一步验证分析，证实它选择

性结合目的蛋白；第二步优化分析，提高灵敏度。看似简单的两步，实际上有着若干制约。因此，Aebersold 等使用低成本的未纯化合成肽段作为验证和优化 SRM 分析的参考，生成了每小时通量超过 100 的高通量分析。

此外，多个实验室的合作研究表明 SRM 分析是可以在实验室之间转移和重复的³。

要想建立一个全蛋白质组的 SRM 分析数据库，还需要很长时间，但是此领域的快速发展是有目共睹的，它在多个实验中实现了高通量、超灵敏的蛋白检测。（生物通 薄荷）

参考文献：

1 Picotti P, et al. Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics. *Cell*. 2009 Aug 21;138(4):795-806.

2 Picotti P, et al. High-throughput generation of selected reaction-monitoring assays for proteins and proteomes. *Nature Methods* Published online: 6 December 2009 | doi:10.1038/nmeth.1408.

3 Addona TA, et al. Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma. *Nat Biotechnol*. 2009 Jul;27(7):633-41.

2009 年最值得关注的技术： 无标记成像

近年来荧光探针的发展，特别是荧光蛋白的快速发展，让光学显微镜在生命科学中的应用上了一个大台阶。但是，这些探针并不完美，它们需要与目标分子结合。对于活体成像而言，这种结合根本不现实。而且，标记会干扰某些小分子的功能。

无标记显微镜的出现并不是最近一两年的事情，它依赖多个不同的光物理过程来产生光信号。双光子显微镜能检测一些自发荧光物种。二次谐波和三次谐波方法能分辨纤维结构和脂体。拉曼显微镜能检测特定类型的化学键，还能确定化学组成和脂的丰度，但是它的背景很高。

大约十年前，哈佛大学 Sunney Xie 领导的小组开发出了 CARS（连续反斯托克拉曼散射）显微镜，大大改善了拉曼信号以及此种方法的可用性，但它在鉴定特定分子方面仍具有挑战性。这两年，Sunney Xie 和他的同事在无标记成像上又有了一些新进展。

2008 年底，Xie 的研究小组报道了一种新的基于拉曼成像的方法，克服了 CARS 显微镜的一些问题¹。受激拉曼散射（SRS）显微镜让特定目标分子的鉴定更容易，且灵敏度非常高。一般来说，无标记方法与荧光标记相比，分子特异性相对较差，这是主要缺陷之一，SRS 就有望缩小这个差距。

2009 年，研究小组又开发出一种基于受激发射（stimulated emission）的新型显微镜²。当处于激发态的电子被正常能量水平的光子干扰时，回到基态，并发射光子。研究人员利用同步的输入和输出脉冲序列，记录了受激发射的信号。输入脉冲序列中的光能强度调成 5 MHz，来产生受激发射。每个脉冲序列会持续约 10-15 秒。非荧光分子就会产生过去无法看见的图像。

该方法的灵敏度比吸收方法高几个数量级，不受样品中其他发色团的干扰，而且适用于三维切片观测。重要的是，所有分子都是“受激发射显微镜”的潜在观测目标，所以它可用来对不发荧光的物质进行成像观测。

尽管研究人员称存在光子损害的可能，且此系统的费用还需要进一步降低，才能大规模应用，但这项研究仍是一项很重要的突破。美国国家自然科学基金会化学司的项目主管 Zeev Rosenzweig 认为：“毫无疑问，此项研究提供了一种独特的方法，对目前的光学显微镜无法成像的多种分子进行成像。”

尽管目前还没有方法能完全取代荧光显微镜，或满足每个无标记成像实验的需求，但是我们也看到了无标记显微镜的转折点，对未来应该充满信心。（生物通 薄荷）

参考文献：

1 Freudiger, Christian W.; Min, Wei; Saar, Brian G.; Lu, Sijia; Holtom, Gary R.; He, Chengwei; Tsai, Jason C; Kang, Jing X.; Xie, X. Sunney. Label-Free Biomedical Imaging with High Sensitivity by Stimulated Raman Scattering Microscopy. *Science*, 322, 1857-1861 (2008)

2 Min, Wei; Lu, Sijia; Chong, Shasha; Roy, Rahul; Holtom, Gary R.; Xie, X. Sunney. Imaging chromophores with undetectable fluorescence by stimulated emission microscopy. *Nature*, 461, 1105-1109 (2009)

2009 年最值得关注的技术：甲基化检测

除了 ATGC 这四种碱基，人们对第五种碱基-甲基化的胞嘧啶的兴趣也日益增加。甲基化修饰的存在对 DNA 转录的调控起了重要作用，异常的甲基化往往是许多疾病的起因。既然如此重要，系统绘制甲基化组的方法自然也多了起来。甲基化组 (methylome) 这个词还不太常见，它指的是全基因组范围内的甲基胞嘧啶。

最近，美国 Salk 生物研究院的 Joseph Ecker 及其同事刚刚通过高通量测序的方法，展现了一张人胚胎干细胞中所有甲基胞嘧啶的完整图谱¹。这是第一张单碱基分辨率的哺乳动物甲基化图谱，并伴随着 mRNA 和小 RNA 以及一些组蛋白修饰的比较分析。他们发现胚胎干细胞中近四分之一的甲基化是在非 CG 背景下，暗示胚胎干细胞采用不同的甲基化机制来影响基因调控。随着 ES 细胞的诱导分化，非 CG 甲基化消失，而在 iPSC 中还原。这张图谱为未来人类疾病和发育中的表观遗传学修饰研究打下了基础。

去年，美国 Whitehead 研究院的 Meissner 等也曾绘制了类似的图谱²。他们利用高通量的亚硫酸氢盐测序和单分子测序，产生了覆盖大部分 CpG 岛的 DNA 甲基化图谱。他们发现，DNA 甲基化模式与组蛋白甲基化模式的相关性比基因组序列更好；CpG 的甲基化是动态的表观遗传标志，在细胞分化期间经历大量的改变。他们还发现，胚胎干细胞和原代细胞中与发育调控相关的“弱”CpG 岛在体外增殖期间经历了异常的超甲基化，让人想起某些原发肿瘤。

另外，两个独立的研究小组，分别为哈佛大学的 George Church 等，以及加州大学的 Kun Zhang 连同弗吉尼亚联邦大学的 Yuan Gao 等，也将传统的甲基化工具如 DNA 的重亚硫酸盐转化与目标基因组捕获技术和高通量测序相结合，定量测定人基因组中的甲基化，详见生物通的报道《[如何捕获人的甲基化组](#)》。

尽管这些甲基化图谱的绘制方法略有不同，但他们都采用了亚硫酸氢盐转化，将未甲基化的胞嘧啶转化成尿嘧啶，并在随后的扩增步骤中转化成胸腺嘧啶。虽然很有效，但这种方法需要一些手工操

作来确保完全的转化，并通过计算分析来绘制图谱。

在今年早期，英国 Oxford Nanopore Technologies 的科学家提出，单分子纳米孔测序可替代这种劳动密集型的技术，测序仪能直接分辨出未修饰的胞嘧啶和甲基化胞嘧啶³。当核酸外切酶消化单链 DNA 后，单个碱基落入孔中，它们瞬间与环糊精相互作用，并阻碍了穿过孔中的电流。每个碱基 ATGC 以及甲基胞嘧啶都有自己特有的电流振幅，因此很容易转化成 DNA 序列。这样，纳米孔技术就能直接读出这第五种碱基，详见《[廉价的第三代纳米孔测序](#)》。

目前，纳米孔测序仅限于短的寡核苷酸，离全基因组测序还有一段很长的路要走。此外，还有一些技术障碍需要克服，比如确保碱基以正确的次序进入纳米孔，然后从另一侧离开。不过，一旦成功，第五种碱基的直接测序将会产生重大影响。至于 2010 年会发生什么，让我们拭目以待吧。（生物通 薄荷）

参考文献：

1 Lister R. et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315-322 (2009)

2 Meissner A. et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 454, 766-770 (2008)

3 Clarke, J. et al. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature Nanotechnology* 4, 265 - 270 (2009)

2009 年最值得关注的技术：PCR

PCR 技术自诞生以来，20 多年始终重复着变性、复性、延伸三步曲，虽说 PCR 酶的改进不少，但主旋律始终不变。直到今年，PCR 有了一些技术上的进步，也值得我们关注。

最近，澳大利亚阿德莱德大学的研究发明出一种温度转变 PCR (temperature-switch PCR)，在单个反应管中发生两次扩增，实现了基于 PCR 的 SNP 基因分型¹。这种技术减少了优化单个反应的需要。

温度转变 PCR 使用两组精确设计的引物：在第一阶段一对位点特异的引物富集靶序列，接着在第二阶段，一对巢式引物只扩增包含待分析等位基因的 DNA。两组引物对的退火温度存在很大差异，从而实现了在反应不同阶段的结合。

对于 SNP 分析而言，温度转变 PCR 具有很好的灵敏度和特异性。它能够扩增 60-500 bp 的等位基因，之后用电泳或高分辨率的熔解曲线分析来检测。这种分析对不同浓度和质量的 DNA 都奏效，起始浓度低于 100 ng 则更佳。研究人员通过盲法试验，说明了温度转变 PCR 具有高的基因分型准确性。

另一方面，在目前盛行的新一代测序中，扩增大量目的序列是必要的一环。加利福尼亚大学 Kelly A. Frazer 教授领导的研究小组发现以微滴 (microdroplet) PCR 为基础的序列富集比传统 PCR 更有效²。

在《Nature BioTechnology》发表的文章中，他们认为微滴 PCR 极其高效，能高度重复地扩增样品中的目的序列。利用 RDT 1000 序列富集仪器 (RainDance Technologies)，研究人员产生的等位基因偏移误差率在 0.1%。

Frazer 认为：“与其它类型的序列富集相比，我们能够更均一地覆盖目的序列。此外，普通 PCR 常常遇到的问题，如引物设计困难和高的等位基因偏移，在微滴 PCR 中观察不到。”

研究人员认为微滴 PCR 显示出目的序列与背景序列的比例较高，即使是同时扩增 3900 多个目的序列。而这些优势将转化成更高的测序效率，让群体研究更为经济。（生物通 薄荷）

参考文献：

1 Tabone T. et al. Temperature Switch PCR (TSP): Robust assay design for reliable amplification and genotyping of SNPs. BMC Genomics 10:580 (2009)

2 Tewhey R. et al. Microdroplet-based PCR enrichment for large-scale targeted sequencing. Nature Biotechnology 27, 1025 - 1031 (2009)

2009 年最值得关注的技术: 基因组的三维结构

如果将人的所有染色体相连并充分伸展的话, 其长度可达 2 米左右, 如此庞大的 DNA 链要全部储存在直径约 10 微米的细胞核中。此外, 基因及其调控元件需要交流, 染色质必须打开, 允许转录和复制。因此, 人们常常提出这样的疑问: “基因的线性顺序与空间排布如何关联?” “基因如何被遥远的元件所调控?”。

阐明染色质复杂结构的技术有染色质构象捕获 (chromatin conformation capture, 3C) 及更高通量的衍生技术 4C、5C, 这些提供了长距离的染色质相互作用, 但不能扩展到整个染色质相互反应组。在 2009 年末, 两种新方法的迸发, 有望绘出全基因组范围的相互作用图谱。

马萨诸塞大学的 Job Dekker 和 Broad 研究院的 Eric Lander 开发出了 Hi-C 技术, 能捕获全基因组范围的相互作用¹。Hi-C 是一种 3C 衍生技术, 基于交联 DNA 与生物素 linker 的邻近连接, 能够拉下 (pull down) 片段, 接着进行高通量测序。从 800 万个读取对中, 研究人员产生了基因组范围的接触模型, 分辨率在 1 MB。

Dekker 认为 Hi-C 的难度不在染色质捕获本身, 而在于数据的阐释。“数据中存在明显的聚合物特征, 它们确定了背景。”他推测, 如果想以 1 KB 的分辨率查看染色体的三维结构, 还需要数亿个读取。

研究人员还发现了出人意料的结果: 染色质并非类似于紧凑、多节的结构, 而是一种无节的紧密压缩构象, 有活性和无活性的染色质结构域折叠成两个空间各异的区室。

一个月后, 新加坡基因组研究院的 Yijun Ruan 和 Edwin Cheung 在《nature》上发表了另一项重要技术 CHIA-PET²。它是对读双标签 (PET) 测序与染色质免疫沉淀 (ChIP) 的结合, 在碱基对的分辨率解析了蛋白介导的功能相互作用。

研究人员用 II 型限制性内切酶将免疫沉淀的 DNA 片段与条形码 linker 连接, 产生了 PET, 然后对染色质相互作用 (ChIA) 的 PET 进行高通量测序, 生成了转录因子依赖的相互作用图谱。

对于 Ruan 而言, 数据阐释中的最大问题在于如何处理噪音。“噪音来自两个水平, 生物和技术。”生物噪音是由染色质的动态性质引起的, 因为它一直在移动, 在任一指定时间点许多相互作用都是无意义的。Ruan 的理论是有意义的相互作用更强, 因此能承受更剧烈的片段化方法。技术上的噪音则来自邻近连接步骤。为了控制这种嵌合体的形成, 研究小组将染色质材料均分成两等份, 随后加入带有不同条形码的 linker, 在连接之前再次混匀。嵌合体将在同一个 PET 上带有不同的 linker, 随后被排除。

Hi-C 和 ChIA-PET 从两个不同的方向靠近染色质相互作用组, 一个提供了染色质如何在核中折叠的鸟瞰, 另一个观察了特定蛋白对基因组结构的影响。为了增加它们的影响力, 提供更为精细的染色质相互作用组图谱, 两种方法都将向中心靠拢。更高的测序能力以及新的分析方法将增加 Hi-C 的分辨率, 最终达到 1 KB 的分辨率。ChIA-PET 在更多蛋白如聚合酶上的应用, 将鉴定出参与转录等过程的所有染色质相互作用。

叠加 Hi-C 图谱和 ChIA-PET 图谱, 以及现有的注释, 将有助于了解三维空间的基因调控。(生物通 薄荷)

参考文献:

1. Lieberman-Aiden, E. et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326, 289–293 (2009).
2. Fullwood, M.J. et al. An oestrogen-receptor- α -bound human chromatin interactome. *Nature* 462, 58–64 (2009).

金子在细胞内发光

生物学家多么希望像孙悟空一样变成小虫子，飞进细胞内，观察单个分子的移动、相互作用和执行功能。希望归希望，实际上活细胞内单分子活性的观察并不是一件容易的事。实验中最常采用的就是荧光基团，但是这些标记很容易漂白，因此在细胞的复杂环境下检测它们极具挑战性，长时间检测尤为如此。

美国 Lawrence Berkeley 国家实验室的 Paul Alivisatos 及其同事正利用一种与众不同的探针，来监测活细胞中的酶活性，这种探针是基于光散射，而不是荧光发射。文章发表在《PNAS》杂志上。

他们之前的研究表明金纳米颗粒的有效光散射能够在体外监测单分子酶活。为了观察活细胞背景下的散射信号，研究人员设计出皇冠状的金纳米颗粒簇，中心有一个颗粒，周边围绕着五个颗粒，颗粒的彼此接近增加了散射光的强度。中心颗粒作为探针，在单分子水平上示踪体内的信号通路。

这些颗粒是通过包含 DEVD 序列的肽段互相连接的。研究凋亡的人都清楚，DEVD 序列是 caspase-3 蛋白酶的底物。连接物的切割，随之而来的纳米颗粒的解体，导致散射减弱，散射光向蓝色偏移。

研究人员在这些探针的表面包被了细胞渗透性的肽段，将它们导入培养的细胞。在几个小时内，始终能观察到这些颗粒，亮度不变，这样研究人员就拥有足够的时间来观察早期 caspase-3 的激活。

这一点是荧光基团无法实现的。在凋亡诱导后，可观察到信号强度减弱，这比标准的群体分析要早得多。

皇冠颗粒的直径约为 100 nm，因此它们不会在细胞内自由扩散，利于单个颗粒的成像。凋亡诱导剂的添加导致了信号强度的急剧下降，这被认为与切割事件一致。

尽管研究人员只是用光散射纳米颗粒来检测蛋白酶活性，但可以预想，只要稍稍改动一下设计策略，这种方法能在活细胞内实现不同类型的研究，诸如蛋白相互作用或构象改变。（生物通 余亮）

原文检索：

Continuous imaging of plasmon rulers in live cells reveals early-stage caspase-3 activation at the single-molecule level

PNAS October 20, 2009 vol. 106 no. 42
17735-17740

MIT 开发出新的 RNAi 导入技术

近日，麻省理工学院（MIT）和 Alnylam Pharmaceuticals 的研究人员合作开发出新的 RNAi 导入方法，比以往技术更有效，且沉默基因所需的剂量更少。

研究小组将 siRNA 与一种类似脂的小分子 lipidoid 混合，并注射到小鼠体内，一次能导入多个片段，干扰肝脏内的多个基因。

MIT Koch 研究院的 Daniel Anderson 表示，该小组的 siRNA/ lipidoid 载体是第一个能一次干扰 5 个基因的方法，过去的导入方法只能干扰一个或两个基因。“效力大大改善，让我们能显著降低剂量水平，并为同时抑制多个基因的配方打开了大门。”

Anderson 等研究人员开发出快速制造、组装并筛选多种 lipidoid 的方法。在过去的研究中，他们创建出 1000 多种 lipidoid。在这项最新的研究中，他们挑选出最有效的，并利用一种新的化学反应创建出 126 种相似分子的库。该小组聚焦在一个看似最有希望的分子上，此分子名为 C12-200。

利用 C12-200，研究人员实现了有效的基因沉默，非人类灵长动物的剂量为 0.01 mg/kg。如果换算成人，可能只需要不到 1 ml 的注射量来抑制基因，也就是五分之一茶匙，而过去的配方可能需要几百毫升。

在小鼠的研究中，研究人员能够一次成功导入 5 个 RNA 小片段，Anderson 相信 lipidoid 有潜力导入最多 20 个。这对于治疗疾病比如癌症而言，是一个巨大的优势，因为癌症中有多个基因的功能失调。

Anderson 及同事表示，考虑到纳米颗粒（如实验中的 lipidoid）常常到达肝脏和脾脏，小鼠肝脏是实验的天然出发点。肝脏疾病，比如肝癌和肝炎，将是 siRNA/lipidoid 治疗的最早靶点。

美国 Beckman 研究院的分子生物学家 John Rossi 认为用低剂量的 siRNA 实现基因沉默是“重大突破”，因为它降低了制造 siRNA 的费用；对长期接受注射的病人来说安全性改善；并带来了肝病的新疗法，也许能避免肝移植。

研究小组还在进行其它的预临床研究，以确定 RNAi 复合物的最佳剂量。他们的论文，题为“Lipid-like materials for low dose, in vivo gene silencing”，将会发表在最新一期的《PNAS》杂志上。（生物通 余亮）

聚焦 ABI 的流式细胞仪

本月初，ABI（现属于生命科技公司）推出了第一台利用声波来控制细胞移动的流式细胞仪。这也让 ABI 踏入流式细胞仪的市场，与 BD、Beckman Coulter、Millipore 等流式制造商直接竞争。

这台仪器名为 **Attune** 声波聚焦流式细胞仪，是史上第一台利用声波来精确控制细胞移动的流式仪器。据相关人员介绍，这将在多个细胞生物学应用中提高样品通量、灵敏度和准确性。此项技术是由美国 **Los Alamos** 国家实验室的科学家发明的，后来由一家名为 **Acoustic Cytometry Systems** 的公司将其商业化。去年 11 月，Invitrogen 低调地收购了这家公司。

传统的流式细胞仪大家都清楚，细胞挨个通过激光检测区，从而收集到细胞大小、表型、健康等方面的信息，应用在细胞生物学基础研究、诊断、药物开发等多个领域。那么，**Attune** 有何特别之处呢？据生命科技公司流式细胞仪的主管 **Mike Olszowy** 介绍，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，同时对更大量的细胞进行分析。

Olszowy 详细解释了此技术的原理。大部分传统的流式细胞仪使用流体动力聚焦，单细胞悬液被鞘液包绕，依次穿过激光检测区。如果你想增加分析的速率，你会增加引入的细胞量，但同时也失去了 **focus**。声波聚焦则不同，它在毛细管的侧面产生声波，聚焦颗粒。这样，你就能调节细胞穿过检测区的速度，更好地分辨单个细胞，将它们与背景分开。

声波聚焦的使用也增加了样品量，达到 **1mL/分钟**，而目前市场上最快的流式细胞仪也只有

160 μ L/分钟。这让用户能更有效地分析相对稀释的样品，因为样品中的颗粒能在检测点浓缩。**Olszowy** 预计新仪器能在一分钟内移动 **20 万个** 细胞，而传统的流式细胞仪需要 **15 分钟** 才能完成。另外，**Attune** 仪器的体积也小于传统的流式细胞仪。

[点击索取更多技术资料！](#)

至于大家关心的仪器价格，据国外媒体透露，不会超过 **10 万美元**。**ABI** 可能会在明年 **4 月份** 开始出售这台新仪器，目前它正将测试版放在一些实验室中试用。

生命科技公司认为 **Attune** 很适合低信号的应用，如细胞内信号研究和稀有事件分析。另外，细胞周期分析也很理想，因为仪器能够分离不同的细胞群体。除了流式细胞计数应用，该公司还打算将声波聚焦技术应用于磁珠分离和样品制备，这与它旗下的 **Dynal** 磁珠业务契合。

在目前的流式细胞仪市场上，**BD** 和 **Beckman Coulter** 无疑占领着统治地位。此外，还有一些新兴的公司，比如 **Guava**（已被 **Millipore** 收购），**Accuri Cytometers** 和 **Amnis**。生命科技公司细胞分析业务的总经理 **Murali Prahalad** 表示，他们在软件方面做了大量的重要创新，让 **Attune** 更易用。“我们的目标客户不仅仅是传统的流式细胞仪用户，还有那些觉得它们太贵或太复杂的人们。”（生物通 余亮）

大片段 DNA 的回收不再是难题

与几十 kb 甚至上百 kb 的大片段打交道就是麻烦，一不留神它就断了。最早采用的经典方法电洗脱和低熔点琼脂糖能很好地回收大片段，但是操作起来相当繁琐，非理想之选。而当今常规的硅胶膜离心过柱法也不适合大片段 DNA 的回收。因为 DNA 分子越长，与硅胶纯化膜的结合力越强，洗脱困难，导致在离心过柱时就很容易断裂，因此仔细看说明书，你会发现采用硅胶膜离心过柱技术的 DNA 片段回收试剂盒一般只适用于 10kb 以下的片段(就算有说能做 20kb 的，往往也会发现结果不好，且回收率低)。对于超大片段的 DNA 回收，负责的厂家会建议采用 Glassmilk 玻璃奶，或者类似的硅胶微珠悬液。

玻璃奶法相对离心过柱法更为灵活，可以根据每次回收实验时预期回收量来调整纯化填料的量，使得实验不受限于柱子的载量，也不会造成浪费。胶回收的步骤都一样，凝胶溶解后，加入纯化填料吸附混合，快速离心沉淀去上清，洗涤之后干燥沉淀，最后用洗脱液将吸附的片段释放出来，离心，取上清，就是回收的产物。这种方法通用型强，适合各种不同大小的片段，特别是大片段的回收，而且可以适当自行调节洗脱体积而决定洗脱产物浓度，价格实惠，确实是生物通小编本人推荐的好东西，可就是操作就复杂一些：一个是沉淀干燥，干燥过度会导致洗脱困难回收率低下，可干燥不足又会残留乙醇而妨碍后继实验，连带检测 OD 值都受影响。这何谓合适，还真没准头——计算时间好像也不怎么完全可靠，室温湿度不同时间也就有差异，因此全凭一双肉眼经验判断。你说那么不靠谱的事儿，一个实验新手，得反复折腾多少回浪费多少材料和精力才能掌握那经验啊。。。因此这产物的纯度也自然不会太高。另一个问题是取上清，洗脱液重悬后离心沉淀，取上清虽微不足道也是个技术活儿，Glassmilk 也好，硅胶微珠也好都轻细如尘，吸取稍多点稍微快点就不小心把它们吸进去了，又得重来，不然混入后继实验委实够你受的，取少了浪费多回收率低又难免心有不甘。这时你就会觉得离心柱是一种多么可爱省心的发明呀！

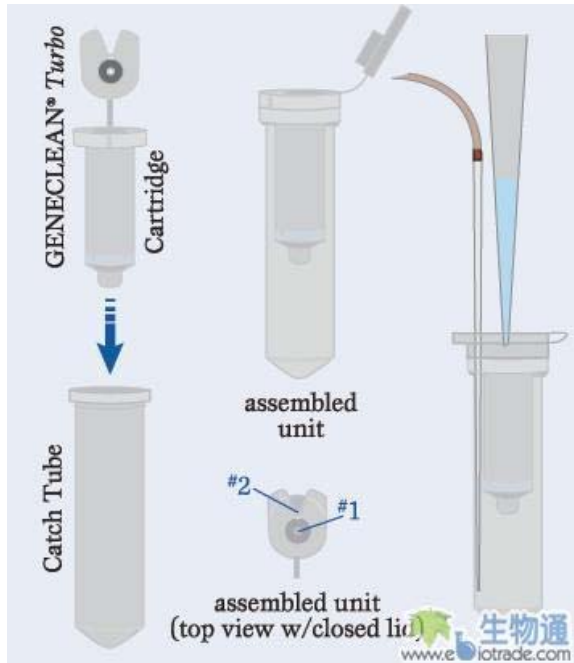
针对这个问题，美国 MP Bio 公司新推出了改进版的玻璃奶试剂盒—GENECLEAN® Turbo Kit，能从琼脂糖凝胶、PCR 反应和其它酶切反应中简单快速地回收 300 kb 以下的 DNA 片段。

也许你还不知道，GENECLEAN® 系列早在 1986 年就已问世，是最早利用玻璃奶特异结合 DNA 的商业化产品。GENECLEAN® Turbo Kit 则是 GENECLEAN® 产品家族的最新成员。它同样是基于玻璃奶结合 DNA 的高效性，但 Turbo 结合基质包被在一种特殊的复合膜中。

Glassmilk 或者硅胶微珠都具有松散的立体结构可以全方位包被 DNA 分子而避免大片段牵扯断裂，但是松散的结构使得在离心沉降过程中粒子沉降速度差异和相对位置不固定，对于会吸附到多个微粒的更大片段来说也会导致断裂，通常适合 10-50kb 的片段，而固定在复合膜中的 Glassmilk 可以减少这个问题，GENECLEAN® Turbo Kit 回收片段最大可达 300kb。

这种内含玻璃奶的膜，也就是 GENECLEAN® Turbo 的滤膜，位于 GENECLEAN® Turbo 吸附柱的底部。上样后，液体穿过滤膜，流到收集管或真空歧管中。吸附柱盖子的设计特别巧妙，请看下图。吸附柱与收集管组装之后，盖上盖子，从上面看下去，有两个孔。#1 孔是加样孔，液体经由这个孔

加到滤膜上。**#2** 孔是废液孔，使用接有真空装置的针头就能将废液轻松吸走。这样，手工操作就更简单了，在洗涤和洗脱的过程中，连开盖、关盖这样的活都省了。别小看开关盖，样品多的话，大拇指可特别遭罪。



整个操作过程也很简单：溶胶（PCR 产物无需溶胶，直接加入 5 倍体积的盐溶液）后，上样到吸附柱中，离心 5 秒；再加入洗涤液，离心 5 秒；之后是空转离心 4 分钟，干燥吸附柱；最后加上洗

脱液，室温孵育 5 分钟，离心 1 分钟，搞定。洗涤这一步能去除琼脂糖、限制性内切酶、反转录酶、Taq 酶、T4 连接酶、引物、接头、EB、盐以及残留的有机溶剂。

于是，大片段 DNA 的回收也能像小片段一样，在十几分钟的时间内轻松完成。100 bp 到 300 kb 的 DNA 片段都不在话下。当然，如果片段很大，还是要特别温柔的，毕竟它们很脆弱。回收后的 DNA 纯度很高，可用于测序、克隆、PCR、转化、转染、显微注射、芯片分析等应用。

对于芯片分析、测序和 PCR 等应用而言，高通量的样品处理形式可能更为理想。GENE CLEAN® Turbo 96 就是高通量的版本。它在 96 孔板中使用了膜包被的 GENE CLEAN® Turbo 基质，纯化后的物质洗脱在可密封的 96 孔收集板中。整个纯化过程在 45 分钟以内完成。

有了 GENE CLEAN® Turbo Kit，大片段 DNA 的回收不再是实验的瓶颈了。你也不用对着 100 多 kb 的片段，一筹莫展啦。如果你现在正面临这样的难题，那就赶快联系 MP Bio 公司 [索取该试剂盒的技术资料](#) 吧。

牛校牛人牛团队，造就超牛新定量

牛校： 加州理工学院（California Institute of Technology 简称 Caltech）创建于 1891 年，校园面积只有斯坦福大学的五十分之一，在校本科生 900 人，研究生 1200，教师不到 1000 人，其中教授 280 人，只有六个系，累计毕业学生 20000 多名，毕业校友和任职教师中至今有 30 人拿了 31 次诺贝尔奖，拿了两次的那位就是爱因斯坦，大名鼎鼎的科学顽童费曼在该校任教 37 年，著名的校友有 Intel 的创始人戈尔·摩尔（提出著名的摩尔定律的那位），华人著名校友包括理论物理学家周培源，核物理学家赵忠尧，遗传学家谈家桢，还有刚刚过世的空气动力学家钱学森，钱伟长也在该校做过博士后。

牛人： 牛校里的两位顶级科学家携手参与创建了 Helixis 公司。

David Baltimore 教授：世界著名生物学家，36 岁当选美国科学院院士，他证实了 RNA 逆转录酶的存在，为 RNA 逆转录 DNA 提供了有力证据，因此在 37 岁时，获得 1975 年诺贝尔生理学 and 医学奖。他在重组 DNA，癌症及艾滋病的致病机理、基因转录调控，免疫相关信号传导等研究领域都做出了杰出的贡献。1997 年-2006 年担任加州理工学院院长。

Axel Scherer 教授：世界著名光子与微细加工专家，1993 年开办加州理工学院纳米加工研究所，创立了光学晶体学，致力于半导体微加工技术研究，并应用于光子学和生物学设备，在世界光电子领域处于领先地位。2001 年合作创办了 Luxtera 公司，在新一代光子通讯技术方面，具有大量创新性专利，超越了 IBM, Intel 等公司，是 SUN Microsystem（太阳微系统公司），Philips 的技术合作伙伴。

牛团队： Helixis 公司由 Alex Dickinson 及上述两位科学家在 07 年创建，组建了一支全明星管理团队。

Alex Dickinson（现任总裁，CEO，创始人之一）：曾在 AT&T 贝尔实验室任职，拥有 50 多项国内及国际专利，在 01 年与 Axel Scherer 一起创建了 Luxtera 公司，六年时间把该公司打造成硅光子通讯技术的领导者。该公司通过微加工技术，将光学器件与电子器件整合到芯片上，从而把目前主要安装于交换机/路由器，服务器端的光收发器，变得可以直接装入电脑主板，把 10Gbp/S 传递速率的硬件成本从 1600 美金降低到 10 美金，单位功耗从 10W 降低到了 20nW，为下一代高速网络通讯做好了硬件准备，从而也大大提升了该公司的商业价值。07 年 Dickson 开始二次创业，希望把 Helixis 变成第二个 Luxtera。

Judy Macemon（副总裁，负责市场方面）：曾在 Invitrogen, Stratagene, Agilent, 及 BD 做过国际市场开发，在 Baxter 医疗还担任过技术服务主管。

Adrian Fawcett（工程高级主管）：具有二十年科学仪器开发经验，在 ABI 新加坡研发部门担任主管十年。

Sameer Deepak Rohatgi（商业发展高级主管）：在 Agilent 生命科学部及化学分析部负责全球市场战略策划。

09年2月26号, Illumina 的首席执行官 Jay Flatley 加入公司董事会。

09年8月18号, Illumina 前副总裁及首席科学官(CSO) David Barker 及 NanoDrop 的创始人之一 Lynne Kielhorm 加入公司顾问团队。

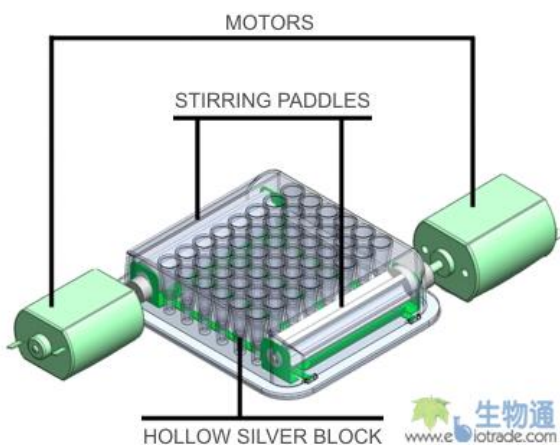
牛机器:



PIXO 定量 PCR 仪作为 Helixis 公司推出的第一款机器, 市场定位, 温控系统, 光学系统及软件界面, 以及服务模式, 都做了颠覆式的创新, 全然不同于市场的同类产品。

市场定位: 目前的定量 PCR 仪, 基本价位仍然在三万美金以上, 70%的定量 PCR 仪的使用人数在十人以上, 80%的实验的样品数在 50 个/每次以下, 每次实验时间都接近两个小时, 这些都制约了客户更多的使用仪器, 因此 PIXO 的定位, 就是个人化的定量 PCR, 进一步加快定量 PCR 普及化进程, 简单易用, 精确快速, 可以满足定量, 等位基因突变的熔融曲线分析, 实时 HRM (高分辨熔融曲线分析) 等多种应用。

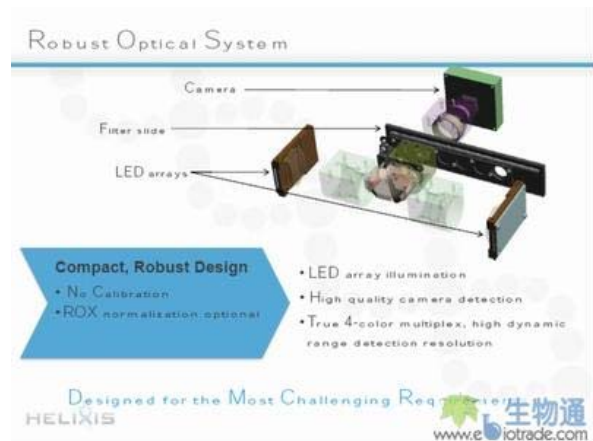
温控系统:



大部分的定量 PCR 仪, 由于采用孔板式模块, 由于本身热容量和加热区域均较大, 所以需要采用多块 Peliter 加热, Peliter 之间本身就有温度差异, 孔间的温度均一性一般在 0.5°C 左右, 边缘效应也难以消除, 变温后的平衡时间, 大约需要 15 秒。

PIXO 温控系统, 包含了一个精密电铸的空心银槽, 其中密封了流动的传热介质, 通过单个 Peliter (以保证温度的精确性) 加热或制冷, 电磁马达驱动的两个相对的叶轮, 进行快速的混匀, 导热介质在槽间流动, 保证传热速率和均一性, 而且没有边缘效应, 孔间温差小于 0.1°C, 测试多台机器在 65°C 时的均一性在 0.06°C, 95°C 时为 0.1°C, 特定的温控系统, 保证了实验的 CV 值小于 0.25%。

光学系统:



激发端: 采用两个不同波长的固定式 48 LED 阵列 (452-486nm, 542-582nm) 分列于孔板两端, 宽广光谱激发, 激发光经过反射镜, 每孔均同时激发, 最大程度减少孔间干扰;

检测端: 四个不同的滤光片 (505-545nm, 562-596nm, 604-644nm, 665-605nm) 通过一个线性滑动滤光片架进行转换, 高性能 CCD 进行并行检测, 发光波长无干扰, 无需补偿和校正, 每循环 48 孔, 均可以四通道实时检测。

通道	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)	检测荧光染料示例
1	452 - 486	505 - 545	DNA Binding Dyes, FAM™
2	452 - 486	562 - 596	HEX™, JOE™, VIC™
3	542 - 582	604 - 644	ROX™, Texas Red®
4	542 - 582	665 - 705	Cy5®, Quasar 670™

软件界面:



集成式软件，包含机器控制，数据采集，分析图表等功能，简洁明了，友好易用。

软件打开，即出现定量，等位基因分析，HRM（高分辨熔融曲线分析）等功能界面，软件功能如下：

- 1.用标准曲线做绝对定量；
- 2.△△Cq法进行相对定量，可以对多个参照基因定标；
- 3.利用终点熔融曲线法进行等位基因突变点分析；
- 4.基因筛查及 HRM 分析。



实验设置简单形象，设置样品性质（标准品，阴性对照，未知样品）等。



反应条件设置为图形界面，温度，时间一目了然，反应进程均在界面上显示。

原始数据，扩增曲线，熔融曲线分析，分析结果，PCR 扩增效率，R2，Cq 值均在报告中显示，可以导出 Excel 或 PDF 格式。

技术支持：

作为一款个人化的定量 PCR 仪，其技术服务形式也采取了灵活便利的方式，强调利用各种在线及社区网络的形式，如 Facebook, Twister, 进行应用技术的实时更新，提高客户的参与感，加强技术资源的有效分享。

固定化的胰蛋白酶

固定化的胰蛋白酶提供了一种快速方便的方法，用于消化多种浓度的已纯化的蛋白质或复杂蛋白质混合物。

该产品将胰蛋白酶固定于纤维素颗粒上。将适量的颗粒装入离心柱中，经过 3 次简单的冲洗/平衡步骤后，在柱子中加入含有 20-500 ug 蛋白质的样品。该产品有助于研究者消化多种蛋白质样品，而无需额外的浓缩或优化步骤。

30 分钟消化后，只需轻轻离心，即可将离心柱中的肽段从固定化的胰蛋白酶中分离，并流入收集管中。从肽段中很容易除去固定化的胰蛋白酶，是因为胰蛋白酶不能通过离心柱滤头。[点击索取说明书!](#)

特点:

快速:消化过程只需 30 分钟即可完成。

规格可调:操作方法易于调整，以适应多种蛋白浓度。

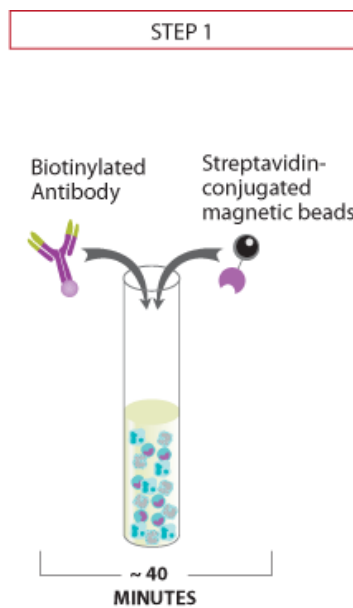
方便:反应组装时，仅需简短的离心步骤。

本文摘自 [《Promega eNews》2009 年 12 月刊](#)。

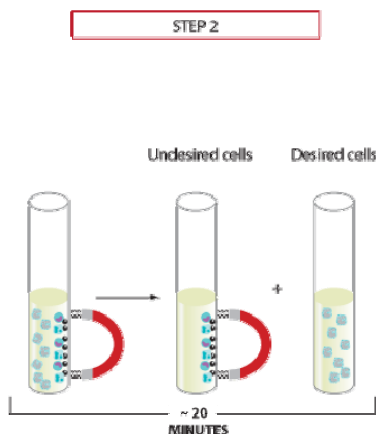
R&D 推出分选 NK 细胞的试剂盒

R&D Systems 最近推出了两个适合自然杀伤 (NK) 细胞的细胞选择试剂盒 — MagCelect Mouse 及 Human NK 细胞分离试剂盒。这两个试剂盒是为分离 NK 细胞而设计, 通过负选的过程从单核细胞悬液中去除非目的细胞。

当你想要保留目标细胞的特定抗原处于未结合的“untouched”状态时 (未激活状态), MagCelect 是一个理想的选择。由于 MagCelect 试剂盒采用阴性选择, 也就是负选, 靶细胞不会与选择试剂结合。分析过程中标记其他非目的细胞, 令其滞留磁场, 然后洗脱得到未标记的纯化靶细胞 (如下图)。



步骤 1: 不想要的细胞与生物素化的抗体结合, 进而被链亲和素结合的铁磁流体磁性颗粒捕获。



步骤 2: 利用 MagCelect 磁铁从样品中负选出不想要的细胞。转移包含目的细胞的样品溶液。这时, 两个细胞组分都是活的, 可用于下游分析。

R&D Systems 的 MagCelect 技术是基于超顺磁的铁磁流体。磁性颗粒的超顺磁性保护纯化的细胞群免收磁力的干扰, 不会影响细胞活性和下游应用。由于铁磁流体的体积小 (直径约为 150 nm), 它们在结合反应中有着高效的扩散动力学。

新的 NK 细胞选择试剂盒中包含生物素化抗体组合, 链亲和素铁磁流体以及缓冲液, 足够处理 1×10^9 个细胞。对于小鼠试剂盒而言, 回收的 NK 细胞一般在 70-80%, 而人的试剂盒则能达到 80-90%。在选出 NK 细胞之后, 它们可用于多个应用, 包括组织培养、免疫状态监控和流式细胞仪。

在操作过程中须注意, 为避免细胞表面的抗体 capping 和非特异的细胞标记, 要保持细胞和溶液冷却, 使用预冷的溶液, 并严格遵守操作步骤中提及的孵育时间和温度。温度升高或孵育时间延长都可能导致非特异的细胞标记, 从而降低细胞纯度和产量。

除了 NK 细胞, MagCelect 试剂盒还能分选多种细胞, 包括人、小鼠和大鼠的 B 细胞、CD3+ 和 CD4+ T 细胞等多种细胞。如需详细的资料, [请点击此处索取](#)。(生物通 余亮)

BioTek 推出 Synergy H4 全功能酶标仪

近日，BioTek 仪器公司的酶标仪家族又增添了一位新成员，那就是 Synergy H4 全功能酶标仪。Synergy H4 同时整合了基于滤光片和基于光栅的光学系统，集前者的高性能和后者的灵活性于一身，为现有检测和未来可能开发的分析实验都提供了完美的解决方案。此外，Synergy H4 全功能酶标仪还能兼容 Take3 多体积板，让小体积测量低至 2 μL 。



基于滤光片的荧光检测光路系统提供了更好的光过滤和纯化，具有快速的波长转换和读取速度，提供了更好的信噪比。这种杰出的性能非常适合高要求的应用，如 TR-FRET 检测、荧光偏振检测或 AlphaScreen®/AlphaLISA®。

基于光栅的荧光检测光路系统则具有波长选择的灵活性，从紫外到近红外，适合多种应用；可变的带通选择系统很适合光谱扫描应用。顶部和底部的光学系统进一步增加了分析灵活性。

Hybrid 技术集合了灵敏、快速的滤光片检测光路和灵活、便利的单色器检测光路，优势如下：

您的选择	基于滤光片	基于光栅	Hybrid技术
光谱扫描		√	√
灵活的波长选择		√	√
Take3™ 2 μL 微量样品检测		√	√
最好的检测灵敏度	√		√
最快的检测速度	√		√
发光过滤	√		√
AlphaScreen®/AlphaLISA®	√		√

Synergy H4 具有独特的模块化设计，客户可以选择所有的检测模块，也可以根据经费预算选择最需要的模块，并在经费充足时对这些模块进行升级。完整的配置可应用在荧光强度/FRET、时间分辨荧光（TRF）和 TR-FRET、荧光偏振、AlphaScreen/AlphaLISA、萤光及紫外-可见光吸收。

BioTek 公司的产品经理 Xavier Amouretti 表示：“许多实验室都有着不同的分析需求，从简单的生化分析到复杂的细胞分析。Synergy H4 的 Hybrid 技术让您在现在和未来的分析中立于不败之地。它相当于一台仪器的价格，两台仪器的性能。”

[点击此处索取 Synergy H4 全功能酶标仪的技术资料或申请演示。](#)

总部设在美国佛蒙特州的 BioTek 仪器公司，是一家全球领先的设计、制造和销售微孔板仪器及软件的公司。BioTek 的仪器设备能协助改进生命科学的研究，加速药物研发的进程，并在临床中经济地定量疾病相关分子。（生物通 余亮）

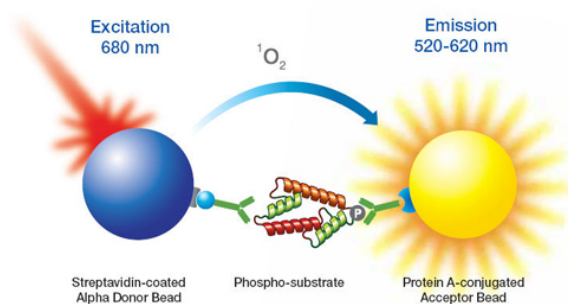
PerkinElmer 新推细胞信号通路和生物标志物分析 No Wash Alpha 系列

PerkinElmer 公司近日在美国细胞生物学会年会上宣布扩展其“**No Wash**”Alpha 技术产品线,新引入 46 种高度灵敏的细胞信号通路和生物标志物分析试剂盒。这些新的试剂盒为加速癌症、炎症和神经退行性疾病的研究提供了广泛的工具。

这 46 种新产品包括 22 种 AlphaScreen® SureFire® 分析和 24 种 AlphaLISA® “**No Wash**”免疫分析试剂盒,让 Alpha 试剂盒的数量上升至 142,其中 AlphaScreen® SureFire® 66 种,AlphaLISA® 76 种。

PerkinElmer 的 AlphaScreen® SureFire® 分析是唯一可以在细胞裂解液中检测内源性的与疾病相关的信号通路蛋白的平台。它能够协助完成高敏感度的各种信号通路、受体及目标激酶的检测。同时可以在细胞模型内检测全长的细胞内源蛋白的磷酸化水平。AlphaScreen® SureFire®可以实现细胞培养及分析物检测的“一体化”模式。此试剂盒简化了复杂的分离及洗涤步骤,增加了自动化高通量筛选的能力,并协助研究人员从耗时的 Western Blot 或 ELISA 方法中转换过来。

AlphaScreen SureFire® Technology



AlphaScreen® SureFire® 检测试剂盒须与 AlphaScreen® SureFire® Protein A 试剂盒结合使用。它是筛查 GPCR 和生长因子受体,以及 MAPK 和其它信号通路的胞内激酶抑制剂的理想试剂。

此外,AlphaLISA® “**No Wash**”免疫分析试剂盒能够研究多种疾病状态的生物标志物。最新的试剂盒包括人和小鼠的生物标志物靶点,大大拓宽了取代 ELISA 的 Alpha 技术的适用性。

PerkinElmer 的 Alpha 技术是专利的磁珠平台,能够高度灵敏地检测生物分子和生物分子之间的相互作用,同时去除了洗涤步骤,排除了不利于自动化的劳动密集操作。它让研究人员克服了 ELISA 和 Western Blot 的传统限制,节约了时间、样品和抗体。Alpha 技术很容易小型化和自动化,也能够实现高通量筛选。(生物通 余亮)

AlphaScreen® SureFire® 分析特色:

均相: 无洗涤步骤、小型化、高通量

非放射性: 无需处理特殊试剂,更加快速的读取数据

灵活性: 可用于任何细胞系,包括原代细胞

灵敏度: 可用于检测过表达细胞系中的目的基因,或细胞生理内源表达水平的目标受体

自动化: 轻松实现经 HTS 验证的 AlphaScreen 技术的自动化

出色的 HTS 兼容性: 适应 96、384 和 1536 微孔板

多种检测选择: 能够检测各种目标信号通路、受体和激酶

如何高效地转染胚胎干细胞？

Bio-Rad 公司近日在其网站上发布了一篇技术指南，是由美国得克萨斯大学健康科学中心的 Eva Zsigmond 撰写的，讲述的是如何利用 Gene Pulser Mxcell 电穿孔系统高效转染小鼠和人的胚胎干细胞。

此技术指南（编号为 5904）研究了电穿孔参数的优化，以更高效地将 DNA 导入小鼠胚胎干细胞和人胚胎干细胞，这些细胞是在克隆形成和无滋养层的条件下生长的。

电穿孔是将基因导入小鼠胚胎干细胞的理想方法。使用已经确立的电穿孔参数，小鼠 ES 细胞能够高效率地稳定转染，在多能性和核型稳定性方面没有不良影响。然而，与小鼠胚胎干细胞相比，人胚胎干细胞在电穿孔后存活率和转染效率都要低一些。

目前关于电穿孔人胚胎干细胞的文献不多，且大部分方法都是针对特定的细胞系或基因座，很难推广到所有干细胞。于是，Zsigmond 的研究小组想要优化电穿孔参数，将 DNA 导入无滋养层条件下的 ES 细胞。

与其它系统相比，Bio-Rad 的 Gene Pulser Mxcell 电穿孔系统的主要优势在于除了目前的程序，每个关键参数都是可编程的，从电压到脉冲次数，让研究人员能够找到特定细胞的最理想条件，包括难转染的原代细胞和干细胞。此外，该系统是 96 孔板形式，能筛选不同的电穿孔条件。

Gene Pulser Mxcell 电穿孔系统采用开放的架构，允许 Zsigmond 的研究小组确定小鼠及人胚胎干细胞转染的最优步骤，同时优化细胞存活率。研究人员保持 DNA 浓度恒定，细胞密度相近，采用不同的电压（250 V 和 300 V）以及不同的电容参数（100 μ F、200 μ F、300 μ F 和 950 μ F）来检测转染效率和存活率。

研究表明，电容在 200 μ F 时，细胞存活率和 GFP 表达都为最有利的水平，而低电压（250 V）时的存活率略高于高电压。研究人员鉴定出人 ES 细胞的最佳电穿孔条件为电压 250 V，电容 200 μ F，电阻 1000 Ω 及指数波形。不过这些结果还需要进一步的验证。

研究人员认为电穿孔是将 DNA 导入细胞的简单且有效的方法，且实验中针对无滋养层的 ES 细胞的电穿孔条件可能对未来的临床应用很重要。

此篇技术指南可在 Bio-Rad 的网站上下载，或 [点击此处索取](#)。
www.bio-rad.com/transfectionprotocols 上还有全世界科学家提交的电穿孔操作步骤，欢迎查看。

（生物通 余亮）

元月号冷泉港实验手册讲述 FISH 和 ELISPOT

宏基因组学 (metagenomics) 正在快速发展。克隆和测序技术的改进让研究人员更好地了解环境样品中的微生物，并对物种相互作用和群落动态有了新的认识。这些样品中微生物的鉴定对于研究结果的阐释极其重要。在元月号的冷泉港实验手册 (Cold Spring Harbor Protocols) 中，德国亥姆霍茨环境研究中心的 Annelie Wendeberg 发表了一篇 protocol，讲述的是用荧光原位杂交 (FISH) 来鉴定环境微生物。

在此方法中，研究人员通过 FISH 和靶定 rRNA 的寡核苷酸探针，以及催化报告基因沉淀 (CARD) 的信号扩增，对环境样品 (比如水和沉积物) 进行了系统发育鉴定。FISH 探针上结合了辣根过氧化物酶。杂交之后，荧光标记酪胺盐的沉淀在靶细胞中产生了更高的信号强度。此步骤中描述了酪胺盐与不同荧光基团的定制标记，以及样品制备和各种微生物细胞壁的细胞通透策略。多色 CARD-FISH 能同时检测不同的系统发育组。文章如下：

[Fluorescence In Situ Hybridization for the Identification of Environmental Microbes](#)

酶联免疫斑点分析 (ELISPOT) 被很多人认为是检测胞内免疫应答的金标准。这种方法高度灵敏、能定量，使用简单，容易发展成高通量筛选。直到最近，ELISPOT 分析也仅限于一个效应分子的鉴定。由于病原体特异的 T 细胞上 IFN- γ 和 IL-2

的维持与 HIV 感染后更有利的临床结果相关联，ELISPOT 分析能够鉴定两种效应分子，对监测某些传染源的免疫应答很有帮助。

加拿大麦吉尔大学健康中心的 Nicole Bernard 及其同事发表了一篇关于双色 ELISPOT 分析的 protocol，描述了在病毒肽段的刺激下，用 ELISPOT 分析同时检测 IL-2 和 IFN- γ 。文章如下：

[Dual-Color ELISPOT Assay for the Simultaneous Detection of IL-2 and/or IFN- \$\gamma\$ Secreting T Cells](#)

以上这两篇 protocol 都是免费的，可点击文章标题查看原文。其它 protocol 涉及抗体、细胞生物学、遗传学、高通量分析、分子生物学等多个方面，不过要订阅后才能查看。

(生物通 余亮)

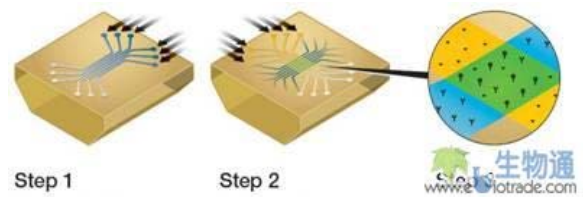
用阵列式 SPR 传感器 ProteOn XPR36 系统进行抗体开发和研究

进行抗体开发和研究，不管是完整的单克隆抗体分子还是 Fab、scFv，我们需要了解抗体分子的表达量、亲和力、反应动力学（特别是解离速率 k_{off} ）以及抗体的其它特性如亚型、特异性等等。使用传统的 ELISA 方法筛选抗体，通常只能先看哪些克隆有表达，然后把表达水平较高的克隆挑出来进一步研究。这种方法筛选抗体，速度虽然快，但充其量只能知道大致的表达水平，其余所有的信息都必须进一步研究，对后续的工作带来很大压力，而且常常会丢掉虽然表达水平不高，但抗体亲和力、特异性等非常好的克隆。

后来，人们尝试用一些新的手段来筛选抗体或抗体片段，其中较常用的是 SPR 技术。SPR 生物传感器技术问世以来，它的通量一直成为问题，测定抗原-抗体反应动力学数据通常需要数小时时间，远远达不到抗体筛选的要求，而通量较高的产品的价格又贵得几乎能令世界上最奢侈的实验室望而却步，所以大多数拥有 SPR 传感器的实验室只是拿它来做后期的抗体特性分析。前期的筛选阶段还是采用 ELISA 方法。

现在 Bio-Rad 公司推出的一种新型阵列式 SPR 生物传感器技术有望彻底打破现有方法的各种瓶颈，做到较高通量的基础上同时获得浓度、亲和力以及反应动力学等相关数据。这种新型阵列式 SPR 生物传感器叫 ProteOn XPR36 系统。如下图所示，它具有可 90° 旋转的 6 通道流动池，可在芯片上产生纵向或者横向的通道各 6 条。首先，流动池旋转成纵向，在纵向的 6 个通道里可以标记最多 6 种不同的 ligand 在芯片上，随后流动池旋转 90° 变成横向，流过 6 个 analyte，当 analyte 溶液接触原先标记的 ligand 时发生的相互作用即可被检测并记录下来。通过这样的分析方式可以实现高通量平行分析。

使用 ProteOn XPR36 系统进行抗体筛选和优化，Bio-Rad 公司给出了一个完全不同于传统方法的新工作流程，如下图所示。

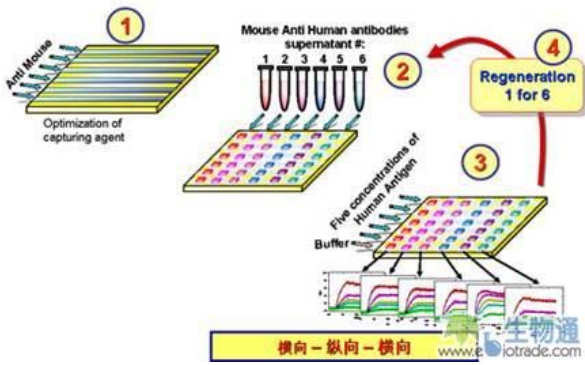


第一步，横向 6 个通道上标记捕获试剂，即可以和单抗结合的分子，如 Anti-mouse IgG、Protein A/G 等，如果筛选抗体 Fab 段，可以标记 Anti-(Fab')₂。标记完成后，通道旋转 90° 变成纵向，进入第二步。

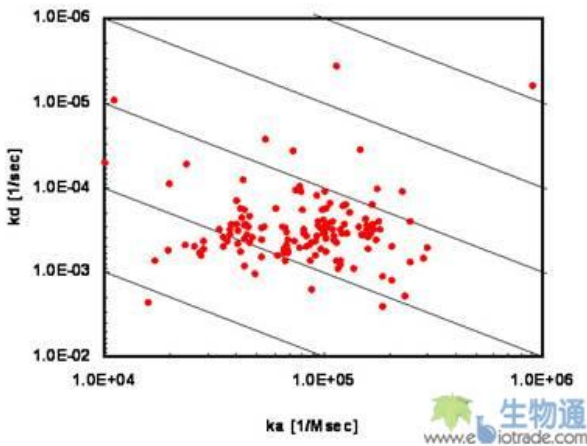
第二步是从细胞培养液中捕获单抗，一次最多流过 6 个克隆。如果表达有单抗，仪器会显示出一条向上的曲线，并且浓度越高，曲线上升得越快。如果定义了标准曲线，可以把浓度数值算出来。这一步完成后，抗体或抗体片段就结合在了捕获试剂上。

第三步，通道再转回横向，流过 5 个不同浓度的抗原分子加一个缓冲液作为阴性对照。这一步可以得出下图右下方所示的 6 幅动力学反应曲线，分别代表 6 个克隆的单抗和抗原反应的结果，我们可以据此计算出 6 个抗体和抗原的动力学数据和亲和力常数。

第四步，用磷酸或 pH2.0 的甘氨酸溶液再生，把抗原连同抗体一块儿从捕获试剂上洗下来，为检测下一批单抗做准备。



按照这一流程，每个循环可以测定 6 个克隆的表达水平和动力学数据。当所有克隆都检测完毕后，我们可以绘制一张包含所有克隆的动力学分布图，如下图所示。



上图纵坐标代表解离速率常数 (k_{off})，横坐标代表结合速率常数 (k_{on})，斜线是等亲和力线，也就是说分布在同一条等亲和力线上的克隆亲和力是一样的。我们可以根据需要挑选特定区域内的克隆，然后进行抗体特性分析。

这一流程的好处是初步筛选得到大量的抗体信息，基本不需要再挑克隆进行第二步筛选就可以直接把我们需要克隆挑出来纯化或者进行进一步分析，确定其亚型、抗原识别表位等。

[点击索取SPR生物传感器的更多技术资料！](#)

有人也许会问一些问题，现在就这些问题回答如下：

1. 这样做一天能筛选多少克隆？

答：200 个左右。这个数字听起来似乎令人沮丧，但别忘了，这是包含大量信息的筛选，一步能顶传统方法多步的工作，其实更省时间。

2. 需要耗费的捕获试剂和抗原量很多吗？

答：一点也不多，捕获试剂大约消耗数微克，抗原消耗则需要根据筛选的克隆数来定，如果筛 1000 个克隆，抗原消耗通常不超过 1 毫克。

3. 整个流程的成本高吗？

答：一点也不高，只需一块芯片就能完成上千克隆的筛选，和其它消耗加在一起的总成本只比 ELISA 高一点。如果考虑传统方法筛选完成后可能还需测定动力学数据，其实这样做的成本会更低。

赛默飞世尔科技质谱技术帮助识别儿童急性阑尾炎的生物标志物

圣何塞, 加州 (2009 年 12 月 14 日) – 服务科学, 世界领先的赛默飞世尔科技今天宣布, 波士顿儿童医院的研究人员识别出一种称作 LRG 的生物标志物, 他们认为这将帮助医生更为准确而有效的诊断出儿童急性阑尾炎。该团队利用 Thermo Scientific LTQ Orbitrap 质谱仪进行研究, 并发现了多种潜在的生物标志物, 其中包括富亮氨酸 $\alpha 2$ 糖蛋白 (LRG)。



生物标志物就是生物指标, 通常在血液, 尿液或组织样本中检测到, 它们可以揭示某个疾病的风险指标, 某个疾病的存在或者说明疾病如何在人体内发展。另外, 生物标志物除了用于临床前研究或临床诊断, 还在某些疾病的早期治疗中起到重要的作用。

这项研究的灵感来自于现实, 阑尾炎的诊断往往需要在急诊室耗费长时间以及昂贵的诊断成像过程。更糟糕的是, 不正确的诊断会导致不必要的手术——每十至二十个阑尾炎中, 就有一个健康阑尾被切除。儿童医院的研究组, 由波士顿儿童医院蛋白质组研究中心主任 Hanno Steen 博士、Alex Kentsis 医学博士和急诊医学部的 Richard Bachur 医学博士领导, 使用 LTQ Orbitrap™ 质谱仪研究在 18 个月内 67 名儿童尿液样本中的蛋白质和多肽。Steen 博士的研究结果表明, LRG 生物标志物是一种稳定而准确的阑尾炎指标, 而且 LRG 浓度水平可直接与受感染的严重程度相关。

“考虑到阑尾炎诊断所耗费的时间和由于计算机断层扫描 (CT) 经受的辐射, 以及不必要的手术数量, 我们对识别出这些有助于诊断的生物标志物感到非常激动,” Hanno Steen 博士认为, “下一步就是寻找成年人阑尾炎的生物标志物, 并利用简单试纸成功开发一种快速尿液测试, 以加速测试过程并提高准确性和可靠性。”

“波士顿儿童医院研究组利用质谱仪发现了生物标志物, 从而证实了质谱仪在突破医学研究方面所具备的巨大潜力, 而这些生物标志物将最终影响到病人护理过程,” 赛默飞世尔科技销售代表 Robert Kane 说, “在过去的几年中, 该技术已经取得卓越进展, 变得更快、更准确, 帮助科学家更快的发现生物标志物。”

关于赛默飞世尔科技 (Thermo Fisher Scientific)

赛默飞世尔科技有限公司 (Thermo Fisher Scientific Inc.) (纽约证交所代码: TMO) 是全球科学服务领域的领导者, 致力于帮助客户使世界变得更健康、更清洁、更安全。公司年度营收达到 105 亿美元, 拥有员工 34,000 多人, 为 350,000 多家客户提供服务。这些客户包括: 医药和生物技术公司、医院和临床诊断实验室、大学、研究院和

政府机构以及环境与工业过程控制装备制造制造商等。该公司借助于 **Thermo Scientific** 和 **Fisher Scientific** 这两个主要品牌，帮助客户解决从常规测试到复杂的研发项目中所面临的各种分析方面的挑战。**Thermo Scientific** 能够为客户提供一整套包括高端分析仪器、实验室装备、软件、服务、耗材和试剂在内的实验室工作流程综合解决方案。**Fisher Scientific** 则提供了一系列用于卫生保健，

科学研究，以及安全和教育领域的实验室装备、化学药品以及其他用品和服务。赛默飞世尔科技将努力为客户提供最为便捷的采购方案，为科研的飞速发展不断地改进工艺技术，并提升客户价值，帮助股东提高收益，为员工创造良好的发展空间。欲获取更多信息，请登陆：www.thermofisher.com（英文），www.thermo.com.cn（中文）。