

## 一、研究前沿：

《自然》两篇文章揭示癌症研究最新进展

《Cell》重要文章：线粒体控量新因子被发现

小小斑马鱼，又一大发现

冷泉港实验室：划算的基因沉默方法

RNAi机制新发现：真菌利用RNAi对抗病毒

10 种灵长类动物基因组研究成果公布

《细胞》：敲除一个基因，小鼠寿命延长

两篇《Nature》文章：延伸三维复合体与抗生素的作用方式

实验鼠比想象中变异的更快！

《自然·方法学》：新方法探测朊病毒

老鼠基因组单体型图谱出炉



## 二、关注中国：

四川大学最新文章发表siRNA新方法

厦门大学生科院等miRNA研究成果发表于《Immunity》

饶子和、刘志杰小组最新《自然》子刊解析蛋白机构

## 三、热点话题：

黄禹锡造假干细胞来源查明 错失重大发现

## 四、技术前沿

实时荧光定量 PCR 实验中试剂的节约

用 GST MultiTrap FF 96 孔滤板筛选纯化 GST 标记蛋白的最佳缓冲液



# 《自然》两篇文章揭示 癌症研究最新进展

**生物通报:** 癌症是全世界一个主要死亡原因, 在 2005 年全世界 5800 万死亡总数中, 癌症占所有死亡的 760 万 (或 13%)。目前对于癌症机制的研究主要集中在致癌基因, 致癌信号途径引发癌症分子迁移和扩增的分子机制等方面, 在本期的《Nature》杂志上, 研究人员在这两方面获得新的突破。

原文检索: Nature 448, 439-444 (26 July 2007) | doi:10.1038/nature05933; Received 8 March 2007; Accepted 11 May 2007; Published online 4 July 2007 A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer Nature 448, 445-451 (26 July 2007) | doi:10.1038/nature05953; Received 9 August 2006; Accepted 18 May 2007; Published online 27 June 2007 Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc

癌症是全世界一个主要死亡原因, 在 2005 年全世界 5800 万死亡总数中, 癌症占所有死亡的 760 万 (或 13%)。目前对于癌症机制的研究主要集中在其引发癌症分子迁移和扩增的分子机制方面, 这主要是因为对于精确的分子机制的了解可以发展特异性靶向肿瘤因子的治疗策略。

随着全世界人口和寿命的增长, 癌症发病率和死亡率持续上升, 癌症继续流行——2000 年全世界癌症新病例达一千万, 死亡人数为六百万, 生存的癌症患者达二千二百万。

我国现患病人数为 300 多万, 在 27 亿个家庭中, 平均每 90 个家庭就有 1 个癌症病人。肿瘤死亡分别列为我国城市和农村死因的第一位和第二位。

目前胃、肝、肺、食管、结肠、乳腺、宫颈癌等为我国最多发的恶性肿瘤。消化系统的胃、肝、食管、结直肠癌占癌症发病总数的 57.8%。乳腺、胰腺、前列腺和卵巢癌近年呈流行之势, 在我国将有一定幅度的增长, 白血病和膀胱癌等增长速度也不容忽视。我国宫颈癌自 80 年以来呈直线下降趋势, 这可能与在

宫颈癌高发发现场成功地进行的 I 级、II 级预防和诊治水平提高有关。

在癌症的机制研究方面, 有关肿瘤形成和扩散增生的复杂信号传导途径的研究正在逐步促进新一代抗癌药物 (靶定特点分子) 的发展。之前《Nature》增刊曾以癌症信号传导为题, 进行了这方面的综述, 见[本期《自然》专题: 癌症信号传导 \(免费下载\)](#)

30 年的时间使得癌症研究从最初的寻找致癌基因——**oncogene**, 发展到现今的新一代癌症治疗——靶定特异信号分子。癌症细胞中调控细胞生长和分化的信号通路几乎总是在改变, 虽然这些相互关联途径已经得到破解, 但是有关这些变化如何导致癌症和如何纠正仍然是一个巨大的挑战。

**Akt1/PKBa** 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其激酶活力在包括细胞凋亡、糖原合成和细胞生长等的各种细胞功能中起着关键作用。**Akt1/PKBa** 被各种生长因子和存活因子所活化(1)。其 308 位苏氨酸残基、473 位丝氨酸残基和 474 位酪氨酸残基的磷酸化对于该酶的充分活化是必要的。**Akt1/PKBa** 通过对包括

胱冬酶-9 在内的几种靶标的磷酸化和失活而抑制细胞凋亡 (2)。Akt1/PKBa 通过对糖原合酶激酶-3a 和 3b 的磷酸化和失活来调节糖原合成(3, 4)。已鉴定了 3 种类型的哺乳动物 Akt1/PKBa。

除此之外, 研究也发现 Akt1 蛋白激酶作用通道调控细胞增殖和生长, 参与包括细胞凋亡和葡萄糖代谢在内的细胞过程。虽然在其他通道构成部分中也发现了激发突变的现象, 而以前却不知道有激发癌症的 AKT 点突变。

在第一篇文章中, 来自翻译基因组学研究院 (the Translational Genomics Research institute), 礼来公司 (Eli Lilly and Company) 癌症研究部, 全球结构生物学部等处的研究人员在人类乳腺癌、结肠直肠癌和卵巢癌中发现了 AKT1 中的一个回复突变, 该突变通过增强其膜联系作用来激发这种激酶, 这将 AKT1 与癌症的发生直接关联了起来。

这一发现可以说是癌症生物学中具有启示意义的一个发现, 证实 AKT1 是乳腺癌、结肠癌和卵巢癌的致癌基因。礼来公司 Kerry L. Blanchard 博士表示, 突变改变了 PH (Pleckstrin 同源序列, 酶与细胞膜上的磷脂结合的部分) 区中结合袋 (binding pocket) 的静电学特征。研究人员分析了包括乳腺癌、结肠癌和卵巢癌在内的共 150 个肿瘤样本。数

据分析结果显示, 8% 的乳腺癌、6% 的结肠癌和 2% 的卵巢癌的样本中, AKT1 发生突变。

第二篇文章主要围绕着 c-Myc 致癌基因, c-myc 基因是 myc 基因家族的重要成员之一, c-myc 基因既是一种可易位基因, 又是一种多种物质调节的可调节基因, 也是一种可使细胞无限增殖, 获永生功能, 促进细胞分裂的基因, myc 基因参与细胞凋零, c-myc 基因与多种肿瘤发生发展有关。

其是作为一个原致癌基因发现的, 活跃于很多人类肿瘤中, 但它也是一种转录因子, 是正常细胞生长和增殖所必需的。它影响基因表达的能力过去曾被认为是其促进肿瘤发育的手段, 但关于 c-Myc 也影响 DNA 复制的发现直接表明, 对于它的某些作用应有另一种解释。

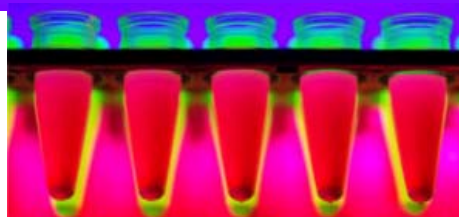
在这篇文章中, 来自哥伦比亚大学医学院, Fred Hutchinson 癌症研究中心的研究人员通过定位 DNA 合成点及与复制前复合体相结合, 发现 c-Myc 能够控制 DNA 复制: 当失控时, 同一机制也许还能引起 DNA 损伤和不正确的细胞增殖。

这些研究成果, 无论对于癌症的进一步研究, 还是癌症与信号传导途径, DNA 复制转录等多方面的相互作用都提出了新的思路和研究方向。(生物通: 张迪)



基因有限公司 LI-COR Odyssey 用户回访活动

免费抗体开始派送!







# 《Cell》重要文章： 线粒体控量新因子被发现

生物通报道：线粒体是细胞中的能量工厂，提供正常细胞功能所需的能量，但这种能量的制造又是如何调控的呢？在最新一期的《Cell》杂志上，来自瑞典卡罗琳斯卡研究院的研究人员首次发现了一种充当能量产生“刹车”的因素。

由于整个细胞呼吸链过程中的重要部分由线粒体 DNA (mtDNA) 编码，因此细胞可以通过增加或者减少线粒体 DNA 的表达来改变能量的产生，以适应不同的需求。但是，在这之前对于这一能量调节过程的机制却知之甚少。

来自瑞典卡罗琳斯卡研究院的两个研究小组在这种能量调节机制的研究上获得了突破性的进展。这两个分别由 Claes Gustafsson 和 Nils-Goran Larsson 领导的小组发现了一种全新的线粒体因子——MTERF3，这一因子主要抑制线粒体 DNA 的表达，从而能够降低细胞能量的产生。

研究人员推测，这些新发现在将来可能会有助于研究人员开发出能治疗多种疾病的新方法。线粒体功能被破坏将会导致细胞产量的危机，并且与多种常见疾病有莫大的联系，这些疾病包括糖尿病、心脏病和帕金森氏症等，甚至普通的衰老也和这一过程密不可分。

线粒体是真核细胞的重要细胞器，是动物细胞生成 ATP 的主要地点。它们内部基本上是空的，但具有复杂的膜结构。线粒体基质的三羧酸循环酶系通过底物脱氢氧化生成 NADH。NADH 通过线粒体内膜呼吸链氧化，与此同时合成 ATP。合成的 ATP 进入细胞质后参与细胞的各种需能过程。线粒体的遗传基因(DNA)跟人的细胞核的 DNA 有质的不同，线粒体独立自主地复制繁衍，跟它寄主的细胞

的繁衍没有关系。如果线粒体 DNA 发生突变，则细胞不能产生足够的 ATP 而导致细胞功能减退甚至坏死，从而使临床上表现为复杂多样的症状。

1890 年 R. Altman 首次发现线粒体，命名为 bioblast，以为它可能是共生于细胞内独立生活的细菌。1898 年 Benda 首次将这种颗粒命名为 mitochondrion。1900 年 L. Michaelis 用 Janus Green B 对线粒体进行染色，发现线粒体具有氧化作用。Green (1948) 证实线粒体含所有三羧酸循环的酶，Kennedy 和 Lehninger (1949) 发现脂肪酸氧化为 CO<sub>2</sub> 的过程是在线粒体内完成的，Hatefi 等 (1976) 纯化了呼吸链四个独立的复合体。Mitchell (1961—1980) 提出了氧化磷酸化的化学偶联学说。

7 月下旬，美国弗吉尼亚生物信息学研究所的研究人员构建出了一种能够让科学家更好地了解抗艾滋病药物 AZT (azidothymidine) 的代谢和毒性。该模型能够使研究人员模拟当 AZT 在细胞中被代谢时发生的生化反应，包括在线粒体中的代谢反应。

AZT 成功用作高效抗逆转录病毒的治疗 (HAART)，能有效控制感染 HIV 的个体中人类免疫缺陷病毒的水平。但是，长期使用 AZT 可能对一些患者产生副作用。David Samuels 和同事希望能够知道 AZT 的毒副作用

用是否能被最小化或消除。为了这个目的，他们构建出了一种细致的计算机模型。AZT 可以干预线粒体中的 DNA 复制，并导致接受 HAART 患者的致死性副作用。HAART 是现

代医学中最成功的一个药物成就。这项研究的目的是希望通过了解 AZT 在一些人中的毒副作用来改善这种药物。（生物通雪花）



## 全基因组的完美复制！

样本珍贵稀缺？基因组DNA不够用？时间紧迫？

看看Sigma能给您带来什么… …



### 全基因组扩增 *Whole Genome Amplification*

超出传统PCR的局限  
无可比拟的均一性与得率  
无限的可能… …

Sigma-Aldrich 有专职的R&D科学家团队，全心全意为您提供最好的全基因组扩增产品。

GenomePlex™ *Whole Genome Amplification (WGA)* 可以有效而精确的扩增纳克级的起始样本基因组DNA，得到微克级的DNA，同时最大程度的避免等位基因的缺失。经过GenomePlex扩增的DNA适合各种下游应用，包括电泳、定量PCR、CGH芯片、STR分析、SNP分析和测序等。

- 适用样本来源广，包括：全血、Blood card、血浆、血清、口腔拭子、植物、土壤、FFPE组织、单个细胞；
- 完好的基因组代表性，无可检测到的等位基因偏好性
- 专用的WGA DNA聚合酶是扩增的精确性更好
- 保护稀有的资源样本，在数小时内扩增纳克级的起始样本基因组DNA，得到微克级的DNA
- 广泛的下游应用：定量PCR、芯片分析、SNP分析和测序等

#### Sigma-Aldrich (上海)贸易有限公司

热线电话：800-819-3336

Email: [orderCN@sial.com](mailto:orderCN@sial.com) ; [china@sial.com](mailto:china@sial.com)

#### 上海 •

地址：上海市淮海中路398号世纪巴士大厦22楼A-B座

电话：021-61415566

传真：021-61415568

邮编：200020

#### 北京 •

地址：北京市朝阳区建国路118号招商局大厦18层G-H座

电话：010-65688088

传真：010-85801346

邮编：100020

#### 广州 •

地址：广州市体育东路南方证券大厦1906房间

电话：020-38840730

传真：020-38840679

邮编：510610



# 小小斑马鱼，又一大发现

生物通报道：宠物店里，斑马鱼的售价在 1 美元左右。幼鱼从破卵而出到能够自己觅食，不到三天时间。成年斑马鱼每次排卵 500 枚。其实，人和斑马鱼有许多相似之处。Rice 大学斑马鱼研究专家 Mary Ellen Lane 说：“我们所分离的任何一个斑马鱼基因，都能找到一个与之相对的人类基因。”

最新工作中，Lane 与研究生 Catherine McCollum 和 Shivas Amin、本科生 Philip Pauerstein 关注斑马鱼中一种叫做 LMO4 的基因。已知 LMO4 在细胞复制和乳腺癌中都有作用。利用生物技术，Lane 等研究 LMO4 基因不能转录的斑马鱼，结果发现这些斑马鱼胚胎的前脑和眼部明显变大。当 LMO4 基因过表达时，这些区域缩小。研究结果将刊登于今年晚些时候出版的《Developmental Biology》杂志。

Lane 说，这项研究表明 LMO4 独立调节促进胚胎这些区域生长的其它两个基因，并且为研究神经发育提供了新资料。

斑马鱼与大鼠和果蝇一样，成为从癌症到可卡因沉溺等一系列研究的模式生物。Lane 的斑马鱼研究解释了发育生物学中的一个重要的未知领域——大脑和中枢神经系统的发育机制。（生物通 小粥）

北大、加大等联手探索斑马鱼全基因组突变新技术

生物通报道：来自北京大学生命科学学院、美国国立人类基因组研究所和加州大学生物系的研究人员，最近在利用逆转录病毒插入法引发斑马鱼全基因组范围内基因突变的研究中取得重大进展。文章刊登于 7 月 18 日在线版《PNAS》。

研究人员采用其研制的一组技术，用假性逆转录病毒（pseudotyped retroviruses）感染斑马鱼胚胎，并且绘制了 F1 代斑马鱼基因组中前病毒整合（retroviral integrations）的遗传位点。研究人员在 F1 斑马鱼中找到代表 993 个逆转录病毒整合的 2045 个序列。共 599 个整合位于现有的遗传集合(Zv6)中，233 个整合定位于基因内。

通过培育 25 个基因中携带前病毒整合的斑马鱼，研究人员证实，在接近一半的基因“点击率”中，mRNA 转录水平下降了 70% 以上，整合出现在外显子或者第一个内含子中时突变的可能性最大。根据这些数据，将近 1/5 的整合会出现逆转录病毒的突变。另外，当鼠类白血病病毒特异整合到基因的第一个内含子（不与其它内含子整合）时，会出现一个强烈的诱变效应。19 个基因无活性事件中的 3 个有胚胎缺陷。根据研究人员所勾勒的策略，可能 F1 代鱼中每 30 个测序反应就有 1 起突变事件。这与传统测序途径（TILLING, Targeting Induced Local Lesions IN Genomes, 定向诱导基因组局部突变技术）相比，鉴别斑马鱼基因突变的有效性上升 20—30 倍。将这种上升的有效性和 F1 代斑马鱼精子样本的低温冻藏相结合，有望得到在每个斑马鱼基因都含有突变的稳定的资源。注：TILLING: Targeting Induced Local Lesions

In Genomes, 将诱发产生高频率点突变的化学诱变方法与 PCR 筛选技术和 Li-Cor 公司生产的 4300 DNA 遗传分析系统的双色红外荧光高通量检测技术有效结合, 快速有效地从

化学诱变剂 (EMS) 诱变产生的突变群体中鉴定出点突变, 这一全新的、高通量、低成本的反向遗传学研究方法大大地方便了植物基因组学的研究。

## 罗氏应用科学部



### 蛋白质组学畅销产品特惠活动

**Buy 2 Get 3**

Valid until August 15, 2007

**Order Today!**

同一产品 · 同一包装规格 · 买2送1

现在就联系我们吧! 自2007年7月1日起至2007年8月15日, 罗氏应用科学部蛋白表达分析系列部分产品 进行买2送1的特惠活动。以更加优惠的价格体验罗氏产品带给您的研究工作带来的简便、高效和成功, 机会难得, 千万不要错过!

- [cOmplete 蛋白酶抑制剂混合片](#)  
cOmplete protection. cOmplete convenience
- [PhosSTOP 磷酸酶抑制剂混合片](#)  
Protect your proteins before phosphatases attack
- [FuGENE® HD 转染试剂](#)  
Measure the results of your transfection, not your transfection reagent

[点击了解活动详情!](#)

#### 罗氏产品“买二送一”特惠活动

- **活动时间: 2007年7月1日至8月15日**
- **定购专线: 021-2412 1188 罗氏应用科学部 (只接受传真订单)**
- **咨询热线: 021-2412 1000 转 罗氏应用科学部**

#### 罗氏诊断产品 (上海) 有限公司 罗氏诊断应用科学部

上海市淮海中路1045号  
淮海国际广场12楼  
Tel: 021-2412 1000  
Fax: 021-2412 1188  
邮编: 200031  
邮箱: [china.as@roche.com](mailto:china.as@roche.com)

北京办事处  
北京市东城区东长安街1号东方广场  
东方经贸城西三办公楼302室  
Tel: 010-8518 1622  
Fax: 010-8518 1623  
邮编: 100738

广州办事处  
广州市环市东路403号  
广州国际电子大厦2701室  
Tel: 020-8732 3050  
Fax: 020-8732 3048  
邮编: 510095





# 冷泉港实验室：划算的基因沉默方法

生物通报：大约在十年前，2006 年诺贝尔生理/医学奖得主 Craig Mello 和 Andrew Fire 发现，他们能够将短 RNA 分子插入到线虫中并沉默特定基因的表达。今天，研究人员也常常使用这种强大的 RNA 干扰方法来研究哺乳动物系统中的特定基因功能。

为了进行这种基因沉默实验，研究人员通常需要依赖化学合成的 RNA 分子，而这个合成过程是相当昂贵的。本月《冷泉港实验手册》（Cold Spring Harbor Protocols）上的一篇免费文章就这个问题进行了讨论。该文章描述了一种能产生沉默 RNA（esiRNA）以有效靶向哺乳动物细胞中的任何基因的很划算的方法。

这篇文章

（<http://www.cshprotocols.org/cgi/content/full/2007/16/pdb.prot4824>）描述了如何在体外利用酶合成RNA分子，该方法利用克隆的感兴趣基因作为模版。接着，这些RNA分子被随机分割成短的片段，纯化后用于RNA干扰实验。

这种方法是由德国马克思·普朗克分子细胞生物学和遗传学研究所的Frank Buchholz研究组发明，能够用于制备大的esiRNA库以用于大规模的基因功能研究（<http://www.mpi-cbg.de/esiRNA/>）。

本月《冷泉港实验手册》中另外一篇重点文章还描述了如何利用胎鼠培养胸腺细胞（<http://www.cshprotocols.org/cgi/content/full/2007/16/pdb.prot4808>）。胸腺是脊椎动物免疫系统的重要组成部分——T细胞的发源地。胎鼠胸腺器官培养是体外研究T细胞成熟过程的唯一可利用系统，并且这种操作方法

将能帮助希望了解T细胞成熟机制的研究人员。该文章的作者是英国伯明翰大学MRC免疫调节研究中心的Graham Anderson和Eric J. Jenkinson撰写。

最新发布的这个实验手册的文章还包括成像斑马鱼的神经元活动、分析果蝇和青蛙的基因表达模式、制备用于基因分型研究的哺乳动物 DNA 和鉴定蛋白质相互作用的文章。

RNAi 现象的发现，加速了后基因组时代基因功能的研究步伐，更重要的是，RNAi 自身可以应用于临床治疗，有望在未来帮助科学家开发出治疗疾病的新疗法。美国《科学》（Science）杂志连续三年将其评为十大科学突破之一，并于 2002 年将其评为十大科学突破之首。

科学家公认，RNAi 的研究将是未来十年生物医药研究中最激动人心也最有可能产生丰富成果的领域之一。在提出后短短几年，RNAi 这一项举世瞩目的技术得到诺贝尔奖的青睐和肯定，其发现者 Dr. Andrew Fire 和 Dr. Craig Mello 获得了 2006 年诺贝尔生理学或医学奖。

RNAi 是在研究秀丽新小杆线虫（C. elegans）反义 RNA（antisense RNA）的过程中发现的，由 dsRNA 介导的同源 RNA 降解过程。1995 年，Guo 等发现注射正义 RNA（sense RNA）和反义 RNA 均能有效并特异性地抑制秀丽新小杆线虫 par-1 基因的表达，



该结果不能使用反义 RNA 技术的理论做出合理解释。直到 1998 年,克雷格·梅洛博士和卡耐基研究院的 Dr. Andrew Fire 证实 Guo 等发现的正义 RNA 抑制同源基因表达的现象是由于体外转录制备的 RNA 中污染了微量 dsRNA 而引发,并将这一现象命名为 RNAi。

此后 dsRNA 介导的 RNAi 现象陆续发现于真菌、果蝇、拟南芥、锥虫、水螅、涡虫、斑马鱼等多种真核生物中,并逐渐证实植物中的转录后基因沉默 (posttranscriptional gene silencing, PTGS)、共抑制 (cosuppression) 及 RNA 介导的病毒抗性、真菌的抑制 (quelling) 现象均属于 RNAi 在不同物种的表现形式。

1999 年,Hamilton 等首次在 PTGS 植株中发现了长度为 25nt 的 RNA 中间产物。2000 年,Zamore 和 Hammond 等使用体外培养的果蝇细胞进行研究发现,外源性 dsRNA 通过耗能过程降解成 21-23nt 的小干扰 RNA

(small interfering RNA, siRNA) 引发 RNAi。

2000 年,Wianny 和 Svoboda 等分别证实小鼠胚胎细胞和卵母细胞中 dsRNA 能引发 RNAi 效应。2001 年,Elbashir 等证实 21nt 的 siRNA 可在避免激活 dsRNA 依赖的蛋白激酶(dsRNA-dependent protein kinase, PKR)和 2',5'-寡聚腺苷酸合成酶 (2',5'-oligoadenylate synthetase, 2',5'-OAS) 信号转导途径的同时,有效抑制人胚肾 293 细胞、Hela 细胞等哺乳动物细胞中目的基因的表达。

2002 年,Brummelkamp 等首次使用小鼠 H1 启动子构建了小发卡 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 表达载体 pSUPER,并证实转染该载体可有效、特异性地剔除哺乳动物细胞内目的基因的表达,为利用 RNAi 技术进行基因治疗研究奠定了基础。(生物通雪花)



### Ni-NTA Superflow 预装柱特价时间延长啦!



尊敬的客户, QIAGEN 公司在 2007 年 4 月至 6 月进行 Ni-NTA Superflow 预装柱试用装免费派送活动, 收到了广大客户的热切支持, 为了答谢广大客户的厚爱, QIAGEN 决定将预装柱的特价时间 **延长至 2007 年 9 月 30 日!**

**还等什么, 赶快行动吧!!! [更多详细信息请浏览>>](#)**

#### 联系我们:

##### QIAGEN 有限公司上海代表处

电话: 021-51345678

传真: 021-51342500

免费技术支持热线: 8009880325

##### QIAGEN 公司代理商联系方式

基因公司 电话: 021-64951899 010-51665161

东胜创新实验技术有限公司 免费订购电话: 4008182168

吉泰生物科技有限公司 免费订购电话: 8008205565

#### QIAGEN 公司的 Ni-NTA 蛋白纯化试剂具有以下特点:

- 灵活性好—蛋白可在变性/非变性条件下进行纯化
- 独特的 Ni-NTA 结构—极低的 Ni 离子脱落率
- 兼容性好—可兼容各类变性剂, 还原剂等 (可兼容 10mM DTT)
- 纯度高—一步纯化即可以得到 95% 纯度的蛋白
- 结合能力强—最高蛋白结合量为 20mg/ml
- 产品规格多—可纯化 ng 级至 kg 级 6xHis 标签蛋白

# RNAi 机制新发现： 真菌利用 RNAi 对抗病毒

生物通报道：植物和动物利用 RNA 干扰，但用途各不同，比如沉默基因和对抗外来的病毒和核苷酸以保护宿主。来自马里兰大学生命科技学院生物系统研究中心的研究人员发现真菌也会利用这种机制来防御病毒的侵袭，这说明 RNA 干扰在免疫方面作用的广泛性，也为其分子机制的研究提出了新的观点。这一研究成果公布在《美国国家科学院院刊》（PNAS）杂志上。

原文检索：Published online before print July 23, 2007, 10.1073/pnas.0702500104 PNAS | July 31, 2007 | vol. 104 | no. 31 | 12902-12906 Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi

RNA 沉默是存在于生物中的一种古老现象，是生物抵抗异常 DNA(病毒、转座因子和某些高重复的基因组序列)的保护机制，同时在生物发育过程中扮演着基因表达调控的角色，它可以通过降解 RNA、抑制翻译或修饰染色体等方式发挥作用。

RNA 沉默存在两种既有联系又有区别的途径：siRNA(small interference RNA)途径和 miRNA(microRNA)途径。siRNA 途径是由 dsRNA(double-stranded RNA)引发的，dsRNA 被一种 RNaseIII 家族的内切核酸酶 (RNA- induced silencing complex, Dicer) 切割成 21~26 nt 长的 siRNA，通过 siRNA 指导形成 RISC 蛋白复合物(RNA-induced silencing complex)降解与 siRNA 序列互补的 mRNA 而引发 RNA 沉默。而 miRNA 途径中 miRNA 是含量丰富的不编码小 RNA(21~24 个核苷酸)，由 Dicer 酶切割内源性表达的短发夹结构 RNA(hairpin RNA, hpRNA)形成。miRNA 同样可以与蛋白因子形成 RISC 蛋白复合物，可以结合并切割特异的 mRNA 而引发 RNA 沉默。尽管引发沉默的来源不同，但 siRNA 和 miRNA 都参与构成结构相似的 RISC，在作用方式上二者有很大的相似性。

RNA 干扰广泛存在于植物、动物等真核生物中，与基因本身及转录并无任何关系，属于转录后水平的基因沉默机制。Djikeng 与 Fjose 等研究表明，无脊椎动物和植物中的 RNA 干扰具有抑制侵入宿主体内的病毒和转座子，减弱和清除其基因毒性的作用。转基因植物中出现的基因沉默作用也是宿主细胞通过 RNA 干扰而实现的自我保护反应。动物基因组对自私 DNA(selfish DNA)，例如病毒和转座元(transposon)的入侵和转录异常的抑制也是通过 RNA 干扰实现的，因为在一般情况下生物体内不会产生双链 RNA。当病毒或转座元等外来遗传物质侵入时，由于它们自身生活周期的需要，才会产生双链异常 RNA(aberrant RNA) 或称为无赖 RNA (rogue RNA)。生物体可能是在进化过程中形成了 RNA 干扰等防卫机制来抵御外来遗传物质的寄生。

我们经常讨论到的是植物和动物利用 RNA 干扰，但用途各不同，比如沉默基因，对抗外来的病毒和核苷酸以保护宿主。在这篇文章中，研究人员发现真菌也会利用这种机制来防御病毒的侵袭。他们敲除了栗疫病菌 (chestnut blight fungus) *Cryphonectria*

*parasitica* 的两个 *dicer* orthologs (指起源于不同物种的最近共同祖先的一些基因): *dcl-1* 和 *dcl-2*。结果发现突变 *C. parasitica* 表型与野生型相似, 但是 *dcl-2* 敲除型变得对于一种低毒病毒 (*hypovirus*, 是一类寄生在板栗疫病菌上的无衣壳双链 RNA 病毒), 和 *reovirus mycovirus* (呼肠(孤)真菌病毒) 非常敏感, 而且病毒 RNA 水平和滴度都提高了。

重新将野生型 *dcl-2* 基因导入到这些突变当中, 可以逆转真菌对于 *mycoviruses* 的易感性。而双 *dicer* 突变则表现出与 *dcl-2* 单突变同样的缺陷型。这一研究成果说明 RNA 干扰在免疫方面作用的广泛性, 也为其分子机制的研究提出了新的观点。(生物通: 张迪)

附: 重要研究进展: 原核生物的 RNA 沉默系统

RNA 沉默 (RNA-Silencing System) 被认为是一种发生在植物(转录后基因沉默或共抑制)、动物 (RNA 干扰) 和真菌 (消除作用) 等真核生物细胞中的一种对外源遗传因子 (转座子、转基因或病毒) 的特异性和高效率的降解机制, 但并没有在原核生物中被发现过, 然而近期来自美国国家卫生研究院

(National Institutes of Health, NIH) 的由 Eugene Koonin 领导的研究小组利用生物信息学的方法预言了一种存在于原核生物里, 类似于真核生物 RNA 干扰系统 (RNA-interference system) 的 RNA 沉默机制。这一研究成果公布在 3 月的 *Biology Direct* 杂志上。

RNA 沉默这一概念还未被单独拿出来研究之前是在不同生物中分别发现的: 在植物中发现了转录后基因沉默 (Posttranscriptional gene silencing, PTGS) 和共同抑制、植物中 RNA 介导的病毒抵抗, 在动物中第一次是

在新小杆线虫属线虫中发现 RNA 干预, 以及真菌及藻中 (链孢菌属中的“镇压”) 的沉默, 这些都是基于同样的核心机制——即共同作用因子 (小干预 RNA, small interfering RNAs, siRNAs) 与植物、动物、真菌和藻中这种基因之间的同源性。之后科学家将其归总起来认为都是 RNA 沉默的一种, 但至今未有研究人员在原核生物中确认发现 RNA 沉默现象。

而来自 NIH 的研究人员从生物信息学的角度第一次提出, 一种在古细菌和细菌里发现的串联重复序列——Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome Repeats (CRISPR) 也许与其它

CRISPR—associated(cas)蛋白相关的基因家族一起担当着对抗噬菌体和质粒 RNA 的防御作用。而许多 Cas 蛋白都包含着在真核生物中与 RNA 干扰有相同功能的蛋白的结构域, 因此研究人员这可能是原核生物的 RNA 沉默系统。

这些分析主要来源于对 NCBI 数据库中古细菌和细菌基因组中 CRISPR 和 cas 基因数据的比较, 通过比较研究人员发现了许多总是定位于 CRISPR 簇附近的 cas 基因, 这些基因可能编码一些与 RNAi 机制相关 (比如解旋和切除) 的蛋白, 包括一个 Dicer 酶类似物, 几个 Slicer 类似物。但是这些类似物与 Dicer, Slicer 基因序列并不相似, 因此可以说不是同源基因的。

同时研究人员还发现 CRISPR 一部分插入片段 (inserts) 与病毒和质粒基因组相似, 由此研究人员分析推测所有的 CRISPR inserts 都是来源于病毒或者质粒, 但由于大部分还是未知的, 因此这种来源性不是那么明显, 并且他们还认为这些 inserts 是通过形成一个双层结构 (被 Cas 蛋白切除后可以降解

外来 RNA) 由沉默的噬菌体或者质粒转录序列得到的。

这一发现打破了原有的对 RNA 沉默的概念, 虽然还只是生物信息学方面的证实, 但是

随着研究的深入, 很有可能是扩展现有 RNA 沉默的定义, 为研究 RNA 沉默提供进化上的, 整体性的帮助。

BIO-RAD

让您以意想不到的价格购买高品质PCR仪

为了热烈庆祝Bio-Rad成功收购MJ Research 三周年, 回馈广大中国用户对Bio-Rad 产品的厚爱, 我们特别推出MJ Mini PCR仪, 以超低优惠价格促销---让您以意想不到的价格购买高品质PCR仪。另外, 凡购买MyCycler和iCycler任一款PCR仪, 即赠送Bio-Rad核酸水平电泳槽一个。促销日期从2007年7月15日起截止到2007年10月31日。机会难得, 欲购从速!

促销一

震撼促销价:

36880元/台



小身材,高性能

MJ Mini™ PCR 仪

- 具有温度梯度功能, 方便快速优化反应条件
- 升降温速度快: 2.5度/秒
- 温度精度高:  $\pm 0.2$ 度/秒
- 样品容量0.2ml  $\times$  48孔或0.5ml  $\times$  12孔, 无需更换Block
- 图形界面, 方便程序设置
- 可升级到双色定量PCR仪



MiniOpticon™ 双色实时定量PCR仪

定货请联系Bio-Rad [当地办事处](#)或[代理商](#), 也可拨打全国统一订货热线021-64260808-31 任琛, 或Email至 [Sales.china@bio-rad.com](mailto:Sales.china@bio-rad.com), 我们将及时与您联系。

联系我们:

Bio-Rad上海办事处  
Tel: 021-64260808-31  
Fax: 021-64264988  
联系人: 任琛

Bio-Rad北京办事处  
Tel: 010-82675748-318  
Fax: 010-62529800  
联系人: 周郁松

Bio-Rad 广州办事处  
Tel: 020-87771498  
Fax: 020-87751142  
联系人: 何咏华





# 10 种灵长类动物基因组研究成果公布

生物通报道：在最新一期的《基因组研究》杂志的网络版上，来自美国科罗拉多卫生科学中心大学和斯坦福大学的研究人员公布了一项大规模基因组研究的结果。

该研究的目的是分析调查 10 种包括人类在内的灵长类动物之间基因复制数量的差异，剩余九种灵长类动物分别为黑猩猩、大猩猩、倭黑猩猩、猩猩、长臂猿、短尾猿、狒狒、豺和狐猴。这项研究系统地分析了不同种系灵长类动物的基因和基因簇。在漫长的 6000 万年的进化过程中，这些基因曾发生过基因拷贝数的增加和缩减。

为了找出这 10 种灵长类动物之间基因拷贝数的差异，研究人员使用了含有 24000 多个人类 DNA 的芯片进行对比性基因杂交试验。接着，他们把人类的 DNA 样本与其它 9 种灵长类动物的 DNA 样本进行对比。这种对比分析使他们鉴定出一些特殊的基因和基因簇：这些基因和基因簇在进化过程中曾经历过种特异性基因拷贝数的增加或减少。

研究人员表示，他们鉴定出的一些基因很可能与成就人类和其它 9 种灵长类动物的种间遗传特点有重要联系。为了证实这种可能性，研究人员集中精力重点分析了几种表现出非常显著的种间特异性的基因簇。

其中一个叫做 AQP7 (aquaporin 7, 水通道蛋白 7) 的基因在人类中的特异性基因拷贝数的扩增能够解释为什么人类进化出长跑耐力。AQP7 的作用是进行水分和甘油的跨细胞膜传递。在人进行剧烈运动期时，AQP7 将促使人体利用糖原贮备。这种蛋白质还可以

帮助人类通过出汗来排除多余的热量。

此外，研究人员还表示，基因拷贝数的巨大差异与认知、繁殖、免疫和遗传病敏感性有潜在的关系。

水通道蛋白属于主体内在蛋白家族 (major intrinsic protein, MIP)，迄今为止，已在细菌、酵母、植物、昆虫和脊椎动物中发现至少 50 余种水通道。世界上第一个哺乳动物的水通道是由 Agre 等人于 1988 年发现的，1991 年确定了其反向转录脱氧核糖核酸 (cDNA) 顺序，随后进行了功能鉴定，证明了其协助细胞转运水的作用。

AQP0 (MIP26) 主要表达在眼晶状体，其基因变异可导致白内障。AQP1 (CHIP28) 分布极其广泛，在肾、肺、眼、血管、生殖道、消化道等上皮都有表达。AQP2 只局限于肾集合管主细胞内，并受血管加压素的调节。

AQP3 在肾等多种组织有表达，其特点是不仅能够转运水，也能转运甘油。AQP4 主要表达在脑，但在肾及呼吸道等多种组织亦有表达。AQP5 只见于唾液腺、泪腺等腺体组织。AQP6 其水通道活性类似 AQP0，但选择性表达在肾。AQP7 和 AQP8 主要见于睾丸中处于不同生长阶段的精子细胞中。AQP9 见于人外周血白细胞、肝脏、肺脏和脾脏等，但未见于胸腺。(生物通雪花)



# 《细胞》：敲除一个基因，小鼠寿命延长

生物通报道：蛋白 5 型腺苷酸环化酶（type 5 adenylyl cyclase，AC5）丢失后，小鼠食欲大增但体重下降，而且寿命延长。

AC5 缺失，肾上腺素导致的心跳加快的效果会降低，肌体抵抗压力的能力增强。寻找抑制 AC5 的药物的研究早已开始，研究小组成员之一、心脏病专家 Stephen Vatner 说：“我们当然对这种化合物很感兴趣。”

目前，衰老学研究的焦点是利用卡路里限制（calorie restriction）作为激发代谢的“青春之泉”。敲除一种心脏基因能够延长寿命，是 Vatner 等在心脏病研究时获得的一个意外发现。Vatner 和 Junichi Sadoshima 与来自新泽西药理牙科大学（University of Medicine and Dentistry of New Jersey）其他同事一起，已经着手检验敲除 AC5 是否会使心脏变得更健康。

阻断肾上腺素信号途径的药物  $\beta$  受体阻滞药（beta-blockers）是心脏病患者或心跳无规律的人群常服用的。2003 年有研究证实，缺乏 AC5 的突变小鼠对心内压力引发的心力衰竭有更强的抵抗能力。

研究小组还发现，这些突变小鼠与普通小鼠相比，寿命平均长 30%，而且不会罹患与衰老相关的心脏压力和骨质疏松。详细内容刊登于上周《Cell》杂志。

## 抗癌特征

AC5 通过降低活性氧积聚所致的损伤而促进长寿。活性氧分子所致的损伤据说会加快衰老。AC5 突变，调节氧化压力反应的蛋白 EPK2 的含量上升。Vatner 与其同事提高正

在出芽的酵母中的 EPK2 含量时，酵母寿命延长。

缺乏 AC5 的小鼠，迷雾重重。年轻突变小鼠的体重与一般小鼠的体重没有什么明显不同，但年老的突变小鼠体重较轻——尽管它们的食量大增。Vatner 说可能有一种类似于卡路里限制的代谢变化。

Vatner 说，还有一种可能是 AC5 突变小鼠抵抗癌症的能力更强。“年老小鼠死亡的主要原因不是心力衰竭，普通小鼠大多死于肿瘤。”这是有可能的，突变小鼠能够避免形成肿瘤，因而寿命较长。

## 神奇药物

所有这些都使得 AC5 抑制物听起来如同奇迹，但解决方案却远没有这么简单。科罗拉多州立大学心脏病专家 Michael Bristow 说，AC5 缺失，突变小鼠仍对肾上腺素有反应，只是肾上腺素作用于心脏的效果似乎减弱了。肾上腺素反应在“Fight or Flight（打或者跑）”情况下迟早会出现。AC5 是复杂途径的一部分，敲除的全部效果还没有完全被掌握。

加州大学圣地牙哥分校心脏病专家 H. Kirk Hammond 认为，这项研究发现还可能与精神原因。AC5 缺乏小鼠对吗啡或安定药（如 haloperidol）的反应都不好。Bristow 和 Hammond 认为，这项发现为衰老学研究开辟了一条新途径。（生物通 小粥）

## “Fight or Flight”理论

哈佛大学心理学家 Walter B.Cannon 于上一世纪提出“Fight or Flight”理论。当某人面对挑战或威胁的时候，他的大脑会产生一系列的生化反应。包括由下丘脑(Hypothalamus, 位于中脑(Limbic System), 应激反应的主要按钮) 刺激及启动交感神经系统(Sympathetic Nervous System) 分泌出肾上腺素(Adrenaline), 使心跳加速, 瞳孔放

大, 血液被输送致主要肌肉, 整个身体处于激发状态, 以准备跟该事物作战(Fight) 或逃跑(Flight)。大脑会在极短的时间内作出选择。这个过程是人类赖以生存的生存机制, 但是, 假如有人长期处于激发状态, 对他的生理功能会有负面的影响。肾上腺分泌过多的皮质固醇(Corticoids)阻碍消化, 细胞修补功能, 减弱免疫系统。身体健康会受到破坏。

## “ep-points 分行中国” 登陆中国!



值得信赖  
Eppendorf  
产品



方便实用  
实验办公  
用品



超酷至 IN  
个人休闲  
娱乐用品



2007 年 6 月 12 日, Eppendorf 公司在中国正式启动 **ep-points 分行中国** 活动! **ep-points** 积分奖励活动是德国艾本德股份公司在全球范围内推出的免费参与的积分活动, 您只需购买 Eppendorf 产品 (移液器及耗材), 就能累积丰厚的 **ep-points** 回馈积分来换取您心仪的礼品。





# 两篇《Nature》文章： 延伸三维复合体与抗生素的作用方式

生物通报道：关于一种在细菌遗传信息转移中发挥重要作用的酶的新发现，有助于研制效果更好的抗生素。研究人员利用功能强大的成像技术首次在原子水平上观察细菌和抗生素之间的相互作用，详细内容刊登于《Nature》杂志两篇文章中。两篇文章的共同作者、俄亥俄州立大学微生物学副教授 Irina Artsimovitch 说，这项工作提供了一种在启动细菌基因中发挥关键作用的酶的最为详细结构。

第一篇文章介绍，Artsimovitch 等获得了延伸三维复合物(elongation complex, 一种由聚合酶负责启动基因表达，功能异常会导致细胞死亡。“RNA 聚合酶大部分工作时间处于延伸三维复合体中，” Artsimovitch 说，“从生理学角度看，这种结构非常重要，不仅是因为抗生素设计，而且许多疾病如遗传性癌症都与此复合体缺陷有关。”

Artsimovitch 与其同事采用极端嗜热菌（*Thermus thermophilus*）进行实验。当 *T.thermophilus* 不再对人体有威胁时，其被广泛用于收集分子水平的结构信息。

研究人员首先分离 *T.thermophilus* 的 RNA 聚合酶，然后将 RNA 聚合酶与 DNA 和 RNA 混合，得到有活性的延伸三维复合体，结晶后，利用 X-ray 结晶学成像技术对晶体进行检测。

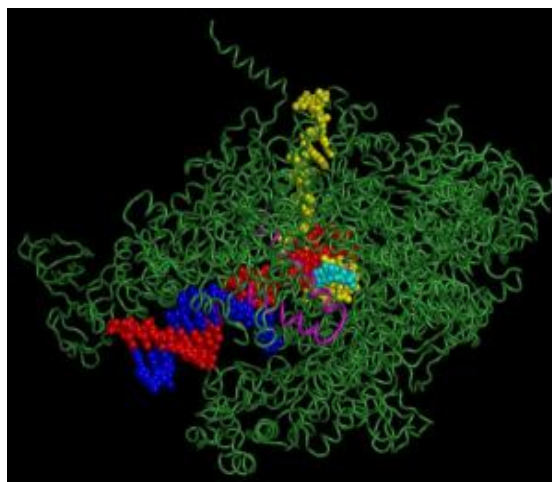
第二篇文章介绍抗生素利链菌素（streptolydigin）阻断转录的机制。研究人员早已知道，利链菌素抑制 RNA 聚合酶的活性，不清楚的是控制这种机制的物质。通过检测 X-ray 图像，Artsimovitch 等发现利链菌素通过将延伸三维复合体锁定在无活性状态而抑制复合体的正常运转。

他们发现一种环状元件，在每次延伸三维复合体向正在生长的 RNA 链添加一个核苷时

RNA 聚合酶形成的结构)的细节图像。RNA 聚

都会关闭。为使下一个循环进行，这种环必需重新打开。如果某种物质如抗生素，将这种环锁定在关闭状态，RNA 聚合酶不能正确发挥功能。

Artsimovitch 说，这种环是利链菌素等抗生素的靶标，如果能够设计出预防其运动的新药，就能立刻停止 RNA 聚合酶的运转，细菌随即死亡。这种可移动中环可能是所有活体生物调节转录的热点，采用抗生素或是通过操作细胞因素都可实现。（生物通 小粥）



图：绿色“面条”代表 RNA 聚合酶。核酸好似链上的珍珠：红色和蓝色珠子形成 DNA 链，结构中隐藏的绿色珠子代表 RNA。青色的是将要添加在结构上的核苷，洋红色代表的是可移动环。



解决抗生素耐药问题可以细菌 RNA 聚合酶为靶点

细菌 RNA 聚合酶是很多抗生素药物的靶点。美国阿拉巴马大学伯明翰分校的 Vassilyev 等近日报告,细菌中 RNA 聚合酶的启动环对 DNA 转录中链延伸具有重要意义。这可能有助于增强抗生素的效力并可能帮助解决抗生素的耐药问题。(Nature 2007 年 6 月 20 在线发表)

研究者在极端嗜热菌 DNA 转录过程中,采用细菌 RNA 聚合酶抑制剂利链菌素抑制核苷酸底物进入活动位点,观察 RNA 聚合酶的变化情况。在未加利链菌素的情况下,底物通过 RNA 聚合酶启动环(TL)再折叠进入双  $\alpha$  螺旋结构而结合到活性位点。加利链菌素的情况下,TL 不发生再折叠,处于无活性的稳定构型,DNA 转录因而中止。

该结果提示,TL 的再折叠对于细菌 RNA 聚合酶的活性和 DNA 转录中链的延伸具有重要的催化作用。将该聚合酶冻结在不发生再折叠的无活性状态将可以阻止细菌复制,从而成为新抗生素的设计方向。

该校网站上有消息称,研究者还发现了人和细菌 RNA 聚合酶更多差异,意味着未来抗生素将只杀死细菌,而不伤害健康的人类细胞。这不仅提供了新的抗生素探索方向,还可用来改进已有的药物。例如,某些抗菌素本身杀菌效力很强,但却难以穿透细胞膜,所以缺乏临床疗效。对于细菌 RNA 聚合酶的详细观察,为生产出能够有效进入细胞、与 RNA 聚合酶结合并杀死细菌而不抑制人类细胞生长的药物提供了基础。



## 上海吉玛制药技术有限公司

siRNA 合成专业公司

| ENGLISH | 首页 | 吉玛简介 | 公司产品 | 订购产品 | siRNA 介绍 | 联系我们 |



**化学合成及荧光标记的 siRNA Oligo Offer!**

最高质量: HPLC 纯化 >97% 最优价格 600 元 / 对 迅速交货: 6 个工作日  
 多种选择: 化学修饰及荧光标记等 超值服务: 免费设计, 附送对照。  
 订货电话: 021-51320195 E-mail: order@genepharma.com



### RNAi 相关产品

普通 siRNA oligo  
siRNA 对照  
RNAi 转染系统  
Starter Kit

化学修饰 siRNA oligo  
公开发表和证实的 siRNA  
RNAi 检测相关产品  
RNAi 完整项目服务

荧光标记 siRNA oligo  
New! RNAi 载体法  
New! RNAi 新超值套餐服务



# 实验鼠比想象中变异的更快！

生物通报：老鼠是生命科学领域实验室经常使用的研究材料。现在，来自美国北卡罗莱纳州大学和 Jackson 实验室的研究人员进行的一项联合实验发现，使用最广泛的实验鼠株的遗传变异要比之前预测的大得多。之前的资料显示其 DNA 序列中携带 140000 个变异，而现在已经有 830 万个变异。

而且，这项研究发现所研究的 15 个小鼠的血统已经不是之前推测的那样。它们相互之间的差异比人类和黑猩猩之间的血统差异还要大。这项研究的结果刊登在 7 月 29 日的《自然·遗传学》杂志的网络版上，并且将在 9 月的印刷版上刊登出来。该研究对过去和未来研究的解释和设计具有重要意义。这篇文章报告了对这种变异的进化起源进行了首次全面综合的分析，对生物医药研究有重要应用价值。

这项研究颠覆了许多长期以来的有关小鼠株起源和亲缘关系的假说。根据这项研究的结果，之前已经完成的一些研究和未来的研究设计都需要重新评估。

动物模型在医学研究领域是非常关键的工具，因为它们能使研究人员在一个确定的生物系统中全面系统地分析探索问题。小鼠是人类疾病和标准化生物学研究的最常用的哺乳动物模型，这是因为它们的基因组具有高度的保守性。而且，由于 99% 的人类基因都能在小鼠中找到对应物，因此克隆小鼠的某个基因常常会导致人类对应基因的克隆。

实验鼠的基因组被认为是一种具有不同亚种起源的拼凑的 DNA 区域。但是，这项新的研究发现，小鼠基因组的大部分在它们的亚种起源中又有意外的变异水平。

研究人员指出，常用的实验鼠已经不是我

株

们所知道的那样了。该研究表明，实验鼠几乎物通雪完全是由一个单一的亚种衍生而来，而不是之花）前认为的那样由三个亚种衍生而来。

研究人员在纯系小鼠的全面的遗传资料基础上分析了血统和序列变异。在分析 Y 染色体和线粒体时，研究人员发现小鼠株不是之前推测的父母的后代。

研究人员表示，对小鼠变异的这项新认识将会使研究人员能够在整个小鼠基因组范围内研究基因变异。

在 7 月 29 日的《自然》杂志上，研究人员公布了小鼠单体型图谱。该图谱首次完整描述了小鼠基因组测序和 SNP 计划的分析数据。该研究计划由美国环境卫生科学研究院进行。

这些数据使研究人员能够比较一个小鼠与另外一个小鼠的遗传组成，并进行必要的遗传分析来确定出一些个体对疾病更敏感的原因。这项研究成果使人们向着了解对人类对环境毒素的个体敏感性前进了一步。研究人员还希望开放环境疾病药物的制药企业将能够利用这些数据。

这项研究详细地描述了用于确定出 15 个小鼠的基因组中分布的 827 万个高质量的 SNP 的方法。SNP 即单核苷酸多态性是发生在 DNA 序列中的单个核苷酸的遗传变异。（生



# 《自然·方法学》：新方法探测朊病毒

生物通报道：朊病毒是大脑中一种传染性蛋白质病毒，能导致牛出现疯牛病、羊患上痒病、人患上克雅氏病。在7月的《自然·方法学》杂志网络版上，美国健康研究院慢性病毒疾病实验室的研究人员发明了一种非常敏锐而快速探测传染性朊病毒蛋白质的新方法。

为了设计出有效的朊病毒探测方法，研究人员利用了这样一个事实，即朊病毒能将某种正常折叠的蛋白质转变成具有传染性的聚合体，这种聚合体是很容易被探测的。如果一个样品含有朊病毒，那么它将诱发蛋白质在健康的组织基底中聚合，通过这种聚合体的测量就可以探测出朊病毒的存在。这种技术的弱点是不敏感、要花费数周的时间，而且很难获取整个脑组织。

该文章的通讯作者 **Byron Caughey** 和同事对这项技术进行了改进，他们用重组蛋白质代替大脑组织作为聚合反应的基底。在2~3天的时间里，只采集一点点体液，他们就能鉴别出被朊病毒感染大颊鼠的和健康的大颊鼠。

这种更快的播种聚合方法rPrP-PMCA不仅有助于研究人员开发出新的诊断陈列，而且还有助于他们研究朊病毒蛋白质聚合体，筛选出阻止这一过程的抑制剂。

该技术使用了重组的大颊鼠PrP-sen（蛋白酶敏感朊病毒蛋白，**protease-sensitive prion protein**）。与大脑衍生的PrP-sen不同，这种蛋白很容易浓缩、突变和进行合成标记。这种方法能够鉴别被羊痒病感染的和未感染的大颊鼠。除了有助于研究人员了解PrPsc形成的机制和结构基础研究，并且可能有助于开放迅速的、超灵敏的朊病毒分析和诊断检测方法。

“朊病毒”最早是由美国加州大学

**Prusiner**等提出的，在此之前，它曾经有许多不同的名称，如非寻常病毒、慢病毒、传染性大脑样变等，多年来的大量实验研究表明，它是一组至今不能查到任何核酸，对各种理化作用具有很强抵抗力，传染性极强，分子量在2.7万~3万的蛋白质颗粒，它是能在人和动物中引起可传染性脑病(TSE)的一个特殊的病因。

朊病毒已经超出了经典病毒学的生物学概念，研究表明，蛋白质在特定条件下发生突变或构型上的变化，由良性变为恶性，即变为具有传染性的蛋白质颗粒，这一观点向传统观点提出了强有力的挑战。由朊病毒引起的疾病近年来不断被发现并相继被确认，不论在人群中还是在动物群中的发病率在全球范围内呈上升趋势，因而对朊病毒的研究不仅有重大的理论意义，同时还有迫切的现实意义。

有关朊病毒的研究在过去的诺贝尔奖百年中曾分别于1976年和1997年两次获得诺贝尔生理学和医学奖。20世纪50年代初，居住在大洋洲巴布亚新几内亚高原的一个叫Fore的部落还处在原始社会，他们一直沿袭着一种宗教性食尸习惯，若干年后(一般5~30年)食尸者中不少人会出现震颤病最终发展成失语直至完全不能运动，不出一年被染者全部死亡。这种现代医学所说的震颤病，当地土语称之为“Kuru”。Fore部落原有160个村落、35000人，疾病流行期间80%的人皆患此病，整个



民族陷入危亡。50年代后期，在世界卫生组织和澳大利亚政府的干预下禁止了这种人吃人的陋习，发病率逐渐下降。

美国国立卫生研究院的Gajdusek和Gibbs与澳大利亚Zigas等人合作共同研究这种震颤性疾病，并通过一系列的实验证实震颤病与羊搔痒症、人早老性痴呆属于同一病原感染，Gajdusek由此获得1976年诺贝尔生理学 and 医学奖。之后，各国科学家在震颤病方面又

做了大量的研究工作，发现震颤病是一种神经系统慢性退化性疾病，其病理变化与动物的海绵状脑病很相似，并成功地构建了动物模型。

美国加州大学神经病学专家

Stanley B. Prusiner等提出，朊病毒是一种传染性蛋白质颗粒，不含有核酸，可自身复制，Prusiner凭借对朊病毒的研究获得1997年诺贝尔生理学 and 医学奖。（生物通雪花）



## 颠覆你的价格观念

### 为您量身定做的纯化方案：

Promega公司近期推出的一款中、低通量的自动纯化仪-Maxwell® 16，为您提供核酸纯化、蛋白纯化的一体化解决方案。为了回馈广大用户，Promega推出重量级促销活动，希望更多用户能够了解并轻松拥有这款性价比卓越的仪器。

### Personal Automation



### 仪器特点：

### Maxwell® 16 System

- 大** ——功能强大，可进行DNA，RNA和蛋白的快速纯化
- 小** ——仪器体积小，价格低，您可轻松做出决定
- 多** ——适用于多种样品，如血液、细胞、动物组织、细菌和植物叶片等
- 少** ——操作步骤少，简单快速，30分钟完成整个提取过程

时间有限，赶快行动吧，机不可失，订购从速，想要了解更多仪器的信息请浏览：

<http://www.promega.com.cn/cx/maxwell/index.htm>





# 老鼠基因组单体型图谱出炉

生物通报道：美国的研究人员希望通过对 15 只常用于生物医药研究的小鼠的 DNA 进行研究来帮助科研人员确定出与环境疾病敏感性相关的基因。目前这些数据被存放在了基因变异数据目录之下，即小鼠基因组单体型图谱（将染色体分隔成许多小的片段），从而帮助研究人员找出小鼠中影响健康和疾病的基因和遗传变异。这个单体型图谱公布在 7 月 29 日的《自然》杂志上，该图谱首次完整描述了小鼠基因组测序和 SNP 计划的分析数据。该研究计划由美国环境卫生科学研究院进行。

这些数据使研究人员能够比较一个小鼠与另外一个小鼠的遗传组成，并进行必要的遗传分析来确定出一些个体对疾病更敏感的原因。这项研究成果使人们向着了解对人类对环境毒素的个体敏感性前进了一步。研究人员还希望开放环境疾病药物的制药企业将能够利用这些数据。

这项研究详细地描述了用于确定出 15 个小鼠的基因组中分布的 827 万个高质量的 SNP 的方法。SNP 即单核苷酸多态性是发生在 DNA 序列中的单个核苷酸的遗传变异。

研究人员利用将第一种小鼠 C57BL/6J 进行 DNA 测序，并将它们作为进行其他四种野生型和 11 种实验室常用小鼠测序的标准参照。研究人员利用寡核苷酸芯片来寻找人类基因组中的常见 DNA 变异。

这种芯片分析了标准参照小鼠株的 25.7 亿个碱基对中的 14.9 亿个碱基对。然后，这些数据被用于开发单体型图谱（含有 40898 个片段）。

NTP（National Toxicology Program）计划是一项以 NIEHS 为总部的多研究机构合作进行的计划。NTP 计划希望能够探索这些小鼠株对不同环境试剂的反应。该研究的数据可登陆<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>获得。

（生物通雪花）

人类基因组单体型图计划简介：

“国际人类基因组‘单体型图’计划”是继“国际人类基因组计划”之后，人类基因组研究领域的又一重大研究计划。科学家们在已完成的人类全基因组序列图的基础上，确定人类经世代遗传仍保持完整的始祖板块。以及在不同族群中这些板块的类型与分布。并将这些不同的板块标上标签。

2002 年 10 月，中国、美国、英国、日本、加拿大五国代表在美国华盛顿正式启动了这项计划。美国完成 31%、日本占 25%、英国占 24%、加拿大占 10%。内地、香港和台湾将合作完成整个国际人类单体型图的 10%，负责 3 号、21 号和 8 号染色体单体型图的绘制。其中，香港大学、香港科技大学和香港中文大学的工作占整个计划的 2%，台湾科学家将负责 1.5%。

“国际人类基因组‘单体型图’计划”将以世界亚、非、欧三大族群为研究对象，三大群体样本各占三分之一。其中，中国汉族将提供一半的亚裔样本，即占世界样品的六分之一。

该计划“中国卷”总召集人北京华大基因研究中心主任杨焕明教授说，人类单体型图的绘制，将为不同群体的遗传多态性研究、疾病和遗传关联分析、治病基因和治病因子的确定、药效及副作用和疾病风险的分析、人类起

源进化迁徙历史的研究等提供完整的人类基因组信息和有效的研究工具。将为人 类常见疾病的研究提供最强大、最经济的工具。

台湾“中央研究院”生物医学科学研究所常兰阳博士说,整个计划将在 2 0 0 4 年 1 0 月份之前基本完成。我们将和上海的国家人类基因组南方中心合作 2 1 号染色体和 8 号染色体短臂单体型图的绘制工作。

香港科技大学生化系王子晖教授说,内地、香港和台湾的同行第一次一起合作,非常 有意义。此次参与这项计划的三所香港大学也 得到特区政府在硬件、人才以及资金上的支 持。他说,能参与这个生命科学最前沿、对人 类整体有所贡献的重大国际合作科研项目,会 对各自生物技术发展有很好的推动作用。

大多数常见的疾病,如糖尿病、癌症、中 风、心脏病、抑郁症、哮喘等,受众多基因以 及环境因子共同作用。尽管任意两个不相关 的人的 DNA 序列有 99.9%是一致的,剩下的那 0.1%由于包含了遗传上的差异因素而非常重 要。这些差异造成人们罹患疾病的不同风险和 对药物的不同反应。发现这些与常见疾病相关 的 DNA 序列上的多态位点,是了解引起人类 疾病的复杂原因的最重要途径之一。

在基因组中,不同个体的 DNA 序列上的 单个碱基的差异被称作单核苷酸多态性 (SNPs)。例如,某些人的染色体上某个位 置的碱基是 A,而另一些人的染色体的相同位 置上的碱基则是 G。同一位置上的每个碱基 类型叫做一个等位位点。

除性染色体外,每个人体内的染色体都有 两份。一个人所拥有的一对等位位点的类型被

称作基因型 (genotype)。对上述 SNP 位点 而言,一个人的基因型有三种可能性,分别是 AA, AG 或 GG。基因型这一名称即可以指个 体的某个 SNP 的等位位点,也可以指基因组 中很多 SNPs 的等位位点。检定一个人的基 因型,被称作基因分型 (genotyping)。

人类的所有群体中大约存在一千万个 SNP 位点,其中稀有的 SNP 位点的频率至少 有 1%。相邻 SNPs 的等位位点倾向于以一个 整体遗传给后代。位于染色体上某一区域的一 组相关联的 SNP 等位位点被称作单体型 (haplotype)。大多数染色体区域只有少数 几个常见的单体型 (每个具有至少 5%的频 率),它们代表了一个群体中人与人之间的大 部分多态性。一个染色体区域可以有很多 SNP 位点,但是只用少数几个标签 SNPs, 就能够提供该区域内大多数的遗传多态模式。

单体型图将描述人类常见的遗传多态模 式。它包括染色体上具有成组紧密关联 SNPs 的区域,这些区域中的单体型,以及这些单体 型的标签 SNPs。同时,单体型图还将标示出 那些 SNP 位点关联不紧密的区域。

研究者一般通过比较患者和非患者来发 现影响某种疾病例如糖尿病的基因。在两组单 体型频率不同的染色体区域,就有可能包含疾 病相关基因。理论上,研究者通过对全部一千 万个 SNP 位点都进行基因分型,也能够寻找 到这样的区域。但是,目前用这种方法进行检 定的成本是过于昂贵。通过单体型图计划将鉴 定出 20~100 万个标签 SNP 位点,从而提供 与一千万个 SNP 位点大致相同的图谱信息。 这样将大幅度地减少成本使研究易于进行。

# 四川大学最新文章

## 发表 siRNA 新方法



生物通报：来自四川大学华西医学中心微生物学教研室，成都生物制品研究所（Institute of Chengdu Biological Products）的研究人员通过构建质粒 pAd-hTR 证明了 hTR siRNA 在 HeLa 细胞系中有效和特异的端粒酶的敲除，从而指出了这种 siRNA 表达重组腺病毒系统在癌症基因治疗方面的前景。这一研究成果公布在《Cancer Gene Therapy》杂志上。

领导这一研究的是四川大学华西医学中心微生物学教研室主任李明远教授，其早年毕业于华西医科大学医学专业，之后在美国著名的 St. Jude Children's Research Hospital 学习，学习了基因敲除、转基因和基因沉默等现代分子生物技术。目前担任四川大学华西医学中心微生物学教研室主任，中华医学会微生物学与免疫学会第六届委员会常委，《中国病原生物学杂志》、《四川大学学报（医学版）》、《国际检验医学杂志》和《西部医学》等杂志编委，《中国普外基础与临床杂志》审稿人，国家自然科学基金同行评审专家。

原文检索：Cancer Gene Therapy (2007) 14, 748-755; doi:10.1038/sj.cgt.7701056; published online 20 April 2007 Inhibition of telomerase RNA (hTR) in cervical cancer by adenovirus-delivered siRNA

**RNA 沉默**是存在于生物中的一种古老现象，是生物抵抗异常 DNA(病毒、转座因子和某些高重复的基因组序列)的保护机制，同时在生物发育过程中扮演着基因表达调控的角色，它可以通过降解 RNA、抑制翻译或修饰染色体等方式发挥作用。

RNA 沉默存在两种既有联系又有区别的途径：siRNA(small interference RNA)途径和 miRNA(microRNA)途径。siRNA 途径是由

dsRNA(double-stranded RNA)引发的，dsRNA 被一种 RNaseIII 家族的内切核酸酶 (RNA- induced silencing complex, Dicer) 切割成 21~26 nt 长的 siRNA，通过 siRNA 指导形成 RISC 蛋白复合物(RNA-induced silencing complex)降解与 siRNA 序列互补的 mRNA 而引发 RNA 沉默。而 miRNA 途径中 miRNA 是含量丰富的不编码小 RNA(21~24 个核苷酸)，由 Dicer 酶切割内源性表达的短发夹结构 RNA(hairpin RNA, hpRNA)形成。miRNA 同样可以与蛋白因子形成 RISC 蛋白复合物，可以结合并切割特异的 mRNA 而引发 RNA 沉默。尽管引发沉默的来源不同，但 siRNA 和 miRNA 都参与构成结构相似的 RISC，在作用方式上二者有很大的相似性。

由于 RNAi 可以作为一种简单有效的代替基因敲除的工具，在功能基因组学研究、基因治疗等领域得到了越来越多的重视。为此被 Science 评为 2001 年最重要成果之一。RNAi，即引入双链 RNA，通过特异性结合互补链从而抑制基因表达/引发转录后沉默。许多的研究人员开始用 RNAi 作为一种工具研究基因功能。较早的哺乳动物 RNAi 实验中，siRNAs 通过化学方法合成。进一步的，开始有了商业化的体外转录方法合成 siRNA 的试剂盒提供，比化学合成方法经济。现在已有研究小组

开发表达载体,能够在哺乳动物细胞中持续表达 siRNAs。

在 RNAi 实验中,化学合成与体外转录方法都是在体外得到 siRNA 后再导入细胞内,但是这两种方法主要有两方面无法克服的缺点: siRNA 进入细胞后容易被降解;进入细胞 siRNA 在细胞内的 RNAi 效应持续时间短。针对这种情况,出现了质粒、病毒类载体介导的 siRNA 体内表达。该方法的基本思路是:将 siRNA 对应的 DNA 双链模板序列克隆入载体的 RNA 聚合酶 III 的启动子后,这样就能在体内表达所需的 siRNA 分子。这种方法总体的优点在于不需要直接操作 RNA,能达到较长时间的基因沉默效果。

通过质粒表达 siRNAs 大都是用 Pol III 启动子启动编码 shRNA(small hairpin RNA)的序列。选用 Pol III 启动子的原因在于这个启动子总是在离启动子一个固定距离的位置开始转录合成 RNA,遇到 4—5 个连续的 U 即终止,非常精确。当这种带有 Pol III 启动子和 shRNA 模板序列的质粒转染哺乳动物细胞时,这种能表达 siRNA 的质粒确实能够下调特定基因的表达,可抑制外源基因和内源基因。采用质粒的优点在于,通过 siRNA 表达质粒的选择标记, siRNA 载体能够更长时间地抑制目的基因表达。当然还有一点,那就是由于质粒可以复制扩增,相比起其它合成方法来说,这就能够显著降低制备 siRNA 的成本。

此外,带有抗生素标记的 siRNA 表达载体可用于长期抑制研究,通过抗性辅助筛选,该质粒可以在细胞中持续抑制靶基因的表达数星期甚至更久(比如 Clontech(现属于 Takara)的 RNAi-Ready 表达载体)。另外带有荧光标记的 siRNA 表达载体也受到研究者的重视与欢迎,因为带荧光标记的表达载体,可以让研究人员通过荧光标记很容易观察

到载体的转染效率及目的基因的沉默效率。可通过荧光显微镜观察含有 shRNA 的细胞或通过流式细胞仪富集被转染的细胞。同时荧光蛋白的表达与 shRNA 的表达是独立的,因此不影响 shRNA 基因沉默的效果。

在这篇文章中,研究人员将编码人类端粒酶 RNA (human telomerase RNA, hTR),长 67bp 的寡核苷酸引入 pSIREN——一种重组腺病毒构建中的穿梭载体。然后将 U6-RNA 启动子和 siRNA 编码 insert 从 pSIREN 上剪切下来,亚克隆进 pAdeno-X,构建出了质粒 pAd-hTR。

接着研究人员将 pAd-hTR 转染进哺乳动物细胞系 HEK-293,获得了携带有 hTR 靶向的 siRNA (Ad-hTR-siRNA)的腺病毒。通过一系列的实验,研究人员证明了 Ad-hTR-siRNA 介导的端粒酶沉默在 HeLa 细胞中的作用。同时将 Ad-hTR-siRNA 与 Ad-NT-siRNA 进行比对,发现前者能极大的降低 HeLa 细胞中 hTRmRNA 水平 (by 70.21%),和端粒酶活性 (by 58.87%)。而且会引起 HeLa 细胞凋亡。

利用 Ad-hTR-siRNA 进行皮下肿瘤异种移植治疗可以减缓肿瘤的生长,其中至少部分是由于体内细胞凋亡 ( $P<0.05$ )。总而言之,这些研究结果证明了 hTR siRNA 在 HeLa 细胞系中有效和特异的端粒酶的敲除,从而指出了这种 siRNA 表达重组腺病毒系统在癌症基因治疗方面的前景。(生物通:张迪)

#### 附 1: 李明远

教授,博士研究生导师, 1954 年 7 月出生,汉族,中共党员。

1982 年 11 月毕业于华西医科大学医学专业 77 级,获医学学士学位;

1989 年 10 月毕业于华西医科大学微生物学与免疫学专业,获医学硕士学位



2001-2002 年,在美国著名的 St. Jude Children's Research Hospital 学习,学习了基因敲除、转基因和基因沉默等现代分子生物技术。

1982 年 12 月至今,一直在原华西医科大学微生物学教研室工作,历任助教、讲师、副教授和教授。现任四川大学华西医学中心微生物学教研室主任,中华医学会微生物学与免疫学会第六届委员会常委,《中国病原生物学杂志》、《四川大学学报(医学版)》、《国际检验医学杂志》和《西部医学》等杂志编委,《中国普外基础与临床杂志》审稿人,国家自然科学基金同行评审专家。

先后被评为四川省学术与技术带头人,四川省卫生厅学术带头人,四川省病原生物实验室生物安全及医用特殊物品出入境审批专家。自参加工作以来,一直坚持工作在教学和科研的第一线。在教学方面,做到既教书又育人,深受本科学生的欢迎。作为研究生导师,已培养毕业硕士研究生 9 名,博士研究生 3 名,目前有在读博士和硕士 10 余名。在教材建设方面,主编和参编了卫生部规划教材多本,现又被遴选为十一五规划教材主编。在科研方面,负责承担国家自然科学基金面上项目 3 项,卫生部课题 1 项,教育部课题 2 项,四川省科技厅项目 2 项;并参加国家 863 课题 1 项。负责和主研的两个科学研究项目先后获四川省科技进步三等奖,已在国内外发表论文 50 余篇。

## 附 2: siRNAs 在基因治疗中的应用

作者:胡迎宾,李定国

来源:世界华人消化杂志

**引言:**小干扰 RNAs(small interfering RNAs, siRNAs)是 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)过程中的效应分子.Fire et al[1]在 1998 年向秀丽隐杆线虫中注射双链

RNA(double-stranded RNA, dsRNA)分子后降解了细胞质中含有同源序列的靶 mRNA.随后的研究表明, RNAi 现象广泛存在于真菌、拟南芥、斑马鱼、果蝇、小鼠及大鼠等大多数真核生物中.早期在哺乳动物细胞中应用长 dsRNA 可引起非特异性干扰素反应而导致细胞死亡,后来遗传学和生物化学研究证明将 dsRNA 切割成 21-28 个核苷酸的 siRNAs 后不引起干扰素反应,并能有效降解含有同源序列的靶 mRNA.因此, siRNAs 正迅速发展成为研究基因功能的新工具和作为治疗的新手段.

### 1 siRNAs 的沉默机制

siRNAs 是由 RNase-III 家族中被称为 Dicer 的核酸内切酶在细胞质中剪切自然存在的长 dsRNA 的过程中产生的.Dicer 将长 dsRNA 剪切为 21-28 个核苷酸的 siRNA 双链.这种 siRNA 双链除了在 5'末端是磷酸,3'末端是羟基外,3'端还有由 2 个核苷酸构成的悬突.siRNA 双链与诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)结合后裂解为 siRNA 单链,与 siRNA 单链完全互补结合的同源性靶 mRNA 被 RISC 剪切降解,从而达到基因沉默的目的.现在 siRNA 能够像核酶一样通过化学合成的方法或者通过载体表达双链短发夹样 RNA(short hairpin-like RNA, shRNA)进入到细胞内,后者在细胞内可转化为 siRNA 而发挥基因沉默效应.一些研究证明 siRNAs 还有其他沉默机制,例如在几种生物中能够通过 RNAi 途径修饰细胞染色质导致转录水平的基因沉默[2-3].

miRNAs(microRNAs)是一类非编码小分子 RNA,具有和 siRNAs 相似的功能,调节细胞内基因表达.成熟的 miRNA 是由胞质中 70 个核苷酸组成的发夹样结构前体剪切为

21-22 个核苷酸分子组成的单链.他们组装成蛋白复合体(miRNP)后在核糖体内与 mRNA 3'端非翻译区部分互补结合从而阻止 mRNA 的翻译.如果与同源性靶 mRNA 完全互补结合,那么 miRNAs 像 siRNAs 一样能够通过正反馈途径循环降解靶 mRNA.

## 2 siRNAs 的基因沉默效率及其安全性

各种基因沉默的方法是否能够高效作用于靶目标仍然是其应用于治疗的一个关键问题.Harborth et al[4]研究表明 RNA 结合蛋白, mRNA 的二级结构和三级结构能够影响 siRNA 的沉默效率.绝大多数研究都证实 siRNAs 比各种寡脱氧核苷酸 (oligodeoxyribonucleic acids, ODNs)更有效,并且作用时间更长.作用于同样的靶目标 siRNAs 的半数最大抑制浓度(IC50)比磷酸硫酯修饰的 ODNs 低 100-1 000 倍.尽管尚未对 siRNAs 与核酶和/或 DNA 酶的效率进行广泛地系统性比较,但 Drew et al[5]研究表明 siRNAs 比核酶和/或 DNA 酶更有效,且具有长发夹结构的 RNA 比锤头结构的核酶能更强烈的抑制靶基因表达.

低浓度的 siRNAs 就能启动基因沉默的过程,因为他们能快速、特异性与 RISC 结合,从而减少了与非特异性蛋白结合的可能,这有利于减少 siRNAs 在治疗中的非特异性反应.事实上已有研究证明转染中等浓度的 siRNAs 并不引起全身非特异性反应[6].也有三项研究[7-9]认为 siRNAs 引起的非特异性反应与 siRNAs 的浓度、细胞类型、转染试剂以及 siRNAs 的转染方式有关.这些非特异性反应包括刺激基因亚型引起的干扰素反应,但研究并非像人们想象的那样,所产生的干扰素反应并不影响细胞生长.

## 3 siRNAs 的表达载体

由于 siRNAs 既可以通过化学合成获得,也可以通过载体表达,这使具有靶向性的药物应用于基因治疗成为可能.表达 siRNAs 的载体通常含有 RNA 聚合酶 III 启动子(RNA polymerase III promoter, pol III)或 RNA 聚合酶 II 启动子(pol II)序列,首先转录生成与 miRNA 前体相似的 shRNA,然后在细胞内变成 siRNA 发挥基因沉默效应.在活体内和培养组织细胞中应用表达 siRNA 的载体能够长时间整合到基因组中并“敲除”内源性基因.许多研究证明腺病毒载体、腺相关病毒 (adeno-associated viral, AAV)载体、逆转录病毒载体及慢病毒载体都能有效转染到活体内和培养细胞中.Shinagawa et al[10]研究表明含 pol II 的表达载体能在体内产生由数百个碱基对构成的 shRNA,而不诱导非特异性干扰素反应,这为 siRNAs 应用于哺乳动物提供了一种安全的新方法.

## 4 siRNAs 在活体中的应用

通过电穿孔、局部注射或静脉注射的方法已经能够成功地将化学合成的 siRNAs、表达 siRNAs 的质粒以及表达 siRNAs 的病毒导入到哺乳动物细胞中.但很难评价哪种方法能更有效的引起基因沉默.经鼠尾静脉高压注射溶于生理盐水的 siRNA 已经成功地将 siRNA 导入大鼠组织中,其中在肝中靶基因的沉默效率达 90%以上,而在肺、肾、脾、胰中靶基因的沉默效率稍低[11-12].采用这种方法引起的基因沉默效应一般持续数天,在有些情况下可超过 1 wk,并且基因沉默的效率因物种的差异而不同.

表达 siRNAs 的病毒载体为研究哺乳动物的基因功能提供了新方法,更为治疗人类主要疾病带来了新希望.已经有几种病毒被设计用于表达 siRNAs.重组 AAV 能在哺乳动物分裂期细胞和静止期细胞中长期表达 siRNA.他

们通常以附加体的形式随机、低频整合到宿主基因组中.有研究[13]表明向大鼠脑内注射表达 siRNA 的 AAV 载体能引起长达 7 wk 之久的基因沉默效应.在 HIV 感染的组织模型中表达 siRNA 病毒载体也被成功地应用于治疗[14].

现在又有几种新的方法将 siRNAs 导入活体内.最近有研究[15]表明大分子能够促进几种小分子物质经皮吸收,包括 siRNAs 分子.这有利于 siRNAs 经皮吸收进入全身血液循环发挥治疗性药物的作用.将含 siRNAs 的气溶胶导入肺内也能起到基因治疗的作用[16].

## 5 以 siRNAs 为基础的基因治疗

虽然 siRNA 在哺乳动物细胞中的应用仅仅 4 a,但他正以飞快地速度发展成为基因治疗的一种新方法.如果 siRNAs 通过尾静脉高压注射能有效到达肝脏,那么他将可以广泛应用于治疗各种肝病.通过沉默肝中内源性凋亡基因的表达,经抗凋亡酶 Caspase-8 或者抗 Fas 细胞死亡受体的 siRNAs 预处理的小鼠能有效预防各种试剂诱导的急性肝功能衰竭;用同样的 siRNA 也能够治疗已经发生的肝损伤[11-12].siRNAs 通过抑制病毒自身或者抑制病毒转录所必须的辅助因子达到抗病毒的目的.将乙型肝炎病毒(HBV)基因组和 siRNAs 共转染可以有效降低 HBV 的复制水平和蛋白合成[17].Wohlbold et al[18]证明用 siRNAs 能有效沉默异常 BCR-ABL 融合基因表达,而不影响正常 c-BCR 和 c-ABL 的转录,这为治疗 Ph 染色体阳性的慢性粒细胞白血病提供了新

方法.

在血浆中 siRNAs 双链能抵抗核酸内切酶的降解作用,但这并不意味着他能够稳定地存在于机体内.因为未被修饰的 siRNAs 不能迅速进入细胞内,或者与血浆蛋白亲和力低而较早地被机体清除.如果不是通过表达 siRNAs 载体的方法,那么必须经过化学修饰的 siRNAs 才能更有效的作为基因治疗的手段.有研究[19-20]正通过硫磷酰修饰 siRNA 提高细胞的摄取能力,从而增强基因沉默的效果.去年美国 FDA 已批准经过修饰的 siRNAs 进行临床新药试验,用于治疗与年龄相关的黄斑退化性改变(age-related macular degeneration)的患者[21].最近 Soutschek et al[22]经鼠尾静脉注射胆固醇修饰的抗 apoB siRNA 能有效沉默同源性靶基因的过度表达,并且证实经修饰的抗 apoB siRNA 导致小鼠胆固醇水平降低的程度与 apoB 基因敲除小鼠的水平相近,这实现了 siRNA 作为静脉注射性治疗药物的可能.

siRNAs 作为一种新的基因治疗方法引起了许多研究者的兴趣,在很大程度上是因为其作为细胞内源性基因表达调节物质的低毒性和特异性,另外一方面则是其比 ODNs、核酶有更强的基因沉默效率.然而将 siRNAs 应用于临床治疗还存在一些挑战,如将 siRNAs 导入细胞内的最佳方法及如何获得更高效率,如何避免脱靶现象及非特异性反应.因此,进一步深入研究 RNAi 的机制将会丰富我们对基因表达调控的认识,也将有利于基因治疗的实际应用.



BD Pharmingen细胞生物学产品全线 6 折



# 厦门大学生科院等 miRNA 研究成果发表于《Immunity》



生物通报道：来自美国著名的斯克利普斯研究院（Scripps Research Institute）免疫学系，厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室（The Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering），中科院上海研究院健康科学研究所，内布拉斯加州大学的研究人员发现Dicer1 突变小鼠对于水疱性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus,VSV)易感性增加，并且野生型等小鼠中并不会出现这种情况，这说明miR24 和miR93 的缺失也是Dicer1<sup>Δ/d</sup> 细胞中VSV复制增多的原因之一。并进一步说明宿主miRNA与病毒的相互作用中扮演着重要的角色。

文章的通讯作者是来自斯克利普斯研究院，厦门大学生科院的特聘教授韩家淮，其研究领域是以 L929 和 MCF-7 细胞株为对象，采用逆转录病毒载体随机插入基因失活的方法，通过 TNF 筛选获得 TNF 抗性细胞株，从而得到与 TNF 诱导细胞凋亡相关的功能基因。分析这些基因在细胞凋亡通路的作用。

Immunity, Vol 27, 123-134, 27 July  
2007 Hypersusceptibility to Vesicular  
Stomatitis Virus Infection in Dicer1-Deficient  
Mice Is Due to Impaired miR24 and miR93  
ExpressionRNA

沉默是存在于生物中的一种古老现象，是生物抵抗异常 DNA(病毒、转座因子和某些高重复的基因组序列)的保护机制，同时在生物发育过程中扮演着基因表达调控的角色，它可以通过降解 RNA、抑制翻译或修饰染色体等方式发挥作用。

RNA 沉默存在两种既有联系又有区别的途径：siRNA(small interference RNA)途径和 miRNA(microRNA)途径。siRNA 途径是由 dsRNA(double-stranded RNA)引发的，dsRNA 被一种 RNaseIII 家族的内切核酸酶 (RNA- induced silencing complex, Dicer)切

割成 21~26 nt 长的 siRNA，通过 siRNA 指导形成 RISC 蛋白复合物(RNA-induced silencing complex)降解与 siRNA 序列互补的 mRNA 而引发 RNA 沉默。而 miRNA 途径中 miRNA 是含量丰富的不编码小 RNA(21~24 个核苷酸)，由 Dicer 酶切割内源性表达的短发夹结构 RNA(hairpin RNA, hpRNA)形成。miRNA 同样可以与蛋白因子形成 RISC 蛋白复合物，可以结合并切割特异的 mRNA 而引发 RNA 沉默。尽管引发沉默的来源不同，但 siRNA 和 miRNA 都参与构成结构相似的 RISC，在作用方式上二者有很大的相似性。

双链 RNA 之所以能引起特异性基因抑制是由于能激活细胞内的 Dicer 的酶复合生物所致。Dicer 是一类多结构域的 RNA 酶 III 样蛋白，由核酸内切酶和解旋酶等组成，能识别异常双链 RNA 并将其切割成短链 RNA，这种短链 RNA 可以与进一步被激活的 Dicer 结合成 RNA 诱导的沉默复合物(RISC)。RISC 通过 Dicer 中解旋酶的作用将双链 RNA 变成两个互补的单链 RNA，然后单链 RNA 识别细胞内与其互补的靶 RNA 分子，并与之互补结合，这时 Dicer 中的核酸内切酶将 RNA 分子

切断,从而使靶 RNA 分子失去编码蛋白质的功能。

植物、线虫、动物和人的细胞中都存在无活性或低活性的 Dicer, 双链 RNA 是其激活剂,因此人们利用合成的短双链 RNA 在 RNA 水平上抑制特定基因活性,就产生了一种 RNA 干扰技术,发挥 RNA 干扰作用的短双链 RNA 被称为小干扰 RNA。由于正常细胞内不存在双链 RNA,一旦出现双链 RNA,细胞内 Dicer 就会被激活,因此 RNA 干扰可以被认为是一种机体的防御机制。如果病毒感染导致单链病毒 RNA 进入细胞时,虽然不能直接激活 Dicer,但可以激活细胞内存在的一种 RNA 依赖的 RNA 聚合酶,被激活的聚合酶以病毒 RNA 为模板合成互补 RNA 链,从而产生双链 RNA。因此异常单链 RNA 可以间接激活 Dicer 而启动 RNA 干扰。

在这篇文章中,研究人员发现带有一个突变 Dicer1 等位基因的小鼠 (*Dicer1<sup>d/d</sup>*) 由于产生的 miRNA 受损,因此对水疱性口炎病毒 (Vesicular stomatitis virus, VSV) 易感性增加。研究人员并没有在野生型细胞,或任何 Dicer1 缺陷的干扰素介导的抗病毒应答中发现 VSV 基因组来源的 siRNA,而宿主的 miR24 和 miR93 可以靶向病毒大型蛋白 (L protein),以及磷蛋白 (P protein) 基因,并且 miR24 和 miR93 的缺失也是 *Dicer1<sup>d/d</sup>* 细胞中 VSV 复制增多的原因之一。这些研究数据说明宿主 miRNA 与病毒的相互作用中扮演着重要的角色。

在今年的《Cell》,韩教授等人也发现了 p38 调节活化蛋白激酶

(p38-regulated/activated protein kinase, PRAK) 在肿瘤抑制以及 ras 引起的衰亡中的重要作用,这是发现的蛋白激酶在肿瘤抑制中的新作用,对于肿瘤发育信号传导研究,以及

细胞凋亡等引起的衰亡机制具有重要意义。

(生物通:张迪)

附:韩家淮,厦门大学生命科学学院长江学者特聘教授。聘任岗位:生物化学与分子生物学。博士生导师。

个人简历

1990.10-1992.3 得克萨斯大学西南医学中心博士后

1992.4-2001.11 美国 Scripps 研究所副教授

2001.11 至今,厦门大学生命科学学院特聘教授

研究领域 (Research Area)

以 L929 和 MCF-7 细胞株为对象,采用逆转录病毒载体随机插入基因失活的方法,通过 TNF 筛选获得 TNF 抗性细胞株,从而得到与 TNF 诱导细胞凋亡相关的功能基因.分析这些基因在细胞凋亡通路的作用。

研究表明,人肿瘤内皮细胞的放射线抗性可能是由放射线激活促进内皮细胞成活的 PI3K—Akt 和 MEK1/2-Erk1/2 信号转导通路所致。我们将使用 RNAi 方法和人内皮细胞特异性靶向的腺病毒载体,抑制 MEK1 和 PI3K 的表达,从而提高放射线疗法的疗效。

We used retrovirus insertion-mediated random mutagenesis and tumor necrosis factor(TNF) selection to generate TNF-resistant lines from L929 and MCF-7 cells, from which we identified a series of functional genes that is closely related to TNF-induced cell necrosis or apoptosis using technology of 3'-RACE and RT-PCR. Our work still moved forward to find out the role that these genes play in the pathway of cell necrosis or apoptosis.

Human tumor endothelial cells have been previously reported to respond poorly to radiation-induced cell killing, partially due to radiation-induced activation of PI3K-Akt and MEK1/2-Erk1/2 signaling pathways that promote cell-survival. We will use RNAi and human endothelial cell specifically Ad-virus vector to suppress the target genes(MEK1 And PI3K) expression and to sensitize endothelial cells to radiation-induced cell killing.

细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室

细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室于 1999 年 9 月 28 日被教育部批准为第一批重点实验室。实验室现任主任为鲍仕登教授, 副主任为田惠桥教授和吴乔研究员; 现任学术委员会主任为翟中和院士, 副主任为徐洵院士和周海梦教授。目前实验室共有研究人员 22 人, 其中教授(包括研究员) 16 人, 副教授 6 人。实验室办公室主任 1 人, 专职秘书 1 人。

在学校、学院的大力支持和学术委员会的精心指导下, 实验室以“开放、流动、联合、竞争”为指导方针, 立足自身实际, 瞄准国际前沿, 积极努力实现“培养高水平人才、产出高水平成果、创建高水平研究基地”的奋斗目标。

主要研究方向：

1, 肿瘤相关基因与细胞信号转导调控：研究肿瘤细胞发生、发展和逆转的分子机理; 肿瘤和肿瘤抑制相关基因的分离、克隆和表达及其生物学功能; 研究与肿瘤和肿瘤抑制相关蛋白的信号转导及其调控功能, 阐明这些蛋白在细胞生长、分化、凋亡和个体发育过程中的关键作用。

2, 海洋生物细胞生物学：研究海洋生物发育生物学和细胞生物学、酶学特征。进行海洋生物活性物质分离和纯化、结构与毒理药理的研究, 发现结构新颖的活性物质, 为开发新型药物提供先导化合物。

3, 重要经济植物细胞分子生物学：研究植物抗病、抗虫和抗盐基因的分离及转化, 转基因植物培养的基因工程和植物体细胞杂交和性细胞杂交研究。开展植物生殖过程中性细胞发生、发育和受精过程的细胞生物学和分子生物学研究。

4, 肿瘤诊断与治疗新技术：研究病毒感染与宿主应答、基因突变与免疫选择、抗原刺激与免疫调节的相互作用。应用基因工程技术开发病毒检测试剂盒。发展高灵敏的发光性分子诊断(包括基因诊断和免疫诊断)检测技术和试剂。

2001-2003 年发表的学术论文共 156 篇, 承担基金 88 项, 获得的研究经费共计 2715.1 万元人民币, 三年来共获各类奖项 12 项, 国家二类新药证书 4 项, 申请专利 25 项, 获批 6 项。

 <p>颇尔公司 (PALL CORPORATION)</p>	 <p>蛋白, 核酸的快速浓缩分离, 脱盐, 纯化</p>
--	--

颇尔公司 (PALL CORPORATION) 于 1946 年创立, 多年来一直专门从事高性能过滤器及过滤分离系统的开发生产。销售额在全球同类型过滤行业居第一位, 为财富杂志评列的美国 500 家最大的工业公司之一。总部设在美国纽约, 下属公司, 制造厂, 实验室遍布世界三十余个国家和地区。





# 饶子和、刘志杰小组最新《自然》 子刊解析蛋白机构

生物通报道：来自中国科学院生物物理研究院国家生物大分子国家重点实验室（National Laboratory of Biomacromolecules），天津医科大学免疫学系，清华大学生命科学实验楼，美国乔治亚州大学，芬兰坦佩雷大学的研究人员对 p100 蛋白这种多功能转录共激活因子的结晶结晶进行了进一步的分析，部分解释了 p100 在转录和剪接中的不同作用，有利于进一步了解 p100 蛋白的功能和作用机制。这一研究成果公布在《Nature-Structural Molecular biology》杂志上。

文章的通讯作者为生物物理研究所的刘志杰研究员，以及天津医科大学的杨洁教授，同时参予研究的还有清华大学饶子和院士，以及赵敏（Min Zhao，音译，第一作者），Neil Shaw（第一作者）。

原文检索：Published online: 15 July 2007; |  
doi:10.1038/nsmb1269 The multifunctional human  
p100 protein 'hooks' methylated ligands

IL-4 信号传导通道是人体免疫反应的重要通道之一，它们通过 IL-4 受体调控细胞周期而诱导了 T 细胞的增殖分化，在如过敏，哮喘，癌症等许多疾病中有极为重要的作用。

多功能转录共激活因子 p100 蛋白是此通道中的一个非常重要多种功能蛋白。p100 蛋白发现至今已有近十年历史，到目前为止，发现的 p100 蛋白涵盖的功能有：p100 蛋白是 EBNA2 的转录调控激活因子；p100 蛋白与转录因子 cMyb 和丝氨酸/苏氨酸激酶 pim1 结合并增强活性；p100 蛋白与病毒 mRNA 合成密切相关的 nsp1 特异性结合；p100 蛋白是 RNA 介导的沉默复合物(RISC)的重要亚基之一，并能够与富含 U-I 和 I-Upair 的 dsRNA 相互作用；p100 蛋白作为共激活因子促进 STAT5 和 STAT6 介导的转录活性调控，并形成多种蛋白质复合物，包括

RNApolIII-p100-STAT6；p100-STAT5；  
STAT6-p100-RHA 等。

然而到目前为止还没有有关 p100 的全面的结构和功能研究的报道，生物物理研究所生物大分子国家重点实验室人源多功能转录共激活因子 p100 结构与功能研究（刘志杰组）的研究人员表达和纯化了人源 p100 蛋白 Tudor 结构域，并获得了晶体，解析了其精细三维结构，为进一步研究 p100 和蛋白质复合物的结构和功能提供了有利证据。

在这篇文章中，重点实验室的研究人员与天津医科大学杨洁研究小组的成员合作进一步对 p100 蛋白的结构和功能分析进行分析——杨洁研究小组主要从事转录激活因子-人类 p100 蛋白参与 pre-mRNA 剪接加工分子机制方面的研究，他们发现人类 p100 蛋白是一个关键的转录调控子，能通过启动子特异性激活因子和基本转录机器之间形成连接从而促进基因转录。

## 文章新发现：

1. 证明 p100 蛋白的 tudor 和 SN(TSN) 位点能于 U 核内小核糖核蛋白/核小核糖核蛋白（small nuclear ribonucleoprotein, snRNP）复合物——由小分子核内 RNA 和蛋白构成的复合体，前体 mRNA 在上面进行

2. 加工, 相互作用, 这说明 p100 在前体 mRNA 加工工程中的作用。

3. 确定了 p100 TSN 位点的结晶结构, 描绘了 p100 可能具有功能的分子基础。

4. 这种结构类似于 hook, 钩状, 一条铰链状结构控制着 hook 的移动和方向。

这些发现告诉我们一种保守的芳香族 cage 钩住了 snRNPs 的甲基化基团, 将 p100 锚定在剪接体 (spliceosome) 上, 这种结构部分解释了 p100 在转录和剪接中的不同作用。(生物通: 张迪)

- **剪接体(spliceosome)**

- 在剪接过程中形成的剪接复合物称为剪接体, 剪接体的主要组成是蛋白质和小分子的核 RNA(snRNA)。复合物的沉降系数约为 50~60S, 它是在剪接过程的各个阶段随着 snRNA 的加入而形成的。也就是说在完整的 pre-mRNA 上形成的一个剪接中间体。

- 剪接体的装配同核糖体的装配相似。依靠 RNA-RNA、RNA-蛋白质、蛋白质-蛋白质等三方面的相互作用。可能比核糖体更复杂, 要涉及 snRNA 的碱基配对, 相互识别等。

附: 饶子和

中国科学院院士

清华大学教授, 结构生物学实验室主任

中科院生物物理所所长, 学术委员会主任

清华大学"蛋白质科学"教育部重点实验室任

室任

中国晶体学会常务理事兼生物大分子委员会主任

中国生物物理学会理事兼生物大分子委员会主任

**研究方向:** 与重大疾病或重要生理功能相关的蛋白质三维结构、功能以及蛋白质工程与创新药物的研究。

**科研领域:**

蛋白质、蛋白质复合体以及蛋白质复杂体系的三维结构与功能研究

蛋白质工程及药物设计

结构蛋白质组学与结构基因组学

**获奖情况:**

1999 年获“求是杰出青年学者奖”

2000 年获国家教育部“长江学者奖励计划”特聘教授

2003 年度“何梁何利基金科学与技术进步奖”

2004 年被评为国家重点基础研究发展计划(973 计划)先进个人

Email: [raozh@xtal.tsinghua.edu.cn](mailto:raozh@xtal.tsinghua.edu.cn)

所在实验室主页:

<http://www.xtal.tsinghua.edu.cn/>

**刘志杰**

男, 博士, 中科院生物物理研究所研究员, 博士生导师。

1995 年在中科院生物物理研究所获蛋白质晶体学博士学位。

1995 和 1997 年先后在美国匹兹堡大学和佐治亚大学完成博士后。

1997 年和 2002 年在佐治亚先后任助理研究员和副研究员, 美国东南区结构基因组研究中心 Crystallomics 实验室主任。提出并构建了美国东南区结构基因组研究中心的基因到结构的高效流水线, 测定了八十多种蛋白质及其复合物的晶体结构, 已在 Cell, Nat Struc Mole Biol, PNAS 等 SCI 收录的国外核心期刊发表论文 50 余篇。2005 年 10 月作为中国科学院海外杰出人才引进计划“百人计划”研究员引进回国工作。

目前主要从事四个方面的研究: 人体内与信号的转录调控和激活相关的蛋白质及多蛋白质复合物的结构与功能研究; 动物体内生物

发光蛋白的发光机理与应用的研究;与人类肝脏疾病相关的酶的结构与发病机理的研究;基于单波长反常散射的蛋白质晶体结构的相位求解方法研究。目前作为首席科学家主持科技部“863”重大项目”关于肝脏代谢及肝病相关蛋白质的三维结构研究”和国家基金委面上项目“基于 Coelentrazine 的生物发光蛋白的结构及发光机理的研究”。

杨洁

女, 1968 年 10 月出生

#### 学习和工作简历:

1986 年 9 月-1992 年 7 月中山医科大学临床医学系(英文班, 医学学士)

1992 年 9 月-1997 年 7 月中山医科大学生化教研室(医学博士)

1997 年 7 月-1998 年 12 月中山医科大学生化教研室(讲师)

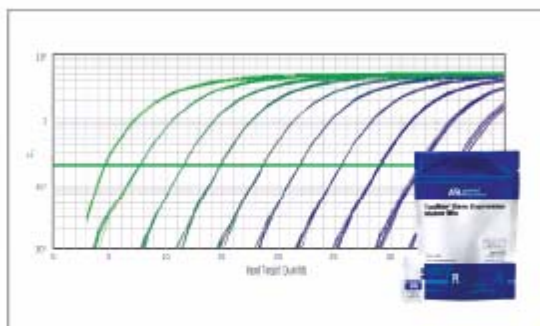
于 2004 年 9 月到天津医科大学访问和讲学。

完美表现  
创造每日成功

买二送一  
大促销

最新上市的两款优化 TaqMan Master Mix 试剂

活动日期: 2007.7.1-9.30

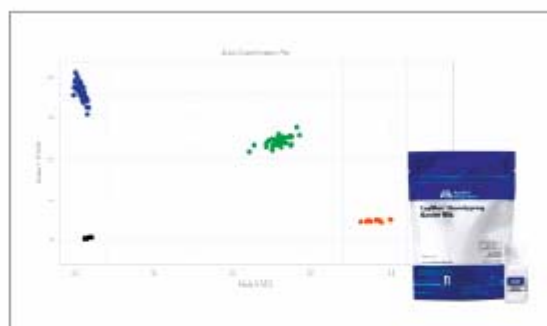


#### 基因表达通用混合试剂

TaqMan® Gene Expression Master Mix

提供准确及灵敏的定量品质

- 目标基因单拷贝的可靠检测
- 单次反应中的双重PCR对两个目标基因扩增
- 卓越的特异性以区分基因家族成员的差异



#### 基因分型通用混合试剂

TaqMan® Genotyping Master Mix

提供清晰及经济的识别效果

- 针对SNP和插入/缺失检测的配方
- 极好的簇集分辨率以获得明确的基因分型
- 基于高识别率的精确而可重复的结果

美国应用生物系统中国公司及办事处地址

Applied Biosystems

如需了解本次活动更多详情, 请咨询当地经销商或拨打我公司免费垂询电话:

上海/8008203939

北京/8008100192

广州/8008302001





# 黄禹锡造假干细胞来源查明 错失重大发现

生物通报道：2005 年，韩国首尔大学的黄禹锡教授因干细胞研究论文造假被揭发而从事业的巅峰跌至谷底。时隔两年，造假风波也早已经尘埃落定。但是，最近的一项追查黄禹锡当时所有的干细胞来源的研究却让人再次感叹其一时的疏忽导致与另外一项重大成果失之交臂。

由美国波士顿儿童医院和哈佛干细胞研究所研究人员公布在 8 月 2 日的《Cell Stem Cell》杂志网络版上的一项报告对韩国黄禹锡研究中所使用的来历不明的胚胎干细胞系有了新的发现。该发现矫正了干细胞研究历史记录，并且还确立一套急需的分享人类胚胎干细胞的标准。

2004 年，韩国黄禹锡研究组宣布利用体细胞核转移技术创造出世界上第一个人类胚胎干细胞，即将生物体中一个系统的遗传物质转移到卵细胞中。现在，由波士顿儿童医院的 Kitai Kim 等人进行的这项研究证实，黄禹锡小组无意间出与他们宣称的完全不同的新细胞——世界第一个由孤雌生殖产生出来的人类胚胎干细胞。孤雌生殖是指形成一个只含有来源于卵细胞的遗传物质的胚胎过程。也就是说，黄禹锡创造出的那个假的核转移衍生干细胞系实际上是一种单独由女性卵子衍生出的细胞。

黄禹锡 2004 年发表在《科学》杂志上的那篇文章因证实数据造假而在 2006 年宣布被撤回。对黄禹锡小组的首个胚胎干细胞系的最初调查显示，她可能起源于孤雌生殖，但无法下定论，因此这些细胞的起源问题在此前一直没有被完全解释清楚。

Kim 等人利用先进的遗传学技术比较了由不同来源衍生的小鼠胚胎干细胞。这些来源包括自然授精产生的胚胎、孤雌生殖产生的胚

胎（通过对未授精卵进行人工激活）何通过体细胞核转移创造出的胚胎。他们还检测了三种从授精胚胎分离到的人类胚胎干细胞以及韩国的这种人类细胞系。

他们发现，孤雌生殖的胚胎干细胞具有一种特殊的遗传标记，该标记能反映出它们的来源。通常，所有细胞都含有成对的，其中一条来自母亲，另外一条来自父亲。在孤雌生殖过程中，染色体对的两条染色体都来自一个亲本，即是所谓的纯合子。

Kim 何 Daley 之前证实，由于染色体常常在细胞分裂初期交换遗传物质进而形成卵细胞，因此被复制的染色体并不是完全等同的，而是有一些位置的基因在染色体对（杂合子）间是有差异的。孤雌生殖形成的胚胎干细胞中，染色体末端比中间部位更容易发生遗传物质的交换。相反，通过细胞核转移方法创造出的胚胎干细胞中，然他的所有区域的交换模式是一致的，因此使它们与孤雌生殖细胞有明显的区别。

他们的研究证实，韩国的细胞系表现出遗传模式明显与孤雌生殖起源的细胞相一致。研究人员推测，由于细胞核转移过程中出错导致了孤雌生殖细胞的产生，而黄禹锡研究组是因为意外而创造出了孤雌生殖干细胞，但是却没有工具来确定他们创造出的细胞到底是怎样的情况。首次获得人类的孤雌生殖干细胞将可能产生重大贡献，但是黄禹锡小组却试

图将这些细胞当作是由细胞核转移产生的细胞而最终使这些细胞只是成为误导的一个很糟糕的案例。（生物通雪花）

### 该不该给干细胞研究捐卵子？黄禹锡丑闻启示

自从韩国黄禹锡干细胞研究丑闻的爆发，有关妇女捐赠研究用的卵子的福利问题引起了公众的注意。在 2006 年 6 月 20 日的第 22 届欧洲人类生殖和胚胎学会年会上，一位生物伦理学家指出，找到平衡捐赠者福利和胚胎干细胞研究前景的一种方式是在干细胞研究进一步发展的关键。

来自比利时 Ghent 大学哲学和达到科学系的 Heidi Mertes 表示，这种特殊的关注包括有见识的认可、捐赠者的健康风险、分配的公正性和不适当的诱惑性捐赠。一些利益团体和管理者将这些关注看作是影响人类胚胎干细胞研究的另外一些原因，并且要要求妇女捐赠卵子用于研究只能是在可获得的利益大于风险的情况下才能接受。由于干细胞研究的不断深入，卵子的需求将会上升，因此这些问题矛盾需要尽快找到解决之道。

在研究中，Heidi 设定了平衡生物伦理原子的边界。捐赠者的风险应该通过彻底筛选候选者以确定出可能发生严重卵巢过敏综合症

的个体来尽可能的降低，例如年纪和体重的限制。排卵诱导药物的使用能够被限制，而且应该对捐赠者进行长期跟踪以评估任何副作用。

第三点，就是限制已经遭受过卵巢刺激和取出卵的 IVF（试管受精）患者捐赠研究用卵子。如果卵的离体成熟和卵冷冻成为了非常可靠的技术，那么利用这种技术将会获得较大量的卵子。Heidi 的最后一点建议是应该寻找替代的卵子源。例如死尸、流产妇女的胎儿、动物、外科手术切除的卵巢和从现有干细胞株产生的卵细胞。

此外，还有许多需要考虑和注意的伦理问题，例如是否需要向捐赠者付费。付费被认为有不适当的引诱、利用人类组织的倾向。但是，如果只是偿还捐赠者的时间和工作损失而不是根据取出的卵子数量，那么就能很大程度地避开了这个问题。

许多立法者都在积极联立干细胞研究和通过体细胞核转移技术获得人类胚胎干细胞的规则。韩国的干细胞克隆丑闻可能使他们禁止用于研究的卵母细胞的捐赠，转而支持间接的体细胞核转移。Heidi 相信证明妇女的福利和体细胞核转移之间不存在冲突是非常重要的。



### 德国美天旆生物技术公司

是一个以细胞分选技术为主、拥有多样化产品的生物技术公司。开发研制并销售世界上最先进的细胞分选、细胞生物学、相关分子生物学产品和技术，尤其在干细胞分选、DC细胞分选与分析、细胞因子分泌细胞分选与分析、免疫治疗、再生医学方面占有极大的优势，CD133、BDCA-2（CD303）、BDCA-4（CD304）单抗为我公司专利产品。

我公司总部位于德国科隆，在科隆和德国北部罗斯托克均有cGMP生产机构。我们的产品有免疫磁珠、特异性细胞及蛋白质或者DNA/RNA分选用的MACS分选设备、单克隆抗体、无菌溶液、基础和特殊培养基、血液/血浆治疗用的生物学吸附剂、LIFE18血浆分离机、流式细胞仪及相关耗材。



# 实时荧光定量 PCR 实验中试剂的节约

实时荧光定量 PCR 是一种高效但昂贵的实验，它的使用总是和高支出联系在一起。一套实时荧光定量 PCR 系统对于实验室来说是笔不小的开支。通常，人们不能意识到所有潜在的支出，比如实验中包含了很大一部分试剂的消耗，因而 PCR 反应时试剂用量的减少则可以显著地降低实验成本。

## 实时荧光定量 PCR 的试剂成本

PCR 试剂是实验支出中最主要的花费。这些由聚合酶、寡核苷酸和盐组成的混合物占据了总花费的 85%—95%。

一个标准的 50  $\mu$ l SYBR® Green 定量 PCR 实验大约需要花费 1.6 欧，而 TaqMan® 实验由于使用了昂贵的探针，成本达到了 2.00 欧。

大部分使用者都会采用 20  $\mu$ l 或 25  $\mu$ l 的反应体系以减少支出，但是通过继续减少反应体积，仍有潜在的可以节约的空间（表 1）。尽管利用 PCR 系统使用 20  $\mu$ l 或 25  $\mu$ l 的反应体系，并没有完全挖掘出潜在的节省空间，但是在此基础上进一步减少用量将变得非常困难，原因是试剂量的减少对移液精度的要求也更高了。

TaqMan 实验	50 $\mu$ l 反应体系	25 $\mu$ l 反应体系	10 $\mu$ l 反应体系
引物成本	0.75 美分	0.32 美分	0.15 美分
样品成本	0.20 欧	0.10 欧	0.04 欧
试剂成本	1.80 欧	0.90 欧	0.36 欧
总成本	2.0075 欧	1.0032 欧	0.4015 欧
SYBR Green 实验	50 $\mu$ l 反应体系	25 $\mu$ l 反应体系	10 $\mu$ l 反应体系
引物成本	0.75 美分	0.32 美分	0.15 美分
试剂成本	1.60 欧	0.80 欧	0.32 欧
总成本	1.6075 欧	0.8032 欧	0.3215 欧

表 1：不同 BR 反应体系下实验的平均成本

通量	每天实验量	每年实验支出 25 $\mu$ l 反应体系	每年实验支出 10 $\mu$ l 反应体系	每年节省费用
低	20	4,016 欧	1,608 欧	2,408 欧
中	96 (1 板)	19,076 欧	7,716 欧	11,360 欧
高	288 (3 板)	57,830 欧	23,148 欧	34,682 欧

表 2：SYBR Green 实时荧光定量 BR 实验中的平均支出（基于 250 个工作日 / 年）



对于两倍梯度稀释（即 Ct 值的差异为 1），其精确度往往需要通过自动移液系统实现，如 Eppendorf 的自动移液工作站 epMotion® 5070。

表 1: 不同 PCR 反应体系下实验的平均成本

表 2: SYBR Green 实时荧光定量 PCR 实验中的平均支出（基于 250 个工作日/年）

#### 自动移液系统首先试剂的节约

epMotion® 5070 自动移液工作站，精心的设计可以同时完成 96 个样品的操作，为绝大多数实验室提供了完美的解决方案。

标准化的操作过程减少了移液过程中的误差。10 µl 反应体系的移液可以在非常高的精度下完成而无需依赖于操作者的经验和技巧。

因此，根据使用频率的不同，使用 epMotion，每年可以节省 2,400 欧至 34,000 欧的支出（表 2）。这种节约可应用于所有实时荧光定量 PCR 的实验。价格适中的 epMotion 节省下来的试剂的费用可以迅速抵消购买成本。

定量 PCR 反应时间的加速

利用较小的反应体系进行实时荧光定量 PCR 不仅减少了实验支出，而且加快了反应

速度。当与快速而精确的实时荧光定量 PCR 系统，如 Eppendorf 的 Mastercycler® ep realplex 配套使用时，设定 10 µl 的反应体系可以使两步法的定量 PCR 反应时间降为 24 分钟。同时，重复样本的标准偏差分析显示，实验的重复性和精确性都大大提高了。

除了节约成本，使用自动移液工作站还有更多好处，例如：

- 减少手工操作带来的移液误差，从而获得更为可靠的分析数据
- 实验具高度重复性，即使使用者不相同
- 有更多的时间来完成其他任务，如对实验结果的评估

因为自动化的操作，使用者可以腾出更多的时间来专注于其

他方面，从而有了更多的个人空间。

**epMotion 自动移液工作站是理想的液体操作系统，适合于各种日常的不同要求的移液操作：**

- 样品从试管到多孔板的转移
- 梯度稀释
- ELISA 和以细胞为基础的实验制备
- 96 和 384 孔板的液体分装、转板、拼板等
- 高通量核酸抽提与纯化

作者: HOLGER EGGERT, EPPENDORF AG

蛋白质组学畅销产品特惠活动

同一产品 · 同一包装规格 · 买2送1



#### 罗氏产品“买二送一”特惠活动

#### 罗氏应用科学部

#### 蛋白质组学畅销产品特惠活动

- **活动时间：2007年7月1日至8月15日**
- **订购专线：021-2412 1188 罗氏应用科学部（只接受传真订单）**
- **咨询热线：021-2412 1000 转 罗氏应用科学部**





# 用 GST MultiTrap FF 96 孔滤板 筛选纯化 GST 标记蛋白的最佳缓冲液

GST MultiTrap™ FF 是一种预先包被好的 96 孔滤板，用于可重复、高通量筛选与快速纯化谷胱甘肽-S 转移酶 (GST) 标记蛋白质。本文描述了用新型 GST MultiTrap FF96 孔滤板筛选从未澄清的大肠杆菌 BL21 裂解液中纯化 GST-hippocalcin (海马钙蛋白) 所需最佳结合缓冲液的实验方法。

## 方法

用 MODDE 软件 (Umetrics) 设计筛选缓冲液研究方案，以确定从未澄清的大肠杆菌 BL21 裂解液中纯化 GST-hippocalcin 所需的最佳结合缓冲液。多种随机试验的缓冲物质变化范围:10-20 mM 磷酸钠;50-100 mM Tris-HCl; pH 6.2-8.0; 140-400 mM NaCl; 0-5 mM DTT; 0-5%甘油和 0-2 mM 谷胱甘肽。同时，对超声和市场上细胞裂解试剂盒 CelLytic™ Express (Sigma-Aldrich) 裂解大肠杆菌的效果也进行了比较。表 1 详细总结了所用缓冲液及裂解方法。32 种不同的结合缓冲液随机加到滤板上，每种结合缓冲液做三个平行样。先将 GST-hippocalcin 结合到滤板孔内，然后洗涤两次，最后用 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM 还原型谷胱甘肽洗脱进行蛋白纯化。

## 结果

样品和结合缓冲液中还原型谷胱甘肽能显著降低纯化 GST-hippocalcin 的产量 (表 1, 图 1 泳道 5, 7, 10)。pH 值降低 (pH 6.2) 时，可见纯化 GST-hippocalcin 的产量提高。实验发现，不同缓冲液和添加剂 (如 DTT, 甘油, 氯化钠) 对纯化结果影响不显著。

10-20 mM 磷酸钠, 140-400 mM 氯化钠, pH 6.2-7.4 的结合缓冲液纯化效果最佳，得到 GST-hippocalcin 的产量与纯度最高 (表 1)。此外，超声或细胞裂解试剂盒都可用于裂

解大肠杆菌，两种方法对纯化结果无明显差异。SDS-PAGE 图谱显示，用 GST MultiTrap FF 纯化 GST-hippocalcin 时，不同的缓冲液条件对纯化 GST-hippocalcin 的纯度没有显著影响。表 1 列出的不同缓冲液对 GST-hippocalcin 的纯化产量的影响得到 SDS-PAGE 图谱 (图 1) 的证实。

## 结论

研究结果表明，使用一种最佳的结合缓冲液对纯化 GST 标记蛋白很重要。GST MultiTrap FF 96 孔滤板为确定最佳缓冲液条件提供了一个简便、快速的筛选工具。

## 96 孔滤板: GST MultiTrap FF

样品: 含有 GST- 海马钙蛋白 (分子量 45,000) 的未澄清大肠杆菌 BL21 裂解液

纯化程序: 执行 GST MultiTrap 说明书, 28-4070-75

样品制备: 比较 CelLytic Express 试剂盒和超声裂解法。两种方法均按

照标准规程进行操作

样品体积: 500 ml

洗脱体积: 3 × 200 ml

结合缓冲液: 多种缓冲物质随机试验: 10-20 mM 磷酸钠; 50-100 mM

Tris-HCl; pH 6.2-8.0; 140-400 mM NaCl;

0-5 mM DTT;

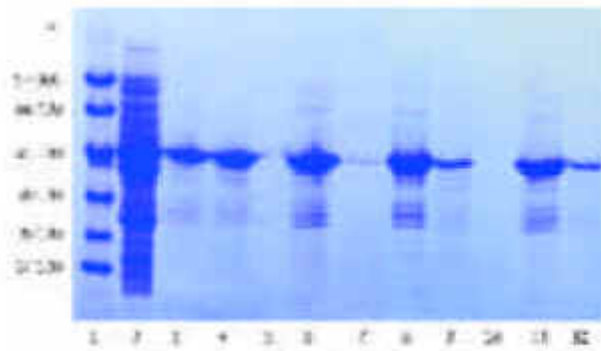
0-5%甘油, 和 0-2 mM 谷胱甘肽

洗脱缓冲液: 50 mM Tris-HCl, 10 mM 还原

型谷胱甘肽, pH 8.0

洗脱方法: 离心

数据评估: MODDE 软件, 紫外分光光度计 (A280), SDS-PAGE



第1道: 低分子量 Marker; 第2道: 初始样品;  
第3-12道: 说明见表1。

图1. 用 SDS-PAGE (还原条件, 浓度 8-18% 的 ExcelGel™ SDS 梯度胶; Coomassie™ 染色) 对从 GST MultiTrap FF 滤板孔中洗脱的 GST hippocalcin 收集组分进行分析。其它关于产量和纯度的细节见表1。

表1. 应用不同结合缓冲液 (包括样品液和洗液) 在 GST MultiTrap FF 96 孔板上纯化 GST-hippocalcin 进行筛选实验的部分结果

结合缓冲液	裂解方法	产量 (μg)	纯度 (%)	SDS-PAGE 图谱泳道 (图1)
10 mM PBS, 140 mM NaCl, pH 7.4	超声	181	95	3
10 mM PBS, 140 mM NaCl, pH 7.4	CellLytic Express	191	94	4
10 mM PBS, 400 mM NaCl, 2 mM 谷胱甘肽, 5% 甘油, pH 8	CellLytic Express	10	95	5
20 mM PBS, 400 mM NaCl, 5% 甘油, pH 6.2	超声	328	87	6
20 mM PBS, 400 mM NaCl, 2 mM 谷胱甘肽, pH 8	超声	18	92	7
50 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 5% 甘油, pH 6.2	超声	269	87	8
50 mM Tris-HCl, pH 8	超声	54	83	9
50 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 2 mM 谷胱甘肽, 5 mM DTT, 5% 甘油, pH 8	超声	-	-	10
100 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 6.2	超声	243	77	11

illustra

GE Healthcare

新产品大优惠

还有免费礼品和试用装!

2007年5月14日至7月13日



奥运纪念杯



WORLDWIDE PARTNER

## 全新的核酸制备技术

为您带来前所未有快速高质量的 DNA/RNA 提取和扩增效果

凡买满 USD 300, 送奥运会纪念不锈钢保温杯一个



GE Healthcare

illustra 全新的核酸制备技术

前所未有快速高质量的 DNA/RNA 提取和扩增效果



WORLDWIDE PARTNER

网址: [www.gelifesciences.com.cn](http://www.gelifesciences.com.cn) 电邮: [lifesciences@ge.com](mailto:lifesciences@ge.com)

详情请与通用电气(中国)医疗集团各办事处联系: 免费咨询热线: 800-810-9118