

EBIOTECH

生物通技术周刊

第44期

2008年10月23日

〔技术前沿〕

生物通2008技术点评：慢病毒载体
高涵量筛选新技术：激光扫描微孔板细胞分析技术
三聚氰胺检测方法汇总

〔新品速递〕

Invitrogen推出Countess自动细胞计数仪
层析柱中的新概念——来自GE的Axichrom
Bio-Rad最新推出两款快速的定量PCR反应液
454新一代测序仪升级 性能全面提升

〔应用指南〕

Affymetrix的基因表达谱有助预测化疗效果
利用多波长微孔板细胞分析仪进行高通量高涵量筛选
利用多重激光微孔板细胞分析仪进行细胞增殖及细胞周期分析
超微量SNP基因分型：用mosquito进行PCR制备

〔行业动态〕

小瓶子也有大学问 GIBCO换新装
GE Healthcare收购MicroCal，拓宽了生物医学和制药研究的能力
赛默飞世尔科技参加科技部组织的生鲜奶中的三聚氰胺快速检测测试

生物通 2008 技术点评：慢病毒载体

近几年来，慢病毒载体因其独特的优势，逐渐成为表达载体中的大热。慢病毒载体与其他表达载体相比，最大的优势是它们能感染分裂和非分裂的细胞。这对于众多干细胞和难转染细胞的研究者而言，可谓是一根及时的救命稻草，能解决令人头疼的转染效率低的问题。

慢病毒（lentivirus）是反转录病毒的一种，需要相对较长的孵育时间，所以称之为“慢”病毒，lenti 在拉丁文中就是慢的意思。它包括 HIV、FIV（猫免疫缺陷病毒）和其他病毒。

先来谈谈反转录病毒吧。反转录病毒是一类正链 RNA 病毒，分为顺式功能基因和反式功能基因。由于反转录病毒包膜上有 env 编码的糖蛋白，能被许多哺乳动物细胞膜上特异性受体所识别，并能介导反转录病毒的遗传物质高效进入宿主细胞内；并且病毒在自身表达的整合酶催化作用下可高效地整合进宿主细胞染色体中，这有利于外源基因在宿主细胞的永久表达；成熟的病毒颗粒以芽生的方式进入细胞培养液上清液中，易于和宿主细胞分离。但传统的反转录病毒载体没有组织特异性，只能感染处于分裂期的细胞，而且滴度低，并可能产生具有复制能力的反转录病毒，因此不能作为理想的表达载体。

慢病毒病毒源于反转录病毒，但又有所不同。市场上的慢病毒是由人类免疫缺陷病毒（HIV），通过去除 env、vif、vpr、vpu、nef 等毒性基因改造而来。复制缺陷型 HIV 载体通常用水泡口炎病毒（vesicular stomatitis virus）G 糖蛋白（VSV-G）来代替 HIV-1 的包膜进行包装，从而更安全，宿主范围更广，还能增加病毒的滴度。慢病毒载体可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上，从而实现持久性表达。在感

染能力方面可有效地感染神经元细胞、肝细胞、心肌细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、干细胞等多种类型的细胞，又很少引发机体的免疫反应，能达到良好的基因治疗效果，具有广阔的应用前景。如果你的实验需要长期基因表达或沉默，而目的细胞又很难转染，那慢病毒可以说是非常理想的选择。野生型的 HIV 大小约为 9.8 kb，故插入片段一般在 4-5 kb 左右，这对于大部分的实验来说应该够用了。

慢病毒载体的发展经历了 3 个阶段：第一代慢病毒载体系统是以三质粒系统为代表。在构建时把 HIV-1 基因组中进行包装、逆转录和整合所需的顺式作用元件与编码反式作用蛋白的序列分离，分别构建在三个独立的质粒表达系统上，即包装质粒(一个强启动子如 CMV 作用下，控制除 env 以外所有病毒结构基因的表达)、包膜质粒(VSV-G 基因)和载体质粒(目的基因)，用这三种质粒共同转染包装细胞如人胚肾 293T 细胞，在细胞上清中即可收获只有一次感染能力、而无复制能力的慢病毒颗粒。第一代慢病毒载体系统的特点是在构建三种包装质粒时，为了降低产生有复制能力的病毒的可能性，尽可能减少三种质粒之间的同源序列，但包装质粒中仍然保留了 HIV 的附属基因。第二代慢病毒载体系统是在第一代基础的改进，在包装质粒中删去了 HIV 的所有附属基因。这些附属基因的去除并不影响病毒的滴度和转染能力，同时增加了载体的安全

性。第三代慢病毒载体系统又增加了两个安全特性：一是构建了自身失活的慢病毒载体，即删除了 U3 区的 3'LTR，使载体失去 HIV-1 增强子及启动子序列，即使存在所有的病毒蛋白也不能转录出 RNA；二是去除了 tat 基因，代之以异源启动子序列，这样原始的 HIV 基因组中的 9 个基因在慢病毒载体中只保留了 3 个(gag、pol 和 rev)。因此第三代慢病毒载体系统更加安全。

安全性始终是大家最关心的问题，毕竟是 HIV 改造过来的，不容许有一点闪失。国内的实验室很多都达不到 P2 的级别，甚至是一堆人挤在一个房间里做各种各样的实验。无论是为人为己考虑，慢病毒的安全性都应该特别关注。Clontech 公司也是主张“安全第一”。它家的 Lenti-X 系统对广泛应用的第三代慢病毒做了改进，将 pol 基因与 gag 基因分离，这意味着要产生原始的病毒，还需要更多的重组步骤。完整的系统包含 5 个载体，安全性更高。

慢病毒表达的一般流程如下：将目的基因片段克隆到表达载体上；将重组表达载体，与包装混合物（packaging mix，通常是几个质粒的混合）共转染 293 细胞；收集病毒上清，测定滴度；感染目的细胞，瞬时表达目的蛋白或用抗生素筛选稳定细胞株；分析目的蛋白。看上去并不复杂，但中间许多步骤需要不断优化。而且慢病毒有一个软肋，就是病毒滴度不高。你可能还需要纯化或浓缩，才能得到 108 TU/ml 的慢病毒。当然，各厂家也注意到了这个问题，不断改造慢病毒载体，使其滴度增加。具体的改造在下文中会一一介绍。

市场上最为成熟的慢病毒表达载体主要来自两大表达巨头——Invitrogen 和 Clontech。Invitrogen 就有十余种之多，而且名字都差不多，乍一看真是有点头晕。不过主要分为两大类，也

就是第三代和第四代。所有的慢病毒表达载体都是 pLenti 命名，后面加上数字 4、6、7，这些数字代表的是不同的筛选标记，4 意味着用 Zeocin 筛选，6 则是用 Blasticidin 筛选，7 是带 EmGFP 的。很多系统都有两个版本，其实只是克隆方式的区别，一部分是采用 Gateway 同源重组的方式进行克隆的，另一部分则采用简便的 5 分钟 TOPO 克隆。

ViraPower Lentiviral Expression System 是最早的慢病毒表达系统，价格在 17000 元左右（20 次）。系统中共涉及 4 个质粒：插入目的基因的 pLenti 表达载体，上面提供了 ψ 包装信号以及截短的 HIV 3' 及 5' LTR，便于病毒包装；pLP1 质粒表达形成慢病毒结构所必需的 gag 基因以及病毒复制和整合必需的 pol 基因；pLP2 质粒表达 Rev 蛋白，它能与 pLP1 上的反应元件（RRE）共同作用诱导 Gag 和 Pol 表达，并指导病毒 RNA 的核运输；pLP/VSVG 表达水泡口炎病毒 G 糖蛋白（VSV-G），让宿主范围更广。这 4 个质粒必须共同作用，才能产生有感染能力的病毒粒子，缺一不可。

最新推出的 **ViraPower HiPerform Lentiviral Expression System** 则是上述系统的升级版，从名字也可以猜个大概，HiPerform 也就意味着 High Performance 嘛。它与上一个版本最主要的不同是表达载体上增加了两个新元件——WPRE 和 cPPT。WPRE 来自土拨鼠肝炎病毒，放置在目的基因的上游，能加强转基因的表达。cPPT 来自 HIV-1 整合酶基因，能增加慢病毒在宿主基因组的拷贝数，从而使病毒滴度增加两倍。这两个元件共同作用，能使大多数细胞中的蛋白表达量至少增加 4 倍。其中有两个 kit 还称为 FastTiter，因为它的载体含有 EmGFP，能用流式细胞仪快速测定滴度。升级版的价格当然也会升级，估计在 2 万元以上。

另外，还有一些特别的载体。比如说不带启动子的，可以让你检测某个启动子的活性；还有四环素诱导型的，能严格控制表达的时间。**Invitrogen** 的慢病毒表达载体大抵就是这些，下面就是 **Clontech** 闪亮登场。

Clontech 的 **Lenti-X** 慢病毒表达载体与 **Invitrogen** 第四代的表达载体极为相似，有 ψ 包装信号和 **LTR**，也有 **WPRE** 和 **cPPT** 两个元件。除了克隆方式（**Clontech** 是采用酶切连接克隆）和筛选标记（**Clontech** 用嘌呤霉素筛选）之外，这两家的载体几乎没什么区别，可能都是看了相同的文献受的启发吧。不过 **packaging mix** 就有一些区别了。**Lenti-X HT** 包装系统利用了反式激活级联反应来高水平表达病毒蛋白，因此病毒滴度更高。**HT** 即 **high Titers** 的缩写。一般来说，慢病毒表达的滴度约为 105-106 **TU/ml**，而 **Clontech** 的滴度达到 108 **TU/ml**。这就意味着你不必浓缩和纯化，就能直接感染细胞。不过需要特别注意的是，胎牛血清中常常含有四环素及其衍生物，会干扰反式激活反应，因此要特别订购不含四环素的 **FBS**。

Lenti-X 系列还包含了荧光表达载体。你的目的蛋白可以在 **N** 端或 **C** 端融合 **AcGFP1**（绿色）或 **DsRed**（红色）荧光蛋白，这样就很容易观察到蛋白的表达和转运。四环素诱导表达本来就是 **Clontech** 的强项，**Lenti-X** 系列当然也有可诱导表达的版本。

慢病毒载体还在 **RNA** 干扰研究中发挥着巨大的潜能。慢病毒载体 **Sigma**、**Dharmacon**、**Invitrogen**、**Clontech** 公司都有，各有特色。**Sigma** 公司的 **Mission TRC shRNA** 慢病毒提供的是已经设计好、克隆并测序验证过、包装好的病毒颗粒，保证滴度达到 106 **TU/ml**，实际滴度常大于 107 **TU/ml**。买回来即可马上用于转导

难对付的细胞，可谓超级方便。**Mission TRC shRNA** 库是由麻省理工和哈佛等 11 个著名研究所及制药公司组成的 **RNAi** 联盟（**The RNAi Consortium, TRC**）的科学家共同研发的，其中包括靶向人类 15000 个基因对应的 75000 个 **shRNA** 克隆，以及小鼠 15000 个基因对应的 75000 个克隆。

Mission 慢病毒颗粒属于第三代，除了 **shRNA** 转移载体外，**Packaging Mix** 中还含有两个质粒：包装载体提供必要的慢病毒基因，来形成病毒粒子的结构蛋白和包装功能；**pCMV-VSV-G** 载体提供了包膜蛋白，让宿主范围更广。**shRNA** 转移载体不仅表达 **shRNA**，还提供了包装信号和顺式作用元件。它以 **U6** 为启动子，用 **G418** 进行筛选，或通过 **GFP** 发出的绿光来挑选。如果你的研究对象是人或小鼠的基因，**Mission** 是再合适不过了。

Dharmacon 现在与慢病毒载体的专业公司 **Lentigen** 合作，强强联手提供全方位的服务。你只需要提供基因的 **ID**，**Dharmacon** 就会帮你设计出 **shRNA**，再由 **Lentigen** 合成，克隆到载体上并测序，转染包装细胞，收集、纯化并浓缩。送达到你手上的就是滴度高于 108 **ifu/ml** 的病毒粒子，直接拿去感染细胞就 **OK** 了。不过具体实验前也需要摸索条件，包括感染复数（**MOI**）、细胞密度等。

如果你对自己的实验技术很有信心，也不妨自己制备病毒粒子。**Clontech** 的 **Lenti-X shRNA** 表达系统和上面的蛋白表达系统类似，不过启动子换成了 **U6**。高效的 **Lenti-X HT** 包装系统对 **shRNA** 研究来说尤其有用。慢病毒的高转导效率，加上高的滴度，对基因沉默研究有着明显的优势。你原本想干扰每个细胞中的基因，但如果你只转导了 50% 的细胞，那就算你的 **shRNA** 非

常棒，你的干扰效果也肯定不会好。这对非分裂细胞尤其重要，因为你本来就没有太多的克隆可供选择。

Invitrogen 的 miRNA 干扰载体与以上都不同，它是模拟体内 microRNA 的加工和干扰过程，所以载体上的启动子也与 shRNA 不同，用的是 CMV，而不是 U6 或 H1。CMV 启动子的活性比 U6、H1 这些可强多了，因此干扰 RNA 的表达量更高，干扰效率自然也就更胜一筹。如果你不喜欢 CMV，想换成组织特异的启动子，也没问题，可以用同源重组的方法将其替换。而且这个载体还有个特别的地方，就是它将几个干扰 RNA 串联起来，同时干扰 2-3 个基因。这样

工作量可就大大减轻了。另外，这个载体现在也升级到第四代，病毒滴度更高。由于是新产品，中国的价格还暂未查到，不过估计在 3 万元左右，好货不便宜啊。

尽管人们对基于 HIV-1 的慢病毒载体已经做了种种安全性结构改造，要产生有复制力的 HIV，必须在不同的质粒上发生多次非同源重组事件。即便如此，基于 AIDS 的病源学基础仍然不能打消人们对于 HIV 的顾虑。这也意味着慢病毒载体要应用于临床，还有很长的路要走。

(生物通 余亮)

逆转录酶“快”乐体验



QuantiTect Reverse Transcription Kit

- 全程只需 20min
- 带有 Oligo-dT 和随机引物
- 双重逆转录酶混合物，cDNA 产量高
- 5' 端的片段也可以得到高效逆转录
- 独特 buffer，2 分钟去除 gDNA 污染

加量
20%

凡订购 QuantiTect RT kit, 即加送 20% 试剂

精品
推荐奖

如果您还向朋友推荐了此 kit, 每成功推荐一次,
您可获得“精品推荐奖”一份

货号	205311	205313
目录价	¥2,690	¥9,160

备注:

1. 活动有效期: 2008 年 9 月 1 日 -11 月 30 日, 依据下订单的时间为准。“每成功推荐一次”是指您订购了而且您的朋友也订购了 QuantiTect RT kit, 数量、包装不限。
2. 奖品为价值 100 元的 U 盘、哈根达斯冰淇淋券、电影券 (限上海客户)、上海书城购书券 (限上海客户), 任选其中的一份。
3. 奖品领取方式: 须填写下面的《精品推荐奖领取表格》, 经 QIAGEN 核实有效后于活动结束时统一寄送奖品。
4. 凯杰生物技术 (上海) 有限公司保留此次活动最终解释权。

备注: 打 *** 号的为必填项目。填写完整后将以上两个表格以 email 或传真的方式发送至 QIAGEN, 或者直接在生物通网站上填写。
E-mail 发送至: Cindy.Cao@qiagen.com; 传真: 021-38653965。凯杰生物技术 (上海) 有限公司保留此次活动最终解释权。

高涵量筛选新技术：激光扫描微孔板细胞分析技术

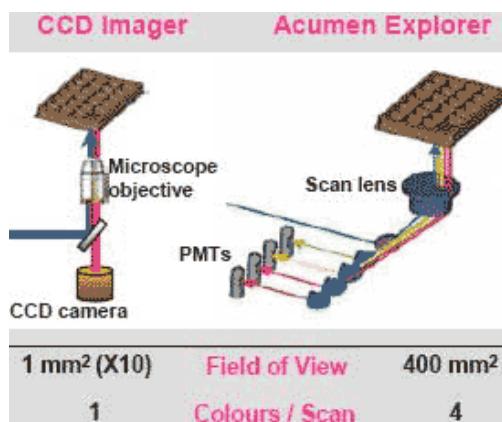
一、摘要

传统的高涵量筛选(High Content Analysis, HCA)方法主要采用诸如流式细胞术 (flow cytometry, FCM)，显微镜成像系统(microscope-based imaging system)等技术。激光扫描微孔板细胞技术 (Laser Scanning Microplate Cytometry) 相比这些方法有更多的优胜之处，而且更加适合于高涵量筛选(HCS)用途。其优点包括：

- 分析多孔板的整个孔内区域
- 可对包括贴壁细胞系和非贴壁细胞系进行活细胞分析
- 快速读取和分析微孔板数据
- 运用阈值计算法则 (thresholding algorithms) 降低文件大小

在这篇文章中，我们举例说明荧光微孔板细胞分析技术的作用，以及利用 Acumen Explorer 进行高涵量筛选的优点。

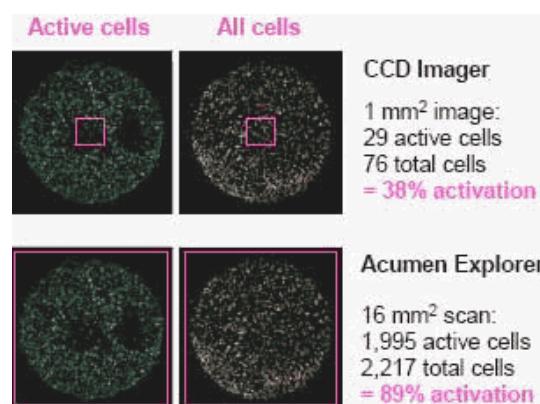
二、与 CCD 成像仪的光学比较 (CCD Imager)



Acumen Explorer 采用扫描透镜 (scan lens)，而非通过显微镜物镜进行 CCD 成像，因而能快速进行多孔板孔内的全孔分析，其光电

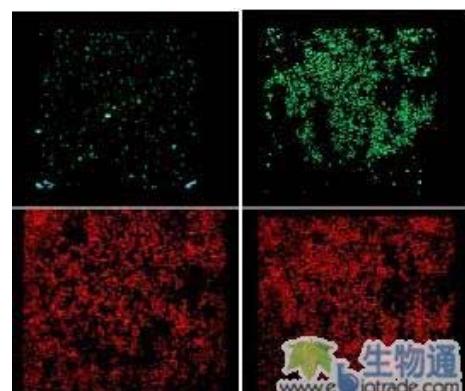
倍增管检测器 (PMT) 可同时收集多达 4 种荧光染料的信号。

三、Acumen Explorer 对比 CCD 成像系统



全孔分析使得分析结果的标准化提升为针对全孔细胞总数进行标准化，而非仅限于某个局部，克服由于各种可变因素以及细胞随机分布造成的问题。

四、细胞成像应用：蛋白激酶活化分析



ERK 激活：对照孔（左边）和实验孔（右边）比较

上面两张图是利用 FITC 荧光染料只显示（ERK 激酶）活性细胞，而下面 2 张图是 PI 染色显示全部细胞数。

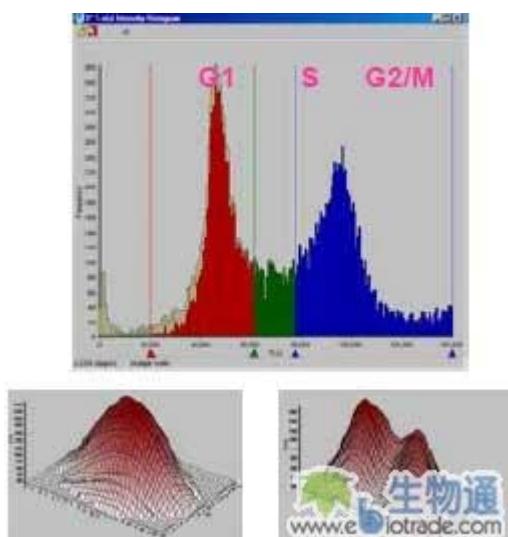
CCD 成像仪：

- 通量：2 小时/板
- 微孔内局部成像
- 文件大小/板：1.7Gb

Acumen Explorer

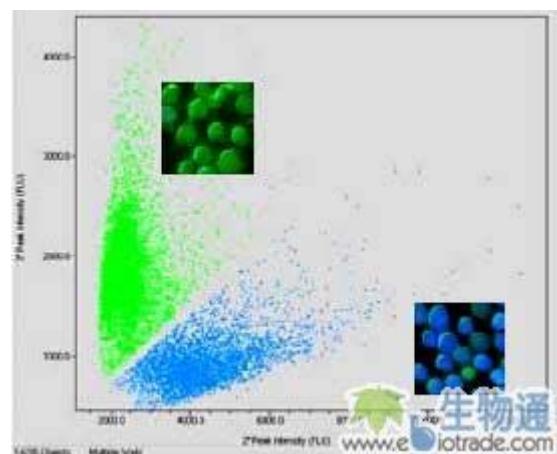
- 通量：9 分钟/板
- 全孔扫描
- 文件大小/板：44Kb
- 96 和 384 孔板已经验证

五、流式细胞术中的应用：细胞周期分析



- 扫描时间：13 分钟/板
- 可以进行贴壁细胞和非贴壁细胞分析
- 形态学读数结果可用于多重分析

六、荧光发光(Bulk Fluorescence)应用：
GeneBLAzer: β -内酰胺酶(β -Lactamase)技术



阴性细胞和阳性细胞的比率分布，基于每个细胞进行标准化而得到高通量读数结果

- 常规可检测酶活性提高 30-50 倍
- $Z' > 0.8$ (Acumen Explorer 405)
- 高通量：6 分钟/板
- 大大减少细胞培养量：减小 100 倍/孔

总结：

- 快速读板时间 (3-13 分钟)
- 多重分析，一次读数可进行四道荧光检测分析
- 可同时扫描 96 孔，384 孔和 1536 孔平板
- 全孔分析
- 文件所占空间小：筛查模式结果小至 kb 级
- 达到真正的高通量筛选

(TTP 供稿 生物通翻译)

三聚氰胺检测方法汇总

一、液相色谱——串联质谱法测定三聚氰胺



美国国家食品安全与技术中心建立了测定食品中的三聚氰胺的新方法

TSQ Quantum 系统在三聚氰胺的分析上得到了应得的认可。我们可以很容易的在含有 10ppb 三聚氰胺的鲶鱼的分析中，获得超过 3800 的信噪比。>>[查看全文](#)

二、ELISA 方法检测三聚氰胺



目前发生的多起三聚氰胺 (melamine) 掺假的事件，迫切需要快速，有效的检测方法监测乳制品

中的三聚氰胺。传统的ELISA方法为检测三聚氰胺 (melamine) 提供了快速，高通量，准确，有效的方法，尤其是生鲜奶的检测。通过采用 Thermo Scientific的Multiskan MK3 型酶标仪和 Wellwash 4MK2 型洗板机，结合Abraxis三聚氰胺ELISA检测试剂盒（由北京测迪科技有限公司提供），以竞争法测抗原的原理对液态奶或奶粉中的三聚氰胺进行检测分析，三聚氰胺的最低检测灵敏度可达 0.2ppm, 80-90 分钟之内可以同时检测 90 个样品。>>[查看全文](#)

Thermo Scientific的Multiskan MK3 型酶标仪和Wellwash 4MK2 型洗板机同时适应于美国 FDA推荐的几种商品化三聚氰胺ELISA检测试剂盒如Abraxis 公司，Beacon, Romer公司；也适合与国产的商品化的三聚氰胺ELISA试剂盒,为酶标法进行三聚氰胺的快速，准确及高通量的检测提供有力的保障，目前也有蒙牛，伊利，雀巢，光明等国内知名乳制品企业选择Thermo

Scientific的Multiskan MK3 型酶标仪。>>[查看全文](#)

三、TurboFlow 在线样品前处理和 TSQ Quantum LC/MS/MS 测定乳制品中的三聚氰胺

2007 年美国国家食品安全与技术中心借助 Thermo Scientific TSQ Quantum UltraTM 三重四极杆液相色谱串联质谱仪，建立了一个新的液相色谱串联质谱方法测定食品中的三聚氰胺。今天，Thermo Fisher Scientific 将独有的在线样品前处理技术TurboFlow 色谱净化和TSQ Quantum LC/MS/MS 分析结合，使分析流程得到大大简化和操作自动化。TurboFlow 是一种可以除去复杂样品中蛋白质等大分子成份的在线样品净化方法，因而不需要传统的蛋白沉淀、液液萃取和SPE 等步骤，有效缩短了样品预处理的时间，因此大大提高了分析速度，同时提高了数据的可靠性，检出限低至 10ppb，而且降低了分析成本。在针对建立快速检测方法以应付全国食品安全的突发性事件具有实用意义。另外，在方法中还用了QED MS/MS 功能进行全谱扫描后再作谱库检索，该数据是在同一次进样中得到的，提供了额外的确证信息。>>[查看全文](#)

四、高效液相色谱—电喷雾串联质谱联用测定植物源性蛋白中三聚氰胺残留

本研究报导了高效液相色谱—电喷雾串联质谱联用 (HPLC/MS/MS) 测定植物源性蛋白中三聚氰胺残留的方法。三氯乙酸溶液沉淀样品中的蛋白，同时提取目标分析物，强阳离子固相萃取柱进一步富集净化后，利用电喷雾串联质谱进行检测。检测低限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，添加回收率 84 ~ 98% 之间 (基质匹配曲线校正)，相对标准偏差 (RSD) 在 1.8 % ~ 7.4 %。[>>查看全文](#)

五、LC-MS/MS 检测食品基质中三聚氰胺和三聚氰酸

2007 年 3 月，北美几个宠物食品生产厂家自发的在全国发起产品回收的公告，这一举动源于报道其产品中有一些会引起宠物肾衰竭的物质成分，用于生产宠物食品的源材料是从中国进口的小麦麸，已经被认定是污染的源头。虽然，早期报道表明这种污染物在宠物食品中是被禁用的。但是，进一步调查研究发现污染有三聚氰胺的饲料已经被用于人所食用的动物喂养。特别是，它已经存在于鸡、猪、鲶鱼的饲料中。因此，美国 FDA 和 USDA 开发了动物器官中三聚氰胺残留检

测方法——强离子交换固相萃取的液相色谱—串联质谱检测。[>>查看全文](#)

六、Determination of Melamine Residues in Catfish Tissue by Triple Quadrupole LC-MS-MS with HILIC Chromatography

The Laboratory Information Bulletin is a communication from the Division of Field Science, Office of Regulatory Affairs, U.S. Food and Drug Administration for the rapid dissemination of laboratory methods (or scientific regulatory information) which appear to solve a problem or improve an existing problem. In many cases, however, the report may not represent completed analytical work. The reader must assure, by appropriate validation procedures, that the reported methods or techniques are reliable and accurate for use as a regulatory method. Reference to any commercial materials, equipment, or process does not, in any way, constitute approval, endorsement, or recommendation by the U.S. Food and Drug Administration.[>>查看全文](#)

Invitrogen 推出 Countess 自动细胞计数仪

Invitrogen 公司的小型台式仪器又添新成员。Invitrogen 公司宣布将于 10 月 15 日推出 Countess 自动细胞计数仪，它能够取代传统的血球计数器，提供自动化细胞计数的新方法。

Invitrogen 细胞分析业务部总经理兼副总裁 August Sick 表示：“Countess 将单调且主观的计数过程自动化，带来了准确、可重复的结果，让科学家们将精力更集中在结果而不是过程上。”

目前，研究人员通常用带有网格的玻片，逐个数出每个格子中的细胞数，并通过稀释因子计算出细胞的总数。Countess 使这个过程自动化，在 30 秒内就能完成全部计数和计算。

Countess 细胞计数仪能够：

- ◆ 对活细胞及死细胞进行计数
- ◆ 计算细胞的存活率
- ◆ 测量细胞的平均大小
- ◆ 计算下游应用的稀释倍数
- ◆ 只需要 10 μ l 的样品

更多有关Countess的信息，请看：[Countess 自动细胞计数仪详解](#)。

Invitrogen 的小型仪器还包括定量 DNA、

RNA 和蛋白样品的 Qubit 定量仪器；抽提 DNA 和 RNA 的 iPrep 纯化仪器和 iBlot 蛋白转印仪。

关于 Invitrogen

Invitrogen 公司竭诚为全球的科研和政府研究机构、药厂和生物公司提供产品和服务，旨在改善人类的现状。该公司提供了用于疾病研究、药物开发和商业生产的必要生命科学技术。

Invitrogen 自身的研发力量主要集中于在生命探索的各个领域包括功能基因组学、蛋白质组学、干细胞、细胞治疗和细胞生物学中开拓创新，使 Invitrogen 的产品能够遍布全世界的所有实验室。Invitrogen 成立于 1987 年，总部设在加州的 Carlsbad，在 70 多个国家设有办事处。该公司拥有约 4700 名科学家和其他专业人员，2007 年收入约 13 亿美金。更多信息请访问

www.invitrogen.com。

(生物通 余亮)

层析柱中的新概念——来自 GE 的 AxiChrom

通用电气医疗集团近日推出低压层析中的新概念——AxiChrom 层析柱。通过智能填充、直观操作和可预测的放大，AxiChrom 使层析过程更轻松、安全，同时也更高效。AxiChrom 柱采用创新的摆动柱管设计，让维护过程更轻松。层析柱的直径范围从 50 到 1000mm，客户可以选择最适合的柱子用于层析分离。

智能填充提供了预设程序和验证的填充方法，可以节省时间，并降低了填充过程对操作员的依赖。它确保了准确、可重复的填充结果，降低了对专业人员的需求，并促进产品更快转换。

通过 AxiChrom Master 和 UNICORN 行家的互动指导，客户可以很轻松地准备和操作层析柱。这种直观的操作可以减少错误，并节省时间。AxiChrom 400 及更大体积的填充由互动的 AxiChrom Master 来指导并控制。AxiChrom Master 是一个独立的单元，包括一个触摸屏操作界面，能指导用户逐步操作，并核对装柱、卸柱和维护等重要环节。

AxiChrom 层析柱还经过特别设计，能可预测地放大。它能确保在一系列柱直径和长度下获得可重复的结果，易于放大，并保证产品在不同地点生产时的一致性。全方位的技术和规范支持提供了快速无忧的安装和技术转移。层析柱易于安装和维护，即使是最大型的层析柱也能由单个操作员安全地进行操作。

通用电气医疗集团生命科学部的总裁 Peter Ehrenheim 表示：“AxiChrom 的上市在帮助客户提高产量，缩短安装、填充和维护的时间，以及改善一致性方面又迈进了一大步。新的设计概念让客户在生产过程中缩短了生产周期，减少了变数。”

AxiChrom 是该公司先进技术中的一部分，秉承了精益制造和追求卓越的理念，不断推动下游处理向简单、高效和经济的方向发展；并能有效缩短产品上市时间，提高产量和减少成本。这些产品包括：不同形式的 Bioprocess 层析介质；从试验到大规模生产的 AxiChrom 层析柱；ReadyToProcess 平台为上游和下游的生物处理提供了即用型的解决方案；PreDictor 96 孔过滤板能够实现高通量的工艺开发。

(生物通 余亮)

Bio-Rad 最新推出两款快速的定量 PCR 反应液

Bio-Rad公司近日宣布推出两款快速的定量PCR反应液——iTaq fast supermix with ROX 和 iTaq SYBR Green supermix with ROX, 能在 40 分钟内得到更加可靠的定量 PCR 结果。

无论你采用何种检测化学, iTaq fast supermix with ROX 能与多种仪器包括 ROX 依赖的实时定量 PCR 系统共同使用, 在快速或传统的循环条件下, 带来最大的 qPCR 效率、灵敏度、特异性以及可靠的荧光信号。反应液预混合了热启动的 iTaq DNA 聚合酶、优化的 buffer、核苷酸和 ROX 参考染料。方便的一管式配方校正了孔内信号差异, 使研究人员能得到低丰度目标的特异、灵敏、快速的 qPCR 结果。

iTaq fast supermix with ROX 为基因表达分析提供了更优的结果。使用荧光探针对两个目的基因同时检测能更加可靠地完成, 而不会在检测低表达基因上存在明显差异。

iTaq SYBR Green supermix with ROX 能为实时定量 PCR 分析提供最佳结果, 它在快速循环条件下有着绝佳的扩增灵敏度和特异性。反应液适用于 cDNA、基因组和质粒 DNA, 能在至少 7 个数量级内实现灵敏、特异的扩增。

更多关于快速PCR反应液的信息, 请访问 www.bio-rad.com/supermixes/。

关于 Bio-Rad

Bio-Rad公司 (美国证券交易所代码: BIO & BIOb)50 多年来一直致力于生产和销售生命科学的研究和临床诊断系列产品, 在科学探索领域保持领先水平。该公司的产品质量与客户服务在世界各地的医院、大学、主要研究机构、生物技术公司及药厂中都有口皆碑。1952 年, Bio-Rad 成立于美国加州的 Hercules, 为全球市场 85,000 多名科研和工业客户提供服务。这家公司全球雇员超过 6300 名, 2007 年收入接近 15 亿美金。更详细的信息请访问www.bio-rad.com。

(生物通 余亮)

454 新一代测序仪升级 性能全面提升

454 生命科学公司 (Roche 子公司之一) 最近推出全新的钛系列试剂和软件, 用于基因组测序仪 FLX (GS FLX)。有了新的试剂盒, 高质量 (Q20) 的读长能达到 400 个碱基, 通量也能增加 5 倍, 单个反应能得到 4-6 亿个碱基对。

新的性能提升巩固了 454 生命科学在测序上的金标准地位, 在很多应用方面能有效取代传统的 Sanger 测序。升级之后, 北美多个主要的基因组中心立即进行了采购。贝勒医学院成为第一个安装了 10 台 GS FLX 仪器的单位, 华盛顿大学的仪器数量也增至 8 台。Broad 研究院现有的 GS FLX 测序仪数量也达 10 台。

首个 GS FLX 钛系列试剂盒在今年早期开发出来, 并由这些基因组中心进行评估。这些中心肯定了试剂和软件的性能, 进一步证明了新系统的实力。贝勒医学院人类基因组测序中心的主管 Richard Gibbs 教授表示: “我们是第一个吃螃蟹的人。我们很高兴新试剂的性能与 454 承诺的一样好。新的化学有效取代了 Sanger 测序, 因此我们将其应用在 10 台 GS FLX 仪器上。”

Broad 研究院基因组生物计划的联合主管 Chad Nusbaum 博士如此评价: “我们对新的 GS FLX 钛试剂系列非常乐观, 它能降低费用并提高质量。这个系统能使我们扩展研究范围, 去涉及以前觉得过于昂贵的项目。我们正在开发新方法来利用这个 400 碱基对的序列读长, 尤其是用于大型基因组的重测序。”

贝勒医学院人类基因组测序中心的助理教授 Stephen Richards 博士表示: “我们用新的 GS FLX 钛试剂来对果蝇进行组装, 效果非常好。在

基因组的序列覆盖度为 12 倍时, N50 contig 长度达到 30-50 kb, N50 scaffold 大小超过 3 Mb。与对照果蝇基因组相比, 这个结果相当好, 说明 GS FLX 钛系列读长至少相当于 Sanger 读长的 8 倍, 而速度却快得多, 费用也少了一个数量级。”

454 生命科学的总裁 Chris McLeod 表示: “我们很高兴能为广大的客户提供 GS FLX 钛系列试剂。基因组测序仪 FLX 系统正迅速成为 DNA 测序的金标准, 它与传统的 Sanger 测序相比, 性能、准确性、价格的优势不言而喻。”

无需对仪器的硬件做任何改动, 只改进试剂和软件, 就能实现性能提升。因此, 目前使用 GS FLX 仪器的客户无需任何仪器升级, 就能享受到这些改进。454 生命科学研发部的副总裁 Michael Egholm 认为: “我们很高兴能为科学家提供这些性能升级。联合基因组研究院现在单次运行就能得到超过 6.5 亿个碱基。我们的平台能使科学家迅速获得有意义的结果, 这一点从发表的高水平文章中也能看出。新的 GS FLX 钛系列试剂不同寻常的性能改进已经被市场认可, 毛细管测序仪正慢慢被淘汰, 客户也开始转向 454 测序平台。”

关于罗氏

总部设在瑞士巴塞尔的罗氏, 是一个世界领先的、注重科研的医药和诊断产品开发集团。作为世界上最大的生物技术公司, 该集团为疾病的

早期发现、预防、诊断和治疗提供了创新产品和服务，在改善人类健康和生活质量的各个方面都做出了大量贡献。罗氏公司是体外诊断的世界领先公司，是治疗癌症和器官移植所需药物的领先供应者，也是病毒学的市场领导者，并活跃在其他主要的治疗领域，如自身免疫性疾病，炎症，代谢及中枢神经系统。2007 年该集团药品部的销售总额为 368 亿瑞士法郎，诊断部的销售额为 93

亿瑞士法郎。罗氏公司与众多的合作伙伴签订了研发协议并结成战略联盟，包括在美国基因技术公司（Genentech, Inc.）和日本中外制药株式会社（Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.）拥有多数股权，2007 年研发投资达 80 亿瑞士法郎。罗氏集团的全球员工总数约 8 万。如需了解更详细的信息，请访问www.roche.com。

(生物通 余亮)

Affymetrix 的基因表达谱有助于预测化疗效果

同样的化疗，为什么对有些病人的效果就更好一些呢？美国科学家发现了一种基因表达特征，能预测个体的细胞是否对特定的 DNA 损伤试剂敏感。

来自马萨诸塞技术研究所的研究小组用一种名为 **MNNG** 的烷基化试剂筛选了多种白细胞系，来观察与敏感度和耐受性相关的基因表达模式。研究人员最终准确定位了 **48** 个基因，它们的基础表达能预测出 **MNNG** 诱导的细胞死亡，准确率达 **94%**，文章发表在《*Genes and Development*》杂志上。

过去的一些研究证实，人类淋巴母细胞（一种永生化的白细胞）的基因表达模式差异很大。但是还不清楚这是否会影响细胞对外界挑战的反应。

在这项研究中，研究人员用 DNA 损伤试剂 **MNNG** 来筛选细胞。**MNNG** 能使特定的 DNA 碱基烷基化，导致突变。这种损伤中的一部分可被 DNA 甲基化转移酶 **MGMT** 修复。但是如果没有被修复，DNA 错配修复或 **MMR** 通路就会靶定损伤的 DNA 碱基，并引发细胞凋亡。

因此，**MGMT** 活性较低的细胞有可能对 **MNNG** 更敏感，而两种通路缺陷的细胞则表现出更多的 **MNNG** 抗性，并积累突变。

研究人员使用 Affymetrix 公司的 **GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 array** 来检测 24 种人类淋巴母细胞细胞系在 **MNNG** 处理前后的基因表达差异。这些细胞系来自健康个体，他们彼此之间没有亲缘关系。

他们聚焦于最敏感和最不敏感的细胞系，比较了两组细胞系的基因表达差异。他们发现了两组细胞系中有 **240** 个基因差异表达。

研究人员利用计算模型精确定位出正或负相关的差异表达基因，确定了 **48** 个基因，它们的基础（处理前）表达能预测出 **MNNG** 敏感度，准确率在 **94%**。

接着，研究人员验证了这些结果。他们定量 **MGMT** 和 **C21ORF56** 两种基因的转录水平，这两种基因在 **MNNG** 抗性细胞中表达量很高。有趣的是，他们只检测到 **MGMT** 表达和 **MNNG** 抗性的弱正向关联。

这意味着新的基因表达检测也许比现有的方法更有效。作者提到：“在预测胶质母细胞瘤的化疗效果时，**MGMT** 沉默是现在常用的方法。但我们的结果表明这 **48** 个基因的表达水平可能是更准确的指示剂。”

研究人员还进行了另外的细胞实验和网络分析。他们将与烷基化关联的其他基因和通路汇总，生成了一个超过 **100** 个相关基因的网络。即便如此，这 **48** 个基因特征仍是 **MNNG** 敏感性的最有力的指示剂。研究小组希望这个发现能最终被临床分析的决策者所采信。

（生物通 余亮）

利用多波长微孔板细胞分析仪进行高通量高涵量筛选

摘要：

荧光微孔板细胞分析仪 (Fluorescence microplate cytometers) 专为大规模筛选工作而设计，拥有在 24 小时内进行 30 万个高涵量数据点分析的能力（当采用 1536 孔板时）。该仪器既可提供显微镜 CCD 成像仪的目标识别能力同时结合高速度的数据采集速率，又可将发光荧光酶标仪 (bulk fluorescence readers) 功能与较小的数据文件结合。由于具备全孔扫描的能力，这种仪器筛选数据的统计质量得以大幅提升，对于那些检测视野要求比普通显微镜物镜可提供视野更大的检测分析，也可以借助这种仪器而转为更高通量的自动化检测模式。

Acumen eX3 (TTP LabTech Ltd, Melbourn, UK.) 是近期推出的一种多波长显微平板细胞分析仪，同一台仪器可提供 405、488 和 633 纳米 3 种激发波长的激光扫描。这种优势大大扩展了可组合用于多色多重分析中的荧光试剂的范围——激发波长范围相当于白光光源的仪器。因此，可将基于 CCD 成像系统设置的高涵量分析实验步骤“无缝”转移到 Acumen eX3 上进行筛选。

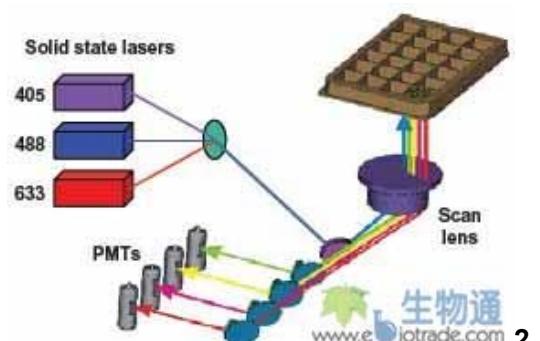
显微平板细胞分析仪利用扫描激光激发微孔板底的荧光物质，无需中间成像传递过程即可从受激发而产生的荧光发射中得到高涵量信息。在 Acumen eX3 仪器中，4 个光电倍增管 (PMT) 检测器可同时监测每道激光可能对应产生的 4 种发射荧光，最高可提供 12 通道数据，实现真正的多重分析。Acumen eX3 这种多波长微孔板细胞分析仪通过扩大应用范围，以及增加分析的灵活性，为药物研发提供了一种新工具。

小结：

- 微孔板细胞分析仪是一种高通量/高涵量筛选的理想工具

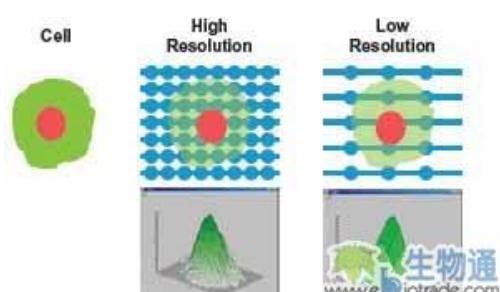
- 每天可进行超过 30 万孔的高通量分析，无需担心数据储存问题
- 多种波长的激发光增加了适用于多重分析的荧光试剂的范围，提升了多重分析能力
- 应用范围包括细胞周期分析，多重免疫分析，以及 β -内酰胺酶(β -lactamase)报告基因分析

1.微孔板细胞分析仪中的光学结构



www.ebiotech.com 2.

激光扫描细胞仪 (Laser Scanning Cytometry)



www.ebiotech.com

扫描分辨率分别由 X 方向和 Y 方向进行定义，3 维荧光密度图的建立使得对每个识别目标进行荧光和形态学参数的计算成为可能。

3. 运行通量和数据储存

以上数据源于 Acumen eX3. 单激光扫描，扫

	96	384	1536
Plate Read Time (whole well)	9.15	10.24	10.26
Plate Read Time (HTS)	4.13	4.8	6.67
Plates per 24h	350	300	216
Wells per 24h	34,000	115,000	330,000
Total Data for 24h operation	17.5 Mb	15 Mb	

描精度为 $1\mu\text{m} \times 8\mu\text{m}$ ，时间单位为分钟。

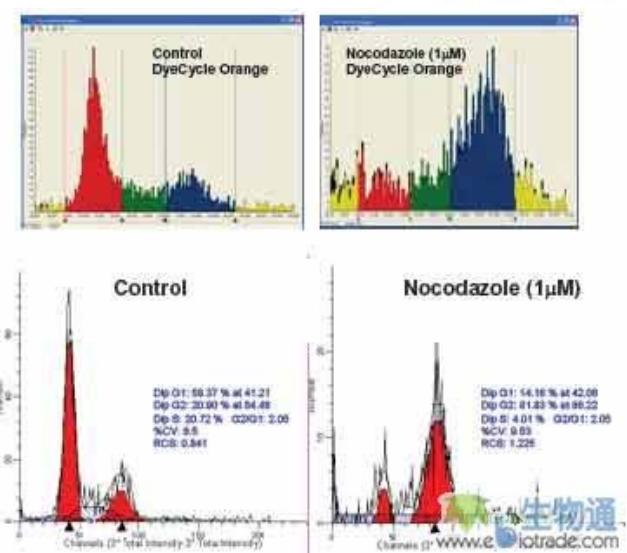
4. 常用激发荧光试剂表

Acumen eX3 可进行多个波长激光激发，每

405 nm	488 nm	633 nm
Hoechst	Propidium Iodide	DRAQ5
DyeCycle™ Violet	Calcein-AM	VITA Blue
Alexa 405	Alexa 488	Alexa 633
Quantum Dots	FITC	Allophycocyanin
FuraRedHi	Phycoerythrin	TP-PRO1
Pacific Blue	eGFP	Cy5
AmCyan	DsRed	HcRed1

次扫描获得多达 12 通道的荧光数据，使之可适用于范围广泛的荧光染料，探针以及蛋白，提升多重检测分析的能力。由于不需要进行细胞核染色来定位细胞。所有探针均可用于报告生物学反应。由于该仪器可适用的染料范围相当于白光光源仪器，基于显微 CCD 成像系统的检测方法可简便地转移到 Acumen eX3 进行初筛。

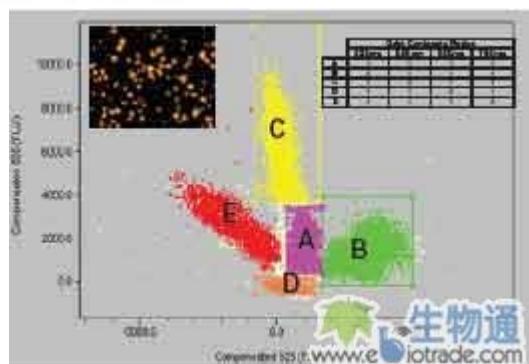
5. 用微孔板细胞分析仪对 HeLa 细胞进行细胞周期分析



将培养了 24 小时的 HeLa 细胞（每孔 2000 个）用紫杉醇(nocodazole)处理 22 小时，再用 Vybrant® DyeCycle™ Orange 进行标记（5uM，室温 30min）对细胞培养物进行原位标记。利用 Acumen eX3 微孔板细胞分析仪，以 488 纳米波长激发进行分析，数据以 FCS 3.0 格式输出，通过 ModFit 3.1 SP3 (Verity House Software) 软件进行分析。可提供同时获取有丝分裂指数 (Mitotic Index) (anti-pH3) 和判断细胞周期的多重分析方法。

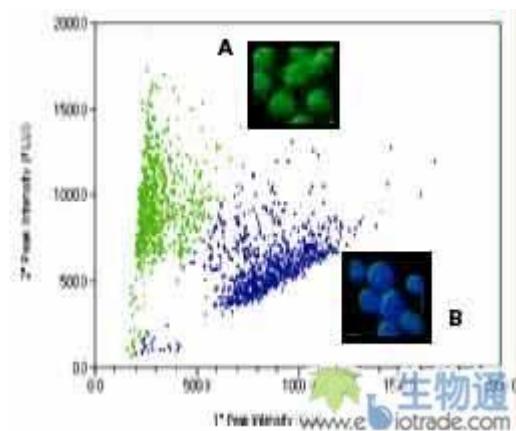
6. 多重量子点分析 (Multiplex Quantum Dot Analysis)

将人类单核细胞样品与生物素标记的抗 CD45 抗体共同孵育，然后用 5 个不同比率的链亲霉素量子点生物结合物(Streptavidin Qdot® Bioconjugates)进行标记（如图中小表），用 Acumen eX3 同时检测每种 Qdot 结合物发射的荧光，可分辩出所有 5 种细胞群体。该实验证实 Acumen eX3 微孔板细胞分析仪与 QDot 标记联用可进行多重免疫检测实验。



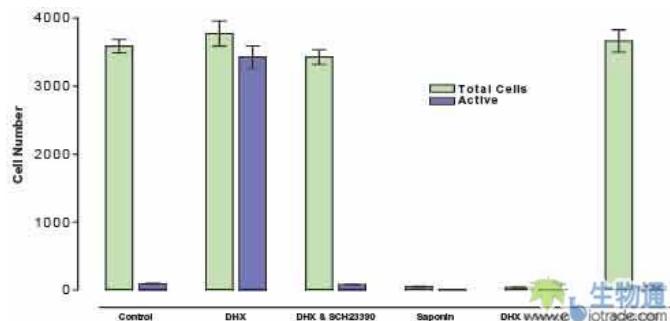
7.GPCR 筛选: β -内酰胺酶(β -lactamase)

报告基因分析



小图显示细胞表达 β -内酰胺酶报告基因的情况:无活性 (A, 绿色) 和有活性 (B, 蓝色)。采

用 405nm 波长激发光, CCF4-AM 底物获得图中数据。注意每组中绿色和蓝色荧光的差异。由于报告的荧光比例数据是基于每个细胞的分析结果, 因而在不降低分析质量的前提下大大降低了在发光荧光分析 (bulk fluorescence assay) 中要求的细胞数量。



Dopamine D1 Receptor 活性: 通过同时检测每个孔中 β -内酰胺酶报告基因活性和总细胞数, 微孔板细胞分析仪可在一次读数过程中获得化合物的活性和细胞毒性之间的相关性, 而这是采用发光荧光酶标仪分析所无法做到的。

(TTP 供稿 生物通翻译)

利用多重激光微孔板细胞分析仪进行细胞增殖及细胞周期分析

概述：

越来越多的研究人员希望通过细胞多重分析从单个样品中获得多种信息，以减少经济和人力消耗的同时增加检测通量。目前这种多重检测的程度受限于可用的试剂----多数荧光探针的最佳激发波长大都在 488nm 附近，而这些荧光探针在光谱曲线上的重叠限制了它们在多通道分析上的应用。另一个限制是许多荧光检测系统的激发和检测范围仅限于一个狭窄的波长范围，导致它们不兼容某些荧光指示剂。如今，试剂和仪器的同步发展扩充了可用新产品的范围，因而使得以不同的光谱检测多种荧光探针成为可能，提升了多通道检测的能力。

激光扫描荧光微孔板细胞分析仪，譬如 Acumen eX3 (TTP LabTech Ltd, UK) , 可在一台仪器中提供 405nm, 488nm 和 633nm 三种波长的激发光，再加上每种激发光可获取四种荧光检测数据，大大扩展了可组合用于多色多重分析中的荧光试剂的范围，其激发波长范围与白光光源仪器相近。Acumen eX3 结合了 CCD 成像仪强大的目标识别能力与快速的数据读取速度，以及对 96 孔, 384 孔和 1536 孔板进行全孔分析，可达到 24 小时内获取 30 万个数据点这样的高通量。

荧光微孔板细胞分析仪在癌症研究中应用广泛，包括用碘化丙啶(PI)进行 DNA 染色（激发波长 488nm）研究细胞增殖和细胞周期分析。在此我们通过在 Acumen eX3 上使用两种 DNA 染料 Hoechst 34580(激发波长 405nm), TO-PRO-3(激发波长 633nm)进行分析，并探讨在免疫检测分析中的多通道技术的应用潜力。

结论：

- 不同激发波长(405nm, 488nm 和 633nm)的细胞核染色所得的细胞数目显示良好的相关性

- Hoechst 34580, TO-PRO-3 和碘化丙啶(Propidium Iodide)可用于同一单孔中以进行多重分析

- 利用 Acumen eX3 在 405nm, 488nm 和 633nm 激发光可对活细胞和固定细胞进行细胞周期分析

- 微孔板细胞分析仪非常适用于高通量高通量筛选，分析通量可达到每 24 小时超过 30 万孔，且无需担心数据储存问题。

1.Acumen eX3 微孔板细胞分析仪



Acumen eX3 激光扫描荧光微孔板细胞分析仪是结构紧凑的台式仪器，可提供三种波长的激发光。这种设计，尤其当仪器是全集成的时候，有利于在宽范围内以高通量进行高通量分析。专

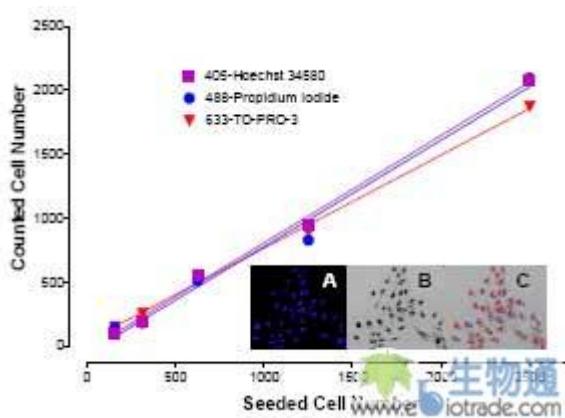
利的信号阈值方法能提供实时(“on-the-fly”)细胞分析,大大缩小了数据文件的大小——在高通量(HTS)筛选模式下数据文件仅为 50Kb 左右。

2.常用激发荧光试剂表

405 nm	488 nm	633 nm
Hoechst	Propidium iodide	TO-PRO-3
DyeCycle™ Violet	DyeCycle™ Orange	DRAQ5
Alexa 405	Calcein-AM	VITA Blue
Quantum Dots	Alexa 488	Alexa 633
FuraRedHI	FITC	Allophycocyanin
Pacific Blue	Phycoerythrin	Cy5
AmCyan	eGFP	HoRed1

Acumen eX3 可进行多个波长激光激发, 每次扫描获得多达 12 通道的荧光数据, 使之可适用于范围广泛的荧光染料, 探针以及蛋白, 提升多重检测分析的能力。由于不需要进行细胞核染色来定位细胞。所有探针均可用于报告生物学应答。Acumen eX3 可提供的染料范围相当于白光光源仪器, 因此, 基于显微 CCD 成像系统的检测方法可简便地转移到 Acumen eX3 以进行初筛。

3.利用多通道激光激发进行多重细胞定量

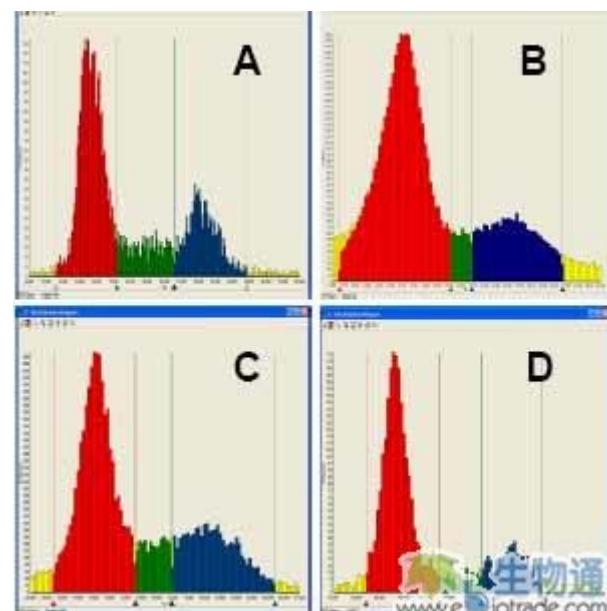


以不同细胞数目接种(每孔 156-2500)的 HeLa 细胞用酒精进行原位固定, 并用 Hoechst 34580 (10uM, 405nm), 碘化丙啶 PI (1.5uM, 488nm), TO-PRO-3 (0.5uM, 633nm) 这三

种染料染色。用 Acumen eX3 微孔板细胞分析仪进行分析。在这个实验中, 我们研究在多重分析中以多种染料(405nm, 488nm 和 633nm 三个激发波长)确定不同细胞数目能力。这三种 DNA 染料加入相同的孔, 结果表明这三种细胞核染料之间在确定细胞数目上的结果具有密切相关性, 其次也证实在同一孔中多重检测全部三种染料的能力。

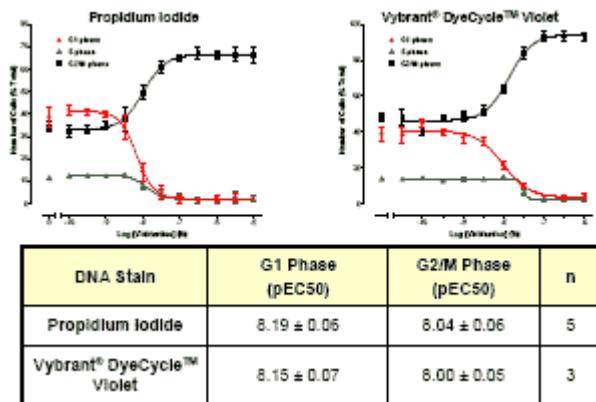
插图: 图 A 为一个孔中 Hoechst 染色细胞的图像, 图 B 为图 A 同一孔的 tiff 格式输出图片, 图 C 为带有细胞计数的 tiff 图片。(Image-Pro Plus; Media Cybernetics)

4.细胞周期分析: 405nm, 488nm 和 633nm 激发波长的 DNA 染色比较



HeLa 细胞 (2000 个/每孔) 以: A. 碘化丙啶 PI (10uM) ; B. Hoechst 34580 (10uM) ; C. Vybrant® DyeCycle™ Orange (5uM) ; D. TO-PRO-3 (0.5uM) 进行原位标记。在 Acumen eX3 微孔板细胞分析仪以 405nm, 488nm 和 633nm 激发波长进行分析。

5.活细胞和固定细胞的细胞周期分析



活细胞用 Vybrant® DyeCycle™ Violet 染色, 在 Acumen eX3 微孔板细胞分析仪上以 405nm 激发波长进行分析。固定细胞则用碘化丙啶 PI 染色, 在 488nm 激发波长进行扫描分析。采用这两种细胞核染料所获得的 G1 和 G2/M 期的 pEC50 值是基本相符的。

6.高通量和数据存储

	96	384	1536
Plate Read Time (whole well)	9.15	10.24	10.26
Plate Read Time (HTS)	4.13	4.8	6.67
Plates per 24h	350	300	216
Wells per 24h	34,000	115,000	330,000
Total Data for 24h operation	17.5 Mb	60 Mb	170 Mb

当 Acumen eX3 扫描一个区域, 而不是全孔扫描时, 这样任一种 SBS(生物分子科学学会) 标准的微孔板的扫描的基本相似。通常可读板的完整时间可达到 10 分钟左右, 这个时间可以通过减少扫描区域从而大幅缩减。Acumen eX3 每天可以进行数百个细胞培养板分析, 且保存数据所在占空间很小。以上数据源于 Acumen eX3. 单激光扫描, 扫描精度为 1μm x 8μm, 读板时间单位为分钟。

(TTP 供稿 生物通翻译)

超微量 SNP 基因分型:用 mosquito 进行 PCR 制备

聚合酶链式反应 (PCR) 是很多技术的基础, 如单核苷酸多态性 (SNP)。人们总是期望反应体积能尽可能地小, 因为某些试剂还要向知识产权持有者-霍夫曼•罗氏公司交纳专利转让使用费, 而且引物/探针和 DNA 样品可能很稀有或者昂贵。近年来热循环仪、读板机和微孔板的发展使分析能在 384 孔 PCR 板中进行, 反应体积只需要 5-10ul。

mosquito 液体操作系统提供了基于一次性加样针头的灵活、准确的移液操作, 体积可低至 50nL。这篇研究表明 mosquito 能将 SNP 基因分型的 384 孔板 PCR 反应体积降至 2ul 以下, 带来可观的试剂节约和通量增加。

简介: SNP 基因分型

SNP 是指在一个群体中, 某个碱基存在两种形式 (等位基因); 例如 SNP 可能是 C (胞嘧啶) 和 T (胸腺嘧啶) 等位基因。在人类基因组中每 1000 个碱基对可能出现 1 个 SNP, 人们努力去发现和鉴定这些 SNP, 以作为发现和诊断疾病基因的工具。

5'核酸酶分析(也就是大家所熟悉的 TaqMan 分析)能根据特异探针的杂交及 Taq DNA 聚合酶特有的 5'-3'核酸外切酶活性, 使得每个等位基因释放出不同荧光标记, 从而得以分辨 SNP 等位基因。

通过侧翼引物进行的 PCR 在同一个分析中使用了两个荧光寡核苷酸探针。专一设计的探针特异性针对包含 SNP 的区域, 探针包括 5'端荧光报告基团和 3' 端的淬灭基团, 如果杂交发生, 5' 核酸酶活性就会切割探针, 从荧光淬灭基团中释放出荧光报告基团。带有不同荧光报告染料的两

种不同探针, 加入反应中用于分辨等位基因, 每一种染料对应一个需要被分型的等位基因变异。

如果探针与靶 DNA 序列间存在错配, 杂交会显著减少并终止荧光报告染料的切割, 因此荧光信号的释放也减少。每个信号的大小显示出哪一种等位基因存在。在 3'端引入两个修饰基团能显著改善探针的灵敏度----非荧光的淬灭基团能降低背景信号, MGB 修饰基团(minor groove binder, 一种 3 肽)能增加反应的灵敏度。

材料与方法

MRC geneservice (一家英国的科研服务的主要供应商) 用 5ul 总体积进行 SNP 基因分型, 这是该类分析的公认小体积。利用 mosquito, 将标准的反应体积 5ul 和更小的反应体积 1.7ul 的分析性能进行了比较。mosquito 具有纳升移液能力, 能进行更小体积的分析, 之所以选择 1.7ul 是确保分析产生的荧光信号能被 ABI 7900 检测到。

5ul 分析

一组 DNA 样品排列在 96 孔微孔板中, 每孔约 20uL。反应混合液 (包括探针和引物) 在 384 孔板的一列中制备。DNA 样品组分别取 1.5uL 转移到 384 孔板中, 与 3.5uL 反应混合液混合。分

析是在 ABI 384 孔板的偶数行中进行的，由于列的密度间隔从 9mm 压缩到 4.5mm，因此只用了第 1-12 列。尽管在这项研究中只测试了一组 96 个 DNA 样本，但这个设置可以将 4 个 96 孔板的样品加到同一个 384 孔 PCR 板上。

由于 mosquito 主要用于纳升级移液操作，移液加样针最大体积为 1.2 μ L，反应混合液的体积通过 3 次移液（1.2、1.2、1.1 μ L）来实现，使用一套 8 个移液加样针头完成所有孔。

同样地，1.5 μ L DNA 分成两个 750nL 加入，但这回每次加样使用新的移液加样针头来防止 DNA 样品的污染。对于使用 mosquito 来说这是一个简单步骤，因为该仪器的核心是一卷 36000 个一次性的微量移液加样针头。为了避免交叉污染，用过的移液加样针被丢弃掉，新的移液加样针进入微孔版中取样，省去了耗时的洗涤循环的步骤。

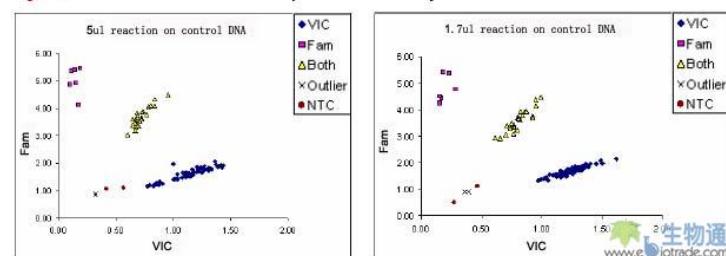
1.7 μ L 分析

采用与前面实验同样一组 DNA 样品，同样的方法分析，不过反应体积减少了。一次移取 515nL DNA 样本（每次使用干净的移液加样针）加入到 1.2 μ L 反应混合液（用一套 8 个移液加样针先加入到干净的孔中）。这些体积的比例与上面 5 μ L 分析相同，通过单次转移就能实现。这些分析在上面平板的相同行，第 13-24 列中进行。

热循环和分析

准备好的 384 孔板用 Abgene 透明封口膜（强）热封，在 ABI 7900HT 中反应和读数。结果根据两个等位基因特异的荧光基团（VIC 和 Fam）的强度绘制成图。

Figure 2. Intensities of VIC and Fam fluorophores for each assay



图中显示了数据点的三个主要簇。右下是 VIC 荧光染料强度与 Fam 荧光染料比较相对较强的数据点，对应于 DNA 样品中单个 SNP 纯合等位基因。左上较小的数据点簇则与第二个 SNP 纯合等位基因相对应。在这两组数据点组之间，有第三个簇，对应两种 SNP 杂合的样品。

4 个数据点位于原点附近。它们对应两个水样品（无模板对照 NTC）和两个异常值。异常值在每个实验中对应相同 DNA 样品。这些样品扩增失败，可能是由于 DNA 质量不好。

通过数据点离散的紧密程度和分散程度可以表明这些数据的质量。在这项研究中，1.7 μ L 总体积分析具有更好的数据质量，而信号水平与 5 μ L 分析相似。

结论

这项研究表明利用 mosquito 将 PCR SNP 分析的制备和分析降到 1.7 μ L 的反应体积是可行的。数据质量与 5 μ L 反应体积相当甚至更高。因此可以通过降低分析使用的试剂量来降低费用。这个发现为 mosquito 液体处理器能在 SNP 分析中降低超过一半以上的试剂费用提供了证据。

(TTP 供稿 生物通翻译)

小瓶子也有大学问 GIBCO 换新装

GIBCO 装细胞培养基的瓶子最近全面升级，并开始在全球上市。如同 iPod nano 2 到 nano 3 的升级一样，新瓶子的造型变得矮矮胖胖，还歪着脖子（下图）。不过这些可都是特别设计，“歪脖子”是为了更好地移液和倾倒，矮胖的造型是为了更好地操作和储存，而大口径则减少了与移液器接触的机会。



可别小看这些设计，还花费了不少功夫呢。据 Invitrogen 细胞部门的高级副总裁 Nicolas Barthelemy 称，他们仔细观察了研究人员的细胞培养操作，花了很多精力来重新设计 GIBCO 的瓶子。“这些创新的产品将改良实验室的操作，并改善实验结果。”

Invitrogen 与一家领先的设计公司 IDEO 合作，在实验室实地调查研究人员在日常工作中如何使用培养基。在瓶子的研发过程中，研究人员

一直提供使用心得，来确保效率最大化及使用方便。新瓶子的主要特征是：改良的人体工程学设计，更好地操作和储存，容易鉴别，为添加物预留了额外的空间。

新瓶子将于 2008 年第四季度开始陆续上市，逐步替换掉原先的包装。所有 GIBCO 的产品（包括血清）都会更换成新瓶子，体积分别为 100ml、500ml 和 1000ml。

更多关于新瓶子的信息，包括申请试用装及试用反馈意见，请访问 www.invitrogen.com/gibcobottle，更有机会赢取 iPod nano 哦。

（生物通 余亮）

GE Healthcare 收购 MicroCal，拓宽了生物医学和制药研究的能力

通用电气医疗集团(通用电气公司下属部门之一)今天宣布它已经收购了 MicroCal 公司。MicroCal 公司是一家创新仪器的供应商，其产品主要用于制药、生物医学和生命科学研究中来探索分子相互作用。此次对 MicroCal 的收购将扩展通用电气医疗集团在快速增长的蛋白质科学和药物开发领域所提供的技术。合作的财务条款没有公布。

MicroCal 开发和制造微型量热仪，能提供包括蛋白、脂类、核酸和抗体在内的多种生物大分子在结构、功能和结合特性等方面的详细信息。目前药物设计上基于结构的发展趋势，加上生物制药开发的扩张，正推动微型量热仪应用的增加而成为制药研究中的标准技术。

MicroCal 的专利技术与通用电气医疗集团的 Biacore 平台互补，为科学家们提供了药物开发过程中各个不同阶段的详细信息，减少了后期候选药物失败的可能性。MicroCal 的技术已经被全球一千多个实验室所采用。

[点击获取更多GE关于蛋白质组学和药物开发的新技术](#)

赛默飞世尔科技参加科技部组织的生鲜奶中的三聚氰胺快速检测测试

(2008年10月16日, 上海)近日, 世界分析领域的领导者赛默飞世尔科技携其先进的 Multiskan MK3 酶标仪和 Wellwash 4MK2 洗板机, 及 08 年最新款的 Multiskan FC 酶标仪参与了在北京中国计量科学院进行的“生鲜奶中三聚氰胺统一测试”。

震惊国人的“三聚氰胺事件”给我国的乳制品行业带来了巨大的损失, 食品安全与质量控制再次成为全行业关注的焦点。对三聚氰胺进行快速检测, 这将对乳制品的质量控制起到关键作用, 将帮助乳制品企业快速把控产品安全, 并充分发挥科技在保障食品安全中的支撑作用。为此, 科技部社会发展司会同国家质量监督检验检疫总局、农业部、卫生部等相关司局于 10 月 1 日向全社会发布了征集快速检测液态奶和奶粉中三聚氰胺技术及产品的通知。

作为全球分析仪器的领导者, 赛默飞世尔科技第一时间向科技部递交了“采用酶标法进行三聚氰胺的快速、高通量检测”的申请书, 并于 10 月 10 日参加了在北京中国计量科学院进行的“生

鲜奶中三聚氰胺统一测试”。本次测试采用盲样检测, 参加本次测试的单位共有 31 家, 提供的方案包括酶标法 (ELISA)、拉曼光谱、离子色谱等十几种方法。赛默飞世尔科技在现场不仅带去了 Multiskan MK3 酶标仪和 Wellwash 4MK2 洗板机, 还展示了 08 年最新款的 Multiskan FC 酶标仪。采用经典的酶标洗板的方法, 结合美国 Abraxis 三聚氰胺检测试剂盒, 三聚氰胺的最低检测灵敏度可达 0.2ppm。

现场公布的测试结果表明, 酶标法 (ELISA) 和拉曼光谱法是进行生鲜奶中三聚氰胺快速检测的比较理想的方案。赛默飞世尔科技希望利用自身在分析仪器领域的技术优势, 为国家的食品安全检测工作尽一份力量。