

EBIOTECH

生物通技术周刊

第32期

2008年7月14日

[技术前沿]

**Western Blot中的新仪器 (Updated)
动态监测NK细胞杀伤活性的新工具**

[应用指南]

**ABI技术手册-microRNA研究指南
Affymetrix技术用于肝毒性检测**

[行业动态]

**Qiagen以1.35亿美元收购Corbett
赛默飞世尔收购Open Biosystems**

主办： **生物通**
www.ebiotrade.com

一、技术前沿:

Western Blot中的新仪器 (Updated)

动态监测NK细胞杀伤活性的新工具

二、应用指南

ABI技术手册-microRNA研究指南

Affymetrix技术用于肝毒性检测

三、行业动态

Qiagen以 1.35 亿美元收购Corbett

赛默飞世尔收购Open Biosystems



[点击下载全文](#)

生物通版权所有 谢绝转载

本期责编: 余亮

制作: 廖旭霞

广告联系电话: 87511980

欢迎访问

www.ebiotrade.com



Western Blot 中的新仪器 (Updated)

二十年来，Western blot 的步骤一直都没有什么大的改变，大家还是沿用分子克隆上的技术和试剂。不过，幸好有一些新产品不断涌现，能大大提高我们的实验效率和效果。现在 Western blot 中的趋势是荧光和化学发光检测、准确定量蛋白、自动化操作、自动冷却转印系统和 CCD 成像系统。大家一直以来可能关注试剂比较多，不过下面提到的这些新仪器，也可以让 Western blot 更快速、更方便呢。

让转膜不再沉闷

其实 Western blot 的原理看起来非常简单，但就是过程很漫长，电泳、转膜、封闭、孵育，每一步都得花一两个小时。如果只是偶尔为之还好，但那些 WB 达人，几乎天天做，就不知要奉献多少宝贵青春了。如果现在告诉你有一种转膜方法，只需要 7 分钟，你是不是会很开心。Invitrogen 的干式转印仪 iBlot 就真的做到了这一点。插一句，Invitrogen 的转印仪叫 iBlot，核酸纯化仪叫 iPrep，不知道它们和苹果的 iPhone、iPod 有没有关系。iBlot 是一台干式转印仪，无需配制任何缓冲液，只需要 5-7 分钟就能将蛋白转到 NC 膜或 PVDF 膜上。iBlot 能实现如此快的转印，是因为 iBlot 转印仪和凝胶转印堆积层的配合，可以产生高电场强度。凝胶转印堆积层（包括 Top 和 Bottom 两块）中含有阳极和阴极，缓冲液和膜（NC 膜或 PVDF 膜），你只需放入你的胶（Tris-Glycine、Tricine 或 NuPAGE 胶都可以），赶走气泡，就可以开始转印了，再也不需要配制大量的缓冲液+等待 2 个小时，可同时进行两块 mini-gel(8x8cm)或一块 midi-gel (8x13cm)的转印。效率呢，和我们常用的湿转相当或更好。如果再配合 Invitrogen 的 NuPAGE 胶和 WB 试剂盒，只需要半天就能完成整个 WB 了，效率那可是相当高啊。iBlot

的价格在 2 万元人民币左右，作为仪器来说不算贵，不过那个凝胶转印堆积层可是一次性的，需要反复购买，价格约是 100 多一块吧。

CCD 成像系统

CCD 表示电荷耦合装置，它是由一种高感光度的半导体材料制成，能把光线转变成电荷。随着冷却 CCD 技术的发展，成像系统成本越来越低，因而在现在的实验室里这些设备越来越普遍。目前几乎所有 Western blot 的新技术都是针对 CCD 成像系统的，它代替了传统的胶片成像。胶片成像虽然比自然发光法灵敏度更高，但也有很多缺点：耗时，需要暗房和显影剂，胶片很贵，而且是一个消耗品，需要持续购买。另外，用胶片上的蛋白条带进行定量几乎是“不可能的任务”，和目测一块考马斯蓝染的胶没什么区别。冷却型 CCD 照相机与 X 胶片相比具有瞬时影像处理、高灵敏度、高分辨率、动力学范围广等优点，而且还不需要胶片处理装置及暗室。然而，这项技术要求底物能产生高强度长持续时间的信号，以被照相机捕获到。不过这个也不是问题，GE、PIERCE、Bio-Rad、ABI 等公司都开发了信号能持续 24 小时的 Western blot 底物或试剂盒，而且灵敏度都超高，达到了飞克级别，具体请看[Western Blot 显色篇：八仙过海，各“显”神通](#)。

另外,现在的研究者们已经不满足于只是知道蛋白有没有,还想知道蛋白的量有多少,与其他蛋白相比是高还是低,定量的方法是否准确。多色的荧光Western blot可以满足研究者对于多蛋白分析的要求,使我们可以检测到电泳中重叠的蛋白条带,如果我们用传统的化学发光方法,是无法将它们分开的。多色荧光检测还可以增加定量的准确性。例如,你可以用一种荧光探针来标记目的蛋白,用另一种荧光探针作为上样量的标准化。这样,如果在某一泳道中你的目的蛋白量有显著的增加,你就可以判断到底是实验的原因,还是上样不准确造成的。GE的Amersham ECL Plex Western blotting系统,就可以在 1-D和 2-D Western blotting中进行多重检测,详细内容请看[多重 2-D Western blotting](#)和[内标](#)。另外,Invitrogen和PIERCE也提供同时检测两种蛋白的多重荧光Western blot试剂盒。

说到成像,连续三年获得生命科学产业成像分析系统大奖的 Bio-Rad 公司在这方面当然是技高一筹。它的 Molecular Imager VersaDoc 成像系统采用 Peltier 冷却的高分辨率数字 CCD 技术,并结合了独特的宽波长紫外激发光源及高效的光学设计,能提供卓越的灵敏度、均一性、灵活性及动态范围,在性能表现上可与更昂贵的以激光为基础的技术相媲美。VersaDoc 系统可用于分析广泛的样品,如凝胶、印迹膜、微孔板、TLC 板及放射自显影图像等。它们拥有 8 个发射滤光片位置,可有效地多通道检测标准品及未知样品。VersaDoc 系统有 2 种型号: 4000 型和 5000 型。4000 型提供最好的分辨率,5000 型提供最高的灵敏度。所有 2 种型号均包含 Quantity One 软件,以进行快速图像采集和定量分析。它能对各种染色或标记的核酸进行检测和定量,包括 EB、荧光素、Radiant 红、

SYBR Green、SYBR Gold 和德克萨斯红。也能对各种染色或标记的蛋白进行检测和定量,包括考马斯亮蓝、铜染色剂、SYPRO Ruby 及锌染色剂等。还能检测和定量其它荧光分子,包括 Cy2、Cy3、GFP 及罗丹明。并能应用于化学发光、化学荧光、比色和荧光等的印迹杂交中,包括所有辣根过氧化物酶 (HRP) 和碱性磷酸酶 (AP) 的底物。

同时,美国 Alpha Innotech 公司也推出了一种新型的 CCD 成像系统,使用荧光检测试剂对 Western blot 进行定量和分析。FluorChem Q 结合了化学发光的优势,能在一台定量 Western 成像仪器上对多种荧光染料(如 Cy 系列、Alexa Fluor 系列和 Qdot 等)进行成像。其他的荧光 Western blot 系统多是应用昂贵的激光检测系统,而 Fluorchem Q 是用多功能的 CCD 照相机,也具有同样的品质。它还是一个多用途的成像系统,不仅可以用来对传统和荧光 Western 进行拍照,还可以拍 EB 染色的 DNA 胶、考马斯蓝染色的蛋白胶,甚至是菌落平板,基本上实验室的所有的成像应用都可以使用。分析软件 AlphaView Q 可用于分析印迹膜或胶,而且可以储存分析步骤,迅速标准化上样对照,并能自动计算背景水平。

老牌的成像系统制造商 Syngene 则更是贴心,他们的口号是“不要再用胶片了,让我们来省钱吧”。而他们也确实做到了从客户的需求出发,帮客户省钱。它的化学发光和荧光成像系统 G:BOX 就提出了一个全新的理念,完全根据客户的要求来定制。这种创新使我们可以根据自己的用途和预算,自由选择几乎所有的成像系统组件,可谓看菜吃饭,量体裁衣啊。这样,我们就再也不用为不需要的部件掏钱了。

基本的G:BOX包括暗室、照相机/镜头座箱,你可以选择你想要的Syngene照相机、镜头和光源配件放置其中,以及GeneTools图像分析软件。暗室的设计已经考虑到更换部件的便利性,使你以后可以轻松地升级。那么可选的部件有哪些呢?如果你只是需要凝胶成像,就可以选择一个普通的照相机;如果用于Western Blot,那么该选择一个高级的冷却型照相机;如果是分析2D胶,那当然要选一个超级照相机了。因为G:BOX是完全电脑控制的,镜头的选择就有电动的、固定的和手动控制的。另外,你还可以选择不同的滤光片和光源。在实验中你可能会用到很多种不同的染料,那么你就可以登录www.syngene.com/html/excitation_long.php,几秒钟就能得到最适合的滤光片和光源。听上去是不是感觉很棒呢。专门为你定制的G:BOX,不单能满足今天的需求,明年的升级也能轻松做到。

Western blot 的终极目标

Western blot 完全是个体力活,需要无数次的加样和洗涤,也就有可能会产生加样的错

误,而且有些样品是来源于传染病人的,对研究人员的安全有一定威胁。Tecan 公司的ProfiBlot 仪器家族就是为了改善 Western blot 及 Southern blot 的安全性和可靠性而设计的,它符合欧盟的体外诊断 98/79/EC 指令。ProfiBlot 48 能同时处理 48 个胶条,而且整个过程是在安全的封闭式环境中进行的,能减少我们与有传染性的样品的接触时间。它能够自动准确地进行繁琐的手工操作步骤,如试剂的加样,孵育以及洗涤。另外,你还可以选择在 ProfiBlot™ 48 上安装一个 CCD 照相机,通过存储相关图像来轻松记录胶条的处理过程,再也不用一个一个地将处理后的胶条贴在实验记录本上了。你所做的工作仅仅是上样而已,是不是看上去很美呢?

这么多年来,Western blot 一直是我们研究蛋白的基本工具。借助于不断涌现的新技术,Western blot 已经从定性发展到定量,从自然发光发展到化学发光到荧光。期待更多杰出技术的出现,让 Western blot 更高、更快、更强!

(生物通 余亮)



动态监测 NK 细胞杀伤活性的新工具

自然杀伤 (NK) 细胞能够识别并消灭肿瘤细胞。NK 细胞在各种生理和疾病状态中扮演了重要的角色。对于它们杀伤活性的评估不仅对于癌症、传染病和自身免疫疾病中免疫活性的监控很重要，还能确定调节细胞溶解作用的蛋白。

传统的测量 NK 细胞杀伤活性的方法是放射性的释放分析。用放射性材料 (如 ^{51}Cr) 标记靶细胞，然后加入效应细胞，比如 NK 细胞。NK 细胞对靶细胞的杀伤活性就通过靶细胞溶解后释放出的放射性来进行分析。然而，这种方法很繁琐，不仅因为它需要用到同位素，而且背景很高，因为标记常常会弥漫在靶细胞之外。

Roche 的非标记实时 xCELLigence 系统是目前唯一能够直接监控 NK 细胞介导的细胞溶解，而不需要标记靶细胞或使用任何化学标记的系统。另外，这项由 ACEA 生命科学公司发明的技术还能通过动态监测细胞溶解的整个过程而更准确地评估细胞杀伤活性。

xCELLigence 系统则提供了一种全新的 NK 细胞杀伤活性的非标记体外研究，使用更加简单，数据则更为可靠。xCELLigence 系统的核心是整合在微孔板底部的生物电阻感应器，它能够反映与粘附细胞的生物学状态相关的连续、定量的信息。细胞数量、大小、形态或粘附质量的任何变化都可以实时检测到，而不需要任何指示剂。集成的软件会每分钟自动收集并保存数据。

这种新技术已被研究人员用于在 9 种靶细胞系中动态及定量监测 NK 细胞的杀伤活

性，其中包括在研究领域广泛应用的人肿瘤细胞系 MCF7、Hela 等。靶细胞接种在 E-Plate 微孔板中，系统每 60 分钟动态监测细胞的生长直到细胞进入对数生长期。然后按照不同的 E/T 比 (效应细胞与靶细胞的比例) 将鼠的效应 NK 细胞直接加到每个孔中，这样就可以动态监测 NK 细胞的杀伤活性了。另外，这项技术还成功用于抗体依赖的细胞毒性 (ADCC) 分析，来动态和定量监测抗体介导的癌细胞杀伤活性。

总的来说，这些实验展示了 xCELLigence 系统能用于评估人和鼠的 NK 细胞杀伤活性。这种活性的定量、动态测量不需要任何标记步骤或试剂。而且，xCELLigence 系统得到的数据清楚地显示，在加入 mNK 细胞 12 小时后，杀伤活性能达到 70%。这种最大的杀伤活性出现在传统的孵育时间之后，很容易被现在的终端分析法所错过。因此，xCELLigence 系统不仅提供了非标记的检测，更重要的是，它还通过动态监测细胞溶解的整个过程而更准确地评估杀伤活性。

如果你了解这项技术的更多信息，请访问 www.xCELLigence.roche.com。

(生物通 余亮)

microRNA研究指南

AB Applied Biosystems

Ambion
THE RNA COMPANY®

microRNAs 简介及实验概述	
miRNA 定义和生成.....	1
miRNA 实验概述.....	2
microRNA 分离和富集	
miRNA 分离	
mirVana™ miRNA Isolation Kits.....	3
“miRNA Certified” FirstChoice® Total RNA	3
RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit.....	3
miRNA 富集	
flashPAGE™ Fractionator System	6
microRNAs 的定量和检测	
特定 miRNA 的表达	
TaqMan MicroRNA Assays.....	8
TaqMan MicroRNA Cells-to-CT Kit	10
其它（基于杂交法的检测）	
mirVana™ miRNA Detection Kit	13
mirVana™ miRNA Probe and Marker Kit.....	14
mirVana™ miRNA Probe Construction Kit	15
全局 miRNA 的表达	
TaqMan® Human MicroRNA Array v1.0 (Early Access).....	16
microRNA 功能分析	
Anti-miR™ miRNA Inhibitors	19
Pre-miR™ miRNA Precursor Molecules	20
siPORT™ NeoFX™ Transfection Agent	20
pMIR-REPORT™ miRNA Expression Reporter Vector	21
microRNA 信息资源.....	22
参考信息	
常用细胞系中的 miRNA 相对表达情况.....	24

Affymetrix 技术用于肝毒性检测



德国 Fraunhofer 研究院的研究人员正在利用 Affymetrix 的转录组基因表达技术来开发一种诊断手段，来检测药物诱导产生的肝毒性。

药物诱导的肝毒性是药物治疗中的常见副作用，也是登记过的药物从市场上撤回的最主要原因。现在还没有一种可靠的方法能够预测不同类型的肝毒性。如果有一种工具能进行有效检测，将使美国每年节省 20 亿美元。

这项研究由 Juergen Borlak 教授来领导，他是 Fraunhofer 研究院毒理学和实验医学研

究所的主管，也是汉诺威医学院药物及毒性基因组学研究院的领导。汉诺威医学院是欧洲最大的肝移植中心。

Affymetrix 表示，研究院希望在 2009 年春天推出这种诊断工具。

协议的金融条款没有公布。

（生物通 余亮）

Qiagen 以 1.35 亿美元收购 Corbett

Qiagen 今天表示，它已经收购了总部位于悉尼的生命科学仪器公司 Corbett Life Science。

根据协议的条款，Qiagen 将会支付约 6600 万美元现金，价值 400 万美元的限制普通股和阶段性付款，以及在未来的四年内再最多支付 6500 万美元。

该公司表示，Corbett 是旋转式定量 PCR 仪 Rotor-Gene 的开发商，能扩展 Qiagen 的分子检验解决方案的平台。Qiagen 的仪器、消耗品和许多调控检测本身都已经优化过，适用于 Corbett 仪器。到目前为止，已有 30 多种 Qiagen 的检测根据 Rotor-Gene PCR 仪优化过。

在一份声明中，Qiagen 表示，它在分子检验的最开始两个步骤中拥有领先地位，样本制备和分析设定，但是以前要依赖合作伙伴包括 Corbett 来进行第三步-检测。

Qiagen 将会继续执行“开放平台策略”，使用第三方的检测系统来进行检验，但也计划“显著增加新的调控检测、平台和检测技术的

开发，以应用于 Rotor-Gene 及后继系统”。

Rotor-Gene 是基于特有的离心旋转式设计，有着广泛的光学范围，六个通道的波长跨越 UV 到红外。Qiagen 表示这个系统有“近乎完美的温度和光学的一致性，和快捷的数据获取速度”。

该公司期望这项交易将会在 2008 年下半年带来 1400 万美元的销售额，并为 2009 年全年销售额贡献约 4000 万美元。

Qiagen 表示，此项交易将使其 2008 财年下半年每股盈利减少 2 美分，对 2009 财年业绩不会产生影响，此后则将显著增加其盈利。

Corbett Life Science 的创始人 John Corbett Senior 和 John Corbett Junior 将可能会在 Qiagen 担任顾问。

(生物通 余亮)



定量RT-PCR方便之选

QuantiTect Primer Assays

—— 经过功能验证的定量RT-PCR引物对

QIAGEN 赠送限量版2008奥运赛事日程表！ ——关注奥运，为中国队加油！



QIAGEN 精心制作了**限量版2008奥运赛事日程表**，只需**点击申请**，即可获得！

关注奥运，为中国队加油！

索取2008奥运赛事日程表申请表			
姓名:	<input type="text"/>	Email:	<input type="text"/>
电话:	<input type="text"/>	传真:	<input type="text"/>
职务:	PI <input type="button" value="v"/>		
单位名称/公司名称:	<input type="text"/>	学院/部门:	<input type="text"/>
系:	<input type="text"/>	实验室:	<input type="text"/>
地址:	<input type="text"/>		
区/县:	<input type="text"/>	城市:	<input type="text"/>
省/自治区/直辖市:	上海 <input type="button" value="v"/>	邮政编码:	<input type="text"/>
国家:	中国		

* 红字栏为必填项

QuantiTect Primer Assays —— 经功能验证的定量RT-PCR引物对

- 高效扩增，高特异性高灵敏度检测目标转录本
- 无引物二聚体
- 覆盖七个物种，十三万多个转录本
 - 人 ~ 23374
 - 小鼠 ~ 30616
 - 大鼠 ~ 25047
 - 鸡 ~ 17809
 - 狗 ~ 3317
 - 拟南芥 ~ 25932
 - 果蝇 ~ 13517



德国快而精有限公司上海代表处
Tel: 021-51345678
E-mail: china@qiagen.com

中国地区指定代理商:
基因有限公司
吉泰生物科技有限公司
东胜创新实验技术有限公司

请登陆 www.qiagen.com/GeneGlobe 快速检索你所需要的
QuantiTect Primer Assays

赛默飞世尔收购 Open Biosystems



赛默飞世尔科技 (Thermo Fisher Scientific) 今天表示, 它已经收购了一家私人持有的 RNAi 产品供应商 Open Biosystems。但未透露交易金额。

赛默飞世尔在一份声明中表示, 这次收购显著扩增了其在 RNAi 领域的实力, 因为 Open Biosystems 的短发夹 RNA (shRNA) 与旗下 Dharmacon 的产品线互补, 补充了它的小干扰 RNA (siRNA) 技术。

RNA 干扰是一种阻断基因表达来研究它们的功能及开发针对致病基因的治疗方法的技术。Open Biosystems 专门研究 shRNA 并将 shRNA 导入活细胞的病毒载体系统。该公司提供了人和小鼠全基因组的完整的 shRNA 文库。而赛默飞世尔科技则是 siRNA 方面的领先者。shRNA 和 siRNA 一起代表了当前应用最广的两个 RNAi 平台。

在上个月揭晓的 2008 年生命科学行业奖中, 赛默飞世尔旗下的 Dharmacon 以其出色的产品和领先的技术夺得了 RNAi 产品大奖。而它的 Accell siRNA, 更是不需要任何转染试剂就可以直接被吸收进入细胞, 掀起了 RNAi 领域的新革命。此次收购对于赛默飞世尔来说可谓如虎添翼。

赛默飞世尔科技的总裁及 CEO, Marijn E. Dekkers 表示, 对 Open Biosystems 的收购使我们增加了互补的 shRNA 技术, 大大巩固了我们在合成 RNAi 产品上的市场领先地位。这种前沿技术的组合使我们能够为从事尖端生命科学研究的客户创造出一个强大的工具箱。

Open Biosystems 于 2001 年成立, 总部

位于美国阿尔巴马州的 Huntsville。该公司 2007 年度总收入约为 1400 万美元。除了 RNAi 产品, Open Biosystems 还同时提供 cDNA 及开放读码框载体用于基因表达, 以及定制抗体服务。

赛默飞世尔表示, Open Biosystems 将会整合到分析技术部门。

关于赛默飞世尔

赛默飞世尔科技 (Thermo Fisher Scientific) (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更健康、更清洁、更安全。公司年销售额超过 100 亿美元, 拥有员工超过 30000 人, 在全球范围内为 350000 多家客户服务。主要客户类型包括: 医药和生物公司, 医院和临床诊断实验室, 大学、科研院所和政府机构, 以及环境与工业过程控制装备制造制造商等。公司借助于 Thermo Scientific 和 Fisher Scientific 这两个主要的品牌, 帮助客户解决在分析领域从常规的测试到复杂的研发项目中所遇到的各种挑战。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综合解决方案。Fisher Scientific 为卫生保健, 科学研究, 以及安全和教育领域的客户提供一系列的实验室装备、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, 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，请浏览公司的网站：www.thermo.com.cn

关于 **Open Biosystems**

美国 **Open Biosystems** 为科研和政府实验室的科学家和研究人员们开发、生产和销售遗传研究工具。这些研究工具为研究人员们提供了

标准化的基因、RNAi和抗体，用于探究与肿瘤学、神经科学和代谢紊乱相关的基因功能。

Open Biosystems成立于 2001 年，总部位于美国阿尔巴马州的Huntsville。欲了解更多信息，请访问：www.openbiosystems.com。

（生物通 余亮）