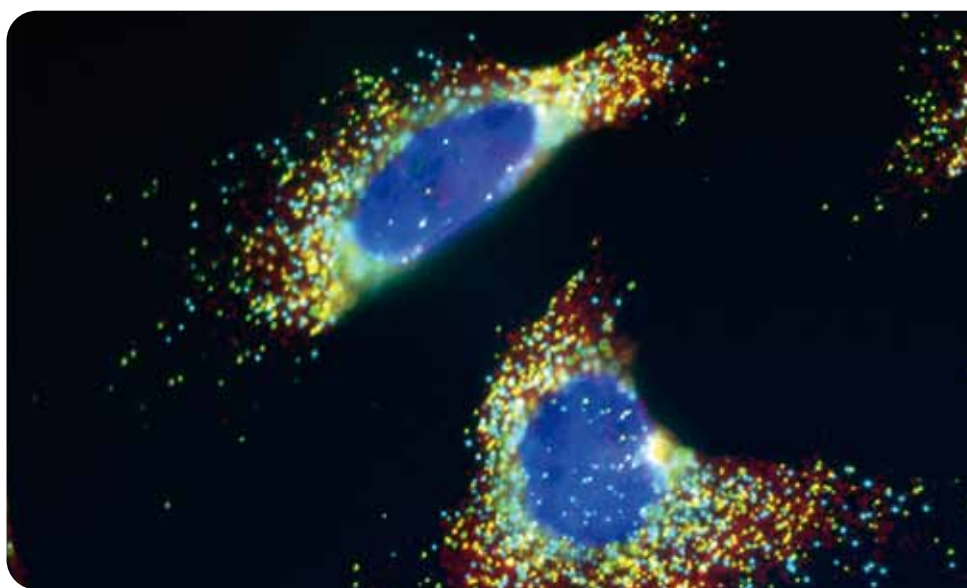


基因快讯

2010年第2期
(总第41期)

GeneExpress



(基因组学与多重检测专辑)

内容提纲

公司动态 1

专题综述

基因表达及其分析技术 2

新技术专题

基因表达分析完整解决方案 4

GWAS研究的有力工具 8

强大的多重检测平台 10

基于Lab-on-Chip的生物大分子检测技术 13

Lab-on-Chip技术在药物筛选, 研发及生产中的应用 15

划时代的RNA原位杂交技术 19

应用文献

高速显微成像流式细胞技术在细胞分析中的应用 21

流式细胞平台新应用——CBA流式液相芯片技术 25

特别推荐

提高基因组、转录组研究效率与数据准确性的技术路线 29

BioTek Synergy™ H4全功能微孔板检测仪在基因组学和多重检测中的应用 31

蛋白质组学研究新思路——蛋白芯片技术 34

Eco™实时荧光定量PCR系统 36

实验指南

特殊样本的RNA提取 38



Gene Company Limited
基因有限公司
A Gene Group Company



Gene Company Limited
基因有限公司

A Gene Group Company



Caliper
LifeSciences

生物大分子多重检测自动化解决方案

真正的Sample-In, Data-Out

LabChip GX生物大分子分析仪:

- 唯一可实现全流程自动化的核酸检测系统
- 适用于DNA及RNA的定性、定量分析及质控
- 28秒/样品: 从上样到完成结果分析, 完全自动化
- DNA分析: 快速筛选、高分辨率、大片段3种模式;
- RNA分析: 提供质量评价分值, 准确直观
- 真正的标准化、自动化、高通量: 配备条码识别, 兼容96/384孔板, 可定义样品特征自动区分筛选阳性阴性结果, 灵活的样品比对, 多种报告格式……

Twister II孔板处理器:

- 储存样品、反应板及耗材, 达成更高的自动化通量;
- 实现样品在工作站、分析仪及PCR仪间的无缝传输

Zephyr基因工作站:

- 预置图形化程序
配合各种主流试剂盒
实现全自动的
- 核酸抽提
 - 样品均一化
 - 梯度稀释
 - PCR/定量PCR/测序/基因分型反应体系构建
 - 产物纯化

可选择整合实时荧光定量PCR
仪或Luminex多重检测系统



应用广泛: 病原体、转基因、种质资源鉴定检测; 大规模测序、基因表达、遗传多态性等基础研究

丰俭由人: 模块式设计, 各组件可独立购买使用并在需要时再行整合

灵活可拓展: 可调整组成及通量以适应用户具体应用, 并可拓展至蛋白组研究及抗体等的研发

公司动态



展会信息:

中国生物化学与分子生物学会农业分会第二届全国代表大会

时间: 2010年11月3日-5日

地点: 湖南长沙

由中国生物化学与分子生物学会农业分会举办的“全国农业生物化学与分子生物学会第二届代表大会暨第九次学术研讨会”将于2010年11月3-5日在湖南长沙召开。会议为全国从事农业生物化学与分子生物学研究和教学人员与国内外相关实验设备、试剂、服务的生产和经销商提供了更好的互动交流平台。

我公司将会参加该展会，并在该展会上有一个简短的讲座，欢迎各位的到来。

第四届荧光定量PCR学习班

时间: 2010年11月14-20日

地点: 厦门大学

实时荧光定量PCR以特异性强、灵敏度高、定量准确、全封闭等优点，已成为基础生物学研究的重要平台技术，并逐渐成为临床诊断新一代标准技术，广泛应用于传染病、肿瘤、遗传病等领域。为使广大一线工作人员全面掌握该技术，同时熟悉该领域的最新进展，分子诊断教育部工程研究中心（厦门大学）在2004、2006、2008年成功举办三届研习班并获得广泛好评的基础上，再次携手国外实时PCR领域知名科学家和实时PCR仪器厂家，举办第四届荧光PCR基础与应用研习班，以推动该技术在我国的研发、应用和开发进一步走向深入。

2011第三届抗体（ICA-2011）/疫苗（WCV-2011）大会

时间: 2011年3月23~25日

地点: 北京

蛋白质和多肽大会（PepCon）是国际性的蛋白质和多肽领域的专业会议，致力于为全球的科学工作者、研究机构和相关企业搭建一个自由交流的平台，促进国际学术交流及商务合作。

从内容上，涵盖了蛋白质/多肽领域各方面的内容。主要有：蛋白质基础科学、蛋白质技术、蛋白质与疾病、人类蛋白质组学技术及疾病蛋白质组学、蛋白激酶、基于蛋白

质和多肽的药物发现、蛋白质表达、蛋白质生物标记物、酶、蛋白质及肽生物材料、蛋白质分析与质量控制、蛋白质工艺研发与制造、肽化学与肽生物学等科技论坛，会议另有项目对接和商务合作等。从会议的组织形式上来看，有专题演讲、学术展板、项目对接、合作洽谈、产品推介会以及企业产品技术展示等多种形式。

在该会议上，我们公司会有两个展台和两个讲座，欢迎大家届时光临。



公司促销信息:

2010年10月15日-2010年12月31日，NEB年底促销活动:

购买超小包装内切酶产品，可享受¥99元超值优惠价格。即日起，购买下列NEB S/L原包装内切酶，随机赠送NEB 100 bp或1kb DNA Ladder，数量有限，送完为止。

BamHI、BamHI-HF、EcoRI、EcoRI-HF、DpnI、HindIII、NcoI、NcoI-HF、NotI、NotI-HF、SalI、SalI-HF、SpeI、XbaI、XhoI

Brady:

买大送小——买IP300，赠送BMP21手持式标签打印机
买一送二——再送贝迪低温冷冻标本管理软件1年免费使用权

Abgent:

一次购买任何1个Abgent 0.1mg规格的抗体（标签抗体除外），即可免费获赠任意1支以AM/AP开头的抗体小包装（25μg）。注：赠送抗体不得和购买抗体识别同一靶蛋白。

更多促销信息请见Gene Focus 2010年第6期



公司活动信息

2010年10月~11月，我公司将全国进行一个大型的Roadshow讲座活动，详情可以通过生物通（www.ebiotrade.com）查询，欢迎大家届时前去参与，我们将有礼品赠送！

编者申明:

- 1.《基因快讯》中所有文章未经允许不得转载。
- 2.《基因快讯》中涉及的产品描述及价格可能会因时限、厂家变动等原因发生一定的变动，请在选择及订购时务必与基因公司销售部门核实，以销售部门信息为准。

基因表达及其分析技术

生命现象的奥秘隐藏在基因组中，对基因组的解码一直是现代生命科学的主流。基因组学研究可以说是当今生命科学领域炙手可热的方向。从DNA测序到SNP、拷贝数变异（copy number variation, CNV）等DNA多态性分析，到DNA甲基化修饰等表观遗传学研究，生命过程的遗传基础不断被解析。

基因组研究的重要性自然不言而喻。应该说，DNA测序技术在基因组研究中功不可没，从Sanger测序技术到目前盛行的新一代测序技术（Next Generation Sequencing, NGS）到即将走到前台的单分子测序技术，测序技术是基因组解析最重要的主流技术。而基因组测序、基因组多态性分析、DNA甲基化修饰等表观遗传分析等在基因组研究中最前沿的课题。但是基因组研究终究类似“基因算命”，再清晰的序列信息也无法真正说明一个基因的功能，基因功能的最后鉴定还得依赖转录组学和蛋白组学，而转录作为基因发挥功能的第一步，对基因功能解析就变得至关重要。声称特定基因、特定SNP、特定CNV、特定DNA修饰等与某种表型有关，最终需要转基因、基因敲除、突变、RNAi、中和抗体等技术验证，并必不可少要结合基因转录、翻译和蛋白修饰等数据。

基因实现功能的第一步就是转录为mRNA或非编码RNA，转录组学主要研究基因转录为RNA的过程。在转录研究中，下面几点是必须考虑的：

1. 基因是否转录（基因是否表达）及基因表达水平高低（基因是低丰度表达还是中、高丰度表达）。特定基因有时候在一个细胞中只有一个拷贝的表达，而表达量会随细胞类型不同或发育、生长阶段不同或生理、病理状态不同而改变。因此任何基因表达检测技术，其是否科学，就是要看能否检测到低丰度表达基因，能否检测到基因丰度的变化尤其是微弱变化，线性范围是否宽广等。这方面的误区在于，很多人过分强调特定技术能否检测到低丰度基因的表达，忽视了特定技术能否检测到基因表达丰度微弱的改变。

如果关注全基因组表达信息，那么目前最经典的技术就是全基因组表达谱芯片技术，这种基因芯片设计了数据库中所有已知基因、EST和预测基因、EST的已知转录本的探针，用来分析全基因组中已知基因、预测基因的已知转录本的表达信息。在利用基因芯片进行转录研究时，应该选择能检测低丰度表达基因的芯片技术，选择可以反映基因表达微弱变化并且线性范围广

的技术，比如Affymetrix公司的转录研究方面的芯片。以GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array 为例，该芯片可以分析多达38500个基因的47400个转录本（而GeneChip® Human Genome U133A 2.0 Array 是对其中14500个well-characterized human genes的18400个转录本进行分析的）。从精确度、重复性、性价比等角度来讲，芯片技术仍然是基因表达研究的首选技术。

除人全基因组表达谱芯片外，Affymetrix公司还可以提供以下物种的全基因组表达谱芯片：大鼠、小鼠、拟南芥、大麦、牛、线虫、狗、鸡、柑橘、棉花、果蝇、大肠杆菌、玉米、苜蓿、绿脓杆菌、蚊子/疟原虫、杨树、猪、恒河猴、水稻、金黄色葡萄球菌、大豆、甘蔗、西红柿、葡萄、小麦、爪蟾、酵母、斑马鱼等。

2. 对mRNA表达而言，更重要的问题是，每个基因的编码区域由若干外显子组成，而特定基因在不同细胞类型中或不同发育、生长阶段或不同生理、病理状态下，外显子存在选择性剪接（alternative splicing），因而会出现不同转录本。不同转录本正是解释同一基因具有不同功能甚至相反功能的遗传基础。因此分析基因表达，不仅要知道基因是否表达与表达水平高低，更重要的是需要知道特定基因表达的转录本是什么。

如果关注全基因组所有外显子表达并希望预测每个基因选择性剪接，那么基因芯片仍然是该方面研究的经典技术。以Affymetrix公司的GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array为例，该芯片可以分析已知及预测的转录区域内的超过1百万个外显子簇的表达，分析选择性剪接。这是迄今为止最全面的、唯一的同时可以研究基因表达与选择性剪接的基因芯片。Affymetrix公司也可以提供小鼠、大鼠的此类芯片，分别分析小鼠的100万个外显子或大鼠的85万个外显子。

3. 基因调节分析。任何基因表达都是受到严格调控的，包括转录因子调控和表观遗传修饰等。如果关注特定转录因子调节的所有基因，那么ChIP on chip技术是必须的。以Affymetrix公司的GeneChip® Human Promoter 1.0R Array为例，该芯片可以分析任何特定蛋白质如转录因子与超过25500个启动子的相互作用。每个启动子覆盖10-12.5kb（转录起始位点下游2.5kb+上游7.5kb，对1300个癌基因而言，上游延长至10kb）。如果分析特定转录因子在特定细胞类型的特定生长、发育阶段或特定生理、病理下调控基因表达的特点，该芯片是很好的工具。该芯片也覆

盖了UCSC in NCBI human genome assembly (Build 34) 中注解的59%的CpG岛, 该芯片同时可以用于DNA甲基化修饰的分析。Affymetrix公司也可以提供小鼠的此类芯片, 分析转录因子与28000个启动子的相互作用。

非编码RNA也是转录组研究的热点, Affymetrix公司的GeneChip miRNA Array可以分析71个物种的数以千计的microRNA与Small nucleolar RNAs (snoRNAs) 的表达。

4. 样本问题。最科学的样本应该是同质细胞。不同细胞类型, 其基因表达是有差异的, 建立细胞类型特异的基因表达数据, 才能真正揭示特定细胞类型基因表达的真实面貌。对于组织, 制作组织切片, 利用(免疫)组织化学技术对特定细胞类型进行鉴定, 进而利用激光显微切割技术分离特定细胞类型, 这是目前从组织中获得同质细胞的关键技术。问题在于组织切片制备和(免疫)组织化学等环节可能造成RNA的降解, 针对这种情况, Affymetrix公司有专门分析福尔马林固定的、石蜡包埋的组织的全基因组表达的芯片GeneChip(R) Human X3P Array, 该芯片设计的每个基因的探针, 都更靠近mRNA 3'端位置, 因为mRNA越靠近3'端越稳定。

对于医学样品的分组, 临床上对疾病、行为等的诊断、分类的公认标准是转录分析中对样本分组的必不可少的参考, 比如肿瘤样本的病理学判读、血液分析中的各种参数、心脑血管分析中的各种参数、精神类疾病诊断中的行为学参数等。优秀的高级别的科学论文, 往往在样本分组分类上非常严格, 描述很清晰, 篇幅很大。没有合格样本及没有合格样本分组, 任何下游分析技术都无法得出有价值数据。

5. 候选基因表达分析技术。在实际研究中, 经常会遇到两类转录分析, 全基因组表达分析与候选基因表达分析。

应该说, 只有通过全基因组表达分析, 才能了解特定生命过程相关的所有基因表达, 从中鉴定出特定生命过程的关键候选基因(如转录因子)及相关基因的网络、信号通路。

关于候选基因表达分析技术, 在实时定量PCR技术独领风骚很多年后, 新的技术不断冲击, 包括Affymetrix公司的Branch-DNA技术。该技术在分析基因表达时, 不是基于将模板进行PCR扩增的原理, 而是检测杂交于特异基因的一组特异探针的信号, 避免了PCR过程引发的很多问题, 而且可以进行单基因表达分析或3-36个基因表达的多重分析。本期基因快讯有专门介绍Branch-DNA技术的文章。相信Branch-DNA技术很快会成为候选基因表达分析的主流技术。

总之, Affymetrix全基因组表达谱芯片等技术被广泛应用于人类和动物生命科学的基础研究中, 如鉴定发育、

生长、分裂、分化、细胞凋亡、信号转导等重要生命过程的相关基因, 鉴定疾病相关基因。大量的研究正在利用基因芯片技术鉴定癌症发生发展和转移的基因, 对癌症进行分子分类/分期, 寻找癌症分子机制的关键分子, 为癌症诊断筛选重要标志分子, 为癌症治疗筛选重要的靶分子, 预后分析等。

而在作物遗传育种领域, 针对转基因生物新品种培育, 全基因组表达谱芯片等技术也大有作为:

1. 高产、抗逆、优质等农业优良性状相关基因的鉴定: 每个物种在自然界中都有不同品种, 传统育种也产生了很多栽培种。不同品种、栽培种间性状差异很明显, 因此深入分析表型差异的遗传机制, 鉴定高产、抗逆、优质等农业优良性状相关基因对转基因育种很重要。利用中国丰富的种质资源, 通过各物种全基因组表达谱芯片技术, 可以分析作物各种表型的分子机制, 并从数以万计的基因中鉴定农业优良性状相关基因, 为转基因作物提供目的基因储备。Affymetrix可以提供多个物种的全基因组表达芯片, 包括: 大豆基因组(包括大豆线虫基因组、大豆疫霉菌基因组)、玉米、小麦、大麦、水稻、苜蓿(含固氮菌)、杨树(包括胡杨)、葡萄、西红柿、拟南芥、猪、牛、鸡、甘蔗、棉花、柑橘等。

2. 转基因生物安全的评估: 转基因生物安全的评估需要从多层次综合进行, 系统比较基因修饰作物与传统育种作物是必须的。国际上这方面的评估正在形成相关理论技术体系, 具体包括: 基因组层次(转进去的目的基因是否对作物基因组稳定性产生影响), 转录组层次(从基因转录水平上评估转进去的目的基因及其表达是否对作物全基因组表达产生影响), 蛋白组层次(转进去的目的基因的蛋白产物是否对作物蛋白组学特征产生影响)。其他包括代谢组层次, 功能特征分析等。转录组学层次的分析是至关重要的, 而且技术相当成熟。已经有科学家做了初步研究, 结果显示: 传统育种的大豆不同栽培品种间基因表达是有差异的, 这也从遗传机制上解释了大豆不同栽培品种间为什么有性状差异; 更重要的是, 该研究也显示, 转基因大豆与其相应的对照栽培种间的基因表达差异非常小, 也就是说, 转基因大豆与其相应的对照栽培种间的基因表达本质是一致的! 拟南芥的相关分析也证明, 转基因拟南芥与非转基因拟南芥间的基因表达本质是一致的! 拟南芥在胁迫环境下基因表达的变化远大于转进去的目的基因对拟南芥基因表达的影响! 玉米、水稻、小麦、大麦等物种的相关分析也在进行。当然不同的物种、不同的目的基因对安全的影响可能不一样, 安全性评估目前只是开始, 大量的评估还需要做, 而基于基因表达谱芯片技术的转录组水平的分析是非常重要的技术。

基因表达分析完整解决方案

随着扫描技术发展, 分析方法的改善, 序列选择和探针设计的优化等, 使得研发人员在一张芯片上可以设计更多的高质量探针。另外, 芯片生产工艺的改善, 使得探针的密度也显著提高。Affymetrix公司采用光蚀刻的专利技术, 第一个将已知物种(人、小鼠、大鼠等)的基因组设计在单一的芯片上, 从而大大方便了研究者。并注册了“GeneChip”商标, 因此“GeneChip”也成为了Affymetrix芯片的代名词。Affymetrix公司作为基因芯片的领头羊, 在表达谱分析和基因组SNP分析等众多领域开发了世界领先的技术和产品, 尤其在表达谱分析领域更是一马当先, 形成了整套的分析方法, 这包括: 基因芯片系统的开发, 芯片及配套试剂的研发和生产, 芯片筛选基因的验证试剂盒等。从而涵盖了从芯片海量筛选差异表达基因到最终验证有效基因的整个过程, 为研究者提供了全套的表达谱研究的解决方案。

一. 基因芯片系统



图1 GeneChip Scanner 3000 7G System

1. GeneChip Scanner 3000 7G System (图1)

目前市面上广泛使用的Affymetrix基因芯片系统为Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G System。利用这一套系统, Affymetrix公司研发并推出了多种类型的芯片和配套试剂盒, 可以完成除了定制SNP以外的所有工作, 这包括了所有的表达谱研究, 当然也包括了全基因组DNA marker的研究工作。该系统包括了以下部分: Scanner 3000 7G扫描仪, FS450洗染工作站, Hyb645杂交炉。如果实验通量较高, 可以选配Autoloader自动加片机。

(1) GeneChip Scanner 300扫描仪

该扫描仪是针对全基因组分析开发的新一代的扫描

仪, 采用了“flying objective”的共聚焦技术, 使用了较大的光圈, 从而大大提高了信号收集的效率。该扫描仪分辨率可以达到16bit, 即可以分辨超过65000级别的荧光信号。同时, 该扫描仪还具有自动调零的亚系统, 从而在降低扫描背景的同时, 最大限度的稳定的获得荧光信息。因此GeneChip Scanner 3000扫描仪在确保高信噪比的同时, 还提供较宽的线性扫描范围, 显著提高了扫描速度。

(2) The GeneChip Fluidics Station 450 (FS450)

为了得到芯片数据的连续性和稳定性, 芯片洗染的条件尤为重要。也就是说, 只有芯片在受到同等的洗脱和染色强度的作用后, 众多的芯片数据才有更好的可比性。而针对不同类型的芯片, FS450都内嵌了对应的洗染程序, 通过芯片种类和洗染程序一一对应的关系, FS450得以完成了此项工作。在使用FS450自动洗染工作站时, 只要放置好相应的洗液和染液后, 选择正确的洗染程序, 即可开始。整个洗染过程可以无人看管, 因此操作简单, 并且大大提高了研究者的工作效率。

(3) The Hybridization Oven 645

在高密度芯片探针和高质量样本结合的过程中, 精确控温和控制转速的旋转方式无疑是最好的选择。杂交炉645正是完成了此项工作。每种类型的芯片杂交条件都是固定在protocol中, Oven645精确的控温, 大范围的温度和转速设定区间, 则可以满足所有Affymetrix芯片的杂交条件。值得一提的是, 一台杂交炉一次最多可以杂交64张芯片, 足以满足高通量客户的需求。

目前市面上与GeneChip Scanner 3000 7G System配套的表达谱产品种类繁多, 使得Affymetrix产品在表达谱领域得到了最为广泛的应用。



图2 3'表达谱系列

2. 3'表达谱系列(图2)

正如大家所知,在真核生物基因形成mRNA的过程中,一个基因的外显子和内含子都转录在一条原始转录物RNA分子中,通过剪切掉内含子之后,在5'端加上“7-甲基鸟核苷三磷酸”帽子,在3'端加上“Poly(A)”尾巴。基于转录3'-5'的方向性,可以将探针主要设计在基因的3'端;基于3'端加上“Poly(A)”尾巴的特性,可以设计出相应的试剂盒,从而使得mRNA的信号得以扩增和检测。基于上述原理,Affymetrix研发出了众多芯片种类和配套的试剂盒,产品几乎涵盖了科研领域所有物种。

实验基本原理如下:

- 1) 提取质量合格的总RNA。
- 2) 配制转录试剂Mix,完成从mRNA到cDNA的反转录过程。
- 3) 消解原始mRNA,通过碱基互补,形成cDNA双链。
- 4) 使用生物素标记的dNTP,进行体外转录(IVT),扩增信号的同时,标记了生物素。
- 5) 片段化扩增产物,使得核酸大小和芯片上探针的长短匹配,提高杂交效率。
- 6) 杂交16个小时。
- 7) 使用洗染工作站洗染芯片,标记上荧光。
- 8) 扫描芯片,得到信号值。
- 9) 分析数据。

科研工作者使用该系列产品,获得了丰富的科研成果。仅“Human Genome U133 Plus 2.0 Array”一种产品在近三年,已经在众多著名期刊上,发表了超过2000篇高质量的文章。如Harewood, L.等在Genome Research发表文献,研究了诱导型的核内移位重组以及对表达的影响; Rouam, S.等在BMC Bioinformatics发表文献,研究了在基因组癌症研究中众多的预兆因子,并成功修订了预兆分子列表; Albert, T. K.等在Genome Biology发表文献,研究了基础核心启动子在人类细胞中如何调控辅助因子和启动复合体的平衡。随着产品包含信息的完善和实验原理的优化,可以说3'表达谱系列产品不仅在过去和现在硕果累累,而且在将来也会发挥重要的作用。

3. 全转录本表达谱系列(图3)

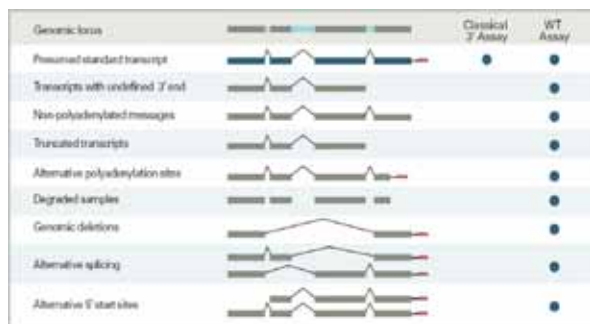


图3 全转录本表达谱系列

3'表达谱系列基于的原理条件为:每个基因的3'端注解明了,且3'端都具有完整的polyA尾巴。因此虽然其应用广泛,但是并不适合所有的基因表达情况。因此,Affymetrix推出了全转录本表达谱系列产品。该系列产品和3'表达谱系列产品最为重要的不同之处在于:设计的探针较为均匀的针对转录本的不同区域,而不是仅仅局限在3'端。由于探针主要是针对外显子设计,因此该系列产品根据可检查外显子的数目和针对每个外显子设计探针数目的多少,可以分为两个亚系列:exonST芯片系列和geneST系列。顾名思义:exonST芯片系列可以检测每个外显子,因此需要更高要求的信噪比,所以实验时要去除样本中的核糖体RNA;而geneST系列由于其设计只是针对个别外显子,因此得到的是整个转录本是否转录的信息,实验时可以直接采用总RNA直接进行芯片实验。全转录本表达谱系列产品是对3'表达谱系列产品的一个重要补充。该实验基本原理和3'表达谱系列产品基本相同,不同之处为:

- 1) 从mRNA到cDNA的反转录过程中使用的为随机引物,并非针对3'端polyA尾巴的多聚T核苷酸片段。
- 2) 体外扩增时,并未使用生物素标记的NTP。
- 3) 体外扩增后,多增加了一个步骤:从RNA反转录成cDNA,增加样本和探针的结合效果。
- 4) 片段化的过程并非通过物理条件裂解,而是通过酶切的方法。
- 5) 标记过程是通过酶标的办法。

通过上述步骤,使得样本信号更加真实,样本片段和探针的结合效率更高,实验反应条件更加温和可控。

全转录本表达谱系列产品推出了2年左右的时间,在科研领域得到较好的应用,目前仅“Human Gene 1.0 ST Array”一种产品已经在众多著名期刊,发表了近60篇高质量的文章。Samuels, A. L.等在BMC Genomics发表文献,利用小鼠异种移植模型体系研究了人急性淋巴细胞白血病表达谱的情况。Philippidou, D.等在Cancer Research发表文献,研究了人黑色素瘤细胞中MicroRNA调控基因的表达情况。Mattera, L.等在Plos Genetics发表文献,研究了E1A偶联的p400蛋白调节人类肝细胞分化的情况。

由于其设计原理更加合理,有理由相信全转录本表达谱系列产品在表达谱研究领域会发挥越来越重要的作用。

4. MicroRNA(图4)

MicroRNAs(miRNAs)是一种小的内源性非编码RNA分子,大约由21—25个核苷酸组成。这些小的miRNA通常靶向一个或者多个mRNA,通过翻译水平的抑制或断裂靶标mRNAs而调节基因的表达。随着MicroRNA研究的走热,Affymetrix推出了MicroRNA芯片,并且和Genisphere公司合作研发了相应的试剂盒——

FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kits。该芯片主要特点如下：

- 1) 信息含量为市面上同类产品之最，几乎包含了科研和药物研发针对的所有物种信息，并且包含了Sanger miRNA信息和snoRNAs and scaRNAs信息。
- 2) 可在Affymetrix目前仪器系统上完成实验，并在实验过程中设计了质控探针。
- 3) 由于可在Affymetrix目前仪器系统上完成实验，因此实验不仅方便，而且成本很低。24个小时即可完成整个实验流程。步骤如下：
 - a. 在MicroRNA末端加上polyA尾巴。
 - b. 在polyA尾巴后加上Genisphere公司专利技术的标记有大量生物素的3D-DNA。
 - c. 杂交芯片。
 - d. 洗染芯片。
 - e. 扫描芯片。
 - f. QC分析和数据分析。

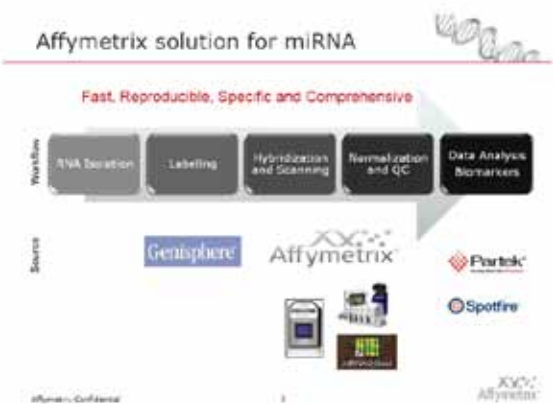


图4 MicroRNA



图5 GeneAtlas™ Personal Microarray System

二. GeneAtlas™个性芯片系统（图5）

正如大家所想，几乎每一个生命科学工作者都想对复杂的生命体有个整体的基因组的了解，基因芯片系统提供了最为有力的工具。然而由于芯片系统复杂且价钱昂贵，并不是所有科研工作者都能够如愿已偿，他们不得不选择价钱低廉但是功能有限的基因组研究工具。针对此情况，Affymetrix开发了新的芯片系统——GeneAtlas™

Personal Microarray System。该系统目前只是针对表达谱研究。该芯片系统包括杂交模块、洗染模块、成像模块等，完全可以完成大型基因芯片系统表达谱研究的工作。由于针对该系统研发的芯片采用了新的格式（4张芯片放在一个模块上，一起操作），因此具有以下优势：

- 1) 杂交方式简单，不用配备另外的杂交装置。
- 2) 节省样本，对珍稀样本尤其有意义。
- 3) 手工操作时间缩短，实验操作流程简化。

Affymetrix不仅提供了简化的芯片系统和protocol，同时和Partek软件公司开发针对此格式的数据分析方法，使研究者得到了具有生物学意义的筛选结果，而不仅仅是数据。并且分析软件是打包在该系统中，客户可以有效使用1年。至于样本的处理方法，则和上述普通卡夹式芯片类似，这里不再重复。

三. Partek芯片数据分析系统

表达谱研究者根据自己的需要，选择上述Affymetrix表达谱产品，得到了大量的数据。下一步的关键工作就是做处理组样品和对照组样品的比较研究，从而找到差异表达的基因列表。该工作需要分析软件来完成。而Partek芯片数据分析软件正是此行业的佼佼者，其主要特点如下：

- 1) 对计算机的要求较低，在相对较低的计算机配置上即可完成大量数据的分析工作。
- 2) 人机交互的图像界面友好，加上针对每种应用都有提示操作的Workflow，使得操作极其简单，方便易用。
- 3) 与主流数据库兼容，可以方便的得到筛选数据的具体信息。

就表达谱分析流程简单，基本如下：

- 1) 导入cel文件（Affymetrix数据格式）。
- 2) PCA（主成分分析）分析，筛选影响因子。
- 3) ANOVA多组分分析（图6），得到差异表达基因列表。
- 4) 根据参数，筛选出感兴趣基因。
- 5) 图表制作，使筛选结果更加清晰明了。
- 6) 链接生物学信息数据库，诠释基因信息。

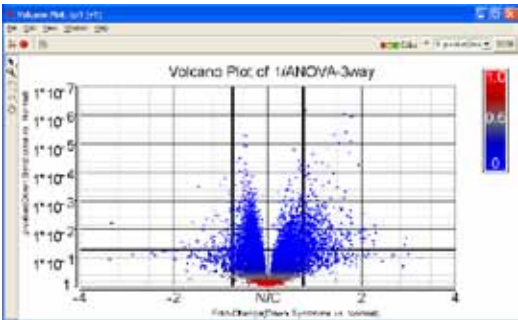


图6 Partek ANOVA多组分分析

四. Panomics Branch-DNA检测体系 (图7)

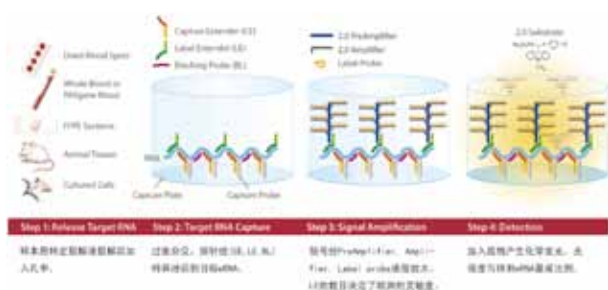


图7 Panomics

通过上述工作，我们得到了一个差异表达的基因列表。接下来必须要做的工作就是对列表中的每个基因进行逐一验证，从而最终确定筛选出来的基因是否符合真实情况。一般而言，科研工作者会选择定量PCR的方法，这也是现在最为广泛使用的方法。但是由于该方法存在热循环扩增的过程，真实信号会打一个不稳定的折扣。因此不需要热循环扩增的验证法得到的信息更为真实有效。Panomics产品正是在这个领域一枝独秀。Panomics Inc. 位于美国硅谷，2008年并入Affymetrix。专精于基因表达精细定量、蛋白质定量图谱以及转录因子和癌症研究的整体解决方案。其产品特点如下：

- 1) 无需抽提RNA/DNA，无需反转录，无需PCR扩增。
- 2) 经探针杂交与信号放大即可迅速得到比Real-time PCR更加精确的定量结果。
- 3) 可分析各种样本（组织，细胞，血液，福尔马林浸泡，石蜡包埋等等），只需用特定裂解液裂解即可。
- 4) 对样本下限无要求（只需mRNA拷贝数在检查范围内）。
- 5) 精确度、准确性、重现性均高于Real-time PCR (Nat. Biotech. 2006,24 (9) ,1115-22)。
- 6) 操作极其简单，无需昂贵设备，用普通化学发光检测仪检测读数。
- 7) 该技术也可用于转基因动植物的DNA拷贝数检测，DNA拷贝数变化等分析用途。

其实验步骤非常简单，基本如下：

- 1) 样本用特定裂解液裂解后加入孔中。
- 2) 过夜杂交，探针组 (CE,LE,BL) 特异性地识别目标mRNA。
- 3) 信号经PreAmplifier，LaberProbe逐层放大。IE的数目决定了检查的灵敏度。
- 4) 加入底物产生化学发光，光强度与待测mRNA量成比例。

随着技术的发展，Panomics在检查单基因的Quantigene 2.0系列产品后，推出了Quantigene Plex 2.0系列产品，每孔

可以检查3—36个基因，大大提高了工作效率。

综上所述，Affymetrix及其合作厂家，为表达谱研究提供了完整的解决方案。不仅可以完成传统意义上利用芯片大规模、高通量筛选基因的工作，而且还可以完成芯片数据分析和最终感兴趣基因的确认等工作。Affymetrix及其合作厂家产品随着表达谱研究的进展在不断的升级，真实反应客观事实和实验条件优化的同时，大大降低实验成本，这些努力都极大方便了科研工作者。因此我们有理由相信，Affymetrix及其合作厂家产品必将在表达谱研究领域发挥越来越重要的作用。

参考文献：

1. The effect of translocation-induced nuclear reorganization on gene expression. Harewood, L. et al. Genome Research 20(5), 554-64, 2010.
2. Research article Identifying common prognostic factors in genomic cancer studies: A novel index for censored outcomes. Rouam, S. et al. BMC Bioinformatics 11, NPG, 2010.
3. Basal core promoters control the equilibrium between negative cofactor 2 and preinitiation complexes in human cells, Albert, T. K. et al. Genome Biology 11(3), NPG, 2010 .
4. Validation of a mouse xenograft model system for gene expression analysis of human acute lymphoblastic leukaemia. Samuels, A. L. et al. BMC Genomics 11, NPG, 2010 .
5. Signatures of MicroRNAs and Selected MicroRNA Target Genes in Human Melanoma. Philippidou, D. et al. Cancer Research 70(10), 4163-73, 2010 .
6. The E1A-Associated p400 Protein Modulates Cell Fate Decisions by the Regulation of ROS Homeostasis. Mattera, L. et al. Plos Genetics 6(6), NPG, 2010 .

GWAS研究的有力工具

——新一代基因分型整体解决方案Axiom

全基因组联研究（Genome-Wide Association Studies, GWAS）是指通过对大规模的群体DNA样本进行全基因组高密度遗传标记（如SNP或CNV等）分型，从而寻找与复杂疾病相关的遗传因素的研究方法。GWAS在全基因组层面上，开展多中心、大样本、反复验证的基因与疾病的关联研究，全面揭示疾病发生、发展与治疗相关的遗传基因，为全面系统研究复杂疾病的遗传因素掀开了新的一页，为我们了解人类复杂疾病的发病机制提供了更多的线索。与以往的候选基因关联分析策略明显不同的是，GWAS不再需要在研究之前构建任何假设，即不需要预先依据那些尚未充分阐明的生物学基础来假设某些特定的基因或位点与疾病的关联。目前，科学家已经在阿尔茨海默、乳腺癌、糖尿病、冠心病、肺癌、前列腺癌、肥胖、胃癌等一系列复杂疾病中进行了GWAS并找到疾病相关的易感基因。我国科学家也在银屑病、精神病和冠心病等方面开展了GWAS研究并取得成效。

在GWAS研究过程中，对SNP进行基因分型是非常关键的步骤。人类的SNP数量多，分布广泛。据估计，人类基因组中每1000个核苷酸至少就有一个SNP，人类30亿碱基中共有300万以上的SNP，而实际存在的SNP数量远远不止300万。对于数量如此巨大的SNP进行分型，无疑是一项艰巨的任务。传统的SNP分型方法因通量远远无法满足要求而在GWAS中无法获得应用。随着基因芯片技术的不断成熟与发展，大规模的SNP同时分型逐步成为可能，这也为GWAS的不断深入打下了技术基础。

昂飞公司（Affymetrix）作为世界上最早研制和开发基因芯片的公司，在近20年的发展过程中，不断探索与创新，广泛与各大研究机构开展深入的应用合作。其基因分型芯片Genome-Wide Human SNP Array 6.0是学者们广泛采用的GWAS过程中SNP分型的明星产品。作为探针覆盖最广最均匀，信息量最大的全基因组关联分析工具，SNP 6.0芯片包含多于1800,000个人类遗传变异的标记，其中约906,600个SNP，另有约946,000个探针用来检测拷贝数差异。SNP Array 6.0芯片具有高性能、高质量、低成本的优点，可以快速的检测人群体之间的基因差异。

随着大规模测序技术的逐渐推广，研究者获得了越来越多的人类基因组测序数据。经分析发现，这些资料在某种程度上颠覆了以前研究者对于人类基因组的固有看法。例如，现在发现SNP的数量远远超过当初的估计，其总数超过三千万个；通过测序发现，不同种群的人类其SNP的组成差异非常大，远远超过以前的估计；对于低频率的SNP作用也有了全新的认识，研究人员越来越看重其与疾病之间的关联关系。与此同时，研究者对于研究手段和技术也提出了更高的要求，大量样本的研究要求单个样

品成本的控制和不断提高通量以缩短研究周期。为满足上述需求，昂飞公司开发了新一代产品，将杂交的敏感性同联接反应特异性结合起来用于DNA的分型，这就是新一代Axiom基因分型整体解决方案。Axiom基因分型整体解决方案在芯片容量、实验通量以及个性化定制方面取得了极大地突破，是具有革命性的新一代基因分型平台。Axiom基因分型平台支持全基因组关联和候选基因关联研究，研究者将不再受困于固定内容的芯片。

一. Axiom基因分型整体解决方案主要特点

1. 可变的芯片内容——在不远的将来，客户可以在昂飞庞大的数据库内挑选SNP来组建Axiom微孔板芯片，以后甚至可以扩展到不同物种上，根据客户提供的SNP信息来设计自己的Axiom芯片，从而达到真正意义上的定制。
2. 极高的实验通量——仅需极少操作人员，即可在一周内一套平台上完成768个样品的实验，业界通量最高。
3. 检测插入和缺失SNP突变——通过技术的革新，Axiom平台可以检测单个SNP插入和缺失突变。
4. 突出的性价比——在有限的预算内可以检测扫描更多的DNA样品。
5. 超群的可信度——起点到终点的全自动化以及优化后的试剂盒确保得到可信的数据。



图1 Axiom芯片和GeneTitan系统

二. Axiom基因分型整体解决方案

1. Axiom™ 人类全基因组微孔板芯片，其设计策略是以最大程度覆盖欧美、亚洲及非洲人群的常见和新型SNP，以及重要的插入和缺失突变。
2. 验证过的基因组生物标记数据库，包括来自于HapMap以及人类基因组国际千人计划的最新内容，这些都可以协助客户自己来设计Axiom芯片。
3. Axiom™ 自动化试剂盒——与Axiom芯片配合使用。
4. GeneTitan™ 多通道自动化芯片工作站及其它配套设备，形成起点到终点的全自动化工作流程。
5. 免费软件Genotyping Console™ Software（GTC）来

完成SNP分型的数据分析工作。

三. 简单直接的实验流程

全新的基因分型平台采用酶介导、单碱基测序步骤来确保实验的低成本、分型结果的高度重复性和流程的全自动化。Axiom芯片实验整个操作流程简单直接，整个实验仅需200ng的起始DNA，在全基因组扩增后将产物随机片段化为25到125bp之间的片段。这些片段纯化后进行重悬，与Axiom人类全基因组微孔板芯片进行杂交。杂交过程完成后进行严谨性洗涤，非特异性背景会被去除而特异性结合被保留。这使得背景噪声降低到最低程度。每一个SNP通过芯片表面所发生的多色联接反应来鉴别。当联

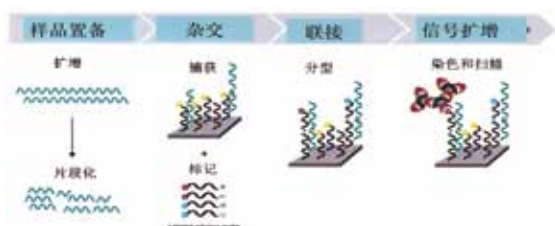


图2 Axiom实验样品处理过程

接反应完成后，芯片将会在GeneTitan多通道自动化芯片工作站上完成染色洗涤等步骤，最后进行扫描并输出结果。

四. Axiom芯片SNP筛选过程

昂飞公司采用新研发的基于联接反应的DNA分型实验在HapMap 3项目中1300个样本内筛选了dbSNP build 128中的SNP，同时也得到了大量宝贵的非-HapMap的SNP筛选结果。这些SNP筛选结果从各个角度进行仔细衡量，例如每个SNP都会考察在分型实验上的表现度、HapMap结果的一致性（如果有HapMap分型结果的话）、分型图形簇的差异、MAF、重复性等方面的特点。最后一共筛选出约180万个（包括单碱基的插入和缺失）各方面表现良好的SNP。此外，随着国际千人计划结果的公布，昂飞公司将新发现的几百万个SNP也加入到筛选的行列。选择好SNP之后，是在Axiom芯片上安排SNP探针。首先考虑特定人群中常见和稀少SNP的覆盖度，然后其他指标如LD和分型实验表现情况也会加以考虑，如果某个SNP在以前的研究结果中已被证实其重要性，则会放在Axiom芯片上，最后加入具有其他重要生物学功能的SNP内容。实际实验结果表明，Axiom的平均分型检出率超过99%，与HapMap数据库分型结果的一致性大于99.5%。

五. Axiom全基因组ASI东亚人群芯片

2010年4月26日，昂飞公司宣布推出Axiom全基因组ASI东亚人群芯片。这是第一款针对东亚人群所推出的GWAS研究产品，以最高程度覆盖东亚人群的生物标记，尤其是中国以及日本人群。这款芯片是继Axiom欧美人群芯片之后第二个目录产品。Axiom全基因组ASI东亚人群芯片为研究者提供了一种在亚洲人群中发现疾病遗传基础

的全新工具，同时这款芯片也兼顾了其他人群，它的高通量和高覆盖率的特点，使其成为家系、人群和个性化医疗研究的强大工具。有证据显示，疾病在不同人群中发病率和发病程度的差异依赖于遗传背景。针对特定人类人群的GWAS芯片可以大大促进研究者对于人群特异性遗传变异的研究工作。研究者借助这款芯片可以检测相关人群特异性等位基因关联的信息。随着亚洲人群遗传学研究的深入，Axiom全基因组ASI东亚人群芯片可以准确地鉴定出与疾病相关的等位基因。全基因组ASI东亚人群芯片也优



图3 Axiom全基因组ASI东亚人群芯片包含的内容

化了对已知疾病关联标记、X和Y染色体、线粒体基因组和ADME基因的覆盖程度。芯片信息还包括了来自国际千人基因组计划和国际HapMap2和HapMap3计划中中国汉族种群和日本东京种群的资料。

完整的Axiom东亚人群基因分型方案由Axiom全基因组ASI东亚人群板式芯片、Axiom完整试剂盒、昂飞公司和Beckman联合开发的自动化样本处理工作站以及GeneTitan多通道自动化芯片工作站组成。GeneTitan多通道自动化芯片工作站整合了杂交炉、芯片洗涤、CCD图像处理和分析软件。科研人员可以每周运行768个样本，明显优于其他竞争产品。ASI东亚人群芯片给研究者提供了一个在东亚人群中寻找与复杂疾病相关新型遗传变异信息的完整解决方案，这个方案对致力于研究亚洲人群中疾病的遗传复杂性是个非常理想的选择。目前，这一芯片已被东南亚的一家研究所率先应用于GWAS研究项目。

随着Axiom平台的不断成熟和发展，在不久的将来，客户可以得到完全的芯片定制服务。客户可以提交各种物种的SNP清单，经昂飞公司验证后即可合成定制Axiom芯片。



图4 Axiom芯片获取流程

强大的多重检测平台

——Panomics/Luminex多重核酸与蛋白定量检测平台

Luminex多重核酸、蛋白定量检测平台又称作液相芯片，是基于xMAP技术（flexible Multi-Analyte Profiling）的新型生物技术平台。xMAP技术最早在1997年由美国Luminex公司开发，可用于免疫学、蛋白质、核酸检测、基因研究等领域，已成为一种新的蛋白质组学和基因组学研究工具。Luminex的代表产品 Luminex® 100/200（图1）以及新推出的FLEXMAP 3D多功能流式点阵仪，是唯一得到美国FDA批准的，也是唯一被纳入美国临床实验室质控网络的高通量诊断技术，被国际业界专家评价为临床诊断的趋势性技术之一。



图1 Luminex 100/200多功能流式点阵仪

一. Luminex多重检测平台技术原理

Luminex多重检测平台主要由4部分构成：生化试剂、微球、流体和光学设备以及高速电子处理设备。其核心技术是基于xMAP微球技术的液相芯片检测系统，在不同荧光编码的微球上进行抗原—抗体、酶—底物、配体—受体的结合反应及核酸杂交反应，通过激光分别检测微球编码和报告荧光来达到定性和定量的目的，一个反应孔内可以完成多达100种不同的生物学反应。

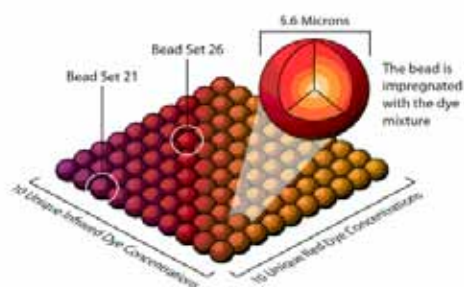


图2 100种经荧光编码的微球

1. 编码微球：分别用不同配比的红色和橙色两种荧光染料(这两种染料各有10种不同区分)将直径5.6μm的聚苯乙烯微球（beads）染成不同的荧光色（图2），从而获得多达100种经荧光编码的微球（最新的FLEXMAP 3D可

达到500种编码微球）。不同颜色微球在分类激光激发下产生的荧光互不相同，这种分类荧光是识别不同微球的唯一途径。利用这100种微球，可以分别标记上100种不同的探针分子。

2. 交联探针、抗体或抗原：把针对不同检测物的核酸探针、抗体或抗原以共价方式结合到特定荧光编码的微球上（图3）。

3. 检测反应：先把针对不同检测物的、用不同荧光色编码的微球混合，再加入被检测物。悬液中的微球与被检测物特异性结合，结合物被标记上报告荧光。

4. 激光分析：微球成单列通过两束激光，一束判定微球的荧光编码；另一束测定微球上的报告分子的荧光强度。红色激光可将微球分类，从而鉴定各个不同的反应类型（即定性）；绿色激光可确定微球上结合的报告荧光分子的数量，从而确定微球上结合的目的分子的数量（即定量）。因此，通过红绿双色激光的同时检测，完成对反应的实时、定性和定量分析（图4）。



图3.探针以共价方式结合到特定荧光编码的微球上

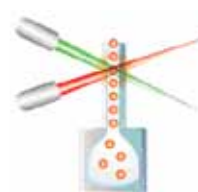


图4.红绿双色激光分析

二. Luminex多重检测平台技术优势

Luminex 多重检测平台最突出的优势在于：仅需少量样本即可同时定量检测同一样本中多个不同的目的分子，即多重检测。具体，有以下显著优势：

1. 高通量：可对同一样本的多个目的分子同时分析。理论上说，检测的通量等于微球的种类数，即最多达100种。

2. 样本消耗量少：由于同一反应孔内可同时完成100种不同的目的分子检测，所以大大节省了样本用量；且由于微球体积小巧，少至1μL的样本即可检测。

3. 操作简单、快速：由于是液相体系，反应时间大大缩短，多重细胞因子检测，2~3小时内可完成。

4. 灵敏度高：微球表面积大，每个微球上可固定10万个探针，保证了能最大程度与样本内的目的分子结合，提高检测灵敏度。最低检测浓度可达0.1pg/mL。

5. 特异性强：可读取单个微球上的荧光信号，自动区分结合与未结合微球。

6. 准确性高：无需洗涤，微球上的报告分子荧光强度与结合的待测分子成正比。由于Luminex检测平台的检测范围大，因此不需要像ELISA检测进行稀释，进一步减少误差。

7. 重复性好：Luminex检测平台直接读取荧光值，更稳定、灵敏；每种微球检测100个，取中值作为结果，相当于每个样本重复检测了100次。

8. 费用低：同时检测一个样本的多项指标可节约时间、样本、试剂、耗材和劳动，降低检测成本，提高分析效率。

9. 灵活：用户只需要增减带有探针的微球和标记分子即可满足不同检测项目的需要。

三. Luminex多重检测平台技术应用

Luminex多重检测平台是一种非常灵活的多元分析平台，在核酸、蛋白质等生物大分子的大规模分析中具有巨大的应用潜力，可用于免疫分析、核酸研究、酶学分析、受体—配体识别分析等众多领域的研究，蛋白质—蛋白质相互作用、蛋白质—核酸相互作用分析等都可以在同一个平台上实现。

1. 可溶性蛋白分子定量检测

Luminex多重检测平台广泛应用于细胞因子检测、病原体的检测和分型、HLA分型、细胞信号转导通路研究以及过敏原筛选、自身抗体筛查、肿瘤标志物检测等诸多方面。国外多家公司已推出了商品化的细胞因子液相芯片检测试剂，比如Affymetrix公司的Panomics Procarta® Cytokine Profiling Kits, R&D公司的Fluorokine MAP系列、MERCK公司的WideScreen® Assays系列等。可用于来自人、小鼠、大鼠的样品，既有一次检测单种细胞因子的试剂盒，也有预先混合多种细胞因子抗体交联微球而一次检测多个指标者，研究者还可根据自身需要自行选购某几种交联微球。这些试剂盒在检测灵敏性、准确性、可靠性等方面都具有很好的性能。

Affymetrix公司的Panomics Procarta®细胞因子/趋化因子检测试剂盒，可在同一反应中同时检测最多达54种蛋白，目前已开发的产品按种属分主要有120种human，39种mouse，32种rat，45种non-human primate，8种porcine和12种canine。该系列试剂盒方便快捷，检测时间小于3小时，灵敏度可达1pg/mL，准确性和重复性好。目前可以检测的样本类型有：血清、血浆、细胞培养上清、以及体液和细胞内检测。

R&D公司的Fluorokine® MAP系列可以对50μL的血清、血浆或细胞上清样品进行多因子分析，目前已推出的

产品类型包括细胞因子、生长因子、趋化因子、MMPs、肥胖/糖尿病相关因子、血管再生因子等。MERCK公司的WideScreen Assays系列目前只提供预混的试剂盒，主要产品类型包括肿瘤标志物、心血管疾病、细胞信号转导通路、肾毒性、激素以及代谢相关分子等。

2. 多基因表达的定量检测

Affymetrix公司的Panomics QuantiGene Plex 2.0技术，可以在同一反应中同时对3-36个基因做DNA或mRNA拷贝数的精确定量。它可以分析各种样本（组织、细胞、血液、FFPE样本、纯化的RNA或DNA等），只需用特定裂解液裂解样本即可，对样本量下限无要求，特别适合需要对微量样本做多基因定量的研究实验。它无需核酸的抽提纯化，无需PCR，因为避免了很多人为因素的干扰，可以快速得到准确的实验结果。

QuantiGene Plex 2.0技术特别适用于血液样本和保存多年的FFPE样本。血液样本含有各种酶的抑制物，FFPE样本由于保存太久造成mRNA高度降解，这两种样本很难用传统的real-time PCR进行分析。而QuantiGene Plex 2.0技术可以保证得到极高的准确度与重复性，相关文献已陆续刊载于世界顶尖杂志（Nature, New England J Med, PNAS等）。

除此之外，Luminex多重检测平台还广泛涉及病原体的检测和分型、HLA分型、mRNA表达谱（Branch DNA技术，无需RNA抽提纯化、无需PCR扩增）、miRNA表达谱、转录因子研究、细胞信号转导通路研究以及过敏原筛选、自身抗体筛查、肿瘤标志物检测等诸多方面。

3. 转录因子（TF）检测

转录因子是一种DNA结合蛋白，它们通过结合上游启动子区域来调控基因表达。转录因子可以通过特定位点的磷酸化或与其他转录因子结合成复合物的方式被激活。而被激活的转录因子复合物则可以结合DNA上游启动子区域来启动转录机制。单一的胞外刺激可以激发多条信号转导通路，从而进一步激活多种转录因子来调节特定mRNA的转录。

转录因子活性的改变通常与人类的疾病相关，比如：癌症患者的AP1、ER、以及p53表达都会改变；相关疾病中NF-κB改变；肥胖症中PPARG发生改变。用简便易行的方法对活化的转录因子做分析和定量就可以帮助我们了解细胞的信号转导并揭示与疾病相关的转录因子。通过运用这些方法，人们逐渐地积累了更多有用信息，同时通过运用这些信息在更短的时间内开发了更安全有效的药物。

Affymetrix公司的Panomics Procarta TF Plex assay是一种转录因子高通量检测试剂盒，它利用专利的分离技术与Luminex液相芯片系统相结合，可以在同一反应中同时检测最多达43种转录因子。它对样本的要求量很低，只需500ng的总细胞蛋白或250ng的核提取物，整个过程只需不

到5个小时。

4. SH2结构域检测

SH2域是在信号转导过程中，介导蛋白质与蛋白质相互作用的众多蛋白质域家族之一。和其他域一样，SH2域也由氨基酸残基的保守区定义。100个氨基酸序列的折叠特性，使得这些序列可以定向识别并结合到包含磷酸化酪氨酸的配体中。涉及磷酸化酪氨酸的蛋白质与蛋白质相互作用，就像SH2域促成的相互作用一样，是补充信号蛋白质的主要方式，因而在信号转导过程中占据重要角色。

目前人们已在酶、适配蛋白质、信号蛋白质的调节亚基、支架蛋白质和转录因子中发现了SH2域。这些蛋白质对于信号转导过程必不可少，因为它们在受体和下游信号分子之间扮演着适配器的角色，使得细胞内的信号传递

得以进行，并对特定蛋白质激酶的活性进行调控。蛋白质磷酸化是细胞应答的主要信息通道，依赖于SH2域的信号传递发生故障，通常直接或间接地与人类疾病相关。

Affymetrix公司的Pamomics SH2 Domain Plex Kit可以在同一反应中同时检测最多达30种SH2结构域，可以自由选择不同的SH2蛋白对样本的磷酸化情况做定量定性分析，操作简单快速，可在4小时内得到精确结果。

总而言之，Panomics/Luminex多重核酸蛋白检测平台带给用户一个更全面、更系统的分析角度，从而使您的检测数据具有更大的意义。

(上接第18页)

6. 高通量N-聚糖研究

链接在重组单克隆抗体（rMabs）的Fc区域的Asn-X位置的N聚糖已表明可以影响药代动力学，药效以及治疗安全性。抗体生产过程中介质，pH值，温度等条件的变化都会影响糖基化的结构。考虑到聚糖对于抗体治疗性特征来说具有重要意义，各家药物生产商必须能够在生产中测量并控制糖基化过程。这就需要一整套糖分析模块系统来确认各批次药物在糖基化关键性治疗属性上的一致性。而且，药物设计和开发过程中优化糖基化作用可有助于显著增强药物性能，并减少临床应用中的安全风险。如果用传统的层析技术，CE-LIF技术或者质谱技术来分析N-聚糖，通常需要3天的时间来进行消化，标记和分析。而如果在LCGXII上使用N聚糖分析试剂盒来做这项工作，这一过程将从3天缩短为不超过6个小时。

7. LabChip N-聚糖分析技术同NPLC和CE-LIF的比较

辉瑞的一份研究报告比较了LabChip N-聚糖分析技术和传统的NPLC和CE-LIF方法，发现LabChip技术的速度是NPLC的160倍，是CE-LIF的6倍，具体数据参见图16。

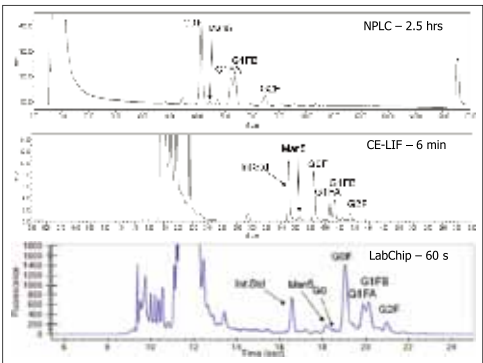


图16. NPLC analysis with 2-AB label (top), CE-LIF analysis with APTS label (center), LabChip N-Glycan Profiling Assay with fluorescent label (bottom). Data courtesy of Pfizer Inc., Chesterfield, MO

LabChip N-聚糖分析技术特点

- 所有试剂预置于96孔板中
- 优化好的实验流程——从样品制备到最终结果获得不超过6小时
- 一小时去糖基化
- 将CE-LIF过程转移到芯片上
- 样品分析仅需60s
- 可识别主要的聚糖类型
- 随解
- 无胺化还原反应

基于Lab-on-Chip的生物大分子检测技术

微流控芯片实验室又称芯片实验室(Lab-on-chip)或微流控芯片(microfluidic chip),指的是把生物和化学等领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米(甚至更小)的芯片上,由微通道形成网络,以可控流体贯穿整个系统,用以取代常规生物或化学实验室的各种功能的一种技术。

微流控芯片实验室以微流控技术为基础,它有别于另一类以静态亲和杂交技术为核心的微孔板芯片。微流控芯片实验室的最早期形式是芯片毛细管电泳,芯片毛细管电泳至今仍是芯片实验室中分离部分的主体。微流控芯片实验室是微纳米技术的重要组成部分,也是系统生物学研究的主要技术平台之一,有重大应用前景。2004年9月美国Business 2.0杂志的封面文章称,芯片实验室是“改变未来的七种技术”之一。按照目前的理解,一个功能化芯片实验室系统应包括芯片分析器、芯片及试剂盒等3个部分。

本文要介绍的Agilent 2100生物分析仪是一个由紧凑型仪器和即用型试剂盒构成的分析系统,是经过广泛验证过的易于操控使用的微流控技术平台。作为世界上第一台商业化的基于芯片实验室技术的生物分析仪,Agilent 2100自1999年面世至今,全球已拥有超过7000台的安装数量以及多达10,000篇的文献引述。Agilent 2100可以进行涵盖核酸、蛋白和细胞在内的多种样本的分析。

分析仪器的小型化与常规技术相比具有诸多优点。主要优点是:1.提高数据精确度和重复性。在整个分离和分析的过程中,使用商品化的分析芯片,最大限度地减少了人为因素对于实验结果的干扰。2.缩短分析时间,提高复杂工作流程的自动化和完整性。由于毛细管的设计相比于传统的凝胶分离方式,更容易散热,可以在分离通道两端加上很高的分离电压,加速样品的分离。内置的荧光检测器可以在分离通道的末端自动完成对样品的检测,而无需将分离后样本转移至其他成像设备进行检测。3.最大限度地降低样品消耗。相对于传统的凝胶分离分析方法,基于芯片实验室技术的Agilent 2100只需微量样品即可完成检测,对于珍贵的稀有样品尤其具有意义。

一. Agilent 2100 生物分析仪在RNA研究中的应用

Agilent 2100生物分析仪通过综合考虑所有能影响RNA质量的因素,来定义和量化了用于评价RNA质量或降解程度的RIN值(RNA Integrity Number)。通过芯片实验室(Lab-on-Chip)微流控技术分析平台,可以对RNA的完整性、纯度或降解程度进行精确的、数字化的评估。

目前,该RIN值参数已经成为RNA研究领域内RNA质量评估的黄金标准。RIN值不仅可以评价真核生物的RNA样本质量,也可以用于植物的RNA样本质量评估。特别是在微阵列或实时荧光定量PCR(qPCR)实验前的RNA样品质量控制是保证实验成功和优异重现性的最重要保障。目前,实时荧光定量PCR的国际标准MIQE也要求对qPCR实验过程中RNA的完整性提供详细描述。此外,Agilent 2100还可以对总RNA样品进行定量,检测是否有基因组DNA的污染等;在小RNA分子的分析中,用于对总RNA中的小RNA分子,如miRNA、siRNA进行定量和质控;对低丰度总RNA进行定量,检测灵敏度可低至皮克级别,特别适合微量或珍贵样品的检测;对mRNA进行定量,纯度检测以及是否降解进行完整性评估;也可以对荧光标记效率进行定量分析。

在RNA分析方面,使用Agilent 2100的优点在于:

1. Agilent专利的RIN值已经成为一个被业内广泛接受的用来检查评估总RNA和mRNA质量的行业黄金标准,已有超过10000篇的文献引述,便于研究人员比较各自的实验结果,追踪实验流程中可能的问题。
2. 仅需1μL样品消耗量,仅使用50pg的总RNA,可以大大节省宝贵的样品。
3. 无RNA酶污染。使用无RNA酶的试剂和芯片,避免分析过程中发生样品降解导致的检测结果误差。
4. 洁净安全,最大限度地减少与有害物质(如溴化乙锭)的接触。

二. Agilent 2100 生物分析仪在DNA研究中的应用

Agilent 2100的DNA芯片可用于高分辨率分析PCR和多重PCR反应,精确测量每个片段的大小和浓度。该分析的高灵敏度和宽泛的线性动态范围使得PCR扩增产物中的少量杂质得以检测出来。分析结果还可用于对多重PCR的条件优化和qPCR反应的设计优化。此外,Agilent 2100在DNA检测分析中的应用还包括:DNA酶切片段的分析;在基因表达分析研究中,利用多重RT-PCR或竞争性PCR对基因表达水平进行分析;在肿瘤学与临床研究应用中,利用多重PCR或PCR结合特异性酶解对肿瘤标志物基因进行监测或者SNP基因分型图谱进行解析,也可以用比较PCR技术对癌基因的表达水平进行定量评估;在法医检测中,对线粒体DNA扩增产物的定量和质量控制以确保进一步测序验证的成功;在食品分析方面,用巢式多重PCR对转基因食品(GMO)转基因成分的分析,通过特异性PCR或PCR-RFLP对加工食品原材料如肉、鱼等成分进行分析鉴定。特别是在日益兴起的下一代测序领域中,

Agilent 2100已被主流的测序仪器供应商推荐为下一代测序流程中不同环节DNA 样品制备质量控制的不可或缺的唯一仪器。

在DNA分析方面，使用Agilent 2100的优点在于：

1. 高灵敏度：Agilent 2100使用激光（LIF）激发荧光的技术，可检测低至0.1ng的DNA 片段。2. 宽泛的线性动态范围：用来检测强弱差别超过两个数量级的毗邻条带。3. 可以提高检测的准确度和精密度：预装的试剂和标准化实验流程确保准确并具有高重复性的数据。4. 洁净安全：和RNA检测一样，在DNA检测中使用Agilent 2100，可以最大程度地减少与有害物质的接触。5. 多种试剂盒可供选择：覆盖不同分子量范围和样品浓度的不同试剂盒给研究中的各种检测提供了全面的解决方案。

三. Agilent 2100 生物分析仪在蛋白质研究中的应用

在蛋白应用中，Agilent 2100可以代替SDS-PAGE，是用于蛋白质定量和纯度鉴定的快捷、可靠的方法。具有从考染到银染的检测灵敏度。对于重组蛋白表达、纯化、稳定性研究或抗体纯化的质控，Agilent 2100生物分析仪仅用一个快速分析步骤，即可提供关于蛋白分子量大小、纯度和浓度的详细信息。Agilent 2100芯片实验室在蛋白质分析上的应用包括：1.蛋白质的表达分析：通过叠加对比，对蛋白表达水平进行阳性克隆筛选，鉴定过量表达的蛋白以及比较不同的表达模式。2.蛋白质的纯化分析：监测蛋白分离和纯化过程，以快速优化纯化方法；监测分离组份的纯度，分析纯化柱的容量和优化上样量。3.蛋白质质量控制：监测蛋白降解和样品完整性，如抗体纯化过程中的轻链和重链的降解程度，确定蛋白质污染物；在还原及非还原条件下分析蛋白以及质谱分析前的样品制备质量控制。4.蛋白质分子量的确定和浓度检测，包括绝对定量和相对定量。5.低丰度蛋白质的定量和检测。6.可替代传统的蛋白质免疫印迹技术，对蛋白质进行定性和定量分析。7.在农业领域种质分类的应用中，通过对不同品种样品或转基因种系蛋白质图谱的比较分析，为品种分类建立一套完整的分类评价体系。

在蛋白分析方面，使用Agilent 2100的优点在于：

1.更高的数据可靠性：预装试剂和标准化分析可得到高重复性的数据。2.快速：可在45分钟内完成10个样品的准备，及分子量、浓度等数据分析。3.最少的样品消耗：每次分析只需要4μL的蛋白样品。4.无需手工染色和脱色，全部过程一步完成。5.用于在法规依从性环境下进行质量控制。Agilent 2100可以提供针对软、硬件的IQ & OQ/PV服务和针对消耗品的合格证明。5.样品对比快速简便，谱图重叠、缩放功能一键式操作。

四. Agilent 2100 生物分析仪在细胞分析中的应用

Agilent 2100的芯片流式细胞分析功能可简单快捷地获取细胞双色标记的荧光数据。在细胞分析方面，Agilent 2100可用于转染条件优化、细胞蛋白表达的检测、凋亡检测等许多方面，包括：1.检测报告基因绿色荧光蛋白（GFP）的表达；2.检测Cy5标记的siRNA的转染率来优化转染条件；3.用直接标记的抗体或二抗进行细胞蛋白染色检测；4.细胞表面和细胞内蛋白的表达检测；5.用Annexin V标记活细胞来进行凋亡检测；6.通过抗体标记胞内活化的caspase-3来检测细胞凋亡。

在细胞分析方面，使用Agilent 2100的优点在于：1.它是一个易于使用的系统。安装时间短、简单易用的数据分析软件让每个人都会使用流式细胞技术。2.可分析多种不同的细胞参数：内生荧光（如GFP绿色荧光蛋白）、抗体染色如Annexin V与磷脂酰丝氨酸的结合进行凋亡检测或Caspase-3检测、活/死细胞染色等。3.调节或开发自己的实验方法。软件中的通用工具均允许您根据自己的分析需求来改变系统设置或用预设的流式细胞分析进行分析。4.消耗最少的样品：仅需10μL细胞悬液（最低至2,500 个细胞）即可用于原代及其他宝贵的细胞样品的流式细胞分析。5.自动化：细胞染色在芯片上进行，可以进行1到6个样品的同步分析，大大加速工作流程。6.可分析大量不同的细胞样品：该系统适用于多种真核细胞分析。

Agilent 2100作为一个功能强大的生物大分子分析系统，已经取代了繁琐的凝胶电泳技术成为RNA样品质量控制（QC）的行业标准。同时在DNA片段分析和蛋白样品SDS-PAGE分析中正在迅速取代凝胶电泳技术。Agilent2100 生物分析仪的独特优点在于它既可用于电泳分离，对每一个片段的大小进行精确测定和浓度定量，又能进行细胞荧光参数的流式分析。这种多功能性使Agilent 2100生物分析仪成为分子生物和生物化学研究不可或缺的工具。

Lab-on-Chip技术在药物筛选，研发及生产中的应用

一. 基于酶促反应的高通量药物筛选及药学相关研究

随着基因组学、化学合成技术及实验室自动化技术的发展，在制药与生物技术企业以及学术机构从事药物筛选的科学家们需要面对开发大量新筛选实验的艰巨任务。这些实验必须是快速、经济、微量、灵敏、准确和自动化的。传统的药物筛选实验技术，比如亲近闪烁检测法（SPA）、时间分辨荧光共振能量转移检测法（TR-FRET）、IMAP检测等，往往都是相当复杂的，而且需要特殊的试剂，比如放射性试剂、特殊的抗体或其它的检测试剂。另外，酶活性的分析需要精确的测定底物的 K_m 和抑制剂的 K_i ，这就需要测定酶促反应过程中产物生成的速率。大多数药物筛选技术都局限于终点法检测，因而很难实现对整个酶促反应过程的跟踪与检测。为了突破传统药物筛选技术的种种局限，美国Caliper Life Sciences公司将其领先的微流体芯片技术（Microfluidic Lab-on-Chip）应用于药物筛选领域，开发了不需要抗体和放射性试剂并具有实时动力学检测功能的EZ Reader系列药物筛选平台（图1）。



图1. EZ Reader药物筛选平台与微流体芯片

微流体芯片技术是将样品制备、生化反应和结果检测等步骤集成到芯片上，将微型化、集成化、自动化的特点集于一身，被视为未来生命科学及医药研究革新的方向之一。微流体芯片是在微型化的芯片上蚀刻出微米级直径的复杂管路系统。生物大分子进入这一管路系统后，便会在电场、压力、及温度的控制下，在这一管道系统中运动、混合并分离，进而在特定的检测窗口中被检测，从而实现了多种功能，包括生物大分子的鉴定，生化反应的实时进行和在线监测等。

EZ Reader系列药物筛选平台的核心是基于微流体芯片技术的迁移率检测技术（Mobility-Shift Assay），该技术将毛细管电泳的基本理念应用到微流体环境中，在不加入中止试剂的情况下检测酶学实验（图2）。用于实验的底物是带有荧光标记的多肽，在反应体系中酶的作用下底物转变为产物，其所带的电荷也发生了相应的变化，

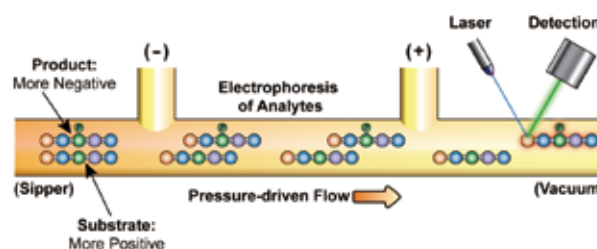


图2. Mobility-Shift Assay技术原理

Mobility-Shift Assay正是利用底物和产物所带电荷的不同，将二者进行分离，并分别进行检测的。在微流体芯片中对样品进行分离的力量来源于两个不同的方面，电动力学和液体压力。工作时，96或384孔板中的反应体系在负压的作用下通过芯片底部的吸样针被吸入芯片内部的管路中。由于芯片中分离管路上被施加了电压，带有荧光标记的多肽底物和反应产物由于电荷的不同被分离，然后在检测窗口进行信号的激发和检测。在检测每一个样品时，都可以同时看到底物和产物的信号。图3显示了Mobility-Shift Assay技术的典型信号数据。产物的量通过计算Conversion值，即产物峰的高度比上底物峰和产物峰高度之和（ $\text{Product peak height} / (\text{Substrate} + \text{Product peak height})$ ），来进行评估。在进行实时动力学检测时，仪器会根据设定的时间间隔将样品吸入芯片中进行分析。

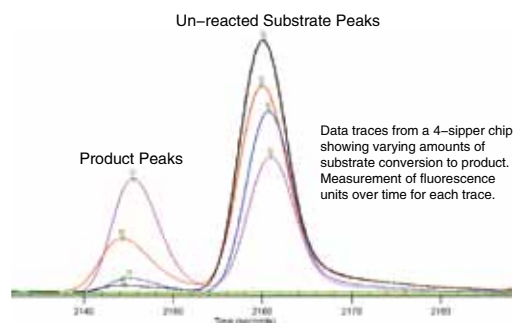


图3. Mobility-Shift Assay技术的典型信号数据

EZ Reader系列药物筛选平台的应用覆盖了药物筛选过程的多个方面，包括筛选实验开发、化合物筛选、效用机理研究（MOA, Mechanism of Action）及构效关系研究（SARs, Structure-Activity Relationships）。大多数作为药物筛选靶标的酶，如激酶、蛋白酶、磷酸酶、组蛋白脱乙酰酶（HDAC）、磷酸二酯酶（PDE）及酰基转移酶等，都能够EZ Reader平台上进行筛选。

为了进行高通量快速激酶筛选，Caliper公司为EZ Reader平台量身订制了ProfilerPro Kinase Profiling Kit。该试剂盒以96种激酶为靶标，在ATP K_m 下进行化合物的筛选。酶、荧光多肽底物以及相应的对照被预先加入384孔

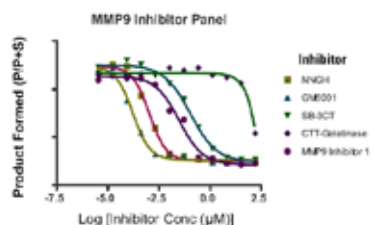


图9. 五种不同的抑制剂对于蛋白酶MMP9的IC50值

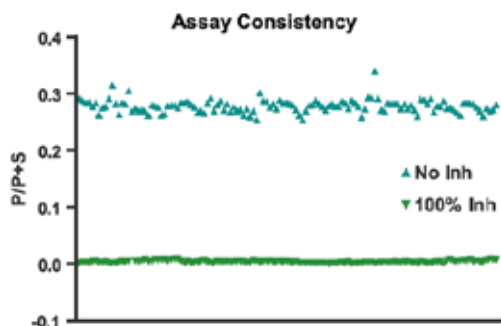


图10. PKA反应重复性测试

图10显示了利用EZ Reader平台进行PKA（蛋白激酶A）筛选实验的重复性测试，分别检测了128个没有抑制剂（1μL DMSO）的反应和128个100%抑制的反应（终浓度3.2μM 星孢菌素（staurosporine））。结果显示了很好的一致性，Z'值达到0.94。

(5) 效用机理研究（MOA）

当找到具有抑制效用的化合物后，就需要进行MOA研究以描述抑制剂的作用机理和比较不同抑制剂的效用。EZ Reader的实时动力学检测功能可以极大的提高MOA研究的效率。图11显示了利用EZ Reader平台检测抑制剂H89对PKA的ATP竞争性抑制，而图12显示了一种ERBB4的抑制剂对其产生了不可逆的抑制。

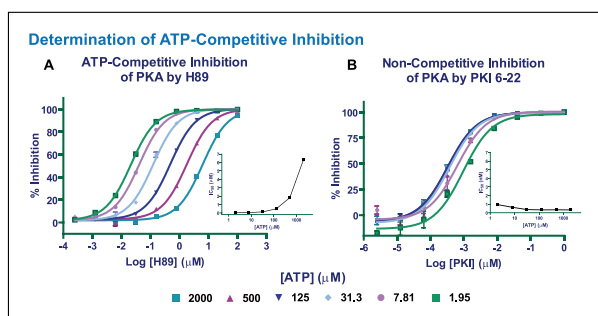


图11. H89对PKA的ATP竞争性抑制

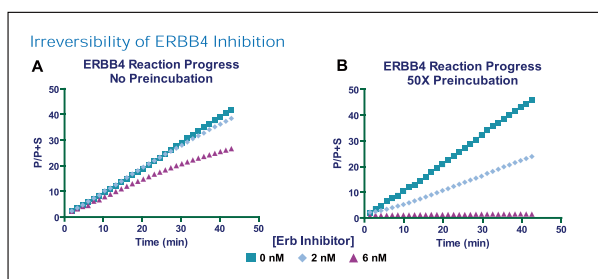


图12. 一种抑制剂对ERBB4的不可逆抑制

综上所述，EZ Reader系列药物筛选平台及基于微流体芯片的Mobility-Shift Assay技术与药物筛选领域的其它技术相比，具有很多的优势，具体体现在，

- (1) 直接检测酶促反应的底物和产物，灵敏度高，假阳性和假阴性率低
- (2) 可以覆盖几乎所有的药物筛选酶靶标
- (3) 具有实时动力学检测功能，提高了筛选实验开发和MOA研究的效率，节省了试剂
- (4) 不需要抗体或放射性试剂
- (5) 很高的检测精度，可以检测到其它技术没法检测的弱抑制剂
- (6) 简单快速的开发筛选实验
- (7) 适用于激酶实验中很宽的ATP浓度范围
- (8) 很小的反应体积（小体积微孔板，4–12μL体系）

由于EZ Reader平台的这些优势，目前全球主要制药公司中，80%以上已经使用该系统作为其药物筛选的核心平台。未来，EZ Reader平台和基于微流体芯片的Mobility-Shift Assay技术必将在药物筛选领域发挥更大的作用。

二. 疫苗工程和治疗性抗体筛选及应用

在疫苗工程，治疗性抗体筛选以及糖基化研究中都会有大量的蛋白样品需要被分析，只有获得高质量的实验数据后，研究者才能决定下一步该怎么做。因此，这些数量巨大的样品必须及时被分析，这样一来，就对分析速度以及分析通量提出了很高的要求。目前许多实验室仍依赖于SDS-PAGE技术，这一方法耗时耗力不说，且通量有限，而诸如CE和HPLC等方法则无法进行高通量分析，这导致了整个研究进程无法高效运行。为了推动这些领域研究的进程，作为Lab-on-Chip领域的佼佼者，美国Caliper公司推出了LabChip GXII生物分析仪用于高通量蛋白分析，目前已被许多用户应用于药物筛选、研发以及生产过程中。



图13 LabChip GXII

1. LabChip蛋白分析

LCGXII自动分析系统可进行快速高效的蛋白分析。

将待检测的蛋白样品放在微孔板中，微流体芯片上的单道吸样针（sipper）会自动将样品吸入，之后在LCGXII系统上自动进行染色、脱色、分离以及信号检测，用户无需再进行SDS-PAGE操作。LCGXII配套的分析软件可自动计算每个样品的浓度、分子量大小、纯度等。用户还可根据需求，通过胶图、电泳峰图或者数据列表等方式查看数据。这使得LCGXII在下述研究领域成为理想工具：

- 疫苗开发和质量控制
- 抗体质控
- N-聚糖研究

LCGXII蛋白检测特点

- 蛋白大小：14–200kDa
- P兼容96孔板或者384孔板
- 完成1个样品的分析仅需约40s
- 比传统毛细管电泳方法快70倍
- 也可用于DNA、RNA检测
- 软件符合21 CFR Part 11

2. 疫苗研发和质量控制

对大规模流行病的担忧以及目前不尽如人意的疫苗供应使得对疫苗开发和其生产能力的要求越来越高。近年来，可提供更具体的分析数据的技术在疫苗工程进程中扮演了非常重要的角色。LabChip技术已经被广泛应用于疫苗开发以及QC过程中，并且被用于诸如病毒分型，亚单位疫苗的优化和追踪，类病毒颗粒（VLPs）研究，疫苗纯度QC测试等不同的应用领域。LCGXII可轻松和已有的工作流程整合，为用户提供高通量的定量分析，之前的研究已经表明，在LCGXII的帮助下，用户可将通常为5个月左右的疫苗生产周期缩短到4周。

3. 亚单位疫苗表达监测

陶氏制药Pfenex系统的研究者需要监测假单胞菌内的亚单位疫苗在不同发酵规模下（从微孔板到20L反应器）的表达情况（图 14）。他们用LCGXII来进行高通量表达监测，很快找到了可提高产量的途径，并且据报告，其中一个亚单位疫苗产量提高了10倍。

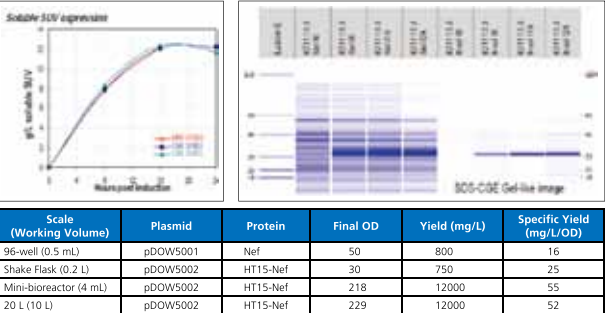


图14. Comparison of final cell densities and SUV expression across different fermentation scales, as determined by SDS-CGE (LabChip Protein Assay). Levels of SUV expression exceeded project goals by 4000X. Data courtesy of Dow Pfenex, San Diego, CA.

LCGXII应用在疫苗领域

- 分析病毒DNA、RNA、蛋白和类病毒颗粒(VLPs)
- 病毒纯化检测
- 亚单位和VLP稳定性和降解程度检测
- 糖基化的不均一性检测
- 快速病毒分型
- 病毒浓度测定
- 病毒蛋白纯度和完整度测定

4. 抗体质量筛选

质量源于设计（Quality by Design, QbD）原则要求进行高通量实验，这样才可以识别和彻底理解实验过程中的参数和产品质量间的相互关系。因此实验设计（DOE）研究会产生大量的样品，其数量将大大超出使用HPLC和毛细管电泳设备进行蛋白质质量分析的实验室的分析能力。LCGXII则可轻松满足这种高通量需求，同传统方法相比，它的速度提高了70倍。另外，其设备精确度、动力学范围以及分辨率还可满足蛋白纯度分析的要求。

5. 单克隆抗体分析——LabChip技术同毛细管电泳的比较

安进公司近期发表了一篇关于单克隆抗体筛选的文章，其作者Greg Flynn博士的结论是：LabChip蛋白分析技术在达到同传统的毛细管技术相当的灵敏度和分辨率时，速度提高了近70倍。图 15是其运行时间的数据。

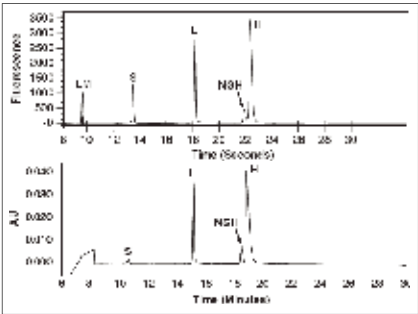


图15. Run time comparison of LabChip Protein Assay to traditional CE. Antibody samples were denatured, reduced, and analyzed. H: antibody heavy chain, L: antibody light chain, NGH: non-glycosylated heavy chain, LM: low molecular weight marker, S: system peak. LabChip Assay data – 30 second time scale (top) CE data – 30 minute time scale (bottom).

LCGXII应用在抗体筛选领域

- 确定同治疗有关的质量特性
 - 浓度
 - 纯度
 - 糖基化程度
 - 共价聚合物
 - 单链抗体QC
 - 片段纯化和抗体组装
- 纯化条件优化
- 克隆筛选
- 细胞培养条件优化

（下转第12页）

划时代的RNA原位杂交技术

——ViewRNA

一. 概述

1. RNA原位核酸杂交

RNA原位核酸杂交(RNA nucleic acid hybridization in situ)又称RNA原位杂交组织化学(RNA in situ hybridization histochemistry)或RNA原位杂交(RNA in situ hybridization RISH)。该技术是指运用cRNA或寡核苷酸等探针检测细胞和组织内RNA表达的一种原位杂交技术。其基本原理是:在细胞或组织结构保持不变的条件下,用标记的已知的RNA核苷酸片段,按核酸杂交中碱基配对原则,与待测细胞或组织中相应的基因片段相结合(杂交),所形成的杂交体经显色反应后在光学显微镜或电子显微镜下观察其细胞内相应的mRNA、rRNA和tRNA分子。

RNA原位杂交技术经不断改进,其应用的领域已远超出DNA原位杂交技术。尤其在基因分析和诊断方面能作定性、定位和定量分析,已成为最有效的分子病理学技术,同时在分析低丰度和罕见的mRNA表达方面已展示了分子生物学的一个重要方向。

RNA原位杂交不同于DNA原位杂交主要有:

(1) 检测目的不同:RNA原位杂交检测和分析的主要为内源性基因,包括细胞内固有基因、异常基因和变异基因。以正确反映组织与细胞之间相互关系及功能、代谢状态、探索疾病发病机理、观察治疗疗效和评估疾病预后等。其次为对外源性基因检测,以获得病毒和细菌类型等病原学诊断。而DNA原位杂交主要为外源性基因检测。

(2) 有较高的灵敏度:在检出细胞和组织内低拷贝核苷酸时, RNA原位杂交能获得较好定位,而DNA原位杂交则难以信任。

(3) 使用的探针不同:RNA原位杂交中多采用RNA或寡核苷酸探针,因此避免了应用双链DNA探针在杂交反应中存在的两条链之间的复性和第二条链的竞争性杂交问题。cRNA-RNA之间形成的杂交体要比DNA-DNA、cDNA-RNA杂交体性能稳定,在杂交反应后可用RNA酶洗脱,以除去未结合的探针,因此特异性更强。

2. 荧光原位杂交

荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization FISH)是一门新兴的分子细胞遗传学技术,是20世纪80年代末期在原有的放射性原位杂交技术的基础上发展起来的一种非放射性原位杂交技术。

与传统的放射性标记原位杂交相比,荧光原位杂交具有快速、检测信号强、杂交特异性高和可以多重染色

等特点,因此在生物、药物研究领域受到普遍关注。

3. QuantiGene ViewRNA

Panomics 公司的 QuantiGene ViewRNA 是一种新型 RNA原位杂交技术,融合了传统RNA原位杂交技术与FISH技术的优点。基于正在申请专利的探针组设计与专有的信号放大方法,在准确性、灵敏度、重复性等方面都大幅提高,可以在单细胞中对多个目标基因的低拷贝乃至单拷贝RNA做出检测。整个实验流程与FISH相似,但时间大大缩短。

这个划时代的技术使人们对基因研究有了突破性的进展。

(1) 这项新技术可主要应用于以下领域:

- 细胞的转录谱分析
- 体内外 RNAi 传递和基因敲除
- 生物标记物研究
- 报告基因筛选
- 分子病理学
- 干细胞分化
- 细胞生物学
- 神经生物学

(2) 较传统技术,这项新技术具有以下优点:

a. 对细胞样本

- 悬浮或贴壁的培养细胞,血液细胞组织(即将推出)
- 单细胞水平检测单拷贝的RNA
- 双“ZZ”探针,准确性高
- 同时检测最多达4个基因
- 极佳的信噪比
- 可在载玻片与多孔板上检测
- 荧光显微镜检测
- 在抗体无法得到的情况下,对免疫细胞化学研究是一种极好的补充

b. 对福尔马林固定,石蜡包埋样本

- FFPE石蜡包埋组织切片
- 单基因原位检测
- 检测下限可达10拷贝/细胞
- 双“ZZ”探针,准确性高
- 光学显微镜/荧光显微镜

二. 实验流程

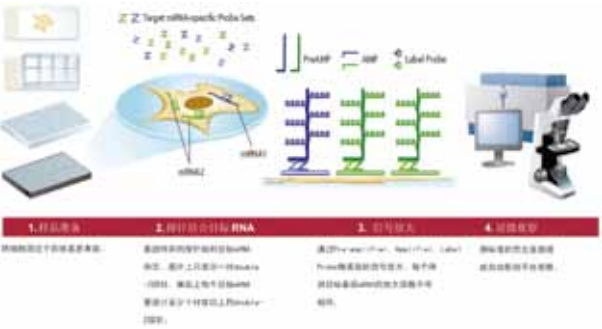


图1. 细胞样本

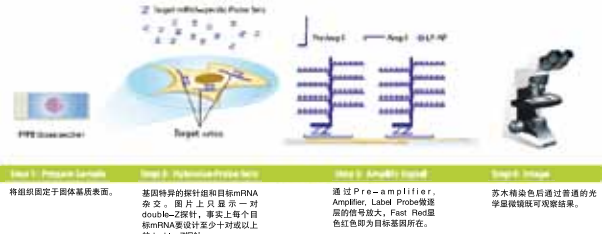


图2. FFPE样本

三. 实验结果展示

1. 同时检测HeLa细胞中4种不同的管家基因表达情况RPLO（绿色），PIIB HPRT（黄色），HPRT（浅绿色），β-actin（红色）

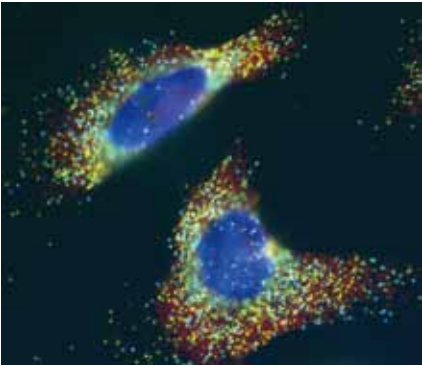


图3

2. 在多通道原位杂交测定中，可同时检测 HeLa（左上）和 SKBR3（右上）细胞中的 Her-2 mRNA（绿色）和 18S rRNA（红色），并通过荧光显微镜观察记录。对于含量极高的 18S rRNA，它在整个细胞质中呈现弥散着色；相比之下，含量较少的 Her-2 mRNA 则呈现与预期 mRNA 表达水平相关的点状图案，每个点对应一个拷贝 Her-2 mRNA（如图所示）。在图4中，用针对Her-2 内含子序列的互补探针组做为阴性对照。在所有板中，细胞核（蓝色）是用 DAPI 染色。

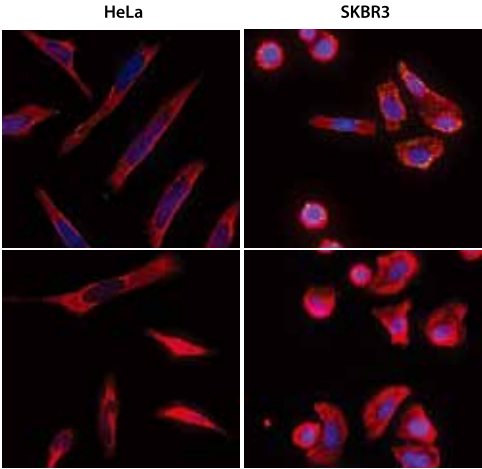


图4

3. PMA处理HeLa细胞后，不同时间段IL-6和IL-8的表达水平。

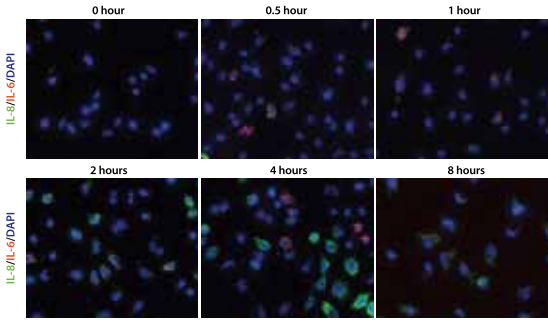


图5

4. ViewRNA组织切片水平检测结果，FastRed显色位置即为该目的基因表达区域，几乎没有背景影响，并且得到的结果非常精确。

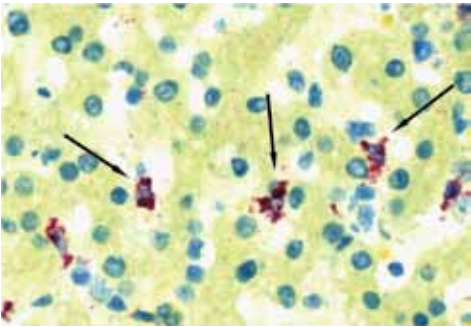


图6

四. 用户发表文章（例选）

Piotrowska, J., et al., Stable formation of compositionally unique stress granules in virus-infected cells. J Virol, 2010. 84(7): p3654-65.

Taylor, A.M., et al., Axonal mRNA in uninjured and regenerating cortical mammalian axons. J Neurosci, 2009. 29(15): p4697-707.

高速显微成像流式细胞技术在细胞分析中的应用

利用传统的流式细胞检测技术, 研究人员可以分析成千上万个细胞, 获得每个细胞的散射光信号和荧光信号的数值, 从而得到细胞群体的各种统计数据, 并可以找到稀有的细胞亚群。但是传统流式细胞检测技术仍然存在局限, 那就是获得的细胞信息很有限。细胞对研究人员来说, 只是散点图上的一个点, 而不是真实的细胞图像, 缺乏细胞形态学、细胞结构及亚细胞水平信号分布的相关信息。要想获得细胞图像, 研究人员就必须使用显微镜进行观察, 但显微镜能够观察的细胞数量是非常有限的, 很难提供细胞群体的量化与统计数据。因此, 我们就只能面对这样的两难选择: 没有一种技术可以既提供细胞群体的统计数据, 又获得细胞图像。不过, 最近美国Amnis公司推出的ImageStream流式细胞成像技术, 可能会给传统细胞分析带来突破性的变革。

ImageStream技术将流式细胞术与荧光显微成像结合于一身, 它具有多个检测通道, 能够对通过流动室的细胞逐个采集的细胞图像, 并利用分析软件对每个细胞图像进行量化分析, 从而提供细胞群的统计数据以及细胞形态学、细胞结构和亚细胞信号分布的信息。ImageStream技术与传统流式细胞仪很类似, 其系统平台也是由液流系统, 光学系统和电子系统等三大部分组成(图1)。液流系统将样本细胞悬液和系统鞘液注入流动室中, 使细胞在鞘液流的约束下聚焦在液流的中心, 逐个流过检测窗口。光学系统中光源照射通过检测窗口的细胞, 从而产生光信号。光源分为两种, 其一用于产生明场细胞图像, 另一种是用于产生荧光细胞图像的激光器。光源照射细胞产生的光信号被大数值孔径的物镜收集, 然后通过光路系统传递到由二向色镜构成的滤光片堆栈(Dichroic Filter Stack)。光信号在这里被分成不同波段投射到CCD的相应检测通道上, 产生一个明场细胞图像, 一个暗场细胞图像(Side Scatter, SSC)及多个不同荧光通道的细胞图像。ImageStream的光路系统能够自动调整焦距, 并实时测定细胞运动速度, 而其CCD采用时间延迟积分方式(Time Delay Integration, TDI)进行信号采集, 上述这些手段保证了系统采集到的细胞图像的质量。

ImageStream系统配有功能强大的数据分析软件IDEAS(图2), 可以对每个细胞分析超过500种量化参数。这些参数不仅包括细胞整体的散射光和荧光信号强度, 还包括对细胞形态, 细胞结构及亚细胞信号分布的分析。通过在细胞群体中对这些参数进行统计, 分析软

件可以生成细胞群体的散点图和柱状图, 而这些统计数据与细胞图像是完全整合的, 比如点击散点图上的点, 就可以直观的看到这个点代表的细胞的图像。另外, 使用者还能够根据自身研究的特殊需要, 进行自定义参数的设定, 进行更深入的分析。考虑到数字图像分析的复杂性, Amnis公司在新版本的IDEAS分析软件中增加了应用向导模块(图2), 覆盖了细胞信号转导、共定位、细胞形态分析等典型应用, 从而提高了软件的易用性。

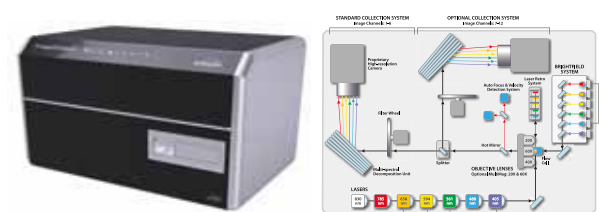


图1. ImageStreamX流式细胞成像系统及工作原理



图2. IDEAS分析软件界面与应用向导

随着ImageStream高速显微成像流式细胞技术的发展成熟, 越来越多的科研人员开始将这种革命性的技术手段运用到自身的研究领域, 并发表了大量有影响力的论文。上期对该仪器的应用做了比较整体的介绍, 这里笔者将介绍一些ImageStream技术的新颖应用。

一. 细胞信号转导/通路分析 (Cell Signaling/Pathway Analysis)

转录因子从细胞质转移到细胞核(Nuclear Translocation)是细胞信号转导过程中的重要事件。传统的检测方法是使用荧光显微镜进行观察, 但是这种方法效率很低, 所能观察的细胞数量十分有限, 且很难对不同细胞的转位程度进行评估。为了更有效的检测Nuclear Translocation, ImageStream系统在IDEAS分析软件中引入了一个全新的参数Similarity, 来对采集的细胞图像进行分析。所谓Similarity, 是指两个不同荧光检测通道采集的荧光图像在空间分布上的一致性(图3)。Similarity值越高, 则两张细胞图像上的信号分布越相似。对于Nuclear Translocation研究来说, Similarity值越高, 细胞因子转位的程度就越高。

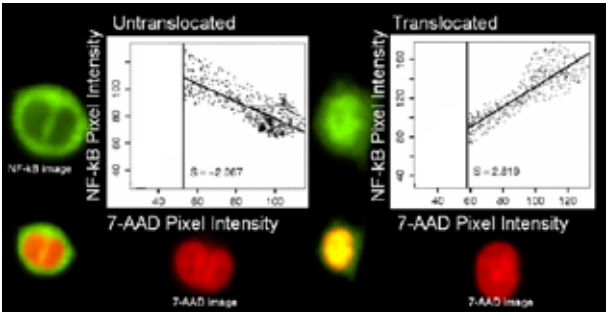


图3. Similarity Feature

NF-κB 是一类重要的转录因子，能够在多种组织中激活不同基因的表达，与慢性和急性炎症、自身免疫性疾病及多种癌症的发生存在着联系。美国明尼苏达大学的研究人员，利用ImageStream技术研究了ADAP蛋白（Adhesion and Degranulation promoting Adapter Protein）对于T淋巴细胞活化的调控作用^[1]。利用Similarity参数对NF-κB的转核进行统计，结果证明，ADAP蛋白具有调控T淋巴细胞受体介导的NF-κB的活化和转位的功能（图4）。

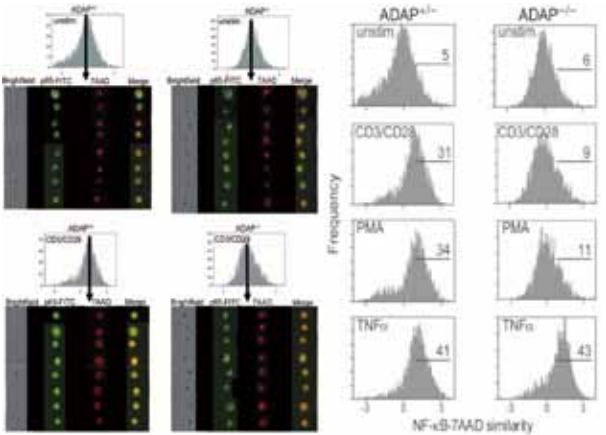


图4. Analysis of NF-κB nuclear translocation regulated by ADAPv

T-bet是属于T-box家族的新型转录因子，选择性地表达于Th1细胞。美国科罗拉多大学的研究人员研究了这种T细胞特异性转录因子的转位情况^[2]。从T-bet敲除小鼠的脾脏和淋巴结中分离的CD4阳性细胞被转染了带有T-bet基因和GFP报告基因的质粒。T-bet位于激素诱导启动子（Estrogen receptor promoter, ER）的下游。实验采用他莫昔芬（Tamoxifen）处理细胞，观察T-bet转位的情况。T-bet用Cy3标记，细胞核用DRAQ5染色，利用Similarity参数对T-bet转核程度进行统计。结果显示，他莫昔芬处理后，细胞中的T-bet转核程度有了显著的增加（图5）。

环孢菌素A（CSA）是一种常用的移植排异反应抑制剂，斯坦福大学的研究人员利用CSA对于NK细胞的作用效应^[3]。利用ImageStream技术，研究人员发现了CSA对于NK细胞中转录因子NFAT转核过程存在抑制作用（图6）。

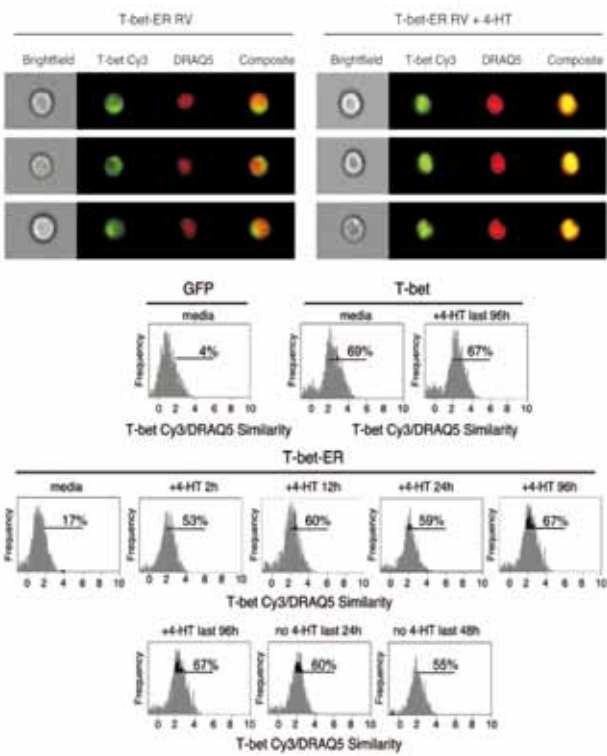


图5. Analysis of T-bet nuclear translocation induced by Tamoxifen

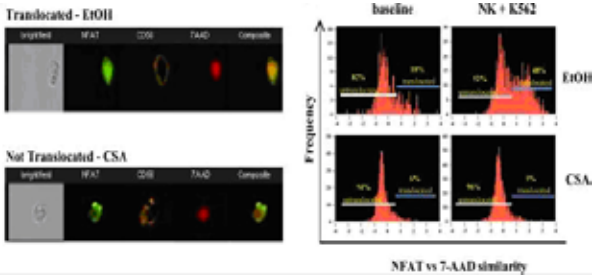


图6. The effects of CSA on NFAT translocation in NK cells engagement with K562 cells

二. 细胞间相互作用（Analysis of Cell Conjugates）

细胞间的相互作用是通过细胞膜接触部位上的分子相互作用来实现的。研究细胞间相互作用，不仅要找到细胞双联体，还要对两个细胞接触部位的信号分子的分布进行研究。T细胞与抗原递呈细胞（APC）之间的相互作用，作为T细胞活化过程的重要部分，是研究细胞间相互作用的一个很好范例。

树突细胞（Dendritic Cell）是免疫系统启动和调控T细胞响应的关键因子之一，德国海德堡大学的研究人员利用ImageStream技术对DC细胞调控T细胞活化过程的机理进行了研究^[4]。利用IDEAS软件对细胞互作区域的标记分子的信号强度进行统计，结果表明，DC细胞对于T细胞和APC的互作的调控依赖于外源抗原的介入。在外源多肽MOG33-55刺激后，DC细胞介导T细胞和B细胞之间发生相互作用，形成免疫突触，突触标记分子TCRβ和LFA1

在突触区域发生富集。而没有DC细胞的情况下，信号分子的分布没有明显变化（图7）。

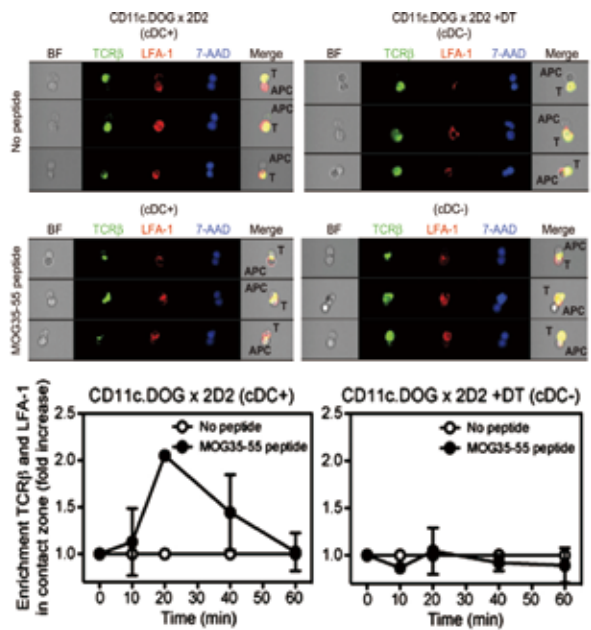


图7. Immune synapse formation with or w/o DC

研究人员还利用ImageStream技术研究了免疫突触标记分子LFA1抑制剂BIRT377对于免疫突触形成过程的影响（图8），并和通过原子力显微镜获得的结果进行了比较[5]。

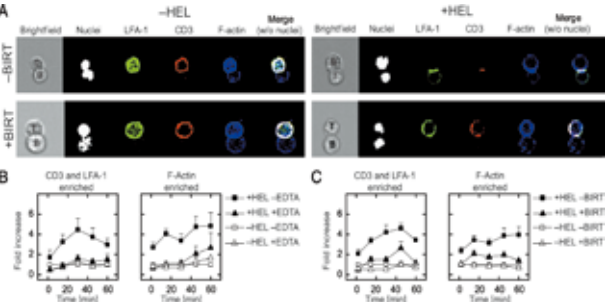


图8. The inhibition of the formation of immune synapse caused by BIRT

三、分子内摄与共定位 (Analysis of Internalization and Colocalization)

炎症介质Substance P（SP）与肠炎等炎症反应相关，其作用是通过激活T淋巴细胞及其它细胞中的激活神经激肽1受体（NK-1R），并调控这些细胞中的多种细胞因子的相互作用来实现的。美国塔芙茨医学研究中心的研究人员利用ImageStream技术研究了SP诱导的T细胞对NK-1R的内摄作用（Internalization）[6]，利用IDEAS软件中的Internalization分析功能对分子内摄程度进行统计，结果显示，TGF-β能够延缓模型小鼠T细胞中NK-1R的这种内摄作用（图9）。

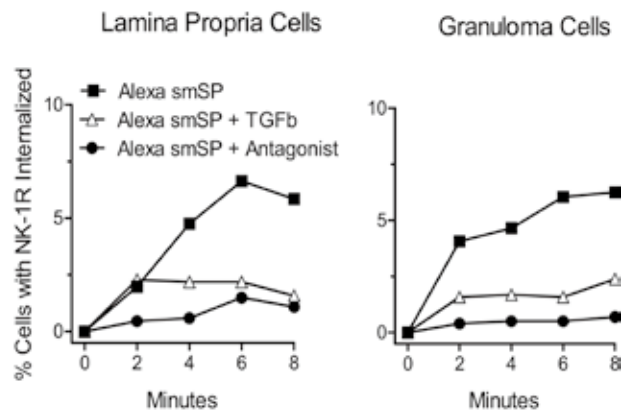


图9. TGF-β delays SP-induced NK-1R internalization

信号点计数（Spot Counting）是IDEAS软件具有的一种重要功能，它不仅被用来对荧光原位杂交的结果进行统计，或应用于DNA损伤研究，而且也能用于对内摄作用进行分析。美国辛辛那提大学的研究人员在糖尿病研究中运用了IDEAS软件的Spot Counting功能[7]，通过计算被内摄到DC细胞内部的胰岛细胞的相对数量，来比较不同种类的DC细胞对于胰岛细胞的内摄作用的差异（图10）。

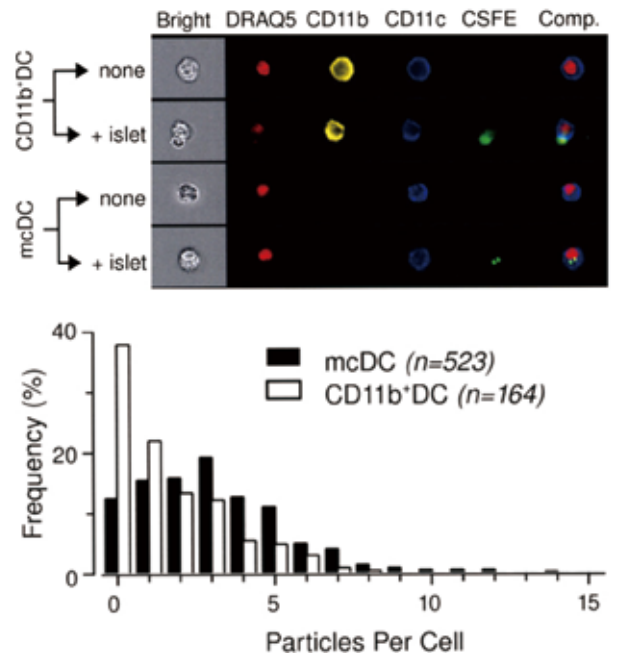


图10. Internalization of islet cells by mcDCs and CD11b+ DCs

治疗性抗体在细胞内的作用位点是分子共定位研究的一个重要方面。弗吉尼亚大学研究人员研究了两种抗体药物OFA（Ofatumumab）和RIX（Rituximab）在诱导抗肿瘤活性与补体依赖型细胞毒性（Complement-dependent cytotoxicity, CDC）方面的差异进行了比较[8]。利用ImageStream技术，研究人员发现OFA与补体C1q存在共定位关系（图11），并进一步证明了，与RTX相比，通过与补体C1q作用，OFA具有更强的诱导CDC的能力。

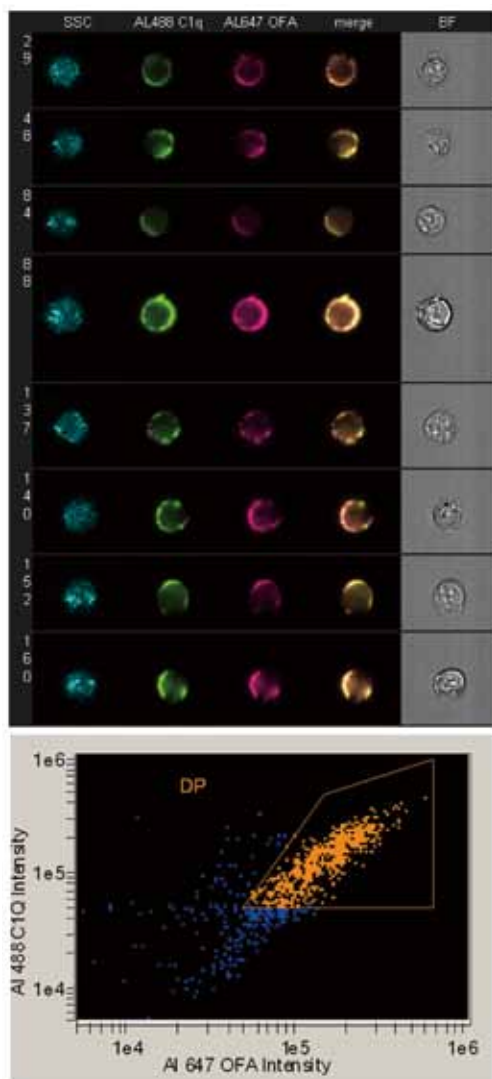


图11. C1q colocalizes with bound OFA

四. 细胞形态学 (Quantitative Morphology)

细胞形态的改变是免疫响应的一个方面。当病原体侵入机体后，首先被入侵的细胞会释放出一些化学信号，诱导免疫细胞发生形变，并向病原体入侵的部位移动。IDEAS软件的Circularity参数很适合用于统计这种细胞形态变化的程度。法国的科研人员就利用ImageStream技术的这个功能对HIV病毒感染所引起的T细胞形态变化进行了研究^[9]。利用Circularity参数对生成突触的T细胞数量进行统计，结果表明，在HIV病毒感染过程中，Nef因子是引起T细胞形态变化关键因子（图12）。

五. 红细胞分化 (Erythroid differentiation)

红细胞去核化是哺乳动物红细胞生成的独特特征，用ImageStream技术研究红细胞去核化过程，不仅能用上述细胞特征来对正在经历去核化过程的细胞设门，而且能进一步利用细胞的形态和荧光信号的亚细胞定位将其细分

为几个不同的去核时期。美国罗切斯特大学的研究人员利用ImageStream技术对哺乳动物胚胎中的原始红细胞的去核化进行了研究^[10]，并利用IDEAS软件对去核化过程中红细胞的大小进行统计分析（图13）。

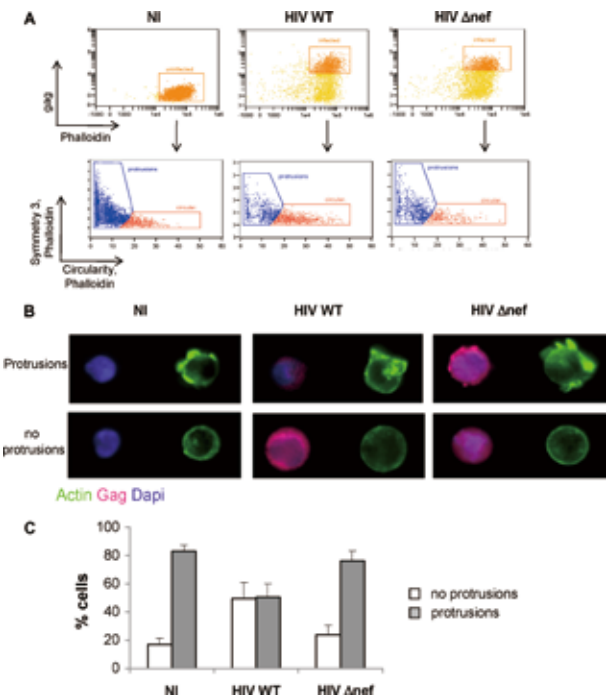


图12, Automated quantification of T-cell protrusions.

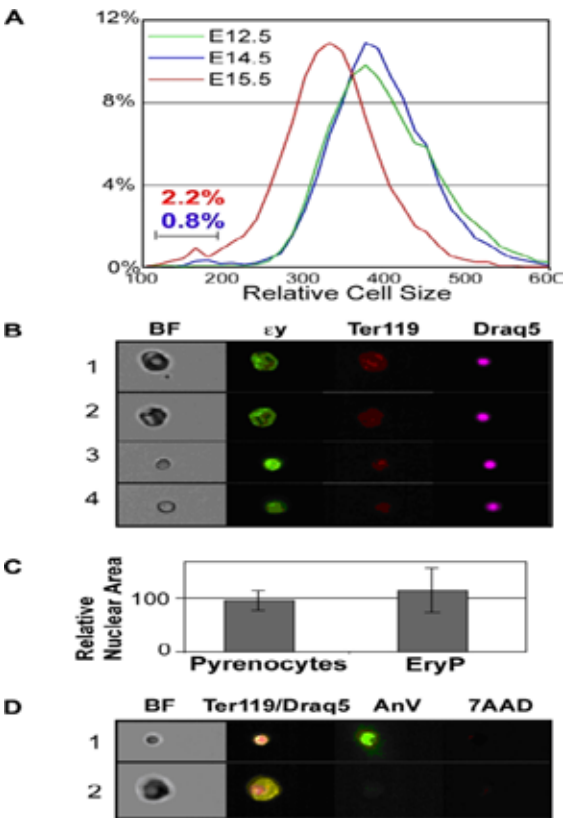


图13. Enucleation of primitive erythroid cells in the mammalian fetus

（下转第28页）

流式细胞平台新应用——CBA流式液相芯片技术

长期以来，科学工作者都希望能够从单个样本中一次检测多个目的蛋白，并且获得高精度度的结果。虽然常规蛋白分析方法很多，如ELISA、Western等，但是Western不能对蛋白精确定量，ELISA一次反应只检测一个指标。如果检测多个指标，不仅要耗费大量样本，而且需要分批操作，增加了不可控因素和较多的人为误差，从而导致组间差异增大，数据可靠性降低。在20世纪90年代初，著名的生物技术公司BD就致力于一种单样本、多指标检测技术的研发，终于在上世纪末成功进入市场。这就是基于流式细胞检测平台的液相芯片，一种多重蛋白定量技术——BD Cytometric Bead Array，简称CBA（图1）。

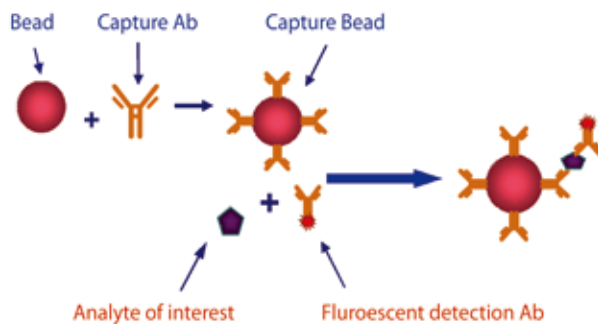


图1 CBA技术原理

CBA是利用一系列荧光强度不同的微球，同时对样本中的多种可溶性蛋白进行分析的流式检测方法。每个CBA微球大小一致，具有特定的荧光强度，包被有适用于特定分析（如其它抗体或者可溶性蛋白）的特异性捕获抗体（Capture Antibody），提供了类似ELISA孔板的捕获表面。当微球和待测样品溶液混合后，微球上的特异性抗体就与样品（血清、血浆或者细胞培养液）中相应的抗原或蛋白结合，然后加入荧光标记的检测抗体，就会形成“三明治”夹心复合物。最后通过流式细胞仪对特异性目的蛋白进行检测。CBA的每种微球携带有不同强度的红色荧光，在流式细胞仪的FL3通道通过检测微球荧光强度的差异对目的蛋白定性；检测抗体带有PE荧光素标记，在流式细胞仪的FL2通道检测，通过检测抗体的PE荧光强度定量目的蛋白。CBA技术能够从单一样本中同时检测多种目的蛋白，操作简单，省时省力，样本需要量小，与以往的技术相比具有更高的灵敏度、更好的重复性和更宽的测量范围，从而成为了多重蛋白检测领域的生力军。

二. CBA的技术特点

- 1. 轻松实现多重检测
最多可同时对一个样本中的72个目的蛋白进行精确定量。
- 2. 样本需要量小
仅需要50μL溶液就可进行一次检测。
- 3. 更高的灵敏度、更宽的检测范围和更好的重复性
分析灵敏度高达2.8pg/mL，检测范围达0-5000pg/mL。
- 4. 随心所欲的组合菜单——BD CBA Flex Set
普通CBA kit只能固定检测6个指标，而最新的Flex Set最多检测72个指标；种类涉及免疫、细胞信号转导、细胞凋亡等许多领域的蛋白定量分析。
- 5. 操作简单省时省力
通过标准曲线定量蛋白浓度，整个流程只需要3.5h。
- 6. 强大的软件分析系统
BD CBA软件可直接将目标蛋白的检测结果换算成标准浓度。

二. CBA的应用

自CBA上市以来，越来越多的科研和临床研究人员将CBA应用于他们的领域。CBA应用领域涉及眼泪、血清、唾液、细胞培养上清等样本中细胞因子、炎症因子水平的分析。CBA还用于细胞信号传导中磷酸化蛋白、凋亡相关蛋白分析，系统性红斑狼疮（SLE）和新生儿脓血症等免疫疾病的监控，肿瘤研究，药效评估，药物研发，疫苗研究，总体免疫功能分析等很多领域。随着FACSArray生物分析仪的诞生，CBA与FACSArray组成了液相蛋白高通量快速检测的黄金组合。

1. CBA与糖尿病研究^[1]

Maier等首次运用CBA技术测定了13例确诊的糖尿病患者和13例非糖尿病患者血清及玻璃体中的IL-8、VEGF、ANG的水平，并与ELISA结果相比较，结果提示两者结果相关性好。糖尿病患者玻璃体中IL-8、VEGF、ANG明显升高，而血清中不升高（表1，Vitreous）。糖尿病及非糖尿病患者血清中的IL-8、VEGF、ANG水平与玻璃体中的含量无显著相关性（表1，Serum）。此技术可同时测定微量样品中的多种分析物，与ELISA相比具有极大的优势。

Diabetics				Controls			
Vitreous	Mean±SD (Range)	Mean±SD (Range)	p-value	Serum	Mean±SD (Range)	Mean±SD (Range)	p-value
IL-8	62.6±51.3 (9.3-173.9)	10.1±7.3 (2.4-29.9)	<0.001	IL-8	15.6±4.9 (9.9-26.8)	16.3±4.8 (9.7-26.5)	0.80
VEGF	48756.0±4993.9 (30.7-17045.5)	30.0±14.82 (13.4-63.1)	<0.001	VEGF	594.3±491.7 (58.3-1777.1)	664.1±452.1 (177.8-1529.2)	0.71
ANG	3925±19427 (15180-75554)	17302±12375 (5887-46580)	<0.001	ANG	703910±230879 (380557-1334784)	618263±259731 (220488-1028632)	0.38

表1. 糖尿病与非糖尿病患者细胞因子差异统计

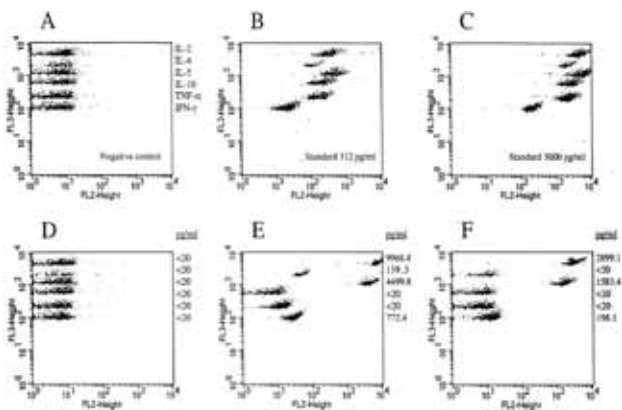


图3. PSA-3及其突变体PSA-3A对前列腺癌患者T细胞免疫

2. CBA与药物研发^[2]

免疫疾病和肿瘤药物筛选和研发的过程中，对于药效的评估需要多项综合指标。药物作用于细胞或者机体后，引起免疫反应，通过使用CBA Human Th1/Th2 Kit检测体内或者细胞培养上清中细胞因子水平作为药物评估的一个重要指标。相关研究发现Prostate-specific antigen突变体PSA-3A比PSA-3能更有效的杀伤肿瘤，是因为PSA-3A能够刺激T细胞分泌更高水平的细胞因子（IFN- γ ，IL-2），这就为后续药物开发打下了基础（图3）。

3. CBA与细胞凋亡^[3]

Bcl-2、Caspase-3、PARP构成的凋亡调控通道对于肿瘤细胞的研究具有特殊的意义。不同细胞的Bcl-2、Caspase-3、PARP三者之间关系的量化可以帮助研究者开发更有针对性的抗肿瘤治疗方案和药物（图4）。



图4. 喜树碱处理细胞U937细胞后，不同时间Active caspase,Bcl-2和PARP表达情况

CBA检测结果表明Bcl-2在凋亡过程中没有变化，证明喜树碱诱导U937细胞凋亡不是依赖于Bcl-2通路。与传统的Western Blotting相比，CBA的凋亡检测试剂盒不但成功地量化了三者的关系，也为后期的研究，药物开发数学模型的构建提供了可能。

摘自Clinical. Immunology.110(2004) 252-266.

4. CBA与疫苗研究^[4]

我国是乙型肝炎的高发地区。目前乙肝抗病毒治疗主要应用于干扰素和核苷类似物，而这些药物的疗效都存在问题。随着免疫学的进步，治疗性疫苗成为了乙肝治疗的一个新方向。一些科学家利用CBA技术对治疗性乙肝疫苗I期临床中的诱导免疫应答进行了研究。结果表明注射疫苗42天后，IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10及TNF- α 与注射前相比，没有显著变化，而在71天时所有志愿者IFN- γ 和7名志愿者IL-2高于注射前，而其它四种细胞因子没有显著变化。这说明疫苗可以有效诱导特异性体液免疫（表2）。

表3 细胞因子检测结果 (pg/ml)																		
编号	IFN γ			IL-2			IL-4			IL-6			IL-10			TNF α		
	前	42 d	71 d	前	42 d	71 d	前	42 d	71 d	前	42 d	71 d	前	42 d	71 d	前	42 d	71 d
1	24.3	20.2	37.2	0.6	0.6	4.0	1.1	1.7	2.4	1.8	1.8	3.1	1.1	2.0	2.3	0.6	0.5	3.0
2	18.6	19.4	36.1	0.4	0.5	0.9	1.6	1.6	1.6	2.1	2.0	2.1	1.6	1.8	2.5	0.6	0.8	0.5
3	18.6	20.5	53.9	0.5	0.6	0.9	1.3	1.1	1.7	1.3	1.4	3.0	3.1	2.4	2.8	0.6	0.7	1.8
4	28.6	25.4	31.0	1.7	1.8	1.1	4.6	4.2	1.3	3.0	2.8	3.3	4.0	3.6	4.2	10.2	8.6	1.8
5	23.6	18.6	48.3	0.6	0.8	4.6	0.9	0.8	6.7	7.2	7.0	4.6	4.6	3.7	4.7	0.6	0.6	1.4
6	25.6	24.6	41.7	1.5	1.4	1.8	4.9	4.6	10.3	13.4	6.2	4.6	3.3	2.8	4.4	16.2	1.4	4.6
7	35.9	20.1	44.4	0.5	0.6	2.9	4.1	6.6	2.1	1.8	1.6	2.6	1.6	0.8	2.8	1.0	1.0	1.8
8	36.5	26.8	68.2	1.2	1.4	7.8	2.4	2.2	7.8	0.7	0.9	7.7	0.9	2.1	4.3	1.2	0.9	15.9

表2. 细胞因子检测结果 (pg/ml)

5. 利用CBA技术研究吸毒者免疫状况^[5]

众所周知，吸毒会对人体健康产生巨大的伤害，对于青少年尤其如此。昆明医学院的科学家就利用CBA技术对于青少年吸毒者的免疫状况进行了研究。他们选择了20例吸食海洛因1年以上，停吸天数小于20天的青少年作为研究对象，测定外周血T细胞亚群、Th1细胞因子（IL-2、TNF- α 和IFN- γ ）、Th2细胞因子（IL-4、IL-5和IL-10）和血清中的生长激素。实验结果表明吸毒者IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4和IL-10的水平均低于正常者，说明海洛因对细胞免疫的损伤大于对于体液免疫的损伤（图5）。

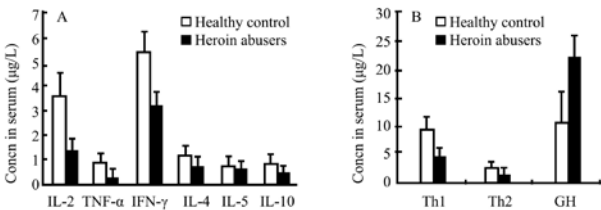


图5. 吸食海洛因组和健康组生长激素和TH1/TH2水平

6. CBA与眼部疾病的研究^[6]

眼泪在抗微生物、伤口愈合和炎症反应中承担了重要的角色，多种眼部疾病都与眼泪中某些细胞因子有关。样本量稀少（5-10 μ L）是目前使用ELISA检测的最大障碍，CBA使微量检测成为可能（图6）。

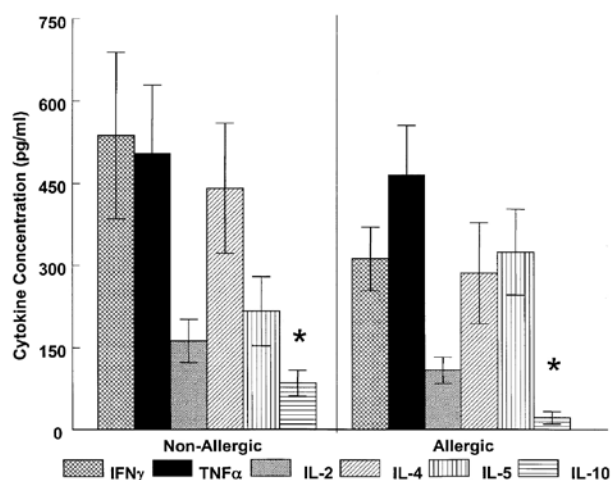


图6. CBA检测正常人和过敏性角膜炎 (AKC) 患者眼泪中炎症因子表达水平

7. CBA用于癌症治疗效果的评估^[7]

有研究者用Human Th1/Th2 CBA试剂盒对接受IL-2治疗前后的癌症病人血清进行了检测。IL-2治疗后用CBA检测发现血清中IL-2和IL-5浓度显著升高, 并且伴随着IL-10、IFN γ 的增加, 可作为IL-2治疗后免疫学水平的变化的癌症疗效评估 (图7)。

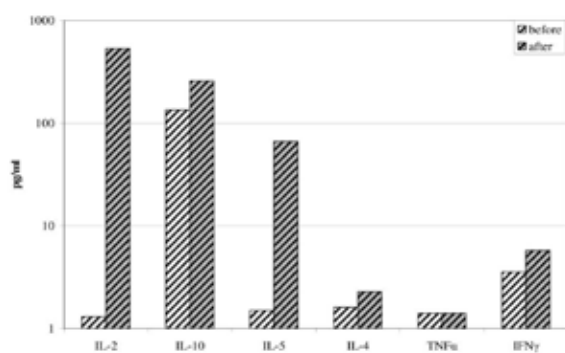


Figure 8. Changes in serum cytokine levels before and 24 h after IL-2 application.

图7. IL-2治疗后用CBA检测发现血清中IL-2和IL-5浓度显著升高

8. CBA Flex与器官移植研究^[8]

闭塞性细支气管炎 (BOS) 是影响肺移植后患者存活的一个障碍。目前主要的治疗BOS的药物是一些免疫抑制剂, 但它们只能暂时性的稳定病情。最近, 一种新型大环内酯类抗生素, 阿奇霉素 (Azithromycin) 被应用到BOS的治疗中, 并且取得了很好的疗效。欧洲的一些科学家利用CBA Flex技术对阿奇霉素进行了药理学研究。他们利用CBA Flex测定涉及MAPK激酶信号通路的一些因子 (phospho-p38, phospho-ERK1/2, phospho-JNK1/2) 的磷酸化情况。结果表明, 阿奇霉素可以显著的降低p38、JNK和ERK的磷酸化水平, 而免疫抑制剂和地塞米松不能明显改变MAPK的磷酸化。说明阿奇霉素是通过抑制MAPK活性来起作用的 (图8)

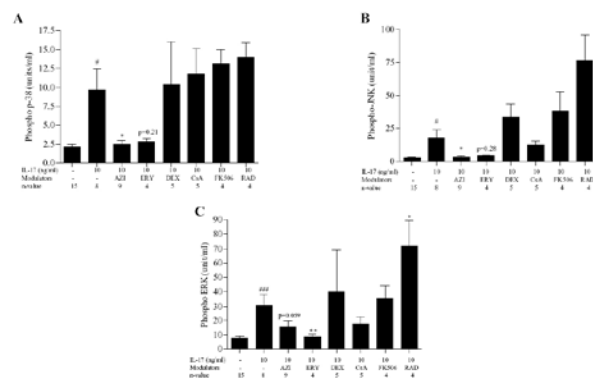


图8 The effect of macrolides, immunosuppressive agents and dexamethasone on the IL17 induced activation of the MAPK (p38, JNK and ERK) in HA SMC. A phospho-p38, B phospho-JNK and C phospho-ERK. MAPK activation (phosphorylation in units/mL) is expressed as mean $\pm$ SEM and the IL17 stimulated group was set referentially as 100% of the MAPK phosphorylation. The n-values are mentioned on the figure. HASMC were stimulated with IL17 (10ng/mL) for 15min and modulators were added 30min before. The concentrations of the different modulators were: 100 nM for azithromycin, tacrolimus, cyclosporine, rapamycin and 10 μ M for dexamethasone. #IL17 stimulated versus control, *modulator with IL17 versus IL17 stimulated. *P<0.05. **P<0.01 and ***P<0.001

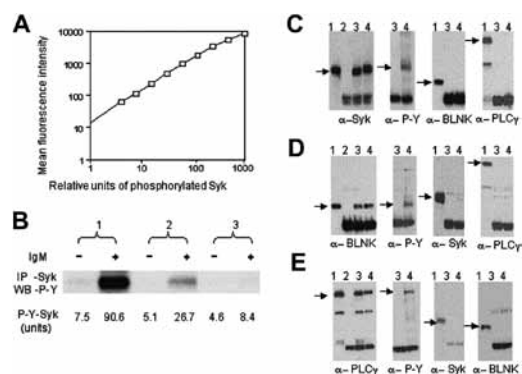


图9. CBA Flex Set检测磷酸化蛋白

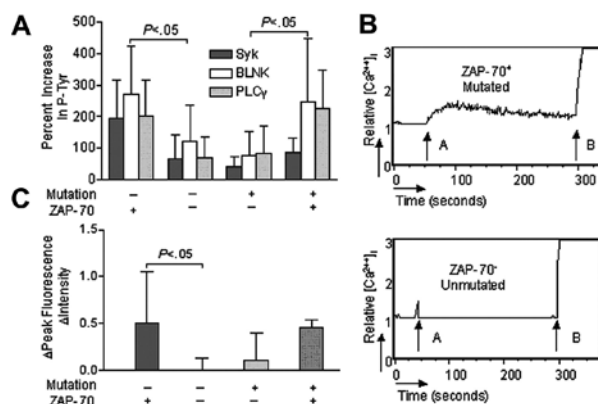


图10. Ig基因异常和ZAP-70- CCL B细胞中, p72^{Syk}, BLNK和PLC γ 磷酸化和钙离子水平

9. CBA Flex Set在白血病研究中的应用^[9]

在慢性淋巴白血病 (CLL) 中的研究中发现, 能够表达正常IgVH蛋白的CCL B细胞通常表达ZAP-70+, 正常人B细胞和表达异常IgVH的大多数CLL病人为ZAP-70-。当IgM与B细胞受体 (BCR) 结合后, 与ZAP-70- CCL B细胞相比, 在ZAP-70+ CCL B细胞中, p72syk, BLNK和PLC-gama有更高水平磷酸化和显著的Ca²⁺外流 (图9)。为验证ZAP-70参与IgM激活的BCR信号通路假说, 研究

者将携带ZAP-70基因的载体和空载体（阴性对照）分别转染ZAP-70-CCL B细胞后，CBA Flex set检测3 μ g细胞裂解液中p72syk，B LNK和PLC- γ 磷酸化水平。与对照相比，在ZAP-70+ CCL B细胞中，上述蛋白有高水平的磷酸化和Ca²⁺外流（图10）。上述研究证明ZAP-70能够增强IgM信号通路，引

起B细胞增殖和存活，从而提高CCL病人的免疫功能。

摘自Blood, 2005, Vol 105 ,2036—2041.

（上接第33页）

结论表明，Synergy™ H4的滤光片系统在绝大多数的荧光分析中都可以提供高质量的数据，而且快速读板的特点是其可以达到并维持高通量的保障。单色器系统提供了卓越的光谱扫描功能，而且更加适用于多种不同的荧光染料。Transcreeper® ADP2 assays可以方便快捷且准确的在Synergy™ H4上进行分析。

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。

综上所述，整合了不同光源和光路设计的Synergy™ H4拥有了更为强大的检测功能和更为广泛的检测用途，可以为基因组学和多重检测以及其他科学研究实验提供可以信赖的检测数据。可以看出，高通量检测始终都会影响生产厂家对仪器、软件和分析技术进行不断的提成，以适应微孔板检测不断变换的要求，Synergy™ H4集方便灵活和灵敏高效于一身的Hybrid技术使得其成为当今生命科学实验室的最佳选择。您还等什么？

参考文献：

1.Optimization of Perkin Elmer's AlphaScreen® cAMP Assay on the Synergy™ H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader. Brad Larson, Paul Held, and Peter Banks, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT

2.Utility of Synergy™ H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader using both Monochromator- and Filter-Based Detection. Capabilities demonstrated with Fluorescence Polarization, Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer, and Fluorescence Intensity Assays for the Measurement of ADP Accumulation. Brad Larson, Peter Banks, and Xavier Amouretti, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT Meera Kumar and John Majer, BellBrook Labs, Madison, WI

3.BellBrook Labs Transcreeper® ADP2 FP Assay Technical Manual.

4.BellBrook Labs Transcreeper® ADP2 FI Assay Technical Manual.

5.BellBrook Labs Transcreeper® ADP2 TR-FRET Red Assay Technical Manual.

（上接第24页）

相关文献：

1, Regulation of NF- κ B Activation in T Cells via Association of the Adapter Proteins ADAP and CARMA1

Science (2007) 316:754-758

2, Temporal Dissection of T-bet Functions

The Journal of Immunology (2007) 178:3457-3465

3, The unexpected effect of cyclosporin A on CD56+CD16 and CD56+CD16+ natural killer cell subpopulations Blood (2007) 110:1530-1539

4, Dendritic cells control T cell tonic signaling required for responsiveness to foreign antigen

PNAS (2010) 107(13):5931-5936

5, Immune synapse formation determines interaction forces between T cells and antigen-presenting cells measured by atomic force microscopy

PNAS (2009) 106(42):17852-17857

6, TGF-beta regulates T-cell neurokinin-1 receptor internalization and function

PNAS (2010) 107(9):4293-4298

7, Cutting edge: Merocytic dendritic cells break T cell tolerance to beta cell antigens in nonobese diabetic mouse diabetes

Journal of Immunology (2010) 185(4):1999-2003

8, Binding of Submaximal C1q Promotes Complement-Dependent Cytotoxicity (CDC) of B Cells Opsonized with Anti-CD20 mAbs Ofatumumab (OFA) or Rituximab (RTX): Considerably Higher Levels of CDC Are Induced by OFA than by RTX

The Journal of Immunology, (2009) 183: 749-758

9, HIV-1 Nef inhibits ruffles, induces filopodia and modulates migration of infected lymphocytes

Journal of Virology (2010) 84(5):2282-2293

10, Enucleation of primitive erythroid cells generates a transient population of “pyrenocytes” in the mammalian fetus

Blood (2008) 111:2409-2417

提高基因组、转录组研究效率与数据准确性的技术路线

1981年,美国Zymark公司成立,成功地推出了世界上第一款商品化的实验室自动化工作站,占领了高端自动化领域的市场。而1995年成立的Caliper公司是一家致力于Lab-on-Chip技术及相关产品研发的公司,曾与Agilent公司合作推出全球第一款基于Lab-on-Chip技术的商品化生物大分子检测设备——2100生物分析仪,其后又自主研发并推出高通量Lab-on-Chip产品LC90及LC3000,分别用于核酸蛋白检测及药筛研究。Zymark公司和Caliper公司于2003年成功合并从而形成了今天著名的Caliper Life Sciences公司。随着公司的发展、队伍的壮大和技术的革新,Caliper Life Sciences已陆续推出了一系列高新技术产品,其中具有里程碑般代表性的产品当数新一代实验室液体处理工作站产品Zephyr系列(图1)以及新一代基于Lab-on-Chip技术的高通量生物大分子分析仪LabChip GX(图2)。这两种产品的完美组合为基因组、转录组学研究提供了完整的解决方案和技术路线,可大大提高各生物类科研机构的研究效率及数据的准确性、可靠性。



图1. Zephyr外观示意图



图2. LabChip GX外观示意图

Zephyr系列实验室自动化系统具备强大的液体处理能力,可配备振荡器、温控、负压抽滤、磁力支架等各种功能附件,应用范围十分广泛。如在基因组学及转录组学中可用于各种文库管理、核酸样品制备与纯化、各种PCR或测序反应体系的构建及产物纯化、新一代测序样品制备、基因表达分析、Affymetrix芯片实验自动化等等,另外在蛋白组学和药物研发领域中均可满足多种应用。

作为一套卓越的液体处理系统,Zephyr基本型工作站拥有可兼容各种96孔板及384孔板的标准板位平台,通过其高精度机械臂精确移动定位加样工具,以实现各种精细的加样、移液及分液自动化操作。可配套使用96道阵列式加样模块或384道模块,前者加样量程1-200 μ L: 1-5 μ L时CV<5%, 5-200 μ L时CV<2%;后者量程为0.5-25 μ L: 0.5-2 μ L时CV<8%, 2-25 μ L时CV<5%,因此满足了高精准度和中高通量的科研要求。Zephyr在液体处理方面功能强大,表现灵活多样,对于常用的96道加样模块,可实现单道、8道、12道乃至96道同步的移液、分液操作,另外在机械臂上一体化配备的抓板机械手,能方便地将微孔板及其他耗材及功能组件进行板位间转移、堆叠,并具备开关板盖功能。试剂耗材方面实现完全开放和兼容,用户可自行编写操作程序,以配合多个主流厂商的试剂产品以达成相应实验的自动化。

在此基础上,Caliper Life Sciences公司于2009年又推出了专业的Zephyr基因组学工作站,用以实验室核酸样品自动化处理。该系统增添了预装的应用程序,包括核酸抽提、PCR/测序体系构建、PCR/测序产物纯化、样品均一化等,其中核酸抽提程序配合了Promega、Millipore等主流品牌公司的试剂盒,兼容了硅胶膜及磁珠法两种提取方法,还可选配环境保护罩及HEPA系统以保证提取过程不受污染。而且程序采用图形化界面(图3),提供试剂用量计算、板位摆放说明等信息,直观明了,方便实用。预置程序还在不断更新中,可在线下载,并可自行修改优化。另外该系统配备了非接触式液面感应装置,以扫描的方式进行Clog Detection,以避免出现个别孔堵膜而未能抽滤充分以及溢液所造成的交叉污染。由此该系统能够更好地为基于核酸的基因组学、转录组学研究提供全面、强大而便捷的自动化服务。

Caliper Life Sciences公司的新一代基于Lab-on-Chip技术的高通量生物大分子分析仪LabChip GX于2008年推出,该仪器可提供全面的高质量核酸检测数据和强大的



图3. Zephyr基因组学工作站特有的图形化界面程序

分析功能,具有数十甚至数百倍于传统的检测速度,完备的试剂耗材及配套认证,操作简便,安全可靠等优势,无疑将使传统的手工一维核酸电泳检测成为历史。芯片检测时仅需纳升级的样品,且一张芯片可重复使用数百上千次,每次可检测1-384个样品。仪器可兼容多种96孔板及384孔板,灌胶、上样、染色、成像、分析并给出结果全部自动化完成,最快可以达到28s/样品的检测速度。软件功能同样强大而标准(图4),符合FDA 21CFR Part11要求,可提供GLP、GCP、GMP要求的4Q(DQ/IQ/OQ/PQ)认证服务。软件可输出峰图、胶图和数据表格或其组合,可对不同批次乃至不同实验间的数据进行平行比对,并具过滤功能用以筛选或比较具特定条带的样品,其数据结果的全面性、准确性、重现性、灵敏度、分辨率及定量线性范围均优于传统一维电泳检测法。检测DNA时(图5),不但可根据特征条带的大小、浓度等参数判断DNA质量,还因检测分辨率高达4-5bp,故可进行某些病原体的鉴定分型,如多重PCR检测样品中是否含有特异的HBV、HCV、HIV的扩增片段;可鉴定某些种质资源,如测定PCR-RFLP指纹图谱以鉴定*C. elegans*;还可进行基因分型如某些SSR分析等等。在RNA分析实验中(图6),为保证下游表达芯片、qPCR等基因表达分析实验的准确性与成功率,RNA样品的浓度及完整性质控至关重要。LabChip GX具有独创的RNA质量评分参数(RNA Quality Score, RQS),能准确而直观地评估RNA样品的质量,并筛选出高质量样本;此外还提供其他多项RNA质控指标:28S、18S、28S/18S(高度)、28S/18S(面积)、28S/总面积、18S/总面积、Fast Area Ratio。由此LabChip GX的RNA检测成为某些生物芯片公司进行表达芯片分析实验前的RNA质控金标准。

众所周知,无论进行何种复杂的基因组学或是转录组学的研究,都是基于核酸的研究,前期都要经历反复多次的核酸提取、纯化、质控、各种PCR反应、PCR产物检测等一系列实验步骤,Zephyr及LabChip GX的出现和分工合作圆满地解决了大部分的实验内容,将实验室研究人员

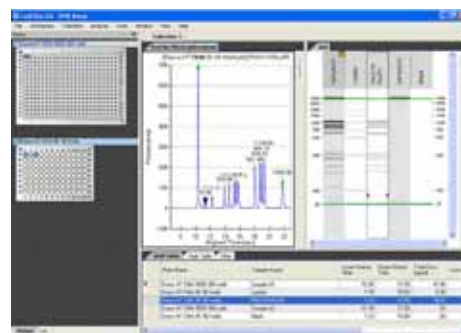


图4. LabChip GX软件分析界面示意图



图5. LabChip GX的DNA检测应用



图6. LabChip GX的RNA检测应用

从每日大量繁杂重复的常规实验操作中解放出来,将更多的精力投入到实验设计和后期数据分析上,从而大大提高了研究效率,降低了人为实验误差,实现了自动化标准化的实验流程,保证了实验的重现性。另外,为满足当前许多生物学研究涉及各种复杂的实验流程,需要高通量及全自动化的要求,Caliper Life Sciences公司开发出iLinkPro软件系统,不但可将Zephyr和LabChip GX两套系统完美整合于一体,且通过与多家科学仪器生产商的多年合作,实现了可与上百种第三方设备实现无缝整合,其中包括有PCR仪、酶标仪、洗板机、储板器、转移机械臂、条形码识别器等等,真正实现了“Sample in-Data out”的完全自动化流程。

实验室自动化系统还在不断发展和完善中,作为其中的佼佼者,Zephyr和LabChip GX的诞生和完美组合为基因组学及转录组学研究提供了完整解决方案,大大提高了研究效率和准确性,今后必定会为生物科学研究带来划时代的变革。

BioTek Synergy™ H4全功能微孔板检测仪在基因组学 和多重检测中的应用

基因组研究计划包括以全基因组测序为目标的结构基因组学和以基因功能鉴定为目标的功能基因组学。随着科技的发展，基因组学研究重心已开始从揭示生命的所有遗传信息转移到在分子整体水平对功能的研究上。功能基因组学的任务是进行基因组功能注释，了解基因的功能，认识基因与疾病的关系，掌握基因的产物及其在生命活动中的作用。在使用全局方法进行研究时，如基因表达调控（如荧光素酶、GFP、GUS等报告基因系统，核酸蛋白相互作用）、信号转导通路（如受体配基相互作用、蛋白质蛋白质相互作用、离子通道研究）等研究时，研究人员往往需要同时检测大量基因的表达水平或指标，从而在整体水平上获得相关信息。这就需要检测仪器不但要具备功能全、性能佳、通量高、速度快的特点，还要兼顾使用上的方便和灵活。同样的需求也出现在多重检测应用中，比如在药物筛选和药物研发领域，用于多靶点生物标记同时测量的多重检测法就体现出了巨大的潜力。

多功能微孔板检测仪（Multi-mode microplate readers）是当今生命科学实验室必不可少的一类仪器。目前先进的读板技术已经可以在荧光、发光、吸收光的基础上实现多到令人难以置信的检测方案。但市面上绝大多数的微孔板检测仪不是基于光栅系统就是基于滤光片系统。光栅系统的特点是波长选择较为灵活，在进行某项新的实验之前无需购买滤光片，并且可以实现一定范围内的光谱扫描。滤光片系统的特点是透光率比较高，从而可以提高检测的灵敏度，尤其适用于荧光偏振（FP），时间分辨荧光共振能量转移（TR-FRET）等实验。总体看来，无论是光栅还是滤光片系统都有自己的优势，但是当我们选择其中一种时无疑就会牺牲掉另一方面的性能。美国BioTek仪器公司于2010年新推出的旗舰型产品——Synergy™ H4全功能微孔板检测仪（图1）正是这样一款将光栅和滤光片完美结合的仪器。该产品拥有Hybrid Technology™的专利技术，可以在高性能滤光片系统和灵活的四光栅系统中任意切换。四光栅系统极大的提高了检测的灵活性和检测光谱的广泛性，从微量的紫外样品检测到近红外样品的检测均能覆盖。另外四光栅系统还具有带宽可调的功能，针对不同荧光染料的特性可以选择最佳的带宽组合，与市面上绝大多数带宽固定的光栅系统相比，可谓真正发挥了光栅的优势。而基于滤光片和二向色镜的光路系统则用于加强检测性能，比光栅系统更为快速和灵敏。整套仪器还可以选配

双自动进样器用于进行快速闪光分析和荧光离子通道分析等实验。除此之外，其主要检测模式还包括：荧光强度检测（FI），荧光偏振检测（FP），时间分辨荧光检测（TRF），高性能发光检测，紫外/可见吸收光检测，AlphaScreen / AlphaLISA等。

另外，通过对传统方法进行改进，还可使用BioTek公司的Take3超微量多体积检测板进行原位微量BCA法蛋白定量分析。BCA蛋白定量法相对于其它比色定量法具有操作简单、稳定、灵敏度高等优点。相对于蛋白质的固有的280nm吸收峰检测，BCA检测法提高了蛋白检测灵敏度和特异性，消除了核酸的干扰，核酸干扰在对细胞裂解物或其他生物样品进行蛋白定量时总是一个难以避免的干扰。在碱性条件下，蛋白将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ ， Cu^+ 与BCA试剂形成紫色络合物，其吸光值与蛋白浓度成正比。测定在562nm处的吸收值，并与标准曲线对比，即可计算待测蛋白的浓度。和传统标准BCA方法（BCA工作缓冲液和蛋白质样品体积比为20:1）相比，该方法的蛋白检测灵敏度有明显的提高。相比与Mini-BCA分析方法，原位分析方法更加精确。



图1. Synergy™ H4全功能微孔板检测仪

一. 产品介绍

Synergy™ H4是全球首款真正意义上的全功能微孔板检测系统，可以完成各种基于微孔板的检测分析实验。在吸收光检测方面采用氙灯做为光源，单色器来选择波长，波长范围230-999nm，测量范围0-4OD，分辨率为0.0001OD。在荧光检测中，采用卤素灯或高能氙灯做为光源，滤光片/二向色镜或四光栅单色器进行波长选择，并根据不同系统选择低噪音PMT或红外延展PMT进行检测，其检测灵敏度可达0.1fmol/孔-384孔板。对于荧光偏振及时间分辨荧光也都有独立的光路进行检测，灵敏度分别为3mP和6amol/孔-384孔板。而对于发光检测，采用专

用的液导光纤及低噪音PMT大大增加了检测灵敏度，其最低检测极限为10amol ATP/孔-384孔板。Synergy™ H4可以阅读6-1536孔板，并可以整合储板器以达到无人值守的高通量检测（图2）。



图2. Synergy™ H4与BioStack储板器

Synergy™ H4的主要特点如下：

- 专利的Hybrid技术：Synergy™ H4整合了高灵敏度的基于滤光片的荧光检测光路和方便快捷的基于单色器的荧光检测光路，为您提供了应用最为广泛的荧光检测系统。

- 模块化设计：每一个检测模式都有相对应的独立检测模块，可以根据需要任意组合配置。

- 带宽可调的四光栅系统，Z轴高度可调：Synergy™ H4的荧光光路系统整合了两个双光栅单色器，这种设计提供了最好的光谱扫描性能和检测灵活性，激发和发射光栅均可独立进行四种不同带宽的选择，共有16种组合方式，最大程度上适应不同荧光染料的检测要求。自动Z轴高度可调，仪器可根据孔板和液面的高度自动进行100μm步进精度的调整，以获得最佳检测效果。

- 深度阻挡滤光片和二向色镜：Synergy™ H4的滤光片/二向色镜光学组合与传统的滤光片系统相比提供了最好的荧光强度检测、时间分辨荧光检测和荧光偏振检测性能。

- 兼容Take3超微量多体积检测板：可同时进行16个体积为2μL的超微量核酸或蛋白定量，适合微量或珍贵样本的检测（图3）。



图3. Take 3超微量多体积检测板

- Gen5™数据分析软件：BioTek 新一代 Gen5™软件所提供的逻辑界面的设计目标是简化从读板参数到微孔板布局、再到强大的数据分析、最后到灵活的数据输出选项的整个流程。这一简单直观的设计取得了众多成功，包括独创的StepWise规程和数据处理工具，强大的Gen5数据精简以及一键导出功能，可显著提高实验室的效率。

各类典型应用代表试剂生产知名厂商的认证：双荧光素酶报告基因分析（DLR™）认证；高灵敏度时间分辨荧光检测所提出的HTRF认证；LanthaScreen™技术认证；BellBrook实验室为Transcreener®系列技术提出的认证。为您的实验成功提供更加有力的保障。

二. 应用举例

在Synergy™ H4全功能微孔板检测仪上进行AlphaScreen cAMP试剂盒实验优化^[1]。

PerkinElmer公司的AlphaScreen产品广泛应用于研究生物分子，包括激酶，G蛋白偶联受体，生物标记分子等。AlphaScreen是在微孔板上基于微球来进行生物分子相互作用研究的技术。“Alpha”是“Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay”每个单词第一个字母的缩写。这个技术提供了一种无放射性、均相的、低背景和高信噪比的检测方式。AlphaScreen系统中包含两种微球：供体微球和受体微球来产生信号。供体微球可以在680nm处被激发，如果受体微球位置离供体微球非常近，激发产生的能量就可以传递给受体微球，并产生520-620nm波长的发射光。如果受体微球离供体微球比较远的话，就不会发生能量传递，这样供体微球的能量就会回到基态。激发供体微球的能量一般是由激光微孔板酶标仪的激光提供，虽然激光酶标仪可以很好的进行AlphaScreen实验，但它价格非常高，而且通常不能用到其他检测中。而在BioTek多功能微孔板检测仪上装备的卤钨灯也可以很好的检测AlphaScreen实验，得到高质量的实验结果，而且相对来说价格更便宜。并且卤钨灯的波长范围很宽，可以进行多种检测的激发，如荧光强度检测和荧光偏振检测。

以下是使用BioTek Synergy™ H4全功能微孔板检测仪来激发和检测AlphaScreen cAMP分析。在这个实验中，采用深度阻挡滤光片和二向色镜的系统进行波长选择，同时配合低噪音PMT来进行结果检测。

链酶亲和素包被的供体微球上含有光敏基团——苯二甲蓝染料，这种染料在680nm波长的光下会被激发把O₂反应产生单态氧，这种单态氧寿命很短，半衰期大约只有4微秒，很快会变回基态。这种单态氧在溶液中可以扩散约200nm。在缺乏细胞内源的cAMP时，生物素标记的

Instrument Detection Component		BioTek Catalog #
Excitation Filter 1	680/30 nm	7082229
Excitation Filter 2	Plug	708673
Emission Filter 1	Plug	708673
Emission Filter 2	570/100 nm	7082264
Dichroic	635 nm Cutoff	7139635
Optimized Instrument Settings		
Light Source: Tungsten	Delay after Plate Movement : 250 msec	
Measurements per Data Point: 15	Dynamic Range: Extended	
Filter Switching per Well: Enabled		

表1. Synergy™ H4 AlphaScreen检测仪器参数设定示意图

cAMP将结合到抗cAMP抗体包被的供体微球上, 这样可以使供体受体两个微球相互接近, 单态氧上的能量就可以传递给受体微球上的二甲基噻吩衍生物, 最终产生520-620nm的光信号。如果体系中有内源的cAMP, 抗cAMP抗体将优先和这类cAMP结合, 而替换掉供体微球/生物素标记cAMP复合物。在没有受体微球的情况下, 单态氧将回到基态而没有信号产生(图4)。

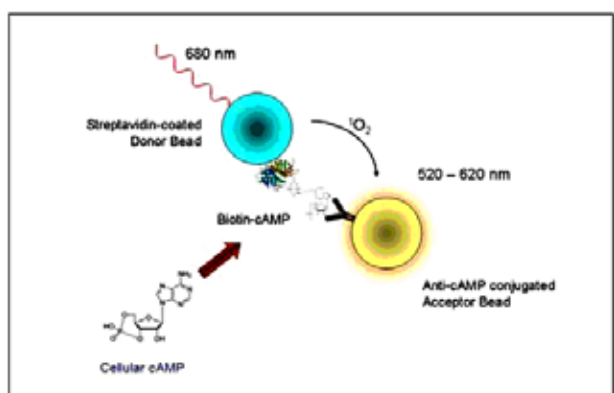


图4. AlphaScreen cAMP原理示意图

我们在正常检测情况下使用Synergy™ H4来检测cAMP实验。按照实验的操作流程构建cAMP标准曲线以用来比较信噪比和IC₅₀值。下列数据是使用Synergy™ H4检测的数据和在试剂盒说明书上列出的数据的对比。

Validation Component	Synergy™ H4 Generated Value	PerkinElmer Value
IC ₅₀ Value	12.3 nM	~7.5-10 nM
Signal:Background	22.5	~12.5
Z'-Factor Value	0.71	NA

表2. Synergy™ H4 和PerkinElmer检测数据比较

表2显示IC₅₀值为12.3nM, 优于实验可以接受的范围7.5-10.0nM。信噪比也同样优于试剂盒说明上列出的数据。而且, Z'-Factor Value为0.71表明使用上述仪器参数设定检测结果良好。

结论表明, Synergy™ H4可以得到从其他AlphaScreen检测仪器上得到的一样的高质量的数据。使用Synergy™ H4的卤钨灯进行检测降低了AlphaScreen检测的成本, 同时提高了检测的便利性。使用推荐的实验流程能够得到与试剂盒说明书上一样甚至更好的实验结果。在加入生物素标

记的cAMP/供体混合后孵育两个小时能有效提高数据质量, 同时不会牺牲试剂的性能(具体实验方案见参考文献1)。

2. 在Synergy™ H4全功能微孔板检测仪上分别用FP、TR-FRET、FI等检测模式进行ADP集聚检测^[2]。

三种检测模式都是基于底物与ATP在ADP生成酶的催化下会产生磷酸化底物及ADP这个反应。

对于荧光偏振检测来说, Transcreener® ADP 检测混合物中包含与Alexa633-ADP相结合的ADP2抗体, 其中Alexa633经过激发可以发出荧光。酶反应过程中产生的ADP可以与Alexa633-ADP发生竞争性结合。被取代下来的游离的Alexa633-ADP会由于自身的旋转导致荧光偏振现象的减弱(图5)^[3]。

对于荧光强度检测来说, Transcreener® ADP 检测混合物中包含与Alexa594-ADP相结合的ADP2单克隆抗体, ADP2单克隆抗体又与IRDye QC-1淬灭剂共轭连接, IRDye QC-1可以将Alexa594的荧光淬灭。酶反应过程中产生的ADP可以与Alexa594-ADP发生竞争性结合。被取代下来的游离的Alexa594-ADP由于与淬灭剂距离变远, 不再受到淬灭, 经过激发会发出荧光, 从而导致反应体系中荧光强度的增强(图6)^[4]。

对于时间分辨荧光共振能量转移来说, Transcreener® ADP 检测混合物中包含与ADP HiLyte647相结合的ADP2抗体-铽(Tb)共轭物。用330nm的紫外光激发Tb复合物导致能量转移到ADP HiLyte647, 从而产生665nm的发射光。酶反应过程中产生的ADP可以与ADP HiLyte647发生竞争性结合, 导致TR-FRET现象的减弱, 产生620nm的发射光(图7)^[5]。

(下转第28页)

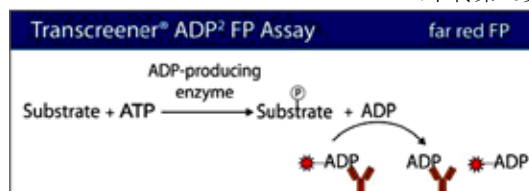


图5. BellBrook Labs Transcreener® ADP² FP分析原理示意图

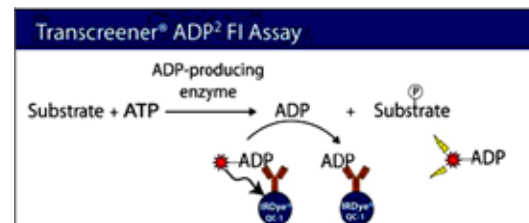


图6. BellBrook Labs Transcreener® ADP² FI 分析原理示意图

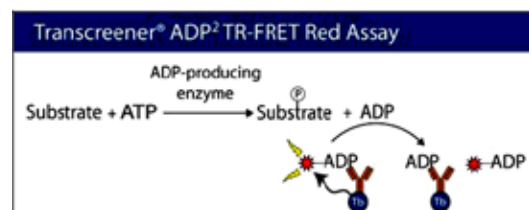


图7. BellBrook Labs Transcreener® ADP² TR-FRET Red分析原理示意图

蛋白组学研究新思路——蛋白芯片技术

蛋白芯片是一种用来检测蛋白分子之间相互作用的高通量检测系统。与传统的基因芯片相比，蛋白芯片是以蛋白质代替核酸作为检测对象，它直接在蛋白质水平上检测表达模式，在基因表达研究中有着更加直接的应用前景。

它的基本原理是将各种蛋白质有序地固定于载玻片等各种介质载体上成为检测芯片，然后，用标记了有特定发光物质的抗体与芯片作用，与芯片上的蛋白质相匹配的抗体将与其对应的蛋白质结合，抗体上的发光物质将指示对应的蛋白质及其表达数量。在将未与芯片上的蛋白质互补结合的抗体洗去之后利用检测仪测定芯片上各点的光强度，通过光强度分析蛋白质与蛋白之间相互作用的关系，由此达到测定各种基因表达功能的目的。由于生物细胞中蛋白质的多样性和功能的复杂性，开发和建立具有多功能样品处理能力、能够进行快速分析的高通量蛋白芯片技术将有利于简化和加快蛋白质功能研究的进展。

广义的蛋白芯片产品分为固相和液相两类，目前市场上液相蛋白芯片的产品主要有：BD公司的CBA平台，MEK、R&D和Affymetrix等公司的Luminex xMAP平台，这两个平台的相关信息在本期其他几篇文章中有详细介绍。固相蛋白芯片产品主要有：R&D的Proteome Profiler抗体阵列和Mosaic™ ELISA试剂盒，CST的PathScan®抗体芯片。

一. R&D Proteome Profiler™蛋白芯片

Proteome Profiler蛋白芯片作为一种快速、灵敏而又经济的工具，在不需要任何特殊仪器的情况下，能同时检测单个样品中多种蛋白的相对水平。试剂盒中点在硝酸纤维素膜上或96孔板上的所有捕获抗体均经过精心选择，具有高度特异性。R&D公司的蛋白芯片能广泛地应用于信号转导、血管再生、细胞凋亡、肿瘤、肥胖、以及干细胞、药物筛选等的研究。

Proteome Profiler™蛋白芯片的特点：

适用范围广——可用于细胞上清、细胞溶解产物、血清、血浆等样本

省时省力——避免重复进行多次免疫沉淀或Western Blot实验，6小时内完成多指标检测

高通量——在单一样本中可同时检测多达119种待测物

高灵敏度——比Western Blot灵敏度高20倍

简便——不需要任何特殊的仪器，使用化学发光检测

其检测原理是：将高度特异的捕获抗体点样在NC膜或96孔板上，形成抗体芯片阵列。捕获抗体识别样本中的目的蛋白，随后HRP结合的检测抗体特异检测被捕获的蛋白。之后，利用化学发光检测试剂来检测蛋白，产生的信号与结合的分析物呈正比（图1）。

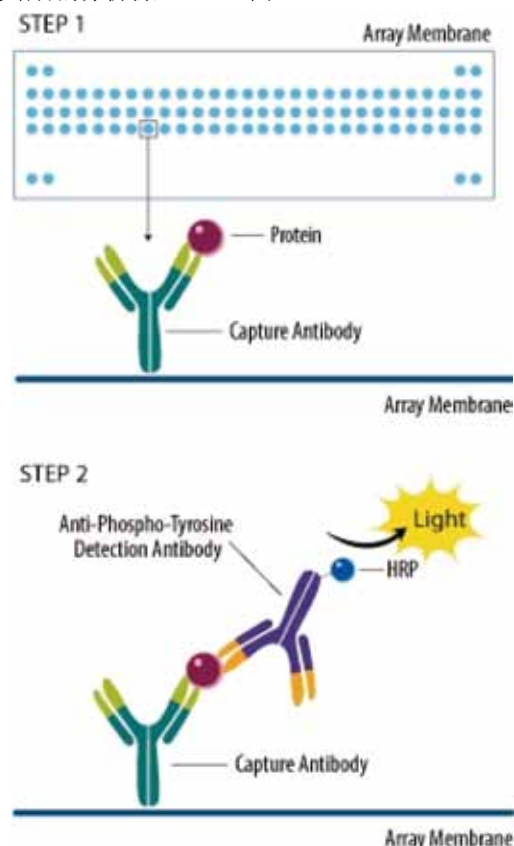


图1 Proteome Profiler™蛋白芯片检测原理

二. R&D Mosaic™ ELISA试剂盒

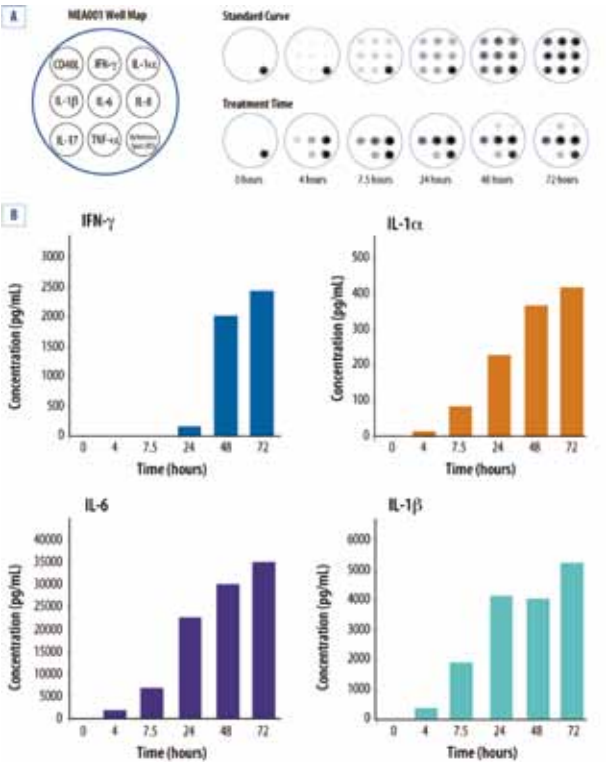
Mosaic™ ELISA试剂盒在96孔板的每个孔中可同时对8个不同指标进行检测，同时在试剂盒中包含了纯化的标准品，可对检测指标进行绝对定量。

相较于传统的ELISA试剂盒，Mosaic™ ELISA有明显的优势：

- 多因子定量分析，每孔同时检测8个指标
- 节约时间，完成1个试剂盒的时间得到8个试剂盒的数据
- 节约了样品，每孔只需50μl样本
- 数码成像系统读取结果，保证其准确性和重复性

规格	预点样的96孔板，每个孔8个捕获抗体点以及一个定位参考点，
每板反应数	80
样本类型	细胞培养上清、血清、血浆
样本体积	25μL
实验耗时	4.5h
检测方法	化学发光
自动化	可以

表1 Mosaic™ ELISA试剂盒概况



Simultaneous detection of multiple analytes in PHA-treated PBMCs. Human peripheral blood mononuclear cells were treated with 10 μg/mL PHA for 0 – 72 hours. Following treatment, analytes were detected using R&D Systems Mosaic ELISA Human Cytokine Panel 1 (Catalog # MEA001). A. Upper panel shows the well map for Mosaic ELISA Human Cytokine Panel 1 and representative images of individual wells for the standard curve and data shown in the histograms below. In addition to the 8 spotted capture antibodies, well images show a Reference Spot (lower rightmost spot in each well). PBMC supernatants were diluted 1:64 to ensure that the values for all of the analytes fell within the standard curve. Reference Spots provide a strong positive signal to allow easy visualization of well location for template alignment during data analysis. B. Lower panel shows examples of analyte concentration quantification.

图2 Mosaic™ ELISA试剂盒数据示例

三. CST PathScan® ELISA抗体芯片

CST PathScan® 抗体芯片技术是基于夹心法ELISA原理的多元分析检测技术，主要用以检测信号转导通路中的关键因子。每个试剂盒提供两张芯片，每张芯片上含有8个抗体阵列，可同时检测多达40个不同的目的蛋白。

PathScan® ELISA试剂盒提供化学发光检测和荧光检测两种形式。化学发光可使用传统的胶片检测，不需要任何额外的设备；荧光可用荧光成像仪检测。

PathScan® ELISA抗体芯片的优势：

- 使用CST生产的最优质的抗体，提供最大限度的特异性和灵敏度
- 可在150μL的细胞裂解中同时检测多个指标，省时

省力、

- 同时检测细胞表面和细胞内的蛋白质，精确反映信号通路情况
- 化学发光检测不需要任何特殊的仪器，也有荧光检测方式供选择



图3 CST PathScan® ELISA抗体芯片图示

四. 产品订购信息

厂家	货号	产品名称	检测指标数
R&D	MEA001	Mosaic ELISA Human Cytokine Panel 1	8
R&D	ARY001	Proteome Profiler Human Phospho-RTK Array Kit	42
R&D	ARY002	Proteome Profiler Human Phospho-MAPK Array Kit	19
R&D	ARY003	Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit	46
R&D	ARY004	Proteome Profiler Human Phospho-Immunoreceptor Array Kit	59
R&D	ARY005	Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit, Panel A	36
R&D	ARY006	Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit, Panel A	40
R&D	ARY007	Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit	55
R&D	ARY008	Proteome Profiler Rat Cytokine Array Kit, Panel A	29
R&D	ARY009	Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit	35
R&D	ARY010	Proteome Profiler Human Pluripotent Stem Cell Array Kit	15
R&D	ARY011	Proteome Profiler Human sReceptor Array	105
R&D	ARY012	Proteome Profiler Human sReceptor Array	119
R&D	ARY013	Proteome Profiler Mouse Adipokine Array Kit	38
R&D	ARY014	Proteome Profiler Mouse Phospho-RTK Array Kit	39
R&D	ARY015	Proteome Profiler Mouse Angiogenesis Array Kit	53
R&D	ARY002B	Proteome Profiler Human Phospho-MAPK Array Kit	26
R&D	ARZ001	Proteome Profiler 96 Human Phospho-RTK Array 1	16
R&D	ARZ002	Proteome Profiler 96 Human Phospho-RTK Array 2	8
R&D	ARZ003	Proteome Profiler 96 Human Phospho-RTK Array 3	8
CST	7982	PathScan® RTK Signaling Antibody Array Kit (Chemiluminescent Readout)	39
CST	7949	PathScan® RTK Signaling Antibody Array Kit (Fluorescent Readout)	39

Eco™实时荧光定量PCR系统

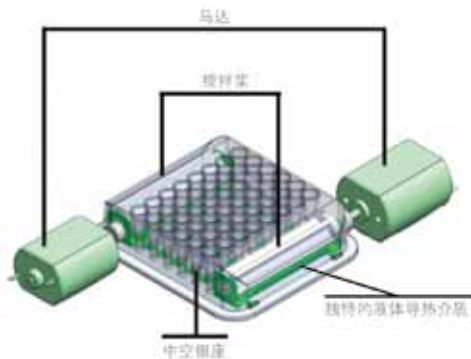
一. Eco实时荧光定量PCR仪背景

Illumina公司推出的Eco实时荧光定量PCR仪诞生于美国著名学府加州理工学院，由1975年诺贝尔生理医学奖获得者David Baltimore博士和世界著名光子与微细加工专家Axel Scherer博士的团队合作研发而成。Eco实时荧光定量PCR仪试剂完全开放，具有定量PCR仪的所有功能，并且含有对温控和光学检测要求更高的High Resolution Melt（HRM）分析功能。



二. 创新的液体-中空银槽热力学系统

Eco实时荧光定量PCR仪的导热元件是一个中空银槽，中空银槽是密闭的，内含一种特殊液体导热介质。在PCR循环过程中，液体导热介质通过两个反方向搅拌装置驱动，在中空银槽中快速流动，使热量从半导体均匀传递到整个银槽。这种独一无二的设计大大消除了孔间的温度差异和孔板的边缘效应，孔间温度均一性可以达到±0.1℃，保证了实验结果重复性好，CV值更低，而且能够进行HRM熔解曲线分析。



Eco实时荧光定量PCR系统更好的温度均一性保证了更好的Cq重复性

Average Cq	Standard Deviation of Cq	Maximum Cq	Minimum Cq
24.131	0.063	24.339	24.017

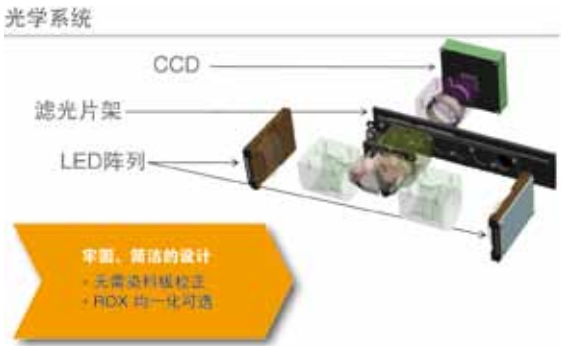
运行48个重复样品，结果显示Cq的重复性非常好，标准偏差仅为0.063，Eco定量仪很好的去除了孔板的边缘效应

三. 准确的光学系统

Eco实时荧光定量PCR仪包含一套先进的、高性能的光学检测系统，实现准确、灵敏的荧光信号检测。每循环48个样品孔，均可以四通道实时检测。

激发端：采用两个不同波长的固定式48 LED阵列（452-486nm，542-582nm），两个LED阵列分别位于样品板的两端，激发光经过反射镜到达样品，每个LED光源对应48孔样品板的每个样品孔，保证激发光路径完全相同。每孔均同时激发，最大程度减少孔间干扰，保证实验结果真实性。

检测端：四个发射滤光片（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实时检测每个循环每个孔的荧光信号，防止数据的丢失，并且可以在实验完成后进行样品编辑。

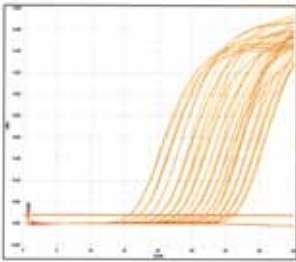


通道	激发波长(nm)	发射波长(nm)	检测荧光染料示例
1	452 - 486	505 - 545	SYRB, FAM™
2	452 - 486	562 - 596	HEX™, JOE™, VIC™
3	542 - 582	604 - 644	ROX™, Texas Red®
4	542 - 582	665 - 705	Cy5®, Quasar 670™

四. 实验数据

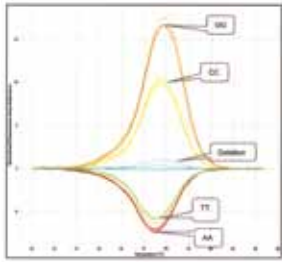
由于Eco实时荧光定量PCR仪无可比拟的温度均一性（±0.1℃）和针对每个孔设计的激发检测光路，得到的实验数据更可靠、精确度更高。

定量结果，区分模板两倍稀释差异



人cDNA (β -actin, 24pg-200ng)
两倍稀释标准曲线，14个梯度，
FAM通道检测

HRM 结果分层图



5个合成的基因变异型：
GG,CC,TT,AA和一个核苷酸的缺
失，每个样品4个重复



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

五. 软件功能

Eco是第一台完全满足MIQE (The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) 准则的荧光定量PCR仪，该系统配套的软件是集成式软件，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。

软件主要功能：

- 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.利用探针法做等位基因突变点分析；
- 4.基因突变筛查及HRM分析。



Eco定量PCR仪软件界面-实验类型选择



实验设置简单直观，设置样品性质（标准品，阴性对
照，未知样品）等

六. 产品参数

描述	特点
仪器规格	
样品板	48-孔板
表现	检测灵敏度可低至1 拷贝
	动力学范围 > 9 logs; 区分5,000 and 10,000模板拷贝，具有99%置信度
热力学系统	
部件	专利的中空银槽和半导体
温度均一性	± 0.1° C，实际温度均一性 < 0.05° C
温控范围	25-100° C
平均升温速率	5.5° C / 秒
样品体积	5-20μL
反应时间	用标准的定量试剂 40循环少于40分钟
	只读熔解曲线，HRM 功能约4分钟
光学系统	
部件	两个固定的固态LED 阵列 (452-486 nm 和542- 582 nm)；四个发射滤光片 (505-545 nm, 562-596 nm, 604-644 nm, 和 665-705 nm)
	检测器：CCD
PCR 试剂	开放平台，适用所有定量试剂
	出厂校正过的荧光染料：SYBR Green, ROX, FAM, HEX, VIC, Cy5 波长范围适用的染料，无需额外的校正
	ROX 支持，可选用

特殊样本的RNA提取

RNA提取是分子生物学研究的基础实验之一，在进行RNA芯片、cDNA测序、cDNA文库构建、qPCR、Northern Blot等研究时都需要高质量的RNA。但是有些样本因为细胞结构特殊、代谢产物极其丰富、本身RNA含量少等因素，影响到RNA提取的质量。另外，由于RNA酶的广泛存在并难以消滅的顽强特性，使得RNA的抽提纯化更为困难。本文将针对几种特殊样本的RNA提取展开介绍。

一. 植物样本

植物组织总RNA的提取较动物和微生物困难，原因是植物具有坚硬的细胞壁，富含多种次生代谢物，如多糖、多酚、蛋白质等。细胞破碎后，这些物质会以不同方式干扰RNA的提取，如酚类氧化后可使RNA活性丧失，多糖可形成难溶胶状物质与RNA一起被沉淀。

1. MN (MACHEREY-NAGEL,GERMAN) 针对植物RNA提取，推出了NucleoSpin® RNA Plant Kit。该款试剂盒较市场同类产品优点如下：

(1) 包含两种优化的Lysis Buffers，RA1 (guanidinium thiocyanate) 和RAP (guanidinium-HCl)，也可选用更强劲的Buffer RL1，即使是次生代谢物非常丰富的植物组织和真菌都可以充分裂解。裂解液中含RNA酶抑制剂，裂解的同时保护了RNA不被内源性的RNA酶降解。

(2) 包含rDNase和两种Wash Buffer，RNA纯度更高。

(3) 配合NucleoSpin® RNA / DNA Buffer，一次提取可同时获得同一样本来源的RNA和DNA。可更精确研究DNA、RNA调控关系。

(4) RNA得率高，耗时少。100mg组织可获得多达70µg RNA，30 min/6 samples。

(5) 对至少20种植物进行RNA提取测试，具体植物种类可见产品说明书。

操作步骤如下：

新鲜的植物组织或培养的植物细胞收集后立即液氮或-70℃保存。

样本液氮研磨→样本裂解→裂解产物过滤→柱子预处理→RNA挂膜→去盐→降解DNA→洗膜3次→洗脱RNA→RNA收集保存

2. EPICENTRE (U.S.A) MasterPure™ Plant RNA Purification Kit

该款试剂盒较市场同类产品特点：

(1) 抽提纯化的RNA中包含small RNA，并可直接用于后续实验。

(2) 采用沉淀法提取，RNA得率更高。

(3) 无需酚、氯仿及腐蚀性溶剂。

二. FFPE样本

石蜡包埋组织样本是珍贵的分子生物学研究材料，包含了大量临床病理信息，但是由于它们的保存时间一般都比较长，很不容易从中提取到可以进行RT-PCR的RNA，主要原因是RNA的降解和脱蜡过程中样品的丢失。

1. MN (MACHEREY-NAGEL,GERMAN) 针对FFPE RNA提取，推出了NucleoSpin® FFPE RNA Kit。

该款试剂盒，较市场同类产品优点如下：

(1) 专利脱蜡技术，无需二甲苯或其它有机试剂，无需反复清洗，避免脱蜡过程中RNA损失，脱蜡试剂无刺激性气味。

(2) 柱子内部创新的漏斗环状设计，超小膜面积，洗脱体积最小至5µL，减少膜上RNA残留，提高RNA浓度。

(3) RNA更完整，最佳条件下可达5000 bases。

(4) 方便快捷，70 min/6 samples。

(5) 另有NucleoSpin® FFPE RNA/DNA Kit，可同时获得同一样本来源的RNA和DNA。更精确研究DNA、RNA调控关系。

操作步骤如下：

样本脱蜡→热处理→样本裂解→去交联处理→柱子预处理→RNA挂膜→去盐→降解DNA→洗膜3次→洗脱RNA→RNA收集保存

2. EPICENTRE QuickExtract™ FFPE RNA Extraction Kit

该款试剂盒较市场同类产品特点：

(1) 仅需热处理融蜡。

(2) 热处理30min后，得到的RNA就可进行RT-PCR适合高通量应用。

(3) 一次提取可同时获得同一样本来源的RNA和DNA。

(4) 无需过柱子, 无需样本转移, 避免样本损失。

三. 珍贵、少量样本

一般的RNA提取试剂盒都有最小上样量, 如果低于这个下限, RNA的浓度和纯度都无法保证, 后续研究将无法进行。因此对于临床活检、显微切割等得到的非常少量的样本, 普通试剂盒是不适用的, 这就需要专门针对这类样本设计的试剂盒。

EPICENTRE针对这方面需求, 推出了ArrayPure™ Nano-scale RNA Purification Kit (图1)

该试剂盒能最少从一个细胞中提取RNA。该款试剂盒较市场同类产品优势:

1. 从1—10,000个细胞中提取RNA。
2. 提取得到的RNA可直接用于后续实验, 例如: real-time PCR。
3. 含RNase Inhibitor、Proteinase K、RNase-Free DNase。
4. 无需过柱子, 最少5 μ L洗脱体积, 减少样本损失, 保证RNA浓度。
5. 操作过程不涉及有毒试剂。
6. 结合相应protocol, 可用于RNA纯化(去除DNA)。

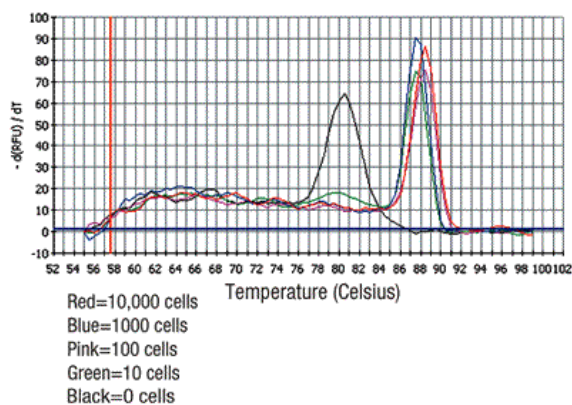
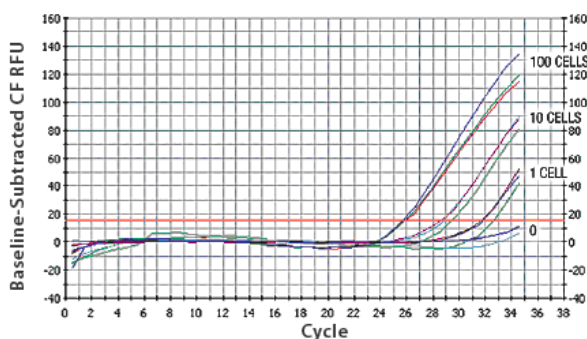


图1. Array Pure(TM) Nano-scale RNA Purification Kit提取RNA, real-time PCR结果展示

操作步骤如下:

细胞裂解→65℃孵育→冰上冷却→加蛋白变性剂→蛋白沉淀→离心后上清转移至干净EP管中→加异丙醇→离心后去异丙醇→沉淀晾干→RNA溶解

MN 有相类似的NucleoSpin® RNA XS Kit样本上样量 tissue < 5mg, 1-100,000 cultured cells, 柱子内部创新的漏斗环状设计, 超小膜面积, 洗脱体积最小至5 μ L, 减少膜上RNA残留, 提高RNA浓度。

四. RNA质量鉴定

1. 紫外分光光度计检测:

纯度 (OD260/280)

OD260/OD280 <1.8	有蛋白污染
OD260/OD280 =1.8-2.0	纯度好
OD260/OD280 >2.0	有部分降解
OD260/OD230 <2.0	有异硫氰酸胍或 β -巯基乙醇残留

得率: Yield=OD260 $\times$ 稀释倍数 $\times$ 40ng/ μ L

2. 电泳检测 (图2)

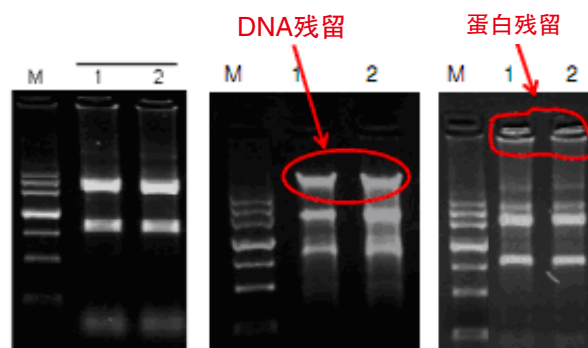


图2. RNA 琼脂糖电泳图

3. RNA完整性检测 (图3)

Agilent2100生物分析仪及其配套RNA检测试剂盒 RIN(RNA完整性指数) 可对RNA样本进行1-10分级, 分值越高, 质量越好。

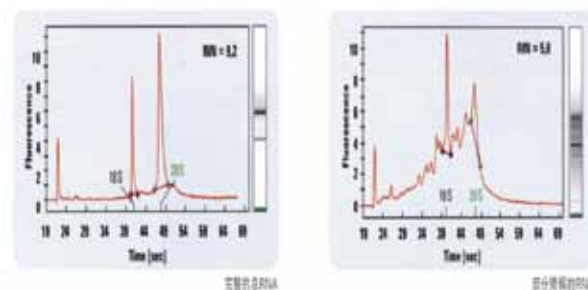


图3. Agilent2100检测结果图

五. Trouble Shooting

Problem	Possible cause	Suggestions
RNA降解或没有RNA	存在RNA酶污染	注意操作台、枪头等去RNA酶处理，戴口罩、手套
RNA质量差或得率低	试剂操作不当	确认实验前，相应的试剂中已加入乙醇、RNA酶抑制剂、DNA酶等，确认试剂没有过期或出现沉淀
	试剂保存不当	各试剂严格按照说明书保存
	样本保存不当	样本需保存在液氮、-70℃或保护试剂中，避免内源性和外源性RNA酶污染
	样本前处理不完全	充分研磨样本
	样本上样量太大	减少样本上样量
	裂解不充分	减少样本上样量或增加裂解液
	柱子堵塞	减少样本上样量，上柱前样本均相化处理
基因组DNA污染	DNA酶失活或未添加DNA酶	确认DNA酶活性，可重新配置DNA酶溶液
下游实验受干扰	RNA中残留乙醇或盐	可增加洗涤液量或增加洗涤次数，洗涤液温度过低，洗涤不充分
	RNA保存不当	-70℃保存或立即逆转录成cDNA保存，避免RNA酶污染，避免冻融

六. 产品订购信息

应用	厂家	货号	产品名	规格
植物样本RNA提取	MNG	740949.1	NucleoSpin RNA Plant Kit	10
		740949.5		50
		740949.25		250
	EPI	MPR09010	MasterPure™ Plant RNA Purification Kit	10
		MPR09100		100
FFPE样本RNA提取	MNG	740978.1	NucleoSpin FFPE RNA/ DNA Kit	10
		740978.5		50
		740978.25		250
	MNG	740969.1	NucleoSpin FFPE RNA Kit	10
		740969.5		50
		740969.25		250
	EPI	QFR82805	QuickExtract™ FFPE RNA Extraction Kit	5
		QFR82050		50
珍贵样本RNA提取	MNG	740902.1	NucleoSpin RNA XS Kit	10
		740902.5		50
		740902.25		250
	EPI	MPS04050	ArrayPure™ Nano-scale RNA Purification Kit	50

七. 其它特色RNA相关产品

1. MN
- NucleoBond® RNA/DNA Kit
- NucleoSpin® miRNA Kit
- NucleoSpin® TriPrep Kit
- NucleoSpin® RNA/Protein Kit
- NucleoSpin® RNA Clean-up/XS Kit
- NucleoTrap® mRNA Kit
- 详情可参见<http://www.mn-net.com/tabid/1311/default.aspx>

2. FUJIFILM
- QuickGene RNA blood cell Kit
- QuickGene RNA tissue Kit II
- QuickGene RNA cultured cell Kit
- QuickGene RNA cultured HC Kit
- 配合QuickGene 810/mini80仪器操作，减少外源性RNA酶污染，更方便快捷。
- 并配有不同物种、不同组织优化的protocol，详情可参见http://www.fujifilm.com/products/life_science_systems/nucleic_acid_isolation/guides/category/rna.html

3. EPICENTRE
- MasterPure™ RNA Purification Kit
- ExactSTART™ Small RNA Cloning Kit
- ExactSTART™ Eukaryotic mRNA 5′ - & 3′ -RACE Kit
- ExactSTART™ Full-Length cDNA Library Cloning Kit
- mRNA-ONLY™ Prokaryotic mRNA Isolation Kit with Poly(A)-Tailing
- mRNA-ONLY™ Prokaryotic mRNA Isolation Kit
- mRNA-ONLY™ Eukaryotic mRNA Isolation Kit
- 详情可参见<http://www.epibio.com/category.asp?CatID=74>

参考文献

[1] Mol Vis. 2006 Oct 2;12:1143-7.

[2] Cancer Res. 2002 Jan;8(1):41-53.

[3] Clin Immunol. 2004 Mar;110(3):252-66. Review.

[4] 中华肝脏病杂志;2006年02期

[5] 细胞与分子免疫学杂志;2007,23(9):821-823.

[6] J Immunol Methods. 2001 Aug 1;254(1-2):109-18.

[7] Anticancer Res. 2006 May-Jun;26(3A):2037-47.

[8] Am J Transplant. 2007 Jan;7(1):76-82.

[9] Blood. 2005 Mar 1;105(5):2036-41.



Gene Company Limited

基因有限公司

A Gene Group Company

illumina®

Eco

个性化定量PCR仪

你的定量PCR仪具有HRM功能吗？

价格、HRM功能，到底选哪个？能否二者兼得？Illumina公司重磅推出的Eco荧光定量PCR仪，由1975年诺贝尔生理医学奖获得者David Baltimore博士和世界著名光子微细加工专家Axel Scherer博士的团队合作研发而成，以其超高的温度均一性（ $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ），更广泛的应用（HRM分析功能），无可争议的价格、多种可选择的外壳和紧凑小巧的设计广受好评。你还等什么？

物超所值

超低的价格

QPCR + HRM

仪器突出表现

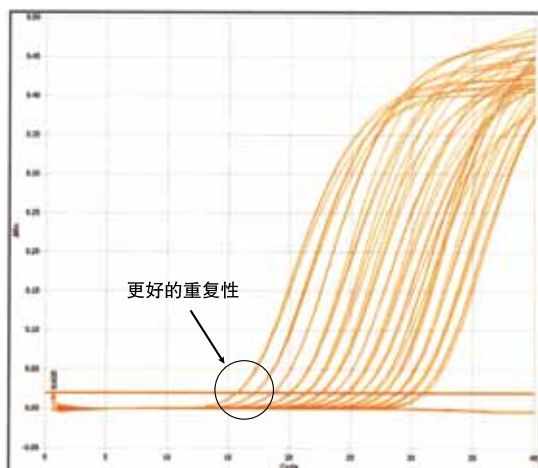
- 温度均一性高： $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$
- 反应速度快：40循环少于40分钟，无需快速试剂
- 动力学范围宽： $>9 \log$ s；区分5,000和10,000模板拷贝，具有99%置信度

软件支持应用

- 高分辨率熔解曲线（HRM）分析
- $\Delta\Delta\text{Cq}$ 法相对定量，支持多内参基因
- 绝对定量
- 等位基因分型

高质量的实验结果

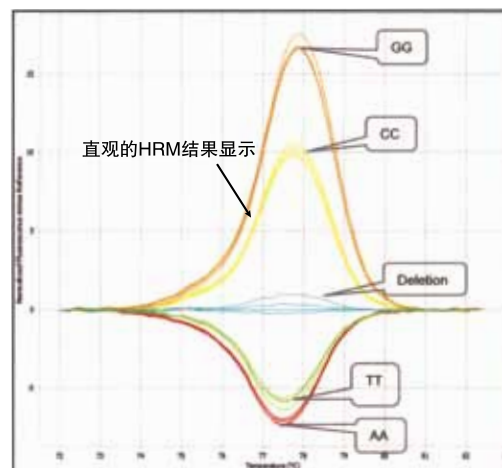
定量结果，区分模板两倍稀释差异



更好的重复性

人cDNA（ β -actin, 24pg-200ng）两倍稀释标准曲线，14个梯度，FAM通道检测

HRM 分析功能，只需设计引物，无需特异性探针



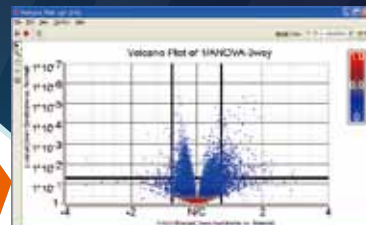
直观的HRM结果显示

5个合成的基因变异型：GG,CC,TT,AA和一个核苷酸的缺失，每个样品4个重复



Panomics基因验证试剂盒

分析结果验证



Partek分析软件

芯片数据分析和挖掘

基因芯片实验

RNA样本质控

RNA样本抽提



Affymetrix基因芯片系统



QuickGene-810



2100生物分析仪

基因功能
研究和开发



Gene Company Limited

基因有限公司

A Gene Group Company

基因有限公司为您倾情打造

Gene Company Limited for your DEDECATES

Let Professionals Serve Professionals

香港: 852-28966283
广州: 020-85524840
武汉: 027-87166462
西安: 029-82501196
济南: 0531-86560825
郑州: 0371-63721519

北京: 010-51665161
天津: 022-88293136
南京: 025-83248692
昆明: 0871-5349992
杭州: 0571-87229824
福州: 0591-22290055

上海: 021-64951899
成都: 028-85503964
沈阳: 024-23341315
重庆: 023-68614842
长沙: 0731-84476562



Gene Company Limited

基因有限公司

A Gene Group Company