

EBIOTECH

生物通技术周刊

第86期

2011年6月24日

全文下载

【基因组DNA纯化之选购宝典】

如何选择基因组DNA纯化产品？

基因组纯化之Promega篇 多样化的选择

基因组纯化之Qiagen篇 技术是王道

基因组纯化之Tiangen篇 只谈性价比

基因组纯化之Thermo篇 基于磁珠的基因组提取纯化系统

基因组纯化之ABI篇 MagMAX核酸抽提系统

【技术前沿】

PIoS ONE: RNA-Seq技术的优缺点

一千元的测序，十万元的数据分析？

基于单分子测序仪的基因表达分析新技术

【新品速递】

PacBio正式发售第三代测序仪

无需系统 轻松纯化生物素化蛋白

BD最新推出FACSVerse流式细胞仪

Sigma推出第二代ChIP试剂盒

轻松克服转染挑战 Neon电转染系统

精确计数 轻松分析 CASY细胞计数分析仪

关注临床应用，454推出HLA分型检测研究产品

【应用指南】

蛋白质磷酸化修饰的最新研究方法

三种靶向序列捕获策略的比较

冷泉港实验方案：利用蛋白芯片鉴定蛋白-DNA相互作用

【行业动态】

中国共有多少台高通量测序仪？

赛默飞世尔科技宣布正式完成对戴安的收购

如何选择基因组 DNA 纯化产品？

基因组 DNA 纯化是很多实验室的保留节目。高纯 DNA 对大部分分子生物学下游应用都很关键，如 PCR、测序、克隆等等。随着试剂盒时代的来临，我们可以更高效、更轻松、更安全地纯化基因组 DNA。不过，市场上有很多基因组 DNA 纯化试剂盒，选择起来也许很困难。生物通小编这次就带大家巡一巡众多品牌的基因组 DNA 纯化产品，包括经典产品和新产品，并教大家如何挑选适合自己的纯化产品。

不同生物（植物、动物、微生物）的基因组 DNA 的提取方法有所不同；不同种类或同一种类的不同组织因其细胞结构及所含的成分不同，分离方法也有差异。在提取某种特殊组织的 DNA 时，可以参照文献，或者向有经验人士请教。

在纯化之前，我们首先应明确 DNA 的用途。一般来说，基因组 DNA 的提取通常用于构建基因组文库、Southern 杂交、RFLP 及 PCR 等。若是构建基因组文库，对片段长度就有严格要求。初始 DNA 长度必须在 100kb 以上，否则酶切后两边都带合适末端的有效片段很少。而进行 RFLP 和 PCR 分析，DNA 长度可短至 50kb。另外，还要考虑 DNA 的纯度。存档、定量 PCR、基因分型、测序等应用对纯度要求都很高，在纯化时应特别注意。

有机溶剂法

教科书中大多介绍了这种传统方法。通常是在有 EDTA 及 SDS 一类的去污剂存在下用蛋白酶 K 消化细胞，随后用酚氯仿抽提。之后加入一定量的异丙醇或乙醇，基因组的大分子 DNA 即沉淀形成纤维状絮团飘浮其中，可用玻棒将其取出，而小分子 DNA 则只形成颗粒状沉淀附于壁上及底部，从而达到提取的目的。

这种方法适用的样本量灵活，且产量较高，但操作步骤复杂，耗时长，结果不稳定，残留在 DNA 溶液中的酚类等有机物质对 DNA 聚合酶有抑制作

用。除此之外，我们还得忍受刺鼻的气味和对健康的损害。当然，现在也有一些替代方法，用非有机溶剂来替代传统的有机溶剂。

介质吸附法

之后，多家公司开发出了纯化基因组 DNA 的试剂盒，它们主要是基于三种吸附材料：硅胶膜、阴离子交换树脂和磁珠。硅胶膜在高盐下结合核酸，在低盐下洗脱。阴离子交换树脂则与之相反，在低盐高 pH 下结合核酸，在高盐低 pH 下洗脱。而特殊包被的磁珠，在一定条件下对核酸有很强的亲和力，而当条件改变时，磁珠释放吸附的核酸，能够达到快速分离核酸的目的。

就这三种材料而言，硅胶膜能快速高效地纯化核酸，不用有机溶剂，相对而言也比较经济，所得 gDNA 纯度高，适用于 PCR、分子杂交、限制性酶切分析及基因芯片等分析。不过，此种方法无法得到全长的 DNA，不适合构建文库的同学选择。阴离子交换树脂纯化所得的 gDNA 纯度更高，而且长度也 longer，但操作过程比硅胶膜漫长一些，因为是靠重力流，而不是几分钟离心了事，价格也贵一些。磁珠法则更是简单快速，规模可大可小，纯度和长度也很理想，但需要额外购置一个磁力架，如果碰上哪家公司搞活动，买试剂盒送磁力架，那就还蛮划算。由于磁珠法易于自动化，多家公司也以此为基础推出了自动化核酸纯化仪。

CTAB 法

由于植物中次生代谢产物-多酚类化合物可介导 DNA 降解，而多糖的污染也是影响植物 DNA 纯度最常见的问题，这些多糖能抑制限制酶、连接酶及 DNA 聚合酶等酶类的生物活性。因此要从富含多酚和多糖的植物组织中分离获得高质量的基因组 DNA 也并非易事。

CTAB 法是目前植物基因组 DNA 提取中较常采用的方法。CTAB 是一种阳离子去污剂，它能与核酸形成复合物，这些复合物在低盐溶液中会因溶解度的降低而沉淀，而在高盐溶液中可解离，从而使 DNA 和多糖分开，再用乙醇沉淀 DNA 而除去 CTAB。在该法中使用的聚维酮（PVP）与多酚结合形成复合物，从而可有效避免多酚类化合物介导的 DNA 降解。后来，在此基础上又出现了多种改良 CTAB 法，针对不同植物做了不同的改进。

以上介绍了一些基因组 DNA 纯化的常用方法。至于各大厂家推出了哪家产品，他们的产品有何优势，请关注生物通的后续报道。（生物通 薄荷）

相关阅读：

[基因组纯化之Promega篇 多样化的选择](#)

[基因组纯化之Qiagen篇 技术是王道](#)

[基因组纯化之Tiangen篇 只谈性价比](#)

[基因组纯化之Thermo篇 基于磁珠的基因组提取纯化系统](#)

[基因组纯化之ABI篇 MagMAX核酸抽提系统](#)

基因组纯化之 Promega 篇

多样化的选择

第一站我们要介绍的是 Promega 公司。在生物技术这个年轻的领域中，Promega 公司进驻中国已有 26 年的历史，可不是一般的长。而且，相对于其他进口品牌，该公司产品价格亲民。在物价飞涨的今天，这一点更是难能可贵。

回到正题，关于基因组 DNA 的纯化，Promega 提供了丰富的产品。若是一一介绍，恐怕大家看了更晕。那么，生物通先给大家介绍两款经典产品，然后再从不同样品类型入手，并结合样品起始量和通量，分别介绍最新产品。

经典产品之一：Wizard® 基因组DNA纯化试剂盒

此试剂盒是基于经典的沉淀法，可从全血、组织培养细胞、动物及植物组织、酵母、革兰氏阳性及革兰氏阴性细菌中提取基因组 DNA，纯化方法简单、快速。

操作过程也是经典的 4 步。首先是裂解细胞和细胞核。对于全血的 DNA 提取，这一步则包括裂解红细胞，接着裂解白细胞和细胞核。如果需要，在这一步可加入 RNase 消化。接着通过盐沉淀步骤去除胞内蛋白。之后，通过异丙醇沉淀浓缩基因组 DNA，并通过乙醇洗涤。纯化得到的 DNA 可用于扩增反应、限制性酶切消化和膜杂交等多种应用。

这一试剂盒能够胜任多种材料，对样品的起始量要求也很广。以全血为例，低至 50 μ l，高至 10 ml 都 OK。因此，的确是实验室的不错选择。价格方面，500 次（每次 300 μ l 全血）试剂盒的价格为 2,742 元，单次不到 5.5 元。

采用 Wizard® 基因组DNA纯化试剂盒从不同起始材料中纯化DNA的产量如下：

来源	起始样品量	DNA 产量
全血	300 μ l	5-15 μ g
	1 ml	25-50 μ g
	10 ml	250-500 μ g
	96 孔板, 50 μ l/孔	0.2-0.7 μ g
组织培养细胞	10^6 - 10^7 细胞	5-30 μ g
鼠肝	11 mg	15-20 μ g
鼠尾	0.5-1 cm 尾	10-30 μ g
昆虫细胞	5×10^6 细胞	16 μ g
植物叶组织	40 mg	7-12 μ g
细菌培养液	10^8 - 10^{10} 细胞	5-20 μ g
酵母	1.9×10^8 细胞	4.5-6.5 μ g

经典产品之二：Wizard® Magnetic 96 食品 DNA 纯化系统

此系统可从多种天然和加工食物中纯化出 DNA，包括谷物种子、谷物粉、大豆、大豆粉和豆奶、薯片、巧克力及含巧克力的食品、蛋黄和植物油等。从这些样品中纯化出的 DNA 可用于转基因作物（GMO）的序列测定。

纯化过程使用了 MagneSil® 顺磁性颗粒，仅需极少的离心，也不需有机溶剂抽提，快速简便，仅用常规方法 1/3 的时间即可完成。此试剂盒的价格为 13,203 元/400 次。

除了这两个经典产品，Promega 近几年也推出了不少新产品，可满足你的“三高”要求——纯度高、产量高、通量高。生物通将按照样品类型一一介绍。

组织

我们都知道，若 DNA 样品有酒精残留，可能会抑制下游的酶解反应。为解决这一问题，Promega 推出了 ReliaPrep™ 组织基因组 DNA 小

提系统。它提供了完整即用的方法,可从高达 25mg 组织、1 个口腔拭子、或 1cm 的剪断鼠尾中纯化得到高纯度的 gDNA。整个操作过程仅需 30 分钟或更短, 无需酒精洗涤或沉淀即可得到完整的 gDNA, 适合基因分型、芯片和测序等苛刻应用。

这个试剂盒采用的是柱提法,也是简单的 4 步。首先破碎起始材料,释放 DNA; 然后让 DNA 与 ReliaPrep™ 结合柱结合; 利用洗涤液去除杂质; 最后是洗脱。不过此洗涤液不同于以往的 70%乙醇, 也就避免了乙醇残留所带来的问题。此外, 系统中的试剂都以即用型提供, 无需添加或配制。

血液

Promega 提供了 ReliaPrep™、Wizard® 以及 Maxwell® 三个系列的 gDNA 纯化试剂盒, 能够从哪怕最具挑战性的血液样品中提取基因组 DNA。前面提到的经典产品 Wizard® 基因组 DNA 纯化试剂盒就能从 50 µl–10 ml 全血中提取 gDNA。

若血液量较少, 你还可以试试 ReliaPrep™ 血液基因组 DNA 小提系统。它的特点同上, 无需酒精洗涤, 即可从多达 200µl 血液或体液中始终如一地提取到纯净的完整基因组 DNA。基因组 DNA 可以从新鲜的或冷冻的血液中制备, 在不到 40 分钟内可得到 4–10µg 的预期 DNA 产量, 当然这取决于血液样品中的白细胞数目。

若血液量较多, ReliaPrep™ 大容量高通量 gDNA 提取系统则更为合适。它能以规格可调的模式从 3-10ml 血样中提取基因组 DNA。该方法无需繁琐的离心步骤, 也无需使用有毒试剂, 而这些是沉淀提取法所固有的。ReliaPrep™ 大容量高通量 gDNA 提取系统已在 Hamilton Robotics MICROLAB® STARplus 液体处理工作站中实现自动化, 可以一次性处理 96 个样品。对于一次最多 32 个样品的低通量 gDNA 提取, 可以使用

ReliaPrep™ 32 LV HSM 的手动模式, 由用户手动进行移液。

上面介绍的这些产品大部分采用手动操作来提取 gDNA。随着人们对速度、质量的要求不断提高, 有些实验室也开始尝试使用自动化的纯化系统。Maxwell® 16 仪器便是 Promega 公司近年来推出的一款纯化仪。

Maxwell® 16 仪器可自动纯化高质量 DNA、RNA、病毒总核酸和重组蛋白, 均衡性好, 省时省力, 可满足多种下游应用。纯化的介质为顺磁性颗粒, 能够实现对目标分子的最佳捕获、洗涤以及洗脱。与传统的硅胶膜方法相比, 磁珠带来了更高的结合量和更干净的洗脱。将样品或样品裂解物直接加入预先装有试剂的试剂筒内, 即可按“开始”键, 启动纯化程序。试剂盒与自动纯化程序均经过优化, 能够从特定样品中纯化出最高质量的目标用于下游实验。



Maxwell® 16 自动纯化仪有两种配置可供选购: 用于得到最大产量的 SEV (Standard Elution Volume, 标准洗脱体积, 200-400µl), 和用于得到最高浓度的 LEV (Low Elution Volume, 低洗脱体积, 30-100µl)。此外, SEV 和 LEV 仪器均可配置 Flexi Method 固件, 用户可以自行构建 Maxwell® 16 自动纯化仪的程序, 做进一步的性能优化。

Maxwell[®] 16 自动纯化仪预置有纯化程序，试剂盒内有预先装有各步骤试剂的条形试剂筒，这些程序与试剂盒最大限度地增加了操作的简便程度。在 18-50 分钟内（取决于样品的类型），该自动纯化仪可处理 1-16 个样品。有了 Maxwell[®] 16，你就可以有更多时间去完成其他更具创造性的工作。

目前，Promega 提供了以下试剂盒，可用于 Maxwell[®] 16 自动纯化仪。

名称	用途
Maxwell[®] 16 LEV Blood DNA Kit	从血液中自动化提取 DNA（低洗脱体积）
Maxwell[®] 16 Blood DNA Purification Kit	从血液中自动化提取 DNA
Maxwell[®] 16 Cell DNA Purification Kit	从细胞中自动化提取 DNA
Maxwell[®] 16 Tissue DNA Purification Kit	从组织中自动化提取 DNA
Maxwell[®] 16 Mouse Tail DNA Purification Kit	从鼠尾中自动化提取 DNA
Maxwell[®] 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit	从 FFPE 样品中自动化提取 DNA（低洗脱体积）
Maxwell[®] 16 Cell LEV DNA Purification Kit	从细胞中自动化提取 DNA（低洗脱体积）
Maxwell[®] 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit	从血清、血浆或其他样品中自动化提取病毒总核酸
Maxwell[®] 16 Buccal Swab LEV DNA Purification Kit	从口腔拭子中自动化提取 DNA
Maxwell[®] 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit	从 FFPE 样品中自动化提取 DNA（低洗脱体积）

ReliaPrep[™] Large Volume HT gDNA Isolation System	从 3-10ml 血样中提取基因组 DNA
---	-----------------------

若您对于选择什么样的纯化产品还是心里没底，那么可以登陆 [Promega 英文网站](#)。它上面有个小工具—[核酸纯化产品选择器](#)，通过几个简单的问答（如样品量和通量），就可以推荐适合的产品，相当方便。当然，你也可以 [点击此处索取 gDNA 纯化的相关资料](#)。（生物通 余亮）

相关阅读：

[基因组纯化之Qiagen篇 技术是王道](#)

[基因组纯化之Tiangen篇 只谈性价比](#)

[基因组纯化之Thermo篇 基于磁珠的基因组提取纯化系统](#)

[基因组纯化之ABI篇 MagMAX核酸抽提系统](#)

基因组纯化之 Qiagen 篇 技术是王道

在核酸纯化领域，QIAGEN 向来就是信心的保证。良好的口碑，稳定可靠的质量，再加上全面的产品，使用起来确实无忧。尽管价格贵点，但“一分钱一分货”的道理大家都懂。若是实验没结果，文章出不来，价格再低也枉然。况且，QIAGEN 直销之后，价格也不再那么高不可攀。

对于基因组 DNA 的纯化，QIAGEN 也有着自己独到的解决方案。纯化前样本的优化保存确保了核酸的完整；快速、高效的样本破碎为后续纯化中样本的充分裂解提供了保障；试剂盒广泛覆盖包括血液样品、组织样品、植物样品、细菌、真菌、酵母样本，及法医检材和其它样本。

尽管试剂盒种类繁多，让人眼花缭乱，但仔细理一理，主要是基于三种成熟的核酸纯化技术：硅胶膜、离子交换和磁珠。生物通小编就从这三种技术入手，分别介绍 QIAGEN 的经典产品和新产品。

硅胶膜技术

大约 20 年前，QIAGEN 推出了日后风靡全球的硅胶膜核酸纯化技术。快速、稳定、质量高，无需经验和技巧，DNeasy 和 QIAamp 系列迅速成为最畅销的产品之一。但同时别忘了，这种技术纯化所得的 DNA 片段最长为 50 kb。若是构建文库，那恐怕不大适宜。

经典产品之一：DNeasy Blood & Tissue Kit

DNeasy Blood & Tissue Kit 能够从多种样品类型中提取总 RNA，包括动物的血液和组织、细胞、酵母、细菌和病毒。可靠的硅胶膜技术确保了快速且重复的 DNA 纯化，无需乙醇沉淀，也避免了接触有机试剂。DNeasy Blood & Tissue Kit 有两种形式，一种是离心柱方式，这些 mini 离心柱预装在收集管内，单独密封，便利且安全；另一种是 96 孔板方法，方便高通量的操作。对于 50 次的离心柱纯化试剂盒，价格为 1630 元。

对于有些特殊的样品，如动物的毛发、唾液、精液、软组织等，QIAGEN 也在网上提供了详细的操作步骤，非常贴心，不需要你再去反复优化。这些经过优化的步骤确保了高的产量，且纯化后的 DNA 不含 PCR 抑制剂，允许实时定量 PCR 的灵敏检测。

经典产品之二：QIAamp DNA Mini Kit

QIAamp DNA Mini Kit 的原理也是相似。DNA 特异性地结合到 QIAamp 硅胶膜上，而污染物则会流过该过滤膜。通过两次高效洗涤步骤，可完全去除诸如二价阳离子和蛋白等 PCR 抑制剂，确保高纯度 DNA 洗脱到水或试剂盒提供的缓冲液中。QIAamp DNA 技术可从人类组织样品中抽提基因组、线粒体、细菌、寄生物或病毒 DNA，可直接用于 PCR 和 Southern blot。

QIAamp DNA Mini Kit 适用的样本包括人体组织、拭子、脑脊液、血液、体液或尿液洗涤细胞。全部手动操作时间仅为 20 分钟，也可在 QIAcube 上自动化纯化。此试剂盒的价格为 1650 元/50 次，单次价格为 33 元。

看到这里，你也许有些疑问，QIAamp DNA Mini Kit 是基于硅胶膜技术，DNeasy Blood & Tissue Kit 也是基于硅胶膜技术，那两者有何差别？从技术上而言，两者是相同的。区别就在于适用的样本不同，QIAamp 产品线是特别为临床客户而开发的，所以 QIAamp DNA Mini Kit 适合多种临床样本类型，包括人体血液、组织活检、拭子、白膜层和干血点等。它们的操作步骤有利于标准化程序的开发，便于临床应用。而 DNeasy 产品线则主

要为科研用户而开发的。从理论上而言，这两个试剂盒的柱子和缓冲液是可以互换的，但 QIAGEN 强烈建议你别这么做，以避免失误，并获得最佳结果。

除了这两个经典产品，QIAGEN 还推出了其他产品，适合不同的样本类型和同类，详见下表。

血液/组织样品	
手动纯化	
血液和无细胞体液样品	QIAamp DNA Blood Mini Kit QIAamp DNA Blood Midi Kit QIAamp DNA Blood Maxi Kit
微量血液和组织样本	QIAamp DNA Micro Kit
人体组织样本	QIAamp DNA Mini Kit
石蜡包埋样本	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit
从 200 µl-10 ml 血液样本中纯化高质量、适合长期存档的 DNA	Genra Puregene Blood Kit
大量组织样本,用于 DNA 存档	Genra Puregene Tissue Kit
自动纯化 (中低通量)	
QIAcube	QIAcube 血液纯化试剂盒: QIAamp DNA Blood Mini Kit 全血和体液纯化 QIAamp DNA Micro Kit 微量血液或干血片纯化 DNeasy Blood & Tissue Kit 动物组织、鼠尾或动物血液纯化
植物样品、细菌、真菌、酵母样本	
手动纯化	
新鲜/干燥植物样本、真菌	DNeasy Plant Mini Kit
大量植物样本总 DNA 提取、真菌	DNeasy Plant Maxi Kit
细菌和酵母	DNAeasy Blood & Tissue Kit Genra Puregene Yeast/Bact. Kit
细菌和动物粪便	QIAamp DNA Stool Mini Kit
细菌和组织	QIAamp DNA Mini Kit
自动纯化 (中高通量)	
QIAcube	QIAcube 植物/细菌/真菌/酵母纯化试剂盒: DNeasy Plant Mini Kit 植物细胞和组织的纯化 DNeasy Blood & Tissue Kit 细菌及酵母的纯化 QIAamp DNA Mini Kit 细菌及酵母的纯化
自动纯化 (中高通量)	
BioSprint 96	BioSprint 96 DNA Plant Kit 从多种植物样本中纯化总 DNA

随着国内一些实验室逐步向自动化迈进，生物通再向大家介绍一下 QIAcube 工作站。这款创新的仪器在刚推出时，就荣获了两项大奖：实验室自动化协会 (ALA) 2007 新产品大奖 (NPA) 和德国红点设计概念奖。它将 Qiagen 柱纯化的过程完全自动化，让研究人员从繁琐的手工操作中解脱出来。

QIAcube 上的样本制备采用与手工操作相同的步骤 (即裂解、结合、洗涤和洗脱)，产量也与手工抽提相当。QIAcube 工作站预装有各种应用的纯化程序，可纯化质粒 DNA、基因组 DNA、RNA、病毒核酸和蛋白，以及回收 DNA 和 RNA。同时更多程序被不断开发出来，这些新程序可通过网络免费下载。有了 QIAcube，你就能完全解放出来了。

[点击此处索取gDNA纯化产品的更多资料](#)

离子交换树脂

前面提到，硅胶膜技术纯化所得的 DNA 片段最长为 50 kb。若想得到大片段的 DNA，硅胶膜技术恐怕无能为力，这时，离子交换树脂就派上用场了。QIAGEN Genomic-tips 使用独特的阴离子交换技术，从多种生物样品中纯化高分子量的 DNA，无需酚氯仿。为不同样本类型而优化的裂解液能使核酸酶、组蛋白及 DNA 结合蛋白等蛋白质迅速变性。在缓冲液所提供的 pH 和低盐环境下，DNA 与 QIAGEN 树脂结合，而其他细胞成分则流出。纯化后的 DNA 洗脱在高盐溶液中，并通过异丙醇沉淀。Genomic-tips 通过重力流操作，不过不用全程盯着，它不会变干，你可以同时处理多个样品。

QIAGEN Genomic-tips 的操作步骤非常“温柔”，因此能得到最长 150 kb，平均 50-100 kb 的 DNA 片段，再也不用担心片段被打断了。这种超纯、大片段的 DNA 非常适合文库构建、脉冲场凝胶电泳、测序，当然，常规分析更是不在话下。

磁珠技术

磁珠技术快速方便，利于自动化。因此 QIAGEN 也基于此技术开发了多个自动化工作站和试剂盒。EZ1 DNA Tissue Kit 含有所有自动纯化 DNA 所需的试剂和操作程序，可利用磁珠技术，处理至多 40 mg 的组织样本。该试剂盒可在 EZ1 Advanced XL（每次可处理 1-14 个样本）、EZ1 Advanced（每次可处理 1-6 个样本），和 BioRobot EZ1 工作站（每次可处理 1-6 个样本）上使用。试剂预装在试剂盒中，确保可快速便利的上样。

BioRobot EZ1 自动化工作站是一款专为核酸自动纯化设计的仪器，封闭式的系统可同时进行 1-6 个样本的核酸快速纯化。它主要是利用硅胶磁珠进行核酸纯化。磁珠表面的硅胶层可以与样品裂解后溶液中的核酸特异性结合，洗脱液可有效地将核酸从硅胶磁珠上洗脱下来从而获得高质量的核酸。

在广受好评的 BioRobot EZ1 的基础上，QIAGEN 公司又开发出新一代 EZ1 Advanced 和 EZ1 Advanced XL 型号的工作站。它们增加了很多新特点，可方便地进行数据管理，同时完善用户的环境保护措施。EZ1 Advanced 工作站主要是针对危险样品而设计的一款全封闭核酸纯化系统，主要用于遗传身份鉴定、法医研究、生物医学研究和基因表达分析。

新产品：从 FFPE 样品中同时纯化 DNA 和 RNA

除了以上这些当家花旦，QIAGEN 还有很多秘密武器，保证能满足各式各样的纯化需求。无论你是想纯化 DNA、RNA 或蛋白中的一种、两种或三种，总能在 QIAGEN 找到相应的解决方案。最近，QIAGEN 又推出了 AllPrep DNA/RNA FFPE Kit，从福尔马林固定、石蜡包埋组织样本中同时纯化基因组 DNA 和总 RNA。

如要对基因组学和转录组学数据进行可靠比较，则需从同一样本中纯化 DNA 和 RNA。有些纯化方法将样本分为两份再分别进行纯化操作，这样

纯化出的 DNA 和 RNA 来自不同的细胞群落，可能具有不同属性。而 AllPrep DNA/RNA FFPE Kit 使用同一样本纯化 DNA 和 RNA。这样不仅结果可靠，而且可避免浪费，因为 FFPE 样本是十分珍贵的样本，通常很难恢复且样本量少。

然而，从同一 FFPE 样本中分离 DNA 和 RNA 面临着很大困难：片段化的 DNA 长度短，且部分是单链结构；因此其更像 RNA，而非完整的 DNA。片段化 DNA 的这一属性使得用物理方法分离 DNA 和 RNA 十分困难。AllPrep DNA/RNA FFPE Kit 使用先进的增溶方法，从同一个 FFPE 样本中区别性释放 DNA 和 RNA。使用这种方法时，FFPE 样本要在优化的裂解缓冲液中孵育，使得 RNA 释放出来，而 DNA 形成沉淀。离心后，将含有 RNA 的上清和含有 DNA 的沉淀分别处理，纯化 RNA 和 DNA。再次进行孵育有一定的解交联作用，然后使用 RNeasy MinElute 或 QIAamp MinElute 离心柱纯化 RNA 和 DNA。用柱上 DNA 酶处理纯化的 RNA，以有效去除 DNA 污染。

尽管 AllPrep DNA/RNA FFPE Kit 已经过优化，可最大程度上逆转甲醛化学修饰，而不引起 DNA 和 RNA 的进一步降解；但还是有必要提醒一下，从 FFPE 样本纯化获得的核酸不应用于需要大分子量 DNA 或完整长度 RNA 的下游应用。

其实在基因组 DNA 纯化方面，QIAGEN 还有更多的产品，鉴于篇幅有限，生物通无法一一介绍。如果你想了解更多这方面的更多信息，[请点击此处索取](#)。（生物通 余亮）

相关阅读：

[基因组纯化之 Promega 篇 多样化的选择](#)

[基因组纯化之 Tiangen 篇 只谈性价比](#)

[基因组纯化之 Thermo 篇 基于磁珠的基因组提取纯化系统](#)

[基因组纯化之 ABI 篇 MagMAX 核酸抽提系统](#)

基因组纯化之 Tiangen 篇 只谈性价比

作为 QIAGEN 的全资子公司，Tiangen（天根）在核酸纯化上的表现还是相当不错的，质量过硬，价格合理。在基因组 DNA 纯化方面，Tiangen 也有不少好东西。生物通这次就带你看看畅销产品。

血液样品

这一系列可是 Tiangen 的王牌产品，销量一直很好，并且广泛用于中华骨髓库建库。针对不同体积的样品，Tiangen 推出了不同的试剂盒。对于少量的样品，主要是走硅胶膜纯化的路线，如果特别微量，试剂盒中还附带了 Carrier RNA，提高 DNA 与吸附柱的结合。对于大量的样品，它采用的是异丙醇沉淀法。

血液基因组提取试剂盒(0.1-1ml)

此试剂盒是 TIANGEN 精心研发的特别针对血液样本的基因组 DNA 提取试剂盒，适合于各种抗凝剂（柠檬酸钠、EDTA 等）处理过的全血的基因组 DNA 提取，也适用于血凝块的基因组 DNA 提取。试剂盒采用了独特的细胞裂解体系，使蛋白变性，结合硅胶膜特异吸附核酸的原理快速纯化得到基因组 DNA。纯化所得的 DNA 无蛋白、核酸酶等污染，可直接进行 PCR、酶切和 Southern 杂交等实验操作。

血液基因组 DNA 提取系统(0.1-20ml)

此试剂盒采用独特的缓冲液系统，可从 0.1-20 ml 加入各种抗凝剂（柠檬酸钠、EDTA 等）的全血、血凝块、白膜层等样本中提取 DNA。样品在裂解缓冲液 FG 和蛋白酶 K 中能够被充分裂解，经异丙醇沉淀便可以得到基因组 DNA。无需使用酚氯仿等有机溶剂，回收的 DNA 适用于各种常规操作。

微量样品基因组 DNA 提取试剂盒

此试剂盒可从少量的血液、干血点、血清/血浆、微量组织、漱口水、毛发、显微切割组织等微量样品中提取基因组 DNA。它采用了硅胶膜离心吸附柱和独特的缓冲液系统。试剂盒中还提供了一种特殊的 Carrier RNA，当需要从非常少量的样品中提取基因组 DNA 时，推荐在操作步骤中加入

Carrier RNA，这样有助于提高 DNA 与吸附柱的结合。

植物样品

我国地大物博，植物资源特别丰富，与植物相关的研究也特别多。然而，进口产品中适合植物的产品还真是不太多见。Tiangen 却特别研发出多款适合植物研究的试剂盒。

植物基因组 DNA 提取试剂盒

此试剂盒适用于从多种植物的不同组织中快速提取基因组 DNA，特别适用于多酚、多糖含量高的植物组织和植物干粉。离心柱中独特的硅基质材料和其配备的缓冲溶液能有效去除植物组织中多糖、多酚复合物和酶抑制剂，纯化过程仅需 1 小时，所得的基因组 DNA 可直接用作 PCR 模板、酶切、杂交等分子生物学实验。

新型植物基因组 DNA 提取试剂盒

此试剂盒采用高效、专一结合核酸的离心吸附柱和独特的缓冲系统，适合从各种不同的植物新鲜或冻存组织中提取基因组 DNA，并可最大限度去除植物组织中的杂质。操作中无需使用酚/氯仿，安全快速。提取的基因组 DNA 可达 40 kb，适合 PCR、Southern 杂交、RFLP 等应用。纯度高，质量稳定可靠。100 mg 植物组织中可提取到 3-30 μg 基因组 DNA，OD260/OD280 的值在 1.7-1.9 范围内。

细菌和病毒

2008 汶川地震，Tiangen 携手中国疾病预防控制中心等检测单位，向灾区及时提供了一批用以进行灾后食品和水源进行安全检测的细菌基因组 DNA 提取试剂盒及病毒核酸纯化试剂盒。地震发生后短短一个月内，TIANGEN 迅速为灾区震后食品安全检测提供了近 2 万次的细菌基因组 DNA

提取试剂盒与 5000 次病毒核酸纯化试剂盒，并且在四川省的 16 个州市被广泛应用。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒

此试剂盒采用了可以高效、专一结合 DNA 的离心吸附柱和独特的缓冲液系统，既适用于革兰氏阴性菌基因组 DNA 的提取，也可适用于革兰氏阳性菌基因组 DNA 的提取。它也可用于食品致病菌(微生物)基因组提取，如：金黄色葡萄球菌、霍乱弧菌、出血性大肠杆菌 O157: H7、单增李斯特、沙门氏菌、阪崎肠杆菌等。从 1-5ml 细菌培养液中，可快速提取纯化 10-40 μg 纯净的基因组 DNA，所得基因组 DNA 可直接用作 PCR 模板、酶切、杂交等分子生物学实验。

TIANamp 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒

Tiagen 的病毒检测产品曾广泛用于手足口病和 H1N1 流感的检测。TIANamp Virus DNA/RNA Kit 采用高效、专一结合核酸的离心吸附柱和独特的缓冲系统，适合从血浆、血清和其它无细胞体液等样品中分离纯化病毒的 DNA 或者 RNA，本试剂盒特别加入了 Carrier RNA，可以从体系中轻松捕获微量核酸，具有方便快捷、产量高、重复性好的特点。所得病毒基因组 DNA 或 RNA 无蛋白、核酸酶或其它杂质的污染，可直接用于 PCR、酶切、杂交、反转录等分子生物学实验。

海洋动物

这也是一个独特的试剂盒，其他公司貌似没有。小编有一个研究鱼类的同学，老是跟我诉苦，说这些常规产品都不适用于他那些鱼，每次都要摸索好久。下回我向他推荐一下 Tiagen 这款专门为海洋动物开发的基因组提取试剂盒。

海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒

此试剂盒是 Tiagen 特别针对海洋动物研发的基因组提取试剂盒，已成功提取到鱼类、虾类、贝类、蟹类等海洋动物组织基因组 DNA。无需酚/氯仿抽提，使用安全快捷方便，可最大限度去除海洋动物组织中的蛋白、脂肪及其他有机化合物等杂质。使用本试剂盒提取的基因组 DNA 可适用于各种常规操作，包括酶切、PCR、文库构建、Southern 杂交等实验。

特殊样品

近日食品安全的问题引发了各界的关注，食品检测的需求也是不断增加。为此，Tiagen 开发了多个产品，能从食品原料、深加工产品以及植物饲料中提取基因组 DNA。

深加工食品 DNA 提取试剂盒

此试剂盒是 Tiagen 精心研发的特别针对食品原料和深加工食品的 DNA 提取试剂盒，成功提取到大豆粒、大米粒、玉米粒、饼干、方便面、豆腐、豆腐干、腐乳、豆浆、番茄酱、薯条、薯片、小馒头、粉条等食品的基因组 DNA。无需酚/氯仿抽提，使用安全快捷方便，可最大限度去除食品中的蛋白、脂类及其他有机化合物等杂质。使用本试剂盒提取的食品 DNA 可适用于各种检测，包括 PCR、荧光定量 PCR 等转基因检测实验。

动物源性植物饲料基因组 DNA 提取试剂盒

此试剂盒是与农业部饲料检疫部门合作开发的，可从多种动物源性植物饲料或动物组织中提取基因组 DNA。它可从 50 mg 饲料中提取到 500 ng-40 μg 基因组 DNA，检测灵敏度可达 0.1%。

粪便基因组提取试剂盒

此试剂盒是专项开发的粪便基因组 DNA 提取系统。离心吸附柱中采用的硅基质材料为 Tiagen 特有新型材料，能够高效、专一吸附 DNA，可最大限度去除杂质蛋白及细胞中其它有机化合物。独特的抑制剂吸附片 InhibitEX 可以高效地吸附去除样品中抑制 PCR 等下游实验的杂质。提取的基因组 DNA 片段大，纯度高，质量稳定可靠。使用本试剂盒回收的 DNA 可直接用于 PCR 等下游实验。

除了以上这些产品，Tiagen 还有多款基因组 DNA 提取产品。若您想了解更多信息，[请点击此处](#)。（生物通 余亮）

相关主题：

[基因组纯化之 Promega 篇 多样化的选择](#)

[基因组纯化之 Qiagen 篇 技术是王道](#)

[基因组纯化之 Thermo 篇 基于磁珠的基因组提取纯化系统](#)

[基因组纯化之 ABI 篇 MagMAX 核酸抽提系统](#)

基因组纯化之 Thermo 篇 基于磁珠的基因组提取纯化系统

赛默飞世尔科技推出的 Thermo Scientific KingFisher 磁珠纯化技术是新一代样品纯化技术，在 KingFisher 系统上利用转移磁珠的纯化方法，从普通样品如：血液、动植物组织、细菌、细胞、病毒；以及疑难样品如：唾液、土壤、粪便、FFPE、法检等样品中，自动化快速提取高产量、高质量、高完整度的 DNA、RNA 样品。KingFisher 磁珠纯化技术及 KingFisher 自动磁珠纯化仪，除了在核酸纯化领域有卓越的表现外，作为开放的平台，根据试剂盒种类不同，KingFisher 也出色应用于蛋白质纯化、免疫细胞分选、细菌富集等领域。

随着分子生物技术的发展，科研及临床检测要求的提高，核酸纯化方法也经历了密度梯度离心，酚氯仿、苯酚、异戊醇抽提，二氧化硅吸附等化学物理方法。目前，基于硅胶膜对核酸特异结合的原理所开发的方法已成为核酸纯化的主流方法。为了减少化学、物理因素对核酸的破坏和降解，科学家们力求开发快速、温和的纯化方法，在确保遗传信息的完整性同时，提高工作效率。而 KingFisher 磁珠纯化法不仅满足了科研工作者对核酸质量的高要求，同时其自动化、通量高、速度快、灵敏度高特性也提高了科研工作者的工作效率。目前转移磁珠的磁珠纯化方案正在逐步替代以往的各种方法，特别是目前普遍应用的离心柱法。

酚法抽提、玻璃珠沉淀法、离心柱法与磁珠法：

经典的核酸纯化法采用酚、氯仿抽提，样品经过处理后分为水相和有机相，通过酒精离心沉淀水相中核酸的方法纯化样品中的核酸，这就是我们所说的酚-氯仿抽提法。酚法抽提相对稳定，至今仍被多数科技工作者广泛应用，也是其他多种提取方法的操作基础。

随后，科学家发现核酸与硅存在特异结合，并开发了用玻璃珠吸附核酸，离心沉淀后经过洗和洗脱得到纯化的核酸样品，因玻璃珠比重较大，容易

离心到管底，从而缩短了离心时间，目前此方法仍被部分实验室采用。

后来科学家将玻璃珠改成玻璃纤维，并将玻璃纤维制成薄膜状，置于离心管中层，用离心的方法从裂解液中吸附，这就是目前核酸纯化的主流方法--离心柱法。离心柱法极大简化了操作流程、缩短操作时间，目前已成为大多数实验室主流纯化方法；但离心柱法样品与硅介质结合时间短，样品回收率低，并对样品有一定的损伤。

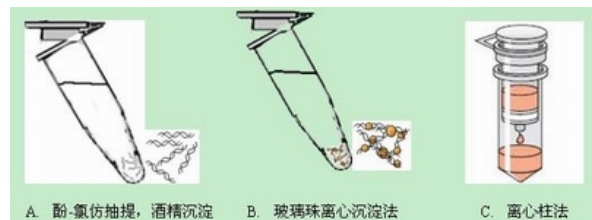


图 1 基于离心法的核酸纯化

以上提到的三种方法都是需要离心操作的纯化方法（图 1），每一批样品的提取都涉及到开关离心管盖、废液处理、加液的操作，不仅引入了人为误差，也容易在大批量样品处理时造成交叉污染。而应用磁珠纯化技术，则可以利用磁铁特异吸附磁珠（图 2A），从而省去离心操作，减少人为操作环节，避免人为误差，不仅节省时间，同时使高通量纯化成为可能。

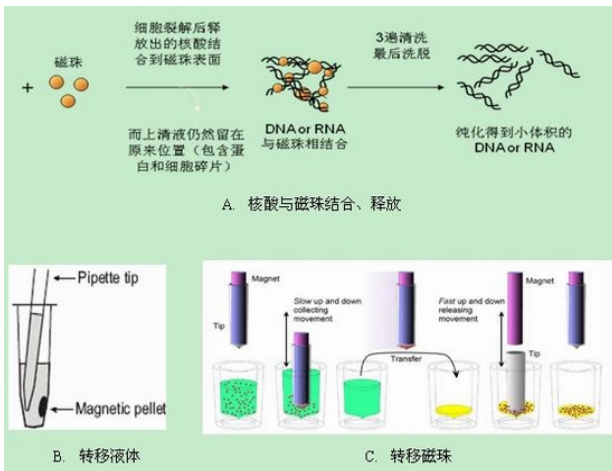


图 2 磁珠纯化的原理及转移液体、转移磁珠的设计

Thermo Scientific KingFisher 转移磁珠纯化方案的专利设计

无论离心柱过滤法还是磁珠法，都是基于硅介质与核酸特异结合的原理而发展起来的。离心柱法所采用的硅胶膜实际上就是玻璃纤维，而磁珠之所以能够结合核酸也是因为其表面包被了玻璃纤维。而磁珠纯化法本身也经历了转移液体的磁珠纯化和转移磁珠的磁珠纯化两个阶段。

最初的设计是用磁力架将磁珠吸附在管内壁，随后将不含磁珠的液体吸走，达到结合、洗涤、洗脱的目的（图 2B）。但转移液体需要吸头移液操作，首先会有大量的液体残留，其次吸液时会损耗一些磁珠，降低磁珠回收率，再者吸液操作的废液处理及移液过程中容易产生交叉污染。

为了弥补转移液体方案的不足，赛默飞世尔科技开发了一种转移磁珠的纯化方案。与转移液体的方案不同，转移磁珠方案用磁力棒吸附、转移磁珠，省去了移液操作，缩短了由移液带来的操作时间（图 2C）；同时在保证磁珠完全回收转移的同时，使液体残留量降至最低水平；从而提高了样品纯度和后续检测灵敏度。

公司的研发团队将这种技术命名为 KingFisher 技术（专利号 US 6447729, US 6448092）。KingFisher 在英文中是翠鸟的意思，

美国的动物行为学家发现，KingFisher（翠鸟）可以从复杂的河流环境中捕食自己喜欢吃的鱼类，而磁力棒吸附、转移磁珠的操作就像 KingFisher 从河中捕鱼一样，因此将这种技术命名为 KingFisher 磁珠纯化法。

Thermo Scientific KingFisher 磁珠纯化仪的超强兼容性与延展性

KingFisher 磁珠自动纯化系统是一套完全开放的体系，几乎兼容所有市面上可以查到的，进口及国产基于磁珠法的纯化试剂盒，如：OMEGA、Qiagen、Ambion、Invitrogen、Invitex 等进口品牌，以及天根、博坤、易瑞等国产试剂盒。应用这些多种多样的试剂盒，研究人员可以方便的从普通样品如：血液、体液、动植物组织、培养细胞、细菌等，以及疑难样品如：土壤、粪便、毛发、FFPE、唾液、法检痕量样品中，自动化快速提取高产量、高质量、高完整度的 DNA、RNA 样品。在 KingFisher Flex 系统上利用磁珠纯化方法提取的核酸样品可以直接进行核酸定量、实时荧光定量 PCR 仪检测、测序、芯片检测等下游实验，无需再纯化。从样品到纯化产品，只需 15-45 分钟（根据样本类型和试剂盒程序略有不同），并且可与其它仪器（包含第三方仪器）整合，提供无限扩展空间和真正意义的实验室自动化。

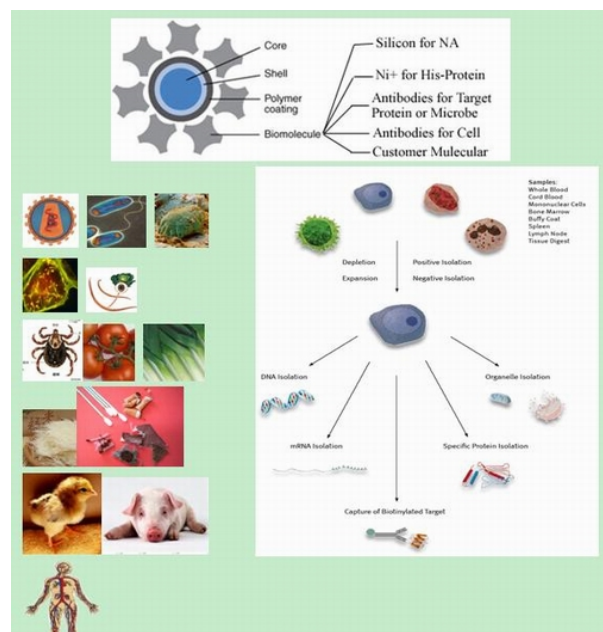


图 3 磁珠核心结构。KingFisher 系列产品可以帮助科技工作者从复杂的各种类型的原始样品中，精确提取所需要的目的分子或细胞。

值得注意的是，KingFisher 磁珠纯化仪所能做的事情绝不仅限于核酸提取，应用不同包被物包被的磁珠，可以从复杂的样品中提取高纯度的 NDA、RNA、蛋白、抗体、细菌、细胞等（图 3）。也可以根据不同的用户需要，在磁珠表面标记所需要的诱饵分子，从复杂的样品中钓取所需的单一目的分子或细胞。

Thermo Scientific KingFisher 系列磁珠自动纯化仪

目前，KingFisher 磁珠自动纯化系列产品主要拥有 15 个样品通量的“KingFisher mL”；24 个样品通量的“KingFisher”；和兼容 24/96 个样品通量的“KingFisher Flex”，可以满足不同样品数量用户的样品处理需求（图 4）。KingFisher 系列产品可以在 15-45 分钟内完成多达 96 个样品的平行纯化处理，在高通量的基础上保证样品纯度和检测灵敏度。

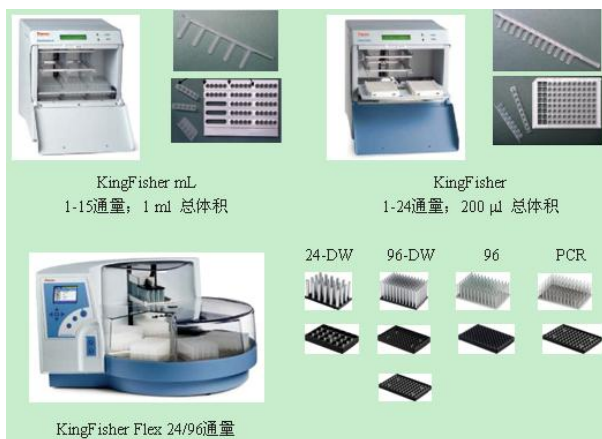


图 4 KingFisher 系列产品成员

KingFisher 磁珠纯化仪作为一种新型的纯化方案，已经成为一种科研以及应用趋势，逐步取代以往的柱法提取，目前已风靡欧美。至今在中国市场，KingFisher 纯化仪也已经被各地高校、研究所、各科研机构、大批量种子检测、疫病监控、流行病

控制、血液初筛、血库建库、高通量基因测序等机关、部门、企业广泛采纳，逐步成为核酸提取的主流应用方法。

[我想了解KingFisher磁珠纯化仪的更多资料](#)

应用实例

1、KingFisher 的磁珠回收率：KingFisher 96 DW Plate 板型与加热块匹配嵌合的独特设计也保证加热的最大效率。如果用其它型号的 96 孔板，热块会抬升板底高度，从而影响混匀操作甚至造成仪器不稳定性。实验数据表明 96 DW Plate 的磁珠回收率比其他 96 孔板的回收率更高。使用 96 DW Plate 进行磁珠孔到孔的水平转移，其回收率高达 99.4%（图 5）。

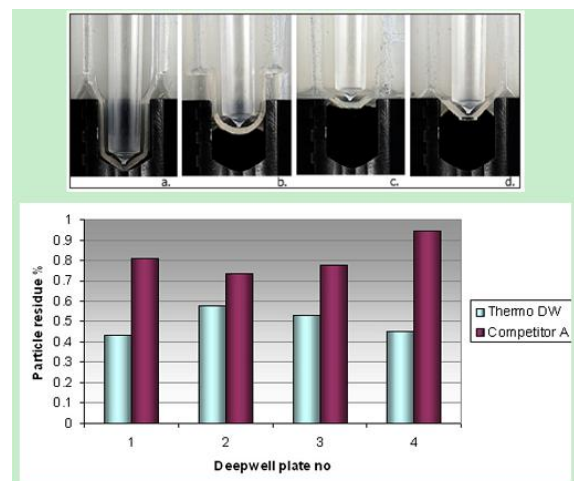


图 5 KingFisher 96 DW Plate 与其它型号 96-well Plate 对比。上图：KingFisher 96 DW Plate (a) 与加热块的吻合，b. c. d. 为其它型号的 96-well Plate；下图：磁珠回收率对比，KingFisher 96 DW Plate 回收率大于 99.4%。

2、血液 DNA 提取：用 ThermoFisher Scientific “KingFisher Blood DNA Kit”从多至 3-8 ml 全血中提取 DNA。产物回收率、纯度、完整度均达到高水平（图 6）。全过程约 45-60 分钟。

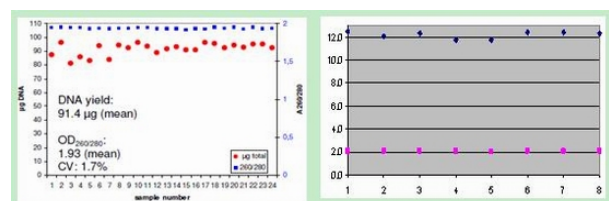


图 6 从 3 ml 全血中提取 DNA。左图：24 个样品的产量和 OD260/280；右图：8 个重复样品的提取均一性。（KingFisher Flex 24 DW Plate 提取）

3、动物组织 DNA 提取：应用 OMEGA MagSi Tissue DNA Kit, 实验者可以方便的从 10 mg 动物组织中提取样品 DNA（图 7）。样品预处理后在 KingFisher 上的运行时间大约 30 分钟。

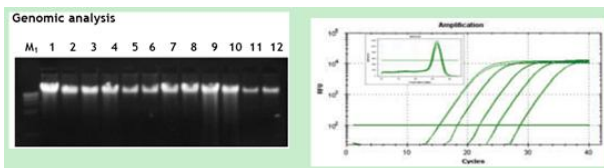


图 7 从 10 mg 动物组织样品中提取 DNA 和定量 PCR 分析。

4、植物组织 RNA 提取：应用 OMEGA MagSi Plant RNA Kit, 实验者可以在 60 分钟内, 从 50 mg 植物组织中, 一次纯化 96 个平行样品（图 8）。

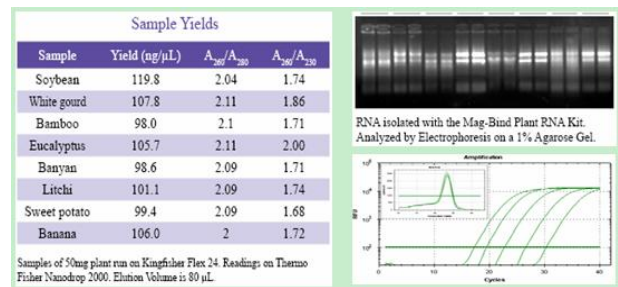


图 8 从 50 mg 植物组织中提取总 RNA。（KingFisher Flex 96 DW Plate 提取）

相关阅读：

[基因组纯化之Promega篇 多样化的选择](#)

[基因组纯化之Qiagen篇 技术是王道](#)

[基因组纯化之Tiangen篇 只谈性价比](#)

[基因组纯化之ABI篇 MagMAX核酸抽提系统](#)

基因组纯化之 ABI 篇 MagMAX 核酸抽提系统

从生物体液和不含寄主细胞的样本（如血清，血浆，化验标本，细胞培养基，血液，精液和奶）中提取核酸面临许多挑战，例如核酸的浓度非常低，大量的标本需要处理，以及标本的复杂性。抽提得到的核酸也必须可以用于荧光定量 PCR。

Life Technologies 公司旗下的 ABI 推出了 MagMAX™ 核酸抽提系统，致力于解决所有这些问题，同时为了便于自动化，不使用有机溶剂或者核酸沉淀试剂。该系统采用微磁珠代替滤膜，可消除滤膜核酸分离方法的常见问题，如滤膜堵塞，洗脱体积过大，抑制剂清除不彻底，以及回收率不一致等。

MagMAX™ 核酸抽提系统充分考虑到待检样品的复杂性，采用适当的前处理，使得从各种样品中抽提核酸的过程能基本统一化，从而实现实验室核酸抽提操作程序的标准化，大大加速了样品制备过程，并提高了检测结果的可靠性。

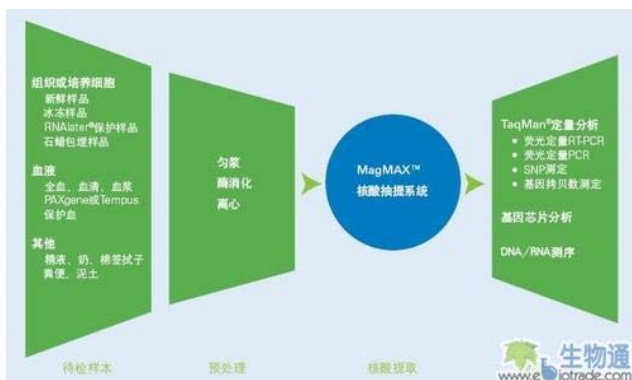


图 1. MagMAX™ 抽提系统分离纯化核酸的基本流程

此系统包括 MagMAX™ 核酸抽提试剂盒和 MagMAX™ Express 磁珠处理仪，使用非常方便，可在更短的时间内得到高质量的结果。

MagMAX™ Express 磁珠处理仪

MagMAX™ Express 磁珠处理仪是 MagMAX™ 核酸抽提试剂盒的理想伴侣，能自动、快速完成核酸抽提。拥有两套配置可供选择：针对低通量的 MagMAX™ Express（一次可处理 1-24 个样品）和针对高通量的 MagMAX™ Express-96（一次可处理 1-96 个样品）。



MagMAX™ Express 磁珠处理仪所采用的操作原理是反向磁珠处理（MPP）技术。与外置磁铁方法相反，无需转移液体，而是将磁珠从微孔转移到包含特殊试剂的微孔中。磁珠的转移借助于表面套上一次性特殊设计的塑料磁头套的磁力棒。仪器无需任何吸取或抽气部件或装置即可工作。

MagMAX™ Express 磁珠处理仪独特的操作原理使之具有诸多优势，主要包括：

- 实现了复杂手工步骤的自动化
- 实现了双链 DNA 等分子的同时处理和纯化
- 由于可在孵育和洗涤的同时进行振摇，从而可实现更快速的反应和更有效的洗涤

- 利用磁铁的高效实现磁珠结合样品的有效收集

- 由于同一个吸头只用于单个样品，且试剂只加入专属孔中（不同试剂不会加到同一孔中），从而避免了残留

- 可在内源程序的辅助下轻而易举地完成整个操作

MagMAX™核酸提取试剂盒

由于采用具有超高核酸结合表面的顺磁性微珠，MagMAX™核酸分离试剂盒可以从各种各样的生物样本中抽提核酸，回收率高，纯度好，实现高灵敏、高特异性的分子检测。

MagMAX™禽流感/新城疫 (AI/ND) 病毒核酸试剂盒
通过美国农业部国家兽医服务实验室 (USDA/NVSL) 评估并纳入美国农业部禽流感/新城疫病毒定量 PCR 诊断标准

MagMAX™总核酸抽提试剂盒

利用微小磁珠机械破壁结合化学裂解，保障核酸有效释放，然后用 MagMAX™技术纯化核酸。适用于具有坚硬细胞壁的革兰氏阳性细菌、芽孢等。

MagMAX™血总 RNA 抽提试剂盒

从人、牛、猪或羊的全血中抽提总 RNA。

MagMAX™病毒核酸抽提试剂盒

从各种各样的样本中同时抽提病毒 RNA 和 DNA

能从 0 到 400 微升的样本中有效回收低至 10 个病毒核酸分子

MagMAX™总 RNA 抽提试剂盒

更有效的 DNA 降解酶和降解液，减少 DNA 的污染、保持 RNA 的完整性；并增加了更完善的从植物组织中抽提 RNA 的方法。

MagMAX™芯片总 RNA 抽提试剂盒

Tri Reagents 和 MagMAX™技术的完美结合，RNA 抽提效果更好、更稳定。

相关阅读：

[基因组纯化之Promega篇 多样化的选择](#)

[基因组纯化之Qiagen篇 技术是王道](#)

[基因组纯化之Tiangen篇 只谈性价比](#)

[基因组纯化之Thermo篇 基于磁珠的基因组提取纯化系统](#)

PLoS ONE: RNA-Seq 技术的优缺点

一直以来，研究人员都很有兴趣了解细胞在各种不同状态下的基因表达差异，并开发出多种方法，来不断提高灵敏度和增加通量。基因表达芯片是近年来较多采用的方法，但它如今却碰上了一个强劲对手——RNA-Seq。

RNA-Seq 可进行全基因组水平的基因表达差异研究，具有定量更准确、可重复性更高、检测范围更广、分析更可靠等特点。除了分析基因表达水平，RNA-Seq 还能发现新的转录本、SNP、剪接变体，并提供等位基因特异的基因表达。

RNA-Seq 的动态范围更广，且假阳性可能更小，这意味着 RNA-Seq 的数据重复性应当比芯片要高。RNA-Seq 能够检测样品中的所有 RNA，这对于鉴定细胞的新颖转录本来说是个优点，但同时缺点在于，它检测了总的 RNA，而细胞中很大一部分 RNA 都来自核糖体和线粒体。这限制了其他 RNA 的读取数量以及这些 RNA 表达水平的准确性。因此，polyA RNA 选择和核糖体 RNA 去除等方法被开发出来，以便解决这个问题。

然而，这些分离方法有可能会引入潜在误差，影响实验结果。因此，第三代测序公司 Helicos BioSciences 的研究人员对操作方法修改后可能发生哪些差异进行了研究，文章发表在最近一期的《PLoS ONE》上。

他们认为，对于研究人员来说，必须了解以下几点：技术差异如何影响结果的质量和可解释性，操作方法如何引入潜在误差，RNA 的来源如何影响转录检测，以及所有这些差异如何影响得到的结论。

Helicos BioSciences 公司的研究人员使用了多个人 RNA 样品，来评估 RNA 片段化、RNA 分

离、cDNA 合成，单个以及多个标签计算。尽管采用 polyA RNA 选择的操作方法得到了最多的非核糖体读取，并能够最精确测定编码转录本，但研究人员发现这种方法只能检测人细胞中的一部分非核糖体 RNA。

polyA RNA 排除了数千个注释的转录本以及更多未注释的转录本，使得转录组查看不完全。而核糖体去除的 RNA 则提供了一个更经济的方法，来生成完整的转录组覆盖。与多个标签相比，利用单个标签的表达测定具有评估基因表达和检测短 RNA 的优势。

这项工作有望帮助研究人员在分析基因表达时选择适当的产品。（生物通 薄荷）

原文检索：

Raz T, Kapranov P, Lipson D, Letovsky S, Milos PM, et al. (2011) **Protocol Dependence of Sequencing-Based Gene Expression Measurements**. PLoS ONE 6(5): e19287. doi:10.1371/journal.pone.0019287

摘要：

RNA Seq provides unparalleled levels of information about the transcriptome including precise expression levels over a wide dynamic range. It is essential to understand how technical variation impacts the quality and interpretability of results, how potential errors could be

introduced by the protocol, how the source of RNA affects transcript detection, and how all of these variations can impact the conclusions drawn. Multiple human RNA samples were used to assess RNA fragmentation, RNA fractionation, cDNA synthesis, and single versus multiple tag counting. Though protocols employing polyA RNA selection generate the highest number of non-ribosomal reads and the most precise measurements for coding transcripts, such protocols were found to detect only a fraction of the non-ribosomal RNA in human cells. PolyA RNA excludes thousands of annotated and even more unannotated transcripts, resulting in an

incomplete view of the transcriptome. Ribosomal-depleted RNA provides a more cost-effective method for generating complete transcriptome coverage. Expression measurements using single tag counting provided advantages for assessing gene expression and for detecting short RNAs relative to multi-read protocols. Detection of short RNAs was also hampered by RNA fragmentation. Thus, this work will help researchers choose from among a range of options when analyzing gene expression, each with its own advantages and disadvantages.

一千元测序，十万元的数据分析？

随着第二代和第三代测序技术的蓬勃发展，千元基因组（当然是美元）这个目标的实现似乎是指日可待了。然而，这似乎只是净测序的价格，至于测序后的数据分析，可能后面还要再加两个零。在本期美国化学会周刊《Chemical & Engineering News》上，高级编辑 Rick Mullin 撰文指出，据保守估计，至少需要 10 万美元来分析这些遗传数据，它才能用于个性化医疗，也就是根据病人的遗传背景来定制设计治疗方案。

最初基于克隆的 Sanger 测序尽管准确，但高昂的价格也让人无法承受，于是不需要克隆的第二代测序（NGS）技术诞生。这是一种高通量、基于图像的系统，能显著加快测序速度，并提高数据产量。去年，Ion Torrent 还推出了一种基于半导体的测序仪 PGM，更是显著降低了测序费用。

然而，作者提到，尽管基因测序的费用在显著下降，但分析基因组数据的费用却几乎没变。如今，基因组分析仍是一个多学科的任务。为了评估一位病人的基因组，数据分析需要分子和计算生物学家、遗传学家、病理学家和医生来共同开展，这些不同的专家有着分析数据所需的不同技能。

不过，作者也提到了一些生物信息学的趋势，它们打开了一扇大门，有望更经济更高效地收集和遗传数据。一个趋势是在一开始就将基因组分析融入药物研发中。另一方面是减少所产生的数据量，从而减轻负担。药物研发人员目前也正在合作和分享数据，有些是使用开放的云计算和免费的源代码软件。

新一代测序的关键人物 Jonathan M. Rothberg 也提出了一些看法。Rothberg 博士是 454 公司的创始人，2007 年 454 被罗氏收购。之后，他又成立了 Ion Torrent 公司。这家公司去年被 Life Technologies 收购，并推出了首款基于半导体技术的 Ion PGM 测序仪。这款仪器被业界普遍看好，目前销量不错。

Rothberg 承认一些数据确实是超负荷，但他认为问题被夸大了。454 的测序仪是第一台使用大规模并行测序的 NGS 系统。它们主要对测序过程拍照。因此，超负荷的数据并不完全是遗传测序信息，还有图像文件。实际上，一些仪器生成了 TB 级的图像文件。

[点击索取 454 测序仪的资料](#)

认识到成像并不是测序的必要部分，Ion Torrent 的研究人员就开始从头设计一个测序仪。于是，他们开发出离子芯片，不再观察光子，而是观察化学反应。Rothberg 谈到，不再成像后，数据负荷降低了数百倍。更重要的是，硬件价格也降低了，只需要 5 万美元左右。每次测序所使用的一次性测序芯片也只需 250 美元，而对于传统的 NGS 系统，每次实验需要几万美元。不过，目前 PGM 测序仪的读长还很短，大约在 100 bp。而 [454 测序仪的读长将达到 800 bp](#)。

Rothberg 也提到，PGM 所使用的芯片正在快速升级，每块芯片上的传感器将从 120 万个增加到 1100 万个，通量和读长也在不断提升。

[点击索取 PGM 测序仪的资料](#)

文中还介绍了一些跨国医药公司在基因组测序和个性化医疗方法的进展，有兴趣的读者可以看看。文章标题为：The Next Generation In Genome Sequencing。（生物通 余亮）

基于单分子测序仪的基因表达分析新技术

生物通报道，日本横滨市 RIKEN Omics 科学中心（RIKEN Omics Science Center）的研究人员开发出一种新的基因表达分析技术，只需 100 ng 总 RNA，就能准确定量地测定基因表达水平。该成果近日发表在《Genome Research》在线版上。

这项技术称为“HeliScopeCAGE”，它将 RIKEN 的 CAGE（Cap Analysis of Gene Expression）与第三代测序公司 Helicos BioSciences 的 Helicos 遗传分析系统相结合，为稀有细胞群体的基因表达网络分析开启了大门。

CAGE 是近年出现的一种分析 RNA 转录本的高效方法。它由日本科学家 Hayashizaki 等开发，能产生样品中 mRNA 的 5'端快照。这种技术实现了高通量的基因表达分析以及转录起点的图谱分析。

目前有很多方法能确定转录本的丰度，包括 RT-PCR、EST 测序、SAGE 和大规模平行测序等，这其中大部分都依赖 3'端的序列。但是对于转录起点和相关启动子的鉴定，5'端特异的特征序列则是表达谱注释所必需的。因此，研究人员开始利用 CAGE 进行 5'端短序列标签的克隆。

近几年，新一代测序仪就基因在分子水平如何表达提供了日渐详细的信息。这些基因的转录产物揭示了转录本结构和功能的复杂度，为了解癌症及其他疾病的分子性质提供了线索。

对于 HeliScopeCAGE，研究人员修改了原先的 CAGE 步骤，以便与 HeliScope 单分子测序仪共同使用。与之前的测序仪不同，HeliScope 测序仪不采用 PCR 反应来扩增 DNA 链，此过程可能会将偏差引入数据。相反，HeliScope 测序仪真正对 DNA 链本身测序，实现了高度精确的测定。

RIKEN 的研究人员证实了这种直接方法能减少偏差，为低至 100 ng，高至 5 μ g 的总 RNA 带来高度重复的数据。白血病细胞系 THP-1 和人类宫颈癌细胞系 HeLa 之间的比较进一步说明，这种技术产生的结果与传统芯片分析的结果高度相关。

（生物通 余亮）

相关阅读：

[如何开展CAGE和nanoCAGE](#)

原文检索：

Unamplified cap analysis of gene expression on a single-molecule sequencer

Published in Advance May 19, 2011, doi: 10.1101/gr.115469.110

摘要：

We report the development of a simplified cap analysis of gene expression (CAGE) protocol adapted for single-molecule sequencers that avoids second strand synthesis, ligation, digestion, and PCR. HeliScopeCAGE directly sequences the 3' end of cap trapped first-strand cDNAs. As with previous versions of CAGE, we better define transcription start sites (TSS) than known models, identify novel regions of transcription and alternative promoters, and find two major classes of TSS signal, sharp peaks and broad regions. However, using this protocol,

we observe reproducible evidence of regulation at the much finer level of individual TSS positions. The libraries are quantitative over 5 orders of magnitude and highly reproducible (Pearson's correlation coefficient of 0.987). We have also scaled down the sample requirement to 5 μ g of total RNA for a standard HeliScopeCAGE library and 100 ng for a low-quantity version. When the same RNA was run as 5- μ g and 100-ng versions, the 100 ng was still able to detect expression for 60% of the 13,468 loci detected by a 5- μ g library using the same threshold, allowing

comparative analysis of even rare cell populations. Testing the protocol for differential gene expression measurements on triplicate HeLa and THP-1 samples, we find that the log fold change compared to Illumina microarray measurements is highly correlated (0.871). In addition, HeliScopeCAGE finds differential expression for thousands more loci including those with probes on the array. Finally, although the majority of tags are 5' associated, we also observe a low level of signal on exons that is useful for defining gene structures.

PacBio 正式发售第三代测序仪

生物通报道，第三代测序公司 Pacific Biosciences 上周宣布已开始正式发售 PacBio RS 系统。当天它发售了两台 RS 测序仪，一台是发往美国国家生化防卫分析与对策中心（NBACC），另一台是发往冷泉港实验室。

PacBio RS 是一台革命性的 DNA 测序系统，它融合了新颖的单分子测序技术和高级的分析技术来实时揭秘生物学。此系统有着其他系统无以伦比的序列读长，平均达 1000 个 DNA 碱基。与第二代测序系统相比，它能更快获得结果——不到一天。RS 测序仪的发售有望扩展 DNA 测序在更多领域的应用，诸如癌症研究、病原体检测和农业。

NBACC 基因组学的小组负责人 Nick Bergman 博士评价道：“PacBio RS 系统是 NBACC 测序项目的重大扩展，其长读长和通量灵活性为我们鉴定微生物病原体提供了很多新的选择。我们非常激动能在多个应用中率先使用它。”

冷泉港实验室曾是 RS 测序仪的早期试用客户之一。W. Richard McCombie 博士表示，他们非常看重长读长在多个项目中的价值，这些项目包括了解人类基因组中的结构变异，以及植物基因组的 de novo 测序。

除了这两个机构，第一批仪器还将发往北美和欧洲的多个机构，包括生物技术公司、商业化服务供应商、政府机构和科研实验室。Wellcome Trust Sanger 研究院也是 PacBio RS 的早期试用客户之一，最近，他们也将升级到商业化的硬件配置。

Sanger 研究院测序技术的主管 Harold Swerdlow 博士表示：“为了维持基因组学的前沿地位，我们探索基因组测序中的新机会。我们计划使用 PacBio RS 来改善病原体的 de novo 拼接，并提高一些物种的序列信息覆盖度，在未来，我们将通过甲基化位点的直接检测来探索表观遗传学。”

Pacific Biosciences 的 CEO Hugh Martin 在一次电话会议中表示，该公司计划在迟些时候用最终发布的软件升级测试系统。他还谈到，目前 PacBio 有 44 台仪器的积压订单，计划在未来几个季度陆续发售。

他表示：“我们计划以非常可控的方式发送并安装积压的系统。我们的目标是成功培养每个客户。因此，我们分阶段发送系统，以便我们的安装和支持资源能够有足够时间支持每一位客户，然后再转去下一位。”

Pacific Biosciences 上周还宣布，其第一季度净亏损较去年同期增长 15%，因为该公司正在准备 PacBio RS 系统的正式发售。第一季度净亏损达 3480 万美元，平均每股亏 0.66 美元。PacBio 于去年十月上市，筹集资金 2 亿美元。

（生物通 余亮）

无需系统 轻松纯化生物素化蛋白

通用电气医疗集团 (GE Healthcare) 近日推出了全新的 Streptavidin Mag Sepharose™ 磁珠产品, 让研究人员无需纯化柱, 也可轻松对蛋白进行富集、筛选和纯化。此产品可针对生物素化的蛋白进行有效的富集、纯化和筛选。

高密度的磁珠可使用磁力装置进行快速收集, 同时, 可视化的操作保证了目的蛋白收集的可靠性。Streptavidin Mag Sepharose 磁珠支持了可靠的样品制备, 便于下游分析, 并有着 400 倍以上的富集系数, 让目标蛋白的检出率大大增加。此外, 磁珠的亲水性和非粘附性可减少样品的粘附及聚集现象, 并提高产量。

Streptavidin Mag Sepharose 利用生物素与链霉亲和素配体之间的相互作用, 可通过免疫沉淀富集目标蛋白, 或纯化生物素化的分子。且样品体积不受限制, 低至微升或高至毫升的样品都适合。

新磁珠有两种包装规格: 2×1 ml 10% 填料浆体和 5×1 ml 10% 填料浆体。1 微升 10% 填料浆体相当于 100 微升沉淀填料, 根据建议的免疫沉淀步骤, 足够 20 次纯化运行。

GE Healthcare 还同步推出了 MagRack Maxi 磁力架。这种新型磁力架可以方便地对最大 50ml 的样品体积进行操作, 便于从较大的样品体积中捕获表达量低的目标蛋白。GE 还有一种磁力架 MagRack 6, 它能够同时处理 6 个 1.5 ml 的管,

适合小规模纯化。而 MagRack Maxi 则是对 MagRack 6 的直接放大, 能够容纳一个 15 ml 管及一个 50 ml 管。每个磁力架都有一个氧化铝外壳和一个可拆卸的塑料条, 其中包含钕磁铁。

当管子放置在磁力架上时, 磁珠在几秒内即可被磁铁吸附。这样, 你就能轻松去除上清, 同时让磁珠保留在管内。此外, 你也能够使用机器人装置高通量地筛选大量样品。

除了新上市的 Streptavidin Mag Sepharose, GE Healthcare 还提供了多种 Mag Sepharose 磁珠产品, 包括 His Mag Sepharose Ni、NHS Mag Sepharose、Protein A Sepharose、Protein G Sepharose 和 TiO₂ Mag Sepharose 等。

即日起至 5 月 15 日, GE Healthcare 的蛋白纯化产品火热促销中, 75 折起! 具体的促销价格请查看

<http://www.ebiotrade.com/custom/GE/110420/index3.htm>。

(生物通 薄荷)

BD 最新推出 FACSVerse 流式细胞仪

生物通报道，BD 生物科学最近推出了 BD FACSVerse™ 流式细胞仪。这是一款灵活、可靠且可扩展的系统，能够分析最多 10 个参数，支持广泛的研究应用。



BD 生物科学细胞分析部门的总裁 James Glasscock 称，他们将前沿的创新融入 BD FACSVerse 系统，但同时本着三个原则。第一，他们希望为研究人员提供单个系统，此系统能够精确重复地处理常规应用以及复杂的多色实验。第二，他们试图简化流程，让系统更为易用。第三，他们为用户提供了升级路径，可从 6 个参数升级到 10 个参数，以及多个可选性能，以便满足未来的研究需求。

BD FACSVerse 的光学系统特有微型化的检测光学装置，以及整合在滤光片装置中的微处理器，让配置检测自动化。如果仪器配置与定义的实验参数不一致，仪器会发出警告，从而保证了结果的可靠性。

真空驱动的流体设备，独特的样品注射管（SIT）改善了系统可靠性和信号分辨率。除了标准的高、中和低流速，BD FACSVerse 系统还包括了一个特殊的高灵敏度流体模式，用于检测模糊染色的颗粒。新的流体设计还允许你选择样品输入装置。你可从微量离心管（~500 μ l）到大的锥形管（最多 50 ml）中灵活选择。

有了全新的 BD FACSuite 软件系统，用户可让常规任务自动化，如仪器启动、设置、样品采集和数据分析，并以最少的点击完成其他工作。软件包的模块化结构让用户可执行多项任务，在系统采集数据的同时开展数据分析。BD FACSuite 软件还能将分析和实验导出至其他 BD FACSVerse 系统，最大限度地降低了常常遇到的系统和用户差异。

BD FACSVerse 流式细胞仪有着内置的智能性，旨在减少失误，提高效率，让过程自动化，并尽量减少用户的交互。

为了支持广泛的应用，系统提供了一些预先定义的 BD 研究分析，如凋亡、细胞周期、细胞增殖和细胞因子检测，这些分析与 BD 的试剂盒匹配，能带来重复的结果。系统也支持用户自定义的实验开发。研究人员可将他们的实验转化成可重复使用的分析，包括相关设置、获取和分析表。他们还可以建立报告参数，以便减少用户和实验室之间的数据差异。

BD FACSVerse 流式细胞仪目前有 4 色、6 色和 8 色配置，带有前向角散射和侧向角散射，支持最多 10 个参数。4 色和 6 色系统可通过升级而扩展。该系统体积小，能够轻松安装在标准的实验室台面上。

如欲了解 BD FACSVerse 流式细胞仪的更多信息，[请点击此处索取](#)。

（生物通 余亮）

Sigma 推出第二代 ChIP 试剂盒

在表观遗传学方面，Sigma-Aldrich 公司拥有丰富的产品线，包括 Imprint DNA 修饰试剂盒、Imprint ChIP 试剂盒、Imprint 甲基化 DNA 检测试剂盒以及 DNA 纯化、定量 PCR、测序和反应纯化等产品。近日，Sigma 又推出了第二代的染色质免疫沉淀试剂盒——Imprint Ultra ChIP 试剂盒，提升了检测的灵敏度，能为新一代测序带来最佳结果。

此试剂盒利用了经过修饰的金黄色葡萄球菌（Staph A）来免疫沉淀和纯化染色质复合物。这种测序级的金黄色葡萄球菌（Staph-Seq）经过专利的 DNA 阻断处理，以避免它本身的 DNA 序列污染待测的基因组（图 1）。

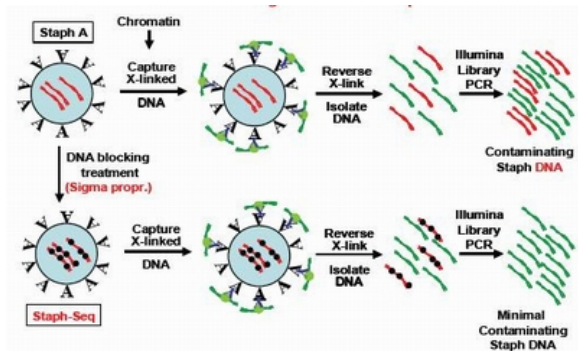
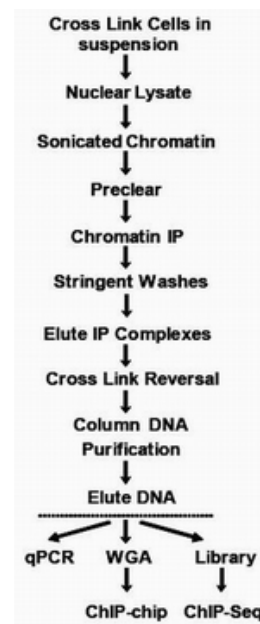


图 1. 在 ChIP-Seq 分析中，使用未经处理（上图）的 Staph A，致使 Staph A 的 DNA 序列污染了待研究的基因组 DNA 序列。Illumina 文库中的基因组 DNA 和 Staph A DNA 都被扩增。然而，使用 Staph-Seq（下图），Staph A DNA 被阻断，不会在文库制备中扩增。

Staph-Seq 非常适合在全基因组定位分析（如 ChIP-chip 和 ChIP-Seq）研究低丰度转录因子。细胞壁上的高密度蛋白 A 充当了一个极佳的基质，来 pull-down 稀少的转录因子关联的染色质复合物。这种高容量，再加上非常严格的洗涤液，改善了 Imprint Ultra ChIP 试剂盒的灵敏度和特异性，产生高产量的纯 DNA，且背景极低。因此，研究人员能够探索低丰度转录因子的结合位点以及新颖的组蛋白修饰。

Imprint Ultra ChIP 的操作步骤也经过精心设计和验证，大致流程如下。它适合细胞数量在

10⁶-10⁷ 的 ChIP 反应。灵活的形式允许对哺乳动物细胞或组织中的 DNA 进行免疫沉淀和纯化。



此外，Sigma-Aldrich 中国凭借多年对中国市场的理解和自身在科研领域的专业能力，以满足中国用户的实际需要为目标，推出了全新的 My Sigma-Aldrich 系列产品。

这些产品是为中国市场量身定制的，由 Sigma-Aldrich 原厂出品，但有着全新的销售模式。

My Sigma-Aldrich 系列产品目前提供了近千种在日常实验中使用频率比较高的产品，产品价格经过重新调整更贴近中国市场，并且在中国保证充足现货库存。产品范围包括：分析化学、有机合成、生化试剂、基础试剂和材料化学。[欢迎点击索取 My Sigma-Aldrich 的产品目录。](#)

（生物通 薄荷）

轻松克服转染挑战 Neon 电转染系统

将质粒或小分子 RNA 转染进入哺乳动物细胞是研究基因功能的重要手段。目前市场上也有多种转染试剂可供选择，从聚合物、脂质体到这两年新兴的纳米颗粒。就普通的细胞系而言，这些试剂大多都能实现高效的转染。然而，有些细胞“百毒不侵”，比如干细胞或原代细胞，你还真拿它没办法。无论怎么优化，转染试剂就是不灵。这时，换个思路，试试电穿孔吧。

电穿孔技术出现于 20 世纪 80 年代中期。电穿孔是一个物理过程，在这个过程中，细胞在高电压场强的作用下，细胞膜发生暂时的重新排列，使得细胞膜具有临时的大分子可通透性，可从周围环境中摄入包括核酸、蛋白质、碳水化合物一类的大分子以及一些小分子。与其他方法相比，电穿孔技术具有简便、重复性好、效率高、适用范围广等优点。由于这是个物理过程，较少依赖细胞类型，后继的生物或化学副作用小，基本上各种细胞都能 work；导入 DNA，RNA 或者 siRNA 统统没问题，而且对大多数细胞类型，用电穿孔法核酸的转移效率比化学方法高得多。当然，这种方法也有缺点，那就是毒性较大，电脉冲会杀死一定比例的细胞，因此，每次实验都需要一定量的细胞。

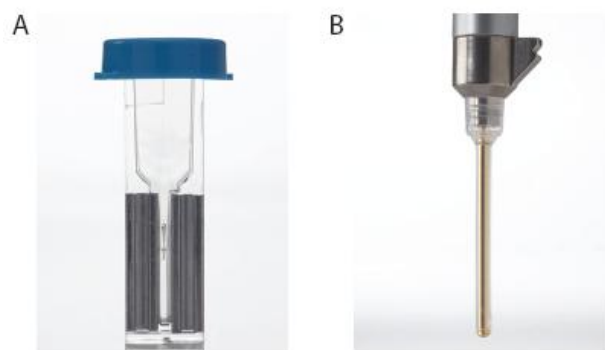
新产品的推出往往代表了技术创新，让实验更简单易行，更高效可靠。Life Technologies 公司推出了一种新一代的电穿孔仪——Neon™ 转染系统。它可将核酸（包括质粒 DNA 和 siRNA）高效导入几乎任意一种动物细胞内，包括难以转染的原代细胞、干细胞和造血系统来源的细胞，同时保持高的细胞活性。



这个开放而灵活的转染系统包括：Neon™ 转染仪、Neon™ 移液器架、Neon™ 移液器以及两套 Neon™ 转染试剂盒。

新颖的转染室

大家可能注意到，Neon 系统中没有带传统的电转杯。确实，这就是它的独特之处。Neon 系统用一个特殊的移液器吸头取代了传统的电转杯。移液器吸头内使用 24K 镀金电极，可形成更为均匀的电场，同时最大限度地减少温度升高和 pH 值变化幅度，在确保细胞高效转染的同时，也更为温和，保证细胞存活率更高。



装有镀金电极的 Neon 移液器吸头（右）与普通电转杯（左）的比较。研究表明，与普通电转杯相比，狭长形移液器吸头可产生更为均匀的电场，从而提高细胞存活率和转染效率。

高效转染

实践证明，Neon 系统能够对多种难以转染的细胞进行高效转染，包括原代星形胶质细胞、原代

树突状细胞、Jurkat、小鼠胚胎干细胞等（表 1）。多种细胞类型可获得超过 75% 的转染效率。截至目前，使用 Neon 转染系统发表的文献已超过百篇，覆盖了人、小鼠、大鼠等多种细胞。觉得摸索电转条件无从下手？别担心，在转染前，你只需登录 Neon 的网页（www.invitrogen.com/neon），就能找到细胞特异的实验条件，无需反复优化，轻轻松松提高转染效率和细胞活性。另外 Life Tech 还有一个专门供 Neon 客户分享他们的实验结果及经验的网站 Neon Protocol Exchange（<http://www.protocolexchange.com/index.jspa>），在这里有很多成功案例，供你参考。你也可以与大家分享你的成功案例。

表 1. 部分经 Neon™ 转染系统成功转染的细胞系。

细胞系	细胞来源	转染效率* (%)	活细胞 (%)
原代星形胶质细胞	大鼠脑神经元	76	88
CHO	中国仓鼠卵巢	91	92
原代树突状细胞	人血	50	70
人神经干细胞	ES	53	97
Jurkat	人 T 细胞白血病细胞	94	97
KG-1a	人血	76	83
原代 MEF 细胞	小鼠胚胎	80	75
小鼠胚胎干细胞	小鼠胚胎	88	96

* 转染效率是根据活细胞和死细胞的全部群体来计算的。

设计灵活

有时，细胞很珍贵，若每次转染所需的细胞量较少，那么你就能开展更多更复杂的实验。Neon

系统带有两种吸头：10 μ l 和 100 μ l，让您可根据实验要求灵活选择，而不像传统电穿孔仪那样只能转染固定量的细胞。使用 Neon 系统，每次最少可转染 2×10^4 个细胞，最多可转染 2×10^7 个细胞。当然，这并非绝对。若你的细胞更少或更多，也可一试，据 Life Tech 的专家介绍，有一位客户曾成功转染了 5000 个原代毛囊细胞。

使用简单

由于省掉了电转杯，转染过程也更为简化：只需将细胞和核酸吸入 Neon 移液器吸头中，再插入到移液器吸头架上，并按“Start”即可。转染过后，直接将细胞加入培养容器中。既没有繁琐的移液，也不需要清洗电转杯。而且，通用的试剂盒适用于所有细胞类型，不用购买多个试剂盒，也无需鉴定最佳缓冲液。当然，一次性使用的 24K 金电极吸头成本不低。因多次使用会导致金包被变薄，改变吸头的电导率，所以每个吸头最多只能使用两次。



若您的实验室经常与难转染的细胞打交道，那真的不妨一试。害怕效果不好？那可以先申请 DEMO 演示啊。Life Tech 现在还推出了有奖申请，凡能在 2011 年 6 月 30 前成功申请 DEMO 演示，就可再获得 Invitrogen 电脑软包一个。机会难得哦，赶快申请吧。

[我想了解 Neon 电转染系统的更多信息](#)

精确计数 轻松分析 CASY 细胞计数分析仪

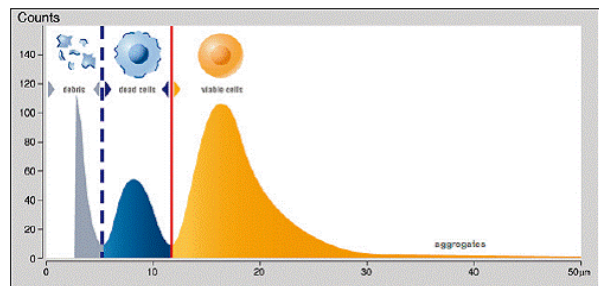
作为第一台自动化细胞计数仪的开发商，Innovatis 公司（09 年已被罗氏诊断应用科学部收购）十余年来一直致力于细胞计数、分析、细胞质量控制的相关技术研发和仪器生产，是国际著名的细胞计数分析仪生产厂商。除了生物通之前介绍的 Cedex XS 细胞计数分析仪，Innovatis 产品目前全球用户已超过 2500 家，在中国也销售了超过百台，CASY 系列细胞分析产品也深受全球广大客户的青睐。



与一般的台盼蓝染色法不同，CASY 细胞计数仪采用的是独特的电脉冲三维扫描分析技术。它突破了传统二维细胞成像分析技术和染色法的局限，提供更加精确的细胞计数和分析功能。您无需购买染色剂，制备样品也更加轻松。

基于非侵入性的电流排除（ECE）原理，CASY 系统可精确、快速地定量细胞浓度、体积、成团和碎片。它根据测量的体积来计算细胞成团，相对于二维成像，更加精准和科学。即使是严重成团的细胞，它也能正确定量。

除了计数，CASY 还能测定细胞活力。细胞死亡时，细胞膜会破损。正常的细胞由电脉冲得到的是整个细胞的体积，而死亡细胞由于细胞膜已经破损，CASY 测得的是细胞核的体积，根据体积大小的差别，我们可以区分活细胞死细胞以及细胞碎片（参见下图）。



CASY 提供的检测数据包括：活细胞浓度/数量、死细胞浓度/数量、总细胞浓度/数量、细胞活力、平均细胞直径/体积、峰值细胞直径/体积以及细胞成团校正。

此外，CASY TT 检测细胞不受样本浓度的限制，低至 100 个细胞，高至 10^7 个细胞，都能精确测定。分析时间仅为 10 秒。每次需要的样本体积也很灵活，5-100 μl 皆可。分析范围包括 0.7-120 μm ，适合所有的哺乳动物细胞、藻类、细菌、精子细胞、寄生虫及浮游生物等。而且，CASY 的高分辨率大小分布还能提供关于细胞代谢状态的重要信息。

仪器具有出色的稳定性。出厂时统一校正，用户每次开机无需人工调零，仪器自动调校，最大限度地减少人为误差。这样，用户之间、系统之间的结果可直接比较。（生物通 余亮）

[索取CASY细胞计数仪的更多资料](#)

CASY TT 的技术参数：

检测原理	电脉冲扫描
体积变化分辨率	1/512000
可显示大小通道	400
检测直径范围	0.7-120um
检测细胞浓度范围	$10^2 - 10^7$ /ml
检测直径动态范围	1:40
检测体积动态范围	1: 70000
检测时间	10 秒
样本体积	5-100ul
打印结果信息	细胞大小分布, 计数结果, 检测参数等
尺寸	39cmX31cmX39cm (高 X 宽 X 深)
重量	14.5kg

关注临床应用，454 推出 HLA 分型检测研究产品

Julia Karow, 2011-4

正如第一个例子，测序平台上的靶位点分析有可能在将来应用于临床上。2011-4，Roche 旗下 454 生命科学推出了高分辨率和中等分辨率的 HLA 基因分型试剂盒。

人类白细胞抗原（HLA）所在位点编码超过 200 个基因，在免疫系统有着关键作用。HLA 具有高度多态性，包括约 6000 个已知的等位基因。HLA 基因型与自身免疫、传染疾病以及一些癌症都有联系，此外 HLA 分型对器官移植中的供体和受体配型也有重要作用。

454 的两套试剂盒，即 GS GType HLA MR 和 HR，目前只能用于研究。它们是 454 分析系列计划里第一个应用于疾病领域的产品，未来产品系列中还将包括免疫遗传学、传染病以及癌症。

据公司介绍，相对于传统的 Sanger 法测序，基于 454 测序技术平台的 HLA 分型，拥有更高的通量，每次运行（run）可平行处理 5—80 个样品；以及可以精确的对目的外显子区域进行高覆盖度的测序，从而得到样本间的多态性数据，从而节省了时间和劳力。

454 CEO Chris McLeod 指出，HLA 分型仅在疾病研究中就“大有作为”，在法医、群体遗传学等其它领域，也有发展潜力。他提到，目前的分辨率水平对于许多研究应用都是非常有益的，今后要做的就是在这个基础上开发有潜力的注册产品，应用于临床。

Roche 公司还未宣布何时计划向美国食品和药物部门提交应用申请，但是，Chris McLeod 也指出旨在提交的测序平台及其分析的申请也是基于现行的研究版本。许多 HLA 分型的临床应用中，

分析的分辨率都要求比现在的更高。临床上的测序平台“不会是全新的，”而是当前最稳定的。

McLeod 指出目前临床 HLA 分型主要是 Sanger 测序法，虽然还没有注册的诊断产品存在，但对于 454 也是个“目标市场”。

上个月，Life Technologies 宣布已开始使用一款 Sanger 毛细管测序仪即 3500 Dx 遗传分析仪进行了 HLA 分型的临床试验，并计划向 FDA（CSN 3/22/2011）申请 510（k）平台空间及分析试剂盒。

McLeod 指出临床 HLA 检测将会是 454 的市场，“在这个领域，我们比 Sanger 测序有着显著的优势。”与其它的二代测序平台相比，454 相对的长读长对准确确定等位基因相位更有用。“由于其它平台的读长不够长，因此实际中他们需要做许多工作，”他说。454 和罗氏与合作研究者已进行了 HLA 分析检测，并于上个月在 Tissue Antigens 公布了研究结果，其中合作机构包括斯坦福大学、德国德累斯顿技术大学、费城儿童医院、奥地利红十字输血服务、奥克兰儿童医院和研究中心以及德国凯撒斯劳滕免疫及遗传学协会。

奥克兰儿童医院和研究中心 HLA & Immunogenetics 实验室负责人，也是文章作者之一，Elizabeth Trachtenberg 谈到 454 平台一个主要优势，就是减少等位基因杂合子对计算多态性频率的影响。而使用 Sanger 测序，“我们必须做许

多补充测验去解决这些模糊的杂合子组合，而这个新的克隆法测序大大简化了该问题，”她这样告诉 **Clinical Sequencing News**，“我们至少要花费四分之一的时间去解决含糊性，而 454 平台确实给 HLA 临床试验提供了很大的帮助”。每个样品的成本也“明显少于 Sanger 测序法，”她补充到，因为许多样品可以平行操作，同时模糊性被降低，尽管她还没有完全精确计算成本，目前她的实验室每次同时进行 40 个样品 11 个位点的测序。

可以肯定的是，虽然 Trachtenberg 的 454 GS FLX 是在 CLIA 实验室运行，但它不是用于临床工作而仅是疾病研究。“但是随着时间推移，我们将会把它应用于临床试验和处理病人样品，”她说，甚至可能在 FDA 同意 454 仪器之前。倘若不能使用罗氏的试剂盒进行临床研究，她可能自己研发试剂。

两年前，一些 HLA 检测实验室一直怀疑使用 454 平台进行临床 HLA 分型，复杂且工作量大的样本准备，读长有限而不能进行外显子之间的多态性分析，此外还需要在一次运行中集合许多样本，以使得分析在成本上更高效 (IS 3/17/2009)。

McLeod 表明，公司已和使用者合作研究液态控制系统，自动化准备样本。此外，两年前引入 Titanium chemistry 技术后，读长增至约 400 bp。最后还引入 GS Juinor，单次运行需要准备的样品数目也减少了。

每个 454 的 HLA 分析研究都包括一个用于 PCR 扩增的引物，可同时扩增多达 10 个 HLA 基因的 1-3 个外显子，以及纠错软件和优化测序数据的第三方软件。试剂盒提供 4 块含干粉引物的 PCR 微量滴定板，每个可用于 10 个样品测定。10 个样品进行中等分辨率分析需要一个板，而高分辨率分析则要求两块板。

无论 GS FLX 或 GS junior，PCR 扩增子都是可直接对接 454 测序样品准备的工作流程中。对于中等分辨率，GS FLX 每次可进行 80 个样品的分析，GS junior 每次可进行 10 个样品的分析。对于高分辨率，FLX 每次可分析 40 个样品的，Junior 每次可分析 5 个样品。

除了 HLA 检验，454 还有一些其他的靶位测序分析的发展空间，McLeod 表示 454 将会在人类健康护理方面有很大作用，包括许多特殊疾病。每一种都将由一套优化的引物和软件组成。454 计划这些疾病相关的检测将定期发布，约每 3 到 6 个月推出一次，其中许多检测将来在临床环境下非常有潜力。

[点击索取HLA基因分型试剂盒的详细资料](#)

更多 454 HLA 产品信息请点击：

<http://454.com/products-solutions/assays/gs-gty-pe-hla.asp>

蛋白质磷酸化修饰的最新研究方法

作者：钟丹丹博士

摘要

蛋白质磷酸化尤其是酪氨酸磷酸化对细胞的调控发挥重要的作用。本文概述了磷酸化研究的一些相关的实验方法以及提高这些实验灵敏度的技巧，包括磷酸化蛋白 Western Blot 检测、磷酸化蛋白质组学和蛋白质酪氨酸激酶活性分析。

引言

蛋白质磷酸化对于许多生物现象的引发是很必要的，包括细胞生长、增殖、泛素（ubiquitin）介导的蛋白降解等过程。特别是酪氨酸磷酸化，作为细胞信号转导和酶活性调控的一种主要方式，通常通过引发蛋白质之间的相互作用，进而介导生长因子、荷尔蒙和细胞因子等对细胞膜上受体的信号调控。

然而，酪氨酸磷酸化在细胞的所有磷酸化修饰中所占的比例却非常低。大概 10% 的细胞蛋白会受到磷酸化共价修饰，但每 100 次蛋白的磷酸化修饰中仅有 1 次酪氨酸基团的修饰。与大部分细胞中的丝氨酸和苏氨酸磷酸化水平相比，酪氨酸磷酸化的水平估计要低 2000 倍。正是由于细胞中酪氨酸磷酸化的水平相当低，才能保证细胞在内外信号的刺激下，作出灵敏的反应，所以研究酪氨酸的磷酸化对于细胞信号的调控和许多重要生物现象的研究具有极为重要的意义，而对发生酪氨酸磷酸化的蛋白质的识别及磷酸化位点的鉴定对揭示细胞过程的调控和药物的作用位点起到非常重要的作用。

研究蛋白质磷酸化的相关方法：

磷酸化 Western Blot:

对于信号转导科研来说，抗酪氨酸磷酸化抗体的出现是一个意义重大的事件。在没有抗酪氨酸磷酸化抗体之前，蛋白质和酶的酪氨酸磷酸化只能通过非常危险的并且很费时的放射性实验来检测。而利用抗酪氨酸磷酸化抗体，则可以通过 Western Blot 或其它免疫学方法轻松地检测到磷酸化信号。常规的检测方法包括：用抗酪氨酸磷酸化抗体在 Western Blot 上检测内源或外源表达的磷酸化蛋白。如果目标蛋白的含量较低，也可利用免疫沉淀的方法先富集发生磷酸化的酪氨酸蛋白，再检测目标蛋白的水平。抗酪氨酸磷酸化抗体也常用于检测在不同处理的条件下，细胞内总的酪氨酸磷酸化水平的变化情况，作为许多细胞生物现象的一个重要指标。

我们都知道如果需要检测某一个目标蛋白的某一特定定位点的磷酸化状态，可以选用该蛋白特定定位点的磷酸化特异性抗体。但由于我们研究的通常是新的磷酸化位点，或者这些蛋白特定定位点的磷酸化抗体效果不够好，我们不得不自己制备磷酸化抗体。如果大家自己制备过磷酸化抗体，就会知道磷酸化抗体的制备比一般抗体的制备更加困难，而且浪费大量宝贵时间。现在国外的科学家发现可以使用通用型的磷酸化抗体，只要巧妙的设计实验，也可以达到同样的检测目的。以 Yuan 的文章为例，他们需要检测 BCR-ABL 的磷酸化，但他们没有特

异性的磷酸化抗体。他们首先使用了抗 c-ABL 的抗体和蛋白 G-琼脂糖珠子来免疫沉淀富集 BCR-ABL 蛋白,然后再通过 Western-Blot 和 4G10 通用型酪氨酸磷酸化抗体 (pan-phosphotyrosine) 来鉴定 BCR-ABL 蛋白的酪氨酸磷酸化水平。另外一组以 Clemens 为首的科学家,则利用抗 Dock 蛋白抗体先免疫共沉淀了 DACK 蛋白,再用 4G10 酪氨酸磷酸化抗体来检测 DACK 蛋白和 DSH3PX1 蛋白的酪氨酸磷酸化水平,通过区分这些蛋白的分子量大小,来确认相应的磷酸化条带的蛋白身份。

[索取 4G10 酪氨酸磷酸化抗体的更多资料](#)

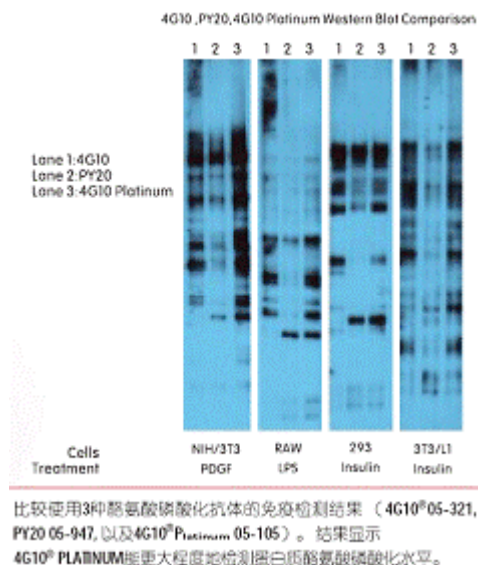
与做普通的 Western Blot 相比,磷酸化 Western Blot 有一些要额外需要注意的事项:

首先,由于蛋白的磷酸化是可逆的,会被磷酸酶去磷酸化,所以在样品制备和整个免疫检测过程中,需要抑制或避免细胞内源性和外源性的磷酸酶的干扰。针对细胞内源性的磷酸酶,我们在样品制备时,需要在细胞裂解液中加入足量的并且是新鲜的磷酸酶抑制剂,如 PhosphoSafe 系列。外源性的磷酸酶主要是由实验过程中的其它试剂带入的,比如我们要确保封闭剂中不含磷酸酶等。同时,样品中或其它试剂中带的细菌也会分泌外源性的磷酸酶,所以做磷酸化 Western Blot 的另一个关键是要尽量使用清洁的新鲜的溶液和新做的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶,并且最好在样品制备完就立刻上样,当天完成 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测。如果要使用同一块 Blot 进行全蛋白的免疫检测,就需要先做磷酸化的检测再做全蛋白的检测,以尽量避免磷酸化信号的丢失,这点非常重要。

有一些实验是用 Western Blot 来验证一组磷酸化的多肽或蛋白的存在,这时候就需要使用的通用型磷酸化抗体。因为通用型磷酸化抗体,如 4G10 酪氨酸磷酸化抗体,具有广泛的识别范围,同时具

有很好的磷酸化特异性,才不会导致假阴性结果的产生。

以 Liu 的研究为例,他们就使用了通用型的抗酪氨酸磷酸化抗体 4G10 和 PY20,利用 Western Blot 技术来验证其通过多肽芯片筛选出的多肽结果。他们的实验室是这样设计的,首先利用磷酸化酪氨酸的多肽芯片 (phospho-tyrosine peptide array) 来筛选与 SH2 结构域结合的磷酸化多肽序列,然后对这些合成的多肽序列进行 Western Blot 验证,利用通用型的抗酪氨酸磷酸化抗体 4G10 和 PY20 检测其磷酸化水平。他们发现不同的抗体具有很不一样的识别特异性,如 pTyr-Pro 序列能被某些 SH2 结构域结合,而不被 4G10 和 PY20 识别。但就总体而言,通用型的抗酪氨酸磷酸化抗体可以识别绝大多数的 SH2 结构域结合的磷酸化多肽,特别是 4G10 抗体比 PY20 抗体能识别更多的磷酸化酪氨酸多肽。



磷酸化蛋白质组学 (PhosphoProteomics):

磷酸化蛋白质组学与蛋白质组学类似,可以通过 2D 胶和质谱 MS 鉴定出新的磷酸化蛋白和蛋白的新磷酸化位点。但是利用 MS 从磷酸化蛋白中检测出磷酸化肽段会遇到许多问题,这是由于样品中大量的非磷酸化肽段的存在使磷酸化肽段的相对浓度降低造成的。大量的非磷酸化肽段会抑制 MS 对

磷酸化肽段的检测，因此必须采取额外的实验步骤在 MS 之前富集磷酸化蛋白或磷酸化肽段。对此，抗磷酸化特异性抗体以及亲和层析琼脂糖珠子或柱子就能起到很好得到富集作用。特别是对于细胞中比例很低的酪氨酸磷酸化的研究来说，富集的过程尤显重要。目前，通用型的抗酪氨酸磷酸化（pan-phosphotyrosine）单克隆抗体 4G10 和 PY20 已被证明对寻找蛋白酪氨酸磷酸化位点起到很好的作用。除此以外，也有一些通用型的抗丝氨酸和苏氨酸磷酸化的抗体如 4A4，也可用于 MS 之前富集丝氨酸和苏氨酸磷酸化的蛋白。

Guha 研究组就是利用这种方法来研究 EGFR 和 KRAS 的磷酸化水平变化的。

在肺腺癌（lung adenocarcinoma）病人中，原癌基因 EGFR 和 KRAS 是两个最经常发生突变的基因。但是带有 EGFR 不同的突变或带有 KRAS 的突变的病人，对 TKI 治疗法（酪氨酸激酶抑制剂治疗法）有不同的治疗效果。Guha 等人通过磷酸化蛋白质组学的方法来比较带这些不同突变的病人的磷酸化蛋白的情况，揭示这些突变的细胞内 EGFR 和 KRAS 的下游信号通路的变化，从而揭示了解造成 TKI 治疗不敏感的机理。

首先，Guha 等人使用了偶联了抗酪氨酸磷酸化抗体的琼脂糖珠子（4G10-agarose），对带有不同突变的细胞裂解液进行免疫沉淀。通过这一步，可以对发生酪氨酸磷酸化的蛋白以及与这些磷酸化蛋白紧密结合的其它蛋白进行有效的富集。免疫沉淀的蛋白可以被 100mM 的磷酸苯酯洗脱出来，然后进行透析，为下一步跑胶做去除过多的盐分和离子的准备。其实，透析很费时间，而且蛋白样品甚至会被稀释，可以选择使用超滤离心（Amicon Ultra）的方法用半小时就可去除离子同时浓缩样品。接下来，处理好的磷酸化蛋白样品通过 SDS-PAGE 胶分开后，进行质谱分析前的常规处理，包括使用 Coomassie 染料进行染色，把胶

切成 20-30 块小块，胰酶消化成多肽片段等。通过 LC-MS/MS，即可定性和定量的分析发生酪氨酸磷酸化的蛋白以及与这些磷酸化蛋白紧密结合的其它蛋白。已被鉴别出的这些蛋白，可以用 Western blot 的方法，并结合使用特异性蛋白抗体和 4G10 抗体，对这些蛋白的酪氨酸磷酸化状态进行进一步确认。

Lind 等人的研究也利用了类似的方法，在做质谱分析之前，使用通用型的抗酪氨酸磷酸化抗体来富集磷酸化蛋白或肽段。有趣的是，他们与前面提到的 Liu 的文章有一致的发现，在文中使用的 5 种酪氨酸磷酸化抗体中，使用 4G10 抗体富集的 MS 结果最后识别了最多的潜在酪氨酸磷酸化蛋白。

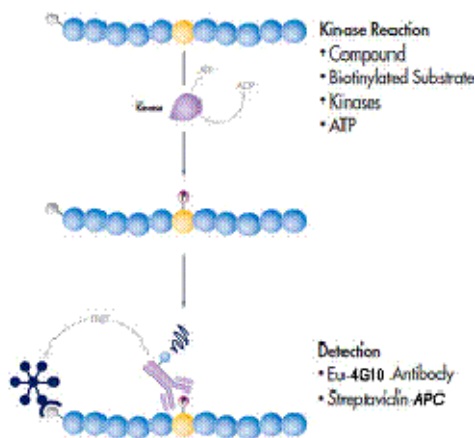
除了这种磷酸化蛋白质组学的通用方法以外，现在也出现了创新的方法来帮助研究磷酸化蛋白质组学。其中基于 Luminex xMAP 和 Epitome 的 Epiquant 技术，就实现了对多种蛋白的磷酸化和同一蛋白上的多个磷酸化位点以及全蛋白，同时进行高通量地定量检测（有关 Epiquant 技术的详细信息，请[点击此处](#)）。考虑到同时检测同一个细胞上，同一条 Pathway 上、下游蛋白的协同作用，可使用流式细胞术进行研究（有关技术信息，可[点击此处](#)）。

蛋白酪氨酸激酶（PTK）活性分析：

酪氨酸磷酸化由蛋白酪氨酸激酶（PTK）诱导。PTK 有很多的种类，包括跨膜的和细胞质内可溶性的酶。PTK 在多种细胞过程中发挥了极其重要的作用，其中包括细胞生长、分化和新陈代谢等。许多疾病也与某些 PTK 失调密切相关，比如造血系统的恶性肿瘤、肾细胞癌、甲状腺癌等多种癌症以及糖尿病、类风湿性关节炎等等。因此，对于 PTK 的活性分析也是细胞调控研究和药物研发中常常需要研究的研究。通过 PTK 的活性分析可以

筛选 PTK 抑制剂，并可以获得这些抑制剂的 IC50 参数。

PTK的活性分析最传统的方法就是使用同位素的PTK的活性分析，后来也有多种非放射性的较安全的分析方法，例如，有基于ELISA的PTK活性分析（此技术的详细信息，请[点击此处](#)），其中应用了可以被许多PTK磷酸化的随机多肽序列和HRP偶联的抗酪氨酸磷酸化的特异性抗体。也有基于竞争性结合的荧光偏振的分析方法（有关荧光偏振技术的详细信息，请[点击此处](#)）。现在，更有基于 HTRF (homogenous time-resolved fluorescence) 的全新的PTK活性分析方法。这种方法利用了荧光共振能量转移（FRET）的原理，比基于ELISA和基于荧光偏振的方法更灵敏，信号也更稳定，对于需要一段时间孵育的激酶分析来说会更有优势。以通用型的 4G10 HTRF分析为例，它使用了偶联于Europium的工业化标准单克隆抗体 4G10，生物素标记的酪氨酸多肽底物，和APC标记的链霉素等。只要在体系中加入PTK激酶后，若多肽底物发生磷酸化，则此底物能被 4G10 抗体结合，导致荧光染料APC和Europium的距离很近足以发生荧光共振能量转移，激酶的活性越强则 HTRF信号的加强越显著（实验原理见下图）。（有关 4G10 HTRF技术的详细信息，请[点击此处](#)）



[索取 4G10 酪氨酸磷酸化抗体的更多资料](#)

参考文献：

Clemens JC et.al. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. PNAS (2000)

Guha U et.al. Comparisons of tyrosine phosphorylated proteins in cells expressing lung cancer-specific alleles of egfr and kras. PNAS (2008)

Lind SB et.al. Immunoprecipitation followed by mass spectrometric detection for studying global protein tyrosine phosphorylation. JPR (2008)

Liu BA et.al. SH2 domains recognize contextual peptide sequence information to determine selectivity. MCP (2010)

Nelson EA et.al. Nifuroxazide inhibits survival of multiple myeloma cells by directly inhibiting stat3. Blood (2008)

Petersen J & Hagan LM. Polo kinase links the stress pathway to cell cycle control and tip growth in fission yeast. Nature (2005)

Yuan H et.al. BCR-ABL gene expression is required for its mutations in a novel KCL-22 cell culture model for acquired resistance of chronic myelogenous leukemia. JBC (2010)

三种靶向序列捕获策略的比较

生物通报道，尽管新一代测序（NGS）的吞吐量越来越高，而费用越来越低，但它仍不是大多数遗传实验室的可行选择。对于复杂疾病的研究更是如此，这类研究至少需要数百个样本，以实现足够的统计能力。然而，这么多样本的全基因组测序，无论从成本考虑，还是从数据分析考虑，都是相对困难的。

为了在大样本量中充分发挥新一代测序技术的潜能，科学家们开发出几种方法，来选择性富集目标区域。与全基因组测序相比，富集后再测序降低了成本，也减轻了后续数据分析的压力，让研究人员能够轻松利用新一代测序的吞吐量。目前有几种靶向富集方法，包括分子倒置探针连接测序（MIPS）、基于寡核苷酸杂交的方法，以及多重PCR。

为了评估这些方法在ABI SOLiD 3系统上表现如何，来自迈阿密大学米勒医学院以及Life Technologies的研究人员评估了三种富集技术：罗氏 NimbleGen 的 SeqCap 寡核苷酸杂交型芯片捕获，安捷伦的 SureSelect 寡核苷酸杂交溶液型捕获以及 Raindance 的多重 PCR 方法。文章发表在4月29日的《PloS ONE》杂志上。

罗氏 NimbleGen 是最早推出商业化序列捕获芯片的公司。它目前拥有多种标准和定制的捕获芯片，包括人外显子组捕获芯片。随后，安捷伦也推出了 SureSelect 靶向序列富集系统。两者的捕获都是基于寡核苷酸探针，但形式不同。NimbleGen 是芯片形式，而安捷伦是溶液（In-Solution）形式。关于这两种技术，生物通之前也有报道，详见[《揭开基因组捕获的神秘面纱》](#)。

在本研究中，目标区域选自人类基因组中的外显子和进化保守区域。根据三种方法各自的指示来设计引物和探针。对于三种方法来说，目标区域都是相同的，大约 0.8 Mb。富集以及测序之后，利

用几个指标来分析 SOLiD 测序结果，包括各样品间覆盖深度的一致性、击中（on-target）和脱靶（off-target）效率、等位基因偏向以及与芯片数据的基因型一致性。

通过分析，研究人员发现：安捷伦的 SureSelect 表现出优异的击中效率以及各样品间读取深度的一致性。在读取深度为 20 倍及以下时，NimbleGen 的性能很相似。Raindance 和 NimbleGen SeqCap 的读取深度都更严格分布在平均值左右，但击中效率却不如 SureSelect。在分析设计上，Raindance 表现出最好的多功能性。它靶定了目标区域的 97%，这对于诊断性的重测序可能很有用。

作者还提到，利用三种靶向富集方法所得的测序结果与已知的基因型表现出很好的一致性，表明不存在影响基因型检出的系统偏向。（生物通 薄荷）

原文检索：

Comparison of Three Targeted Enrichment Strategies on the SOLiD Sequencing Platform

摘要：

Despite the ever-increasing throughput and steadily decreasing cost of next generation sequencing (NGS), whole genome sequencing of humans is still not a viable option for the majority

of genetics laboratories. This is particularly true in the case of complex disease studies, where large sample sets are often required to achieve adequate statistical power. To fully leverage the potential of NGS technology on large sample sets, several methods have been developed to selectively enrich for regions of interest. Enrichment reduces both monetary and computational costs compared to whole genome sequencing, while allowing researchers to take advantage of NGS throughput. Several targeted enrichment approaches are currently available, including molecular inversion probe ligation sequencing (MIPS), oligonucleotide hybridization based approaches, and PCR-based strategies. To assess how these methods performed when used in conjunction with the ABI SOLiD3+, we investigated three enrichment techniques: Nimblegen oligonucleotide hybridization array-based capture; Agilent SureSelect oligonucleotide hybridization solution-based capture; and Raindance Technologies'

multiplexed PCR-based approach. Target regions were selected from exons and evolutionarily conserved areas throughout the human genome. Probe and primer pair design was carried out for all three methods using their respective informatics pipelines. In all, approximately 0.8 Mb of target space was identical for all 3 methods. SOLiD sequencing results were analyzed for several metrics, including consistency of coverage depth across samples, on-target versus off-target efficiency, allelic bias, and genotype concordance with array-based genotyping data. Agilent SureSelect exhibited superior on-target efficiency and correlation of read depths across samples. Nimblegen performance was similar at read depths at 20× and below. Both Raindance and Nimblegen SeqCap exhibited tighter distributions of read depth around the mean, but both suffered from lower on-target efficiency in our experiments. Raindance demonstrated the highest versatility in assay design.

冷泉港实验方案：利用蛋白芯片 鉴定蛋白-DNA 相互作用

冷泉港实验方案《Cold Spring Harbor Protocols》5月刊新鲜出炉。本期照例有两篇精选文章可供大家免费查看。一篇是利用蛋白芯片鉴定蛋白-DNA 的相互作用，另一篇是对肾脏发育的成像。

[Characterization of Protein-DNA Interactions Using Protein Microarrays](#)

这篇实验方案是由约翰霍普金斯大学医学院的朱恒（音译，Heng Zhu）博士领导的研究小组提供的。

蛋白-DNA 相互作用（Protein-DNA interactions, PDIs)是调控生命功能的重要机制，对细胞的分化发育、功能的维持以及细胞活性的维持都具有重大的意义。朱恒博士领导的研究小组在此介绍了一个利用蛋白芯片技术鉴定 PDIs 的实验方案。

此方案具体介绍了双链 DNA 的设计和制备，双链 DNA 探针的制备，DNA 探针与蛋白芯片杂交，并分析所产生的蛋白-DNA 相互作用。此方案能够同时鉴定数千个蛋白的蛋白-DNA 相互作用，而多个精心设计的 DNA 探针也能平行检测，实现了蛋白质组范围的 PDIs 快速分析。

朱恒研究小组曾利用此技术系统分析了人类蛋白-DNA 的相互作用图谱。他们在 460 个基因序列上发现了 17718 个蛋白-DNA 作用现象，它们调控各种转录过程。这些蛋白可归为 4191 个类别。当时的研究成果发表在《Cell》杂志上，并被列为亮点研究推荐。

[Imaging Kidney Development](#)

这篇实验方案改编自冷泉港出版社最近出版的《Imaging in Development Biology : A Laboratory Manual》一书，是由哥伦比亚大学医学中心的 Frank Costantini、牛津大学的 Shankar Srinivas 及其同事提供的。

肾脏的发育包含了一些细胞谱系的相互作用以及复杂的形态发生过程，如输尿管芽发育成肾盂，分支形成肾盏、再分支形成小盏、集合管，而间充质祖细胞分化形成肾上皮。小鼠肾脏作为实验系统的一个主要优势在于，它能够在培养过程中发育。而荧光蛋白的出现也为观察器官培养中特定肾脏结构的形态发生提供了工具。

在本方案中，研究人员介绍了两类表达荧光蛋白的转基因小鼠，来观察不同的细胞谱系和发育过程。一类是以特定基因的形式表达荧光蛋白的转基因小鼠，另一类是 Cre 报告基因小鼠，它通过 Cre 重组酶活性打开了细胞中的荧光蛋白。

在本期 CSHL 中，另一篇实验方案详细地介绍了胚胎小鼠肾脏的解剖、体外培养和成像，可惜不能免费看全文，订阅用户才能看。

（生物通 余亮）

中国共有多少台高通量测序仪？

生物通报道，近日，英国两名学者（James Hadfield 和 Nick Loman）绘制了高通量测序仪在全世界的分布图。

根据他们的统计，目前全世界总共购买了 1599 台高通量测序仪（包括第二代和第三代），分布在 527 个研究中心，平均每个中心拥有 3.0 台测序仪。

若按照国家来统计，毫无疑问美国是最多的，拥有 702 台，遥遥领先于其他国家，其次便是中国，拥有 199 台，英国以 132 台位列第三。之后是德国、加拿大、澳大利亚、西班牙、韩国、法国、日本。让人意想不到的是，台湾也拥有 22 台高通量测序仪，超过香港的 13 台。

与美国的分布广泛不同，中国的高通量测序仪主要集中在三个地区：深圳、北京和江浙沪地区。深圳华大基因不愧为全世界规模最大的基因组学研究中心，拥有 166 台高通量测序仪，占全国 80% 以上，也是全世界拥有最多高通量测序仪的基因组中心，领先于美国哈佛-麻省 Broad 研究院（114 台）。其中，Illumina HiSeq 137 台，SOLiD 27 台，Roche/454 1 台，Ion Torrent 1 台。

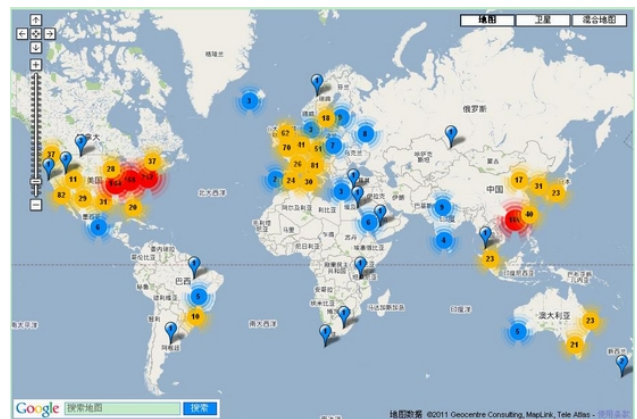
在北京地区，北京基因组研究所拥有 15 台高通量测序仪，分别为：9 台 SOLiD 3/4、5 台 Illumina GA2 和 1 台 454；而北京贝瑞和康生物技术有限公司也拥有 2 台测序仪，分别为 Illumina 的 GA2 和 HiSeq，这家公司提供测序和产前诊断业务。

在江浙沪地区，上海伯豪生物技术有限公司/生物芯片上海国家工程研究中心拥有 4 台 SOLiD 4/5500、2 台 Illumina GA2 和 1 台 454；而康成生物拥有 1 台 Illumina GA2；浙江大学也拥有 1 台 Illumina GA2；苏州众信生物技术有限公司拥有 2 台 SOLiD、1 台 Illumina HiSeq 和 1 台 Illumina GA2；苏州生物医药创新中心也拥有 Illumina 的测序仪。

就各测序平台的销售情况而言，Illumina 无疑是最大的赢家，总共售出了 627 台 Genome Analyzer 2 和 367 台 HiSeq 2000。ABI 售出 296 台 SOLiD，而罗氏 454 售出 262 台测序仪。这些数据也与 Frost & Sullivan 的统计结果基本相符，根据 Frost & Sullivan 对 2010 年 NGS 市场份额的统计，Illumina 占 69%，Life Tech 占 16%，Roche 占 15%。

当然，这些数据也不是非常准确，仅供大家参考。据生物通所知，中山大学也有一台 454 的测序仪，而北京毅新实业公司也新引进了 6 台 Illumina GAIIx 测序仪和 2 台 Polonator 测序仪。还有网友提到，同济大学也有一台 GA2 和一台 454。

随着 454 测序仪的读长不断提高，Illumina 和 ABI 相继推出个人化测序仪，而第三代测序仪 PacBio RS 在国内也即将开售，高通量测序仪的竞争将愈加激烈。未来形势将如何发展，让我们拭目以待。（生物通 余亮）



[\(点击这里查看原图\)](#)

赛默飞世尔科技宣布正式完成 对戴安的收购

中国上海，2011年5月17日 -全球科学服务领域的领导者赛默飞世尔科技于2011年5月16日正式宣布，其已成功完成对戴安公司的收购。该项要约收购的截止时间为2011年5月13日（星期五），纽约时间下午七点整。此次收购意味着赛默飞世尔科技将具备行业内最全面的产品及服务的能力，可以为更广泛的应用领域带来更大的价值，这是其作为全球科学服务领域的领导者向前迈出的重要一步！

戴安公司是世界领先的色谱系统制造商和营销商，在离子色谱技术上的优势无可匹敌，其先进的离子色谱解决方案以及在液相色谱和自动样品制备等方面所取得的重大突破使其在全球尤其中国和亚太地区具有广泛影响力。收购后，戴安将成为赛默飞世尔分析技术业务的一部分，与赛默飞世尔在质谱及其它技术领域的领导地位相辅相成，显著加强赛默飞世尔科技的产品及服务的深度、广度和差异化，为客户提供更多全新的价值。

赛默飞世尔科技公司总裁兼首席执行官 **Marc N. Casper** 说：“收购戴安公司与赛默飞世尔的快速发展战略相一致，因为我们能够借此机会提升我们在创新技术研发与新兴市场开拓的能力。两家公司的优势资源结合有助于为我们的客户打造全球领先的色谱仪器、软件、耗材和服务。戴安公司加盟后，我们将进一步提高在环境分析、水测试与食品安全等应用市场的影响力，并且能显著扩大在中国以及其他亚太地区新兴市场的经营规模。”

对于此项收购的成功完成，**Marc N. Casper** 说：“此次收购为所有关键利益攸关方创造价值--客户、员工和股东。我们很高兴地欢迎来自戴安公

司的才华横溢的员工加入我们的团队，他们的加入将进一步拓宽我们满足客户需求的专业知识范围！我们热切期待能与他们共同携手完成我们的使命--致力于帮助我们的客户使世界更健康、更清洁、更安全。”

关于赛默飞世尔科技

赛默飞世尔科技（纽约证交所代码：**TMO**）是科学服务领域的世界领导者。我们致力于帮助我们的客户使世界更健康、更清洁、更安全。公司年销售额接近 **110 亿美元**，拥有员工约 **37000 人**。主要客户类型包括：医药和生物技术公司、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行业。借助于 **Thermo Scientific** 和 **Fisher Scientific** 两个首要品牌，我们将持续技术创新与最便捷的采购方案相结合，为我们的客户、股东和员工创造价值。我们的产品和服务有助于加速科学探索的步伐，帮助客户解决在分析领域所遇到的各种挑战，无论是复杂的研究项目还是常规检测或工业现场应用。欲了解更多信息，请浏览公司网站：www.thermofisher.com，中文：www.thermofisher.cn。