

eppendorf

BIO NEWS

中文版生物资讯 No.8



Real-time PCR without Limits

- Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统成功实现小体积扩增检测
- 评估 384 孔微孔板混匀效率的一种新方法
- Eppendorf 多功能电转仪在薄荷原生质体的体细胞杂交实验中的使用

eppendorf

最新动态

华裔美国科学家荣获 2006 年度 Eppendorf & Science 全球神经生物学奖

Eppendorf 和《Science》杂志在美国亚特兰大市举办的 36 届全球神经生物学学会年会上共同颁发“Eppendorf & Science 神经生物学奖”，2006 年度奖项颁发给了出生于中国的华裔美国科学家 Doris Tsao 博士。



3

AnalyticaChina 2006 慕尼黑上海生化分析展

2006 年 9 月, AnalyticaChina 2006 慕尼黑上海生化分析展在上海隆重开幕。艾本德中国有限公司在会上展示了从实验室常规设备到分子生物学实验设备的全线仪器与耗材。

4

“ep-points 分行中国”积分活动

“ep-points 分行中国”——积分在行动即将开始！您只需登陆艾本德中文网站，心仪礼品等你拿！

5

创 新

Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统 成功实现小体积扩增检测

随着实时荧光定量 PCR 技术的快速发展，定量 PCR 扩增的运行时间和结果的重复性获得了极大地改善。本文通过使用 Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统和 epMotion 5070 自动移液工作站，成功地将 PCR 反应体系降至 5 μ l，比常规 25 μ l 反应体系压缩了近 80% 的成本。同时，增加了实验的通量并保证了实验结果的准确性与重复性。



6-8

实用技巧

实时荧光定量 PCR 实验中试剂的节约

通过对定量 PCR 50 μ l、25 μ l、10 μ l 反应体系所需的试剂成本，借助自动移液工作站，在保证微量体积的精确加样和实验重复性的前提下，使微量体系的应用在真正意义上达到了节省实验成本的效果。

9-10

文献参考

评估 384 孔微孔板混匀效率的一种新方法

本文通过一种量化的手段，利用双染料光度法，对 384 孔板的混匀效率进行了测量和评估，从而避免了用肉眼观察判断混匀效率得出的错误结论。

11-13

文献参考

Thermomixer 舒适型恒温混匀仪 应用于基因微阵列杂交反应中 研究不同探针合成方法对杂交信号强度的影响

本文采用寡核苷酸微阵列技术对黄羽扇豆的 11 个高同源性、编码致病机制相关的 Class 10 (PR-10) 蛋白表达进行了分析，同时进一步用 RT-PCR 的方法对不同的表达水平进行了验证。结果说明可替换的 Thermoblock 片基可以作为一个性价比很好的基因芯片杂交仪，用于标准的自动化的杂交过程。

14-15

基于 Mastercycler ep *realplex* 的梯度 与 Impluse 功能实现 对 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 实验的高效优化

Eppendorf 最新 Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 仪的梯度功能与 Impluse 功能，从仪器的角度高效灵活的促进了 PCR 的优化过程，是 SYBR Green I 染料法荧光定量 PCR 的得力助手。

16-18

Eppendorf 多功能电转仪 在薄荷原生质体的体细胞杂交实验中的使用

本文以薄荷为对象，探讨原生质体融合的最佳参数，我们将富含薄荷醇的品种与一个高产的品种融合，创造一个新的比以往更适合于薄荷醇生产的薄荷品种。实验表明，其融合率达到了 16-27%，同时原生质体的存活率维持在 97%。

19-21

FLIP_L 干扰性小 RNA 促使大肠癌细胞 HT-29 凋亡敏感化

本文使用电穿孔技术将特异性 siRNA 片段转染入体外培养的大肠癌细胞 HT-29，通过半定量 RT-PCR 法判断干扰前后 FLIP_L mRNA 水平的变化，另外通过 AnnexinV 染色法检测干扰前后 HT-29 细胞对 Fas 介导的凋亡敏感性的改变。

22-23

华裔美国科学家荣获 2006 年度 Eppendorf & Science 神经生物学奖

德国汉堡的生物技术公司 Eppendorf 和《Science》杂志在美国亚特兰大市举办的第 36 届全球神经生物学会年会上共同颁发“Eppendorf & Science 神经生物学奖”。



2006 年度的“Eppendorf & Science 神经生物学奖”以及 25,000 美元奖金被授予来自德国不莱梅大学的 Doris Tsao 博士，以表彰她对细胞水平的面孔识别研究的杰出成就。

“Eppendorf & Science 神经生物学奖”是由 Eppendorf 公司赞助的面向全球青年科学家的奖项。参加这个奖项评选的青年科学家需满足两个条件：应用分子生物学和细胞学方法进行神经生物学研究，获得卓越成就；并在最近的 10 年内获得其医学博士或理学博士学位。2006 年年度的获奖者是以《Science》杂志主编 Donald Kennedy 博士为首的杰出评委会从大约 50 名候选人中评选出来的。

颁奖酒会于 2006 年 10 月 16 日在美国乔治亚州亚特兰大市举行，来自科学界及其相关行业的 90 多名嘉宾出席了酒会。《Science》杂志主编 Donald Kennedy 博士和 Eppendorf 公司董事会成员 Michael Schroeder 博士致开幕词，2005 年度的获奖者徐平西博士发表演讲，并向 2006 年度获奖者颁奖。

面孔是提供身份、表情、性别、心情等重大信息的重要来源，除此之外，面孔还具有吸引其他个体注意的作用。Doris Tsao 博士的研究结果阐明了面孔认知的神经基础作用机制。应用功能性核磁共振成像技术，并与无面孔物体进行对比实验，曹博士成功地定位出猕猴大脑中三个对面部认知表现出血流量增加的相关脑区。

此次获奖的论文概述以及颁奖酒会的照片，请登陆网站：

www.eppendorf.com/prize

Doris Tsao 博士介绍：

生于中国常州的 Doris Tsao 博士成长于美国马里兰州 College Park 市，并在哈佛医学院 Margaret Livingstone 博士的实验室里，完成了她的研究生论文：《初级视觉皮层神经元深度调节特性：双眼深度知觉》。



在此之后，Tsao 博士对应用 fMRI（功能性核磁共振成像技术）绘制主要感觉区之外的未知脑区图像的研究产生了浓厚兴趣，并与 Roger Tootell 共同绘制出猕猴大脑中与深度知觉和面部认知的相关脑区图像。并于 2002 年获得其博士学位。

2004 年德国洪堡基金会授予 Tsao 博士 Sofja Kovalevskaya 奖项，凭借这笔奖金，Tsao 博士在德国不莱梅大学创建了自己的实验室，从事揭示 2 毫米厚度的大脑细胞皮层如何构建 3 维图像并轻易识别其中的多种物体的科学研究。



AnalyticaChina 2006 慕尼黑上海生化分析展

在德国慕尼黑举办的 Analytica 是全球领先的仪器分析、生化技术、诊断和实验室技术博览会。德国慕尼黑国际博览集团已在 2002 年成功的把该展会的理念引入到中国市场。

2006 年 8 月 14-15 日,在媒体的大力支持下,AnalyticaChina 2006 慕尼黑上海生化分析展主办方邀请行业内领先展商的高层管理人员,分别在上海、北京举行 AnalyticaChina 2006 展前媒体见面会,艾本德中国有限公司市场部经理马青女士亲自到场发表讲话,并展示了即将在 AnalyticaChina 2006 展出的最新产品和技术。



2006 年 9 月 19-21 日,AnalyticaChina 2006 慕尼黑上海生化分析展在上海新国际博览中心隆重开幕。参展商来自 18 个国家,数量达到 270 家,其中半数以上来自中国以外的国家,来自德国的厂商有近 40 家,在国际展商中居首位。

此次盛会吸引了来自 58 个国家和地区的 8,557 名专业观众到场参加,囊括了教学科研、生物医药、食品、环境资源、能源石化、化学与化工、医疗与临床化学、检验检疫、疾病控制等各个领域。



在会上,作为独立展商的艾本德中国有限公司展示了从实验室常规设备到分子生物学实验设备的全线仪器与耗材,包括 2006 年全球同步上市的 Eppendorf Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统、MixMate 混匀小精灵、Multipette stream/Xstream 电动分液器等全新产品。

展会现场人头攒动,反响热烈,参会观众纷纷在 Eppendorf 展位前驻足,与工作人员就 Eppendorf 产品技术和应用等方面进行积极交流。独创的耗材糖果架也吸引了众多观众现场免费领取 Eppendorf 试用耗材,亲身体验其安全性与稳定性的可靠保证。

Eppendorf 产品经理孙伟伟女士在展商论坛上发表演讲,以“High-speed and accurate real-time PCR — made by Eppendorf”为题,运用领先的定量 PCR 技术与翔实的实验数据,详细介绍了 Eppendorf 实时荧光定量 PCR 系统的最新应用,并以其先进的实时荧光 PCR 硬件技术与灵活独特的设计理念,吸引了众多与会者的注意。



“ep-points 分行中国”积分活动

ep-points 分行中国——积分在行动活动即将开始！

“ep-points 分行中国”——积分在行动即将开始！

您只需登陆：www.ep-points.com

输入移液器和耗材包装盒内的标签编码，

心仪礼品等你拿！

敬请留意近期艾本德中文网站：www.ependorf.cn，

“ep-points 分行中国”积分活动即将正式启动！

什么是“ep-points 分行中国”？

ep-points 积分奖励活动是德国艾本德股份公司推出的一项免费参与的活动，您可以通过购买艾本德产品（移液器及耗材）累积 ep-points 积分来换取您想要得到的礼品。现在 ep-points 来到中国，有了自己的中文名“分行中国”。

在您得到公司授予的客户个人帐号后，您就可以加入积分换礼品的活动，所有的操作都将通过互联网进行，“ep-points 分行中国”将带给您灵活、便利、趣味的活动体验。

如何获得“ep-points 分行中国”积分？

首次注册

登陆 www.ep-points.com 进行注册

点击“注册”

根据提示，选择所在的国家和使用语言

完整填写注册表，并同意接受 ep-points 条款

点击“发送”

完成注册

完成注册后，您就轻松拥有了 50 个 ep-points 积分！

TIPS: 前 2000 名成功注册者，获赠精美小礼物！

积分获得及输入

购买艾本德产品（移液器及耗材）

登陆 www.ep-points.com 您的个人账号

撕下粘附在产品包装盒内的 ep-points 标签

输入标签背面的十位编码

您的个人账号中将获得相应积分

TIPS: 活动正式开始的前三个月，只需输入产品编码，立即获得双倍积分！



如何用“ep-points 分行中国”积分换取礼物？

丰厚的礼物

值得信赖的 Eppendorf 产品

方便实用的实验办公用品

超酷至 in 的个人休闲娱乐用品

详细礼品目录及相应兑换积分请登录：

www.ep-points.com 查询

礼品兑换

登陆您在 www.ep-points.com 的个人账号

直接进入“礼物兑换”目录，任意挑选您心仪的礼物，

放进购物车

再次确认您的收件地址

点击发送订单

六周内您将收到礼物

礼物就这么便捷的送到您的手里！

我们期待您的参与！

在“ep-points 分行中国”中体验无穷乐趣！

友情提示：在注册后 12 个月内没有获得任何产品积分，您的个人帐号将被取消。

Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统 成功实现小体积扩增检测

摘要

近来,随着荧光定量 PCR 技术的快速发展,极大地改善了定量扩增的运行时间和结果重复性。本文的研究涉及,使用 Eppendorf Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统实现小体积扩增检测,并评估结果的重复性。

前言

由于基因组学的研究成本昂贵,通过尽可能减少试剂的用量来降低成本就显得尤其必要。在定量 PCR 技术的运行成本中很重要的一块试剂消耗就是 MasterMix,它包括 dNTP、PCR 酶、镁离子和稳定剂。此外,另一块重要的组成就是反应模板,这些用于扩增的 DNA 或 RNA,购买非常昂贵,自己制备与纯化过程非常耗时且批间差异大。如此算来,25 μ l 的反应体系已经非常奢侈了。当然,我们还需要考虑降低定量 PCR 结果的变异性,这些往往是由于操作者的移液操作误差所造成,也正因为此,引入全自动移液工作站可以很好地改善 PCR 结果的重复性。

在保持反应体系中各组成浓度相同的前提下,减小反应体系的体积不失为减少试剂用量、降低成本的好办法。然而,小体积的反应体系也会引起许多问题,这些问题都会直接导致 PCR 反应效率降低,极大影响 PCR 定量的质量。其中,挑战最大的莫过于小体积很容易造成 PCR 反应孔壁上挂液与蒸发,导致反应体系间试剂浓度变异。为了克服移液误差造成的体积变异,可以使用 ROX 校准染料。可是,由于小体积体系中发生蒸发是无法控制的,每批蒸发程度的重复性也无法控制,因而 ROX 是无法补偿这类原因造成的关键因子的浓度变异。另外,仪器运行定量 PCR 实验一般需 1 个半到 2 个小时,其间的蒸发现象是无法根除的。鉴于实验时间越长热量的吸收越大,小体积扩增时必须运行尽量短的时间。

方法与材料

实时荧光定量 PCR 实验

所有实验都在 Eppendorf Mastercycler ep *realplex* S 实时荧光定量 PCR 系统银制模块上运行, RealMasterMix 含酶预混液、SYBR Green I 与引物对用于扩增检测 *-actin*、两个小鼠基因及 LamdaDNA 104 bp 片段; RealMasterMix Probe 含酶预混液、引物对、标记有 Cal Fluor Gold 540 与黑洞淬灭染料的探针 (Biosearch Technologies) 用于扩增检测 DNA。所有反应的液体操作均在 Eppendorf ep*Motion* 5070 自动移液系统上完成,分液至 Eppendorf twin.tec 96 孔 PCR 板,使用 Eppendorf 热封膜与热封仪封板。对照组选用的是 20 μ l 反应体系。



Eppendorf 最新推出 Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统用于广大科研市场,本文数据来自于三个小鼠基因与 LamdaDNA,使用 SYBR Green I 染料和 TaqMan 探针,5 μ l 反应体系。

Eppendorf ep*Motion* 5070 自动移液系统,已经在科研与制药业实验室用于小体积液体准备,以增加实验通量与降低成本。由于自动移液系统很好控制了移液的随机误差,所以保障了实验的准确与重复性。

本文的实验设计,将自动移液系统与灵敏、快速的实时荧光定量 PCR 系统结合,成功实现 5 μ l 小体积扩增检测,此外,与更大体积的体系相比,PCR 效率与相关性基本一致。

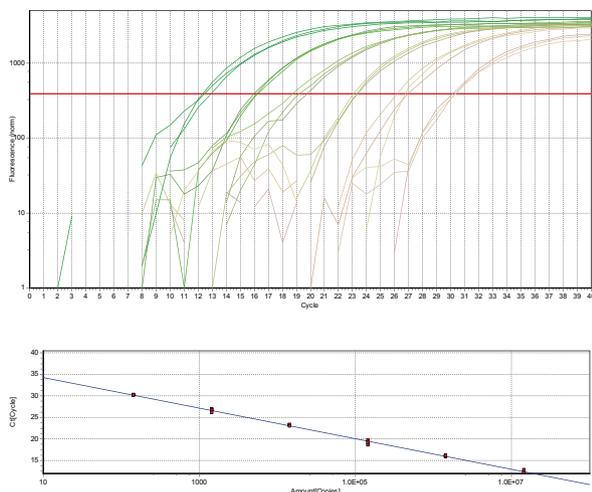


图 1：CAL FLUOR Gold 540 标记的 TaqMan 探针分析

上方图示：每孔 5 μl 反应体系定量 PCR 扩增重复性。扩增目的片段为 DNA 104 bp 片段。模板 DNA (Promega) 进行连续 10 倍稀释，反应体系采用 Eppendorf RealMasterMix 含酶预混液，正向与反向引物终浓度取 400 nM，CFG450/BHQ-1 标记的探针终浓度取 400 nM，50 个循环，运行 43 分钟。

下方图示：根据上方 TaqMan 探针分析生成标准曲线

结果：斜率 = - 3.552，Y 轴截距 = 37.89，
扩增效率 = 0.91，相关系数 = 0.998

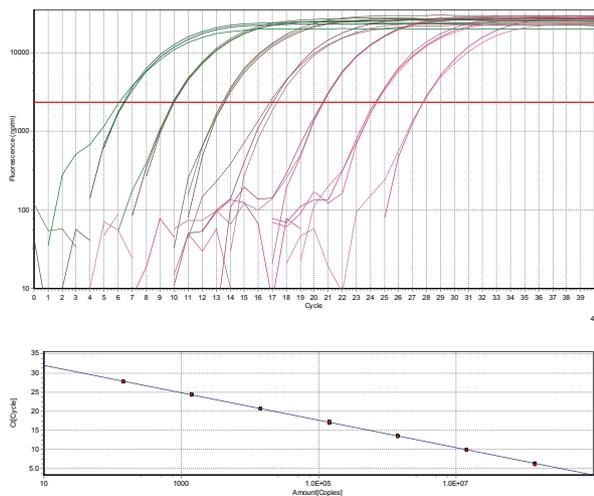


图 2：SYBR Green I 定量分析

上方图示：每孔 5 μl 反应体系定量 PCR 扩增重复性。扩增目的片段为 DNA 104 bp 片段。模板 DNA (Promega) 进行连续 10 倍稀释，反应体系采用 Eppendorf RealMasterMix 含酶、SYBR Green I 预混液，正向与反向引物终浓度取 400 nM，50 个循环，运行 43 分钟。

下方图示：根据上方 SYBR Green I 分析生成标准曲线

结果：斜率 = - 3.591，Y 轴截距 = 35.61，
扩增效率 = 0.90，相关系数 = 1.000

反应液体准备 —— SYBR Green I 分析

每个定量 PCR 反应均运行三重管，用做模板的人基因进行三级倍比稀释，最小到 142.5 拷贝。PCR 热程序为初始变性 2 分钟，接着两步法 95 变性与 60 退火延伸，40 个循环。

CAL FLUOR Gold 540 标记的 TaqMan 探针分析模板 DNA (Promega) 进行连续 10 倍稀释，从 1.42×10^7 到 142.5 拷贝。PCR 热程序为初始变性 2 分钟，接着两步法 95 变性与 60 退火延伸，40 个循环。

结果

TaqMan 探针 5 μl 体系定量分析，标准曲线线性范围跨越 6 个数量级。在同样 5 μl 小体系 SYBR Green I 分析中，无模板对照扩增管出现了引物二聚体（未显示熔解曲线），由于 SYBR Green I 自身本底的干扰，对单拷贝模板的定量并不可靠，但是，标准曲线线性范围跨越 7 个数量级，最小至 14 拷贝。

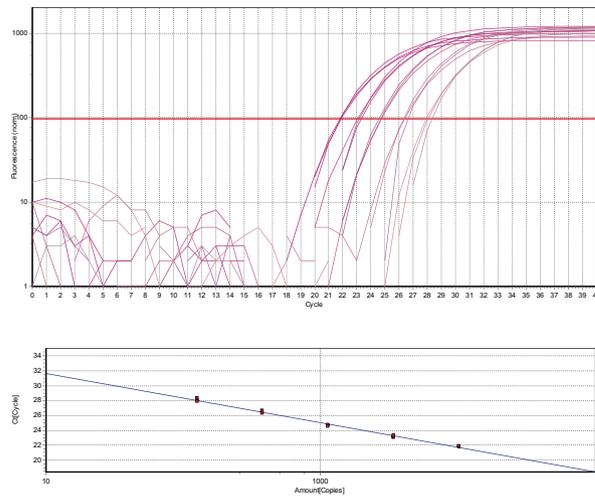


图 3：SYBR Green I 定量分析

上方图示：每孔 5 μl 反应体系定量 PCR 扩增重复性。扩增目的片段为 G469 bp 片段。模板小鼠基因组 DNA (Promega) 进行 3 级 10 倍稀释，反应体系采用 Eppendorf RealMasterMix 含酶、SYBR Green I 预混液，正向与反向引物终浓度取 300 nM，45 个循环，运行 41 分钟。

下方图示：根据上方 SYBR Green I 分析生成标准曲线

结果：斜率 = - 3.309，Y 轴截距 = 34.96，
扩增效率 = 1.01，相关系数 = 0.994

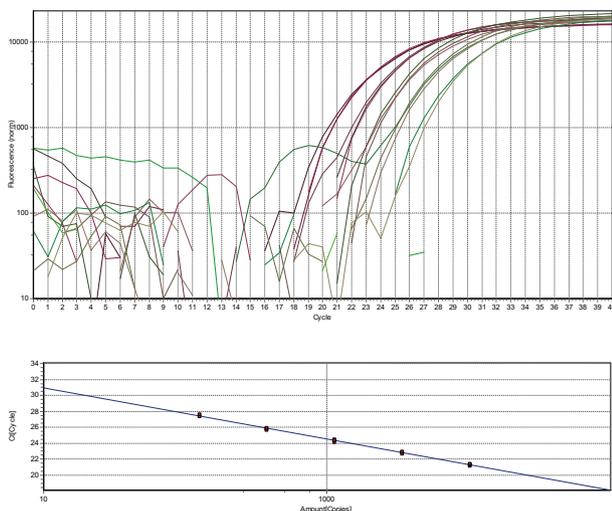


图 4：SYBR Green I 定量分析

上方图示：每孔 5 μ l 反应体系定量 PCR 扩增重复性。扩增目的片段为 G171 bp 片段。模板小鼠基因组 DNA (Promega) 进行 3 级 10 倍稀释，反应体系采用 Eppendorf RealMasterMix 含酶、SYBR Green I 预混液，正向与反向引物终浓度取 300 nM，45 个循环，运行 41 分钟。

阈值：1568 (系统设置)

基线：自动

漂移校正：关闭

下方图示：根据上方 SYBR Green I 分析生成标准曲线

结果：斜率 = -3.207, Y 轴截距 =34.13, 扩增效率 = 1.05, 相关系数 =0.996

基线：自动

漂移校正：关闭

小结

通过与 20 μ l 反应体系 (未显示) 的对比, 5 μ l 小反应体系扩增的效率与相关系数与之相当。虽然, 蒸发是小反应体系扩增最大的挑战, 但 Eppendorf 银制超速模块却很好地克服了这个难题。它可以在 25 分钟内完成 40 个循环, 而原来同样的循环可能需要 40 分钟。

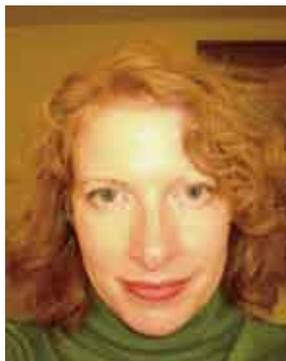
Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统实现的热传导是基于拥有专利的“三组回路”技术, 它意味着有六块 peltier 元件在模块内部精确温控。另外, 用于荧光激发的 96 个 LED 光源直接位于反应模块的上方, 保证每一孔都最大、最一致的激发。市面上很多定量 PCR 仪的光源采用的都是白炽灯位于反应模块正中的上方, 对于普通 25 μ l 反应体系很容易发生由距离因素造成的荧光激发 / 检测的“边缘”效应。当将反应体系降到 5 μ l 这样的小反应体系时, 边缘效应所造成的危害将更为显著, 影响结果的一致性。

为了保证有效地捕捉荧光信号, Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统采用 96 个光纤同步采集信号并传送至通道式光电倍增管, 这是目前最灵敏的荧光检测器。

我们有理由相信, 5 μ l 小反应体系定量扩增获得如此满意的重复性, 在很大程度上得益于 Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统优秀的光路设计、灵敏的荧光检测和均匀的热传导。此外, 缩短了运行时间也很好解决了样品蒸发的难题。

通过使用 Eppendorf epMotion 5070 自动移液工作站完成液体准备工作, 加上 Mastercycler ep *realplex* 荧光定量 PCR 系统优异的性能, 成功地将定量 PCR 的反应体系降至 5 μ l 小体积。比常规的 25 μ l 体系压缩了将近 80%。这将意味着试剂成本实实在在的降低。

当我们需要操作高通量基因表达分析时, 压缩试剂成本带来的好处是显而易见的, 另外, 由于 Eppendorf 银制超速模块可以在 25 分钟内完成 40 个循环, 使实验时间也大幅压缩。因而, Eppendorf epMotion 5070 自动移液工作站与 Mastercycler ep *realplex* 实时荧光定量 PCR 系统的组合是您从事定量 PCR 研究省时、省钱的选择。



作者 Cynthia Potter,
Eppendorf UK,
Cambridge



作者 Arun Kumar, Ph.D.,
Eppendorf North America,
Westbury, N.Y.

实时荧光定量 PCR 实验中试剂的节约

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

使用自动加样系统，如 epMotion® 自动移液工作站，进行精确的微量液体操作，可以最大限度地减少 PCR 反应试剂量，从而最大程度地节省实验开支。

实时荧光定量 PCR 的试剂成本

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

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



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

表 1：不同 PCR 反应体系下实验的平均成本

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

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

大部分使用者都会采用 20 μ l 或 25 μ l 的反应体系以减少支出，但是通过继续减少反应体积，仍有潜在的可以节约的空间（表 1）。

尽管利用 PCR 系统使用 20 μ l 或 25 μ l 的反应体系，并没有完全挖掘出潜在的节省空间，但是在此基础上进一步减少用量将变得非常困难，原因是试剂量的减少对移液精度的要求也更高了。

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

自动移液系统实现试剂的节约

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

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

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

定量 PCR 反应时间的加速

利用较小的反应体系进行实时荧光定量 PCR 不仅减少了实验支出，而且加快了反应速度。当与快速而精确的实时荧光定量 PCR 系统，如 Eppendorf 的 Mastercycler® ep realplex 配套使用时，设定 10 µl 的反应体系可以使两步法的定量 PCR 反应时间降为 24 分钟。同时，重复样本的标准偏差分析显示，实验的重复性和精确性都大大提高了。

更多信息

我们的网站：www.epmotion.com 将提供给您详细的 epMotion 应用及附件方面的信息。

此外，您可以通过 www.save-reagents.com 网站计算您自己的实时荧光定量 PCR 反应试剂的节省量。

专注于其他方面

除了节约成本，使用自动移液工作站还有更多好处，例如：

减少手工操作带来的移液误差，从而获得更为可靠的分析数据

实验具高度重复性，即使使用者不相同

有更多的时间来完成其他任务，如对实验结果的评估

因为自动化的操作，使用者可以腾出更多的时间来专注于其他方面，从而有了更多的个人空间。

广泛的应用

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

样品从试管到多孔板的转移

梯度稀释

ELISA 和以细胞为基础的实验制备

96 和 384 孔板的液体分装、转板、拼板等

高通量核酸抽提与纯化

作者 HOLGER EGGERT,
EPPENDORF AG



评估 384 孔微孔板混匀效率的一种新方法

概述

对于 384 微孔板的格局来说,想要得到最佳的混匀效果是比较难的。通常混匀效率都是通过肉眼观察来确定。我们的研究认为,这种主观的定性的测定方法,往往不能得出最佳的结果,甚至得到错误的结论。因此,我们提出一种量化的手段,利用双染料光度法,使得用户可以对混匀设备进行混匀效率的测定。

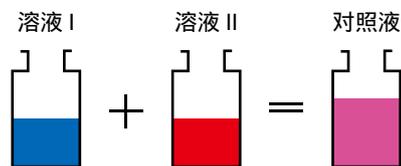
为了测定最理想的混匀状态,需要在测试孔板内分别加入两种溶液,然后进行预定的混匀程序。另外使用预先混匀的溶液作为对照液来剔除非混匀因素带来的偏差。通过测定两种溶液的平均吸光率、标准偏差和变异系数(CV),计算多次混匀的数据结果,就可得到混匀效率的数据。我们采用上述的新测量方法,测定了 384 孔微孔板中未被混匀和完全混匀后的数据。



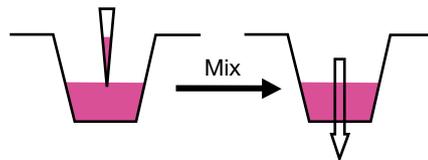
方法

对照液

向测定板的一部分孔内加入 55 μl 预先混匀的对照液。此对照液是在分配到测定板之前就混匀好的。包含两种染料,与测试溶液的浓度相同。由于两种溶液的蓝色染料浓度是一样的,所以可以以此作为参照。

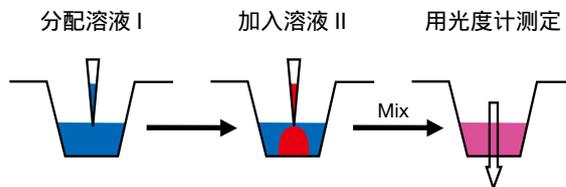


分配预混合的对照液 用光度计测定



样本

往一部分测试孔内加入 53 μl 的溶液 I
使用多通道吸液管吸取 2 μl 的溶液 II, 加入到已有 53 μl 溶液 I 的孔内
在测试板上剩余的孔内加入 55 μl 的溶液 I, 保证混匀过程中孔板平衡
分别测试溶液的初始 / 混匀前吸光度, 在表格上对应为“测试 0”点的值



目的

论证用肉眼观察来判断混匀效率是不够的
推荐一种通过双染料光度法来量化混匀效率的方法
介绍该方法及相关试验数据, 在某种意义上可用于混匀器及工程样机在实验环境下的混匀效率的测定

材料

溶液 I (MVS® Diluent, ARTEL), 含有不挥发的已知浓度的蓝色染料
溶液 II (MVS® Range C, ARTEL), 除含有与溶液 I 相同浓度的蓝色染料外还含有已知浓度的红色染料
用于测量在 520 nm & 730 nm 的吸光率的平板读取器 (Bio-Tek, ELx800nb)
384 孔平底、未处理的黑色聚苯乙烯测定板 (Corning, #3711)

测定完初始值后，将该测试板放置在需要测试的混匀设备上运行预先设定好的混匀程序。当混匀停止后重新测定一次。为混匀/测定的一个过程设定一个测试序号。

每次需测定两个波长段下的平均吸光度、计算每个测试孔和对照孔标准偏差和变异系数（CV）。这种分析包含了两种溶液中以对照液的形式体现的参照标准。因此该数据可以反映出混匀器或混匀程序的混匀效率。

因为对照液在被分配到微孔板内之前已经被混匀，所以平均吸光率和 CV 值在多次的测试中都将基本稳定在同一水平。对照液的数据会由于客观存在的损耗（比如蒸发和洒出）而产生变化。所以并不需要苛求最后测出的对照液和样品的吸光率能保持在某个点上不发生变化。

加了溶液 II 的测试孔内的最初平均吸光度和 CV 数值跟对照液相比通常差距会很大（尽管用肉眼观察与对照液的差距可能很小）。这是由于溶液 II 中的红色染料集中于管中心的缘故。混匀后，测量值将会有新的变化。因为红色染料通过混匀均匀分散，所以吸光率将改变，而 CV 值是相对离散度的体现，所以将减小。如果两种溶液已经达到最佳混匀状态，再次混匀，溶液的吸光度也不会产生明显改变。

某些情况下，所设定的混匀参数并不能通过一次混匀就达到最佳混匀效果。用肉眼判断可能觉得已经完全混匀，然而，继续混匀后测量值可能改变较大，说明通过肉眼判断是不可靠的。每次的重复混匀操作后，测量值可能变化或保持不变。当测量值不再变化时就说明已达到最佳混匀效果。

示例

未完全混匀

使用前文所述的方法，测定某混匀器的最佳混匀状态

该方法中的混匀参数（60 s 混匀时间，混匀频率为 3,100 rpm）是随意选择的

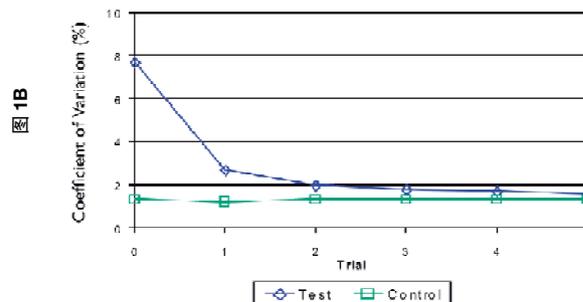
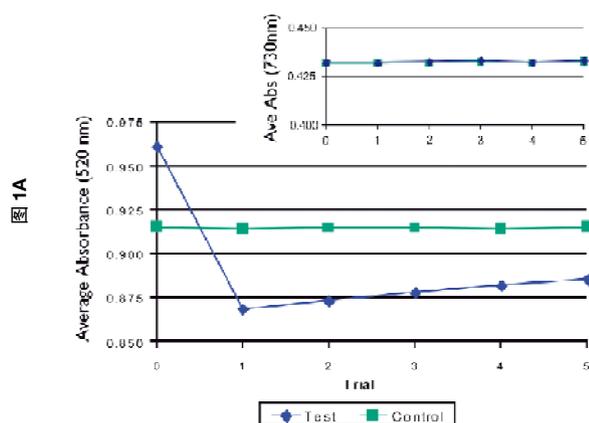
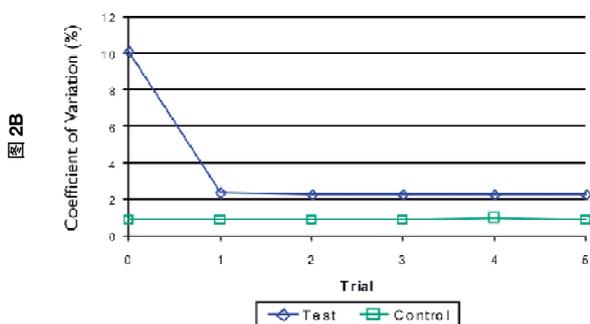
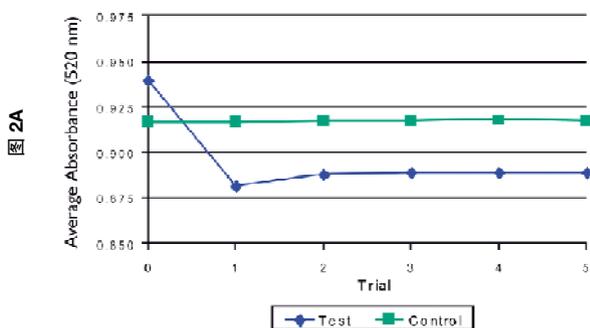


图 1A 中，在每次混匀步骤后的测试点得到的测试孔的平均吸光率最后没有达到一个稳定的数值。图 1B 中显示的是 CV 数据曲线，在一次的测试中 CV 值持续减小，但是经过五次混匀最后仍然没有趋于稳定。这说明溶液还未达到最佳混匀状态。

插在图 1A 中的那组 730 nm 的数据，给出了理想化的测试液和对照液的曲线（两根线重叠在一起）。平坦的平均吸光率曲线说明溶液在分配到测试板时的操作非常完美。另外，也说明了测试溶液没有受到其他因素的影响（比如泼洒、液面变化、气泡导致的移液不均等）。

完全混匀

根据第一次实验的结果,对同一混匀设备进行了第二次测试,在这次测试中,混匀频率被提高到 3,750 rpm



在图 2A 中,平均吸光率的数值在第二次混匀后基本达到稳定状态。对照液的值在几次混匀中都没有变化。图 2B 中 CV 值也达到一个稳定的水平。这说明两种溶液在该混匀设备及该条件下经过两次混匀后达到了最佳的混匀状态。

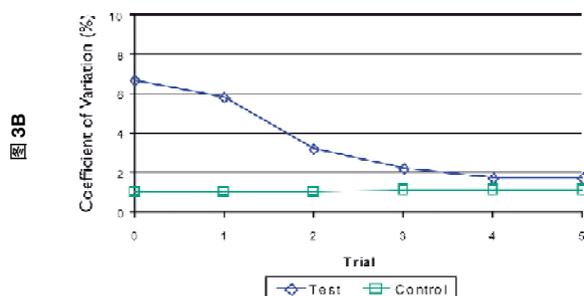
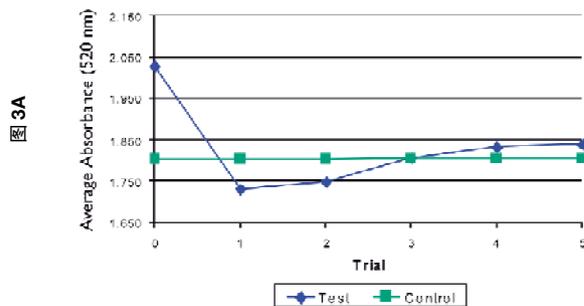
混匀效率

Eppendorf MixMate 混匀小精灵

测试“384”按键内置的标准混匀参数,混匀时间 15 秒,混匀速率 2,000 rpm。

对照液孔数: 48, 测试液孔数: 64。

平均孔板重量 ~ 88g。



Eppendorf MixMate 混匀小精灵在预议的参数下达到了稳定数值(图 3A,3B)。

通过目测判断, MixMate 混匀小精灵在三次混匀后,溶液达到最佳混匀效果。而通过光度计测定,则在经过四次混匀后达到最佳混匀效果。

在以上预置参数下, MixMate 经过四次混匀(60 秒)达到最佳混匀效果。因此,可以设定时间参数为 60 秒,就可确保溶液被充分混匀。

结论

以上讨论的方法通过量化试验对混匀效率进行测量和评价。这种方法相对于广泛使用的目测或者高速摄影来判断混匀效率的常规方法来说是一种提高。对照液的引入可以记录其他非混匀因素的影响。此外,内部参照物(蓝色染料)在样品和对照液中同时存在,可由此计算影响测量结果的因素。比如气泡的破裂会改变光程长度,溶液溅出造成的损耗和液柱的弯液面的变化。内部参照物的引入可以通过分析修正和消除这些混匀过程中的影响。

虽然本次试验仅针对 384 孔板,但是该方法对于 96 孔和 1536 孔的孔板同样适用。此外,该方法也可用于测定带有自动移液器的混匀标准程序以及倍比稀释分析法的混匀效率。总而言之,如果没有彻底有效地混匀,试验方案及仪器就可能产生不正确的试验结果。而前面所介绍的这种方法提供了量化的指标保证了实验结果的可信度及完整性。

作者 BENJAMIN W. SPAULDING
JOHN THOMAS BRADSHAW
ALEXIS L. ROGERS

Thermomixer 舒适型恒温混匀仪

应用于基因微阵列杂交反应中

研究不同探针合成方法对杂交信号强度的影响

示例

寡核苷酸基因微阵列和 cDNA 微阵列是现代分子生物学研究中基因表达分析最为有力的研究工具之一^[1]。在化学修饰的玻璃片基上结合了高密度的 DNA 探针矩阵，通过与荧光分子标记的 cDNA 或 cRNA 的杂交，微阵列技术可以在一次实验中同时对几千个基因的表达状况进行分析。微阵列的制备和扫描检测需要特殊的设备，而探针的杂交反应通常在一个用盖玻片封住，并浸入装有水的 50 ml 试管中，放入水浴或孵育箱进行杂交。这种方法常常由于混匀不够充分而无法保证结果的重复性和检测的灵敏度，而且还需要额外添加甲酰胺来防止杂交缓冲液的蒸干。

本文中，我们采用寡核苷酸微阵列技术对黄羽扇豆的 11 个高同源性，编码致病机制相关的 class 10 (PR-10) 蛋白表达

进行了分析^[2]。我们早期的研究发现有一些 PR-10 的同源蛋白的表达调节源于环境的胁迫性，例如致病菌的侵入、损伤或外源植物激素的影响。微阵列技术的应用对 PR-10 基因的表达谱研究是极为有力的工具，它可以快速的鉴别出不同个体在各种不同的胁迫因子影响下发生的表达调节变化。这项研究工作的目的在于对待研究的样本制备的实验流程进行优化。

我们采用了两种不同的引物延伸方法来合成双链 cDNA：方法 A，通过 Oligo(dT) 和 5' 端通用引物来合成所有的 cDNA；方法 B，通过 PR-10 特异性引物和 Oligo(dT) 选择性扩增 PR-10 的同源基因的 cDNA。然后制备生物素标记的 cRNA 探针，用于微阵列的杂交。

材料和方法

微阵列的制备

我们合成了 42 个来自于黄羽扇豆，针对 11 个 PR-10 基因和 6 个对照基因的 28 bp 的特异性寡核苷酸探针，通过基因芯片点样仪 Spot-Array 24 (PerkinElmer® Life and Analytical Sciences, Wellesley, MA, USA) 将探针以 8 个重复拷贝制备于 SCHOTT Nexterion® Slides E 片基上 (Schott, Jena, Germany)

经过复水化处理后，探针被固定 (30 min, 120 °C)，在室温下用缓冲液 (0.1% Triton X-100 (5 min), 1 mM HCl (2 x 2 min), 100 mM KCl) 依次洗涤。

然后，根据片基制造商的说明书建议，将微阵列置入 Nexterion Blocking 溶液中 50 °C 孵育 15 min，再用水在杂交前冲洗。

待测样品的标记

用 Chomczynski 和 Sacchi 方法^[3]从 4 周龄的黄羽扇豆叶片提取总 RNA，用 2M LiCl 选择性 RNA 沉淀进行富集。用两套不同的引物反转录合成双链 cDNA，(A) 两个通用引物^[4]；(B) 一个 Oligo(dT) 引物和序列特异性正向引物。

特异性的正向引物已经经过了前期的 PCR 证实。然后根据 Affymetrix 说明书的流程，用 GeneChip® Expression 3'

IVT 扩增试剂 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) 通过体外转录标记合成 cRNA。

杂交

将 cRNA 经片段化处理后，将生物素标记的 cRNA 溶解于 900 μl 杂交缓冲液中 (2x MES, 94.5 μg BSA, 79.2 μg 鲑精 DNA)，加入杂交小室 (Whatman Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA) 内。

杂交过程在 Eppendorf Thermomixer comfort 舒适型混匀仪的可替换式 Thermoblock 片基杂交模块 (图 1) 中在 45 °C 下进行 16 个小时，同时以 500 rpm 进行振荡混匀。为了保持适当的湿度环境，将 Thermoblock 模块的垫片用去离子水润湿，置入模块的内腔中。



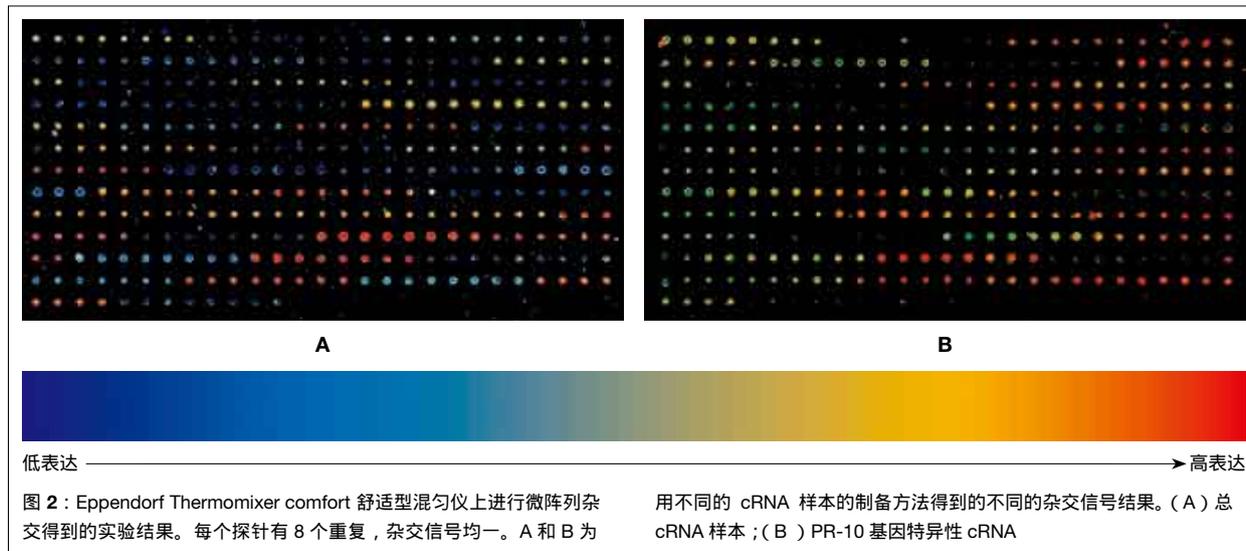
图 1：在 Thermomixer comfort 舒适型混匀仪上进行微阵列杂交。

免疫化学检测

杂交结束后, 根据 Affymetrix 的实验方法^[5], 用含有 Cy3 标记的链霉亲和素溶液对微阵列进行反复的洗涤和孵育。

数据的扫描和分析

在 ScanArray[®] Express 基因芯片扫描仪 (PerkinElmer[®] Life and Analytical Sciences) 对干燥后的微阵列进行扫描, 用 ScanArray Express 软件对数据进行适应性圆周量化 (Adaptive Circle quantification) 和分析。



结果和讨论

在实验 A 中, 由于 cDNA 的合成是来自于 Oligo(dT) 和通用引物, PR-10 转录子与待测样本组织中的所有 mRNA 同时被进行了反转录 (尽管这些 PR-10 转录子以外的基因表达我们并没有进行这方面的检测)。而在实验 B 中, 只有很小一部分 PR-10 特异性的 cDNA 被合成。总 cRNA 样本 (A) 和 PR-10 基因特异性 cRNA (B) 在同一张微阵列上进行了杂交和检测。

尽管在这两个实验中在微阵列上都得到了杂交信号, 但比较而言, 方法 B 的灵敏度更高 (图 2)。在实验 B 中, 比较实验 A 中总 cRNA 的使用量, 用于杂交的 cRNA 量不到实验 A 的十分之一, 但微阵列的杂交信号强度却远高于实验 A 的结果。

进一步用 RT-PCR 的方法对高同源性的 PR-10 基因的不同表达水平进行了验证 (数据未在此列出)。我们确信, 这种针对性的微阵列将会是一个非常有用的研究工具, 用于鉴别这类及其相似的 PR-10 多基因家族成员。我们也相信, 对各种致病性相关基因的表达谱分析将对分子诊断产生帮助, 如鉴定和识别各种不同类型的植物致病菌、细菌、真菌和病毒。

而且, 在微阵列的杂交结果中, 每一个探针的杂交信号点都可比较, 本底信号低, 分布均匀。在杂交过程中, 没有发现

杂交缓冲液挥发干的现象, 这说明可替换式 Thermoblock 片基可以做为一个性价比很好的基因芯片杂交仪, 用于标准的自动化的杂交过程, 操作简便, 而且能保证高质量的实验数据。

参考文献

- [1] Aharoni, A., Vorst, O., DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Mol. Biol.* 48: 99-118, 2001
- [2] Handschuh, L., Femiak, I., Kasperska, A., Sikorski, M.M., Pathogenesis-related proteins of subclass PR-10.2 in yellow lupine – comprehensive analysis. *Proceedings of the XIIth International Congress on "Genes, Gene Families and Isozymes"*, Berlin 2003
- [3] Chomczynski, P., Sacchi, N., Singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159, 1987
- [4] Ji W., Zhou W., Gregg K., Lindpaintner K., Davies S., A method for gene expression analysis by oligonucleotide arrays from minute biological materials. *Anal. Biochem.* 331: 329-339, 2004
- [5] Affymetrix Inc. *GeneChip Expression Analysis, Technical Manual*

作者 Luiza Handschuh,
Agnieszka Żmieńko, Wiesława Włoszczak,
Michał M. Sikorski & Marek Figlerowicz;
Institute of Bioorganic Chemistry,
Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

基于 Mastercycler ep *realplex* 的梯度 与 Impluse 功能实现 对 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 实验的高效优化

摘要

众所周知，目前实时荧光定量 PCR 实验设计主要分为探针法与 SYBR Green I 染料法。当选择探针法时，能检测 PCR 中的特异性扩增产物，而不受非特异性扩增产物的影响，因而被广泛应用于 mRNA 和以 RNA 为基因组的病原体的定量。一条有效的荧光探针需要具备很高的保守性、合适的 GC 含量和长度、以及合适的熔解温度 (T_m)，这使探针设计的难度极大提高。另外，探针合成的费用昂贵，并且还需要针对不同的基因来设计不同的探针，因而在一定程度上限制了特异性探针的使用。

与荧光探针不同，SYBR Green I 是一种双链 DNA 结合染料，只要有合适的引物与模板，SYBR Green I 可以实现任何目的基因的实时定量。但是，SYBR Green I 对双链 DNA 的结合是非特异性的，因此，PCR 中的非特异扩增产物，特别是引物二聚体，就会产生荧光信号并严重干扰对目的基因的定量。这也就是为什么对 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 实验体系尤其需要优化的原因。

实现对 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 实验的高效优化在本质上就是努力提高 PCR 反应的特异性，Eppendorf 最新 Mastercycler ep *realplex* 荧光定量 PCR 仪的梯度功能与 Impluse 功能，从仪器的角度高效灵活的促进 PCR 的优化过程，是 SYBR Green I 染料法荧光定量 PCR 的得力助手。

Mastercycler ep *realplex* 的与 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 实验的优化

如何正确地选择引物的退火温度对于 PCR 反应的结果与效率至关重要。一直以来，虽然有许多软件提供各式算法去估计该温度值，但是在现实的实验中能否精准地确定该参数却是随机的。

Mastercycler ep *realplex* 的梯度功能旨在 96 孔 PCR 样品槽上按 12 列的方式提供一个相对宽的温控范围，即最多可

以在一次 PCR 反应中实现 12 种不同的温度。如果你选择的是 Mastercycler ep *realplex* 铝制样品槽，梯度温控范围为 1-20，如果是银制样品槽，梯度温控范围为 1-24。

为了展示 Mastercycler ep *realplex* 的梯度功能的易用性，更重要的是显示其对 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 实验优化的重要性，我们用实验进行验证。

应用梯度功能的荧光定量 PCR 实验方案

准备包括 RealMasterMix 荧光定量 PCR 试剂、SYBR Green I 与引物的反应体系，用于扩增 球蛋白基因序列片段。在 Mastercycler ep *realplex* 银制的样品槽上设定梯度退火温度，温控范围 24 (44-68) 见图 1，PCR 程序为：95 2 分钟预变性，三步 95 15 秒、44-68 30 秒、68 60 秒 循环 40 次，反应结束后加熔解曲线分析。

对于梯度设定的 12 种不同的退火温度，每个温度条件下准备三个重复管，每管加 5 ng 人基因组 DNA 作为模板，并准备一个空白对照 (NTC)。

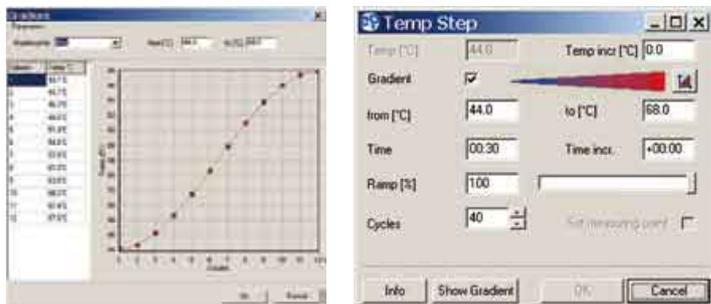


图 1: 在 Mastercycler ep realplex 软件上设定梯度退火温度梯度功能在 96 孔 PCR 样品槽上按 12 列的方式显示一个连续变温范围，并符合三组回路的技术特点

Well position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Annealing temperature (°C):	44.1	44.7	46.2	48.6	51.4	54.6	57.8	61.0	63.8	66.0	67.4	67.8
Mean C_t :	28.5	28.7	28.1	26.9	25.6	25.0	24.3	24.1	24.0	23.9	24.1	24.4
Specific PCR product:	-	-	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nonspecific PCR product:	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-

表 1: 对于梯度设定的 12 种不同的退火温度，分析对应反应体系的参数

实验结果与讨论

对照图 3 的熔解曲线分析结果，退火温度低于 48.6（对应样品槽上的第 1-3 列位置）的实验体系与空白中均出现了大量的非特异性片段扩增。值得一提的是，对 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 实验进行熔解曲线分析是很必要的。

从表 1、图 2 的结果可以看到，特异性 球蛋白基因的扩增，由最佳的退火温度（对应样品槽上的第 7-12 列位置）到最差的退火温度（对应样品槽上的第 3 列位置）， C_t 值偏移了大约 4 个循环，从而导致不同的反应结果。

表 1 中还显示，对比样品槽上的第 10-12 列位置上不同的退火温度， C_t 值偏移了大约 2 个循环，第 10 列对应的退火温度实现的 PCR 结果最佳。纵观第 1-12 列结果趋势，由第 1 到第 10 列， C_t 值逐渐降低（特异性提高），由第 10 到第 12 列， C_t 值逐渐升高。

通过以上利用 Mastercycler ep realplex 梯度功能对 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 退火温度进行优化，实现了令人满意的可靠结果。充分证明了梯度功能的灵活性与高效性，对于初步建立 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 分析尤为必要。

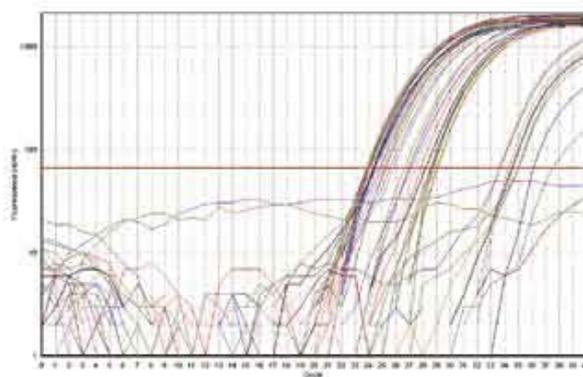


图 2: 经对数处理的 beta 球蛋白基因序列定量 PCR 扩增曲线显示梯度功能设定的不同退火温度对应的定量 PCR 扩增 C_t 值

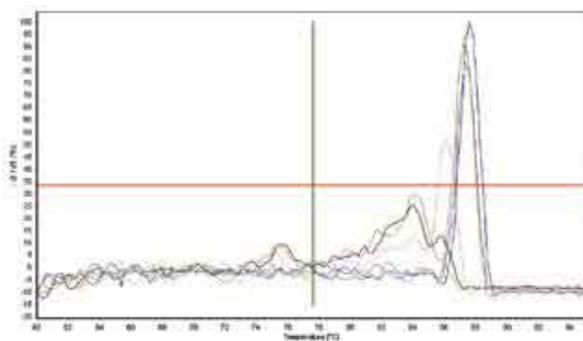


图 3: 第 3 和第 8 列的熔解曲线分析

基于 Mastercycler ep realplex S 的 Impluse 功能，新颖的仪器层面的热启动理念

通过优化 PCR 反应的退火温度，可以尽可能地减少体系内的非特异扩增；但是，另一个非特异扩增的易发环节即 PCR 反应由初始到第一次高温变性这一时相，对 PCR 反应特异性的破坏作用不容忽视。

原因有二：首先普通 Taq 酶在常温即有活性，在 PCR 反应由初始室温到第一次高温变性这一升温的过程中，很容易在低于特异性退火温度下发生非特异性退火或引物二聚体的延伸；其次，这些非特异性扩增产物又会作为模板，在其后的正式循环中数量逐级放大。

因此，尽可能缩短 PCR 反应由初始室温到第一次高温变性这一升温过程所需要的时间，不失为一种提高 PCR 反应特异性的有效手段。

基于 Mastercycler ep realplex S，银制样品槽的 Impluse 功能是 Eppendorf 独创的新颖的仪器层面的热启动理念，可极大地提高定量 PCR 的特异性与 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 的重复性。

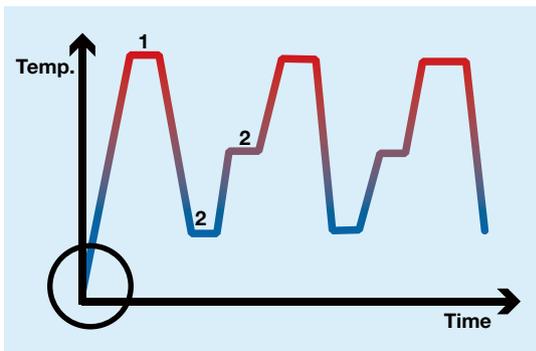


图 1：一个典型的 PCR 程序
PCR 反应由初始室温到第一次高温变性这一升温的过程中（画圈部分），很容易在低于特异性退火温度（第二步）下发生非特异性退火或引物二聚体的延伸。

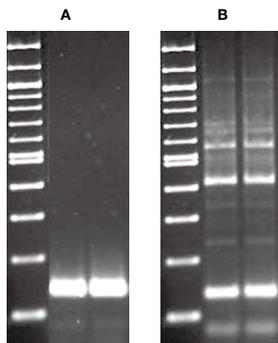


图 2：聚乙烯凝胶电泳结果
A 显示一特异性 PCR 扩增而 B 为非特异性 PCR 扩增，B 相较 A 胶片中增加的条带为非特异性扩增产物

Impluse 功能针对的正是 PCR 反应由初始室温到第一次高温变性这一升温过程，原本 Mastercycler ep realplex S，银制样品槽的升温速度就已达 6 /S，在此基础上，Impluse 功能通过增加热源，将 PCR 反应由初始室温到第一次高温变性这一升温过程的升温速度提高到 8 /S，极大地缩短该时相尤其是低于特异性退火温度下的时间，从而减小产生非特异性扩增的机会。

在 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 体系中，由于 SYBR Green I 染料对序列的非选择性，一旦非优化的体系导致非特异性扩增的出现，势必导致特异性扩增产量的下降、与 SYBR Green I 染料的结合下降，荧光信号的读取不准确。图 3 显示在 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 体系中，非特异性扩增对应着在熔解曲线分析上为特异性扩增峰以外的杂峰，这一点与传统的胶电泳相呼应，图 2。

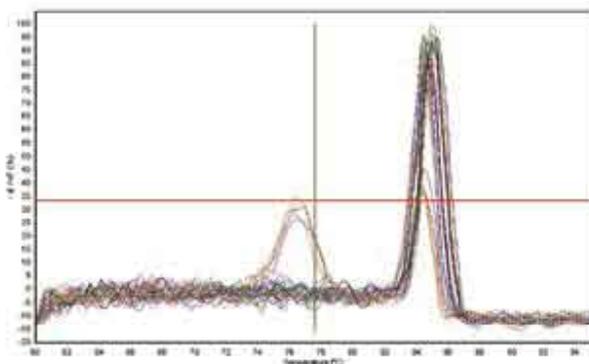


图 3：对 SYBR Green I 法荧光定量 PCR 实验进行熔解曲线分析
非特异性扩增对应着在熔解曲线分析上为特异性扩增峰以外的杂峰

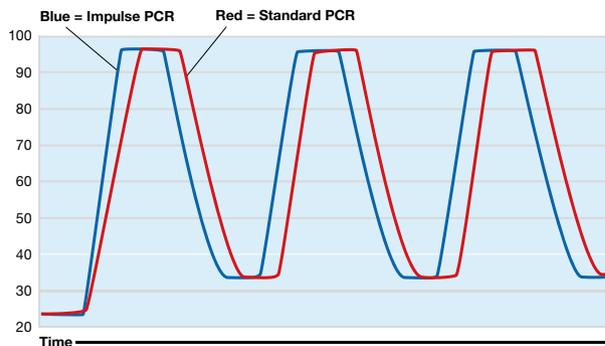


图 4：Impluse 功能选择与否的温度速率图谱
Impluse 功能选择与否的温度速率图谱分别用蓝色与红色区别，X 轴显示时间、Y 轴显示温度。Impluse 功能通过提高 PCR 反应由初始室温到第一次高温变性这一升温过程的升温速度，极大减小产生非特异性扩增的机会。

Eppendorf 多功能电转仪 在薄荷原生质体的体细胞杂交实验中的使用

摘要

细胞融合是产生具有新特性细胞的技术基础，分为化学诱导方法：PEG（聚乙二醇）和电融合方法。这项技术在自然科学的基础研究、药物学测试、生物工程应用和植物育种这些领域得到广泛的应用。

除了哺乳动物细胞融合这方面，通过原生质体间的融合产生植物的杂交体也是一项极为重要的应用，这个植物杂交体产生的过程称之为体细胞杂交（SH）。与传统经典的植物育种方法相比，SH 具有其自身的优势，基因多样性可以在短时间内得到迅速扩增，对那些难以通过自然杂交育种方法产生或杂交效率很低的植物系来说，SH 方法提供了一个可行途径。另外，SH 突破了以往的转化极限，只需把微量的基因元素导入目标基因背景，从而能扩增染色体数量或倍性，达到增加产量的目的（即：杂种优势效应）。

细胞融合方法中电融合法的优势在于操作方便快捷，对原生质体伤害更小，实验效率更高。它包括三个过程，第一阶段：排列；细胞膜紧密相接触彼此吸引；第二阶段：在高电场下非常短的电脉冲，在细胞膜上产生电穿孔，然后就是融合过程；第三个阶段：后排列，细胞膜仍然相互接触直到形成稳定的胞膜联接；至此，细胞融合全过程就圆满结束了。

以下实验就是以薄荷为对象摸索原生质体融合的最佳参数，创造一个新的、比以往更适合于薄荷醇生产的薄荷品种。

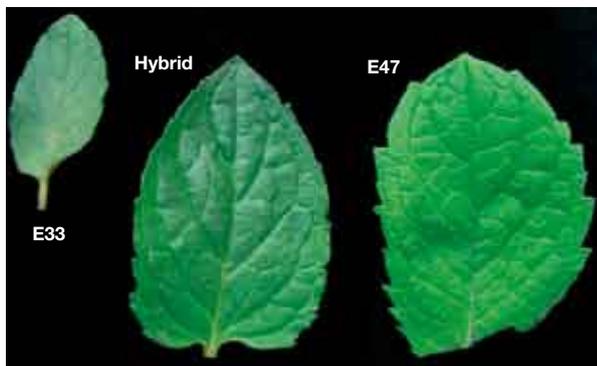


图 1：两种不同的薄荷品种的叶片照片（E33，E47）以及用这两品种的原生质体融合产生的杂交植物叶片的图片（中间）

材料和方法

植物

用于电转的薄荷品种：Mentha piperita 变异体 Piperita multimentha、Mentha piperita 变异体 Piperita mitcham 和 Mentha suaveolens Ehrh。由于花房植物的产量和传代速度非常低，我们使用了体外培养的植株。

电融合仪器和配件

Eppendorf 的多功能电转仪 Multiporator 是一台电穿孔仪器，整合了电融合的模式，使用特定的插件可将不同的融合杯与仪器相连（图 2A），比如说 Eppendorf 的螺旋杯（电极间距为 0.2 mm，能容纳 250 μ l）；Eppendorf 的微融合杯（电极距离为 0.2 mm）（图 2B）用于在显微镜下观察实验过程以优化实验参数。



图 2A：带螺旋融合杯的 Eppendorf 多功能融合仪

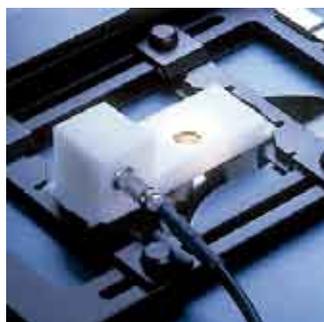


图 2B：Eppendorf 的微融合杯

方法

根据 Sato 等人^[13] 整理的方法分离出原生质体, 对电融合实验来说, 细胞的密度要达到每毫升 $5.0-9.0 \times 10^5$ 原生质体, 保存在 0.7M 山梨醇中。实验中, 吸取一定体积的混合液, 完全覆盖微融合杯的电极腔, 对螺旋杯则应加入 250 μl 的混合物, 设置的参数在结果中列出。

为了观察融合过程, 我们用 DAPI (4, 6-Diamidino-2-Phenylindol) 标记原生质体的细胞核 (图 4B)。根据形态的改变来判断融合是否完成。

为了能挑出杂交体细胞, 我们选出具有不同培养特性的薄荷品种, 一种能在原生质体状态下传代的薄荷与另一种传代能力弱但高产的品种结合, 具有传代能力的品种用 IOA (iodine acetamide) 处理, 因为原生质体不能分裂, 两个样本的遗传信息能在杂交体中混合, 因此比起原来单一品种的特性具有了选择性的提高。

结果

“排列阶段”和“融合脉冲”的电压参数, 脉冲时间和脉冲次数都经过了优化。应该注意的是电场强度 (电融合的重要参数) 决定于设定的电压和电极间距, 当使用不同电极间距的电融合杯时, 必须依据下列的公式调节设定电压以保持同样大小的场强: 场强 $[\text{V}/\text{cm}] = \text{电压} [\text{V}] / \text{电极间距} [\text{cm}]$ 。

排列参数的确定

电压

在微融合杯中, 在选择可变电压 1.5 - 3 V 间, 以每步 0.5 V 的递增来摸索最佳参数。当电压达到 2.5 V 以上, 原生质体被极度拉长、破裂, 所以 1.5 V 的电压值是最合适的, 如图 3, Sato 等人也曾描述过这个现象。这个电压值也能直接适用于螺旋融合杯的实验中。



图 3: M. Piperita 与 Piperita mitcham. 的原生质体在微融合杯中 1.5 V 电压下的排列 ($\times 200$)

时间

选择了 30 - 60 s 这个范围进行测试, 每次增加 10 s, 我们发现 40 s 是最佳值, 这个参数同样适用于融合后阶段。

脉冲长度和数量

获得膜穿孔的最小场强可从下面的公式, 依据细胞大小计算 $E_c = V_c / (0.75 \times d)$

V_c : 穿透电压 (对真核细胞来说是 22 , 1V) [V]

d : 细胞直径 [cm]

原生质体的细胞直径 (d) 变化很大, 所以计算时使用平均直径 25 μm 即可。因此要得到膜穿孔就需要 533.33 V/cm 大小的场强, 由于是两个细胞相互融合, 则电压要加倍至 1066.7 V/cm, 那么在多功能电融合仪的 0.2 mm 融合杯中只需要 21.3 V 的电压降, 在这个基础上以 25 V 为准, 来优化脉冲时间 () 及脉冲次数 (n)。

我们分为三类分析, 以下三种情况对原生质体的活力没有不良影响, 在镜下数微融合杯电极间的融合细胞数, 融合后的细胞形态很大, 相互间紧密排列或排成“8”状, 第 2 种方式的融合产生了 9 个融合细胞, 其他两种各得到了 6-7 个融合细胞, 然后确定 25 μs 的脉冲长度, 2 个脉冲数进行下面试验 (如表 1)。

$U' \sim 1.5 \text{ V}$	40 s	
$U \pi \text{ V}$	25 μs	2x
$U'' \sim 1.5 \text{ V}$	40 s	

- 1) 50 μs 脉冲长度 + 1 个脉冲
- 2) 25 μs 脉冲长度 + 2 个脉冲
- 3) 20 μs 脉冲长度 + 3 个脉冲

脉冲电压的确定

为获得脉冲电压, 在场强 750 - 2,500 V/cm 下进行了 8 次实验, 计算原生质体的存活率和融合率, “双细胞融合”中的胞核以 DAPI 做标记进行计算, 但不考虑多个融合的个数, 结果显示在表 1 中。

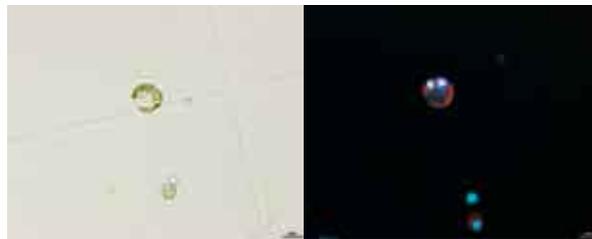


图 4A: 在 transmitted 光下的融合原生质体

图 4B: 在荧光显微镜下的融合原生质体。两个细胞核用 DAPI 染色 ($\times 200$)

当融合率上升则原生质体存活率下降，在 150 V 和 170 V 的电压下能得到 82% 或 81% 的存活率，而此融合率仍能保持在 25% - 24%。

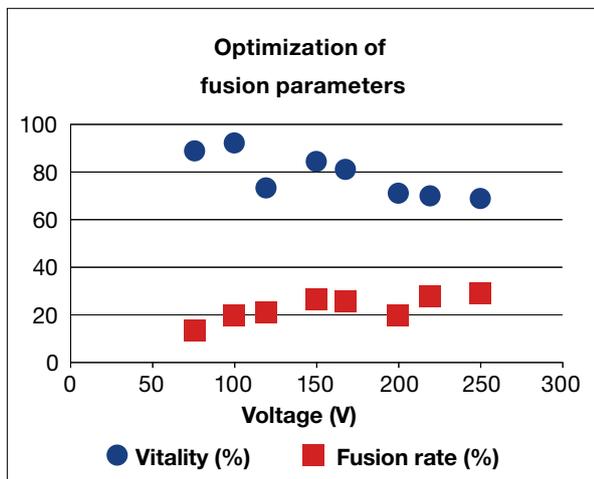


表 1：随电压变化 M.Piperita 与 Piperita mitcham. 的原生质体间的融合效率和存活率的变化

总结

本文以薄荷为对象，摸索原生质体融合的最佳参数，我们将富含薄荷醇的品种与一个高产的品种融合，创造一个新的、比以往更适合于薄荷醇生产的薄荷品种。

多功能电转仪非常适合不同种类的体细胞杂交实验，融合率达到了 16-27%，同时原生质体的存活率维持在 97%。与以往 6% 的融合率相比，这个实验结果得到相当程度的提高，这是与多功能电转仪的性能分不开的，它保证了高效而准确的实验得以进行。

多功能电转仪是个高效的、目的性强的细胞融合工具，使用不同规格的融合杯，多功能电转仪可应用于各种类型的使用（从小量摸索到大规模的商业应用的案例均可）。其质量和效率让那些专业从事细胞融合方面的公司（如：Phytowelt Green Technologies GmbH 公司）也感到非常满意。

表 2

U' ~ 7.5 V	40 s	
U π 170 V	25 μs	2x
U'' ~ 7.5 V	40 s	

U' ~ 7.5 V	40 s	
U π V	25 μs	2x
U'' ~ 7.5 V	40 s	

参考文献

- [1] Power, J., Cummins, S., Cocking, E. (1970). *Nature* 225: 1016-1018
- [2] Carlson, P.S., Smith, H.H., Dearing, R.D. (1972). *Proc Natl Acad Sci U S A* 69(8):2292-2294
- [3] Galun, E., Aviv, D., Perl, A. (1994). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Somatic hybridization in crop improvement, Vol. 27*, Bajaj Y.P.S. (Ed), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 167-182
- [4] Grosser, J.W., Ollitrault, P., Olivares-Fuster, O. (2000). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 36:434-449
- [5] Brewer, E.P., Saunders, J.A., Angle, J.S., Chanery, R.L., McIntosh, M.S. (1999). *Theoretical and Applied Genetics* 99: 761-771
- [6] Kao, K.N., Michayluk, M.R. (1974). *Planta*. 115:355-367
- [7] Zimmermann U., Scheurich, P. (1981). *Planta*. 151:26-32
- [8] Cheng, J., Saunders, J.A. (1995). In *Methods in Molecular Biology, Vol. 55: Plant Cell Electroporation and Electrofusion Protocols* Edited by: J.A. Nickoloff Humana Press Inc., Totowa, NJ
- [9] Saunders, J.A., Bates, G.W. (1987). In *Cell Fusion* (Sowers, A.E., ed.), Plenum, New York: 497-520
- [10] Fish, N., Karp, A., Jones, M.G.K. (1988). *Theor. App. Genet.* 76:260-266
- [11] FNR-Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. Plenum, New York: 497-520.
- [12] Smith, M.A.L., McCown, B. (1982/1983). *Plant Sci. Lett.* 28: 149-156
- [13] Sato, H., Enomoto, S., Oka, S., Hosomi, K., Ito, Y. (1993). *Plant Cell Reports*, 12:546-550
- [14] Sato, H., Yamada, K., Mii, M., Hosomi, K., Okuyama, S., Uzawa, M., Ishikawa, H., Ito, Y. (1996). *Plant Science* 115:101-107(7)

作者 Ellen Nissing & Andreas Müller,
Phytowelt Green Technologies GmbH, Nettetel, Germany
Natascha Weiß, Eppendorf AG, Hamburg

FLIP_L 干扰性小 RNA 促使大肠癌细胞 HT-29 凋亡敏感化

摘要

目的：研究对应 FLIP_L 基因的 siRNA 片段对大肠癌细胞株 HT-29 凋亡的影响，明确 FLIP_L 在 Fas 介导的凋亡途径中的作用。

方法：体外培养大肠癌细胞 HT-29，通过电穿孔技术将特异性 siRNA 片段转染入细胞，半定量 RT-PCR 法判断干扰前后 FLIP_L mRNA 水平的变化，分析 RNA 干扰的特异性、时效性。以 AnnexinV 染色法检测干扰前后 HT-29 细胞对 Fas 介导的凋亡敏感性的改变。

结果：特异性 siRNA 片段能有效地降低 FLIP_L mRNA 水平，最大的干扰效率达 65.02%，明显高于作为对照的非相关片段；干扰作用于转染后 24h 即可出现，48h 达高峰，72h 稍有降低。在诱导型抗体的刺激下，与未转染的细胞相比，转染 siRNA 的 HT-29 细胞中凋亡细胞所占比例明显增加。

结论：特异性 siRNA 片段可显著降低 FLIP_L 基因 mRNA 的表达水平，并提高 HT-29 细胞对 Fas 介导的凋亡敏感性。

FLIP_L (FADD-like IL-1 converting enzyme inhibitory protein) 是近年来发现的凋亡抑制蛋白，与恶性黑色素瘤、Burkitt 淋巴瘤、卡波氏肉瘤等的发生、发展具有密切的相关性。其在蛋白水平在 N 端含有两个与 caspase-8 相似的死亡效应域 (DED)，在 C 端含有一个 caspase 同源结构域，但其中具有催化功能的半胱氨酸残基被酪氨酸残基所取代，因此丧失了蛋白水解酶活性。本研究以大肠癌细胞为研究对象，采用电穿孔技术，将对应 FLIP_L 的干扰性小 RNA (small interfering RNA, siRNA) 片段转染入细胞，观察肿瘤细胞对 Fas 介导的凋亡敏感性的变化，以期为肿瘤的基因治疗提供新的靶点和思路。

材料和方法

材料

细胞

大肠癌细胞株 HT-29 起源于人类结肠腺癌原发灶。

siRNA 片段

对应目的基因 FLIP_L 选用大小为 20 nt 的 siRNA 片段；对应型人类 T 细胞白血病病毒转录激活区选用大小为 19 nt 的 siRNA 片段；经 BLAST 分析，二者不具备任何的同源性。

RT-PCR 引物

FLIP_L 上游引物：

5' -ACCGAGACTACGACAGCTTTGTG-3'，

下游引物：

5' -CAATGTGA AGATCCAGGAGTGGG-3'，

扩增产物大小为 429 bp；

内参照 -actin 上游引物：

5' -ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3'，

下游引物：

5' -CATCTCTTGCTCGAAGTCCA -3'，

扩增产物大小为 318 bp。

主要试剂及仪器

Hypo-osmolar 电转缓冲液购自 Eppendorf 公司；ImProm-TM 反转录酶购自 Promega 公司；凋亡诱导型小鼠抗人 Fas 单抗、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自 Beckman Coulter 公司。电转仪 (Eppendorf Multiporator 型)，PCR 仪 (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9700 型)，流式细胞仪 (Beckman Coulter 公司 EPICS-XL 型)。

方法

转染细胞

取对数生长期的 HT-29 细胞，胰酶消化，重悬于含 0.5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中，计数 10⁶ 个细胞，800 r/min 离心，以 800 μL 的 Hypo-osmolar 电转缓冲液轻柔重悬，室温静置 25 min，加入 siRNA 片段，电转 (具体转染条件见表 1)。电转后室温静置 5-10 min，接种于 6 孔板 (每个转染条件接种 3 个复孔)，每孔加入 2.5 mL 含 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液，37 培养，4h 后更换常规培养液，继续培养。实验中，以未加任何处理的细胞为对照，并设仅施以电穿孔组和转染非相关片段 (HTLV-1 Tax) 组。

表 1 电穿孔转染大肠癌细胞 HT-29 参数

细胞株	HT-29 (贴壁生长)
外源物质	siRNA (19~20 bp, 100 nM)
电击杯	4 mm 电极间距, 800 μ L
温度	常温
电转缓冲液	低渗液 (90 mOsmol/kg)
电压	500 V
时程	70 μ s

PCR: 于转染后 24、48、72 h, 收集细胞, PBS 洗涤, 提取总 RNA, 逆转录, PCR 扩增。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 3 min; 94 $^{\circ}$ C, 45 s; 65 $^{\circ}$ C, 45 s; 72 $^{\circ}$ C, 2 min; 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

凋亡检测: 以凋亡诱导型小鼠抗人 Fas 单抗刺激细胞, 37 $^{\circ}$ C 孵育 16 h, 收集细胞。取 5×10^5 个细胞加入 5 μ L Annexin V-FITC 溶液 (5 μ g/mL) 和 2.5 μ L 的 PI 溶液 (250 μ g/mL), 轻轻混匀, 冰上避光孵育 10 min, 流式细胞仪检测。

重复性评价: 以上各种实验方法均独立进行三次以上。

结果

RNA 干扰的特异性和时效性

半定量 RT-PCR 检测发现, 与未处理的细胞相比, 仅进行电穿孔和转染 siRNA-H 的细胞中, FLIP_L mRNA 含量无明显变化, 而转染特异性 siRNA 片段后, FLIP_L mRNA 含量明显下降, 最大的干扰效率达 65.02%; 且于转染后 24 h, FLIP_L mRNA 的含量已出现下降, 最显著的干扰作用出现在转染后 48 h, 72 h 后 FLIP_L mRNA 的表达水平略有回升 (表 2)。

表 2 siRNA 对 FLIP_L mRNA 的基因沉默作用

组别	干扰效率 (%)
未处理组	--
仅电穿孔组	8.61
非相关对照组	7.12
24 h 组	35.47
48 h 组	65.02
72 h 组	59.31

HT-29 细胞凋亡敏感性

与未处理的 HT-29 细胞相比, RNA 干扰后细胞在各成分的组成上发生了明显的变化。其中, 活细胞所占比例下降, 凋亡细胞和死细胞所占比例上升, 且凋亡细胞在细胞总体中所占的比例上升得尤为显著 (图 1)。

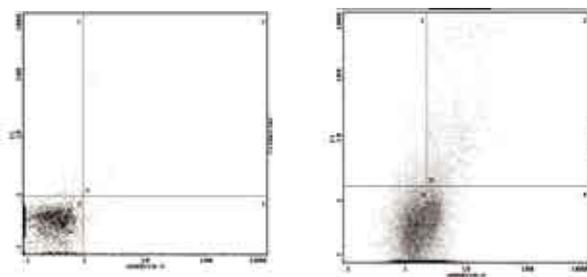


图 1: RNA 干扰对大肠癌细胞 HT-29 凋亡的作用 (Annexin V 分析)。 (a) 未处理细胞, (b) 转染 siRNA 细胞。左下象限代表活细胞, 右上象限代表坏死细胞及细胞碎屑, 右下象限代表凋亡细胞。

讨论

FLIP_L 作为新近发现的凋亡相关因子, 由于其在结构上与 caspase-8 的相似性, 故可竞争性地与 Fas 相关死亡结构域 (FADD) 结合, 阻断 caspase 蛋白酶级联反应, 从而抑制 Fas、TNFR-1、DR5、TRAILR 等死亡受体介导的凋亡。在本研究中, 我们应用 Eppendorf Multiporator 系统, 将对应 FLIP_L 的 siRNA 片段转染入大肠癌细胞株 HT-29, 在 mRNA 水平上封闭其表达, 推测大肠癌中 FLIP_L 在 Fas 介导的凋亡途径上所起的重要作用。结果显示, 转染对应 FLIP_L 的 siRNA 片段可特异性地降低目的基因的 mRNA 水平 (转染 100 nM 的 siRNA 48 小时后, 干扰效率可达 65.02%),

而转染非同源的、对应 HTLV-1 Tax 的 siRNA-H 却几乎不产生任何的干扰作用, 充分证实了 RNA 干扰的高度特异性。siRNA 封阻 FLIP_L mRNA 表达后, 以凋亡诱导型抗体激活细胞, 通过检测凋亡早期细胞膜表面磷脂酰丝氨酸的变化, 发现 RNA 干扰组的细胞对 Fas 介导的凋亡敏感性明显上升, 从反向基因功能研究的角度证实在大肠癌细胞中 FLIP_L 对 Fas 介导的凋亡受体通路起到了阻断作用。目前, 对于这种阻抑作用的机制仍在进一步研究之中。

作者 天津医科大学附属肿瘤医院肿瘤研究所
孙保存 臧凤琳 牛瑞芳



畅享移液新境界

半世纪创新品质的信赖

—— Eppendorf 移液器系列



源于独创，1961 年获第一支气体活塞式移液器专利
优化的外形和功能，用力均衡，符合人体工程学
陶瓷活塞，配件精良，造就更高品质更高精度
全套专业的维修保养和校准服务

eppendorf
In touch with life

Eppendorf China Limited 艾本德中国有限公司 中文网址: www.eppendorf.cn
上海浦东新区世纪大道 1600 号浦项商务广场 1511-1515 室 邮编: 200122
上海: 86-21-6876 0880 北京: 86-10-8836 0998 广州: 86-20-3836 1160