

实验大课堂

目录

1	DNA 技术	4
1.1	DNA 序列查询	4
1.2	DNA 序列比对	39
1.3	DNA、RNA 提取与纯化	51
1.4	DNA 载体构建	56
1.5	DNA 电泳	154
1.6	DNA 甲基化	163
1.7	测序与芯片技术.....	178
2	RNA 技术.....	204
2.1	RNAi 与 siRNA 技术	204
2.2	cDNA 合成.....	221
2.3	RNA 提取.....	231
2.4	RNA 电泳.....	254
2.5	非编码 RNA 研究套路.....	260
2.6	启动子序列查询.....	365

3	PCR 技术	387
3.1	PCR 引物	387
3.2	Realtime PCR	482
3.3	其他 PCR	548
3.4	PCR 疑难杂症	567
4	蛋白质技术.....	605
4.1	蛋白表达及含量测定	605
4.2	蛋白分离纯化.....	609
4.3	SDS-PAGE	611
4.4	酵母杂交技术.....	615
4.5	其他蛋白技术.....	618
5	免疫学技术.....	659
5.1	免疫组化.....	659
5.2	ELISA	688
5.3	Co-IP 和 CHIP	722
5.4	Western Blot.....	764
5.5	组织切片	846
6	细胞实验技术.....	848
6.1	细胞培养与冻存复苏.....	848

6.2	细胞形态检测.....	941
6.3	细胞计数.....	978
6.4	流式细胞术.....	995
6.5	细胞周期增殖凋亡.....	1058
6.6	细胞免疫荧光法.....	1094
6.7	细胞转导.....	1116
7	实验动物.....	1174
7.1	动物伦理与争议.....	1174
7.2	实验动物模型.....	1196
8	生信工具.....	1218
9	高通量测序技术.....	1342
10	CRISPR 技术.....	1347
11	CAR-T 实验技术.....	1383
12	肿瘤自噬技术.....	1396
13	外泌体实验研究技术.....	1406
14	其他.....	1422
15	实验心得.....	1441

1 DNA 技术

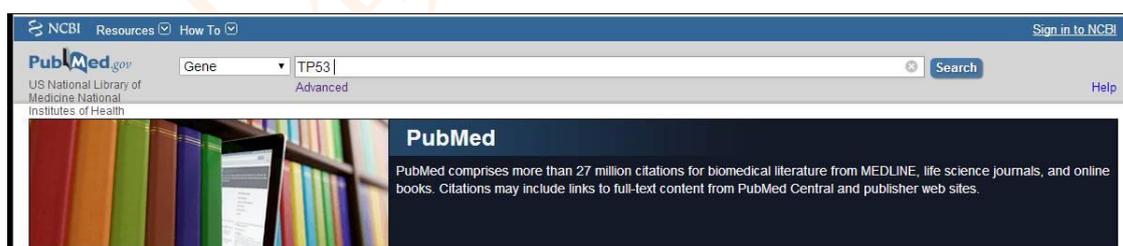
1.1 DNA 序列查询

NCBI 良心教程，寻找基因转录本序列及相关编码蛋白

提及 NCBI 我们大家都不陌生，研究物种基因功能可都靠它呢。在 NCBI 的快速搜索下，基因转录本序列以及相关编码蛋白信息那也是手到擒来。然而当我们查找某个基因的相关信息时，就会发现该基因有很多个转录本。所以尽管基因查询很简单，但要精确定位到自己所需的转录本核酸序列及蛋白信息仍是一个问题，今天小编就手把手教大家如何通过经 NCBI 搞定此难题，以栗子为主，包学包会。

步骤

- 1.打开 pubmed: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- 2.选择基因并输入你要查找的基因名称，这里以 TP53 基因为例：



- 3.点击 search 进入该界面

How To

Gene Search

Create RSS Create alert Advanced

Tabular 20 per page Sort by Relevance Send to

See TP53 tumor protein p53
tp53 in [Homo sapiens](#) [Rattus norvegicus](#) [Danio rerio](#) [All 142 Gene records](#)

Search results
Items: 1 to 20 of 3561
See also 57 discontinued or replaced items.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
<input type="checkbox"/> TP53 ID: 7157	tumor protein p53 [<i>Homo sapiens</i> (human)]	Chromosome 17, NC_000017.11 (7668402..7687550, complement)	BCC7, LFS1, P53, TRP53	191170
<input type="checkbox"/> Tp53 ID: 24842	tumor protein p53 [<i>Rattus norvegicus</i> (Norway rat)]	Chromosome 10, NC_005109.4 (56186299..56198449)	Trp53, p53	
<input type="checkbox"/> tp53 ID: 30590	tumor protein p53 [<i>Danio rerio</i> (zebrafish)]	Chromosome 5, NC_007116.6 (23582427..23594005)	brp53, drp53, etID22686.5, fb40d06, p53, wu.fb40d06, zgc:111919	
<input type="checkbox"/> TP53 ID: 403869	tumor protein p53 [<i>Canis lupus familiaris</i> (dog)]	Chromosome 5, NC_006587.3 (32561406..32565149)	P53	

Filters: [Manage Filters](#)

Results by taxon
Top Organisms [Tree](#)
Homo sapiens (1201)
Mus musculus (52)
Rattus norvegicus (40)
Jaculus jaculus (22)
Cricetulus griseus (18)
All other taxa (2228)
More...

Find related data
Database:

Search details
TP53[All Fields] AND

4. 点击第一个 TP53 进入以下界面

TP53 tumor protein p53 [*Homo sapiens* (human)]
Gene ID: 7157, updated on 2-Apr-2017

Summary

Official Symbol TP53 provided by HGNC
Official Full Name tumor protein p53 provided by HGNC
Primary source HGNC:HGNC:11998
See related [Ensembl:ENSG00000141510](#) [MIM:191170](#); [Vega:OTTHUMG00000162125](#)
Gene type protein coding
RefSeq status REVIEWED
Organism [Homo sapiens](#)
Lineage Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo
Also known as P53; BCC7; LFS1; TRP53
Summary This gene encodes a tumor suppressor protein containing transcriptional activation, DNA binding, and oligomerization domains. The encoded protein responds to diverse cellular stresses to regulate expression of target genes, thereby inducing cell cycle arrest, apoptosis, senescence, DNA repair, or changes in metabolism. Mutations in this gene are associated with a variety of human cancers, including hereditary cancers such as Li-Fraumeni syndrome. Alternative splicing of this gene and the use of alternate promoters result in multiple transcript variants and isoforms. Additional isoforms have also been shown to result from the use of alternate translation initiation codons from identical transcript variants (PMIDs: 12032546, 20937277). [provided by RefSeq, Dec 2016]
Orthologs [mouse](#) [all](#)

5. 下拉到 NCBI Reference Sequences (RefSeq) 区域，mRNA and Protein(s) 下显示的就是该基因的转录本及其编码的蛋白：

NCBI Reference Sequences (RefSeq)

RefSeqs maintained independently of Annotated Genomes

These reference sequences exist independently of genome builds. [Explain](#)

Genomic

1. [NG_017013.2 RefSeqGene](#)

Range: 5001..24149
 Download: [GenBank](#), [FASTA](#), [Sequence Viewer \(Graphics\)](#), [LRG_321](#)

mRNA and Protein(s)

1. [NM_000546.5](#) → [NP_000537.3](#) **cellular tumor antigen p53 isoform a**
[See identical proteins and their annotated locations for NP_000537.3](#)

Status: REVIEWED

Description: Transcript Variant: This variant (1) can initiate translation from two in-frame AUG start codons. The isoform represented in this variant (a, also known as p53alpha) results from translation initiation at the upstream start codon. Both variants 1 and 2 encode isoform a, which is the longest isoform.

Source sequence(s): [AK223026](#), [DA453049](#), [DQ186650](#), [X02469](#)

Consensus CDS: [CCDS11118.1](#)

UniProtKB/Swiss-Prot: [P04637](#)

UniProtKB/TrEMBL: [K7PPA8](#), [Q53GA5](#)

Related: [ENSP00000269305.4](#), [OTTHUMP00000221333](#), [ENST00000269305.8](#), [OTTHUMT00000367397](#)

Conserved Domains (3) [summary](#)

pfam00870	P53; P53 DNA-binding domain
Location:95 - 289	
pfam07710	P53_tetramer; P53 tetramerization motif
Location:319 - 358	

这就是该基因的转录本信息

6.一直下拉会发现该基因共有 15 个转录本

15. [NM_001276761.1](#) → [NP_001263690.1](#) **cellular tumor antigen p53 isoform g**
[See identical proteins and their annotated locations for NP_001263690.1](#)

Status: REVIEWED

Description: Transcript Variant: This variant (2) uses an alternate splice site in the 5' UTR, compared to variant 1. This variant can initiate translation from two in-frame AUG start codons. The isoform represented in this variant (g, also known as delta40p53alpha or deltaNp53) results from translation initiation at the downstream start codon. It has a shorter N-terminus, compared to isoform a. Variants 1, 2, and 8 encode isoform g.

Source sequence(s): [AB082923](#), [AK223026](#), [DA453049](#), [DQ186650](#), [X02469](#)

Consensus CDS: [CCDS73969.1](#)

UniProtKB/Swiss-Prot: [P04637](#)

UniProtKB/TrEMBL: [H2EHT1](#), [Q53GA5](#)

Related: [ENSP00000482537.1](#), [OTTHUMP00000275852](#), [ENST00000619485.4](#), [OTTHUMT00000476704](#)

Conserved Domains (2) [summary](#)

pfam00870	P53; P53 DNA-binding domain
Location:56 - 250	
pfam07710	P53_tetramer; P53 tetramerization motif
Location:280 - 319	

案例

以第一个转录本为例来告诉大家怎样查找转录本的核苷酸序列及其编码的蛋白质的氨基酸序列。

7. 点击 NM_000546.5 后会出现以下界面

Homo sapiens tumor protein p53 (TP53), transcript variant 1, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_000546.5

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS NM_000546 2591 bp mRNA linear PRI 28-DEC-2016

DEFINITION Homo sapiens tumor protein p53 (TP53), transcript variant 1, mRNA.

ACCESSION NM_000546

VERSION NM_000546.5

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2591)

AUTHORS Marcel V, Tran PL, Sagne C, Martel-Planche G, Vaslin L,
Teulade-Fichou MP, Hall J, Mergny JL, Hainaut P and Van Dyck E.

TITLE G-quadruplex structures in TP53 intron 3: role in alternative
splicing and in production of p53 mRNA isoforms

JOURNAL Carcinogenesis 32 (3), 271-278 (2011)

PUBMED [21112961](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 2591)

AUTHORS Marcel V, Perrier S, Aoubala M, Ageorges S, Groves MJ, Diot A,
Fernandes K, Tauro S and Bourdon JC.

8. 下拉到 ORIGIN 区域即为该转录本的核苷酸序列

ORIGIN

```
1 gatgggattg gggttttccc ctcccatgtg ctcaagactg gcgctaaaag tttgagcctt
61 ctcaaaagtc tagagccacc gtccagggag caggtagctg ctgggctccg gggacacttt
121 gcgttcgggc tgggagcgtg ctttccacga cggtagacacg cttccctgga ttggcagcca
181 gactgccttc cgggtcactg ccattggagga gccgcagtca gatcctagcg tgcagcccc
241 tctgagtcag gaaacatttt cagacctatg gaaactactt cctgaaaaca acgttctgtc
301 ccccttgccg tccaagcaa tggatgattt gatgctgtcc ccggacgata ttgaacaatg
361 gttcactgaa gaccaggctc cagatgaagc tcccagaatg ccagaggctg ctccccccgt
421 ggccccctgca ccagcagctc ctacaccggc ggccccctgca ccagccccct cctggcccct
481 gtcattctct gtcccttccc agaaaaccta ccagggcagc tacggtttcc gtctgggctt
541 cttgcattct gggacagcca agtctgtgac ttgcacgtac tcccctgccc tcaacaagat
601 gttttgcaa ctggccaaga cctgccctgt gcagctgtgg gttgattcca ccccccgcc
661 cggcaccgcc gtccgcgcca tggccatcta caagcagtca cagcacatga cggaggttgt
721 gaggcgctgc ccccaccatg agcgtgtctc agatagcgat ggtctggccc ctccctcagca
```

9. 返回到以下界面

mRNA and Protein(s)	
1. NM_000546.5 → NP_000537.3 cellular tumor antigen p53 isoform a	
See identical proteins and their annotated locations for NP_000537.3	
Status: REVIEWED	
Description	Transcript Variant: This variant (1) can initiate translation from two in-frame AUG start codons. The isoform represented in this variant (a, also known as p53alpha) results from translation initiation at the upstream start codon. Both variants 1 and 2 encode isoform a, which is the longest isoform.
Source sequence(s)	AK223026 , DA453049 , DQ186650 , X02469
Consensus CDS	CCDS11118.1
UniProtKB/Swiss-Prot	P04637
UniProtKB/TrEMBL	K7PPA8 , Q53GA5
Related	ENSP00000269305.4 , OTTHUMP00000221333 , ENST00000269305.8 , OTTHUMT00000367397
Conserved Domains (3) summary	
	pfam00870 P53; P53 DNA-binding domain Location:95 → 289
	pfam07710 P53_tetramer; P53 tetramerization motif Location:319 → 358
	pfam08563 P53_TAD; P53 transactivation motif Location:5 → 28

10. 点击 NP_000537.3 后会看到以下界面

cellular tumor antigen p53 isoform a [Homo sapiens]

NCBI Reference Sequence: [NP_000537.3](#)

[Identical Proteins](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS NP_000537 393 aa linear PRI 28-DEC-2016
 DEFINITION cellular tumor antigen p53 isoform a [Homo sapiens].
 ACCESSION NP_000537
 VERSION NP_000537.3
 DBSOURCE REFSEQ: accession [NM_000546.5](#)
 KEYWORDS RefSeq.
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
 Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (residues 1 to 393)
 AUTHORS Marcel V, Tran PL, Sagne C, Martel-Planche G, Vaslin L,
 Teulade-Fichou MP, Hall J, Mergny JL, Hainaut P and Van Dyck E.
 TITLE G-quadruplex structures in TP53 intron 3: role in alternative

11. 下拉到 ORIGIN 区域即为该转录本编码的蛋白质的氨基酸序列

ORIGIN

```
1 meepqsdpsv epplsqetfs dlwkllpenn vlsplpsqam ddlmlspddi eqwftedpgp
61 deaprmpeaa ppvapapaap tpaapapaps wplsssvpsq ktyqgsygfr lgflhsgtak
121 svctctyspal nkmfcqlakt cpwqlwvdst pppgtrvram aiykqsqgmt evvrrcphhe
181 rcsdsdglap pqhlirvegn lrveylddrn tfrhsvvypy eppevgsdct tihynymcns
241 scmggmnrp iltiitleds sgnllgrnsf evrvcacpgr drrteenlr kkgephhelp
301 pgstkralpn ntssspqpk kpldgeyftl qirgrerfem frelnealel kdaqagkepg
361 gsrhsshk skkgqtsrh kklmfktegp dsd
```

//

获得该转录本的 ORF 序列

12. 返回到以下界面

mRNA and Protein(s)

1. [NM_000546.5](#) → [NP_000537.3](#) cellular tumor antigen p53 isoform a
[See identical proteins and their annotated locations for NP_000537.3](#)

Status: REVIEWED

Description	Transcript Variant: This variant (1) can initiate translation from two in-frame AUG start codons. The isoform represented in this variant (a, also known as p53alpha) results from translation initiation at the upstream start codon. Both variants 1 and 2 encode isoform a, which is the longest isoform.	
Source sequence(s)	AK223026 , DA453049 , DQ186650 , X02469	
Consensus CDS	CCDS11118.1	
UniProtKB/Swiss-Prot	P04637	
UniProtKB/TrEMBL	K7PPA8 , Q53GA5	
Related	ENSP00000269305.4 , OTTHUMP00000221333 , ENST00000269305.8 , OTTHUMT00000367397	

Conserved Domains (3) [summary](#)

pfam00870 Location:95 → 289	P53; P53 DNA-binding domain
pfam07710 Location:319 → 358	P53_tetramer; P53 tetramerization motif
pfam08563 Location:5 → 28	P53_TAD; P53 transactivation motif

13. 点击 [CCDS11118.1](#) 后会出现

NCBI Consensus CDS protein set CCDS Database

EBI • HGNC • MGI • NCBI • UCSC • WTSI

PubMed Entrez Gene BLAST OMIM

Search CCDS ID for CCDS11118.1 in All Organisms and Current Releases Go Clear

Report for CCDS11118.1 (current version)

CCDS	Status	Species	Chrom.	Gene	CCDS Release	NCBI Annotation Release	Ensembl Annotation Release	Links
11118.1	Public	<i>Homo sapiens</i>	17	TP53	20	108	85	H G C G S

Public since: CCDS release 1, NCBI annotation release 35.1, Ensembl annotation release 23

Review status: Reviewed (by RefSeq and Havana)

Sequence IDs included in CCDS 11118.1

Original	Current	Source	Nucleotide ID	Protein ID	Status in CCDS	Seq. Status	Links
✓	✓	EBI, WTSI	ENST00000269305	ENSP00000269305	Accepted	alive	N P N P
✓	✓	EBI, WTSI	ENST00000445888	ENSP00000391478	Accepted	alive	N P N P
✓	✓	EBI, WTSI	OTTHUMT00000367397	OTTHUMP00000221333	Accepted	alive	N P N P
✓	✓	EBI, WTSI	OTTHUMT00000367398	OTTHUMP00000221334	Accepted	alive	N P N P
✓	✓	NCBI	NM_000546.5	NP_000537.3	Accepted	alive	N P N P B

CCDS Home FTP Process Releases & Statistics Curation Guidelines

Collaborators EBI HGNC MGI NCBI UCSC WTSI

Contact Us email CCDS

Genome Displays E Ensembl U Genome Browser N Map Viewer V VEGA

14. 下拉到 Nucleotide Sequence 区域即为该转录本的 ORF 序列，Translation 区域是该转录本编码的蛋白质的氨基酸序列。

Nucleotide Sequence (1182 nt):

ATGGAGGAGCCGAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGA
AACTACTTCCGAAAACAACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCC
GGACGATATTGAACAATGGTTCACTGAAGACCCAGGTCAGATGAAGCTCCCAGAAATGCCAGAGGCTGCT
CCCCCGTGGCCCTGCACCAGCAGCTCTACACCCGGCGCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCTGT
CATCTTCTGTCCCTTCCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCACTCTGG
GACAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTACTCCCTTGCCCTCAACAAGATGTTTTCGCAACTGGCCAAGACC
TGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCACACCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATCTACA
AGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGG
TCTGGCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAAC
ACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCTATGAGCCGCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACT
ACAACATACATGTGTAACAGTTCTGCAATGGCGGCATGAACCGAGGCCATCCTCACCATCATCACACT
GGAAGACTCCAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTTGTCCTGTCTGGGAGA
GACCGCGCACAGAGGAAGAGAACTCCGCAAGAAAGGGAGCCTACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCA
CTAAGCGAGCACTGCCCAACAACACCAGCTCCTTCCCGAGCCAAAGAAAGAAACCCTGGATGGAGAATA
TTTCAACCCTCAGATCCGTGGGCGTGAAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCCTTGAACATC
AAGGATGCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCCAAAAAGG
GTCAGTCTACCTCCCGCCATAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGGCCTGACTCAGACTGA

Translation (393 aa):

MEEFQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLENNVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPPEAA
PPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSVPSQKTYQG SYGFRLLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKNMFCQLAKT
CPVQLWVDS TPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTTEVVRRCPPHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDLDRN
TFRHSVWVPEYEPPEVGSDCITTHYNYMCNSSCMGGMNRRPILITITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPR
DRRTEENLRKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALEL
KDAQAGKEPGG SRAHSHLKS KKGQSTRHKKLMFKTEGPDSD

NCBI 数据库中搜索基因序列的私家套路三

“荷叶师兄，教授让我研究新基因 XXX 的功能，我想问下...”

“小师妹，这个也是有套路的，首先你可以研究 XXX 在各器官、组织表达谱，其次.....，你明白吧？”（师兄迫不及待的向小师妹传授经验之谈）

“哦！”（刚入科的小师妹好像明白怎么做了）

“你可以利用原核、真核表达系统将 XXX 表达出来研究其功能，再次.....，你明白吧？”

“哦？”（小师妹感觉好多东西需要学）

“接下来你可以研究 XXX 的表达调控，.....，你还可以.....，你明白吧？师兄我硕士阶段就是这么做的。”

“哦？？？”（小师妹感觉有点跟不上节奏）.....

一个小时后师兄意犹未尽。

“师兄，我就是想问下在 NCBI 里如何快速、准确找到基因序列。”（小师妹弱弱的说了一句）

“Easy！”荷叶师兄又开始传授经验。

套路一

进入 NCBI 网站，在 Nucleotide（核苷酸）数据库中搜索，以人 CCL2 为例。

NCBI Resources How To

Nucleotide **Nucleotide** Advanced

GenBank

Homo sapiens C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2), mRNA
 NCBI Reference Sequence: NM_002982.3
[FASTA](#) [Graphics](#)

ORIGIN

```

1 gaggaaccga gagcctgaga ctaaccocaga aacatccaat tctcaaacctg aagctcgcac
61 tctcgcctcc agcatgaaag tctctgccc ccttctgtgc ctgctgctca tagcagccac
121 cttcattccc caaggctctg ctccagccaga tgcattcaat gccccagctca cctgctgtta
181 taacttcacc aataggaaga tctcagtgca gagctctcgg agctatagaa gaatcaccag
241 cagcaagtg cccanagaag ctgtgatett caagaccatt gtggccaagg agategtgac
301 tgaccccaag cagaagtggg ttccagattc catggaccac ctggacaagg aaaccaaac
361 tccgaagat tgaacactca ctccacaacc caagaactcg cagctaacct atttccoot
421 agcttccccc agacaccctg tttttttta ttataatgaa ttttgtttg tctgtgaaa
481 cttatgctct taagtaagt taattcttat ttaagttatt gatgtttta gtttatcttt
541 catgtacta gtgtttttta gatcacgaga ctgggggaaa ttgctttccc tottgaaaca
601 cagttctacc cctggatgt ttgagggtc ttgcaagaa tcatatfac aaagaatttt
661 ttttaacatt ccaatgcatt gtaaaatata tattgtgaa atgaatatt tgaactatt
721 acaccaasta aatataat tgtacaaaa aaaaaaaaaa
  
```

套路二

进入 NCBI 网站，在 CCDS（共识编码序列）数据库中搜索，
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi>

NCBI Consensus CDS protein set CCDS Database

PubMed Entrez Gene BLAST OMM

Search All for cc12 in Homo sapiens and Current Releases Go Clear

CCDS Home FTP Process Releases & Statistics Curation Guidelines

The Consensus CDS (CCDS) project is a collaborative effort to identify a core set of human and mouse protein-coding regions that are consistently annotated and of high quality. The long term goal is to support convergence towards a standard set of gene annotations.

Available information includes:

Chromosome	Start	Stop	Links
17	34256360	34256425	NINUEV
17	34256222	34256339	NINUEV
17	34256722	34256827	NINUEV

CCDS Sequence Data
 Blue highlighting indicates alternating exons.
 Red highlighting indicates amino acids encoded across a splice junction.

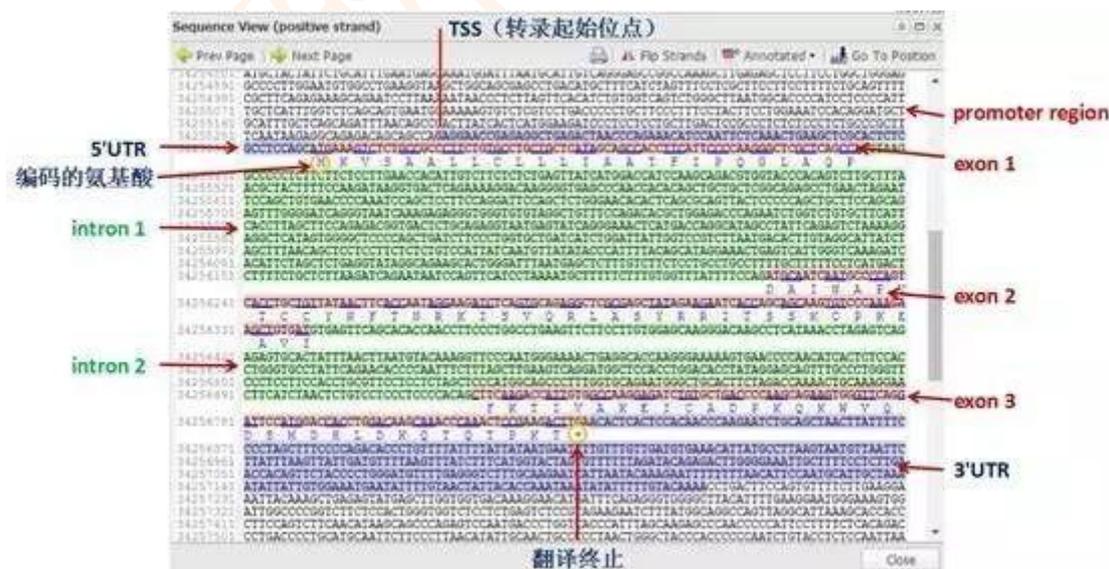
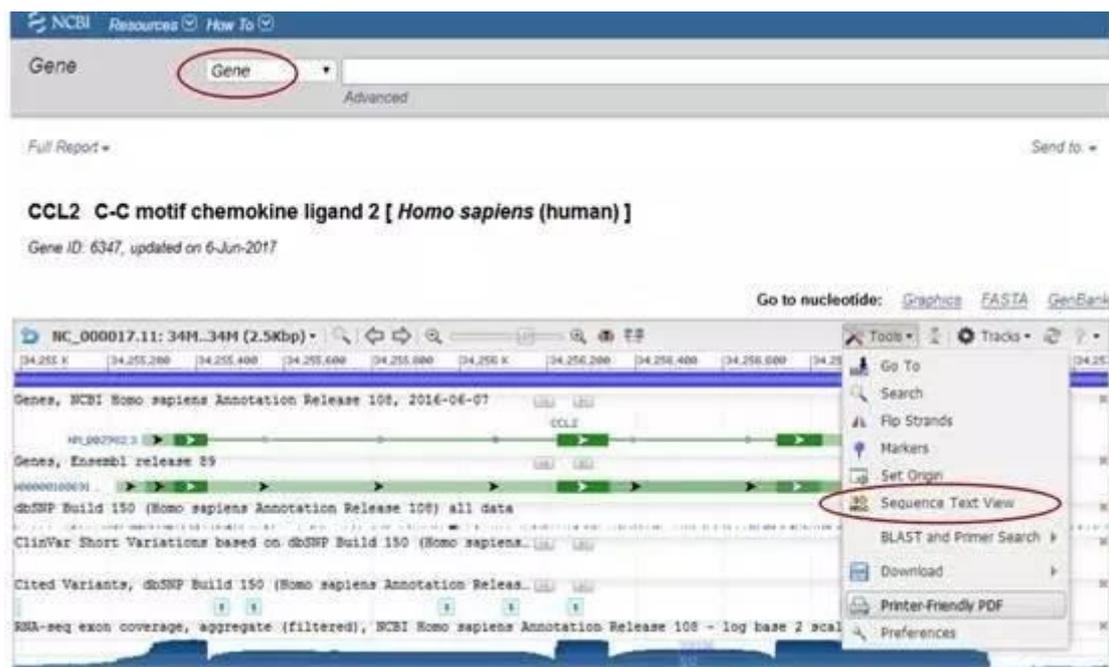
Mouse over the nucleotide or protein sequence below and click on the highlighted codon or residue to select the pair.

Nucleotide Sequence (300 nt):
 ATGAAGTCTGTCGCGCACTCTGTCGCTGCTCATAGGCGCACCTTCATTCCCAAGGCTGCTC
 AGCCAGATCCAAATCAATGPOCCAGTCAGCTGCTTATAGCTTACCAATAGGANGATCTCAGTCCAG
 GCTCCGAGCTATAGAAAGATCAACAGCAGCAAGTCTCCAAAGAGCTCTGATCTTCAGACCATCTG
 GCCAAGAGATCTGTCGCAACCCCAAGCAGAAAGTGGGTTCCAGGATCCATGGACCACTGGCAAGCAA
 CCCAAGTCCGAGACTGCA

Translation (99 aa):
 MYSALLLTLTRATFIPGLVPAVLAIAFVTCYNTMRELSVQLASTRELTSSQCHRAVIFKTV
 AKEDCAPDQAVVQSMHLEKVTQPKT

套路三（荷叶推荐）

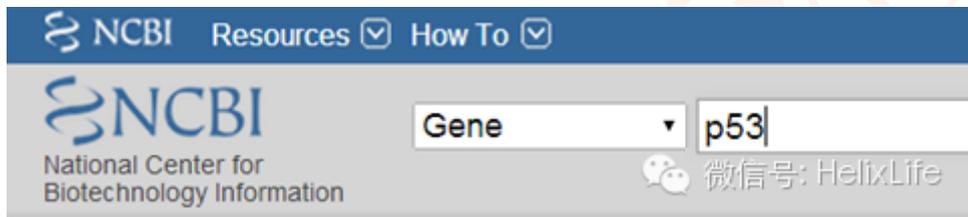
进入 NCBI 网站，在 Gene（基因）数据库中搜索。找到 Tools 工具的下拉菜单中 Sequence Text View，点击就可以查到基因序列，并且网站以不同颜色标注 CCL2 基因的不同部分，灰色的 UTR，红色的外显子，绿色的内含子，以及一一对应的编码区。



NCBI——序列寻找之旅

我个人对 NCBI 充满敬畏之情，就其蓝天白云的配色就觉得神清气爽，pubmed 也是科研人员必备工具之一，其实 NCBI 的功能不仅仅局限在查文献上，其他功能我用的少，只给大家介绍下基因序列的查找，包括全基因组、CCDS、剪接体等等。

① 打开 NCBI 主页在下拉框里选择 Gene 选项，输入基因名称（p53）



② 搜索结果会有种属的区别，要看清你要的种属（homo）

Results: 1 to 20 of 8510 << First < Prev Page 1 of 426 Next > Last >>

Filters activated: Current only. [Clear all](#) to show 8768 items.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
<input type="checkbox"/> p53 ID: 2768677	CG33336 gene product from transcript CG33336-RB [<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)]	Chromosome 3R, NT_033777.3 (23049657..23054082, complement)	Dmel_CG33336, CG10873, CG31325, CG33336, D-DMP53, Dm-P53, DmP53, DmelCG33336, Dmp53, Dp53, dmp53, dp53, prac	
<input type="checkbox"/> TP53 ID: 7157	tumor protein p53 [<i>Homo sapiens</i> (human)]	Chromosome 17, NC_000017.11 (7668402..7687550, complement)	BCC7, LFS1, P53, TRP53	191170
<input type="checkbox"/> Trp53 ID: 22059	transformation related protein 53 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Chromosome 11, NC_000077.6 (69580359..69591873)	Trp53, bbl, bfy, bhy, p44, p53	
<input type="checkbox"/> Tp53 ID: 24842	tumor protein p53 [<i>Rattus norvegicus</i> (Norway rat)]	Chromosome 10, NC_005109.4 (56187013..56198449)	Trp53, p53	

微信号: HelixLife

③ 结果页的右侧是它包含的内容，可以直接选择你要的项，调到那个位置

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Gene Gene Search Help

Display Settings: Full Report Send to: Hide sidebar

TP53 tumor protein p53 [*Homo sapiens* (human)]
Gene ID: 7157, updated on 30-Mar-2015

Summary

Official Symbol TP53 provided by HGNC
Official Full Name tumor protein p53 provided by HGNC
Primary source HGNC:HGNC:11598
See related Ensembl:ENSG00000141510; HPRD:01808; MM:191170; Vega:OTTHUMD00000192125
Gene type protein coding
RefSeq status REVIEWED
Organism *Homo sapiens*
Lineage Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorhina; Catarrhini; Hominoidea; Homo
Also known as P53; BCC7; LFS1; TRP53
Summary This gene encodes a tumor suppressor protein containing transcriptional activation, DNA binding, and oligomerization domains. The encoded protein responds to diverse cellular stresses to regulate expression of target genes, thereby inducing cell cycle arrest, apoptosis, senescence, DNA repair, or changes in metabolism. Mutations in this gene are associated with a variety of human cancers, including hereditary cancers such as Li-Fraumeni syndrome. Alternative splicing of this gene and the use of alternate promoters result in multiple transcript variants and isoforms. Additional isoforms have also been shown to result from the use of alternate translation initiation codons (PMIDs: 1203296, 20937277) [provided by RefSeq, Feb 2013]
Orthologs mouse: al

Table of contents
Summary
Genomic context
Genomic regions, transcripts, and products
Biolographs
Phenotypes
Variation
HFV-1 interactions
Pathways from BioSystems
Interactions
General gene information
Markers, Clone Names, Homology, Gene Ontology
General protein information
NCBI Reference Sequences (RefSeq)
Related sequences
Additional links
Related information

④ Genomic regions, transcripts, and products 这个选项中，是以图的形式显示基因序列，在 tool 中选择 sequence text view，可以弹出碱基序列

Genomic regions, transcripts, and products

Go to reference sequence details

Genomic Sequence: NC_000017.11 Chromosome 17 Reference GRCh38.p2 Primary Assembly

Go to nucleotide: Graphics FASTA GenBank

Gene, NCBI RefSeq release Association Release 137, 2015-03-19

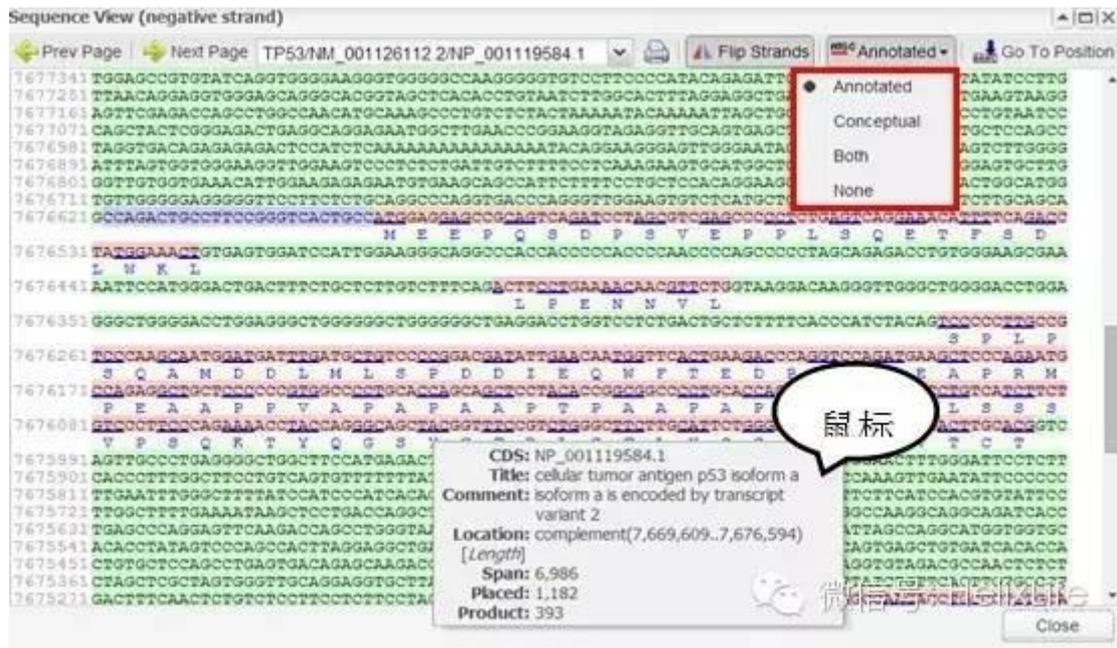
TP53

WP_082292122.2
WP_082292161.2
WP_082292162.2
WP_082292163.2
WP_082292164.2
WP_082292165.1
WP_082292166.1

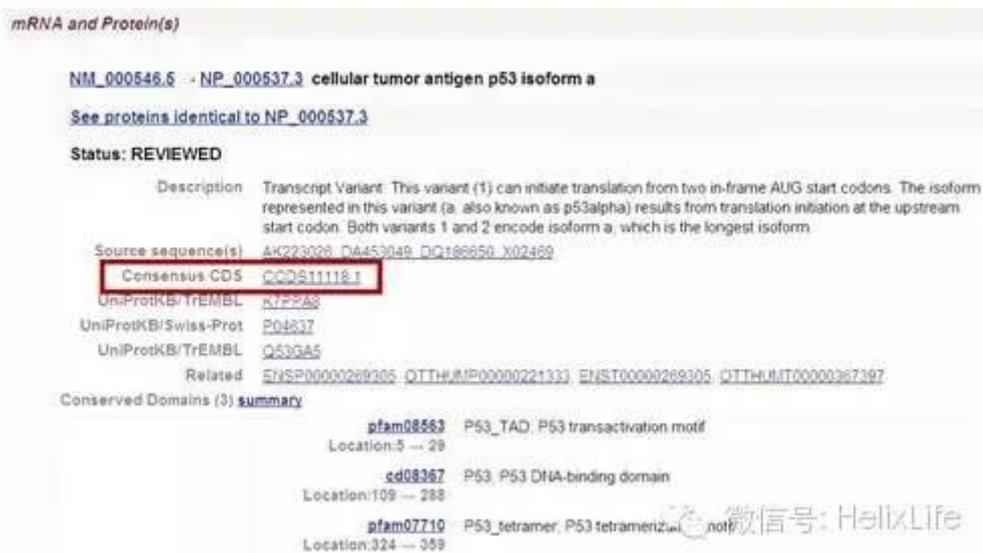
Tools

- Go To
- Search
- Flip Strands
- Markers
- Self Origin
- Sequence Text View
- BLAST and Power Search
- Download
- Protein-Friendly PDF
- References

⑤ 在碱基序列中，红色区域是外显子，绿色是内含子及基因间序列，鼠标在某个区域停留，就会显示该区的信息。红色框内可以自己试试功能，None 可以不显示蛋白序列，方便拷出序列。Flip strand、go to position 你们都懂得。



⑥ 你如果觉得自己去把外显子拼起来得到CDNA序列的话,那你就outs了,在NCBI Reference Sequences (RefSeq)这个选项中,有NG、NM、NP这些你熟悉或者不熟悉的缩写, mRNA and protein(s)这里面,有剪接体的简介、剪接体之间的不同,有几个就会报道几个,很全。然后,重点是有个CCDS这个链接,点进去



⑦ 把网页往下翻,你就会看到CCDS Sequence Data,不同的外显子用不同的颜色区别,点击碱基会用高亮颜色与下面的蛋白序列对应显示。如果需要设计过表达、QPCR引物,预测蛋白大小,这些就足够了。

CCDS Sequence Data

Blue highlighting indicates alternating exons.

Red highlighting indicates amino acids encoded across a splice junction.

Mouse over the nucleotide or protein sequence below and click on the highlighted codon or residue to select the pair.

Nucleotide Sequence (1182 nt):

```
ATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGA
AACTACTTCTGAAAACAACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCCC
GGACGATATTGAAACAATGGTTCACTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTCCAGAAATGCCAGAGGCTGCT
CCCCCGTGGCCCTGCACCAGCAGCTCCTACACCGCGGGCCCTGCACCAGCCCCCTCTGGCCCTGT
CATCTTCTGTCCCTTCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCATTCTGG
GACAGCCAAGTCTGTGACTTGCACGTACTCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACC
TGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCGCCCGCCGTCGCGGCCATGGCCATCTACA
AGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGG
TCTGGCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGAAGGAAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAAC
ACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCTATGAGCCGCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACT
ACAACACTACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATCATCACACT
GGAAGACTCCAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTTGTCCTGTCTGGGAGA
GACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGAGCCTACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCA
CTAAGCGAGCACTGCCAACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAGAAACCACTGGATGGAGAATA
TTTACCCTTCAGATCCGTGGGCGTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCCTTGGAACTC
AAGGATGCCCAGGCTGGGAAGGAGCCAGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACTGAAGTCCAAAAAGG
GTCAGTCTACCTCCCGCCATAAAAAACTCATGTTCAAGACAGAAGGCCTGACTCAGACTGA
```

Translation (393 aa):

```
MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDEPGPDEAPRMPEAA
PPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKT
CPVQLWVDSTPPPGRVVRAMAIYKQSQHMTVEVRRCPHHERCSDSDGLAPPQHILRVEGNL RVEYLDDRN
TFRHSVVVPYEPPEVGSDCCTTIHYNMNCNSSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEV RVCACPR
DRRTEENLRKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGTRFEMFRELNEALEI
KDAQAGKEPGGRAHSSHLKSKKGQSTSRHKLMFKTEGPDSD
```

至于其他的选项的功能，小伙伴们自己去发掘吧，我也跟着学习。

OMG! NCBI 竟然能批量下载基因序列!

小师妹一脸苦闷：酵母双杂交的测序结果回来了，唉，这个周末又不能好好休息，要查 200 多个基因序列，周一老板就要，查这么多基因序列，一个一个的查，我会吐血的。

小师弟眼神迷离：你比我幸运，我不只吐血，还伤身啊，我的基因芯片结果终于出来了，可是要分析 1000 多个基因，还要设计引物，我是一个星期都不用休息了，什么叫悲惨的世界，这就是。

大师兄悠悠飘过：你们俩是猪吗？竟然不知道怎么批量获取基因序列？一脸鄙视，然后开始了他不屑的指导，其实只需要 4 大步就能轻松搞定：

第一步：整理排列好基因登入号，NCBI 检索 nucleotide

第二步：调整展示界面 Display Settings

第三步：选择文件发送内容 Send

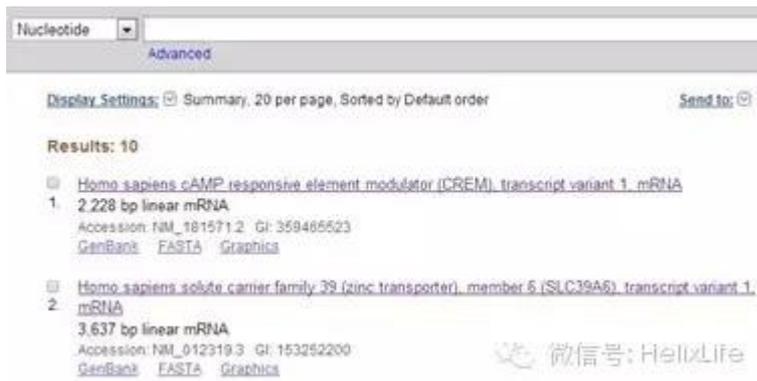
第四步：合适的打开方式 DNASTar 软件（翠花最常用，各有所好）

还不懂吧，来，师兄给你们演示下：

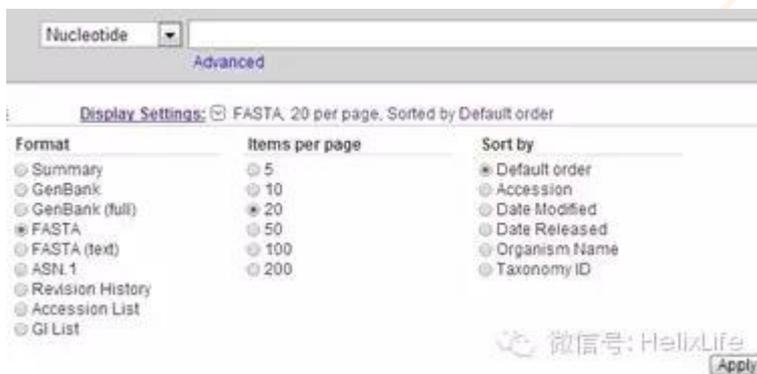
第一步：每个基因都有它的 Accession number（基因登入号，好比身份证一样），这个你们已经拿到手了吧，首先登入 NCBI 网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>，在 All Databases 处下拉，选择 nucleotide，将基因的 Accession number 都排列在一起，用空格隔开，不要有回车符（怎么快速排列就不多说了，excel 就能实现），例如：NM_181571 NM_012319 NM_016651 NM_007678 NM_004642 NM_145918 NM_024504 NM_014847 NM_004196 NM_002295:



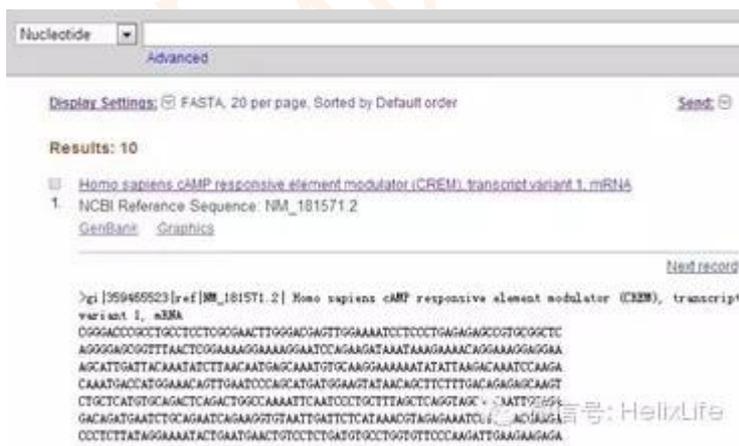
填好后 Search，然后会出现这样一个界面：



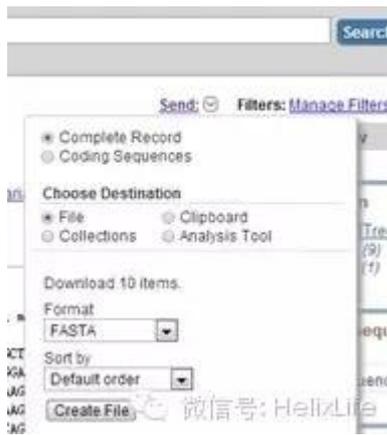
第二步：点击上面的 Display Settings 下拉标记，在 Format 选项中选择 FASTA，在 Sort by 选项中默认选择 Default order（界面展示顺序会和你输入的 Accession number 一致）：



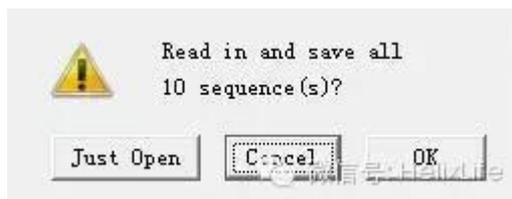
点击 Apply，就会出现下一个界面：



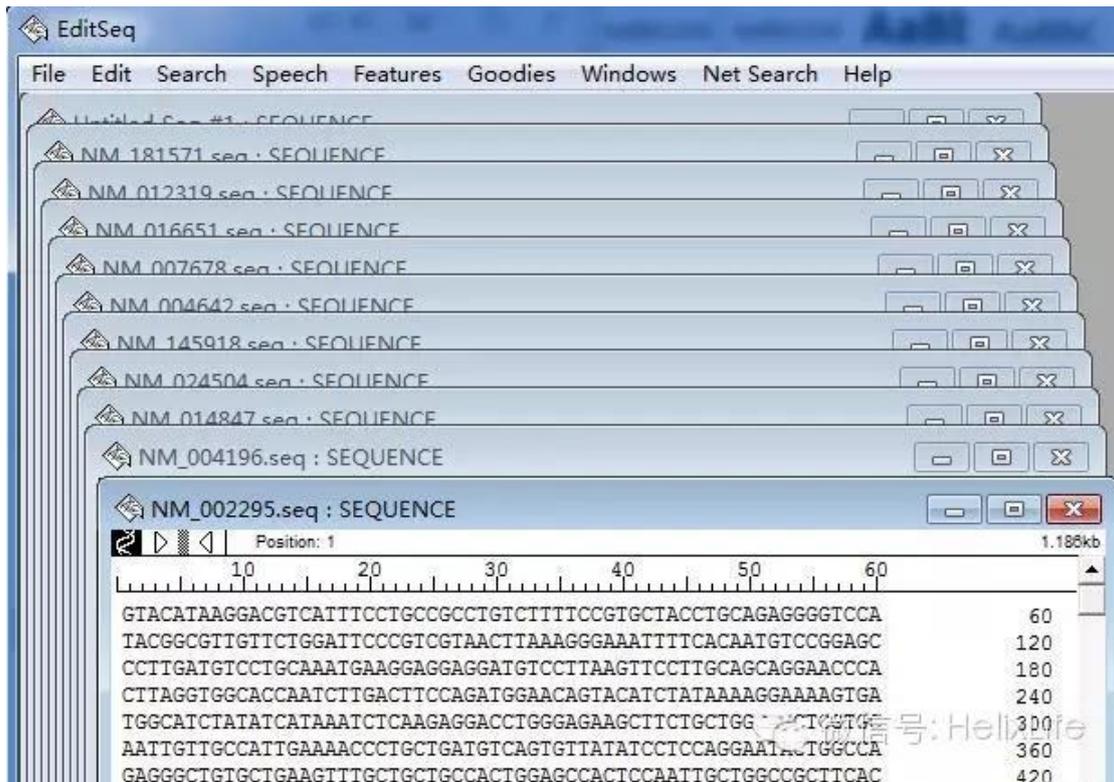
第三步：点击右上角的 Send 下拉标记，选中 Complete Record 和 File，然后在下面 Format 中选择 FASTA，Sort by 不变（默认），最后点击 Create File 保存数据：



第四步：安装 DNASTar 软件（最常用的序列分析软件，和 Office 办公软件类似，有多款用途的工具），打开其中的 Editseq 工具，将保存的文件 `sequence.fasta` 拖进来，这时会弹出一个界面：



点击 Just Open，就可以直接打开所有下载的基因序列；



如果希望一个一个打开，则点击 OK 先保存基因序列（自动以基因的 Accession number 命名），再选择性打开。

名称	类型	大小
NM_002295.seq	EditSeq DNA Sequence File	2 KB
NM_004196.seq	EditSeq DNA Sequence File	2 KB
NM_004642.seq	EditSeq DNA Sequence File	2 KB
NM_007678.seq	EditSeq DNA Sequence File	3 KB
NM_012319.seq	EditSeq DNA Sequence File	4 KB
NM_014847.seq	EditSeq DNA Sequence File	5 KB
NM_016651.seq	EditSeq DNA Sequence File	4 KB
NM_024504.seq	EditSeq DNA Sequence File	3 KB
NM_145918.seq	EditSeq DNA Sequence File	2 KB
NM_181571.seq	EditSeq DNA Sequence File	3 KB

这样就大功告成啦。可是获得了这么多序列可以做什么呢，这个就看你的目的了，分析酶切位点、设计引物、比对序列、构建多表达克隆、设计敲减靶点等等都可以啊！

干货 | 用 Pubmed 来寻找基因信息

说起 Pubmed 我们大家都不陌生，当然，找文献可都靠它呢。不过，这个美国国立医学图书馆的搜索引擎可不止能干这个。它只是 NCBI Entrez 整个数据库查询系统中的一个。PubMed 界面提供与综合分子生物学数据库的连接，其他的内容还包括：DNA 与蛋白质序列，基因图数据，3D 蛋白构象，人类孟德尔遗传在线等。这次我们要讲的就是怎么用里面的 NCBI 来查找所需要的基因信息。

如何寻找基因信息

首先，打开 NCBI 网页 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>，选择[gene]，输入您要的基因名称（可简写），如 CCR9，搜索。

Tabular ▾ 20 per page ▾ Sort by Relevance ▾ Send to: ▾

Did you mean CCR9 as a gene symbol?
Search Gene for CCR9 as a symbol.

Filters: [Manage Filters](#)

Search results
Items: 1 to 20 of 179
Showing Current items.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
<input type="checkbox"/> Ccr9 ID: 12769	chemokine (C-C motif) receptor 9 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Chromosome 9, NC_000075.6 (123767211..123783457)	A130091K22Rik, Cmkbr10, GPR-9-6	
<input type="checkbox"/> CCR9 ID: 10803	chemokine (C-C motif) receptor 9 [<i>Homo sapiens</i> (human)]	Chromosome 3, NC_000003.12 (45886504..45903177)	CC-CKR-9, CDw199, GPR-9-6, GPR28	604738

Results by taxon
Top Organisms [\[Tree\]](#)
Homo sapiens (12)
Mus musculus (12)
Nomascus leucogenys (2)
Rattus norvegicus (2)
Danio rerio (2)
All other taxa (149)
More...

Find related data
Database:

然后，选择种属，如 *homo sapiens*，点击进入所需基因，下拉网页，在"NCBI Reference sequence (Refseq)"下方，

CCR9 chemokine (C-C motif) receptor 9 [*Homo sapiens* (human)]

Gene ID: 10803, updated on 15-Nov-2015

Summary

Official Symbol CCR9 provided by [HGNC](#)
Official Full Name chemokine (C-C motif) receptor 9 provided by [HGNC](#)
Primary source [HGNC:HGNC:1610](#)
See related [Ensembl:ENSG00000173585](#); [HPRD:09200](#); [MIM:604738](#); [Vega:OTTHUMG00000133450](#)
Gene type protein coding
RefSeq status REVIEWED
Organism [Homo sapiens](#)
Lineage Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorhini; Catarrhini; Hominidae; Homo
Also known as GPR28; CDw199; GPR-9-6; CC-CKR-9
Summary The protein encoded by this gene is a member of the beta chemokine receptor family. It is predicted to be a seven transmembrane protein similar to G protein-coupled receptors. Chemokines and their receptors are key regulators of the thymocytes migration and maturation in normal and inflammation conditions. The specific ligand of this receptor is CCL25. It has been found that this gene is differentially expressed by T lymphocytes of small intestine and colon, suggested a role in the thymocytes recruitment and development that may permit functional specialization of immune responses in different segment of the gastrointestinal tract. This gene is mapped to the chemokine receptor gene cluster region. Two alternatively spliced transcript variants have been described. Multiple transcript variants encoding different isoforms have been found for this gene. [provided by RefSeq, Jan 2012]
Orthologs [mouse](#) [all](#)

NG_029472.1 就是该基因的 genomic DNA 序列号, NM_001256369.1 就是异构体 B 的 mRNA 序列号, 而 NP_001243298.1 就是 NM_001256369.1 相应的氨基酸序列号。同理, NM_031200.2 → NP_112477.1 分别是异构体 A 的 mRNA 和氨基酸序列号。Genomic context 中 Location= 3p21.3 是指此基因位于 3 号染色体短臂 (p) 2 带 1 区 3 亚区。

NCBI Reference Sequences (RefSeq)

[RefSeqs maintained independently of Annotated Genomes](#)

These reference sequences exist independently of genome builds. [Explain](#)

Genomic

NG_029472.1 RefSeqGene

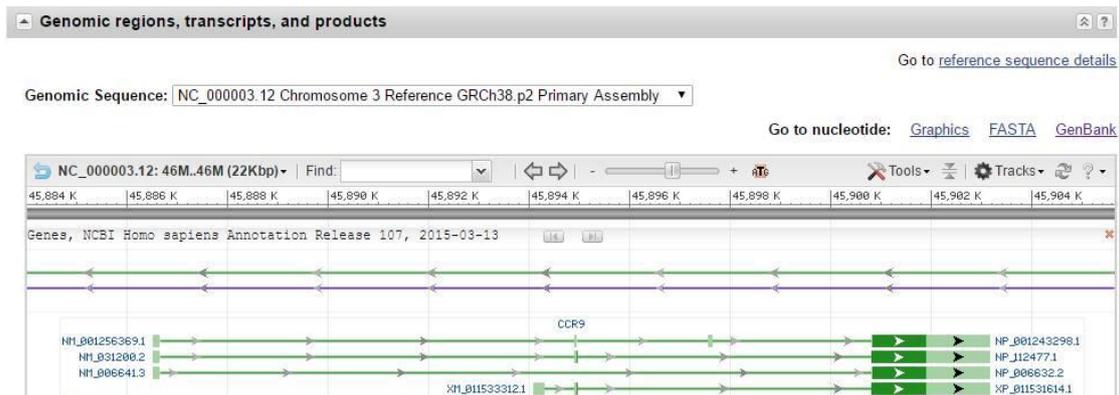
Range 5001..21672
Download [GenBank](#), [FASTA](#), [Sequence Viewer \(Graphics\)](#)

mRNA and Protein(s)

[NM_001256369.1](#) → [NP_001243298.1](#) C-C chemokine receptor type 9 isoform B
[See identical proteins and their annotated locations for NP_001243298.1](#)

点击进入相应页面就会出现详细的外显子、编码序列等信息。

想要知道详细信息的话, 可以点击 [GenBank](#),



Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p2 Primary Assembly

NCBI Reference Sequence: NC_000003.12

[FASTA](#) [Graphics](#)

LOCUS NC_000003 16674 bp DNA linear CON 12-MAR-2015
 DEFINITION Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p2 Primary Assembly.
 ACCESSION [NC_000003](#) REGION: 45886504..45903177 GPC_000001295
 VERSION NC_000003.12 GI:568815595
 DBLINK BioProject: [PRJNA168](#)
 Assembly: [GCF_000001405.28](#)
 KEYWORDS RefSeq.
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
 Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 16674)
 AUTHORS Mizny, D. M., Scherer, S. E., Kaul, R., Wang, J., Yu, J., Sudbrak, R.,

如果你只想获得序列（例如去设计 PCR 引物的时候），那就可以选择 FASTA，这样就得到了 FASTA 格式的序列文件，没有其他数字和格式的干扰。

如何选择目前公认的 mRNA 序号

在这推荐一个网站：mutation@glance, <http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/mutation/>。

Welcome to Mutation@A Glance!

Mutation@A Glance provides the scientific community with an integrated viewer for disease-causing mutations as well as genetic variations observed in human populations or individuals from public databases. The genetic variants can be visualized on the gene or its gene products along with the sequences or protein 3D structures. You can search for genetic variants by gene names, disease names or dbSNP IDs, etc.

输入您查找的基因，如 CCR9, "Go"提交，便会出现 CCR9 的相应界面，点进去就能显示公认的序列号和 DNA 序列。

这样参照的序列号对了，设计引物、基因突变的命名及表述才是对的，发文章时才不会错。（基因突变命名也是一个系统，可以到 NCBI 上下载相关文献）。另外，这一网站 DNA 序列中也提供了目前文献报道的已知的突变位点和 SNP 位点。非常好用。

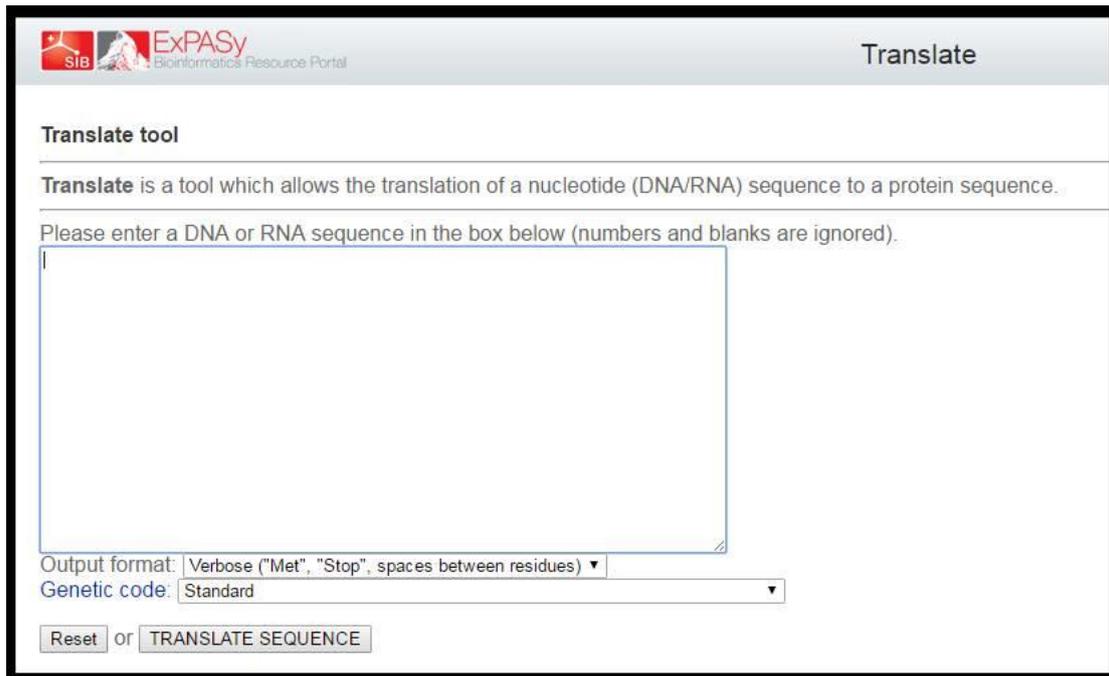
如何预测新基因编码蛋白的氨基酸序列

当我们想研究一个新基因的功能时，我们首先预测一下它是否编码蛋白，如果编码蛋白，那编码出的蛋白的最有可能的氨基酸序列是什么？

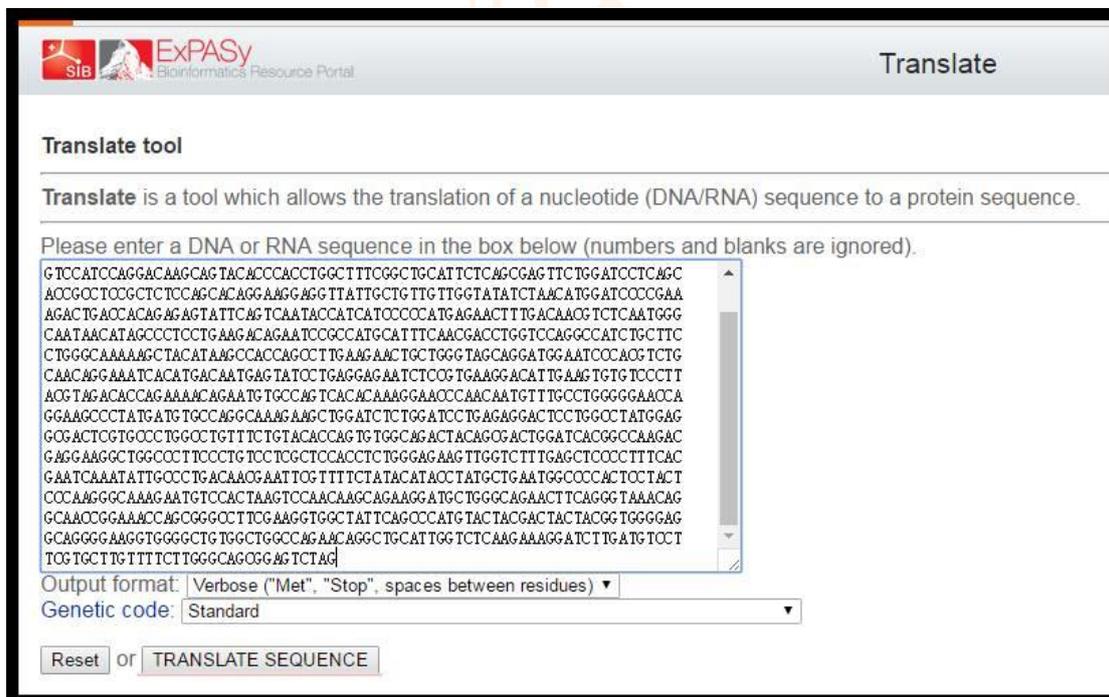
当我们预测出该基因编码的蛋白的氨基酸序列后，在数据库中比对，如果比对出了一个高度相似的已知蛋白，那我们可以根据该蛋白的功能来大概的推测我们要研究的新基因所编码的蛋白的功能，这将为我们之后研究该新基因的功能提供方向。

接下来我们就来说一下怎样预测一个新基因编码的蛋白的氨基酸序列。首先我们需要做的就是通过 5'- and 3'-RACE 技术得到该基因的全长 cDNA 序列，然后按以下步骤进行即可。

1. 首先打开网址：<http://web.expasy.org/translate/>



2.将 DNA/RNA 序列输入白色框中（应输入 cDNA 序列）。



3.点击下方的 TRANSLATE SEQUENCE。

4. 点击 TRANSLATE SEQUENCE 后会看到如下结果（红色部分为可能的该段 DNA 序列的 ORF 编码的氨基酸，因为输入 cDNA 序列后，并不是该段序列上的所有碱基都用来编码氨基酸，而是只有位于 ORF 框内的碱基用来编码氨基酸，ORF 是不确定，所以编码的蛋白也不确定，那我们现在要做的就是得到最有可能的 氨基酸序列，红色区域为各种可能）。

5. 一般我们认为红色最多（即最长）的就是该段 cDNA 序列编码的氨基酸序列。

6.因为第一个红色最多（即最长），那接下来就点击第一个。



7.点击进入后会看到以下结果，我们会看到红色中有许多的蓝色字母（画红线的部分），如果我们仔细看了之后会发现蓝色部分就是 M---甲硫氨酸，我们都知道真核蛋白的起始氨基酸都是甲硫氨酸，也就是说画红线的部分就是可能的起始氨基酸部分，那只有一个是有可能的，那就是使氨基酸序列最长的。因为下图的结果中只有一个终止-----在最后面，那我们选择第一个划线的 M 作为起始氨基酸使编码的氨基酸序列最长，所以第一个 M 最有可能是起始氨基酸。



8.那接下来就点击第一个蓝色的 M，点击后进入会看到以下结果（红色框内即为该段 cDNA 序列最有可能编码的氨基酸序列）

The screenshot shows the ExPASy Translate interface. At the top, it says "Translate". Below that, there is a header for "SIB Bioinformatics Resource Portal". The main content area contains the following text:

```

ID VIRT469          Unreviewed:      383 AA.
AC VIRT469;
DE Translation of nucleotide sequence generated on ExPASy
DE on 01-May-2017 by 202.120.136.53.
CC -|- This virtual protein sequence will automatically be deleted
CC from the server after a few days.
DR SWISS-2DPAGE: VIRT469: VIRTUAL.
SQ
SEQUENCE 383 AA. 932F3175150DFC9E CRC64.
MAMRPGMLLM LLYTSHSSA IGGIQRATIA DLKKNLVSS TEFPWVSIQ DRQYTHLAFG
CILSEFWLIS TASAQGRKE VIATWGISNM DPRKTIAREY SYNTIIPHEN FFWVSMHWI
ALLKTESAMH FFDLQAQCF LGRKLRPFA LKQVWAGWN PFSATQREHT MSTLRISVR
DIEVCLRRH QRTECASHTK EPNWVCLGEP GSPMCOAKK LDNLWLRGLL AYGDSCPGL
FLYTSVADYS DWITAKTRKA GPSSLSSLHLW EKLWVLEPFH ESNIALTINS FSIHTYAEWP
HYSQGRMS TKSNGKQDAG QNFRVNRQPE TSPSEVAIQ PMYTDYVGE AGEQAVAGQ
NRLHWQERI LMSFVLFVG SGV
//
Sequence in FASTA format

```

Below the sequence, there are four tool links:

- [BLAST](#) BLAST submission on ExPASy/SIB
- Sequence analysis tools: ProtParam, ProtScale, Compute pI/Mw, PeptideMass, PeptideCutter,
- ScanProsite
- Direct Submission to SWISS-MODEL

9.我们还可以看到在结果的的最下方有一些工具（点击第一个划线部分可以得到该段氨基酸序列的 Fast 格式。那下方的四个划线部分就是一些分析蛋白氨基酸序列的一些工具，比如可以拿该段氨基酸序列在数据库中 Blast，划线部分的这些工具就是对该段氨基酸序列进行进一步的分析，得到有关该段氨基酸序列更多的信息）。

This screenshot is identical to the one above, but with red underlines highlighting the following links:

- FASTA format
- BLAST
- Sequence analysis tools: ProtParam, ProtScale, Compute pI/Mw, PeptideMass, PeptideCutter,
- ScanProsite
- Direct Submission to SWISS-MODEL

如何在 NCBI 上进行菌种的同源性比对

当我们将未知菌株送到公司测序时，并不意味着公司会直接告诉我们未知菌株是什么种什么属的，他们只会给你未知菌株的测序序列，这时候就需要我们自己在 NCBI 上进行同源性比

对。下面结合我自己的实验经历跟大家交流一下。

首先，我们先来弄清楚几个概念：

Query: 数据库中的序列

alignments: 比对上的两个序列

hits: 两个序列比对上的片段

Score: 比对得分，如果序列匹配上得分，不一样，减分，分值越高，两个序列相似性越高

E Value: 相对的一个统计值，值越小，越可信，

Length: 输入序列的长度

Identities: 一致性，就是两个序列有多少是一样的

Accession: 登录号

NCBI 网站：

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

操作步骤

1、打开上述网址，出现图 1 页面，点击 ，进入图 2 页面

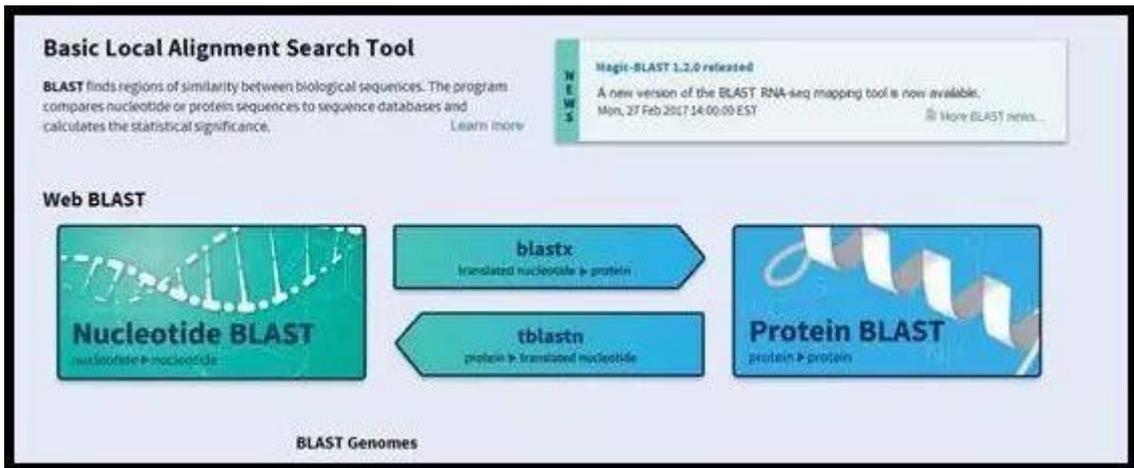


图 1



2、在图 2 界面的这 里 以

JF439461//CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGC
 CATTACCGAGTGC
 GGGTCTTTGGGCCAACCTCCCATCCGTGCTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCC
 GCCGTTGTCGGCCGCCGGGGGGCGCCTCTGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGAGACCCCAACACGA
 ACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTG
 GTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA
 GTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAA
 GCCCGGCTTGTGTGTTGGGTGCCCGTCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACC
 GCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTC
 CAACCATTCTTCCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGA

GGA 为例。选中页面下的 然后点击 BLAST。出现图 3 和图 4 的页面（图 3 和 4 是同一页面的上下两部分）。



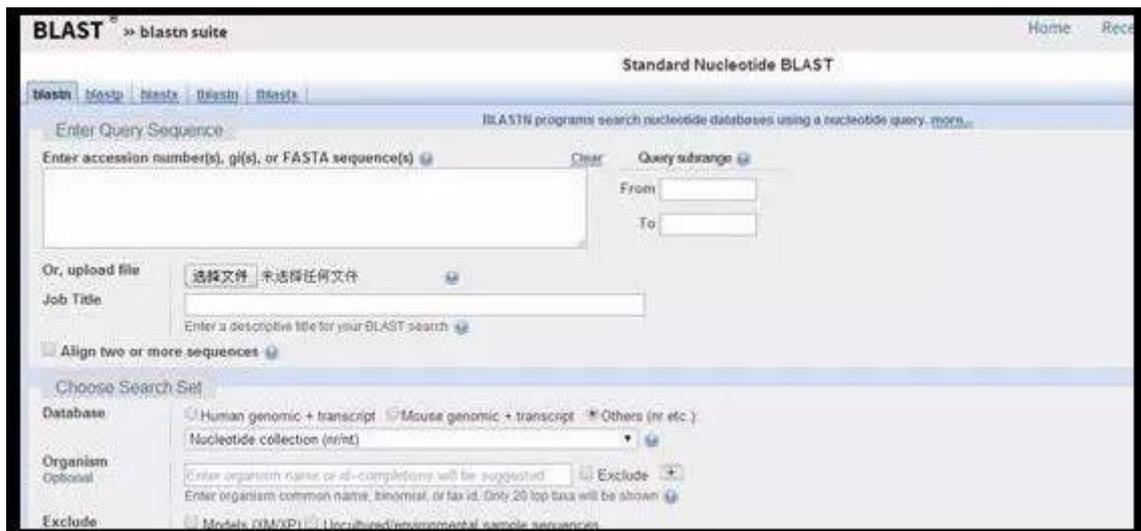
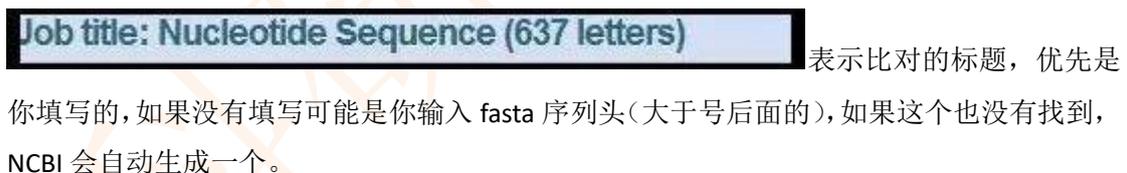


图 2

3、在图 3 页面上



表示你可以调整参数，重新比对或者保存搜索条件以便下次比对，调整报告显示的参数，以更符合你的要求、下载你比对的结果。



表示你输入序列的信息，包括标识号、描述信息、类型、长度。



表示你可以查看其他报告，比如摘要、分类、距离树等。

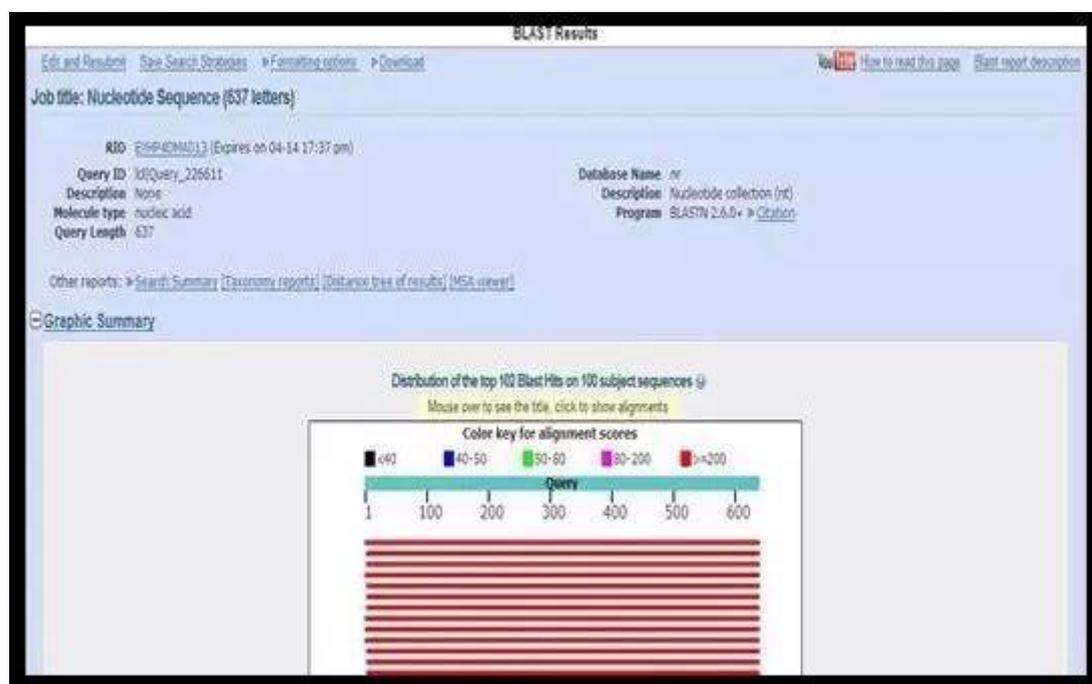


图 3

4、在图 4 的页面上 Ident 越高，表明序列的同源性也就越高。通过同源性较高的描述你可以初步判断未知菌株的类别。点击同源性较高的，比如我们点开第一个，出现图 5 的页面，将滚动条向下拉至图 6，得到比对同源性高的序列，将其登录号以及序列保存在文本文档中，通过系统发育树我们能具体判别未知菌株属于哪种菌株。

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments [Circular](#) [GenBank](#) [Sequence](#) [Display options](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger isolate F34 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1177	1177	100%	0.0	100%	JF439461.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger strain NJA-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1171	1171	99%	0.0	100%	KJ385316.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger strain KAM 02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1171	1171	99%	0.0	100%	KC119204.1
<input type="checkbox"/>	Fungal endophyte sp. 0112 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1171	1171	100%	0.0	99%	HM537079.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger contig AN349133, genomic contig	1171	3515	99%	0.0	100%	AM270982.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus niger contig AN349100, genomic contig	1171	1171	99%	0.0	100%	AM270981.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured fungus clone CM481 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1166	1166	99%	0.0	99%	KF892542.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus sp. strain S83 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1162	1162	100%	0.0	99%	KX529746.1

图 4

GenBank Send to

Aspergillus niger isolate F34 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: [JF439461.1](#)

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

Go to: [🔍](#)

LOCUS JF439461 637 bp DNA linear PLN 19-APR-2011

DEFINITION *Aspergillus niger* isolate F34 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION JF439461

VERSION JF439461.1

KEYWORDS .

SOURCE *Aspergillus niger*

ORGANISM *Aspergillus niger*
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae; *Aspergillus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 637)

AUTHORS Han, G., Feng, X. and Tian, X.

TITLE Isolation and evaluation of terrestrial fungi with algicidal ability from Lijin Mountain, Nanjing, China

图 5

```

                2, and 28S ribosomal RNA"
ORIGIN
   1 cttggtcatt tagaggaagt aaaagtcgta acaaggttcc cgtaggtgaa cctgcggaag
   61 gatcattacc gagtgcgggt cctttgggcc caacctccca tccgtgtcta ttgtaccctg
  121 ttgcttcggc gggcccgccg cttgtcggcc gccggggggg cgcctctgcc ccccgggccc
  181 gtgcccgcg gagaccocaa cacgaacact gtctgaaagc gtgcagtctg agttgattga
  241 atcaatcag ttaaaacttt caacaatgga tctcttggtt ccggcatcga tgaagaacgc
  301 agcgaatgc gataactaat gtgaattgca gaattcagtg aatcatcgag tctttgaacg
  361 cacattgccc cccctggtat tccggggggc atgcctgtcc gagcgtcatt gctgcocctca
  421 agcccggctt gtgtgttggg tcgccgtccc cctctccggg gggacgggcc cgaaaggcag
  481 cggcggcacc gctccgac ctcgagcgta tggggcttgg tcacatgctc tgtaggattg
  541 gccgggcgct gccgacgttt tccaaccatt ctttccaggt tgacctcgga tcaggtaggg
  601 ataccgcgtg aacttaagca tatcaataag cggagga

```

图 6

扫盲贴：NCBI 上的这些字母都是些什么鬼

NCBI 上基因前面有个 accession (编号) 分别有 **NC**、**NM**、**NP**、**GI**、**XP**、**XM**、**BC**、**AB**、**NG**、**AJ**、**AC**、**AY** 和 **AF** 等等，然后后面是一串数字，比如：

NM_01105295.1	Sus scrofa n
AB425547.1	Sus scrofa N
EU345431.1	Sus scrofa n
XM_002914230.1	PREDICTED:
XM_003477684.1	PREDICTED:
NM_001002889.1	Bos taurus n
XM_004014980.1	PREDICTED:
AY594541.1	Saquinus oec
XM_002499510.1	PREDICTED:
NM_115857.2	Mus musculu
AF520574.1	Mus musculu
AY160821.1	Mus musculu
BC164407.1	Synthetic co
AY160820.1	Mus musculu
AK089843.1	Mus musculu
NM_001106172.1	Rattus norve
AC005508.7	Homo sapien
BC047142.2	Mus musculu

天哪，这都是些什么鬼！！特别是看 Blast 结果时，这些编号到处都是的，根本不知道哪个才是想要的好么！

A00127.1	AA000705.1	AB000095.1	AD000712.1	AF000017.1	AI001064.1
AJ000001.1	AK000001.1	AL009266.1	AM000001.1	AT006305.1	AU014597.2
AV000174.1	AW000796.1	AX713278.1	AY003920.1	BB004412.1	BC000001.2
BE003291.1	BF000400.1	BG003040.1	BI000785.1	BJ989456.1	BK000002.1
BL000019.1	BM005736.1	BN000087.1	BP192775.1	BQ000004.1	BR000036.1
BT006627.1	BU052737.1	BV210386.1	BX088742.1	BY000007.1	BZ690126.3
C00487.1	CA305950.1	CB043913.1	CD000001.1	CF1041.1	CG671741.1
CJ040988.1	CK000110.1	CL210542.2	CN250002.1	CO38888.1	CQ819099.1
CR407601.1	CT000143.1	CU012932.1	CV023001.1	422364.1	D00003.1
DA000315.1	DB000953.1	DC200001.1	DD72993.1	DQ000004.1	DR000002.1
DT215613.1	DV039750.1	DW000900.1	DX203808.1	E00175.1	EB385493.1
EC440053.1	EF01091.1	EG7356.1	EH094589.1	EI504936.1	EL594621.1
ES309123.1	EU000460.1	EV7390.1	EX487988.1	EY892390.1	F01203.1
FJ002243.1	FM029308.1	FN152980.1	FQ074486.1	FR682664.1	FY210693.1
G49230.1	GO136344.1	GH454882.1	GQ129214.1	GU014832.1	H00840.1
HE572747.1	HM002604.1	HQ008360.1	HY002496.1	J00068.1	JF262036.1
JN003607.1	JQ012741.1	JX013981.1	K00001.1	L00131.1	M00001.1
N20370.1	NM_000014.4	NR_000001.7	R00579.1	S34389.1	T08293.1
U00001.1	V00478.1	W00439.1	X00033.1	XM_001000016.2	XR_000375.1
Y00023.1	Z00036.1				



莫慌，麦子今天就给大家理理顺！

ACCESSION 是 NCBI 序列数据中我们常用到编号(另一个是 GI)。ACCESSION 形式为 **CC_#####**，其中 CC 为两个字母，其不同组合又可以区分为蛋白序列、核酸序列或基因组序列，而#为位数不等的数字；ACCESSION 后面又会加版本号，以 **CC_#####.#**形式表示，最后的尾数递增表示序列信息较之前的版本有所修改。这样 **ACCESSION+版本号**就是一个唯一的表示，代表一个唯一的序列，而且这个编号不会改变。

以下是麦子帮大家找到的整理表格！具体的各项说明及序列来源说明可以查看 [NCBI](#)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/about/>)

ACCESSION	MOLECULE	METHOD	NOTE
AC_123456	Genomic	Mixed	一些可供选择的注释的基因组序列 主要用来标记病毒和原核生物。
AP_123456	Protein	Mixed	AC_标记序列对应的蛋白产物。
NC_123456	Genomic	Mixed	完整的基因组分子序列，标记的类别包括基因组、染色体、细胞器、质粒。
NG_123456	Genomic	Mixed	不完整的基因组区域，提供NCBI基因组注释途径。比较有代表性有不转录的假基因或者那些很难自行化注释的基因组簇。
NM_123456	mRNA	Mixed	转录产物序列；成熟mRNA转录本序列。
NM_123456789			

微信号: HelixLife

一般来说，mRNA 和基因组序列是我们主要的寻找对象。如果想找标准序列的话，mRNA 就采用 NM_开头的，基因组用 NC_或者 AC_开头的。so easy!

NP_123456 NP_123456789	Protein	Mixed	蛋白产物；主要是全长转录氨基酸序列，但也有一些只有部分蛋白质的部分氨基酸序列。
NR_123456	RNA	Mixed	非编码的转录子序列，包括结构RNAs，假基因转子等。
NT_123456	Genomic	Automated	BAC或者鸟枪测序法的还未完全注释的测序序列。
NW_123456 NW_123456789	Genomic	Automated	BAC或者鸟枪测序法的还未完全注释的测序序列。
NZ_ABCD12345678	Genomic	Automated	收集的各种利用鸟枪法测序的测序计划，ABCD代表的是计划的名称。

微信号: HelixLife

XM_123456 XM_123456789	mRNA	Automated	转录产物；mRNA来自基因组注释，序列相当于基因组重叠群。
XP_123456 XP_123456789	Protein	Automated	蛋白产物。序列相当于基因组重叠群。
XR_123456	RNA	Automated	转录产物；非编码区来自基因组注释，序列相当于基因组重叠群。
YP_123456 YP_123456789	Protein	Mixed	蛋白产物。不涉及到转录，主要用来标记细菌、病毒和线粒体。
ZP_12345678	Protein	Automated	蛋白产物，主要是用电脑自动注释。
NS_123456	Genomic	Automated	未知生物分子基因组序列。

微信号: HelixLife

不同的编码代号代表不同的意思，如 **NM_**开头的表示标准序列，**XM_**表示预测的蛋白编码序列，**NR_**表示非编码蛋白的 mRNA 序列，**AF** 开头的表示克隆序列，**BC** 开头的表示模板序列.....

上面的表格中是一些常见序列的 accession 号，不过大家知道 NCBI 中还有很多其他的 accession 号么？！其中，仅与 RNA 相关的就有 116 种！不过，科研人员生存不易，不必在细节上作死自己，麦子建议大家按需选择或者需要时查询即可！

1.2 DNA 序列比对

Blast, 有种, 有料, 有用!

作者：子非鱼

首发日期：2015-07-05

NCBI 中的 Blast 被誉为序列比对界中的领头羊，并非浪得虚名的，他多才多艺（功能多样），博学多识（比对面面俱到），还广交天下名人雅士（可获得各大数据库的信息，他就是有种！）。今天，小鱼让大家见识一下老大的风采。

首先，登陆 blast 主页 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Blast 导航主页面主体包括三部分 **BLAST Assembled Genomes**、**Basic BLAST** 和 **Specialized BLAST**。

BLAST Assembled Genomes: 就是让你选择你要对比的物种，点击物种之后即可进入对比页面。

Basic BLAST 包含 5 个常用的 Blast:

1. BLASTP 是蛋白序列到蛋白库中的一种查询。

2. BLASTX 是核酸序列到蛋白库中的一种查询。

3. BLASTN 是核酸序列到核酸库中的一种查询。

4. TBLASTN 是蛋白序列到核酸库中的一种查询。与 BLASTX 相反，它是将库中的核酸序列翻译成蛋白序列，再同所查序列作蛋白与蛋白的比对。

5. TBLASTX 是核酸序列到核酸库中的一种查询。此种查询将库中的核酸序列和所查的核酸序列都翻译成蛋白（每条核酸序列会产生 6 条可能的蛋白序列）。

Specialized BLAST: 是一些特殊目的的 Blast，如 Primer-BLAST、IgBLAST。

The image shows a screenshot of the NCBI BLAST search interface. It is divided into three main sections, each with a red box around its title:

- BLAST Assembled Genomes:** This section is titled "Find Genomic BLAST pages:". It features a text input field with the placeholder "Enter organism name or id--completions will be suggested" and a blue "GO" button. To the right of the input field is a grid of checkboxes for various organisms: Human, Mouse, Rat, Cow, Pig, Dog, Rabbit, Chimp, Guinea pig, Fruit fly, Honey bee, Chicken, Zebrafish, Clawed frog, Arabidopsis, Rice, Yeast, and Microbes.
- Basic BLAST:** This section is titled "Choose a BLAST program to run:". It lists several options with brief descriptions and the algorithms used:
 - [nucleotide blast](#): Search a nucleotide database using a nucleotide query. Algorithms: blastn, megablast, discontinuous megablast.
 - [protein blast](#): Search protein database using a protein query. Algorithms: blastp, psi-blast, phi-blast, delta-blast.
 - [blastx](#): Search protein database using a translated nucleotide query.
 - [tblastn](#): Search translated nucleotide database using a protein query.
 - [tblastx](#): Search translated nucleotide database using a translated nucleotide query.
- Specialized BLAST:** This section is titled "Choose a type of specialized search (or database name in parentheses.)". It contains a single checkbox option: Make specific primers with [Primer-BLAST](#).

假设以下为一未知蛋白序列，我们通过 blast 搜索来获取一些这个序列的信息。

点击选择“BLASTP”，粘贴序列到指定地方。

Enter Query Sequence

BLASTP programs search protein databases using a protein query. [more...](#)

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) Clear

RDQ
YMRTEGFLLVFAVNNAKSFEDISAYREQIKRVKDADVVFPMVLVGNKCDLQVRAMDMQQAREVAKNY
DIP
FIETSAKTRMGVDDAFYTLVREIRKDRERVFVKVIRIGSRNSKRKCIVF

Query subrange
From
To

Or, upload file 浏览...

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

Choose Search Set

Database

Organism
Optional
Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown.

Exclude
Optional Exclude
 Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences

Entrez Query
Optional
Enter an Entrez query to limit search [You may](#) [Create custom database](#)

Program Selection

Algorithm

blastp (protein-protein BLAST)
 PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)
 PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST)
 DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST)
Choose a BLAST algorithm

BLAST Search database Patented protein sequences(pat) using Blastp (protein-protein BLAST)
 Show results in a new window

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow and marked with **+** sign

根据需要选择数据库，如果不明白，
比对一次再比较一个结果就明白。

根据目的选择Blast的方式

点击这里可以设置更多的参数

点击“Algorithm parameters”设置详细参数：

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow and marked with **+** sign

General Parameters

Max target sequences
Select the maximum number of aligned sequences to display

Short queries Automatically adjust parameters for short input sequences

Expect threshold **E值**

Word size

Max matches in a query range

Scoring Parameters

Matrix

Gap Costs

Compositional adjustments

Filters and Masking

Filter Low complexity regions

Mask Mask for lookup table only
 Mask lower case letters

BLAST Search database Patented protein sequences(pat) using Blastp (protein-protein BLAST)
 Show results in a new window

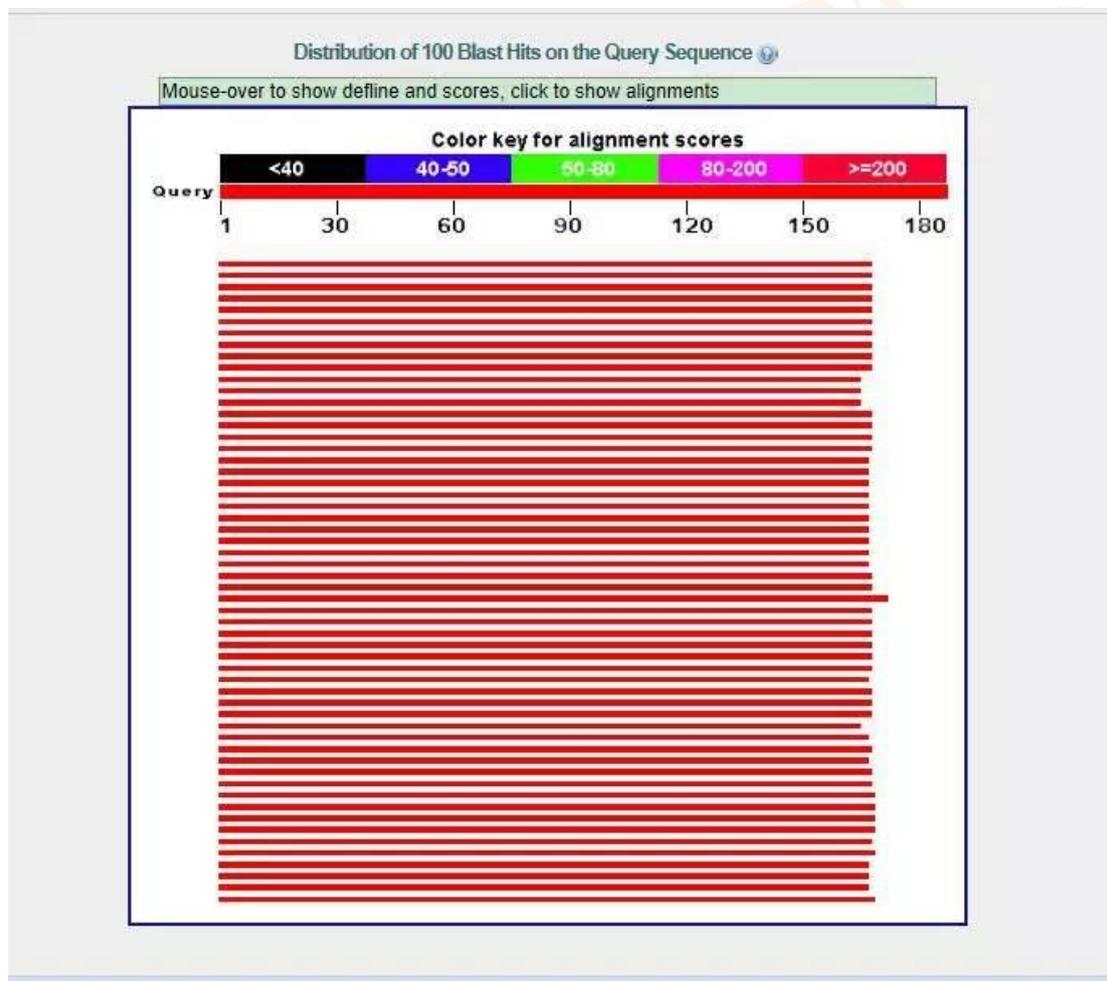
显示的最大结果数

点击运行

点击运行后，结果如下图，请注意数据库的名字和说明，如果不合适，请迷途知返哦~

The screenshot shows a BLAST search interface. At the top, there are navigation links: "Edit and Resubmit", "Save Search Strategies", "Formatting options", and "Download". On the right, there is a red box containing the text "所选数据库及其说明" (Selected database and its description). Below this, the "Database Name" is listed as "pat", with a description: "Protein sequences derived from the Patent division of GenBank". The "Program" is listed as "BLASTP 2.2.31+". On the left, the "Protein Sequence (187 letters)" section shows the "Query ID" as "Id|Query_72605", "Description" as "None", "Molecule type" as "amino acid", and "Query Length" as "187". There is also a "RID" field with the value "TEYP92B9014" and an expiration date of "07-05 14:18 pm". At the bottom, there are links for "Search Summary", "Taxonomy reports", "Distance tree of results", and "Multiple alignment".

Blast 的结果显示图：颜色比例尺，可以简单的理解为红色的线表示有较好的比对结果。



Blast 结果的描述区域, **Max Score**: 匹配片段越长、相似性越高则 Score 值越大。

E value 是得到上述 Score 值的概率的大小。E 值越小表示随机情况下得到该 Score 值的可能性越低。

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

Description	匹配的分值 Max score	Total score	Query cover	E 值 E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Sequence 3 from patent US 8242326	301	301	89%	7e-103	86%	AFQ80220.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product [synthetic construct]	300	300	89%	2e-102	86%	CBKS1874.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product [synthetic construct]	300	300	89%	2e-102	86%	CBKS1881.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product [synthetic construct]	300	300	89%	2e-102	86%	CBKS1873.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product [synthetic construct]	299	299	89%	5e-102	86%	CBKS1880.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product [synthetic construct]	299	299	89%	5e-102	86%	CBKS1875.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product [synthetic construct]	299	299	89%	6e-102	86%	CBKS1879.1
<input type="checkbox"/> Sequence 7 from patent US 7329649	299	299	89%	6e-102	86%	ACC01076.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product [synthetic construct]	298	298	89%	9e-102	86%	CBKS1877.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product [synthetic construct]	298	298	89%	1e-101	86%	CBKS1878.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product [synthetic construct]	296	296	88%	4e-101	87%	CBX55886.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product [synthetic construct]	296	296	88%	5e-101	87%	CBX55885.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product [synthetic construct]	296	296	88%	5e-101	87%	CBX55884.1
<input type="checkbox"/> Sequence 10 from patent US 7329649	296	296	89%	6e-101	85%	ACC01079.1
<input type="checkbox"/> Sequence 11 from patent US 7329649	296	296	89%	7e-101	85%	ACC01880.1

Blast 比对结果的详细版: **Expect(E 值)**、**Identities (一致性)**、**Gaps (缺失或插入)** 三项是评价 blast 结果的标准。E 值接近零或者为零时，具体上就是完全匹配了。一致性: 匹配上的碱基数占总序列长的百分数。

Alignments

Download GenPept Graphics

Sequence 3 from patent US 8242326
 Sequence ID: [gb|AFQ80220.1](#) Length: 188 Number of Matches: 1
[See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 1 to 168 GenPept Graphics Next Match Previous Match

	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
301 bits(771)	7e-103	Compositional matrix adjust.	145/168(86%)	155/168(92%)	0/168(0%)

输入的序列

Query 1 MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAG 60
 MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAG 60

Sbjct 1 MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAG 60

比对到的序列

61 QEEYSAMRDQYMRTGEGFLVFAVNNAKSFEDISAYREQIKRVKDADVPMVLVGNKCDL 120
 QEEYSAMRDQYMRTGEGFL VFA+NN KSFEDI YREQIKRVK++ VPMVLVGNKCDL 120

Sbjct 61 QEEYSAMRDQYMRTGEGFLVFAVNNAKSFEDIHHYREQIKRVKDSADVPMVLVGNKCDL 120

Query 121 QVRAMDMQQAQEVAKNYDIPFIETSAKTRMGVDDAFYTLVREIRKDR 168
 R +D +QA+E+A++Y I PFIETSAKTR GVDDAFYTLVREIRK +E 168

Sbjct 121 PSRTVDTKQAQELARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLVREIRKHKE 168

Download GenPept Graphics

unnamed protein product [synthetic construct]
 Sequence ID: [emb|CBK51874.1](#) Length: 188 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 168 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps

有料，但不难理解

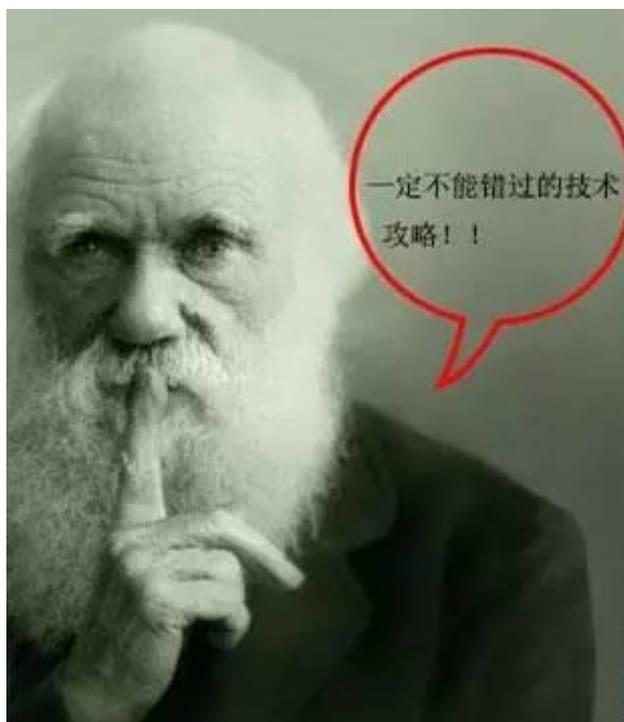
有用，但不难操作

这就是 blast 的魅力所在

【实验工具专栏】要套近乎？先用 DNAMAN 证明我祖宗就是你祖宗！

作者：翠花

首发日期：2015-06-28



有“缘”没“缘”，让 DNAMAN 告诉你

在生物学的研究中,有一个常用的方法,就是**通过比较分析获取有用的信息和知识**。想当年,达尔文爷爷正是研究比较了达尔文雀(galapagos finches)同其它一些物种的形态学特征,从而提出了**自然选择学说**。

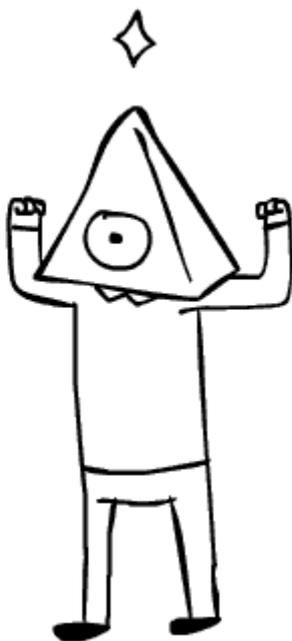
Darwin's Finches

Brian J Small



达尔文雀或加拉巴哥雀是 13 或 14 种近缘的雀鸟物种,由查尔斯·达尔文所发现,当中有 13 种在加拉巴哥群岛生活,另有一种在科科斯群岛。

在科技飞速发展的今天，对两个物种进行**全基因组序列比较**已经不再是一个梦想。达尔文爷
爷泉下有知，一定会喜极而泣！



序列比对的理论基础是**进化学说**：如果两个序列之间具有足够的相似性，就推测二者可能有共同的进化祖先，**经过序列内残基的替换、残基或序列片段的缺失、以及序列重组等遗传变异过程分别演化而来**。序列相似和序列同源是不同的概念，序列之间的相似程度是可以量化的参数，而序列是否同源需要有进化事实的验证。

物以类聚人以群分，就像你要了解一个人可以通过了解他的朋友一样，序列比对是从已知获得未知的一个十分有用的方法。另外，**物种亲缘树**的构建都需要进行生物分子序列的相似性比较。

序列比对按照数目、范围和对象来分，可以分为：

- 1.两序列比对和多序列比对
- 2.全局比对和局部比对

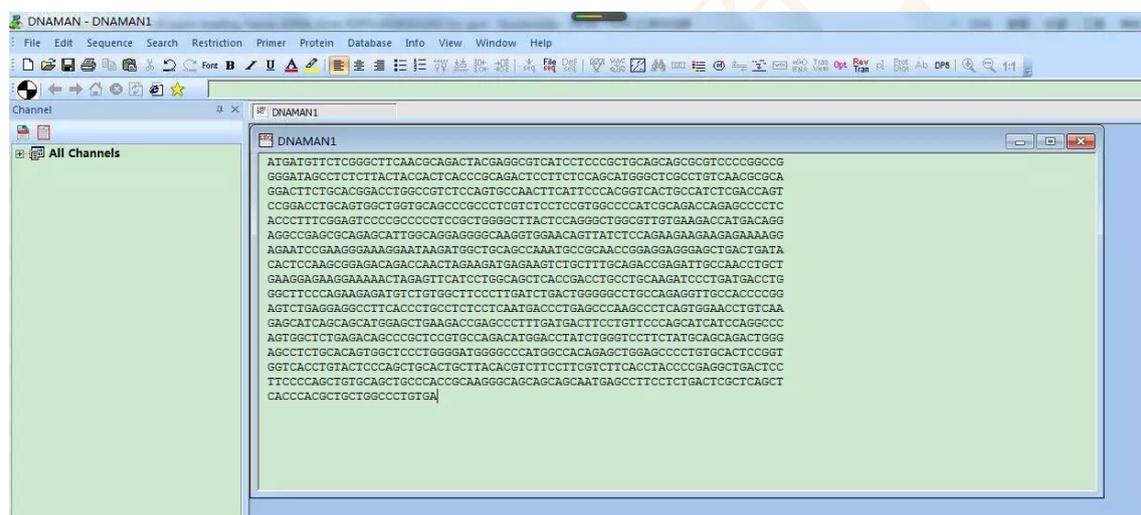
3.核酸序列比对和氨基酸序列比对。

限于篇幅，翠花今天只给大家介绍如何使用 **DNAMAN 8** 作核酸多序列比对。

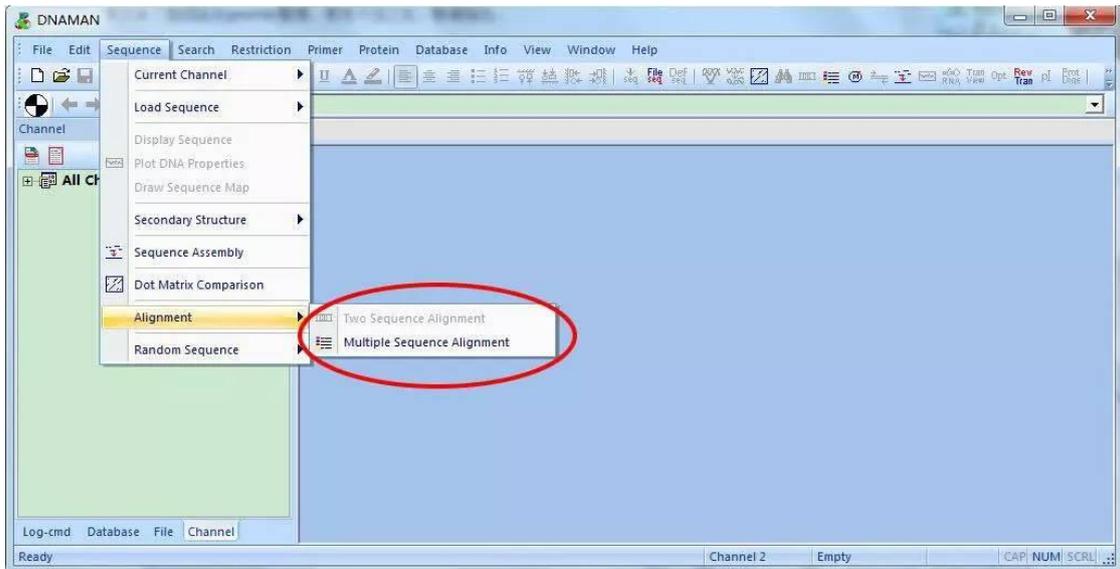
多序列比对就是把两条以上可能有系统进化关系的序列进行比对的方法。其意义在于它能够把不同种属的相关序列的比对结果按照特定的格式输出，并且在一定程度上反映它们之间的相似性。

首先，打开 DNAMAN 8 软件后可以看到以下界面：第一栏为主菜单栏，除了帮助菜单外，有十个常用主菜单；第二栏为工具栏；第三栏为浏览器栏。

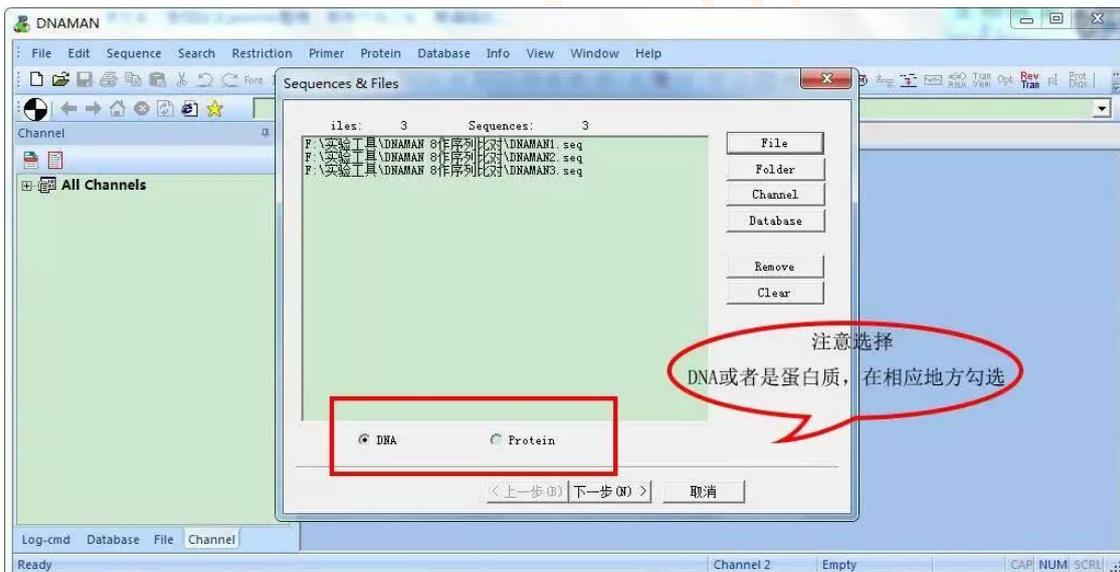
打开 **File-New**，将序列粘贴到弹出的窗口中，点击 **File-save**,保存到指定的文件夹。



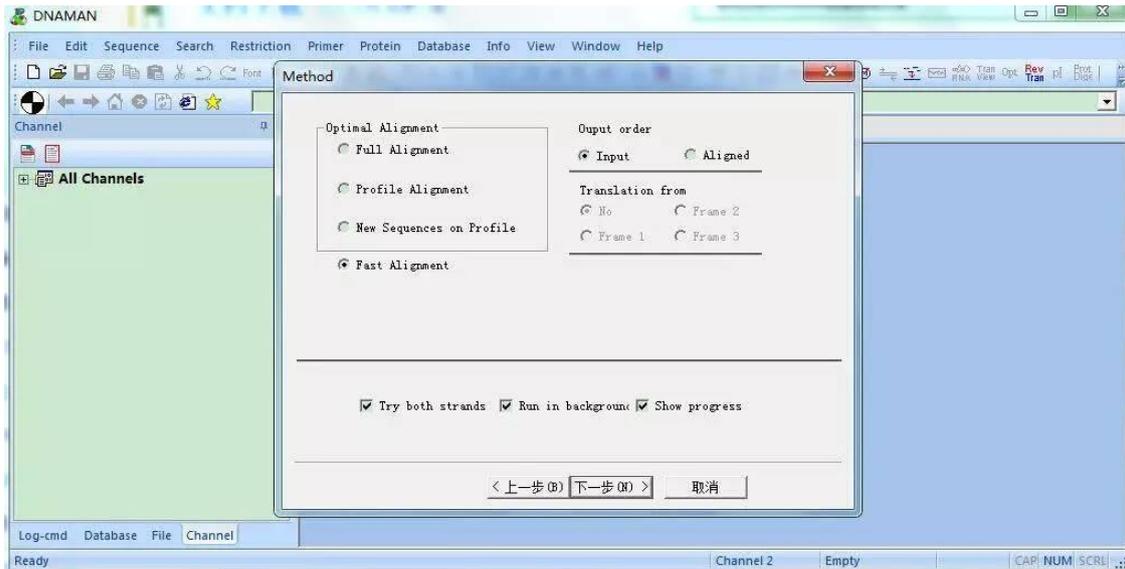
将所需比对的序列保存好以后，选中 **Sequence—Alignment—Multiple alignment sequence** 进行多序列比较。



在弹出的窗口 Sequence&Files 中加载序列，File、Fold、channel、Database 分别表示从文件、文件夹、channel 和数据库中获取序列。勾选窗口中的“DNA”，点击“下一步”。

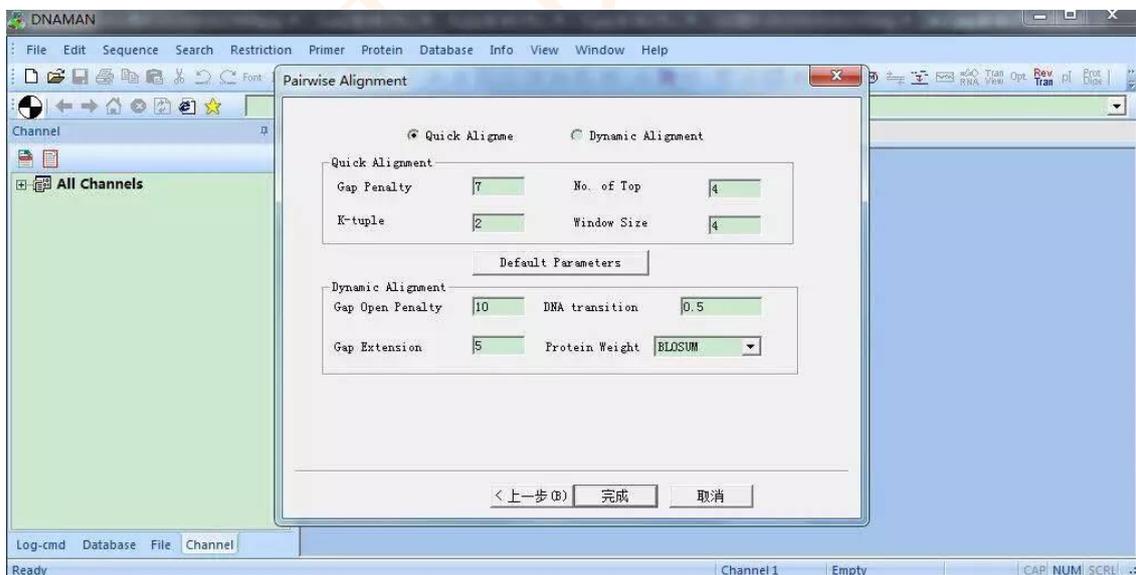


在弹出的窗口 Method 中，“optimalalignment”最佳比对方式中有四个高大上的选项：Full Alignment（完全比对）、Profile Alignment（轮廓比对）、New Swquence on Profile（轮廓上的新序列）、Fast Alignment（快速比对），本文选择了 Fast Alignment，并且勾选了 Try both strands(尝试使用双链)。其他项目不需修改，默认就 OK，点击“下一步”。

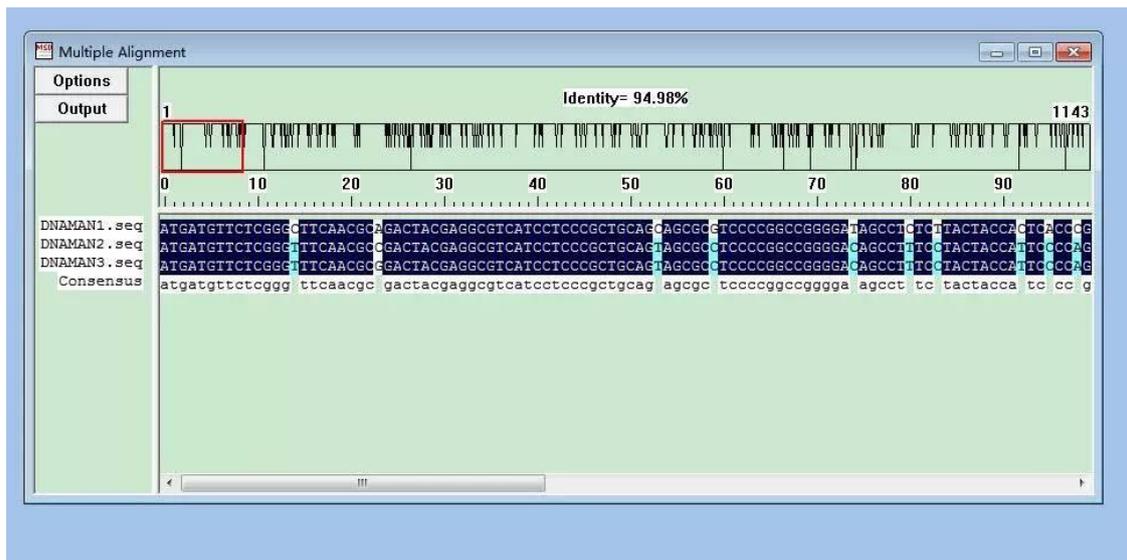


在弹出的 **Pairwise Alignment** 窗口中，是记分矩阵的参数，如空位罚分、Dna 转换加权值、K-tuple 值等等，记分矩阵应用于评价序列对位排列的质量，若想深入了解序列算法，用这个网址：

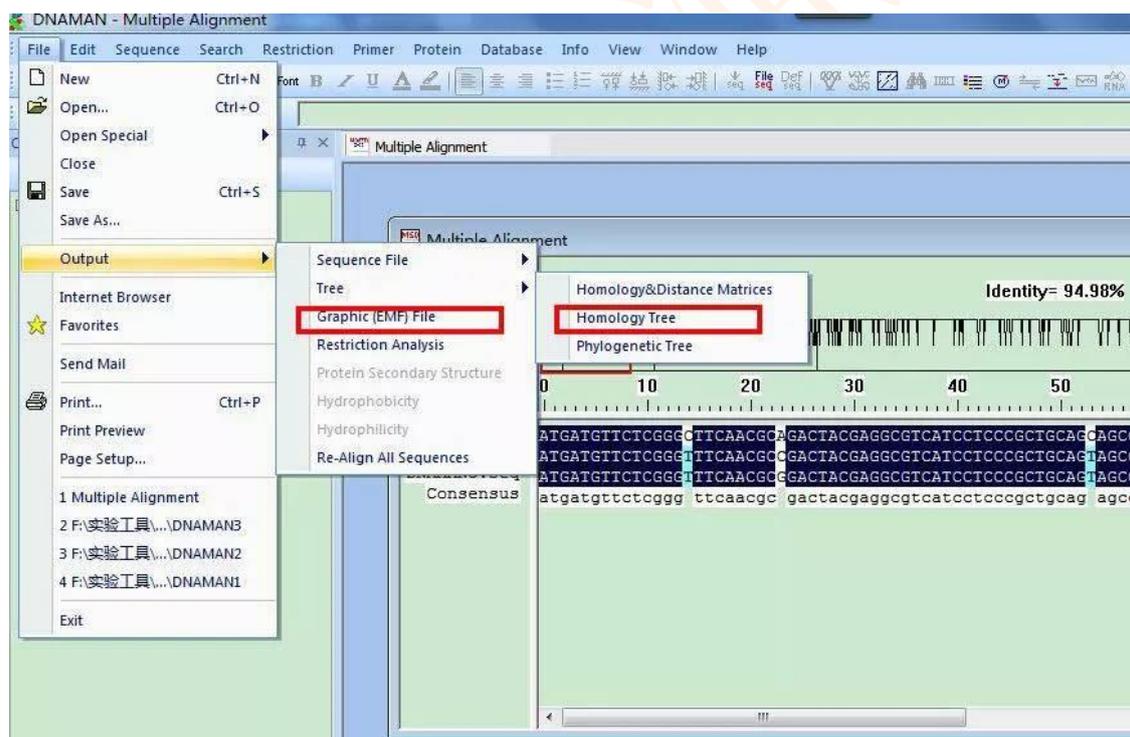
<http://www.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?filename=2010138689.nh&dbcode=CMFD&dbname=CMFD2010&v> 选项不需修改，默认就行。点击“完成”。



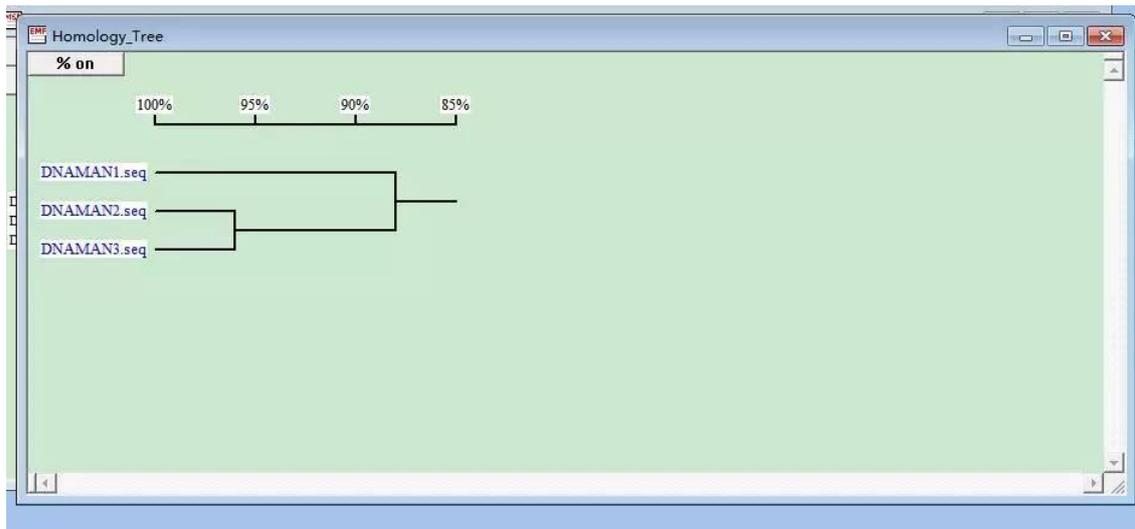
“Duang”，结果就出来啦！点击“Option”可以选择要显示的内容。



点击 **File-output-Graphic(EMF)File**，该序列比对的结果窗口可以图片格式保存。



然后点击 **Tree-Homology Tree**，绘制同源关系图。点击 File-save 保存。



本文以核酸序列为例，呈现多序列比较的具体步骤。如果亲们要比对氨基酸序列，在结果的“output”中可以看到更多的选项，点击这些选项可以对比序列间的蛋白质二级结构、亲水性和疏水性残基、跨膜蛋白分析等。几十秒的操作就可以获得丰富的比对信息，突然觉得 DNAMAN 真的很 man，有木有？

1.3 DNA、RNA 提取与纯化

技术 | 很好很纯洁：DNA 纯化实验

作者：毛博

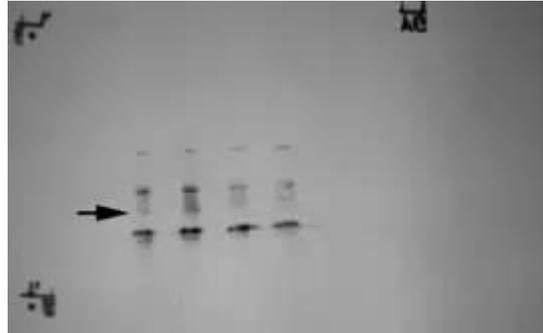
首发日期：2015-10-12

DNA 纯化是分子生物学研究中经常需要用到的一种方法。一般来说，做 DNA 纯化有 3 个目的：**1. 获得高纯度的 DNA；2. 浓缩 DNA；3. 用 DNA 做测序**，芯片等生物信息学方面的实验。下面，毛博谈一谈 DNA 纯化的几种常用方法。其中有毛博自己摸索出来的保证成功的 protocol。诚意奉上，敬请期待。

DNA 纯化实验基本上可以分为 **PCR 清洁试剂盒纯化法和 DNA 凝胶回收纯化法**两大类。PCR 清洁试剂盒纯化法又称为硅胶膜吸附法。因为它的原理是：硅胶膜可在高盐条件下结合 DNA，又可在低盐条件下与 DNA 分离。而 DNA 溶液中的其他渣渣包括引物、单核苷酸、酶、矿物

油、盐离子等，因为没有 DNA 的这种神特性，所以会被分离开来。

如果你的 PCR 产物得到的是单一条带，完全可以直接纯化。那么问题来了。如果发现有多条带？怎么办？有哪些办法可以提取得更干净？



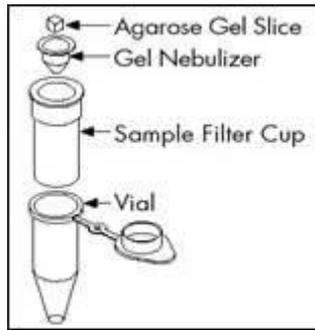
那么就诞生了我们的第二种方法：**DNA 凝胶回收纯化法**。这种方法简单粗暴有效率，也能纯化得比较彻底。现在已经慢慢地取代了第一种方法，成为了 DNA 纯化的主流方法。

扩增时出现非特异性条带，那么在胶回收时切胶很重要，切胶时尽量选择目的基因条带，可以将目的基因所在的胶的边缘弃去一些，**尽量不要切上含有非特异性带的胶**。

切胶之后就是回收了。这里就要讲到毛博的独门 protocol 了。市售的试剂盒常常有小片段回收效率很低的问题。其实完全没有必要买试剂盒。**回收可以用酚氯仿**。

PCR 产物经过酶切、回收等步骤后，损失太大。我的做法是：**简化步骤、减少核酸在处理过程中的损失，让较多量的 PCR 产物和质粒片断进入酶连反应——以量取胜**。毛博的做法是很粗放型的，但是成功率很高。如果愿意，你可以试试。

大致的做法是：**制作 100 μ L PCR 产物；酒精沉淀回收 PCR 产物；PCR 产物及载体酶切；跑回收胶；将回收胶上的 PCR 产物和载体片断切下，回收到一个试管中；冰冻、碎胶，酚、氯仿抽提，酒精沉淀；加入 8 微升水、1 微升连接酶和 1 微升连接 buffer，4 度过夜；转化涂板。**



具体的毛博独门 protocol:

PCR 产物回收

1. 制备 100 μ L PCR 产物。
2. 将 100 μ L PCR 产物加入一 1.5mL 离心管中，再加入 400 μ L 双蒸水，颠倒混匀。加入 900 μ L 预冷 无水乙醇、20 μ L3M 的醋酸钠。颠倒数次混匀。（提示 本方法使用的醋酸钠量较小，但足够沉淀核酸，并且无需洗盐。）
3. 4 $^{\circ}$ C 静置 30 分钟，以利于核酸沉淀。
4. 12000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 15 分钟，沉淀核酸。
5. 弃上清，将离心管倒置于干净吸水纸巾上 5 分钟。室温下吹风干燥。（提示 可将试管置于超净台吹风干燥。如果管底有较多液体聚集，可盖好管盖后，轻弹管底数次，将液体分散挂在管壁上，再打开管盖吹风。）

酶切直接在回收 PCR 产物的试管中配置酶切体系。1%琼脂糖回收胶回收（碎胶、酚氯仿抽提法）。

综上所述，纯化的主要目的就是**要去除蛋白质**。而酚氯仿混合液能有效地使蛋白质变性，同时抑制 RNAase 的活性，酚氯仿还可以减少酚在核酸溶液中的痕量。所以是一种好东西。完全没有必要买昂贵的试剂盒。

为什么不能用质粒 DNA 抽提试剂来提取基因组 DNA?

作者：老谈

首发日期：2014-10-14

导读

为什么同样抽提质粒 DNA 的试剂不能用来抽提基因组 DNA 呢？差别很大么？要买两种试剂盒真是麻烦啊！你还不要不相信，有小伙伴试过，还真没抽提出来。今天老谈就来和大家一起探究下原因！

基因组 DNA 的抽提，一般不会用到质粒抽提的试剂盒，究其原因这是由于两者的原理完全不同。两者不都是 DNA 抽提么？其实关键在于这两者在实验的初始设计上就完全不同。先给大家解释一下质粒抽提吧。

--by 老谈

质粒抽提

质粒抽提通常用的是碱裂解法，一般的试剂盒都会有 Solution I，Solution II，Solution III，有的还会有 Solution IV，然后是过柱子。

Solution I

Solution I一般都是用来重悬菌液的，会加入RNase I，降解掉里面大肠杆菌的RNA。同时里面还会用Tris-HCl体系来维持一个pH，另外会加入较大量的EDTA，去螯合掉里面二价金属离子，使菌体本身的DNase失活。其实用双蒸水来代替Solution I问题也不大，关键就是把菌重悬起来就行。

Solution II

Solution II，一般来说主要成分有两个，就是NaOH和SDS，NaOH主要是用于破坏细胞膜结构，强碱条件下，菌体的细胞壁结构、细胞的磷脂双分子层和微囊结构的构相都会发生变化。而SDS在这里主要并不是起到裂解蛋白的作用，而是**结合氨基酸**，一般两个氨基酸可以结合一个SDS分子。菌体裂解后，其实小片段的质粒已经释放出来了，而大片段的基因组DNA还结合在蛋白质上。

Solution III

Solution III的主要成分是醋酸钾/醋酸缓冲液。首先长时间强碱环境下，DNA会断裂，所以需要醋酸进行中和，而钾离子可以与SDS产生沉淀反应，使可溶于水的十二烷基磺酸钠变成不溶于水的十二烷基磺酸钾。这样结合蛋白质的PDS就被沉淀下来了，同样基因组DNA也同样被沉淀了下来，用硅胶吸附释放在上清里的质粒，或者用无水乙醇对上清进行沉淀，即可获得质粒的DNA。

基因组DNA抽提

而普通的基因组DNA抽提，首先是裂解，用离子型的蛋白变性剂：CTAB或者SDS对细胞进行裂解（加不加蛋白酶K其实并不太要紧），破膜的同时使得DNA从蛋白上解离下来。加入高盐溶液使蛋白质沉淀。然后用酚仿，使蛋白质沉淀变性在水相油相间，并分离出的可溶性蛋白。上清用异丙醇将DNA沉淀下来，同时低温加入一定量的二价阳离子，可加速DNA沉淀。这些能和上述的质粒抽提混为一谈么？！当然不行啊！

小伙伴们现在能明白为啥基因组DNA不能用质粒抽提的试剂了吧.....

1.4 DNA载体构建

干货 | 三图让你秒懂质粒图谱

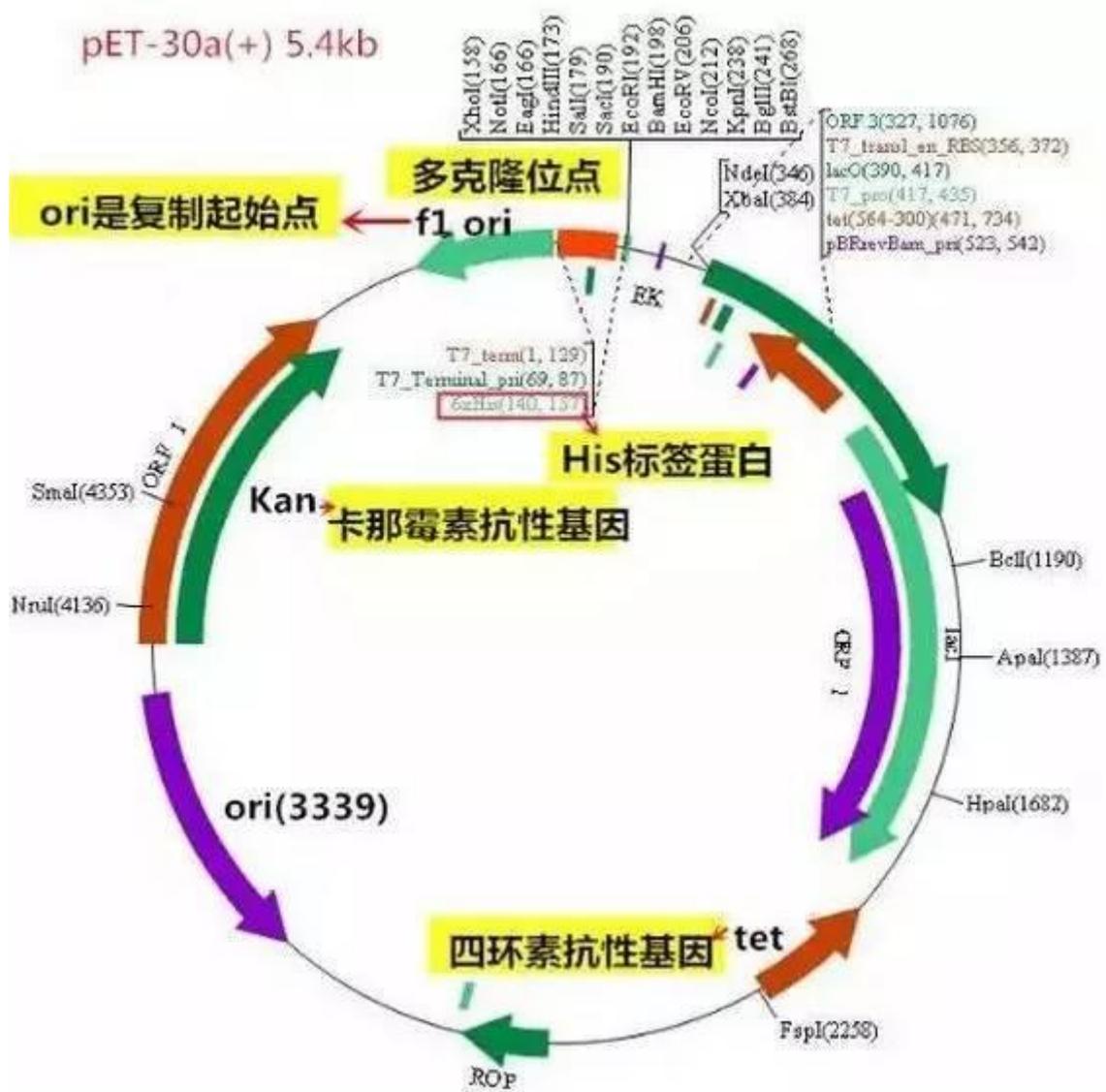
作者：子非鱼

首发日期：2015-11-19

当年小鱼拿到一个质粒图谱，第一反应只能是仰天长啸，这是什么玩意？这些 ori、RBS、tet 是什么鬼？这些箭头代表什么，转录的方向吗？为什么都不相同，不会“撞车”么？

来，看几张图，上面的问题就能一一破解。

Step 1:先了解质粒的基本组成元素。



1) 复制起始点 Ori。该位点决定了质粒的宿主及质粒的拷贝数，它是质粒中一段特定序列，富含 AT 和重复序列。

Tips: 图谱上只有一个 Ori，表示质粒是原核克隆表达质粒；有两个 Ori，则表示该质粒是，穿梭质粒，即可在原核也可在真核中复制。

2) 抗性筛选基因。图谱中 Kan/tet 就是抗生素抗性基因，方便后续通过抗生素筛选阳性克隆。特点就是单词最后会以大写 R 或上标 r 结束。

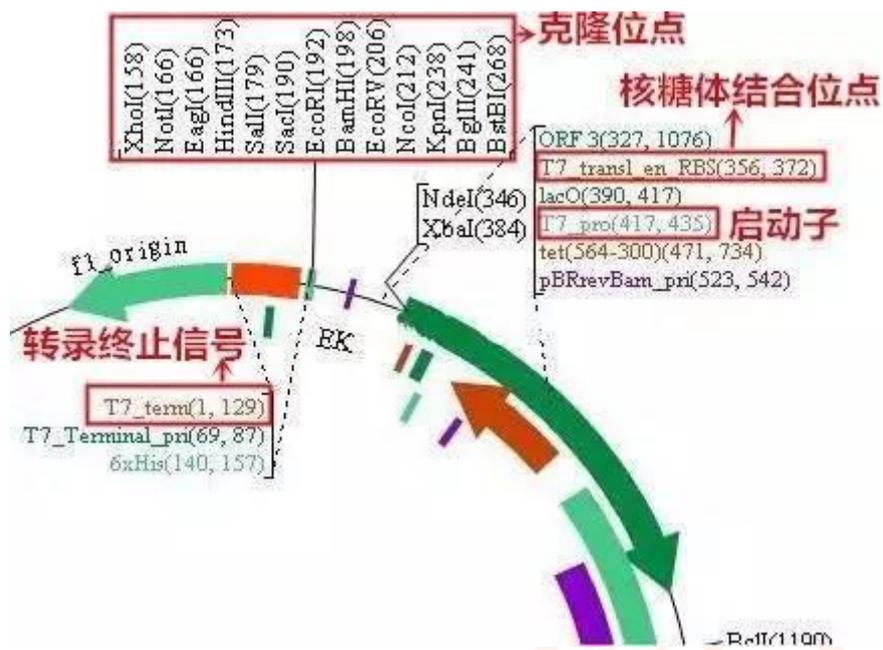
Tips: 一般克隆载体只有一种抗性筛选标记，部分表达载体及穿梭质粒具有两种抗性筛选标记。

3) 多克隆位点 (MCS)，即一系列限制性内切酶酶切位点，是外源 DNA 插入位点，一般可通过酶切/连接方式将外源 DNA 插入质粒，外源 DNA 一般小于 10kb，而片段越长，转化效率越低。

Tips: 一般位于转录启动和转录终止信号之间；所包含的限制性内切酶位点数量和组成因载体不同会有所差异，且其中的酶切位点在质粒中为单一的酶切位点；同时在使用时需注意质粒载体与外源 DNA 酶切位点的兼容性问题

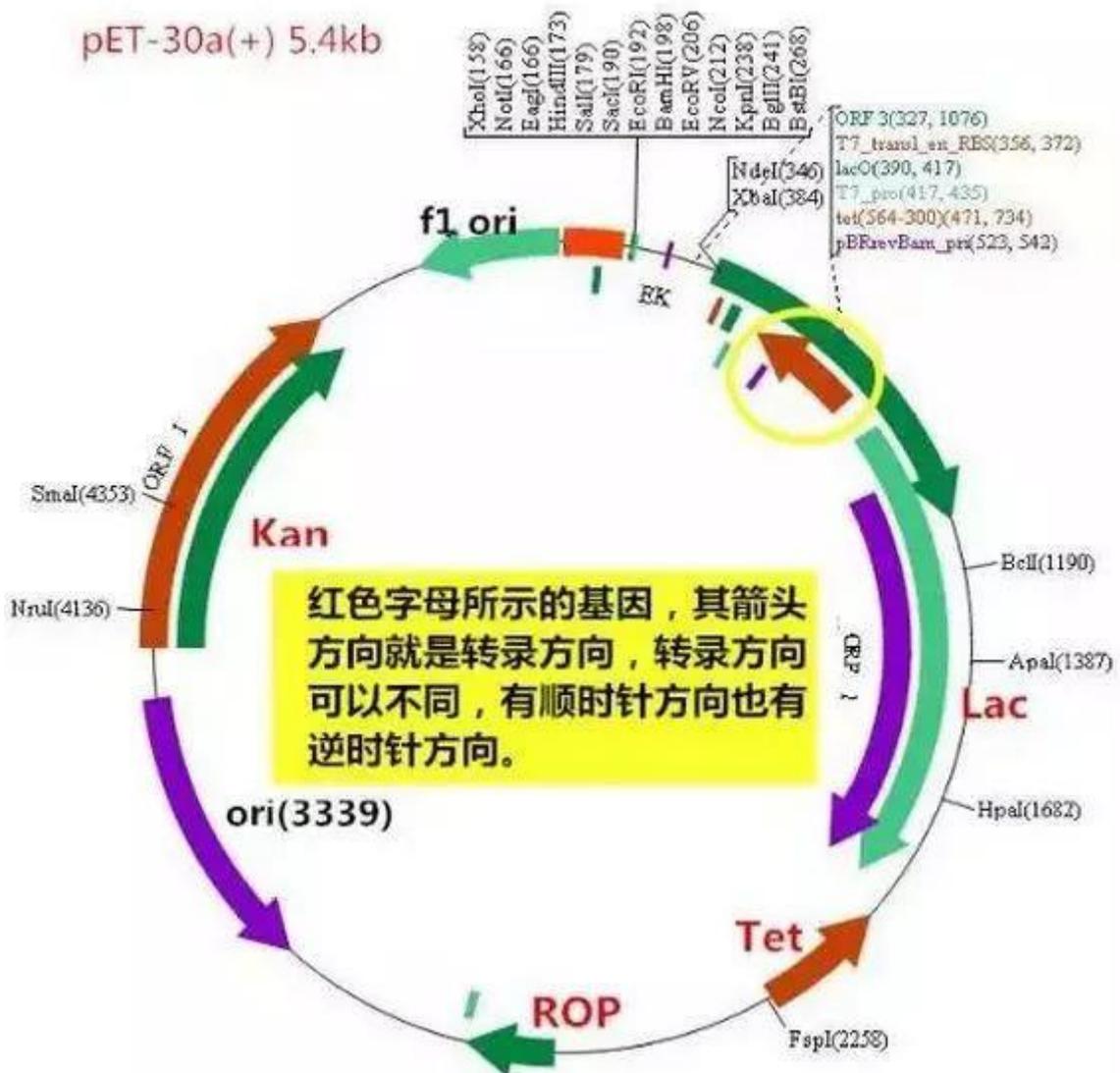
荧光标记或蛋白标签序列。蛋白纯化标签蛋白：His-Tag，GST-Tag 等；蛋白检测标签蛋白：Myc-Tag，Flag-Tag，HA-Tag 等；荧光蛋白表达标签：GFP，mCherry 等。

Step 2:看质粒是否是表达载体，如果是，那就必定有这些原件：**启动子—核糖体结合位点—克隆位点—转录终止信号。**



- 1、启动子：促进 DNA 转录的 DNA 序列，可与 RNAPol 特异性结合。
- 2、增强子/沉默子：前者是真核基因组中一种增强邻近基因转录过程的调控顺序，其作用与增强子所在位置或方向无关。后者是负增强子，负调控序列。
- 3、核糖体结合位点/起始密码/SD 序列 (Rbs/AGU/SDs)：mRNA 有核糖体的两个结合位点，对于原核而言是 AUG（起始密码）和 SD 序列。
- 4、转录终止顺序（终止子）/翻译终止密码子：结构基因的最后—个外显子中有一个 AATAAA 的保守序列，此位点 down-stream 有一段 GT 或 T 富丰区，这 2 部分共同构成 poly (A) 加尾信号。

Step 3:弄清楚方向，即为何质粒图谱上有的箭头顺时针而有的箭头逆时针。



其实那是代表两条 DNA 链，即质粒是环状双链 DNA，它的启动子等在其中一条链上，而它的某些基因在另一条链上。当然，最重要的是要弄清楚目的基因插入那一段（从 T7 启动子到终止子那一段）的方向，即下图黄色圈圈所示的箭头方向，其它的大可以忽略。

工具 | 基因操作——过表达的正确打开方式

作者：麦子

首发日期：2015-07-27

基因的操作

- Overexpression (本期主题)
- Knockdown (Knockdown程度大了就是Knockout)



Helxilife

过表达 (overexpression)

1、外源构建目的基因的CDS区，使用外源启动子表达外源构建的目的基因。

2、上调目的基因的激活型转录因子，使得基因上调表达,方法：外源构建、药物刺激

(如：化合物、蛋白等，比如免疫中常用的LPS)。



Helxilife

外源构建目的基因考虑两个地方：

- 1、什么启动子？
- 2、基因CDS区。



Helxilife

一 启动子

过表达工具在什么地方使用？
原核表达OR真核表达？
表达的环境是什么物种？
是否需要受诱导？...

要是不需要表达，T载体就可以搞定！

所以，根据研究目的的不同，寻找合适的启动子，基本上都有相应商业化的载体。



Helxilife

到NCBI上查询就能简单解决吗？ NO！

二
CDS
☒

(1) 多转录本，我做哪个呢？

最笨的：在NCBI上查询不同转录本NM号及研究的内容，看哪个文章最多，用哪个。如果你知道你的研究方向，别人用的是哪个。哪怕文章少，也得用。

(2) 特殊定位蛋白。比如，分泌蛋白。需要有分泌肽。那其功能是分泌出来行使，还是在细胞内行使的呢？可以把他的分泌肽去掉，看功能。



Helxilife

那么问题来了：启动子确定了，CDS也确定了就OK了？

NO !



Helxilife

过表达构建主要 **注意**：

- 1、构建序列正确，属于可控范围，看测序结果搞定。
- 2、外源tag抗体检测有外源条带：验证一个蛋白的目的抗体是否OK，就用一个带有外源tag的蛋白来做WB。



Helxilife

在WB中，会出现的问题：

- A、不表达
- B、大小不对



Helxilife

A、不表达

明明序列正确，载体也OK为啥不表达？真核基因，转录后翻译一般都是从ATG开始，但有好多ATG，到底从哪个开始？

真核基因翻译开始的ATG有两个特点：

1. Kozak序列，是翻译起始ATG前9到10个碱基，在 - 3, - 6, - 9有要求，为嘌呤。很多表达载体上，都有kozak序列在。

2. ATG后面如何还是一个G，也就是ATGG，那么这个ATG也可以作为翻译起始位点（但不绝对）。



Helxilife

B、大小不对

一般需要考虑是否为修饰，什么修饰？

是磷酸化还是糖基化（膜蛋白经常会有）？

是否有剪切？



Helxilife

谢

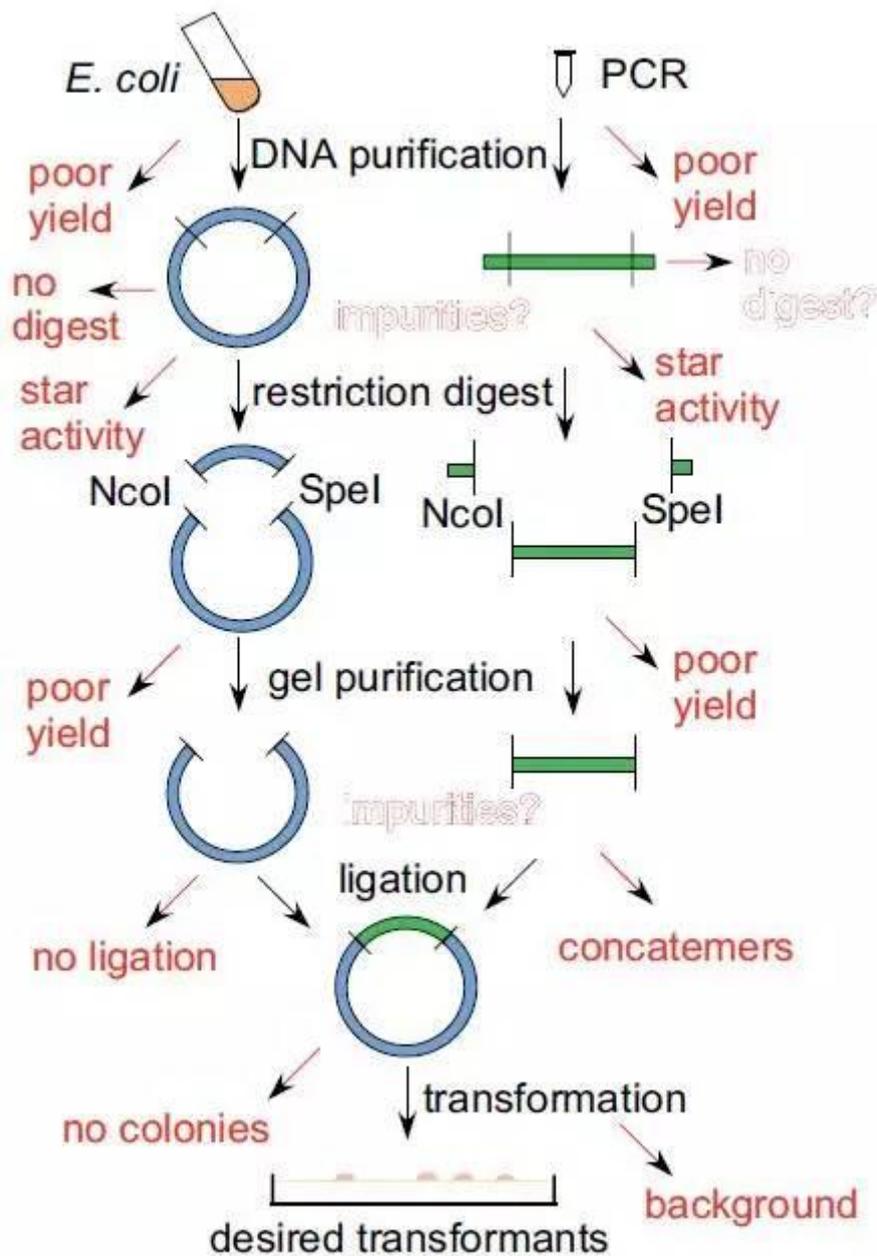
Maizi
2015.07
HelixLife

技术 | 基因克隆重重陷阱，一不小心就掉坑里

作者：麦子

首发日期：2015-09-24

基因克隆在发明后的 32 年，需求一直不断增加，但是有些小伙伴的重组质粒就是怎么样都构建不出来。其实，看似简单的传统基因克隆，可是存在着重重陷阱！美国罗林斯研究中心（Rollins Research Center）Ichiro Matsumura 在新一期的《BioTechniques》上分享了他的经验：“Why Johnny can't clone: Common pitfalls and not so common solutions.”麦子今天就把核心的“姿势”给大家提炼出来，主要是琼脂糖凝胶电泳、酶（DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 连接酶等）和试剂的使用等一些注意事项。



从 PCR 产物到质粒的工作流程

1. 聚合酶

DNA 聚合酶有两个对 PCR 过程必不可少的附加属性，但是不利于后续克隆的步骤。第一，Taq/DNA 混合物的解离常数在室温中是 20 nM，与扩增产物的终浓度相当，因此酶往往与扩增产物同时纯化。实际上，大多数其他商用 DNA 聚合酶与 DNA 结合的更加紧密。残存的聚

合酶可以阻止限制性内切酶作用于 DNA 末端，或者填补突出的部分。第二，市场上一些改造后的新型 DNA 聚合酶相比于 Taq 酶热稳定性更高，在有机溶剂和离液盐中的构象稳定性也更高，PCR 产物的纯化更加困难了。

2. 割胶回收

载体经过酶切后，需要经过凝胶纯化提高克隆效率。割胶回收对技术要求高，也很难自动化，而且 DNA 暴露在紫外光下会大大降低转化效率。凝胶纯化的产量往往有限，因此研究人员需要消化毫克级的 DNA，才能产生最后的终产物。残留的琼脂糖或凝胶提取过程中引入的各种溶剂和盐，可能抑制后续 T4 连接酶的活性，从而降低克隆效率。另外回收效率还与片段的长短相关，小于 500bp，或者大于 4kb 的片段，加异丙醇有助于提高回收效率。

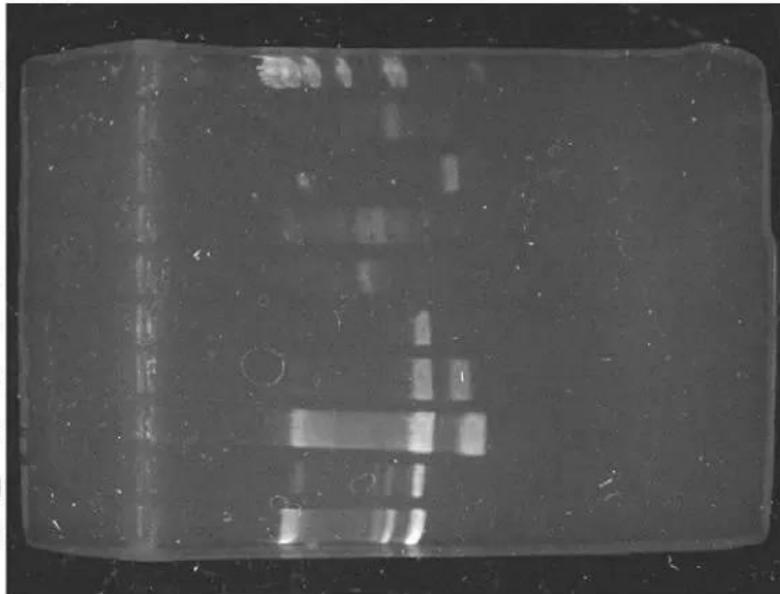
3. 限制性内切酶

限制性内切酶的出现是为了保护细菌免受噬菌体及其他入侵者。因此，限制性内切酶/DNA 底物的 K_M 值相当低（米氏常数 K_M 值等于酶促反应速度为最大速度一半时的底物浓度，是酶的特征性常数之一。 K_M 值只与酶的结构、酶所催化的底物和反应环境如温度、PH、离子强度有关，与酶的浓度无关。 K_M 值愈小，酶与底物的亲和力愈大）。所以“提高酶切反应中 DNA 的浓度，这样凝胶纯化的产物才足够连接反应使用”是错误的！在这种情况下，限制性内切酶会受到抑制，从而导致不完全的消化。

4. T4 连接酶

连接反应失败的原因有很多，但失败可能在加入 T4 DNA 连接酶之前就发生了：由于 DNA 聚合酶扩增不完全导致的末端不均一、酶切不完全、连接酶抑制剂或者突出的部分被补平。在某些情况下，连接反应失败可能是因为退火效率不够、反应缓冲液中的 ATP 浓度过低（室温孵育时间过长）或者酶可能变性了。T4 连接酶在室温下相当稳定，但如果被水而不是合适的 buffer 稀释后可不是如此。如果有问题，可以通过阳性对照来检测酶的完整性：

10. lambda HindIII digest
9. insert + ligase
8. gel purified insert
7. vector + insert + ligase
6. vector + ligase
5. gel purified vector
4. donor plasmid digest
3. recipient plasmid digest
2. uncut donor plasmid
1. uncut recipient plasmid



5.感受态细胞转化

在克隆过程中，具有高效转化效率的感受态细胞至关重要，这对于之前并不高的分子克隆效率具有一定的补偿作用。最常见的两种转化方法：**热激转化**和**电穿孔**。电穿孔是最有效的，更重要的是，转化细胞的数量与 DNA 的量成正比，可以达到**微克**级别，且不会出现热激中出现的菌株效应或者对质粒的长度有限制，所以对于困难的克隆项目，电穿孔无疑是首选方法。不过虽然热激转化效率不及电穿孔，而且会因 DNA 过量 ($>10\text{ng}/200\mu\text{l}$ 感受态细胞) 而抑制转化，但是它**方便**啊！“冰一冰、热一热、凉一凉、加一下再摇一摇”就搞定了，所以还是有很多人使用这个方法的！

技术 | 酶切啊酶切，切还是不切？

作者：毛博

酶切，作为一种常用的分子克隆的手段，如果应用得当，可谓宝刀屠龙，无往而不利；如果应用不当，又会步步维艰。真是让人欢喜让人忧愁。酶切，最常见的问题就是切不动和切过了。这些问题比较复杂。毛博准备分两节来讲。下面，毛博先讲一讲切不动的问题。

切不动可能的原因：

1. 酶不匹配

解决的方法：如果是双酶切 A 和 B，预实验中必须做 A 和 B 各自的单酶切和 A+B 的双酶切，好确认这几种酶都好用，质粒上的切点都好用。

2. 体系的问题

解决的方法：酶切尽量用大体系，如 50ul、100ul 等。大体系能稀释内切酶包装中的甘油，对反应有利。

3. 酶的量太少

解决的方法：当设计一个酶切时，限制性内切酶的用量是与 DNA 分子的大小和量密切相关的。根据每种酶的单位定义，精确计算出所需的限制性内切酶的量。不要简单的套用酶说明书中的“通用酶切方案”，那个通用酶切方案是很多酶切不动的原因。

这里，毛博隆重推荐一款酶切利器：3D(Double Digestion Designer)。该软件的一个主要功能就是根据不同限制性内切酶的单位定义，以及你底物 DNA 分子的大小以及 DNA 的量（ug 数）来精确计算出完全酶切你的 DNA 底物所需要的酶量，为完全酶切提供夯实保证。



4. 酶失活

如果限制性内切酶因为保管不当，导致酶失活或部分失活，那么依据 3D 计算出来的酶量就

不能保证完全酶切。解决的方法：保管好你的酶。如果过期了，就不要用了。

5.DNA 的问题

如果制备的质粒 DNA 的质量不好（如细菌培养时间过长，质粒制备时裂解不充分或裂解时间过长等），那么对这种质粒 DNA 进行酶切时，即使酶活性正常，酶量足够，也不能实现完全酶切，因为其中很多质粒 DNA 已经变性，不能被切开。

下面，毛博给大家看一个简单的实例。

如果要用 AcsAB + pSB1C3 对质粒 DNA 进行双酶切，以便进行某基因的克隆。

那么，应该同时设计并进行三种酶切反应：

A: AcsAB + pSB1C3 双酶切

B: AcsAB 单酶切

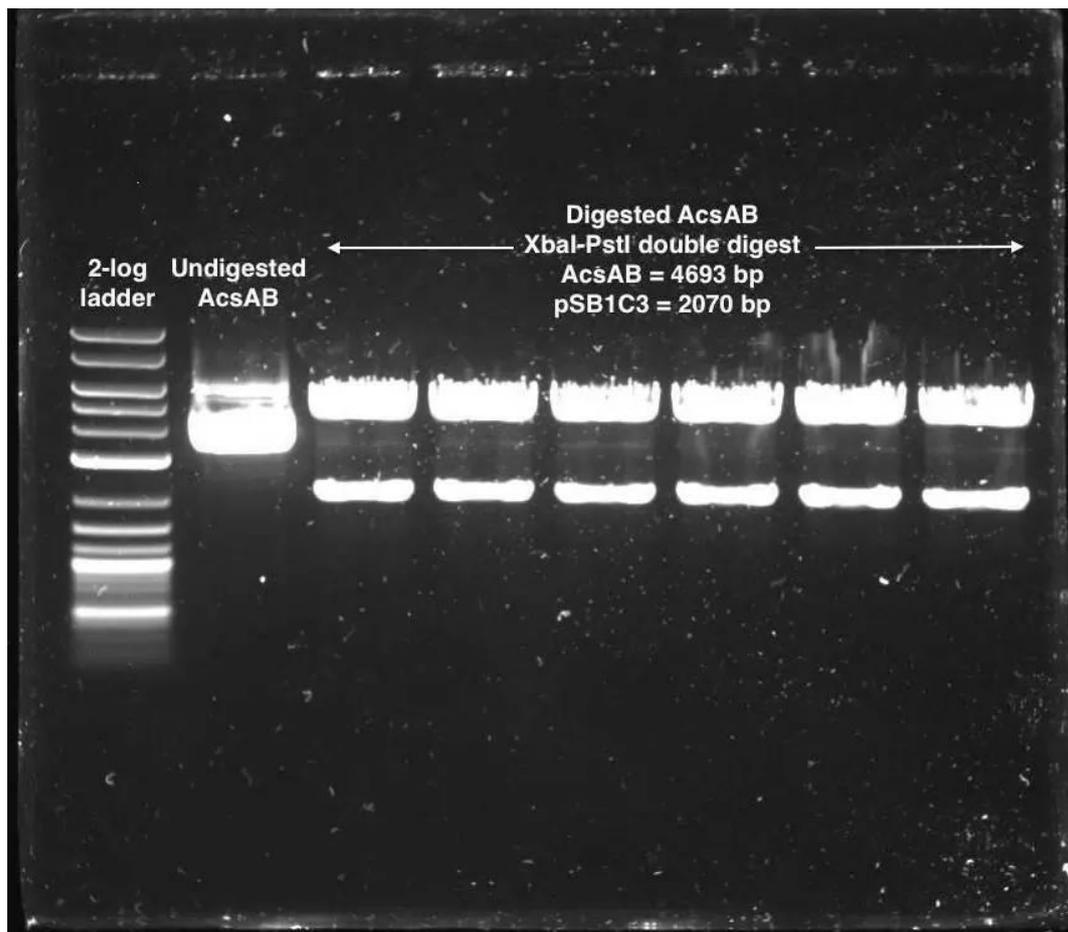
C: pSB1C3 单酶切

在酶切时，A，B，C 三种酶切反应都用相同的 buffer 系统，相同的 DNA 量（建议至少 0.5ug），所需的酶量用 3D 进行计算。在合适的温度（37°C）酶切 1~2 个小时，然后进行电泳分析。电泳分析时，添加两种对照：未酶切的质粒 DNA 和分子量标准（Marker）。

根据电泳的结果，就可以知道酶切是否完全：

如果一切正常，完全酶切后电泳的条带分布如下：

- 1.单酶切(B 和 C)应该只有一条线性化的 DNA 条带，其大小与质粒的理论长度一致；
- 2.未进行酶切的质粒 DNA 应该主要是一条超螺旋条带，其电泳位置应该在单酶切产生的线性 DNA 分子的前面。(有的质粒会在超螺旋条带的后面出现线性化条带和环状 DNA 条带)；
- 3.双酶切的条带应该只有一条带，而且大小与单切的位置一样(注意：只有当两个酶切位点间没有大片段插入时，才如此。事实上，大部分质粒的多克隆位点都是如此)。



如果出现以下的情况，就表明有问题：

1. 单酶切后（B 和/或 C），与未酶切的 DNA 样品(D)的电泳位置一样（即依然为超螺旋）
2. 出现线性化质粒及超螺旋质粒两条带。

这意味着：AcsAB 和/或 pSB1C3 未能完全切开，原因可能是酶部分失活，或者质粒的质量有问题。此时，即使双酶切只出现一条线性化 DNA 条带，也可能在线性化质粒中存在大量的单酶切的载体。

用此种载体进行克隆，则在连接时会出现大量的单酶切载体的自连（载体自连的效率较双片段连接高 10 倍以上），导致大量的自连克隆，很难挑选到有插入的克隆（克隆失败）。如果出现此种现象，建议不要盲目地做下去。应该先停一停，首先逐一查找可能的原因。只有当上述两种可能的问题都解决了，才能保证完全酶切，进而获得正确的克隆。

以上是毛博总结的酶切的常规经验，当然还是会有特例比较难做，因为其中涉及到酶量的计算，Buffer 的选择，反应体积，反应条件等多种条件摸索。一旦出现问题，大家需要耐心细致，逐一查找可能的原因。

技术 | 酶切，切，切过了头，咋办？

作者：毛博

上一节，毛博谈到了酶切不动的问题。这一节，毛博想探讨一下酶切的另外一个极端：酶切过头的问题。还是按照毛博一贯的做法和思路，发现主要是两个原因导致的，解决办法也是有的。

一、酶切时间过长

酶切时间过长的确有时候会对目的条带有影响，因为你用的酶可能会有星号活性。那么什么叫星号活性呢？通俗一点讲，就是酶不去切它该切的地方，瞎切一气.....酶切时间过长，会导致最后乱切。毛博个人建议：双酶切不要超过 5 小时。其实一般 3-4 小时足够了。你应该有提供给你酶的生物试剂公司的相应的说明书的吧？上面都有写明酶的活性和作用时间。现在的酶都很不错的,10 到 15 分钟就可以都切完。我一般只水浴一个小时,不会再长了。

如果时间太长，就会造成下图所示的情况。注意第四泳道红框标注的地方。居然切出了 5 根条带。这显然是时间过长了。

二、酶量过多

和过长的反应时间会造成非特异性的酶切（星号活性）一样，酶加多了也会产生星号活性。一般来说，所加酶的体积不能超过酶切总体积的 1/10，否则甘油浓度会超过 5%，会产生星号活力。在使用高酶量的时候需要注意甘油的最终浓度不要超过 5%，也就是说 10ul 的体系，酶的用量不要超过 1ul。

以 TAKARA 的酶为例，其对 1 单位酶的定义如下：在 50 μl 反应液中，30 $^{\circ}\text{C}$ 温度下反应 1 小时，将 1 μg 的 λDNA 完全分解的酶量定义为 1 个活性单位(U)。而该酶浓度约为 15 U/ μl 。在除外酶降解的因素外，理论上，该酶可分解 15 μg 的 DNA。而一般从 1-4ml 菌液提出的 DNA 约为 3 μg ，而 PCR 纯化后的产物（50 体系）约为 3 μg ，所以即便全部加进去，只要纯化的质量非常好，酶切也完全切得动。注意，不要加多了呀。

但是公司给推荐的一般都是 20 μl 体系加 1 μl 。其实，毛博我有的时候为了省酶，在 20 μl 只加 0.5 μl 酶，切的效果也很好。

其实，除了考虑酶浓度（每 μl 多少个单位）以外，还应该考虑这种酶在 λDNA 上的酶切位点数目。比如用 Hinc II 和 XbaI 双切 pUC118，这两个酶在 pUC118 上都只有一个酶切位点，而在 λDNA 上的酶切位点分别是 35 个和 1 个。根据酶活性的定义，相同单位的 Hinc II 和 XbaI 对 pUC118 的酶切效率是 35 比 1，所以在双酶切体系中，所用的 Hinc II 显然应该要少很多。毛博举这个例子，是想说明：大家再考虑酶浓度的时候，应该多想一层。

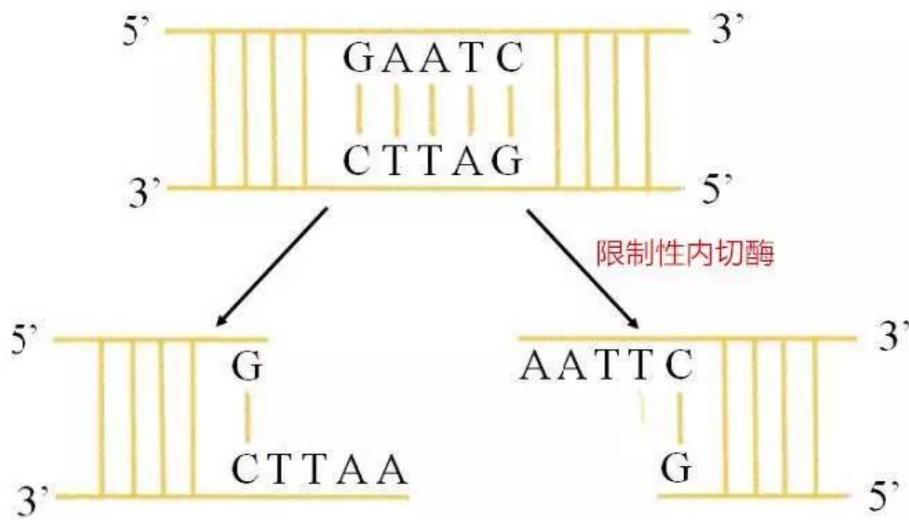
综上所述，酶切切过头了的原因，其实并没有酶切不动那么复杂。不外乎时间过长和酶量太大。童鞋们只要注意一些，一般都没有问题。

技术 | 上图！秒懂重组 DNA 技术常用工具酶

作者：子非鱼

1 分子剪刀——限制性内切酶：

作用：识别特异序列，切割 DNA



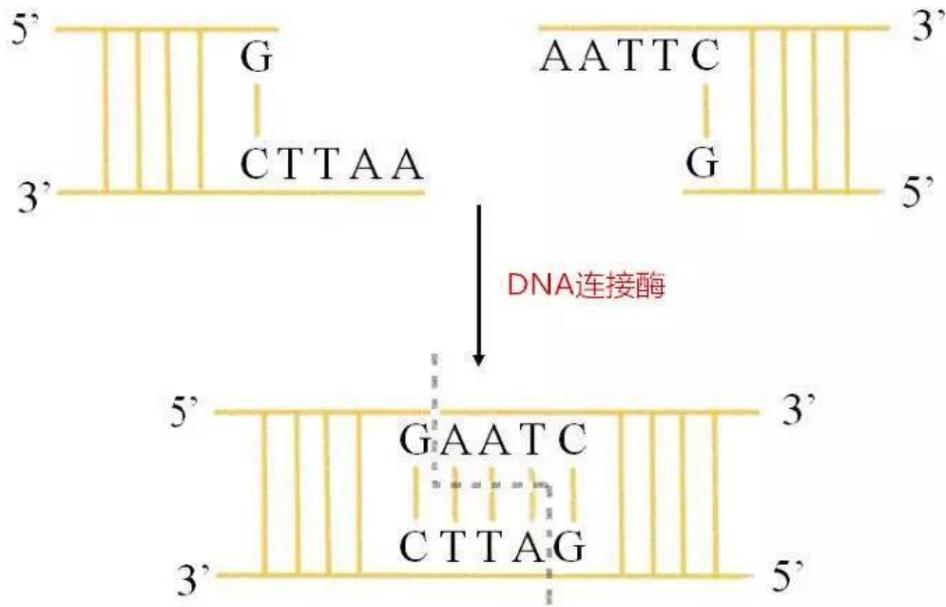
限制酶的命名是根据细菌种类而定，以 EcoRI 为例：

E	<i>Escherichia</i>	(属)
co	<i>coli</i>	(种)
R	RY13	(品系)
I	首先发现	在此类细菌中发现的顺序

2 胶水——DNA 连接酶

作用：跟限制性内切酶对着干，催化 DNA 中相邻核苷酸间形成磷酸二酯键，使 DNA 切口缝合，连接 DNA 片段。

无论是双股或是单股 DNA 的黏合，DNA 黏合酶都可以借由形成磷酸双脂键将 DNA 在 3'端的尾端与 5'端的前端连在一起。

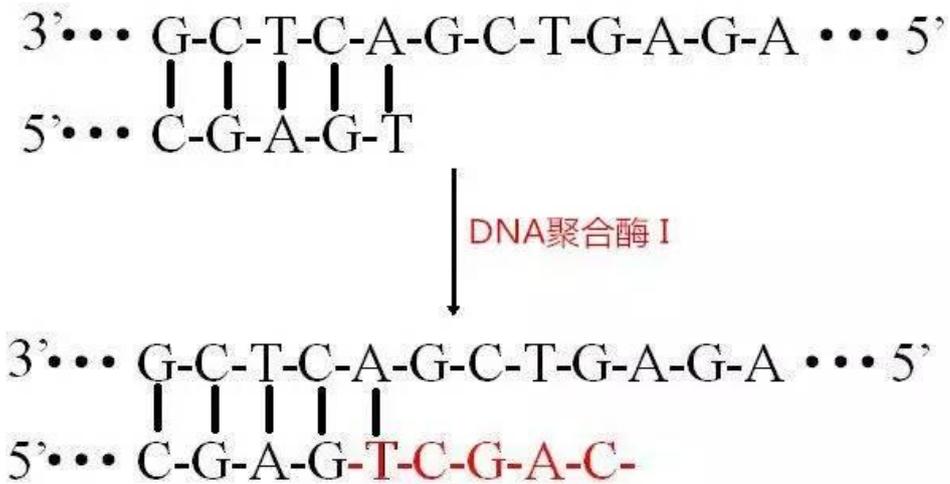


3 DNA 聚合酶

就像玩拼图能手，DNA 聚合酶用于 DNA 复制，连接两条 DNA 单链形成一条 DNA 双链，作用于碱基对间的氢键。

DNA 聚合酶主要应用于：

a.合成双链 cDNA 中第二条链;b.缺口平移制做探针;c.DNA 序列分析;d.填补 3'末端。

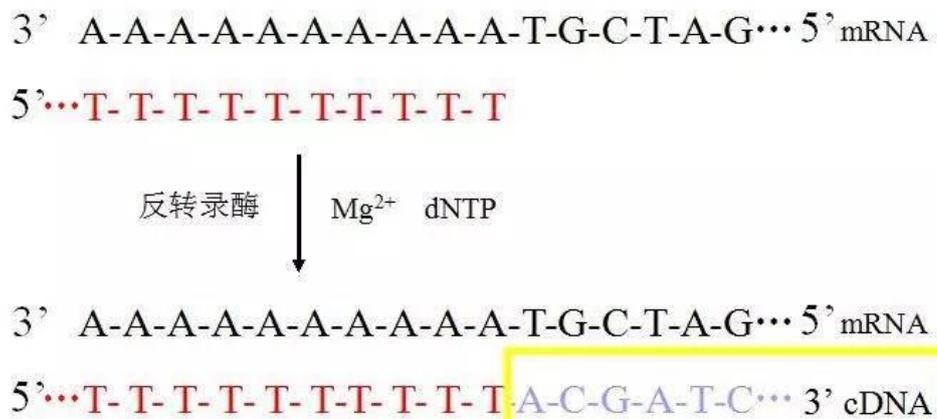


4 反转录酶

作用：a.合成 cDNA;b.替代 DNA 聚合酶 I 进行填补，标记或 DNA 序列分析

反转录酶的基本特性：以 RNA 为模板聚合 cDNA 链以及双向外切 DNA-RNA 杂合链中的 RNA 链。

主要用于荧光定量 PCR 和 cDNA 文库构建等。

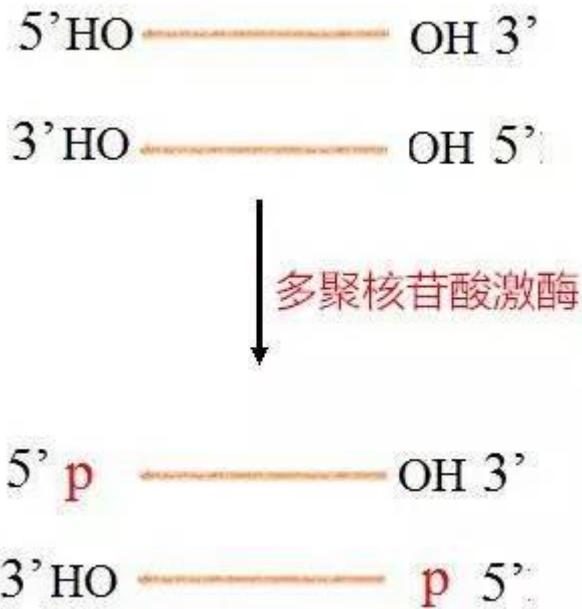


5 多聚核苷酸激酶

作用：催化 DNA 5'羟基末端磷酸化，或标记探针

它是由 T 偶数噬菌体所感染的大肠杆菌分离出来的酶，能催化 ATP 的 γ -磷酸转移到 DNA 或 RNA 的 5'-OH 末端生成 ADP 的反应。

因为此酶的催化反应特异性很高，可用 ^{32}P 标记的 ATP 特异地标记多核苷酸的 5'末端。广泛应用于多核苷酸的链长的测定和 5'末端核苷酸排列的确定等核酸结构的研究。



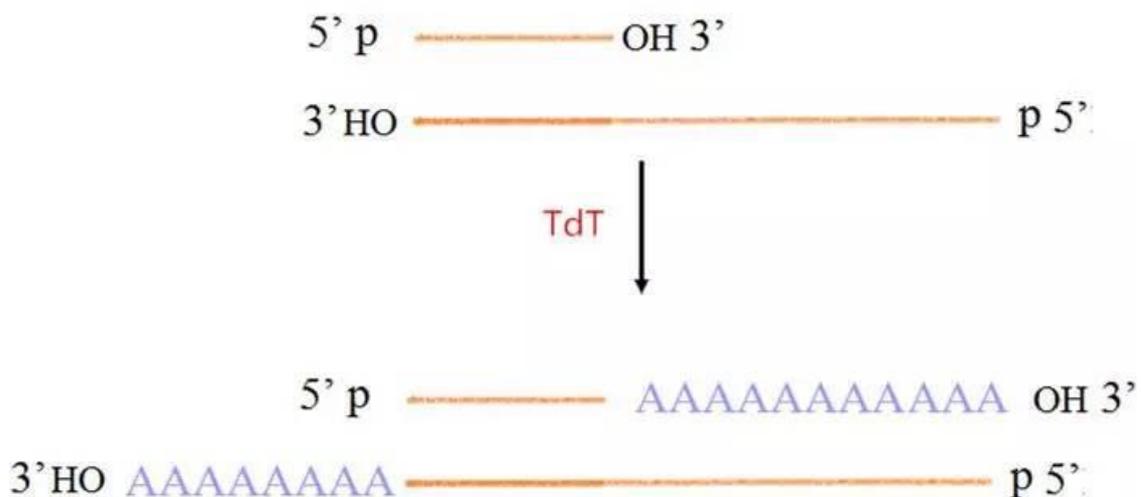
6 碱性磷酸酶：切除 DNA 5' 末端磷酸基

碱性磷酸酯酶的作用是从 DNA 或 RNA 的三磷酸核苷酸上除去 5'磷酸根残基。可用于防止 DNA 片段自身连接，或标记（5'端）前除 DNA 或 RNA 5' 磷酸。



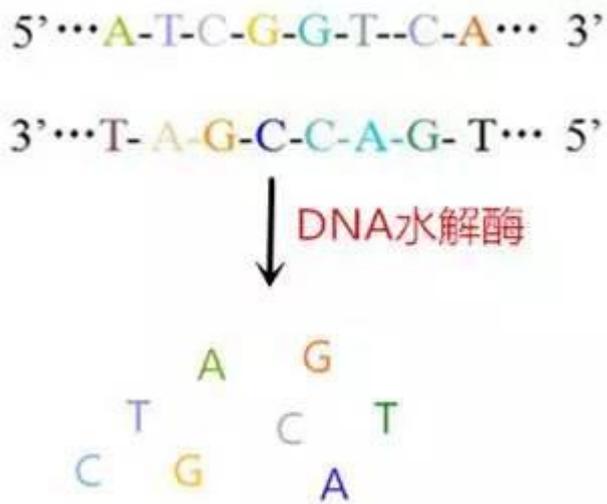
7 末端转移酶：在 3'羟基末端进行同系多聚核苷酸加尾。

末端转移酶的作用是将脱氧核糖核苷酸通过磷酸二酯键加到 DNA 分子的 3'-OH 末端。主要用于拼接人工接头或在 3'端进行引物标记的时候。



8 DNA 水解酶

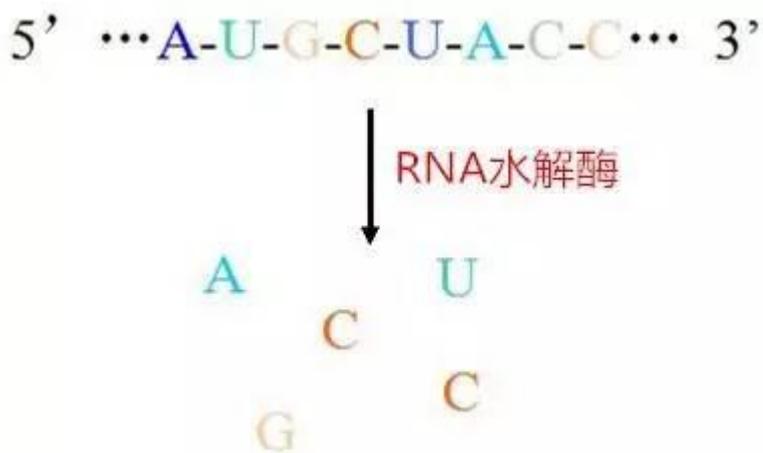
DNA 在水解酶的作用下，可以得到四种不同的核苷酸，即腺嘌呤脱氧核苷酸【A】，鸟嘌呤脱氧核苷酸【G】，胞嘧啶脱氧核苷酸【C】，胸腺嘧啶脱氧核苷酸【T】。



9 RNA 酶：切割 RNA

一类催化 RNA 降解为小片段的核酸酶。

RNase 酶非常稳定，是导致 RNA 降解最主要的物质。



技术 | 上图！秒懂重组 DNA 技术常用工
具酶

作者：小杜

师兄：师妹，怎么看你做克隆都做了半个月了，还没有结果吗？

我：对啊，师兄，我也不知道为什么，我鉴定老是没成功？

师兄：你真的了解 TA 克隆，你要是真的了解肯定早出结果了。

我：真的了解？难道还有什么秘诀吗，师兄

师兄：看你一脸懵逼的样就知道你肯定不知道，来来来，我给你讲讲。

首先，TA 克隆是用于 PCR 产物的克隆和测序。原理是利用 Taq 酶能够在 PCR 产物的 3'末端加上一个非模板依赖的 A，而 T 载体是一种带有 3'T 突出端的载体，在连接酶作用下，可以快速地、一步到位地把 PCR 产物直接插入到质粒载体的多克隆位点中。

那么在你做 TA 克隆时，需要准备的前期工作是什么呢？

1 设计引物 P 出你的目的基因

不管你是手动设计还是软件设计或是直接引用别人已经发表文章用到的引物，只要能 P 出来目的片段就行，在 PCR 的结果中需要注重 P 出来的浓度，要达到浓度高的要求一方面是在前期的样本准备本身就得到高浓度。

比如要 P 出一种病毒的某部分基因，那么在病毒的 RNA 提取时，就必须保证该病毒的病变效果明显，才有可能得到高浓度的 RNA，继而或者逆转录得到高浓度的 cDNA。

另一方面是在 PCR 的条件时对于退火温度等的条件把握，如果有一些引物二聚体存在，那么可以尝试提高退火温度，延长一点延伸时间，但具体如何使得 PCR 跑出来又亮又单一，还是需要摸摸条件。

2 切胶回收产物

在紫外仪下切下目的产物，注意一定要快准狠，尽快切下，并尽可能少的切下多余的胶，回收利用的试剂盒一般严格按照试剂盒操作应该没有什么问题。回收之后测浓度，准备下一步。

3 连接

这一步骤就直接按照选择的 T 载体说明书来操作了，需要注意的是，在上一步测完回收浓度后，如果浓度较低，建议在试剂加量上尽量加大 DNA 的用量。

一般来说回收之后就赶紧地进行连接，但是由于有时候可能中间时间耽误了，没能及时连接，那么在这之前可以补加两个步骤，一是加 A 尾，二是纯化回收的产物。

但是在长期的尝试中，我发现纯化与否和手动加 A 尾并不怎么影响连接效果。

4 转化铺板

这个步骤用来筛选重组子，长出来的菌多不是好事，菌少也不是坏事，也许就只长两个单克隆菌，但这两个都是阳性重组子，反正只要挑到正确的就行。

5 菌液 PCR 鉴定

一般挑菌之后在 EP 管中摇个 3 到 5 个小时就可以进行菌液 PCR 了，一般来说这样的摇菌时间能最保证接近真实的阳性结果，菌液 PCR 之前有人建议说要煮沸几分钟再 P，但其实直接取摇菌的 1ul 作为模板，进行 PCR 就可以了，条件与之前 P 产物的条件一致。

6 酶切鉴定

酶切位点的选择必须要确保 目的基因中没有这个位点，而载体与目的基因连接附近有位点。在进行酶切的时候是要摸酶切时间的，是否已经切开跑一个电泳看看。

7 测序鉴定

如果实在是觉得上面两个鉴定都拿不准，那也可以尝试测序，如果测序结果与目的基因能够完全比对匹配上，那么也说明就是连接上了。

师兄：你看看，其实 TA 克隆是非常简单的克隆，先天的条件 A 和 T 都已经具备了，除非你手实在不顺，连个 2500bp 以下的都是没什么问题的。

我：好吧，师兄，我发现你说的注意的点我好像是有问题，我再来试试吧。

师兄：做实验嘛，也就是不断尝试了才能积累经验，说不定再做几次你就是克隆小公主了呢！哈哈！

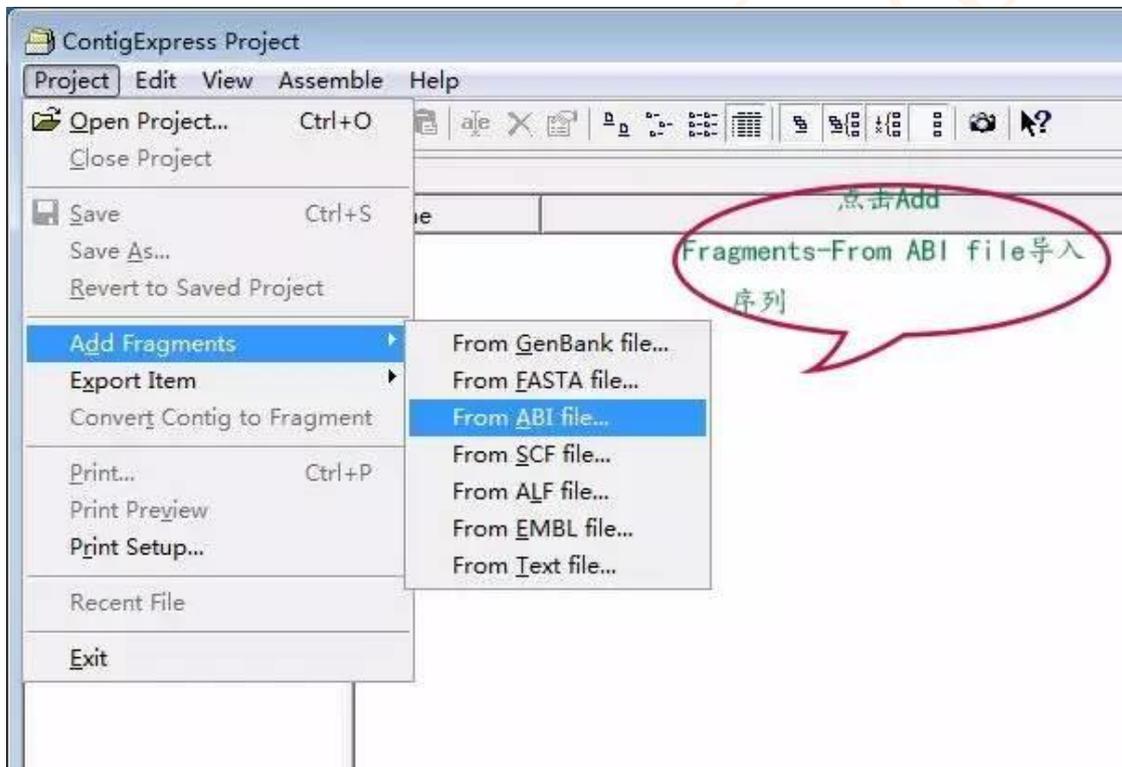
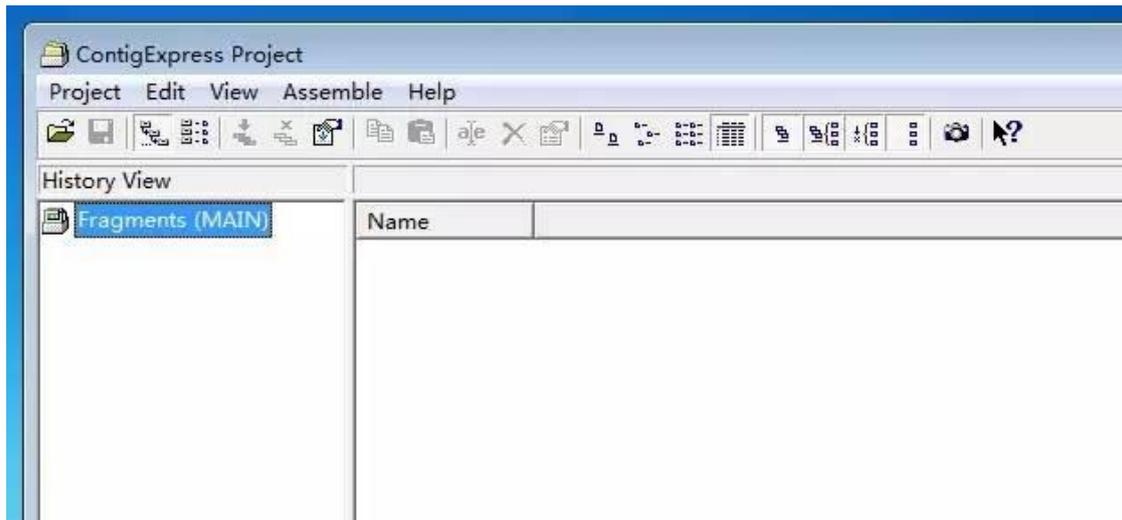
没法拼爹？就学学序列拼接

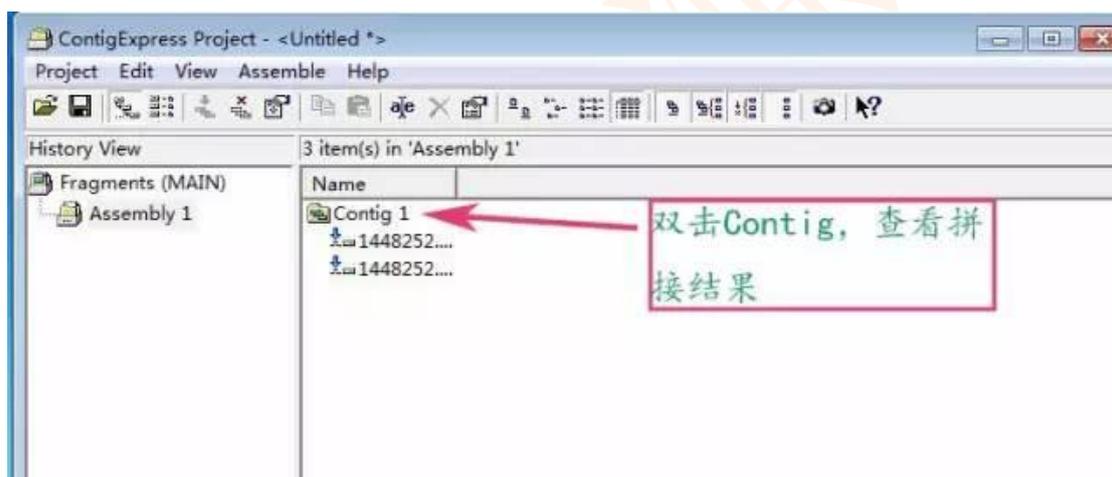
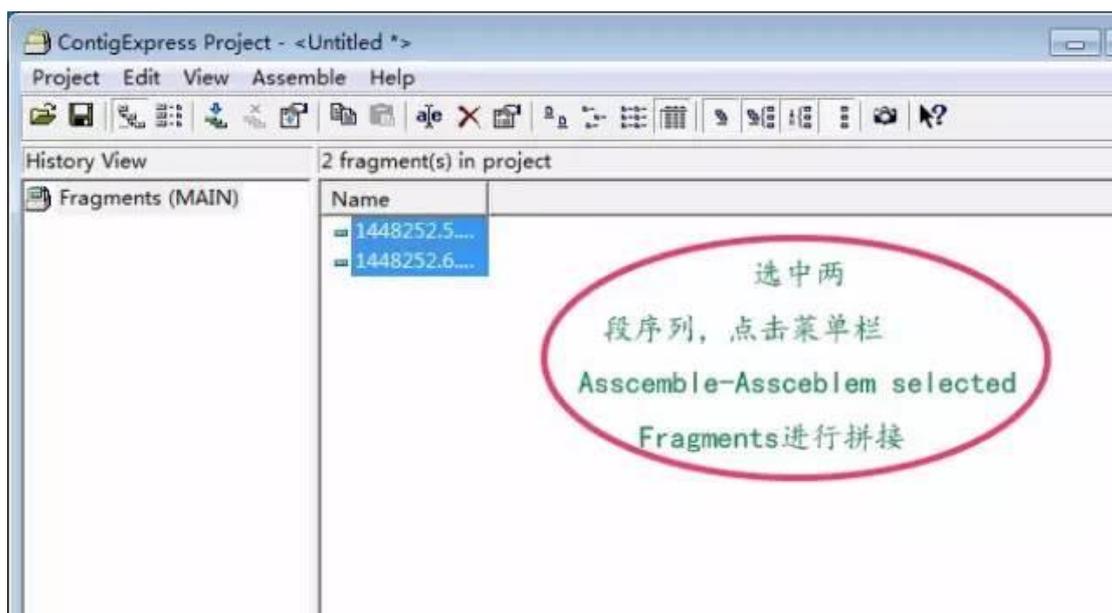
作者：子非鱼

相信大家 PCR 之后一般要进行测序以保证扩增序列的正确性吧？由于测序能力的限制，目前最好的公司也只能保证一个反应 **800bp 测准**。如果大家的克隆片断大于 **1k**，那么**势必要同时测两个反应**，然后将两个反应得到的序列**利用其相互重叠的部分进行拼接**，这样才能得到完整的 PCR 产物序列。

怎样拼接呢？多付点钱，让公司帮你拼接？想当年老板出国了，测序的费用还是自己挨了几顿馒头省下来先垫上的！实在没有这个余钱了~好吧，爹拼不了，还是自己老老实实学拼接吧！请跟小鱼一样悲催的童鞋们走过路过不要错过●●●●●●

首先下载并安装 **Contig Express** ，打开软件：





Contig 1

Contig 1 [2 fragments]

General Description

Fragments

1448252.6.CONTROL(2)-A4.(A4717)213R.G1306054674: 844 ?1715

1448252.5.CONTROL(2)-A4.(A4716)298F.G1306054673: 17924 (complementary)

所需拼接的序列

序列交叠部分

拼接后的序列

	830	840	850	860	870	880	890	900	
?	1	AGAGAGGGAGCCACGGGC GGCG TGAGG TGC TACGAG TTTGGGGACACAAGGCCG TCCGAAGGAACC							
?	829	TCCGC TCCAGGGAAAGAGAGGGAGCCACGGGC GGCG TGAGG TGC TACGAG TTTGGGGACACAAGGCCG TCCGAAGGAACC							
Contig 1	829	TCCGC TCCAGGGAAAGAGAGGGAGCCACGGGC GGCG TGAGG TGC TACGAG TTTGGGGACACAAGGCCG TCCGAAGGAACC							

Contig 1 [2 fragments]

General Description

Fragments

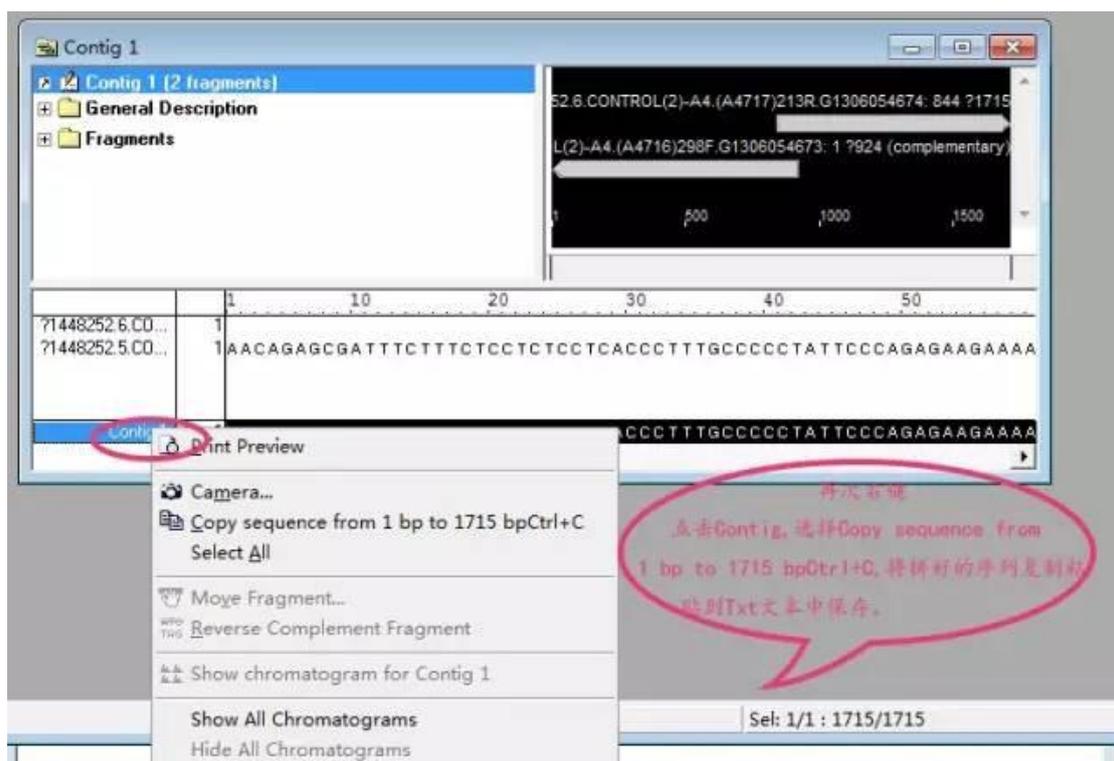
52.6.CONTROL(2)-A4.(A4717)213R.G1306054674: 844 ?1715

L(2)-A4.(A4716)298F.G1306054673: 17924 (complementary)

	1	10	20	30	40	50	
?	1	AACAGAGCGATTTCTTTCTCCTCTCCTCACCCCTTGCCCCCTATTCCCAGAGAAGAAA					
Contig 1	1	AACAGAGCGATTTCTTTCTCCTCTCCTCACCCCTTGCCCCCTATTCCCAGAGAAGAAA					

右键点 击Contig, 选中Select All

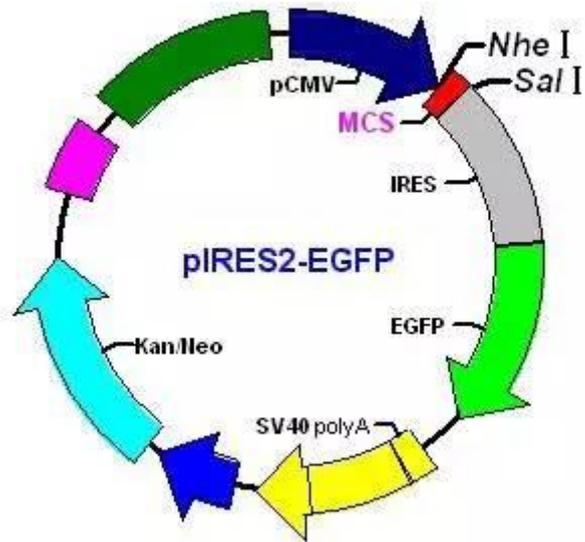
- Print Preview
- Camera...
- Copy Ctrl+C
- Select All
- Move Fragment...
- Reverse Complement Fragment
- Show chromatogram for Contig 1
- Show All Chromatograms
- Hide All Chromatograms



Winplas----科研汪的秘密花园

作者：子非鱼

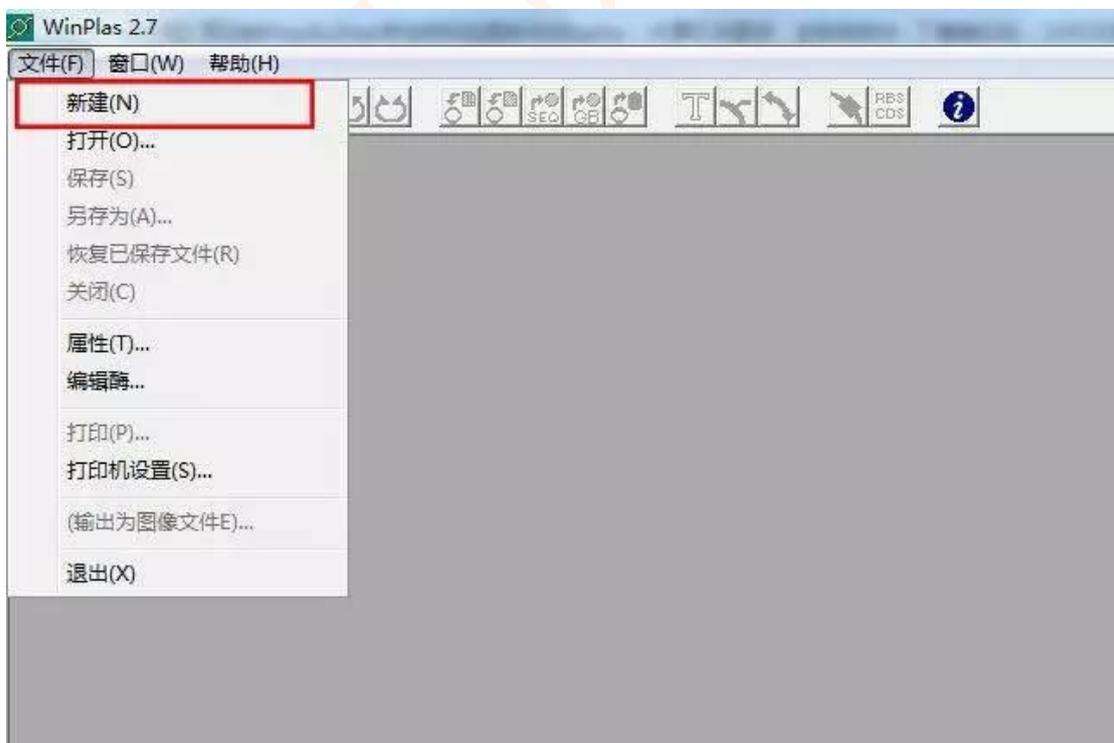
Winplas2.7 作为质粒绘图的专业软件，文件很小，最主要是简单易学，可以在知道或不知道序列结构的情况下绘制质粒图。利用 Winplas 绘制质粒图，这不但让你顺利完成工作，还可通过绘画绚丽多彩的质粒图来放松心情，简直就是科研版的秘密花园嘛！

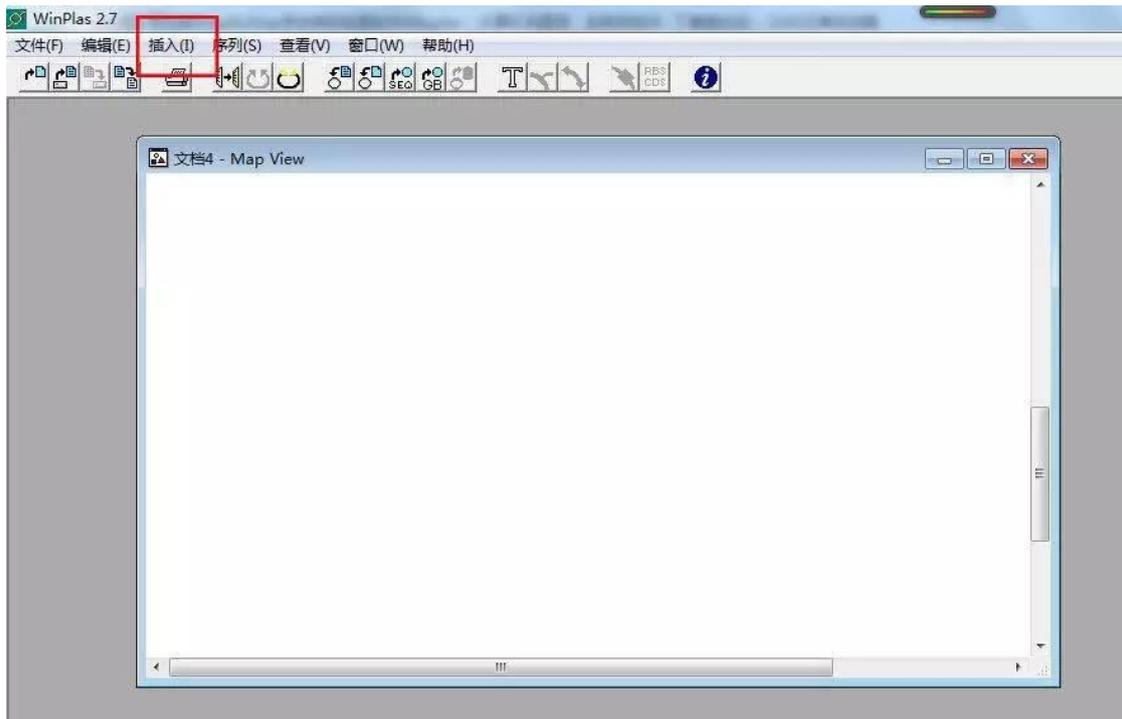


下面小鱼就简单介绍如何使用这款软件绘制质粒图。

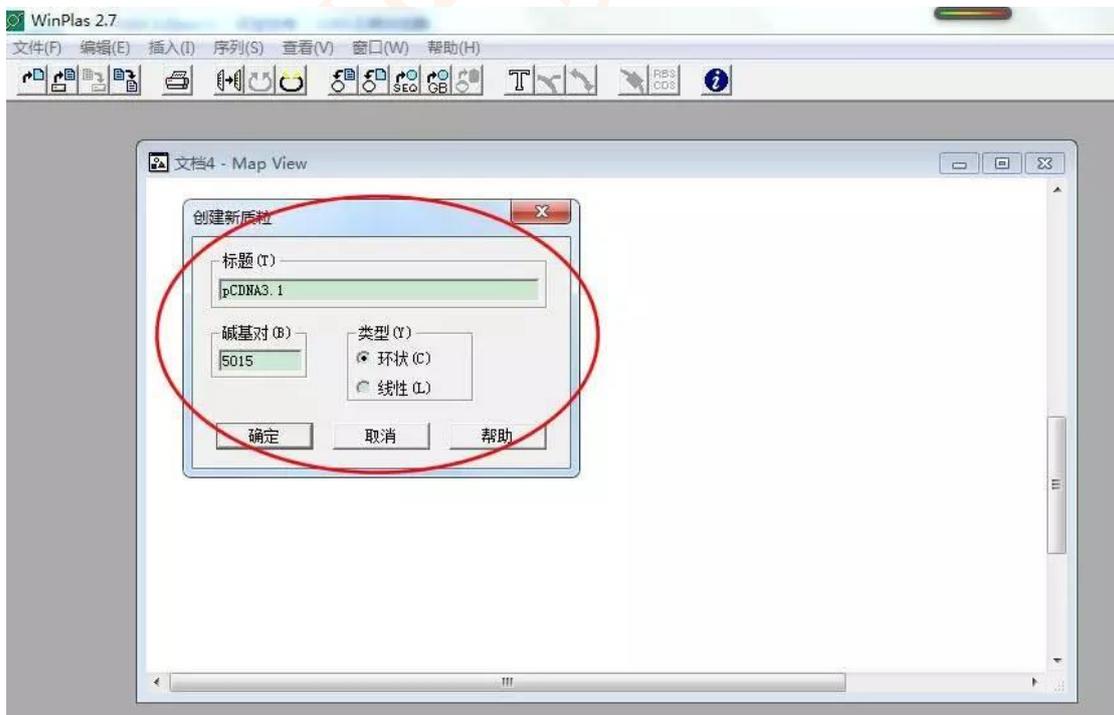
在不知道序列结构时绘制质粒图(白手起家虽然辛苦,但享受过程才能体会这里面的乐趣!)

1、点击“文件”菜单中新建命令，出现 MapView 窗口，同时工具栏中地绘图命令显亮。

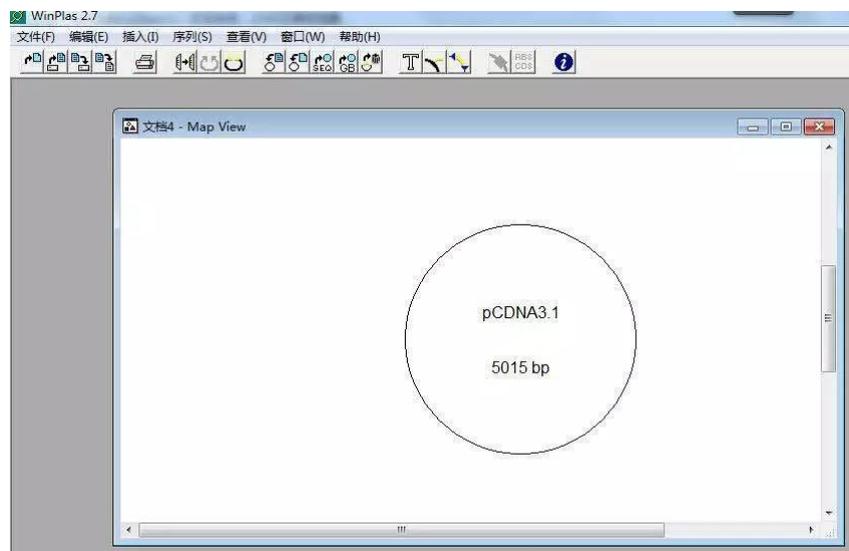




2、点击“插入-空片断”命令，出现一个“创建新质粒”对话框。在“标题栏”中填入质粒名称，在“碱基对”栏中填入质粒大小，在“类型”单选框中设制质粒图谱为线型还是环形。



3、点击“确定”后，在 Map View 窗口就会出现一个圆环，其中有质粒名称及质粒大小。



4、点击“插入”菜单中“区域”命令，弹出“Edit Arc Object”对话框。

*在 Arc 书签中的“碱基对”栏中，填入 Arc 的起始位置，如 209。

*在“长度”栏中填入 Arc 的长度，如 654。在标签栏中填入 Arc 的名称，如 pCMV。

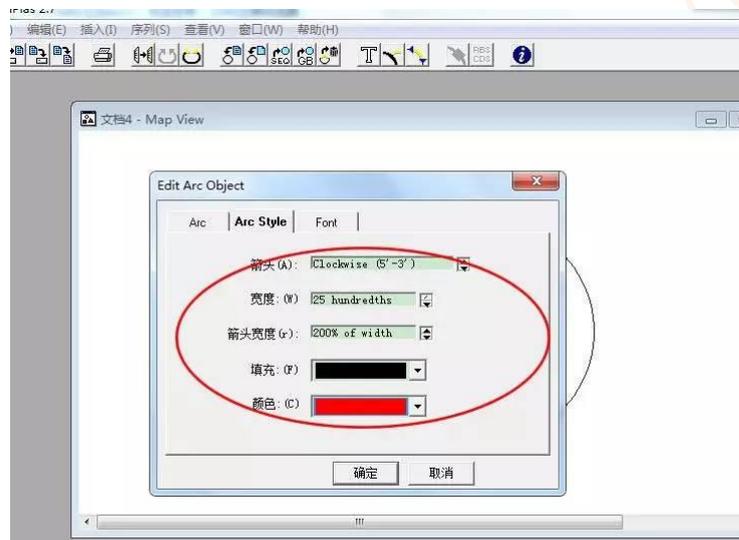
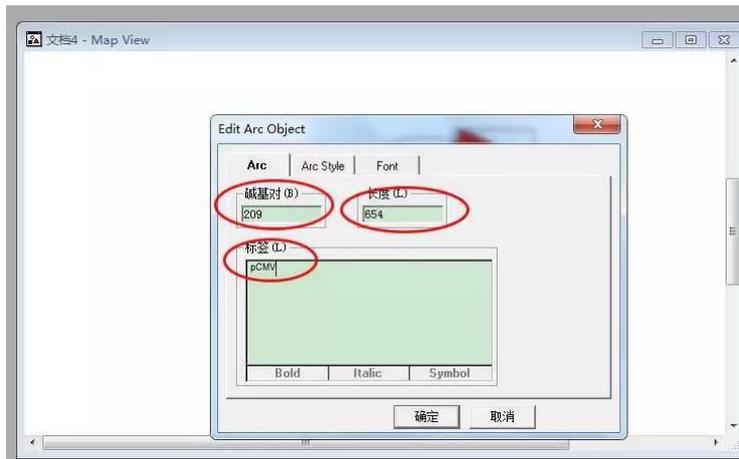
*在 Arc Style 书签中，首先确定该 Arc 是否有箭头以及箭头的方向。分别对应 none, 5'→3', 3'→5', 及双向。

*通过 Width 来确定 Arc 的宽度

*也可以调节箭头与 Arc 径宽度的比值

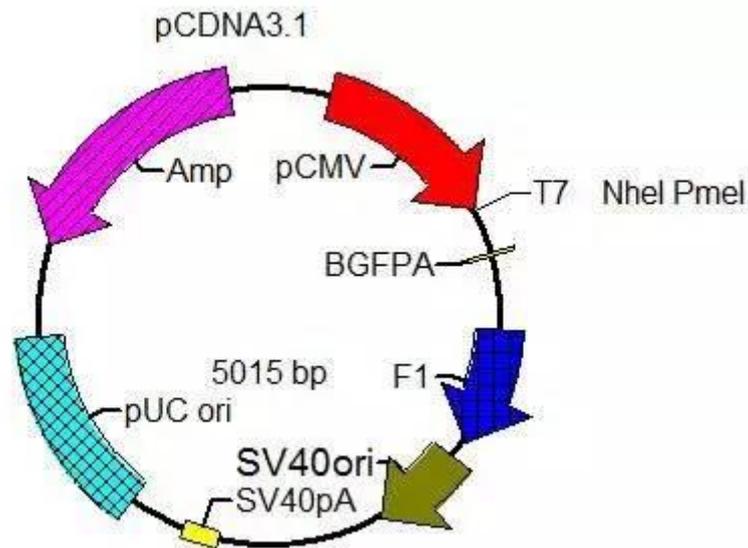
*改变填充样式以区分不同的 Arc;改变 Arc 的颜色;同样也可以改变字体的样式、颜色等

点击 OK，则在图谱中 209-863bp 位置出现一个 Arc，名称叫 pCMV。



5. 对于任何一个项目，如需要修改，我们只需用鼠标左键选中它（哪里要修点哪里！），并双击，即可出现相应的编辑窗口。对于文字及质粒名称、大小，我们可以用鼠标在任意位置拖放。其它的修饰，点击 **Edit** 菜单中“质粒选项”命令，可以调节质粒环的粗细、大小（半径）环的颜色以及背景颜色；标记连线的粗细、颜色以及标出 **Marker** 的位置；以及 **Arc** 名称连线的粗细、颜色、**Arc** 边缘的颜色等。

下面是小鱼做的质粒图，做得不是很好，仅供参考



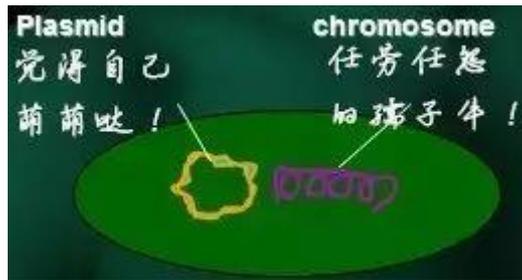
另外，在知道序列结构时绘制质粒图：只需要选择 File New 后，在“插入”菜单选择“GenBank 文件”或者“序列文件”，选择一个指定文件，确定后，便根据此序列生成质粒图，进行进一步编辑。当然，在知道序列结构时绘制质粒图时也是可以自己一步步画出来哦

质粒图的绘制就是这么简单有趣，大家回去不妨一试！

“胖”质粒之逐爱瘦身记

作者：子非鱼

与身兼数职（复制、转录、翻译等）而致使瘦成螺旋状的染色体大哥不同，我只是一个胖胖的萌萌哒质粒，因心宽体胖兼有高度亲和力，能跟很多受体细胞都能打成一片；且又因身具多种单一切割位点、能容纳外源基因及合适的筛选标记，因而也备受科研者们的喜爱并被光荣选为各种基因的载体。

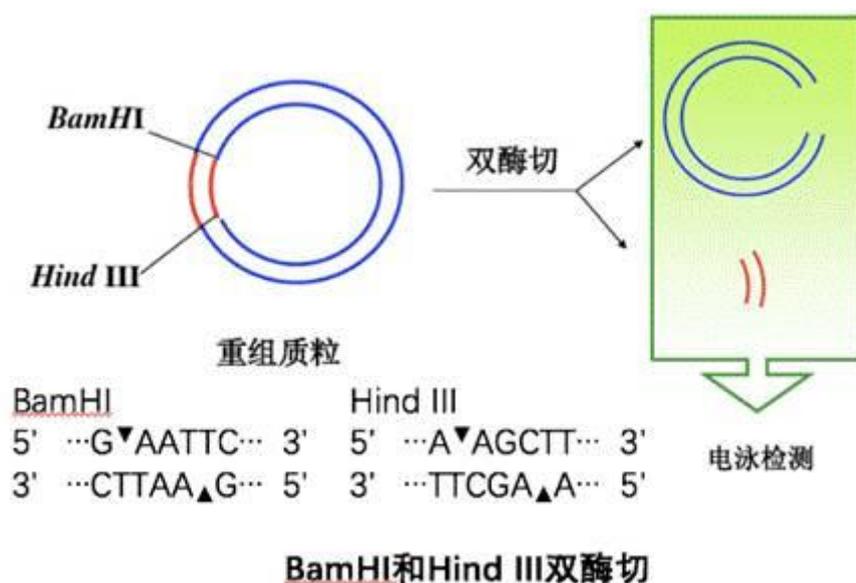


而我本人对于高富帅的外源基因也可谓是一见倾心。为了能和外源基因重组为一个完满的圆，“好闺蜜”限制性内切酶着实功不可没！为了打动高富帅外源基因的心，限制性内切酶会强制性帮我减肥，使我从圆滚滚的憨丫头顺利转为苗条的俏姑娘，并努力帮我争取与外源基因约会的机会。



对此，我很是感激。果然，在核酸内切酶家族中，只有II型内切酶才是我的好闺蜜，因为她不仅了解外源基因真正喜好（粘性末端序列），并能依据我身上特异性的回文序列进行量体裁衣（定点切割）。哪像I型和III型限制酶这两个绿茶妹，说是要帮我，却只是简单粗暴在离切割位点1kb到几kb的地方随机切割，因而带着错误妆容（粘性末端序列不匹配）的我与心仪的外源基因只能擦肩而过，这样还不如当初直接让核酸外切酶将我切成渣渣的好。

至于我瘦身的过程，说起来也非常简单，就是闺蜜嗖嗖两刀下去，便可迫使我所有脂肪细胞（酶切位点）纷纷离去。换言之，就是将我和两种限制性内切酶以及Buffer和（huò）在一起，然后于37℃水浴锅里泡个1-2h的澡，即可通过电泳走秀检验我的瘦身成果。



而后瘦身成功且变得美美哒的我便会在“红娘”连接酶的搭桥连线中与高富帅外源基因结成一家人。而在重组家庭之后，很快我便又重新恢复本性，再一次变得心宽体胖起来。

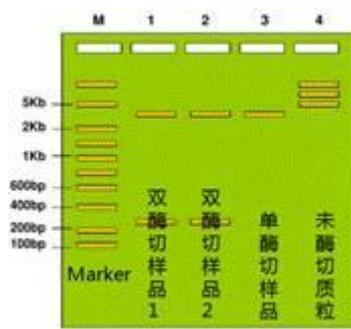
就在一切都尘埃落定时，我便喜欢话当年，遥想起当年与闺蜜（限制性内切酶）之间种种过往，不得不感叹道好闺蜜的养成也是蛮不容易的。

初识闺蜜时，自然少不了摩擦与矛盾，以至于时常会出现以下两种极端情况：要么瘦身失败（切不断）；要么瘦到走火入魔（乱切一气以自虐）。因而这段友情唯有通过彼此之间的相互了解相互磨合方可得以维系。

所以一旦我瘦身失败，我首先会反思自己是否太过任性，竟将酶切位点的碱基修饰成了闺蜜识别不了的形式（如甲基化等）；又或者太过调皮，以至于酶切后的黏性末端在退火时又重新结合起来，让闺蜜做了无用功。

此时，我会当机立断的改用 JM109 来替代 DH5 α 以减少修饰，同时尽量调整酶切体系（50ul、100ul，大体系可稀释酶中的甘油有利于反应）。

其次，为了确保限制内切酶与我是否真的志同道合（相互匹配），我会预先进行酶 A 和酶 B 各自的单酶切以及 A+B 的双酶切等实验。如果一切正常，即单酶切时只有一条线性化条带、双酶切出现两条带时，那么她才算具备成为中国好闺蜜的特质。



即便如此，我瘦身的道路依然曲折而险阻。毕竟，天下懒胖是一家。我既然占了胖，那么闺蜜自然也就赖上了懒。有时，闺蜜懒癌晚期，不肯尽心尽力的出大力（如酶活性下降甚至失活），也会极大的阻碍了我减肥大业的完成。这时，只有对其进行冷处理（冰上酶切）或者忍痛换新酶才能助我早日搞定自身的终身大事。

但有时我会为了瘦达到一种丧心病狂的地步（酶切过头），以至于经常发生一些该切的地方没切，不该切的地方瞎切的“自虐”事情。追根究底，竟是由好闺蜜的癫狂（非特异性酶切活性——星号活性）而引起的。

其实，能引起酶切的星号活性的因素有很多：1）非最适的 pH；2） Co^{2+} 、 Mn^{2+} 取代 Mg^{2+} ；3）酶浓度大于 $25\text{u}/\text{ug}$ ；4）盐浓度降低；5）高浓度甘油的存在($>12\%$)；6）有机溶剂的存在等等，但最常见的原因莫过于酶切时间过长或者酶量过多。

这种时候，我的良心建议就是酶切水浴 1-2h 就已经完全足够了；另外，所加酶的体积不能超过酶切总体积的 $1/10$ ，否则甘油浓度就会超过 5%，进而会产生星号活性。

虽说酶切没有辣么简单，但是对于不做构建的小伙伴们而言并没有什么卵用，可如果你想玩转基因克隆，那么以下两件神器就是必须要掌握的了。

1、REBASE (Restriction Enzyme dataBASE)

网址：<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>



通过使用 REBASE 来获取限制性内切酶的最新信息，几乎已成为了该领域的主力军。REBASE 于 20 世纪 70 年代由 New England Biolabs 创建，并被诺奖得主 Richard Roberts 进行了专利申请。REBASE 可提供大量有关限制性内切酶的类型、识别序列和切割位点的信息。同时它还包含了有关甲基转移酶，晶体结构等信息。

2、NEBcutter

网址：<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>

NEBcutter V2.0

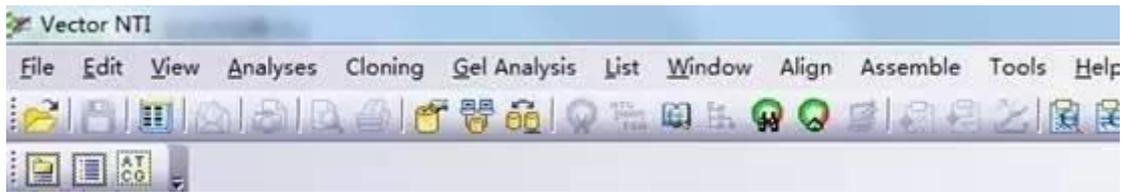
Find the large, non-overlapping open reading frames using the E.coli genetic code and the sites for all Type II and commercial enzymes. By default, only enzymes available from NEB are used, but other sets may be chosen. Just enter your sequence and "submit" file is 1 MByte, and the maximum sequence length is 300 KBases.

在 NEBcutter 中，可以输入高达 200,000 个碱基的线性或环状 DNA。该程序则将提供一些使用大肠杆菌遗传密码的开放阅读框（ORF），以及一次切割这些 ORF 的 II 型和 III 型限制酶列表。

一文学会查找质粒图谱

作者：子非鱼

方法一：Vector NT 软件



毋庸置疑，这款软件绝对是了解质粒图谱的一个压箱底的法宝，它包含 Invitrogen 公司里所有的质粒图谱信息和其他比较常见和经典的质粒图谱，可使得初接触分子克隆的小伙伴们对质粒图谱有着简单直观的认识，真正做到了软件在手，质粒我懂。

方法二：查找质粒图谱的网址

1.Vector Database

网址：<http://www.addgene.org/vector-database/>

直接再输入框中输入 pET，即可搜索出相关质粒。

The image shows a screenshot of the Addgene website. At the top, the Addgene logo is displayed with the tagline "The nonprofit plasmid repository". There are links for "Login" and "Create Account". Below the logo is a navigation bar with "Find Plasmids", "Deposit Plasmids", "How to Order", and "Plasmid Re". A search bar is present with the text "Search Vector Database | Search Addgene Plasmids". The search input field contains "pET" and a search button. Below the search bar is a pagination control showing "1" as the selected page. The search results are displayed in a table with the following data:

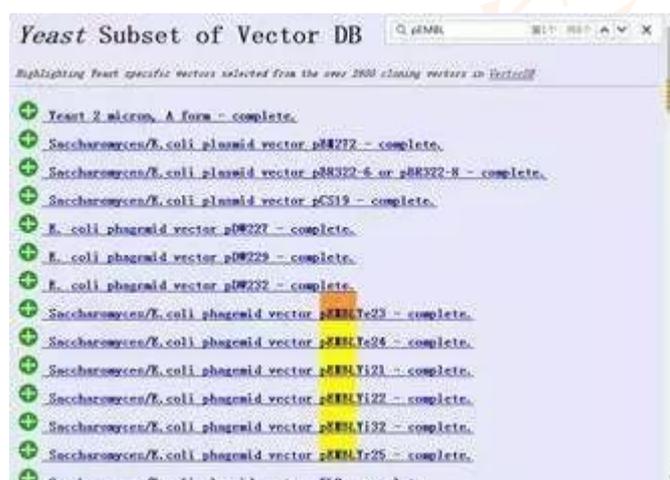
Name	Vector Type	Resistance Marker	Bacterial Resistance	Source	Sequence
CYPet-N1	Mammalian Expression	Neomycin		Addgene	✓
mTagRFPet-C1	Mammalian Expression	Neomycin		Addgene	✓

而后点击自己所需要的质粒名称，就可以看到质粒的详细信息以及图谱。

2.Vector DB

网址：<http://genome-www.stanford.edu/vectordb/vector.html>

该网址里对质粒的总结和分类比较完整，基本囊括了所有表达系统的质粒信息。不过，让人有些不爽的是这个网站竟然没有搜索栏，太不人性化了。好在小鱼有妙招：按 Ctrl+F，输入质粒名称即可。



点击所需质粒名称即出现以下界面，此时点击 [sequence link](#) 可查看该质粒的序列，而点击 [NCBI link](#)，就可以直接跳转 NCBI 页面。然后点击右边的 [send to](#)，选中 [File](#)，[GeneBank](#) 等选项，点击 [Create File](#) 选项可得到一个 [gb](#) 格式文件，导入 [vector](#) 软件中，即可得到质粒图谱。

pEMBLye23

●Vector IG Sequence Link :

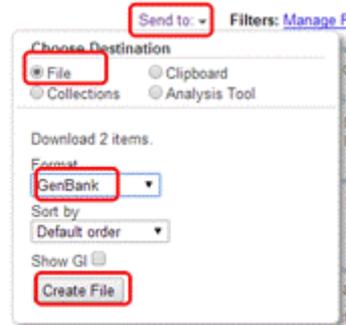
- General : phagemid ds-DNA 7282 BP
- Functions : (cloning)
- Selection : ()
- Copy Number :
- Hosts : (E.coli 71/18)(Saccharomyces cerevisia
- Suppliers : (ATCC)
- Misc. Comments : Created by Moore, July 1995,
- Parents : (pEMBL9+)(YEp24)
- Siblings : ()
- Descendents : ()

●NCBI ENTREZ Link :

Summary ▾ Sort by Default order ▾

Items: 2

- [Cloning vector pEMBL 8 minus \(pEMBL8m\)](#)
 - 3,939 bp linear other
Accession: X04995.1 GI: 58261
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- [Cloning vector pEMBL 8 plus \(pEMBL8p\)](#)
 - 3,939 bp linear other
Accession: X04995.1 GI: 58262
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)



3.Google 学术

网址： <https://www.google.com.hk/> 在搜索框中输入质粒名称+map，或者质粒名+sequence+filetype:txt/filetype:pdf，又或者进入 Google 后，点击图片搜索，直接查找图谱。



Google 搜索

手气不错

4.悠游博客

网址：<http://yoou.bokee.com/5757561.html>

如果你能在该网址里找到自己所需的质粒，点击相应的质粒名即可查看质粒图谱。



方法三：公司试剂网页

有些商业化公司整理某一系列的质粒相关信息，如克隆载体 pMD18-T, TaKaRa; pGM-T, 天根; 表达载体 Novagen 公司的 pET 系列等。因而如果知道常见的质粒是哪个公司的，去其官方网站上可以查找该质粒的相关信息。

方法四：寻找改造后的质粒图谱

有些经过改造的质粒可先将名称输入 Google scholar 中，查看使用过该质粒的文章，进而了解该质粒的来源，因而向文章作者进行咨询。以文章 Kuhlman, T. E. and E. C. Cox (2010). "Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs." *Nucleic Acids Res*38(6): e92 为例，也可先在 PubMed 中进行搜索，而后在 Related Information 中点击 Nucleotide，并按照在 NCBI 下载质粒图谱的方法获取质粒图谱即可。

Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs.

Kuhlman TE¹, Cox EC

Author information

Abstract

We have developed an effective, easy-to-use two-step system for the site-directed insertion of large genetic constructs into arbitrary positions in the Escherichia coli chromosome. The system uses lambda-Red mediated recombineering accompanied by the introduction of double-strand DNA breaks in the chromosome and a donor plasmid bearing the desired insertion fragment. Our method, in contrast to existing recombineering or phage-derived insertion methods, allows for the insertion of very large fragments into any desired location and in any orientation. We demonstrate this method by inserting a 7-kb fragment consisting of a venus-tagged lac repressor gene along with a target lacZ reporter into six unique sites distributed symmetrically about the chromosome. We also demonstrate the universality and repeatability of the method by separately inserting the lac repressor gene and the lacZ target into the chromosome at separate locations around the chromosome via repeated application of the protocol.

PMCID: PMC1458111
 PMC Full text

Save items

Similar articles

Cited by 34 PubMed Central articles

Related information

Articles frequently viewed together

Nucleotide

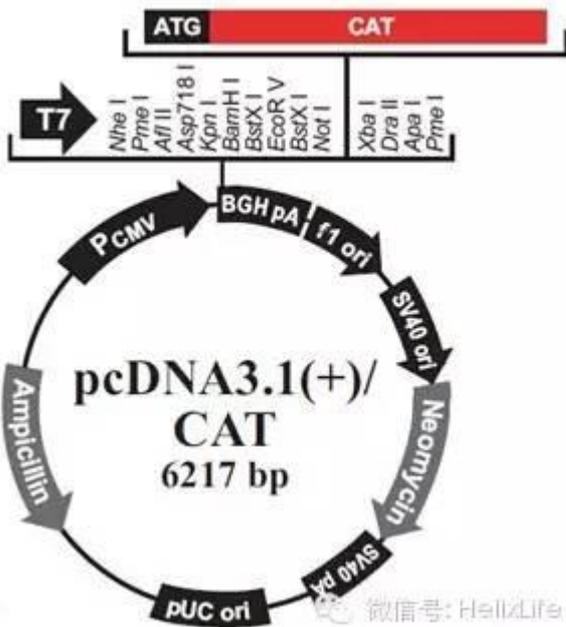
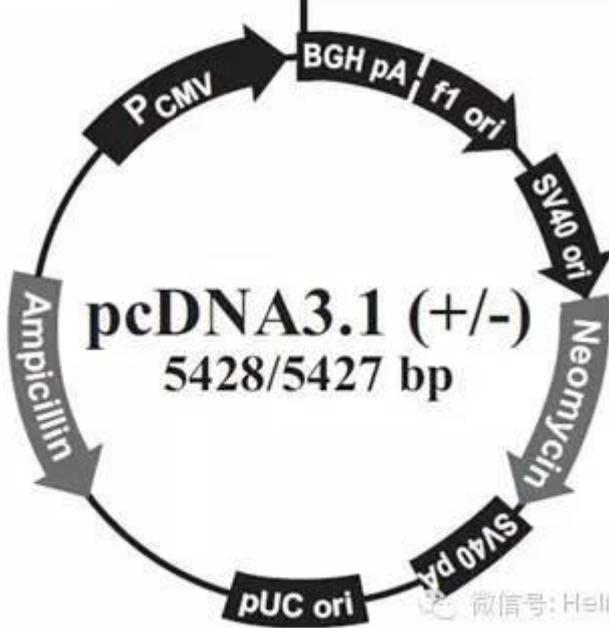
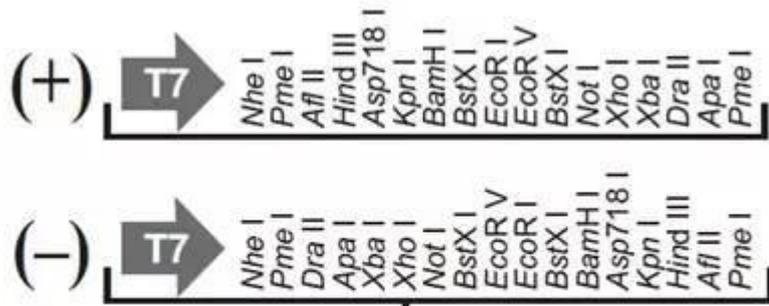
附录：常见质粒图谱清单

常见质粒图谱清单	
九种表达载体	Pllp-OmpA
	Pllp-STII
	pMBP-P/pMBP-C
	pET-GST
	pET-Trx
	pET-His
	pET-CKS
	pET-DsbA
	pTZ19R DNA
克隆载体	pUC57 DNA
	PMD18T
	PQE30
	pUC18/pUC19
	pTrcHisA
	pTrxFus
	pRSET-A/pRSET-B
	pVAX1
	PBR322
	pbv220
	pBluescript II KS(+)
	L4440
	pCAMBIA-1301
	pMAL-p2X
	pGD926

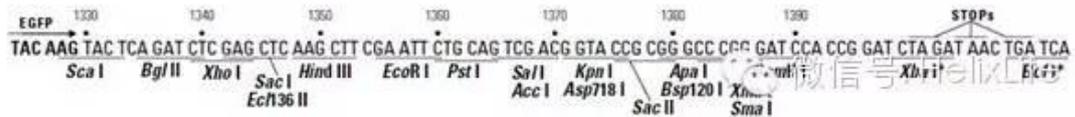
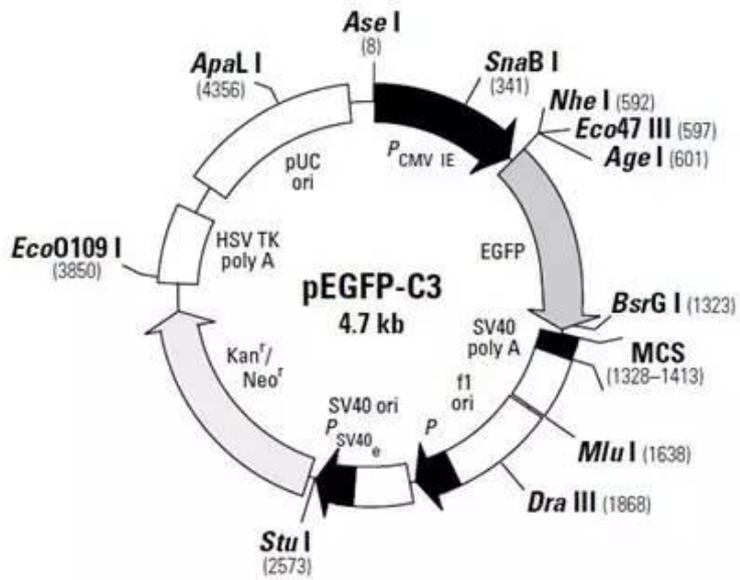
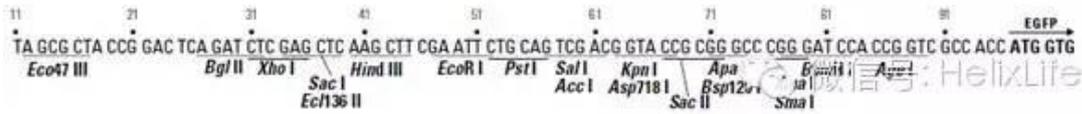
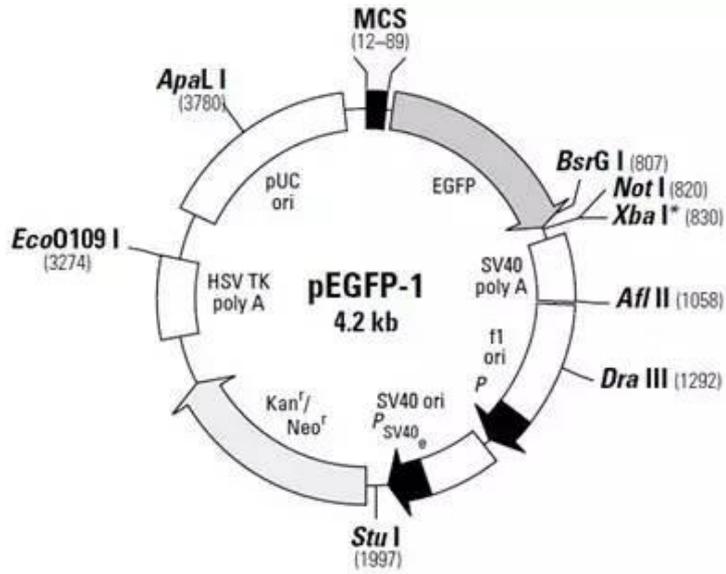
PET系列表达载体	pET Dsb Fusion Systems 39b&40b
	pET Expression System 33b
	pET Expression Systems
	pET Expression Systems plus competent Cells
	pET GST Fusion Expression Systems 41&42
	pET NusA Fusion Expression Systems 43.1&44
	pET Vector DNA
PGEX系列表达载体	pGEX-1 I/BAP λ T EcoR
	pGEX-2T/pGEX-2TK
	pGEX-3X
	pGEX-4T-1/pGEX-4T-2/pGEX-4T-3
	pGEX-5X-1/pGEX-5X-2/pGEX-5X-3
	pGEX-6P-1/pGEX-6P-2/pGEX-6P-3
PTYB system	PTYB1
	PTYB2
	PTYB11
	PTYB12
真核表达载体	pCDNA3.1(-)/pCDNA3.1(+)
	pPICZ alpha A
	PYES2.0
	pBI121
	pEGFP-N1
	pEGFP-C1
	pPIC9K
	pPIC3.5K

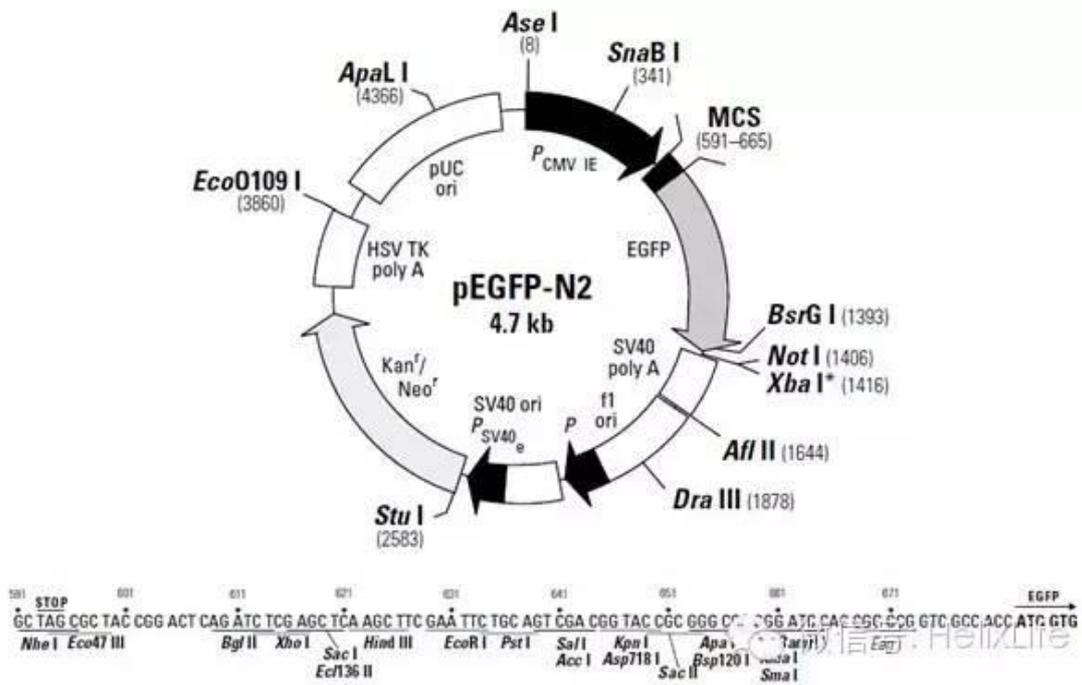
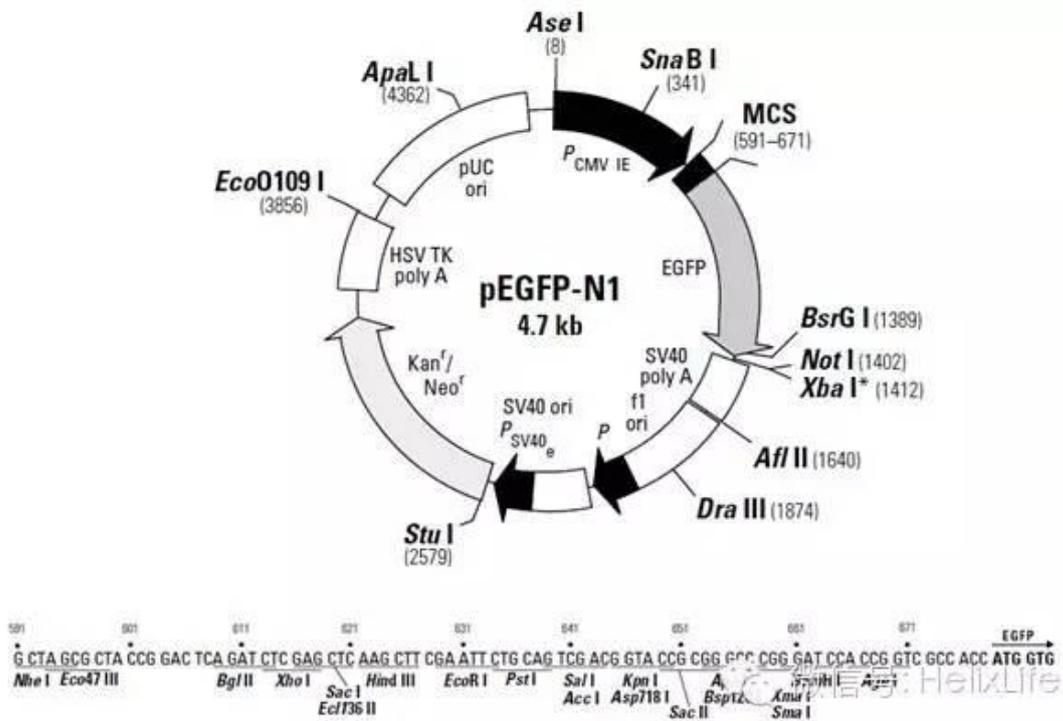
质粒盛宴，可打包带走

作者：麦子

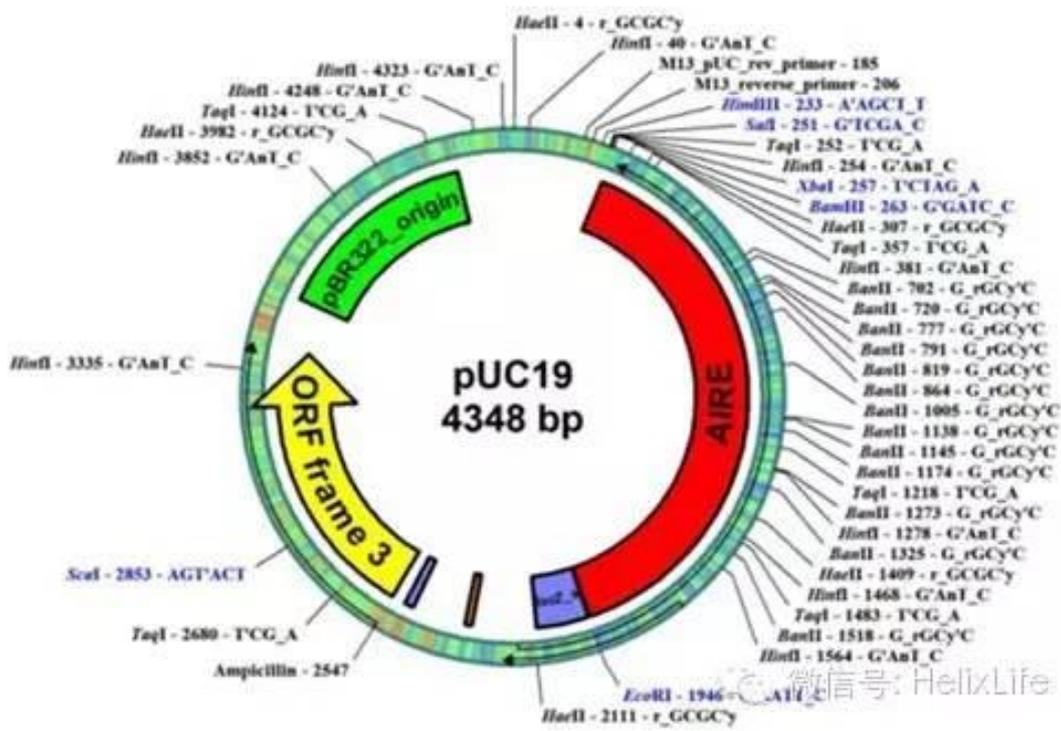


pcDNA3.1(-)和 pcDNA3.1(+), 构建表达载体常用思密达~

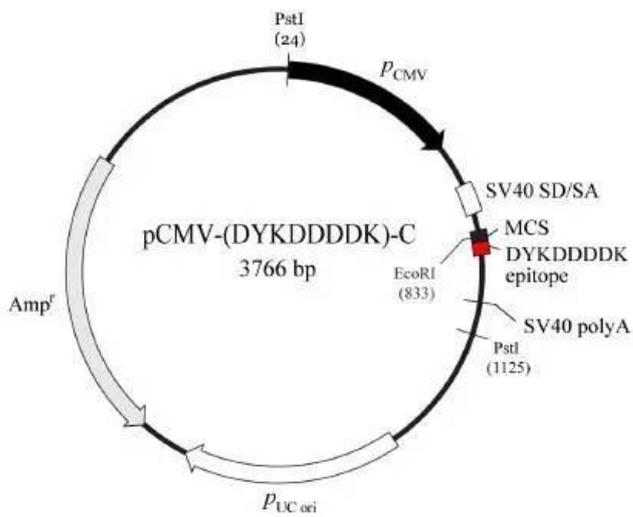




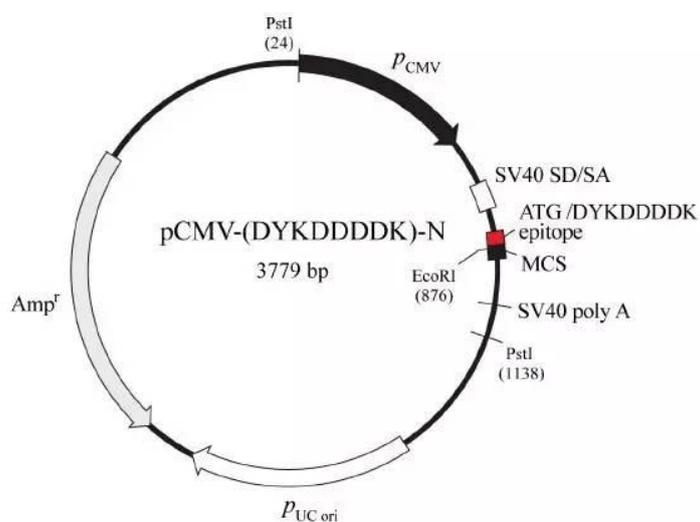
强大的 pEGFP 质粒家族，构建具有绿色荧光的融合蛋白，麦子的挚爱~



pUC19 常用于 DNA 片段克隆、DNA 测序、外源基因表达等



	<u> ApaI </u>		<u> EcoRI </u>		<u> SalI </u>		<u> BglII </u>		<u> XhoI </u>	
819	CGG GCC CAG GCC CGA ATT CGG TCG ACC GAG ATC TCT CGA		CGA ATT CGG TCG ACC GAG ATC TCT CGA		CGG TCG ACC GAG ATC TCT CGA		GAG ATC TCT CGA		TCT CGA	
	GCC CGG GTC CGG GCT TAA GCC AGC TGG CTC TAG AGA GCT		GCT TAA GCC AGC TGG CTC TAG AGA GCT		AGC TGG CTC TAG AGA GCT		CTC TAG AGA GCT		TAG AGA GCT	
	<u> Acc65I </u>									
	<u> XhoI </u>									
	<u> KpnI </u>		<u> DYKDDDDK epitope </u>							
858	GGT ACC GGC GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG TAA		GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG TAA		GAC GAC GAT GAC AAG TAA		GAT GAC AAG TAA		AAG TAA	
	CCA TGG CCG CTG ATG TTC CTG CTG CTA CTG TTC ATT		ATG TTC CTG CTG CTA CTG TTC ATT		TTC CTG CTG CTA CTG TTC ATT		CTG CTA CTG TTC ATT		CTG TTC ATT	



ATG+DYKDDDDK epitope SfiI

HindIII MscI

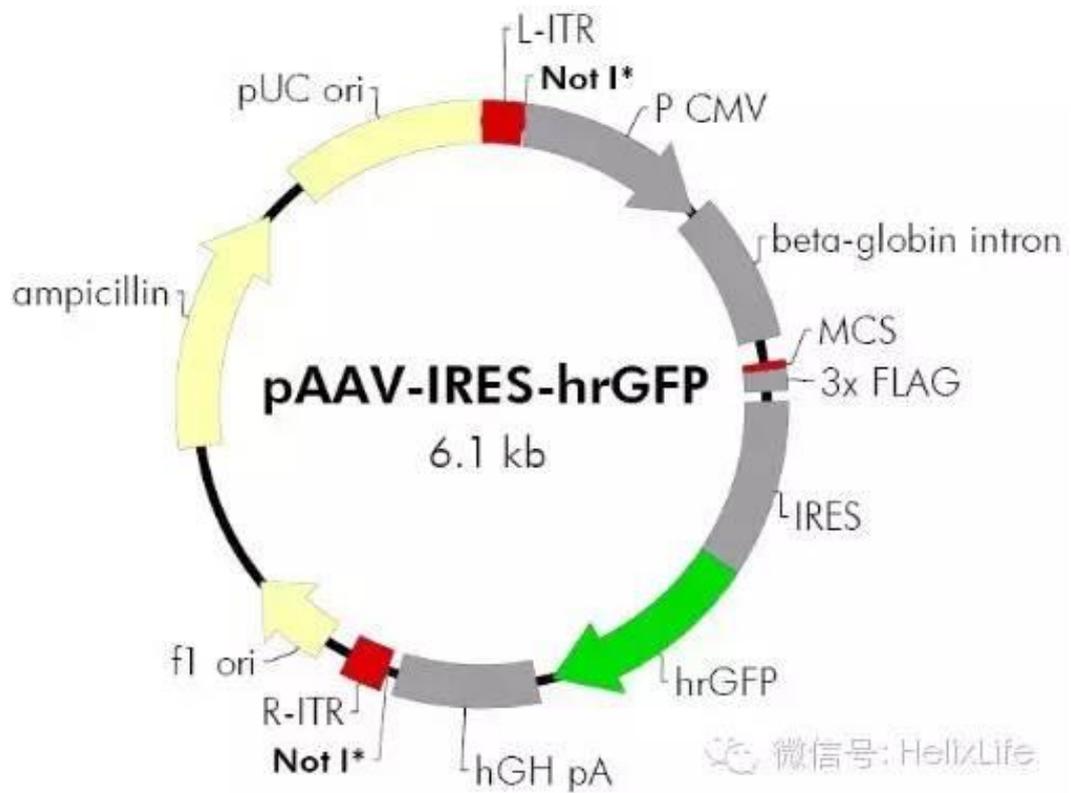
829 ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG CTT ATG GCC ATG GAG GCC
TAC CTG ATG TTC CTG CTG CTA CTG TTC GAA TAC CGG TAC CTC CGG

SalI KpnI NotI

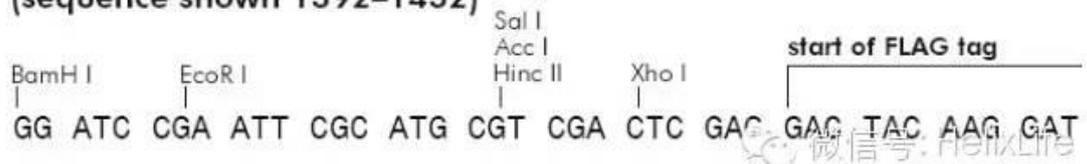
EcoRI AccI BglIII XhoI Acc65I EagI

874 CGA ATT CGG TCG ACC GAG ATC TCT CGA GGT GCG GCG GCG GCG
GCT TAA GCC AGC TGG CTC TAG AGA GCT CCA TGG CGC CGG CGC

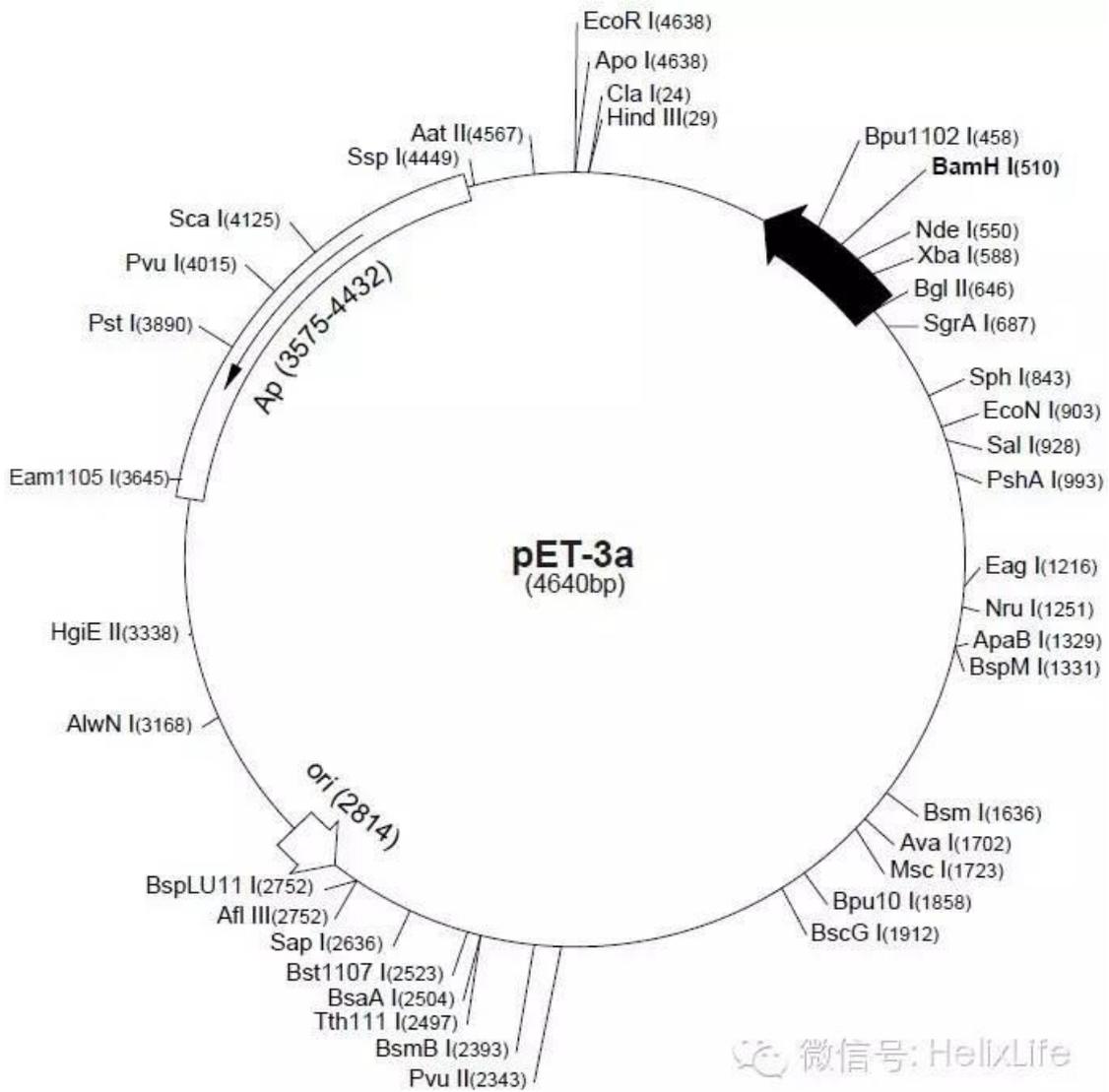
带 DYKDDDDKtag 的 pCMV-C/N 质粒及其多克隆位点

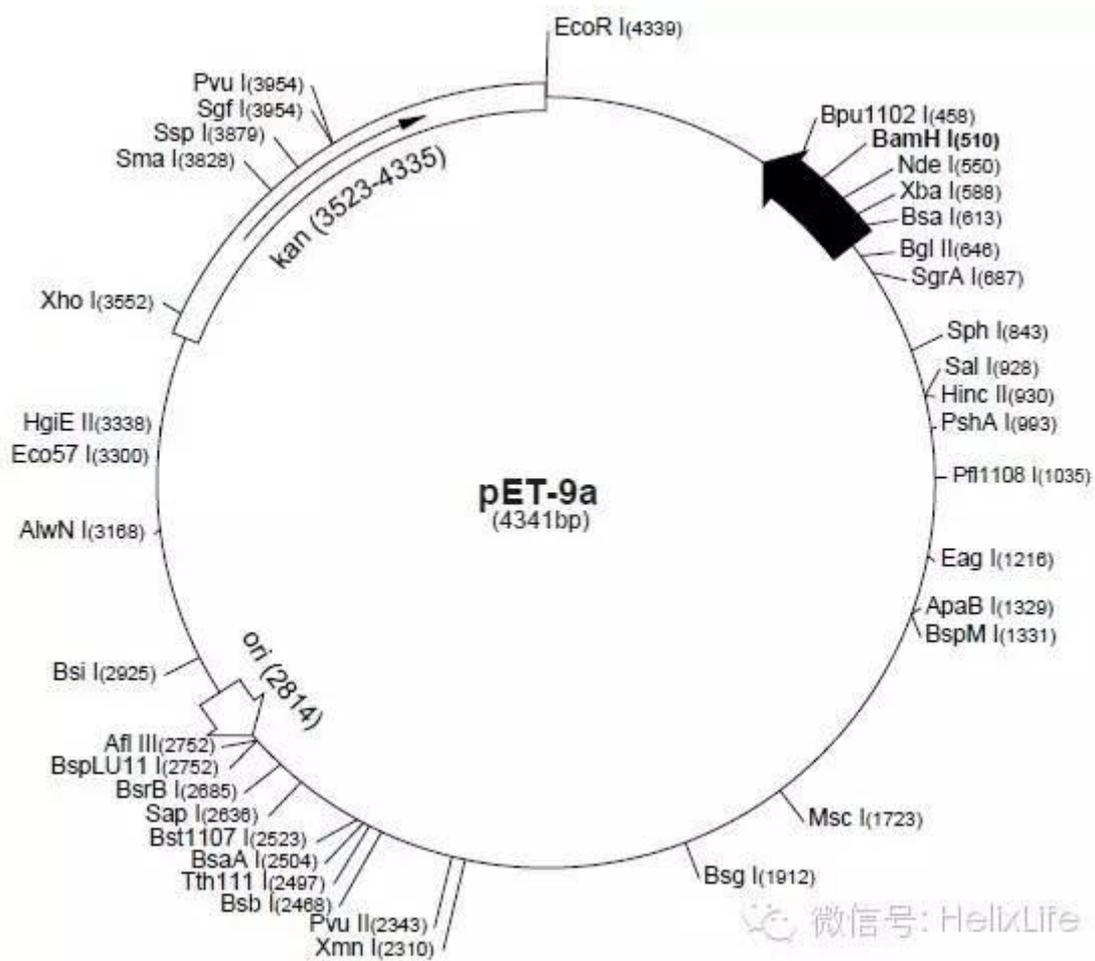


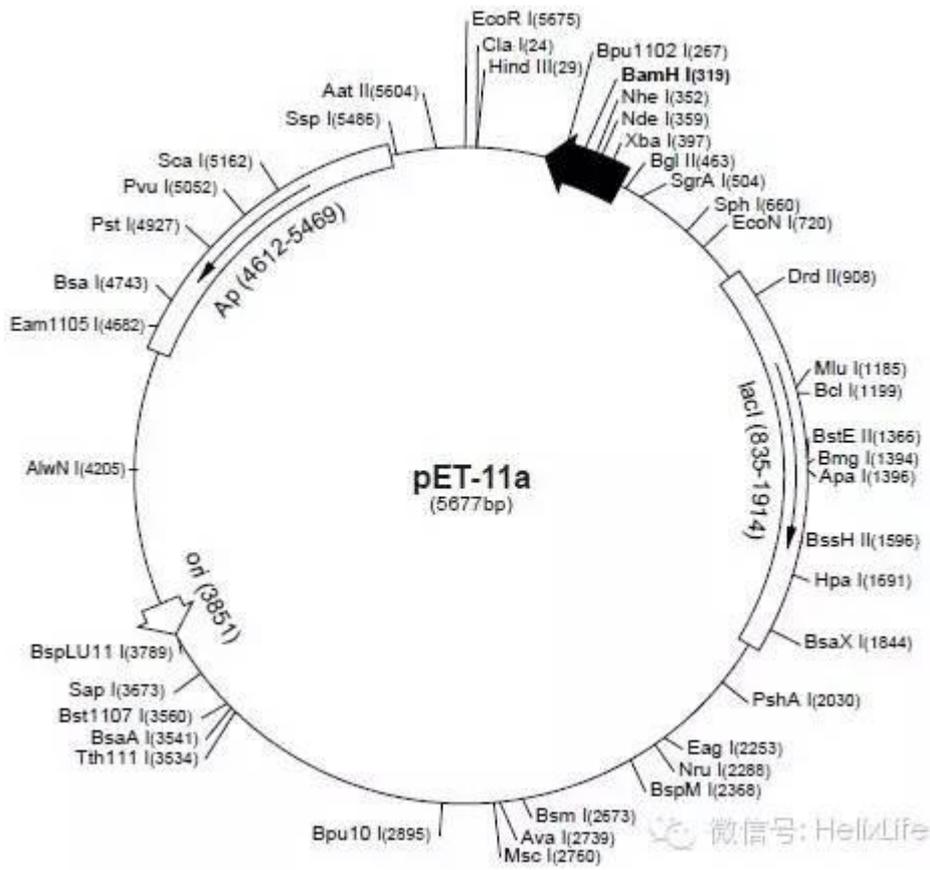
pAAV-IRES-hrGFP Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 1392-1432)

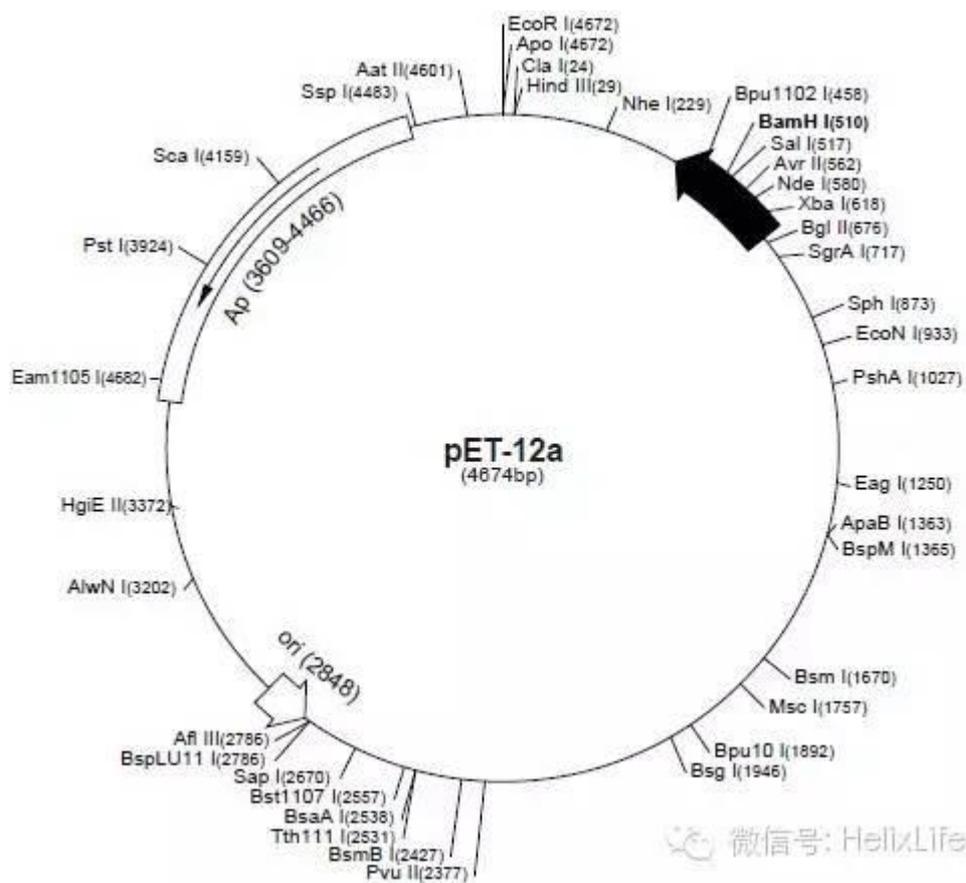


pAAV-IRES-hrGFP 腺病毒相关载体



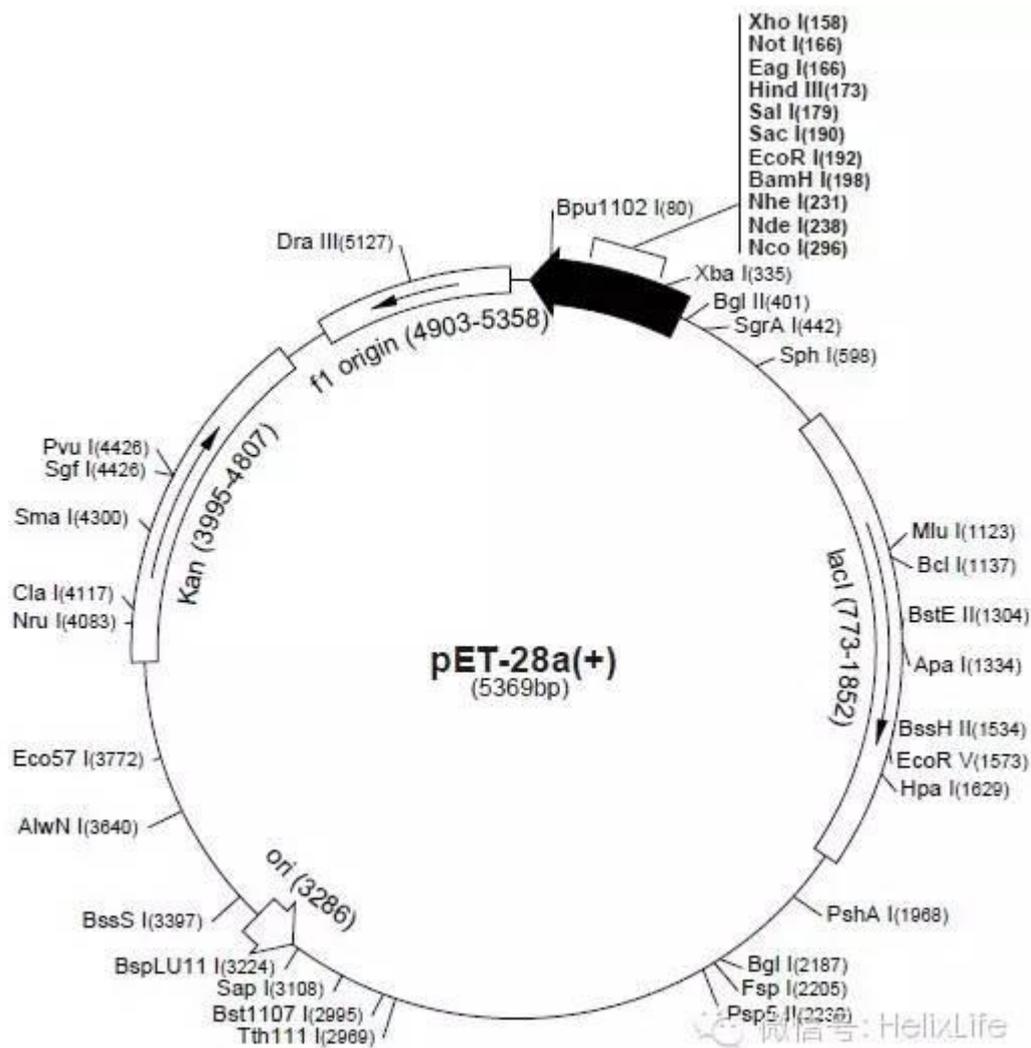




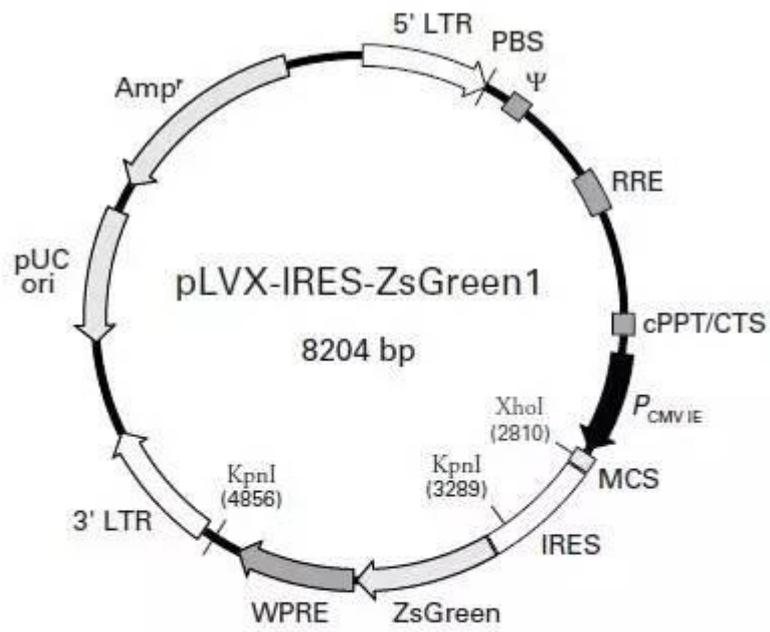


.....

科佰网



pET 质粒系列该系列是大肠杆菌克隆表达重组蛋白很强大的系统，目的基因被克隆到 pET 质粒载体上，受噬菌体 T7 强转录及翻译调控，宿主细胞提供的 T7RNA 聚合酶诱导其表达。

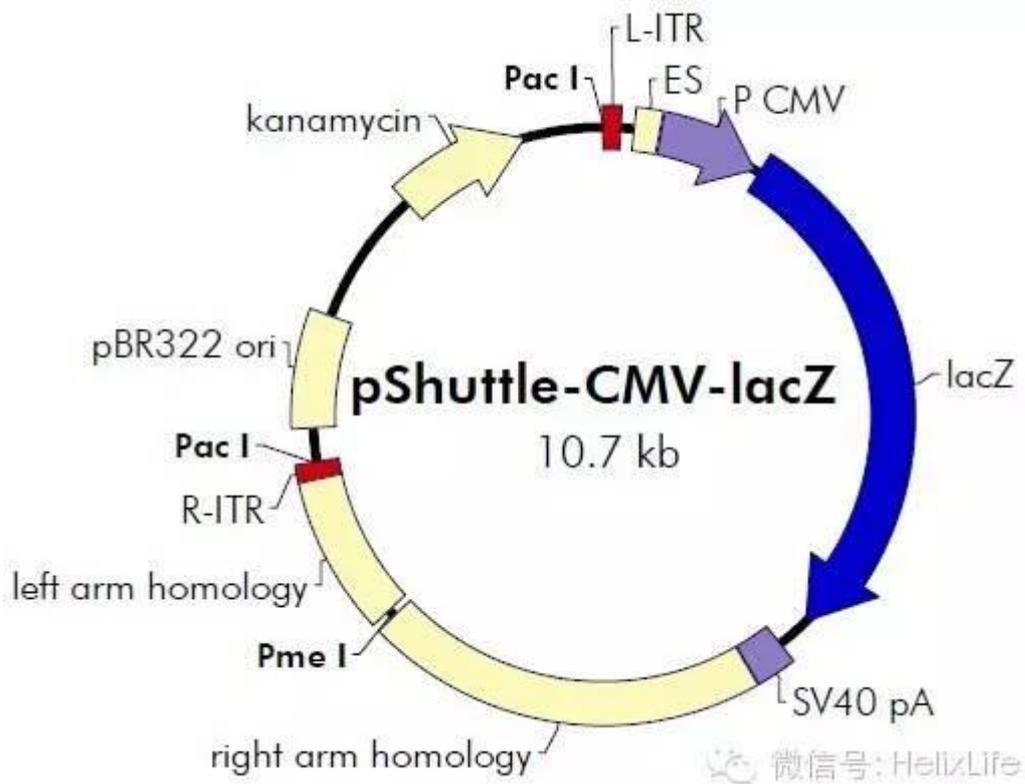
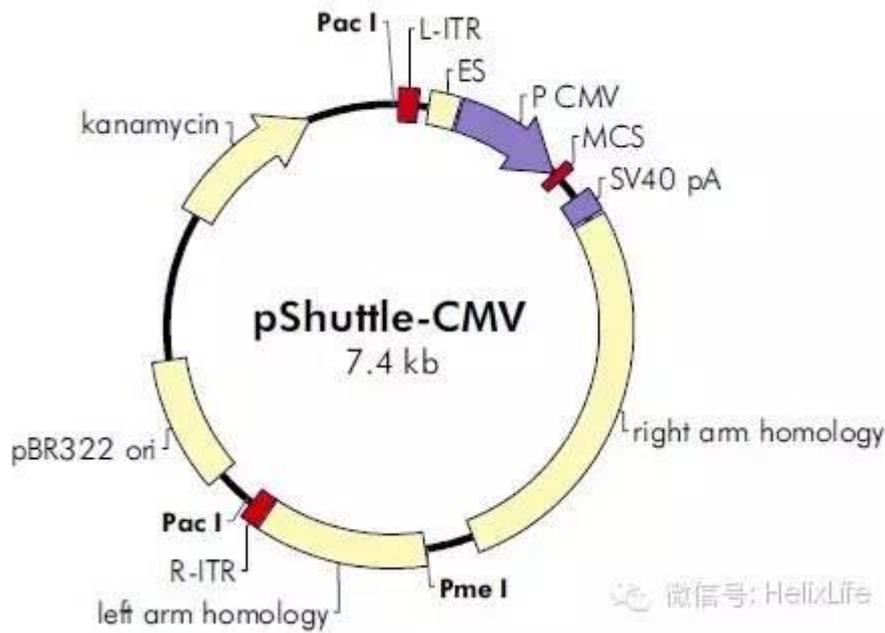


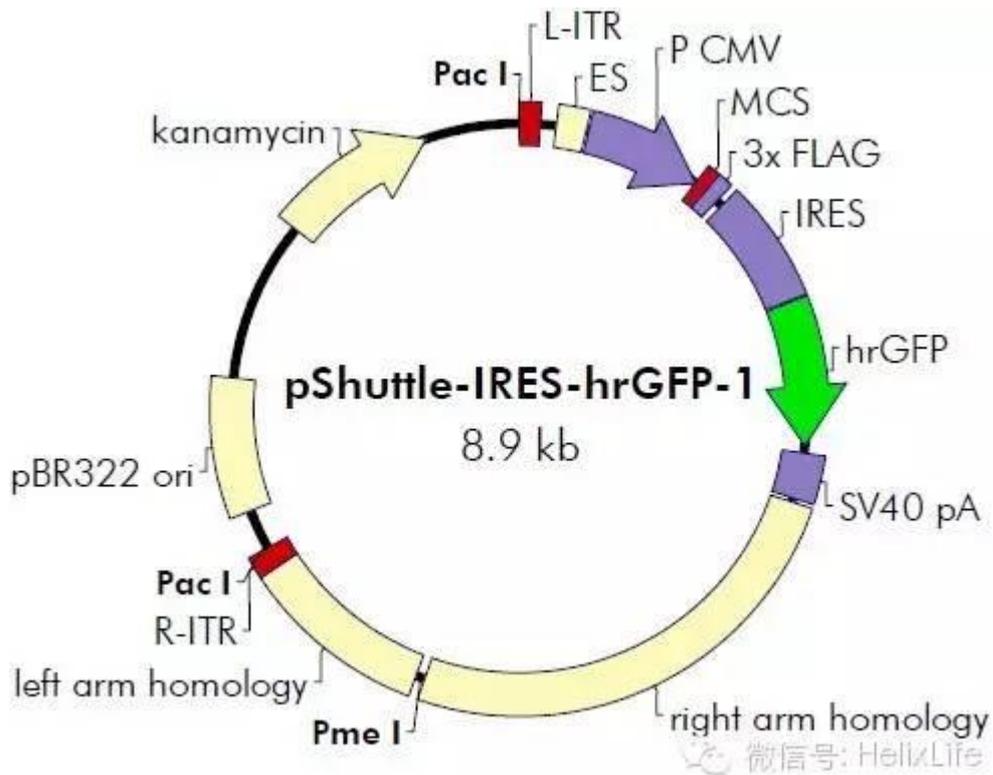
2801

	<u>EcoRI</u>	<u>XhoI</u>	<u>SpeI</u>	<u>XbaI</u>	<u>NotI</u>	<u>BamHI</u>
	GTGAATTCCT	CGAGACTAGT	TCTAGAGCGG	CCGCGGATCC		
	CACTTAAGGA	GCTCTGATCA	AGATCTCGCC	GGCGCCTAGG		

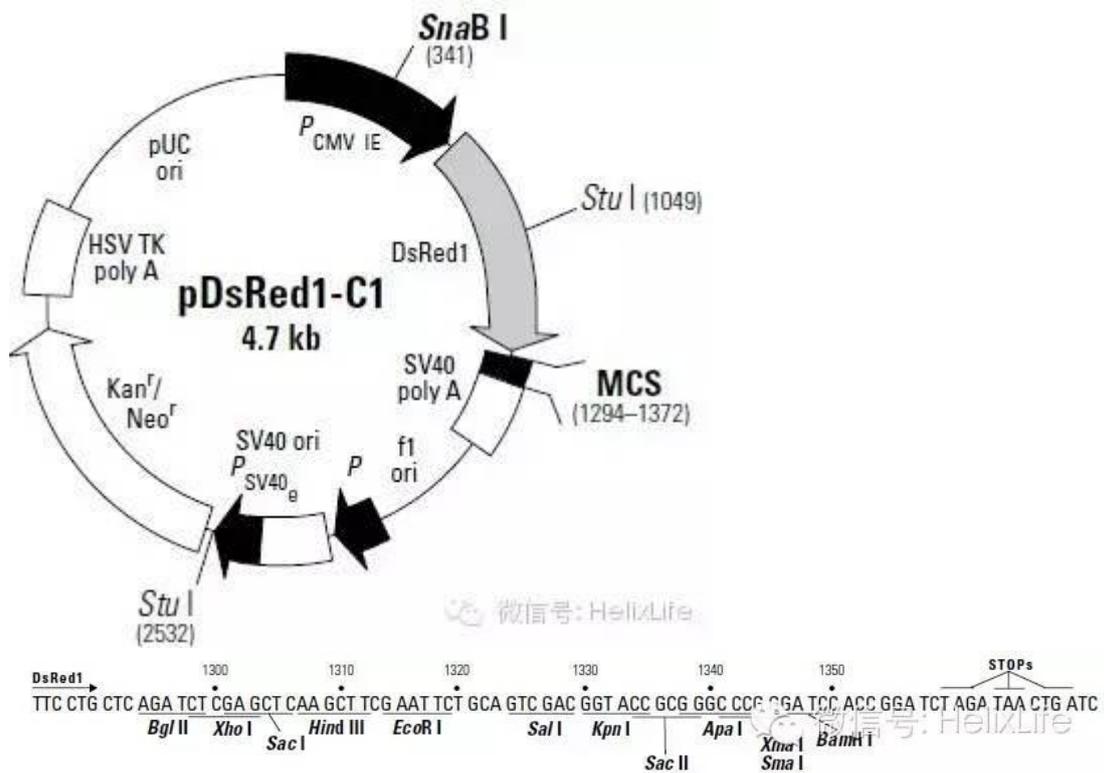
微信号: HelixLife

pLVX-IRES-ZsGreen1 及其克隆位点，哺乳动物细胞慢病毒表达载体，载体能够同时表达 ZsGreen1 荧光蛋白和目的基因

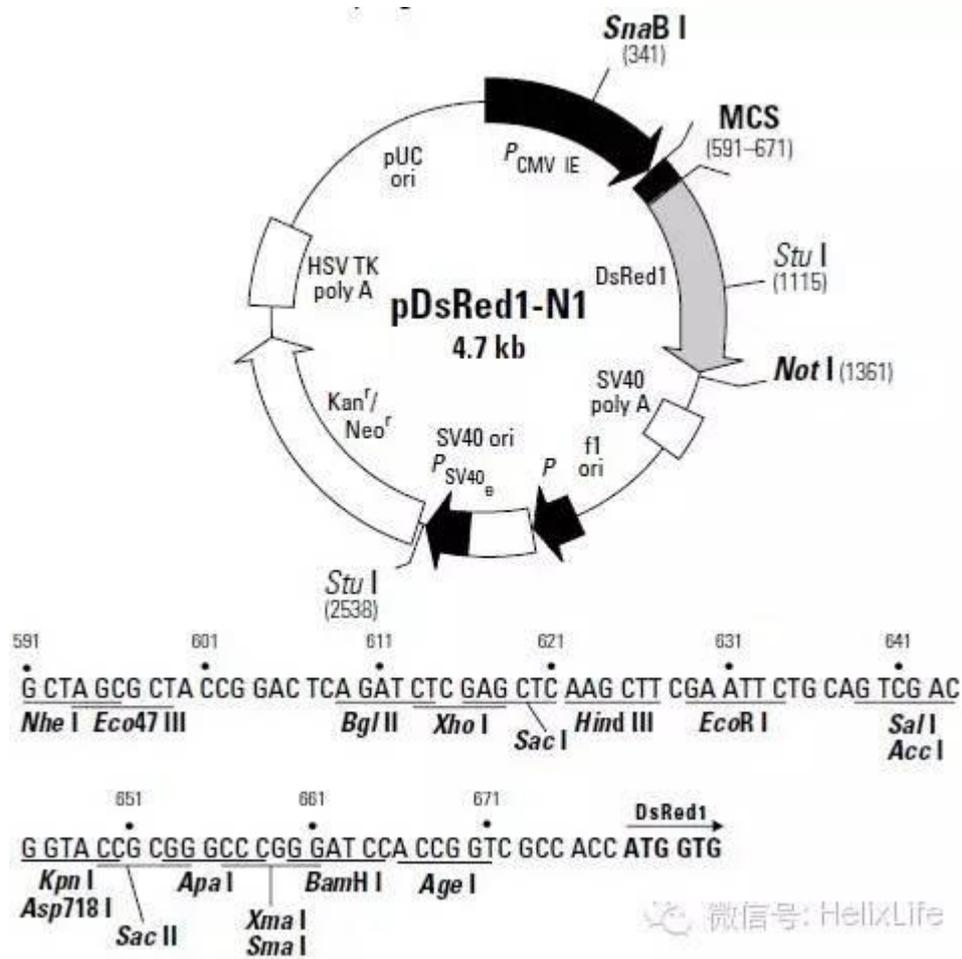




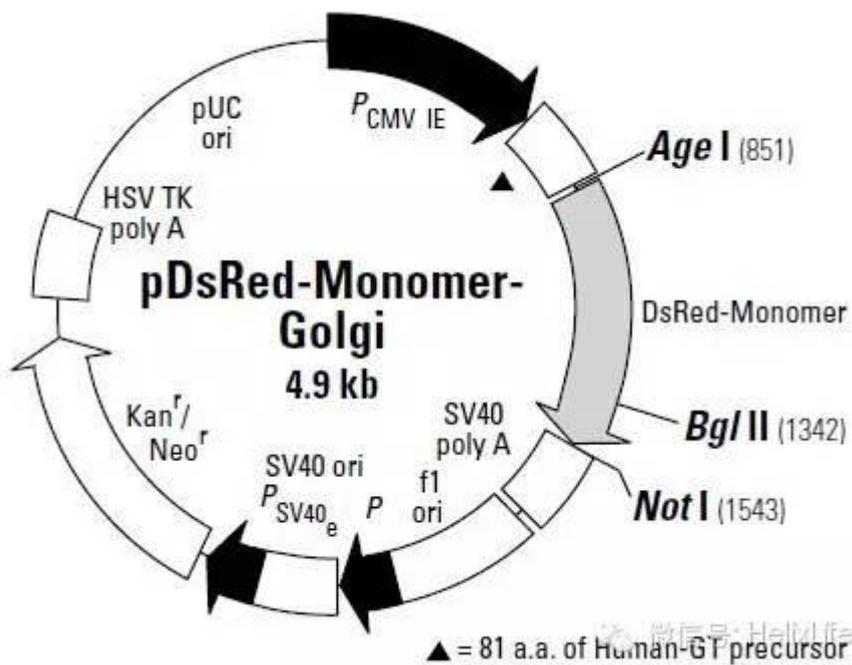
腺病毒穿梭质粒 pShuttle 系列



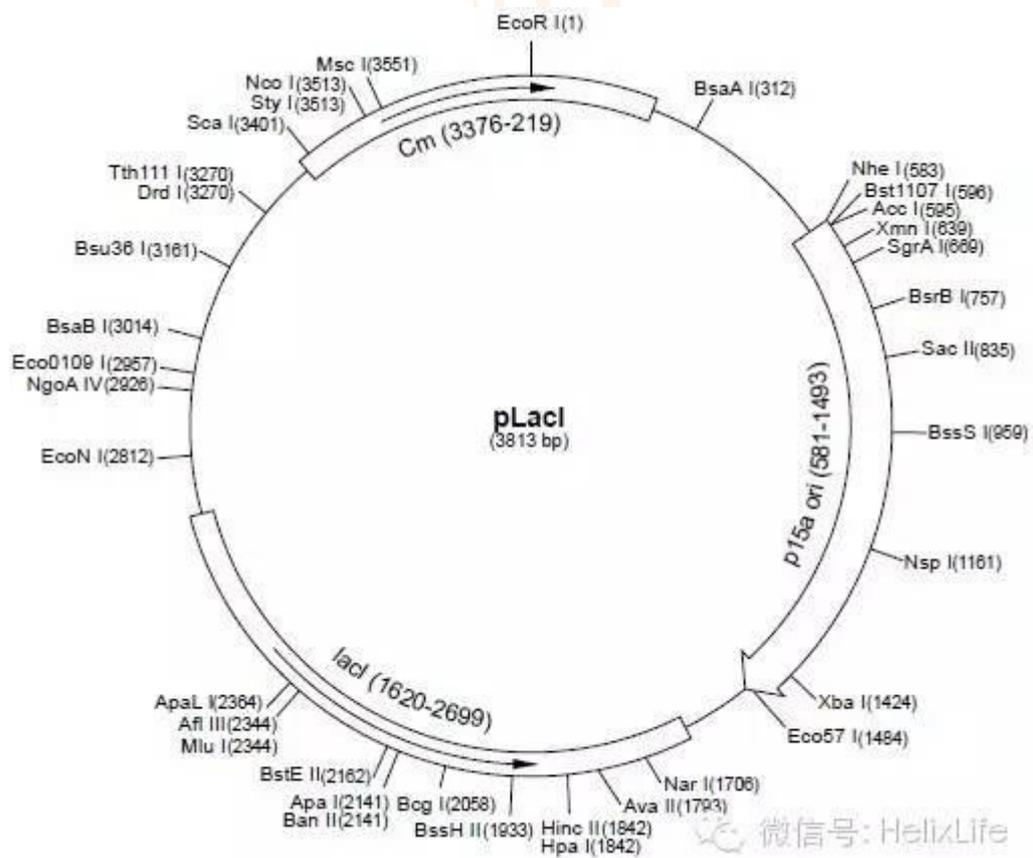
pDsRED1-C1: C 代表在 DsRed1 的 C 段插入序列构建融合蛋白



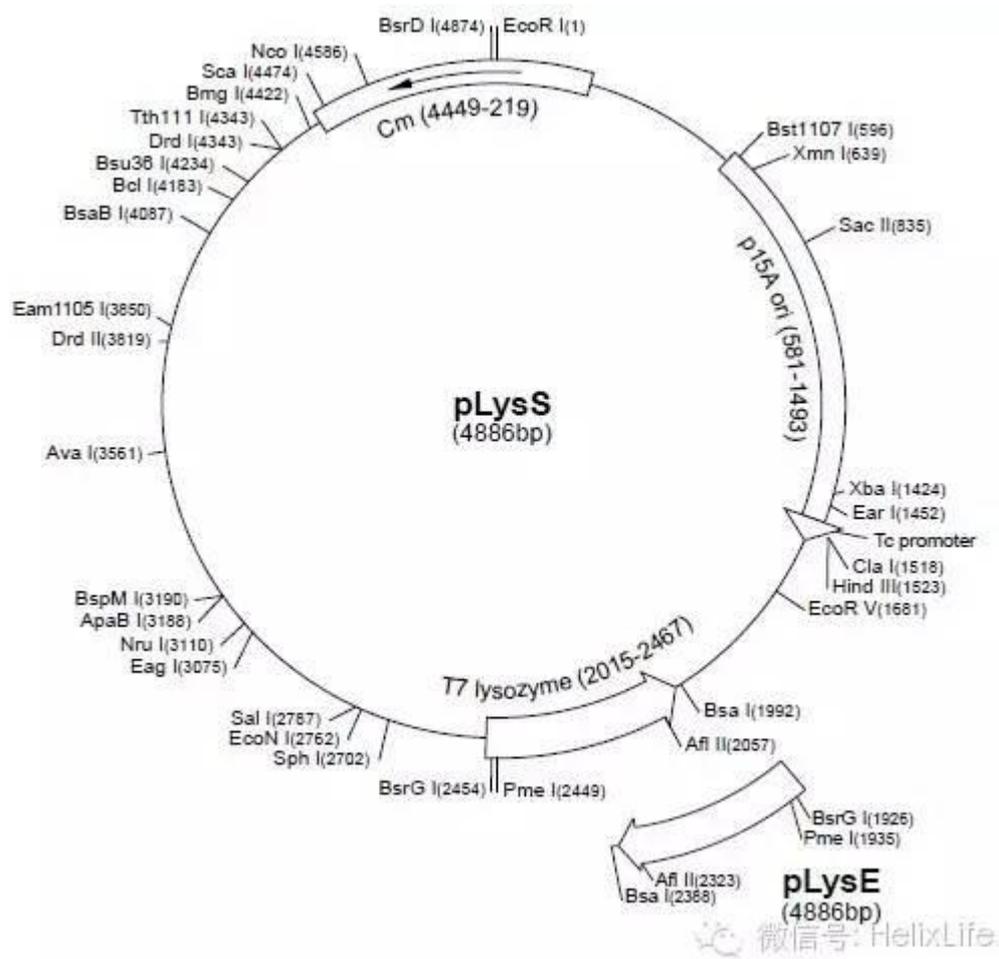
pDsRED1-C1: C 代表在 DsRed1 的 N 段插入序列构建融合蛋白



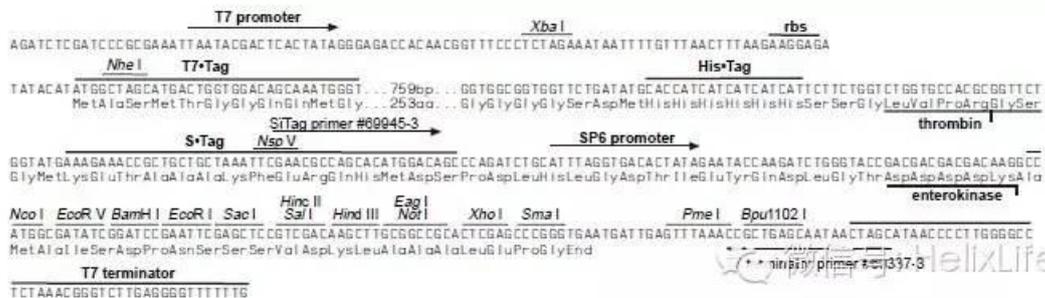
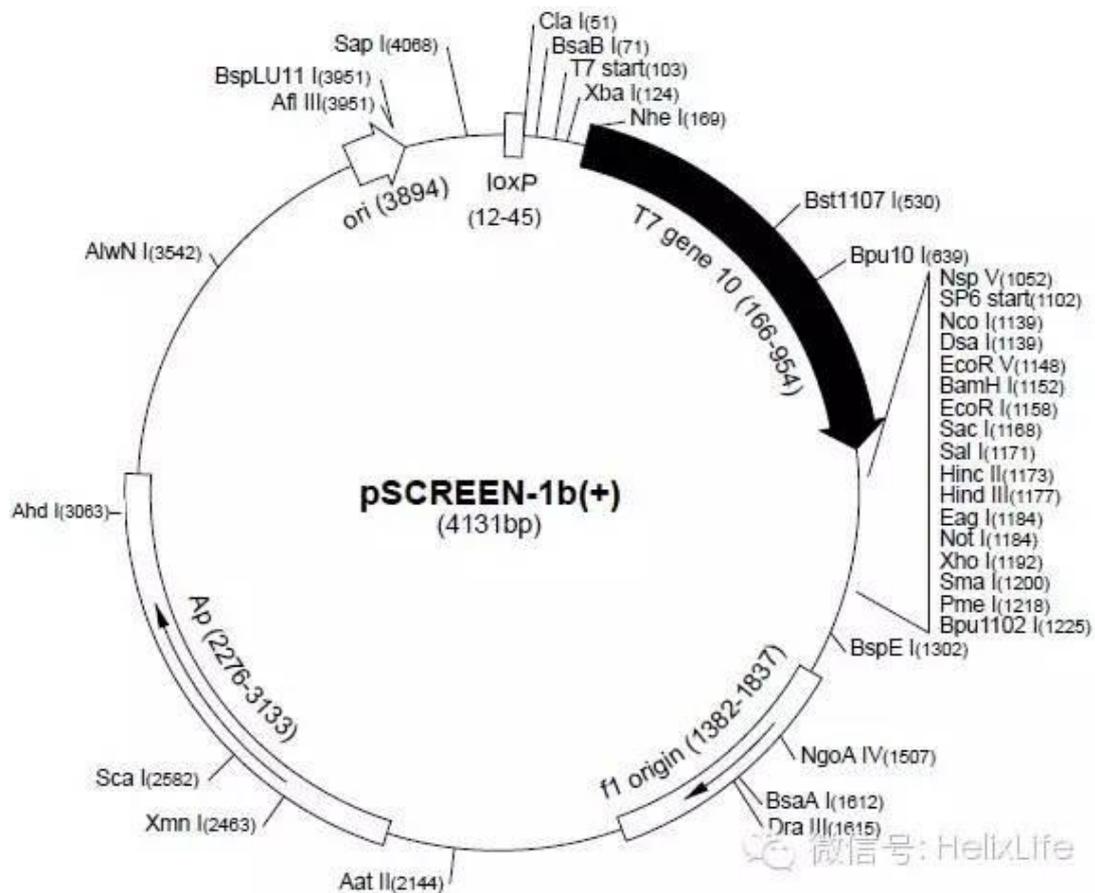
DsRed 蛋白单体突变的载体，pDsRED 系列载体，属于荧光蛋白报告载体



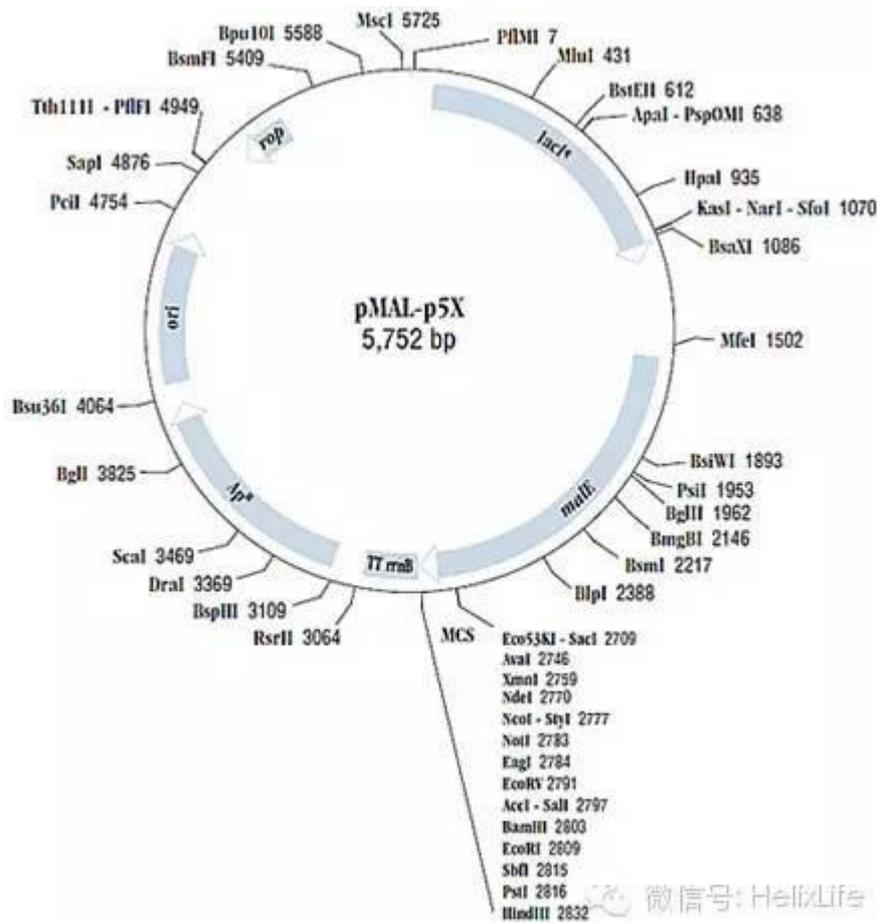
pLazI 质粒，可以提供 lac 阻遏蛋白



质粒 pLysS&E，具有氯霉素抗性。此质粒含有表达 T7 溶菌酶的基因。



pSCREEN-1b(+)质粒，也含有表达 T7 溶菌酶的基因



pMAL-p5X Polylinker:

```

      Aval           XmnI           NdeI           NcoI           NotI           EcoRV
5' ma?E...CTC GGG ATC GAG GGA AGG ATT TCA CAT ATG TCC ATG GGC GGC CGC GAT ATC
      Sall           BamHI           EcoRI           SbfI
GTC GAC GGA TCC GAA TTC CCT GCA GGT AAT TAA ATA A...
  
```

pMAL-p5E Polylinker:

```

      Aval           KpnI           NdeI           NcoI           NotI
5' ma?E...CTC GGG GAT GAC GAT GAC AAG GTA CCG CAT ATG TCC ATG GGC GGC CGC
      EcoRV           Sall           BamHI           EcoRI           SbfI
GAT ATC GTC GAC GGA TCC GAA TTC CCT GCA GGT AAT TAA ATA A...
  
```

pMAL-p5G Polylinker:

```

      Aval           SnaBI           NdeI           NcoI           NotI
5' ma?E...CTC GGG CCG GGT GCG GCA CAC TAC GTA CAT ATG TCC ATG GGC GGC CGC
      EcoRV           Sall           BamHI           EcoRI           SbfI
GAT ATC GTC GAC GGA TCC GAA TTC CCT GCA GGT AAT TAA A...
  
```

pMAL-p5X:大肠杆菌(E.coli)表达载体，用于蛋白表达与纯化

pGEX-1λT

Thrombin
Leu Val Pro Arg⁺Gly Ser Pro Glu Phe Ile Val Thr Asp
CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG GAA TTC ATC GTGACT GAC TGA CGA
BamHI EcoRI Stop codons

pGEX-2T

Thrombin
Leu Val Pro Arg⁺Gly Ser Pro Gly Ile His Arg Asp
CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG GGA ATT CAT CGT GAC TGA CTG ACG
BamHI SmaI EcoRI Stop codons

pGEX-2TK

Thrombin Kinase
Leu Val Pro Arg⁺Gly Ser Arg Arg Ala Ser Val
CTG GTT CCG CGT GGA TCT CGT CGT GCA TCT GTT GGA TCC CCG GGA ATT CAT CGT GAC TGA
BamHI SmaI EcoRI Stop codons

pGEX-4T-1

Thrombin
Leu Val Pro Arg⁺Gly Ser Pro Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His Arg Asp
CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CCG CCG CAT CGT GAC TGA
BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI Stop codons

pGEX-4T-2

Thrombin
Leu Val Pro Arg⁺Gly Ser Pro Gly Ile Pro Gly Ser Thr Arg Ala Ala Ala Ser
CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCA GGA ATT CCC GGG TCG ACT CGA GCG GCC GCA TCG TGA
BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI Stop codon

pGEX-4T-3

Thrombin
Leu Val Pro Arg⁺Gly Ser Pro Asn Ser Arg Val Asp Ser Ser Gly Arg Ile Val Thr Asp
CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG AAT TCC CGG GTC GAC TCG AGC GGC CGC ATC GTGACT GAC TGA
BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI Stop codons

pGEX-3X

Factor Xa
Ile Glu Gly Arg⁺Gly Ile Pro Gly Asn Ser Ser
ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC GGG AAT TCA TCG TGA CTG ACT GAC
BamHI SmaI EcoRI Stop codons

pGEX-5X-1

Factor Xa
Ile Glu Gly Arg⁺Gly Ile Pro Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His Arg Asp
ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CCG CCG CAT CGT GAC TGA
BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI Stop codons

pGEX-5X-2

Factor Xa
Ile Glu Gly Arg⁺Gly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ser Thr Arg Ala Ala Ala Ser
ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC GGA ATT CCC GGG TCG ACT CGA GCG GCC GCA TCG TGA
BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI Stop codon

pGEX-5X-3

Factor Xa
Ile Glu Gly Arg⁺Gly Ile Pro Arg Asn Ser Arg Val Asp Ser Ser Gly Arg Ile Val Thr Asp
ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC AGG AAT TCC CCG GTC GAC TCG AGC GGC CGC ATC GTGACT GAC TGA
BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI Stop codons

pGEX-6P-1

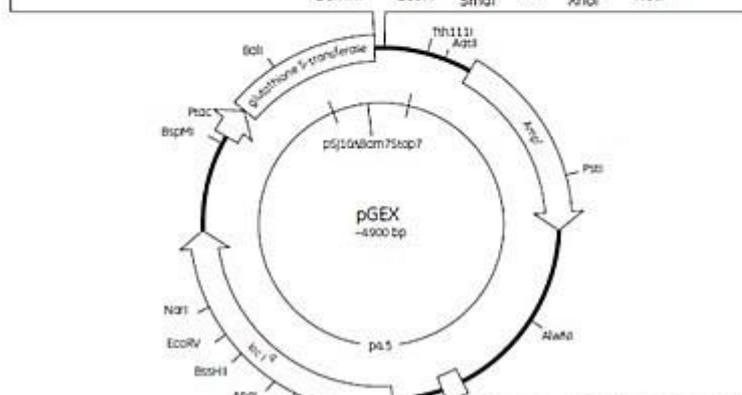
PreScission[™] Protease
Leu Glu Val Leu Phe Gln⁺Gly Pro Leu Gly Ser Pro Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His
CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCG GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CCG CCG CAT
BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI

pGEX-6P-2

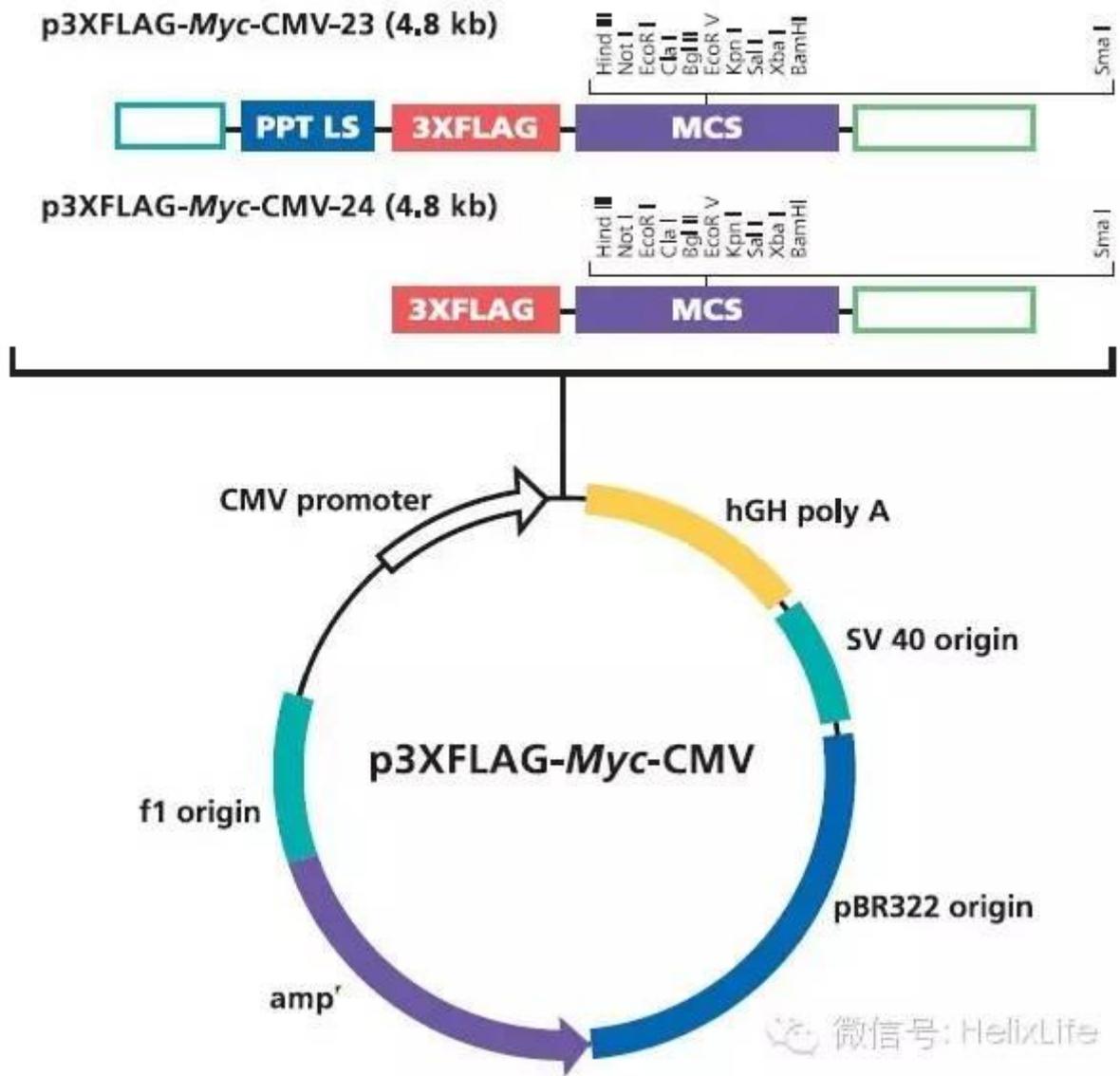
PreScission Protease
Leu Glu Val Leu Phe Gln⁺Gly Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ile Pro Gly Ser Thr Arg Ala Ala Ala Ser
CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCA GGA ATT CCC GGG TCG ACT CGA GCG GCC GCA TCG
BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI

pGEX-6P-3

PreScission Protease
Leu Glu Val Leu Phe Gln⁺Gly Pro Leu Gly Ser Pro Asn Ser Arg Val Asp Ser Ser Gly Arg
CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCG AAT TCC CCG GTC GAC TCG AGC GGC CGC
BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI



pGEX 载体系列，特点就是带有 GST 标签，可以增加目的蛋白的溶解度



Multiple Cloning Site

(p3XFLAG-Myc-CMV-23 and p3XFLAG-Myc-CMV-24)

3XFLAG Peptide Sequence														
Met	Asp	Tyr	Lys	Asp	His	Asp	Gly	Asp	Tyr	Lys	Asp	His	Asp	Ile
ATG	GAC	TAC	AAA	GAC	CAT	GAC	GGT	GAT	TAT	AAA	GAT	CAT	GAC	ATC
TAC	CTG	ATG	TTT	CTG	GTA	CTG	CCA	CTA	ATA	TTT	CTA	GTA	CTG	TAG

3XFLAG Peptide Sequence														
Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys							
GAC	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAC	AAG	CTT	GCG	GCC	GCG	AAT	TCA	TCG
CTG	ATC	TTT	CTG	CTA	CAG	CTG	TTC	GAA	CGC	CGG	CGC	TTA	AGT	AGC

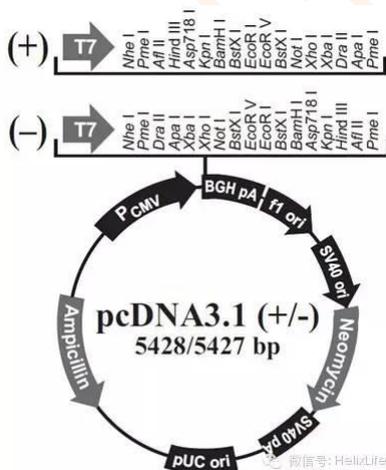
ATA	GAT	CTG	ATA	TCG	GTA	CCA	GTC	GAC	TCT	AGA	GGA	TCC	GAA	CAA	AAA
TAT	CTA	GAC	TAT	AGC	CAT	GGT	CAG	CTG	AGA	TCT	CCT	AGG	CTT	GTT	TTT

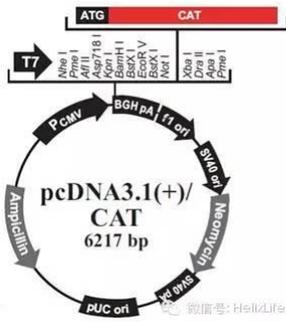
Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	STOP								
CTC	ATC	TCA	GAA	GAG	GAT	CTG	TGA	CCC	GGG						
GAG	TAG	AGT	CTT	CTC	CTA	GAC	ACT	GGG	CCC						

微信号: HelixLife

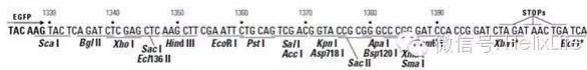
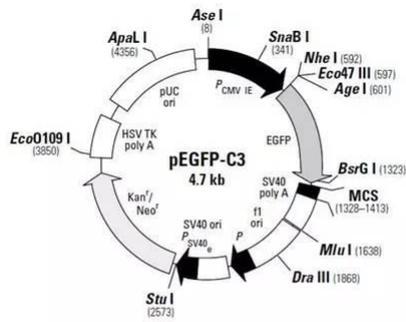
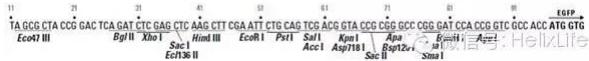
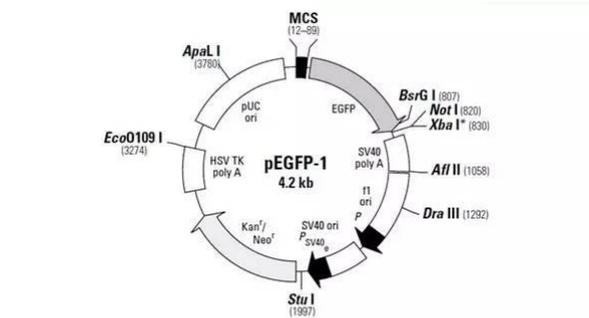
p3XFLAG-Myc-CMV 质粒，For transient expression and secretion of dual tagged (N-terminal 3XFLAG™, C-terminal c-myc) fusion proteins.

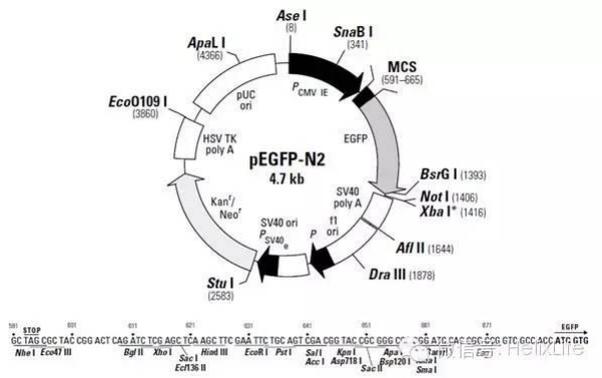
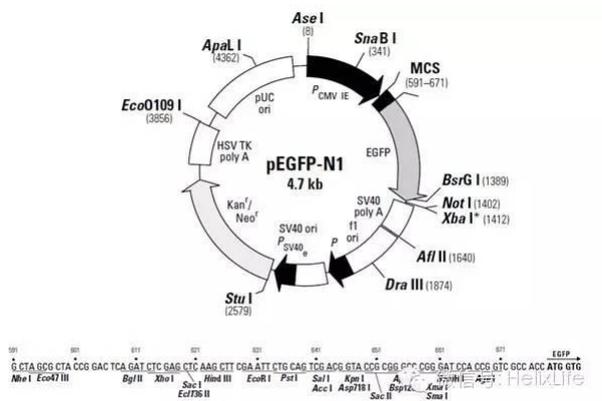
即双重标记瞬时表达和分泌，N 端 3XFLAG 标记，C 端 c-myc 标记，一看这质粒就知道逼格高、价格较贵~



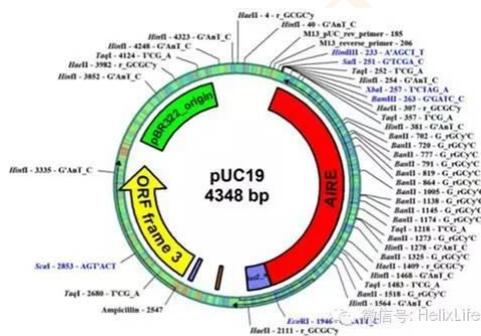


pcDNA3.1(-)和 pcDNA3.1(+), 构建表达载体常用思密达~

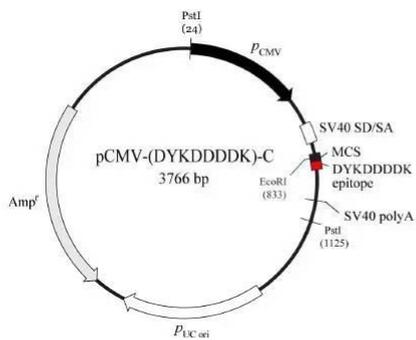




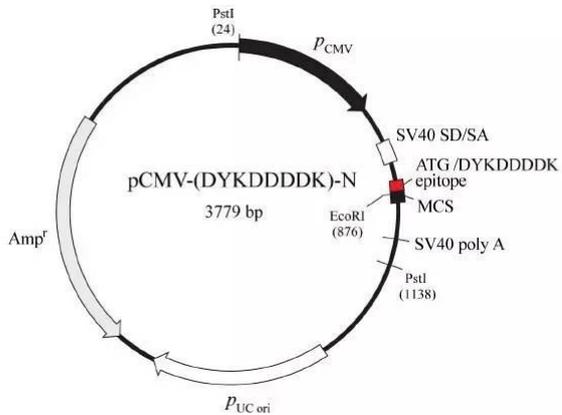
强大的 pEGFP 质粒家族，构建具有绿色荧光的融合蛋白，麦子的挚爱~



pUC19 常用于 DNA 片段克隆、DNA 测序、外源基因表达等

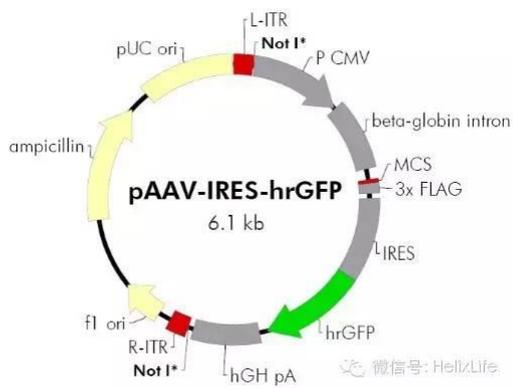


	<u> </u> <u> </u>	<u> </u> <u> </u> <u> </u>	<u> </u> <u> </u> <u> </u>	<u> </u> <u> </u> <u> </u>	<u> </u> <u> </u>
	ApaI	EcoRI	Sall	BglII	XhoI
819	CGG GCC CAG GCC CGA ATT CGG TCG ACC GAG ATC TCT CGA				
	GCC CGG GTC CGG GCT TAA GCC AGC TGG CTC TAG AGA GCT				
	<u> </u> <u> </u> <u> </u>				
	Acc65I				
	<u> </u> <u> </u>	<u> </u> <u> </u> <u> </u> <u> </u> <u> </u>			
	XhoI	KpnI	DYKDDDDK epitope		
858	GGT ACC GGC GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG TAA				
	CCA TGG CCG CTG ATG TTC CTG CTG CTA CTG TTC ATT				

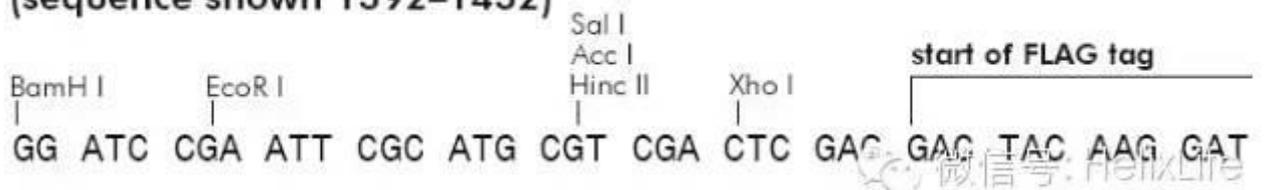


	<u> </u> <u> </u> <u> </u> <u> </u> <u> </u>	<u> </u> <u> </u> <u> </u>	<u> </u> <u> </u> <u> </u>
	ATG+DYKDDDDK epitope	HindIII	MscI
829	ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG CTT ATG GCC ATG GAG GCC		
	TAC CTG ATG TTC CTG CTG CTA CTG TTC GAA TAC CGG TAC CTC CGG		
	<u> </u> <u> </u> <u> </u> <u> </u> <u> </u>	<u> </u> <u> </u>	<u> </u> <u> </u>
	Sall	KpnI	NotI
	<u> </u> <u> </u>	<u> </u> <u> </u> <u> </u> <u> </u>	<u> </u> <u> </u>
	EcoRI	AccI	EagI
874	CGA ATT CGG TCG ACC GAG ATC TCT CGA GGT CCG GCG GCC CCG		
	GCT TAA GCC AGC TGG CTC TAG AGA GCT CCA TGG CGC CGG CGC		

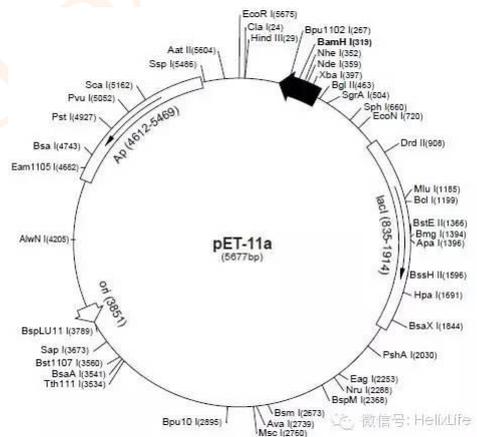
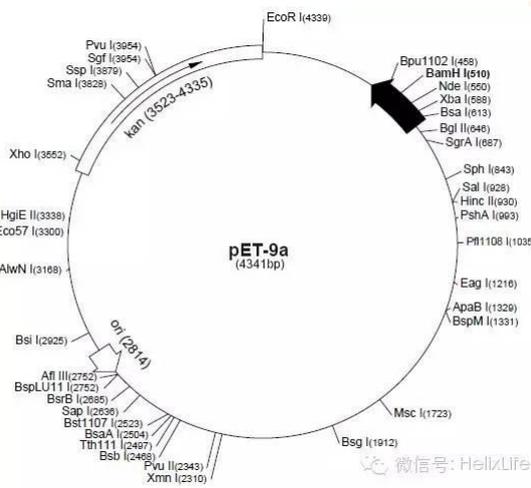
带 DYKDDDDKtag 的 pCMV-C/N 质粒及其多克隆位点

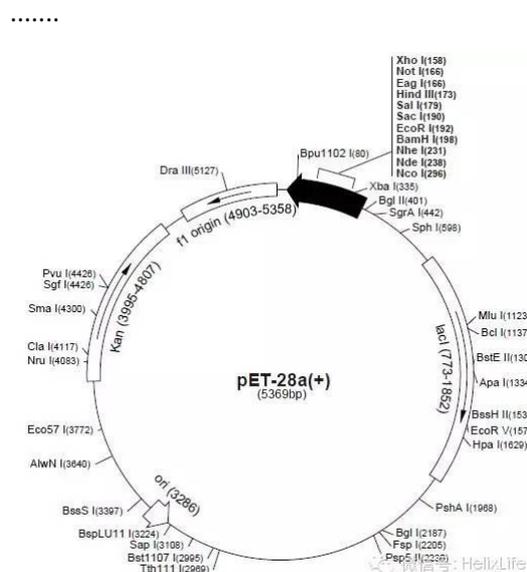
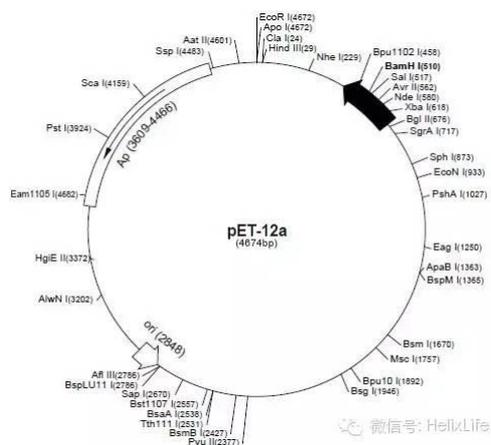


pAAV-IRES-hrGFP Multiple Cloning Site Region (sequence shown 1392-1432)

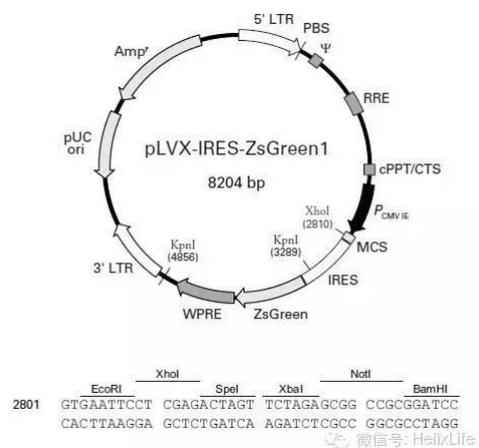


pAAV-IRES-hrGFP 腺病毒相关载体

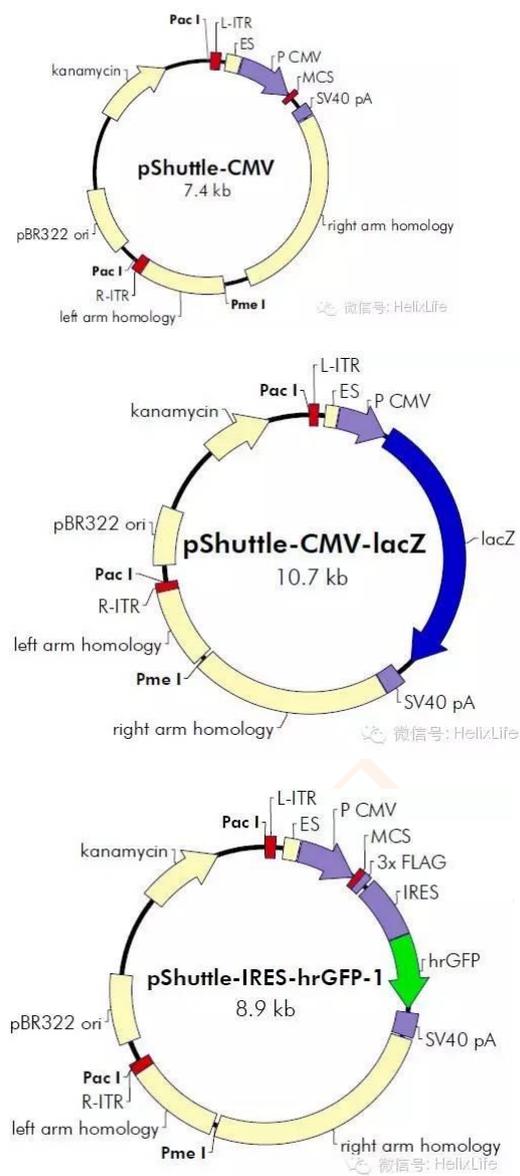




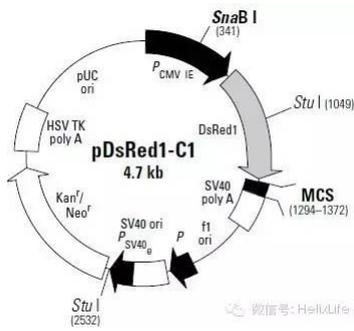
pET 质粒系列该系列是大肠杆菌克隆表达重组蛋白很强大的系统，目的基因被克隆到 pET 质粒载体上，受噬菌体 T7 强转录及翻译调控，宿主细胞提供的 T7RNA 聚合酶诱导其表达。



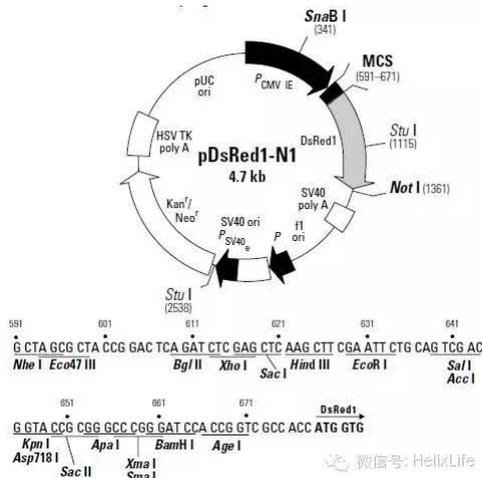
pLVX-IRES-ZsGreen1 及其克隆位点，哺乳动物细胞慢病毒表达载体，载体能够同时表达 ZsGreen1 荧光蛋白和目的基因



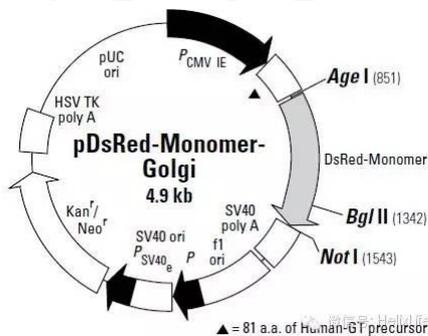
腺病毒穿梭质粒 pShuttle 系列



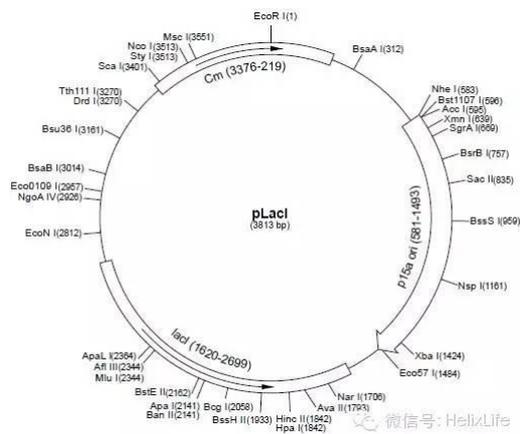
pDsRED1-C1: C 代表在 DsRed1 的 C 段插入序列构建融合蛋白



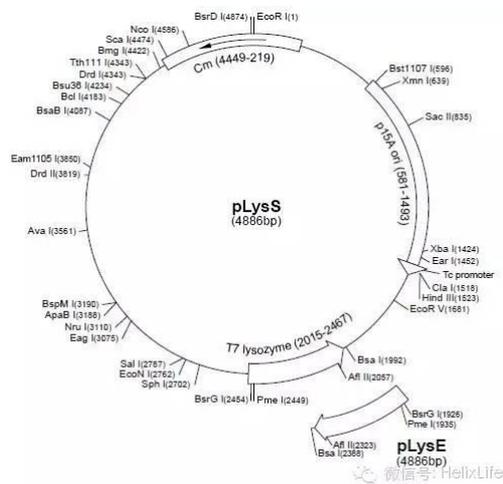
pDsRED1-N1: N 代表在 DsRed1 的 N 段插入序列构建融合蛋白



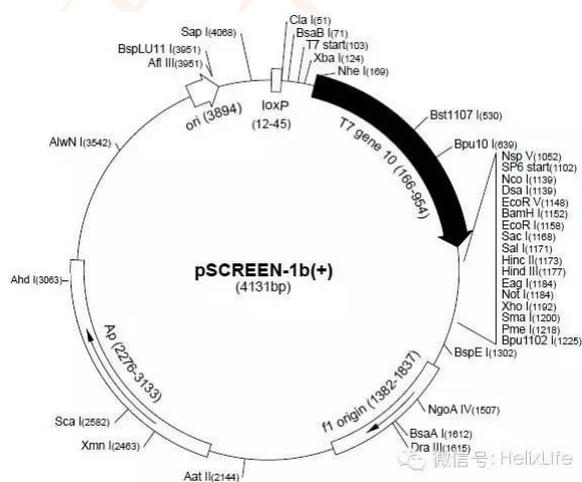
DsRed 蛋白单体突变的载体，pDsRED 系列载体，属于荧光蛋白报告载体

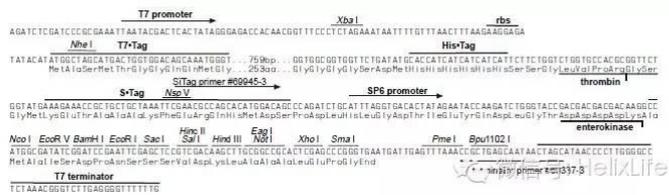


pLacI 质粒，可以提供 lac 阻遏蛋白

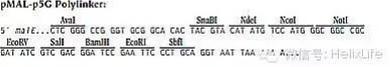
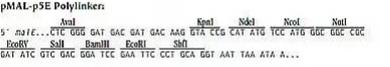
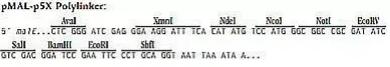
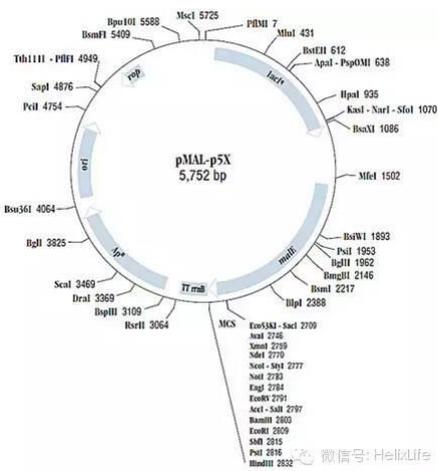


质粒 pLysS&E，具有氯霉素抗性。此质粒含有表达 T7 溶菌酶的基因。





pSCREEN-1b(+)-质粒，也含有表达 T7 溶菌酶的基因



pMAL-p5X:大肠杆菌(E.coli)表达载体，用于蛋白表达与纯化

pGEX-3T
 thrombin
 Leu Val Pro Arg^HGly Ser^HPro Glu Phe Ile Val Thr Asp
 CTG GTT CCG CGT GGA TTC CCG GAA TTC ATC GTG ACT GAC TGA CGA
 BamHI EcoRI Stop codons

pGEX-2T
 thrombin
 Leu Val Pro Arg^HGly Ser^HPro Gly Ile His Arg Asp
 CTG GTT CCG CGT GGA TTC CCG GGA ATT CAT GCG GAG TGA CTG ACG
 BamHI SmaI EcoRI Stop codons

pGEX-2TK
 thrombin Kinase
 Leu Val Pro Arg^HGly Ser^HArg Arg Ala Ser Val
 CTG GTT CCG CGT GGA TCT CAT CCG GGA TCT GTT GGA TCC CCG GGA ATT CAT CGT GAC TGA
 BamHI SmaI EcoRI Stop codons

pGEX-4T-1
 thrombin
 Leu Val Pro Arg^HGly Ser^HPro Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His Arg Asp
 CTG GTT CCG CGT GGA TTC CCG GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CCG CCG GAT CGT GAC TGA
 BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI Stop codons

pGEX-4T-2
 thrombin
 Leu Val Pro Arg^HGly Ser^HPro Gly Ile Pro Gly Ser Thr Arg Ala Ala Ser
 CTG GTT CCG CGT GGA TTC CCA GGA ATT CCC GGG TCG ACT CGA GCG GCC GCA TCG TGA
 BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI Stop codon

pGEX-4T-3
 thrombin
 Leu Val Pro Arg^HGly Ser^HPro Asn Ser Arg Val Asp Ser Ser Gly Arg Ile Val Thr Asp
 CTG GTT CCG CGT GGA TTC CCG AAT TCC CCG GTC GAC TCG AGC GGC CCG ATC GCG ACT GAC TGA
 BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI Stop codons

pGEX-3X
 Factor Xa
 Ile Glu Gly Arg^HGly Ile Pro Gly Asn Ser Ser
 ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCG GGC AAT TCA TCG TGA CTG ACT GAC
 BamHI SmaI EcoRI Stop codons

pGEX-5X-1
 Factor Xa
 Ile Glu Gly Arg^HGly Ile Pro Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His Arg Asp
 ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCG GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CCG CCG CAT CGT GAC TGA
 BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI Stop codons

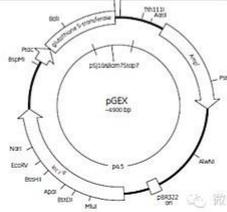
pGEX-5X-2
 Factor Xa
 Ile Glu Gly Arg^HGly Ile Pro Gly Ile Pro Gly Ser Thr Arg Ala Ala Ser
 ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCG GAA ATT CCC GGC TCG ACT CGA GCG GCC GCA TCG TGA
 BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI Stop codon

pGEX-5X-3
 Factor Xa
 Ile Glu Gly Arg^HGly Ile Pro Arg Asn Ser Arg Val Asp Ser Ser Gly Arg Ile Val Thr Asp
 ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCG AGG AAT TCC CCG GTC GAC TCG AGC GGC CCG ATC GCG ACT GAC TGA
 BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI Stop codons

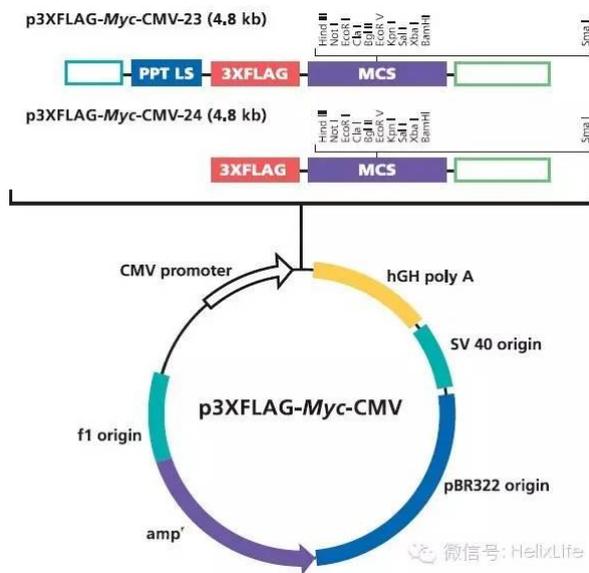
pGEX-6P-1
 PreScission[®] Protease
 Leu Glu Val Leu Phe Gln^HGly Pro Leu Gly Ser Pro Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His
 CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCG AAT TCC CCG GAA TTC CCG GGT CGA CTC GAG CCG CCG CAT
 BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI

pGEX-6P-2
 PreScission Protease
 Leu Glu Val Leu Phe Gln^HGly Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ile Pro Gly Ser Thr Arg Ala Ala Ser
 CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCG AAT TCC CCG GGT CGA CTC GAG CCG CCG CAT
 BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI

pGEX-6P-3
 PreScission Protease
 Leu Glu Val Leu Phe Gln^HGly Pro Leu Gly Ser Pro Asn Ser Arg Val Asp Ser Ser Gly Arg
 CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCG AAT TCC CCG GGT CGA CTC GAG CCG CCG CAT
 BamHI EcoRI SmaI Sall XhoI NotI



pGEX 载体系列，特点就是带有 GST 标签，可以增加目的蛋白的溶解度



Multiple Cloning Site

(p3XFLAG-Myc-CMV-23 and p3XFLAG-Myc-CMV-24)

3XFLAG Peptide Sequence														
Met	Asp	Tyr	Lys	Asp	His	Asp	Gly	Asp	Tyr	Lys	Asp	His	Asp	Ile
ATG	GAC	TAC	AAA	GAC	CAT	GAC	GGT	GAT	TAT	AAA	GAT	CAT	GAC	ATC
TAC	CTG	ATG	TTT	CTG	CTA	CTG	CCA	CTA	ATA	TTT	CTA	CTA	CTG	TAG

3XFLAG Peptide Sequence														
Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys							
GAC	TAC	AAA	GAC	GAT	GAC	GAC	AGA	CTT	GCG	GCC	GCG	AAT	TCA	TGG
CTG	ATC	TTT	CTG	CTA	CAG	CTG	TTC	GAA	CGC	CGG	CGC	TTA	AGT	AGC

ATA	GAT	CTG	ATA	TCG	GTA	CCA	GTC	GAC	TCT	AGA	GGA	TCC	GAA	CAA	AAA
TAT	CTA	GAC	TAT	AGC	CAT	GGT	CAG	CTG	AGA	TCT	CCT	AGG	CTT	GTT	TTT

Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	STOP								
CTC	ATC	TCA	GAA	GAG	GAT	CTG	TGA	CCC	GGG						
GAG	TAG	AGT	CTT	CTC	CTA	GAC	ACT	GGG	CCC						

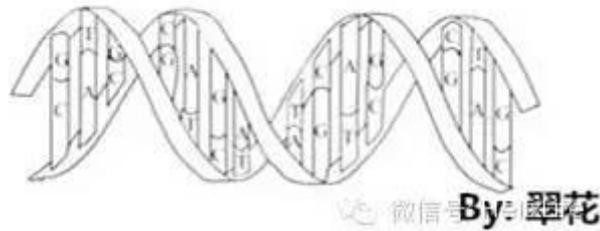
p3XFLAG-Myc-CMV 质粒，For transient expression and secretion of dual tagged (N-terminal 3XFLAG™, C-terminal c-myc) fusion proteins.

即双重标记瞬时表达和分泌，N 端 3XFLAG 标记，C 端 c-myc 标记，一看这质粒就知道逼格高、价格较贵~

图文并茂的教你做分子构建（典藏版）

作者：翠花

分子构建详解



做过分子实验的人都知道，要想做的有效率有质量是很苦逼的，1个月做100个克隆那都是小case，没点看家的本事怎么行。如果再遇到比较极品的稀有基因，周旋个把月，那也是家常便饭。下面就和大家分享一些载体构建的经验，从此迈向科研达人：

1. 准备工作

俗话说：用欲善其事，必先利其器。建议大家在做构建之前先找好工具，效果事半功倍哦。推荐两个工具，一个是oligo软件，常用于引物设计和酶切位点分析；另一个是DNASTAR软件，工具极强大，一款全面的生物学软件，用作DNA和蛋白质序列分析、重叠群拼接和基因工程管理。



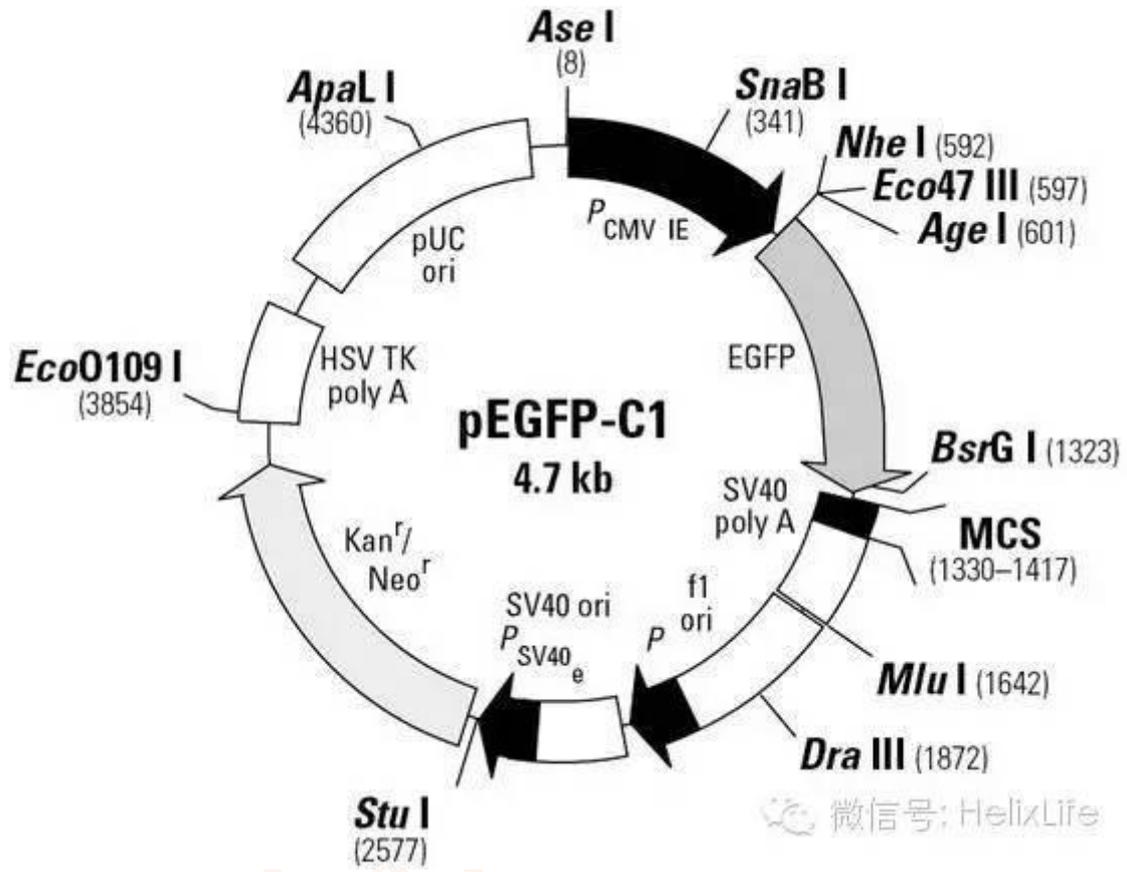
2. 设计引物

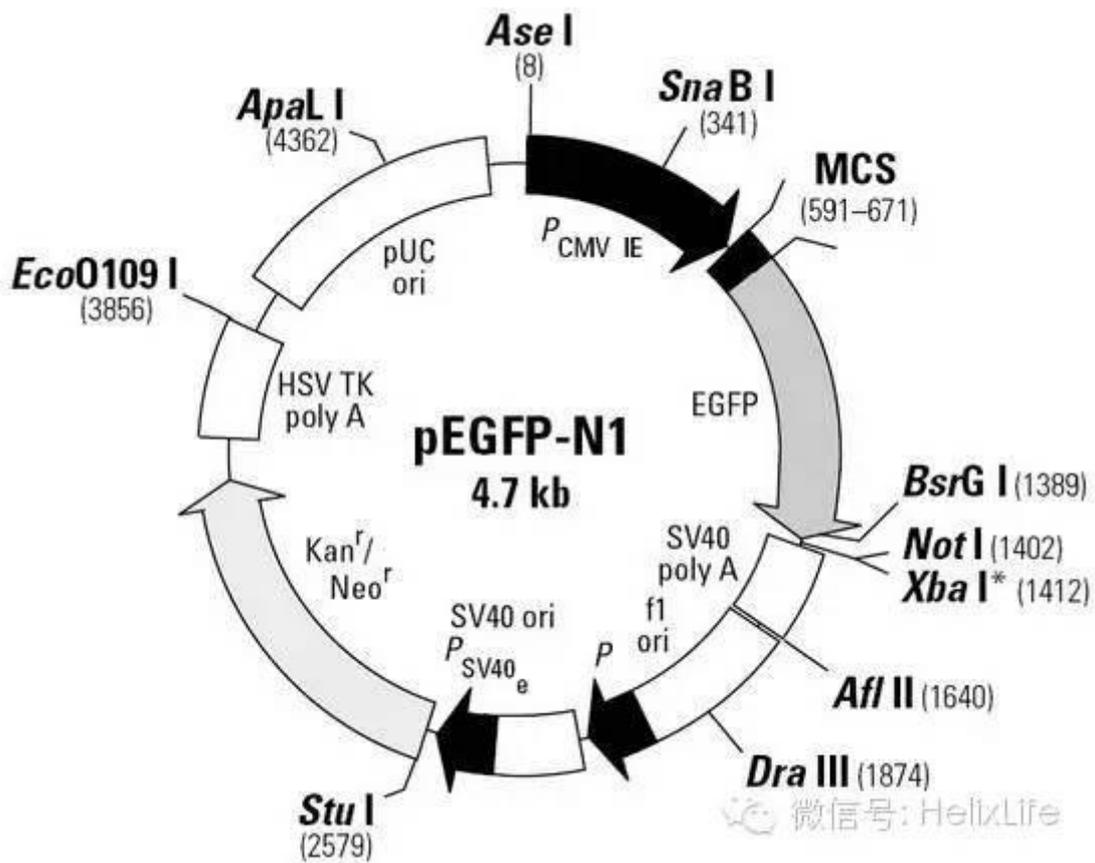
1) **注重要：**看懂质粒图谱！拿大家比较熟悉的PEGFP-C1和PEGFP-N1做例子。

想用N1质粒，设计引物就得把下游引物上的中止密码子去掉，不要辛辛苦苦的一路做下来结果根本不表达融合蛋白，你就死了；C1质粒，注意阅读框，要是移码了，你也死了。而且

PEGFP 系列有 1.2.3，要弄清楚别弄窜了。一句话，要看懂你的图谱！

其他需要注意：





*设计酶切位点时要加保护碱基（大家要用 T 载体就当我说）；

*酶切位点设计原则：尽量用粘性末端，实在不行就用一些常用平端酶，如 *EcoRV* 和 *SnaB1* 等，要是以后还有别的用处就多加点酶切位点，曾一口气在引物上加了五个酶切位点以防以后要用到，注意计算 TM 值的时候要减去这些不匹配的序列；

*注意 KOZAK 序列的问题，很多质粒没有提供 KOZAK 序列，这要在设计的时候直接在引物上加好。

*擅用 Gene Overlap，比方说加个 flag 标签，his 标签，my 标签之类的，直接设计三引物 overlap 一下就可以，省得还要再多构建一步，这些都是设计引物时候就要考虑好的。引物长一点不要紧（我最喜欢两步法了），尤其是对 GC 比高的序列，有时候引物不长 PCR 根本不出结果，注意如果 GC 比较高，这个时候 Gene Overlap 就不要做了，很麻烦，克隆很难挑。

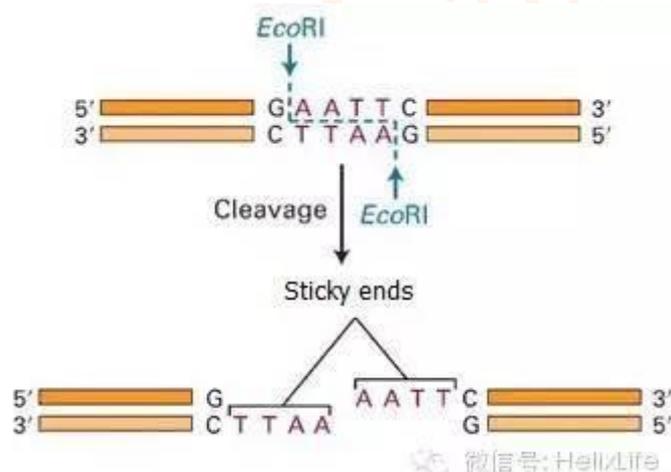
*没有合适的酶切位点？很简单，用同尾酶策略，比方说 *Bgl2* 和 *BamH1*，*Nhe1* 和 *spe1*，*Xho1* 和 *Sal1*（注意连上了切不下来），实在不行就平端吧。

3. PCR 扩增

如果没有现成的质粒可供酶切，PCR 是最理想也是最方便的策略。目前市面上可选择的 PCR 酶实在太多，每隔一段时间还会升级，正常情况下，高保真的 taq 酶都能满足需求。但如果遇到难 PCR 的高 GC 基因，可以换不同 PCR 酶，添加一些 DMSO，甘油等，实在不行可以考虑 Clontech 的 2 GC rich kit，价格和实力都大牛。另外，建议电泳切胶回收纯化 PCR 产物，去除一些非特异性条带。

4. 酶切

强烈推荐 NEB 的内切酶，记得有一次用别家的酶切过夜，结果质粒都被切碎碎了（当然当时质粒浓度也不高），而用 NEB 的酶，切个七十二小时仍旧一切 OK，尤其现在 NEB 还推出了 HF 的内切酶，没有星活性而且统一都用 Buffer4。另外 TAKARA 的酶也还可以。



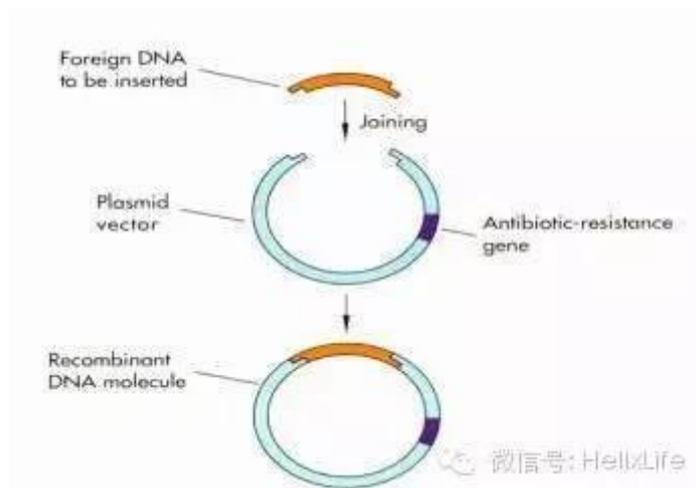
5. 连接

最常用的是 NEB 的 T4 连接酶，很好用，但是注意 Buffer 里有 ATP，反复冻融 ATP 失活很快，拿到 buffer 后就分装，10uL/管，一次性使用。

载体总量：一般来说，载体浓度在 20-100ng/uL 较好，太低的话碰撞几率低，太高的话又会产生很多非目的克隆，总量从 50-100ng 就可以，太低失败几率很高，太高克隆太多，挑克隆会很麻烦，反应总体积也有讲究，体积太大载体和目的片段碰撞几率太低，而且对感受态

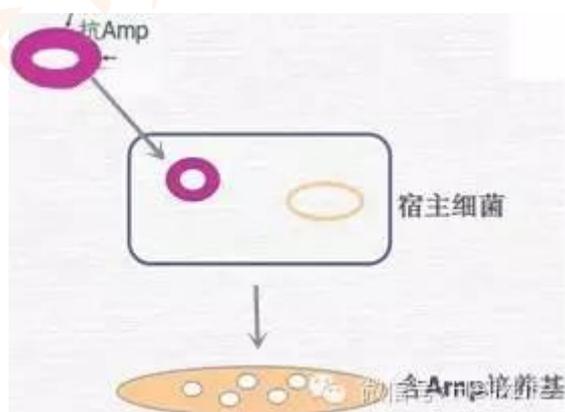
细胞也是个挑战，通用 10-15uL。

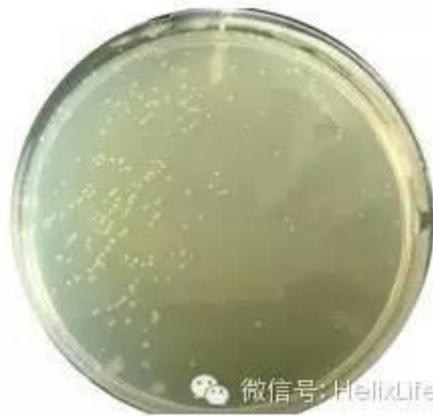
载体和插入片段比例：载体和插入片段比例一般是 1:7，如果很难连接，比如说平端连接，要适当提高片段浓度，同时加大比例 1:10。



6. 转化

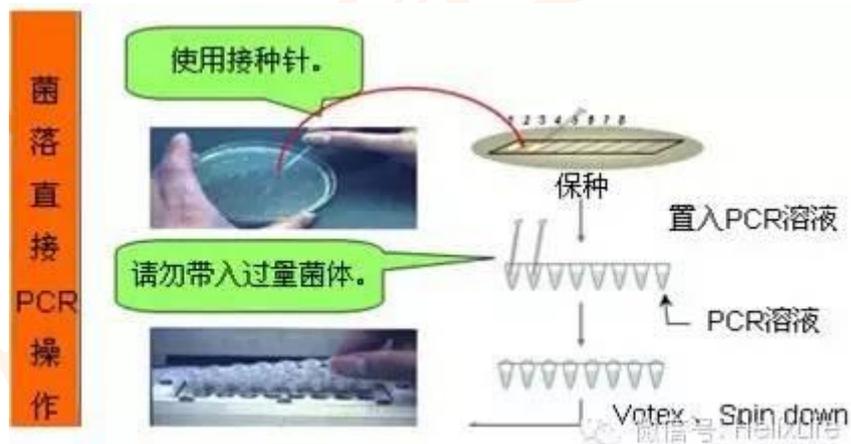
按照 SOP 做就行，话说实验室原来从 takara 买感受态 (competent cell)，后来发现还是自己做的效率高 (protocol 免费索取)。要注意的是 LB 必须无菌而且没有抗生素，实验室原来有个技术员，做一次失败一次，我就奇怪了，后来才发现他用的居然是加了 kana 的 LB，直接晕过去了。





7. 鉴定

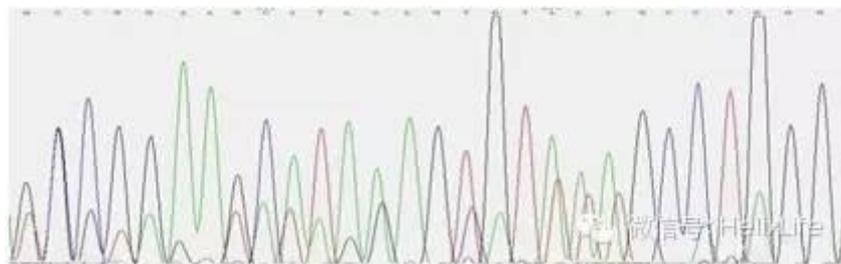
想要快速鉴定，建议用菌液 PCR，菌液 PCR 是有一定讲究的，很多人做菌液 PCR 鉴定假阳性特多，为什么？因为你 PCR 引物选的都在载体上，注意引物必须分别在载体和插入片段上才准，PCR 方法鉴定是极其准确的，数百次菌液 PCR 经验。PCR 鉴定做起来也很简单，拿个 2mL tube，装 0.5mL 加入相应抗生素的 LB，摇个三小时左后取 1uL 做模板就行了。如果想更快，直接菌落 PCR 也不错，效果一样。



8. 测序

拿到测序结果时，不仅要核对序列，还要看测序峰图，这很重要。因为有时候光看序列对，实际上图显示的不对，或者虽然序列结果不对，但是图上出现的峰值本身就很怪异不可信，出现突变也不怕，有很大可能性是简并密码子；

还要重点检查的地方就是“接头”的地方，因为偶尔引物会出错，比方说少个碱基什么的，还有时候酶切之后连接也会丢一两个碱基什么的，如果不仔细检查到了后期悔之莫及。



表达融合蛋白时，如何把两个基因拼接起来？

作者：子非鱼

小师弟屁颠屁颠跑过来：师姐，我要表达一个 ras 加 GFP 融合蛋白，怎么设计引物？

小鱼：你的 GFP 标签蛋白在载体里还是要你自己插进去？

小师弟：是我自己插进去。（怎么听来觉得怪怪的……）

小鱼：你打算怎样融合？

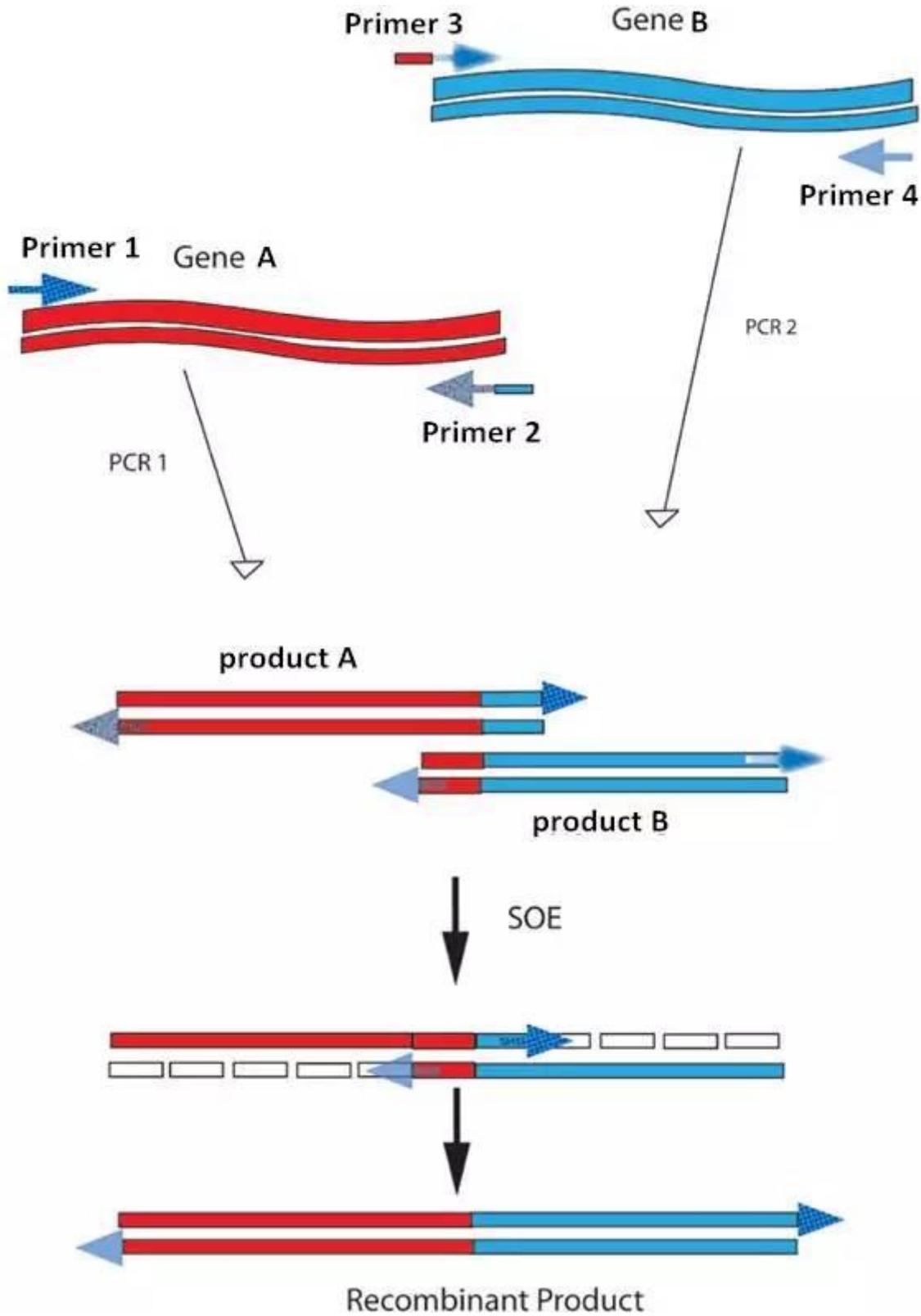
小师弟：是不是这样？酶切 A 基因，酶切质粒，把 A 先插入载体，筛选出克隆，然后酶切 B 基因，用不同的酶酶切质粒，将 B 基因插入含 A 的载体。

小鱼：No,何必这么复杂，SOE PCR 吧！

小师弟：什么是 SOE PCR？

SOE PCR 是一种通过寡聚合甘酸链之间重叠的部分互相搭桥、互为模板进行 PCR 扩增，从而

获得目的 DNA 基因片段的方法。SOE PCR 可简单地凭借互补引物，通过 PCR 迅速地将两段基因连接在一起，成为新的杂交基因片段。



若要将基因 A 和 B 连接在一起，假设引物 P1、P2 扩增基因片段 A，引物 P3、P4 扩增基因片段 B；P2、P3 为内引物，P2 上含有 B 的序列，P3 上含有 A 片段的互补序列。单独 PCR 后，P1、P2 将 A 的 3'端带有 B 的 5'端的互补序列，P3、P4 将 B 的 5'端带有 B 的 3'端的互补序列；将各自 PCR 产物混合作为模板，变性退火后，A 链和 B 链结合起来，延伸成新的杂交基因，可以将 A、B 连接起来。（师弟看到这里开始叽咕：这都是什么鬼？）

下面以表达融合蛋白 S 和 A 为例，小鱼给大家介绍拼接基因 S 和基因 A 的方法，先在 NCBI 中查找两个基因的 mRNA 序列，然后利用 primer6.0 软件，设计扩增基因 S 和 A 基因的引物，并去除 S 的终止子和 A 基因的起始密码。

关键问题来了，引物要怎么设计？SOE PCR 引物设计跟普通 PCR 引物有什么不同？

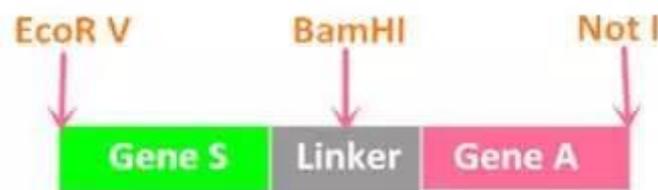
*SOE PCR 引物比较长，可长达 80bp，太短要增加反应次数，提高成本。（土豪可忽略）

*引物有重叠区域，引物间的 overlap region 以 25~30bp 为宜，尽量避免富含 AT 的序列。

*考虑引物的 Tm 值，依照“50°C规则”可以设计出可行的重叠区，但也必须全面考虑其他引物的 Tm 值，在 PCR 的前 5 个循环中，采用就低引物 Tm 值设计退火温度是最好的解决办法。

*引物长，更要避免自身二级结构、引物二聚体形成等。

在 S 上游引物 5'端加入 EcoR V 限制性核酸内切酶位点，在其下游引物 5'端则加入 BamH I 限制性核酸内切酶位点、含 5 个氨基酸残基的柔性肽基因序列(linker 序列) 以及基因 A 的部分 5'端序列，在 A 基因的上游引物 5 端加入 BamH I、含 5 个氨基酸残基的柔性肽基因序列(linker 序列)以及基因 S 的部分 3'端序列，在其下游则加入 酶切位点 Not I 酶切位点。



S (P1): 5'-ATAGATATC GGAGAA CGG GAT ATG TTT AG-3'

S (P2)5'- ATA GGATCC ACC GCC ACC GAC ATTGCC AAC GTA TTT TAAG- 3'

A (P3): 5'-ATA GGA TCC GGT GGC GGT GGC TCC GCT CAA GTA AT C AAC ACT-3'

A (P4): 5'-GCGGCCGC CGACAT CCTATC GACCTAAC-3'

划线部分为酶切位点

接着以 S (P1)和 S (P2)为引物，含有 S 基因的 cDNA 为模板；以 A (P3)和 A (P4)为引物，含有 A 基因的 cDNA 为模板；进行 PCR,得到上述产物并鉴定后，将两者混合作为模板，以 S (P1)和 A (P4)为引物扩增融合基因 S-A。采用两步法循环模式：第一步将两种模板混合后，在不加引物的情况下循环 3 次；第二步加上引物后，在循环 28 次。将产物转入载体进行后续的克隆。

引物的结构组成看上去虽然复杂，但设计起来却十分简单，无非就是在普通引物设计的基础上加上重叠区以及一些修饰：

*Gene S 5'端的修饰， gene A 3'端的修饰，比如增加限制性酶切位点进行克隆和表达。

*Gene S 3'端的突变， gene A 5'端的突变，比如进行偏嗜密码子的修改、起始密码子的掺入。

*在 gene S 和 gene A 之间添加 DNA linker。

在应用这一技术时，还有几个要注意的问题：

*DNA 酶的质量：应避免使用 Taq 酶，因其在 PCR 产物 3 端添加一个突出的 A，从而造成移码，翻译蛋白时全部错位，不好意思今天白忙活，去墙角哭会。因此，为了最大限度地避免碱基的错配，一般采用具有 3'-5'外切酶活性的高保真酶，如 TLI DNA Polymerase (Promega)、KOD DNA Polymerase (Toyobo)、Pyrobest DNA Polymerase (Takara)。比起普通酶，这些高保真酶是贵了点，但真的物有所值。

*模板的来源：在构建嵌合 ORF 时，如果选择基因组 DNA 为模板的话，可能会 P 出非翻译区，宜选择 mRNA 作为原始模板。

*接头序列(Linker): 通过一段适当的核苷酸序列将不同的目的基因连接起来, 使其在适当的生物体内表达成为一条单一的肽链, 使得融合蛋白中的两种成分能分别形成正确的空间结构、 更好的发挥生物学活性。Linker 序列就像安排一个人畜无害的小伙伴在性格比较暴躁的两人之间, 充当和平使者, 避免冲突。

*Mg²⁺是 DNA 聚合酶活性的依赖离子, Mg²⁺浓度过低会影响聚合酶活性, 过高会造成非特异扩增。SOE-PCR 中: 在保证产物扩增效率及特异性的前提下, 尽可能降低 Mg²⁺的浓度, 这可最大限度地提高 DNA 聚合酶的保真性。

今天就小鱼就分享到这, 大家记得要好好消化一下!

构建载体一点也不难

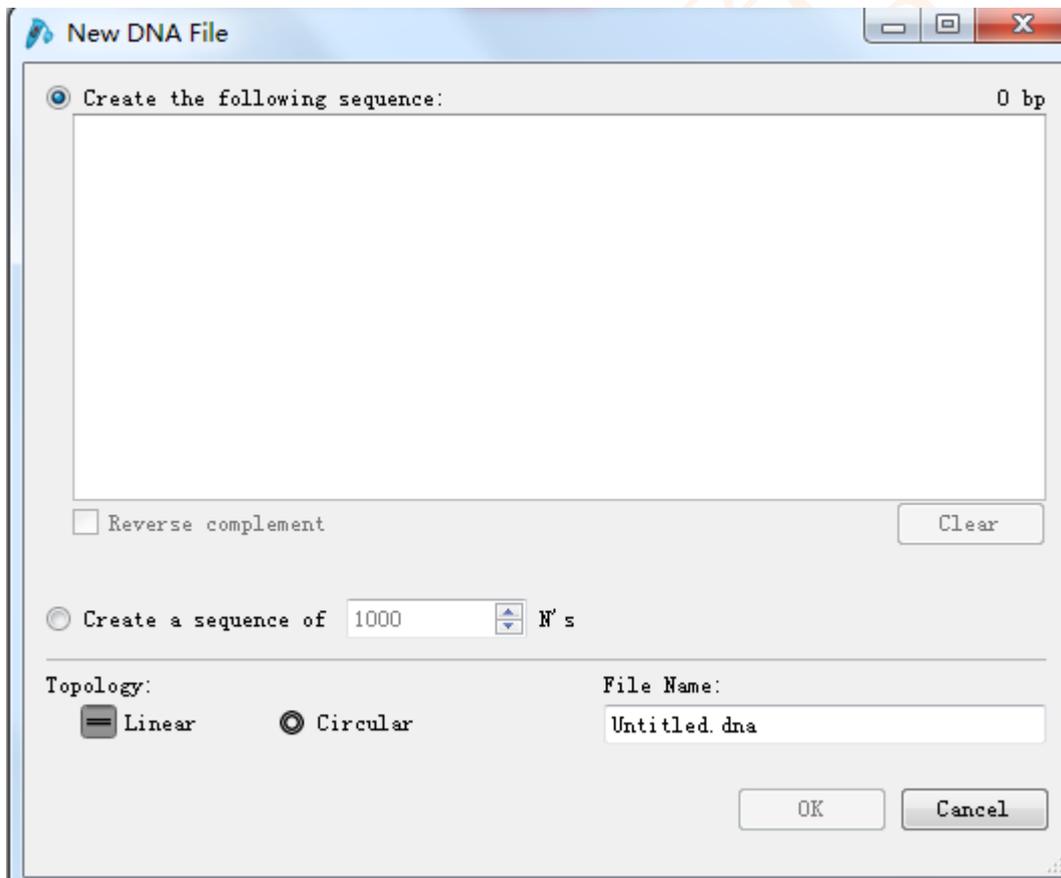
作者: 阳光

作为一名生物汪, 我们在研究基因的功能时, 逃脱不掉的就是我们为了我们的实验目的, 可能需要构建各种载体, 比如表达载体, 克隆载体, 基因打靶载体等等。很多人在构建载体的时候都感觉很困难, 特别是对于一个刚进入实验室的新人来说那更是难上加难, 完全摸不着头脑。

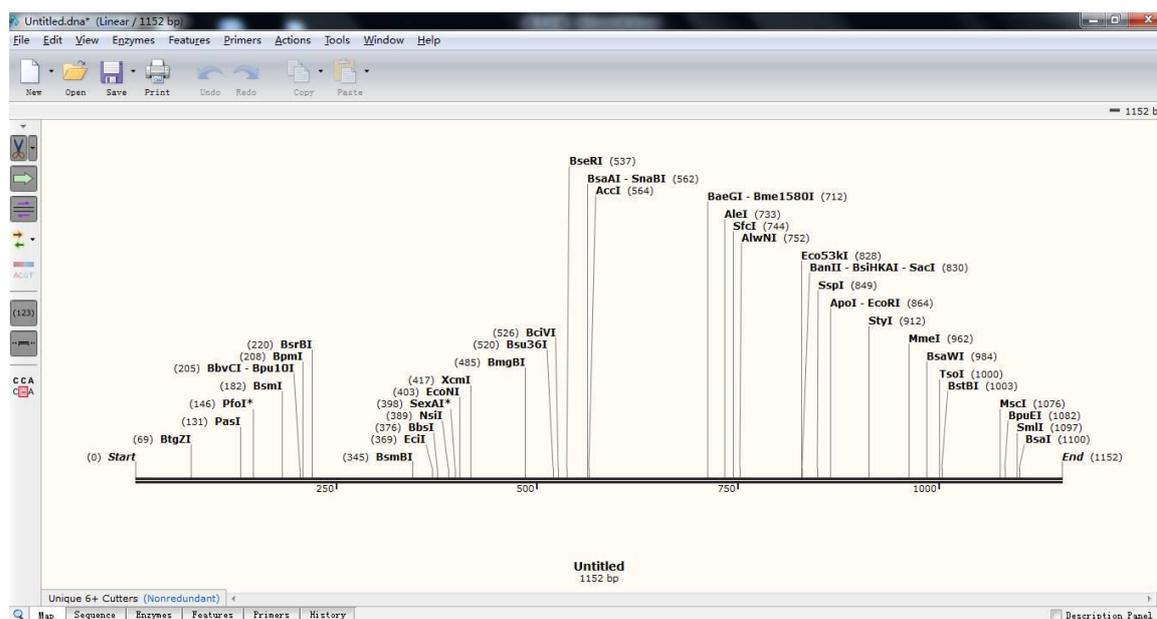
那是因为其实构建载体是一个不小的工作量, 需要经历很多的过程, 比如首先我们需要设计引物引入酶切位点, 接下来还需要经历酶切酶连等过程, 只要其中的某一环节出现问题, 那最终都会导致实验失败。

我认为构建载体最关键的一步就是设计引物引入酶切位点, 一旦引物设计好, 那接下来就非常简单了, 今天重点就来教教大家如何利用 `snappgene` 轻松获得构建载体所需的引物序列。

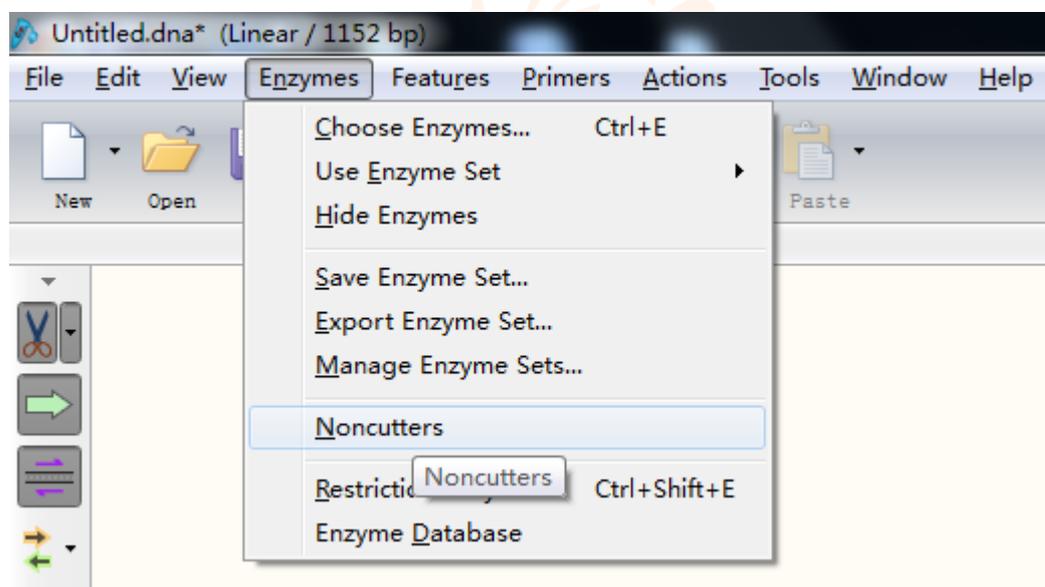
1. 打开软件, 选择第一个(红线标记), 然后输入基因的 CCDS 序列(基因的 CCDS 序列可在 NCBI 数据库中获得)

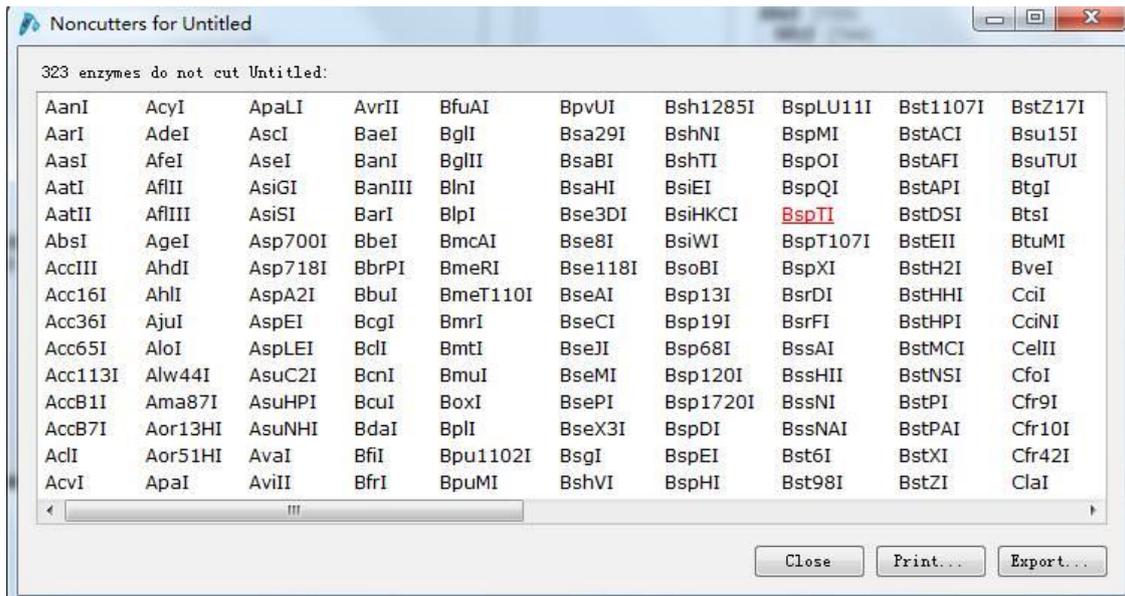


2. 点击 ok 后界面如下，图中显示的是会切割基因编码序列的酶



3. 接下来点击最上面的 Enzymes Noncutters，会显示所有不会切割基因编码序列的酶，这些酶都是我们可以用的，选酶的标准：要选择不能切割目的基因序列并且质粒上含有的酶，还有就是最好是实验室有的酶。





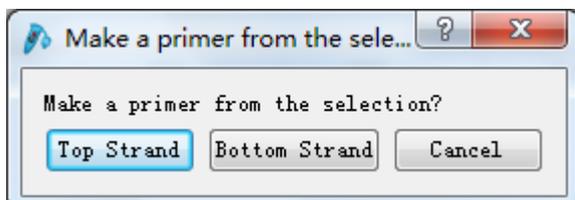
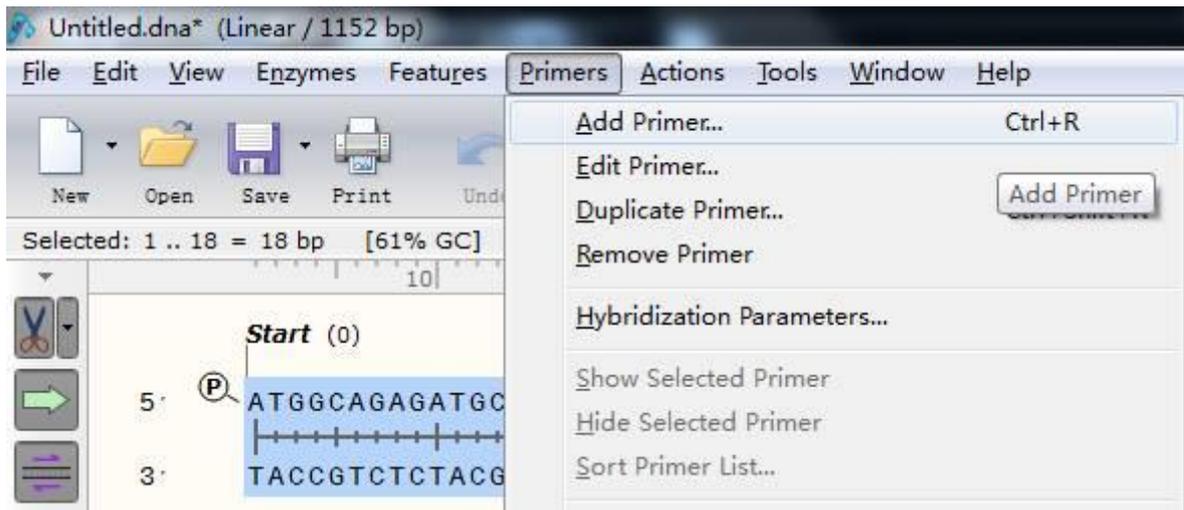
4. 确定了可以用的酶后，接下来需要确定设计引物时用的这两种酶，确定方法：这两种酶最好不要邻近，最好使用双酶切有共同 buffer 的酶,两个酶切位点最好不要是同尾酶（切下来的残基不要互补），否则效果相当于单酶切。

5. 确定了所要用的酶之后，接下来需要做的就是设计引物并引入酶切位点（注意：一定要看清楚载体上 promoter 的方向，将 CDS 正向插入到 promoter 后面）

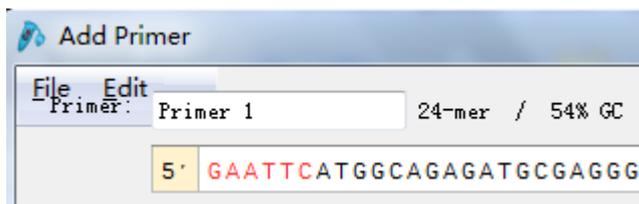
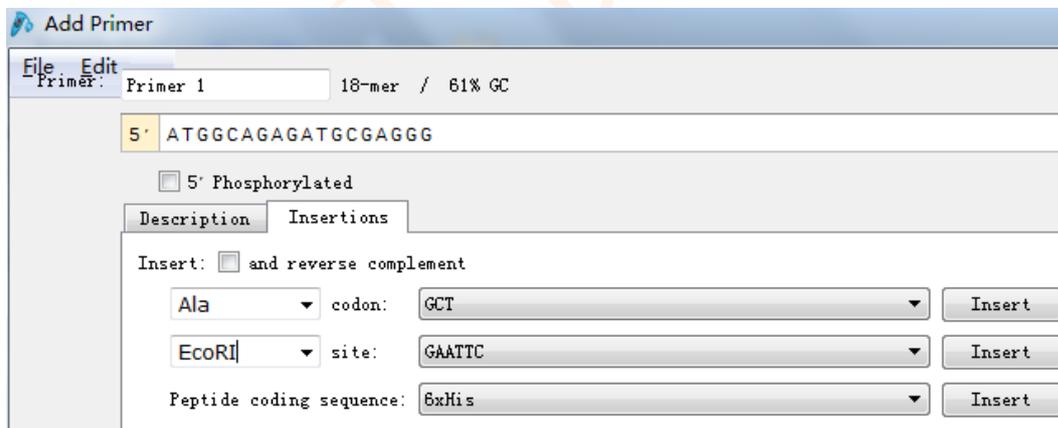
6. 点击左下角的 sequence，然后拉取上游一部分基因本身的序列，拉取的时候会显示拉取的碱基的个数以及 Tm 值，拉取到 Tm 值 55 度左右就可以（55 度以上最好）



7. 然后点击 primer——add primer，选择 top strand



8. 点击 insertions，在 site 位置处选择你准备引入的酶，比如我要引入 EcoR I，那我就选择它，然后点击 insert，这样我们就引入了该酶的酶切位点。



9. 接下来需要添加保护碱基，我一般所有的酶的保护碱基都加三个，加哪个碱基没有要求，

使 GC 含量及 Tm 值适中即可。



10. 这样上游引物就设计好了，接下来需要检测一下引物是否会形成发卡结构，可以应用 OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>)，如果发现会形成发卡结构，那就需要对引物序列做出一些调整，直到发卡结构消失。

11. 接下来拉取基因的下游的一部分序列，用同样的方法设计好下游引物，有一点需要注意的是，设计下游引物的时候选择 bottom strand。

这样构建载体所需的引物就设计好了，怎么样，是不是感觉其实也没有那么难，接下来就可以构建属于你自己的载体了。

1.5 DNA 电泳

技术 | 教你做果冻：琼脂糖凝胶电泳实验技巧

作者：毛博

果冻晶莹剔透，口感 QQ 的，其实果冻的原料琼脂糖，也是我们平时用来跑电泳的材料，琼脂糖凝胶电泳实验常用以 DNA 切胶回收，DNA 分离和用于佐证 DNA 是否重组、质粒等是否切开。今天我们就来聊聊琼脂糖凝胶电泳实验的一些小技巧小细节。



第一步：胶液的制备

称取 0.4g 琼脂糖，置于 200ml 锥形瓶中，加入 50ml 0.5×TBE 稀释缓冲液，放入微波炉里加热，直到琼脂糖全部熔化，取出摇匀，此为 0.8%琼脂糖凝胶液。**总液体量不宜超过锥瓶的 50%容量。否则会溢出来的。**毛博就吃过这个亏。还要擦洗微波炉。加热过程中要不时摇动，使附于瓶壁上的琼脂糖颗粒进入溶液。加热时应盖上封口膜，以减少水份蒸发。

第二步：胶板的制备

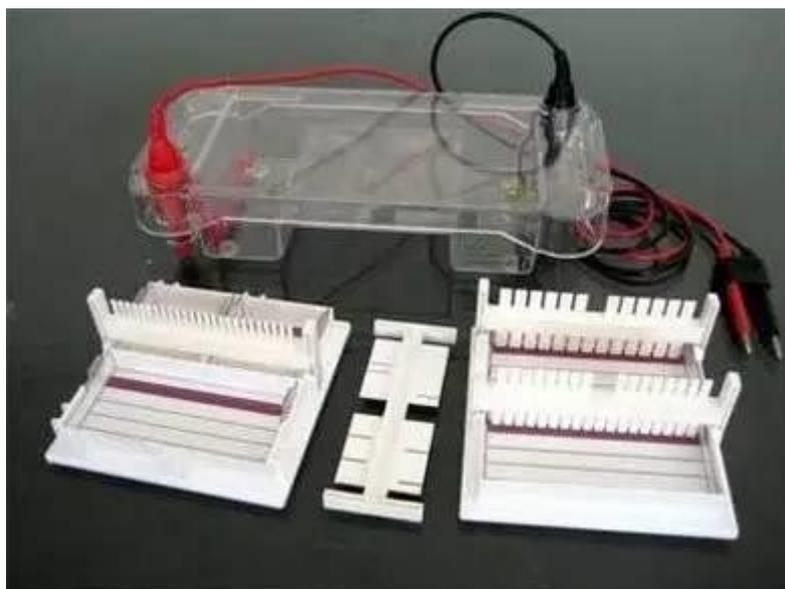
倒胶时的温度不可太低，否则凝固不均匀。东一块西一块的。果冻做出来就不好看啦。速度也不可太快，否则容易出现气泡。果冻做出来里面都是气泡。怎么吃呀？待胶完全凝固后拔出梳子，注意不要损伤梳底部的凝胶。

第三步：加样

注意上样时要小心操作，**避免损坏凝胶或将样品槽底部凝胶刺穿。**果冻下面被戳个窟窿，还怎么吃呀？

第四步：电泳

加完样后，合上电泳槽盖，**立即接通电源。**控制电压保持在 60-80V，电流在 40mA 以上。当溴酚蓝条带移动到距凝胶前沿约 2cm 时，停止电泳。



第五步：染色

未加 EB 的胶板在电泳完毕后移入 0.5 μ g/ml 的 EB 溶液中，室温下染色 20-25 分钟。

第六步：观察和拍照

在波长为 254nm 的长波长紫外灯下观察染色后的或已加有 EB 的电泳胶板。DNA 存在处显示出肉眼可辨的桔红色荧光条带。紫光灯下观察时应戴上防护眼镜或有机玻璃面罩，以免损伤眼睛。童鞋们千万不要犯上海最贵私立学校的那种错误啊。

沪上最贵私立学校惠灵顿多名学生在校实验时眼角膜损伤

2015-10-15 06:30

来源：新民网 记者：萧君玮 新民网编辑：裴蓓

分享到     1
参与评论 打印  字号：T|T



图说：上海惠灵顿国际学校。新民晚报新民网记者 萧君玮 资料图

除这些细节之外，还有一些注意事项：

- 1、酶切时所加的 **DNA 溶液体积不能太大**，否则 DNA 溶液中其他成分会干扰酶反应。
- 2、酶活力通常用酶单位（U）表示，酶单位的定义是：在最适反应条件下，1 小时完全降解 1mg λ DNA 的酶量为一个单位，但是许多实验制备的 DNA 不象 λ DNA 那样易于降解，需适当增加酶的使用量。**反应液中加入过量的酶是不合适的**，除考虑成本外，酶液中的微量杂质可能干扰随后的反应。
- 3、市场销售的酶一般浓度很大，为了省着点儿花，使用时可先用酶反应缓冲液进行稀释。另外，酶通常保存在 50%的甘油中，实验中，应将反应液中甘油浓度控制在 **10%以下**，否则，酶活性将受影响。
- 4、观察 DNA 离不开紫外透射仪，可是紫外光对 DNA 分子有切割作用。从胶上回收 DNA 时，**应尽量缩短光照时间并采用长波长紫外灯(300-360nm)**，以减少紫外光切割 DNA。
- 5、**EB 是强诱变剂，还有中等毒性，就是有致癌性**。配制和使用时都要戴好手套。尽量不要把 EB 洒到桌面或地面上。如果真的不幸洒到桌面或地上了，凡是沾污了 EB 的容器或物品

必须经专门处理后才能清洗或丢弃。

6、当 EB 放太多了，胶染色过深，DNA 带看不清的时候，可将胶放入蒸馏水冲泡，30 分钟后再观察。

以上，毛博介绍了做果冻，啊，不！做琼脂糖凝胶电泳实验的一些小技巧小窍门，也希望大家伙儿做出好吃的“果冻”来。

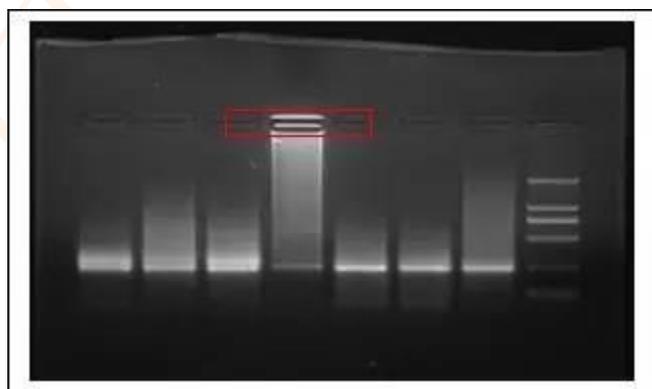
技术 | 涨泳姿！电泳中的异常现象及其原因分析

作者：毛博

跑电泳是分子生物学实验的一项基本技术。只要做分子生物学方面的实验，可能或多或少，或早或晚都要跑跑电泳。有时候，跑电泳跑着跑着也会出现一些奇奇怪怪的现象。下面，毛博就谈一谈跑电泳的过程中可能会发生的异常现象，可能的原因，以及处理的方法。

1. 加样孔有荧光

下图的红框部分就是一个典型的加样孔有荧光的例子。发生这种现象可能的原因如下：



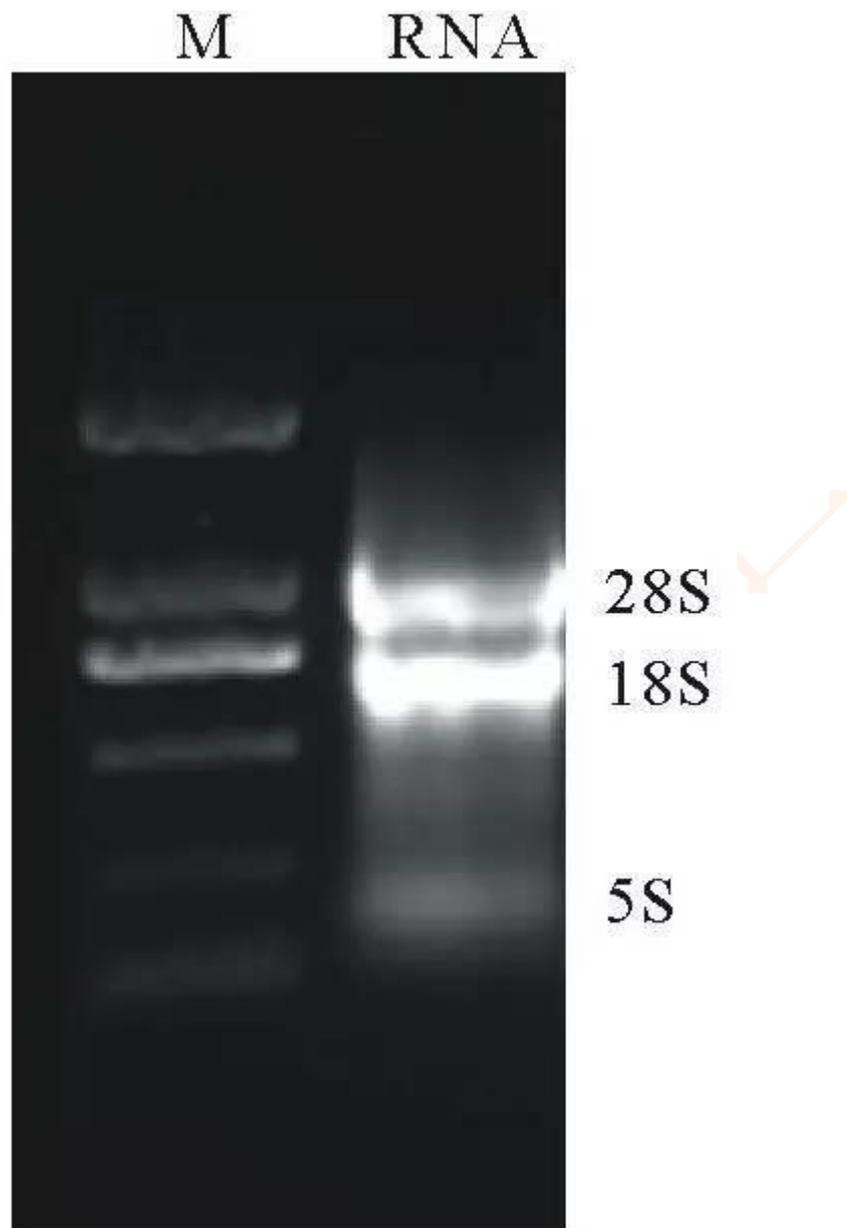
首先一定有 **DNA** 的滞留，其次多含**蛋白质残留**；如果是比较特殊的样品，其杂质也可能导

致荧光。蛋白质几乎不会被 EB 染色，能出现荧光，则一定含有核酸。非常巨大的基因组 DNA (>50kb)，如果使用普通的琼脂糖电泳，往往不能电泳出孔，单独就可能滞留在加样孔中产生荧光。更多的时候，是比较大的 DNA 与残留的蛋白质结合后，电泳不能出孔而在孔中产生荧光。酶反应产物，如果没有经过纯化去除酶，也非常容易在孔中出现荧光，其原因是酶与核酸几乎都有比较强的结合能力(基因组 DNA 的 PCR 产物电泳往往在孔中都有荧光，而且荧光强度与体系的特异性成反比。)。如果是植物样品，还可能由其它杂质残留引起。

那么，这么多种可能性。到底是什么东西残留呢？我的经验是：蛋白质残留的荧光有点发闷，其它杂质残留亮得很刺眼，且薄得锐利。如上面那个例子，这么亮，这么锐利，肯定不会是蛋白质啦。

2.总 RNA 非变性电泳显示 28S 不如 18S 亮

如下图所示，18S 明显地比 28S 亮了。

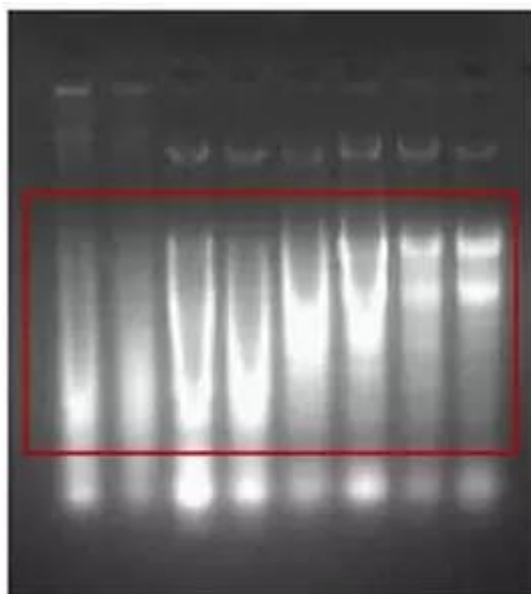


如果 28S 和 18S 的条带清晰无弥散，那么多提示 **28S 没有被 EB 饱和**。RNA 残留多时，基因组 DNA 的电泳也会有相似现象。解决方法：简单的补染就可以解决此问题。再次电泳时，或者降低上样量，或者直接增加胶中 **EB 的量**。保证 28S 比 18S 亮堂很多很多。

3. 降解

降解的现象，其实是千奇百怪的。可以简单总结如下：主带不再突出，向小片段方向发生弥散，亮度比较均衡地衰减。如果同时还伴随下列的一个或者多个现象，则需要更进一步的检

测：加样孔非常的亮、弥散发生在主条带位置的上下两个方向、从加样孔即开始发生弥散。如下图所示，红框里面的就是典型的降解的现象。



其实，以现在的裂解液的裂解能力而言，降解的发生主要是在彻底匀浆之前，只有极少量由不干净的溶解液导致。以总 RNA 抽提为例，总 RNA 的质量由高到低依次为悬浮细胞、贴壁细胞、组织。彻底裂解悬浮细胞的时间最短，彻底裂解组织的时间最长，这就是降解多发生在彻底匀浆之前的一个佐证。再看一看新鲜样品和冷冻保存样品，非常严格的冷冻保存和匀浆操作的确可以确保冷冻样品的核酸的质量；但是，有许多实验室并不具备严格的保存手段，实验人员的操作也并非完美，其结果就是核酸的降解。

事实上，RNA 抽提受的影响因素太多，就以基因组 DNA 的抽提为例看一看吧。假定消化使用的是含蛋白酶 K 的溶液，无论你使用的是新鲜样品还是冷冻保存样品，如果混匀彻底，可以预期的降解为：**细胞：不应该降解，碾碎的组织：不应该降解，大块组织：部分降解。**如果电泳发现新鲜的细胞和碾碎的新鲜组织发生了降解现象，该现象是假象；如果电泳发现冷冻的细胞和碾碎的冷冻组织发生了降解现象，该现象不是假象，就是样品在保存中已经降解了。说得更极端一点，即使蛋白酶 K 失活了，消化试剂的裂解能力也足以保证细胞的基因组 DNA 在抽提过程中间不被降解。

毛博啰哩啰嗦说了这么多。那么，如何才能减少或者杜绝核酸降解呢？那就是：一定要将重点放在样品被彻底匀浆之前。样品的保存在前面写的 RNA 的提取一节里面已经说过了，不重复。其次就是要缩短样品从脱离原来的生存环境或者低温到被彻底匀浆之间的时间。越快越好。

要保小命，远离核酸染料？

作者：酸菜

在生物化学实验室中，小伙伴们经常与毒性很强、有腐蚀性、易燃烧和具有爆炸性的化学药品直接接触，常常使用易碎的玻璃和瓷质器皿以及在煤气、水、电等高温电热设备的环境下进行着紧张而细致的工作，因此，必须十分重视安全工作。对于医学小伙伴而言，最常接触到的就是核酸染料，核酸染料主要有 EB、GoldView、GelRed 和 GelGreen，要保小命，远离核酸染料？今天给各位小伙伴补补脑。

——by 酸菜

EB 染料

在研究数以千计的实验室残留性有毒物质，最值得一提的就是溴化乙锭（EB，3,8-二氨基-5-乙基-6-phenylphenanthridinium 甲基溴），该物质的潜在毒性作用已被大众广泛的认知。EB 属于核酸分子嵌入剂，通常用于分子遗传学、DNA 和染色质结构分析等研究中，特别是国内很多实验室仍在使用 EB 进行凝胶核酸电泳实验的染色。

EB 是极易渗透细胞膜与胞内 DNA 嵌合的小分子，它具有平面共轭大环结构，是典型的 DNA 分子插入试剂，菲啶环插入到 DNA 分子的碱基对之间，与 DNA 嵌合形成稳定的复合物，并影响 DNA 的复制，破坏正常的遗传生理现象。EB 作为诱变性的化合物，它在人体中诱导突变的机制是不可逆转的。

网络上有多数网友反映，周围长期进行生化实验的女性老师，都生产出不同程度畸形儿的现象。还有长期做凝胶实验的同事得白血病等。在此提醒广大 EB 操作小伙伴，科研诚可贵，生命价更高！不为自己着想，也要为下一代的希望着想，做好防护措施，规范操作。尽量远离 EB---这个分子实验头号杀手！或者选择相对安全的 EB 替代品。

GoldView 染料

GoldView(GV)是一种可代替溴化乙锭(EB)的新型核酸染料,其灵敏度与EB相当,使用方法与之完全相同。在紫外透射光下双链DNA呈现绿色荧光,也可用于RNA染色。Goldview对于大片段DNA的染色效果还凑合,但是在对于500bp以下的片段效果不是很好,还有一个弱点是它的荧光基团在紫外灯下非常容易淬灭,一般5-10min条带就会消失。所以应该抓紧时间拍照后再观察。

实质上,所谓的Goldview就是吖啶橙,也就是传说中的AO,有一种传统的细胞凋亡试验,采用的染料正是吖啶橙,也就是AO/EB染色试验,EB无法穿透完整的细胞膜,而AO可以穿过细胞膜染上细胞核,以此来区分凋亡和未凋亡的细胞。这个实验其实告诉我们的是,由于AO会穿过细胞膜,所以虽然GoldView被说的多么不具有毒性,我们还是要谨慎待之。

GelRed 和 GelGreen 染料

GelRed 和 GelGreen 是两种集高灵敏、低毒性和超稳定于一身的极佳的荧光核酸凝胶染色试剂。其水溶染色剂通过美国环保局安全认定,废弃物可直接倒入下水道,而不会造成任何环境污染。GelRed 和 GelGreen 的特殊化学结构使其难以穿透细胞膜进入细胞,正是这一特性降低了染料的细胞毒性。不过也正是因为如此,其价格大约是 GoldView 的十倍左右。

但是我们想想,不管一些核酸染料宣传的时候如何说它们具有多高的安全性,至今小鼠皮下注射未发现致癌性,但是为安全起见,我们强烈建议操作时依然应该每次带手套,不小心接触皮肤后应该立刻清洗,并妥善处理废弃物。

1.6 DNA 甲基化

触手可得的甲基化

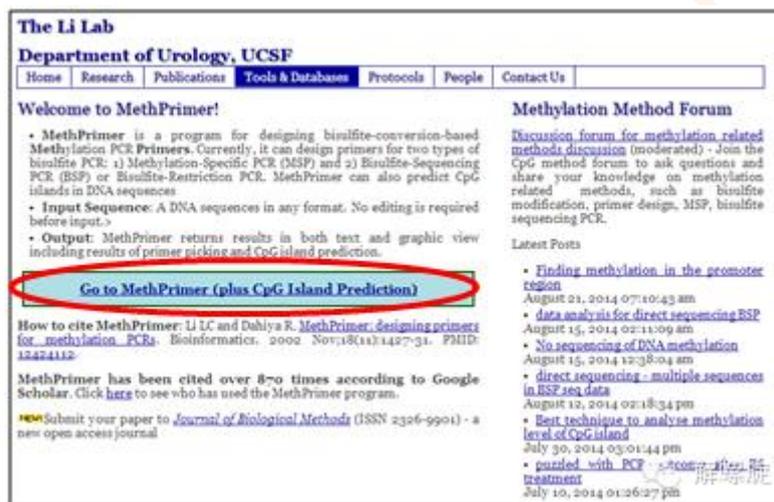
作者: 酸菜

从自然中标的结果,表观遗传学中的甲基化一直是研究热点。加上近来对甲基化在肿瘤中重要性的报道,想必这一热潮还有待持续。小伙伴们是否蠢蠢欲动呢?对于甲基化的研究其实并不困难,甚至可以用触手可得来形容,你不相信么?既然如此,酸菜今天就用一个简单的方法说明甲基化研究究竟多么不在话下!

--by 酸菜

也许有的小伙伴已经猜到了，今天要讲的就是**甲基化 PCR**！这种方法灵敏度高，无需特殊仪器，关键是经济实用，是目前应用**最为广泛的检测方法**。然而小伙伴们要注意的事，甲基化 PCR 是环环相扣的，你从**预测甲基化位点设计引物到最后的每一步都要小心**！甚至在最后 PCR 的时候，**点样的顺序**都是和 WESTERN BLOT 一样有讲究的！

第一步 在线引物设计：<http://www.urogene.org/methprimer/>

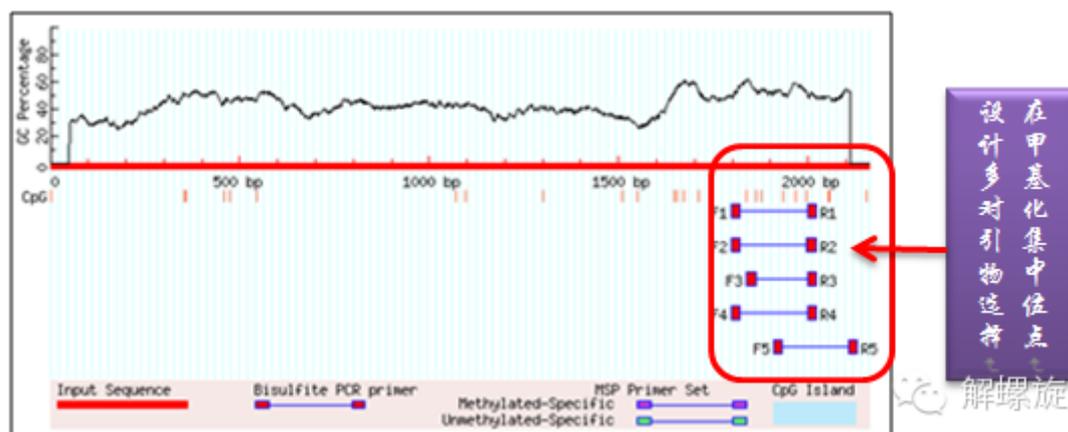


把你基因的启动子序列拷贝至此



坐等结果，它会预测甲基化位点并设计好甲基化引物（很多对引物供你选择，当然你还要根

据设计出来的引物的退火温度是否合理之类的进行筛减),如此智能,拿做己用最为省心了!



第二步 基因组 DNA 的提取。

这一步完全可以购买供细胞或组织使用的 DNA 提取试剂盒,大神们自己配试剂提取完全可以。此步**重点在于 DNA 的纯度**,即减少或避免 RNA、蛋白的污染很重要。因此在提取过程中需使用**蛋白酶 K 及 RNA 酶**以去除两者。

使用两者的注意事项:

- 1: 蛋白酶 K 可以使用灭菌双蒸水配制成 20mg/ml;
- 2: RNA 酶必须要配制成不含 DNA 酶的 RNA 酶,即在购买市售 RNA 酶后进行再处理,配制成 10mg/ml。否则可能的后果是不仅没有 RNA,连 DNA 也被消化了。两者均于-20 度保存。

第三步 亚硫酸氢钠修饰基因组 DNA (也可直接购买试剂盒)

原理:亚硫酸氢钠处理后, DNA 中未发生甲基化的胞嘧啶脱氨基转变成尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶保持不变,通过设计出来的特异性甲基化引物和非甲基化引物对 PCR 取得条带的亮度比较来判断序列是否被甲基化。

大神们请继续自配试剂使用~~

最后一步 PCR 就不再赘述啦~~

最终如果与预期相符的话，会有如例图所示的结果，M 代表甲基化引物，U 代表非甲基化引物，1 和 2 分别是肺癌组织和正常组织所提取的基因组。可见在肺癌组织中甲基化程度明显偏高。



图片引自：Xu Zhai, Shi-Jun Li. Methylation of RASSF1A and CDH13 Genes in Individualized Chemotherapy for Patients with Non-small Cell Lung Cancer. Asian Pac J Cancer Prev, 15 (12), 4925-4928

酸菜炒杂烩：

这样的检测并不局限于组织，经过药品（如甲基化抑制剂）处理后的肿瘤细胞与未处理的细胞比较某基因甲基化程度也是可行的。另外，小伙伴们如果手头样本量够大，可以不局限于比较癌组织和癌旁组织的差异，不妨对癌组织样本分期，或者对病人分类（如初发肿瘤和复发肿瘤病人）来检测有无甲基化差异，也许结果会有惊喜！

科研老司机的套路哲学（七）

作者：子非鱼

生命中存在种种因果关系

也许都可简单粗暴的归因于基因

然而就算是拥有相同遗传背景

并不意味着拥有平等的人生了

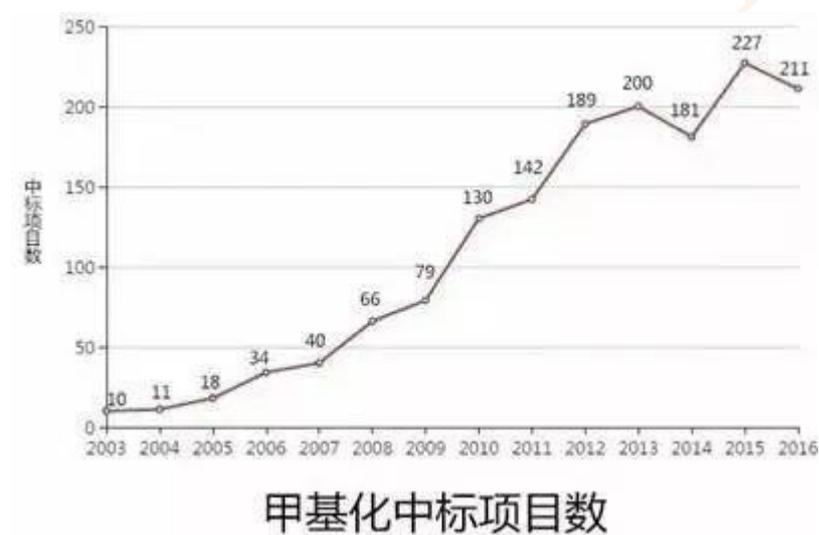
表观遗传学带来的“获得性遗传”

使得一切成为可能

因此成为科研界中的“耀眼明星”

而在如火如荼的表观遗传学研究中

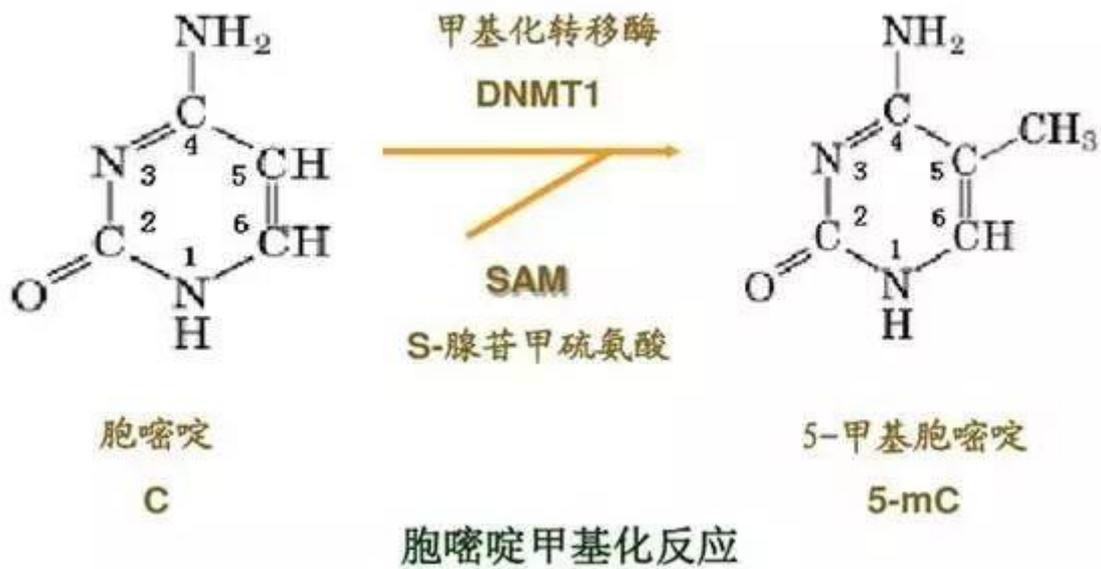
DNA 甲基化可谓是独占鳌头



简言之，DNA 甲基化就是

将胞嘧啶 (cytidine,C) 的嘧啶环上

第 5 位碳原子加上甲基基团 (-CH₃)



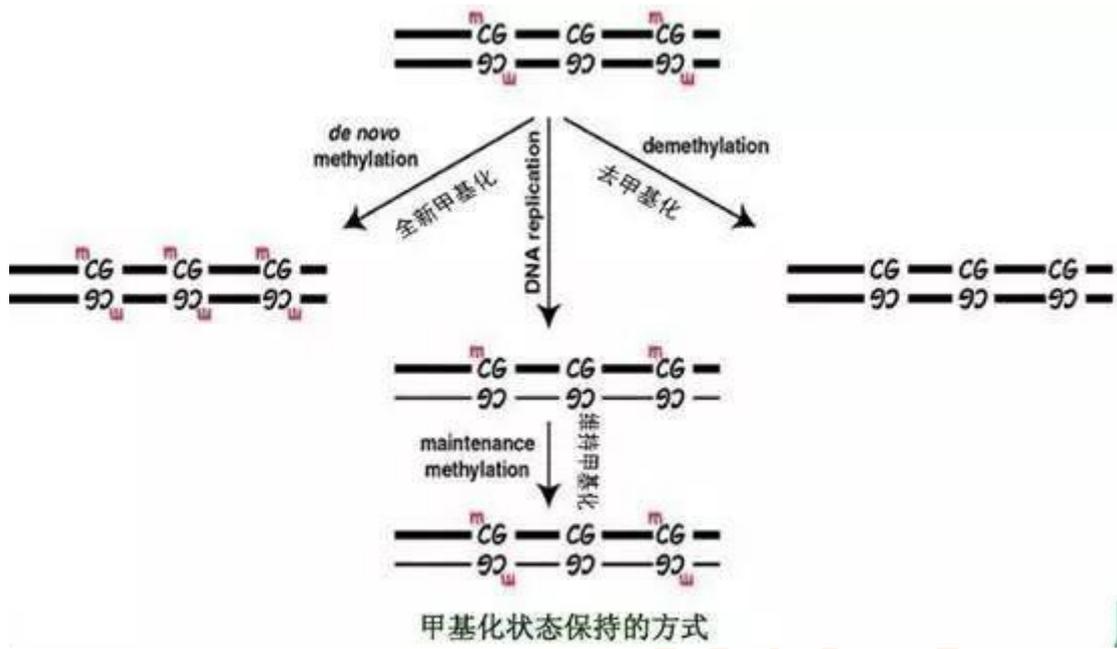
甲基化一般发生在 CpG 岛 (CpG island)

CpG 岛通常与基因的启动序列区域相关

正常情况下, CpG 岛内的位点通常处于

非甲基化状态, 可开启基因表达

而 CpG 岛外的位点通常是被甲基化的



DNA 甲基化就是拨动基因开关的隐形之手

它就相当一把锁，

凡是被甲基化的 DNA

均是需要被“尘封”、“监禁”的基因

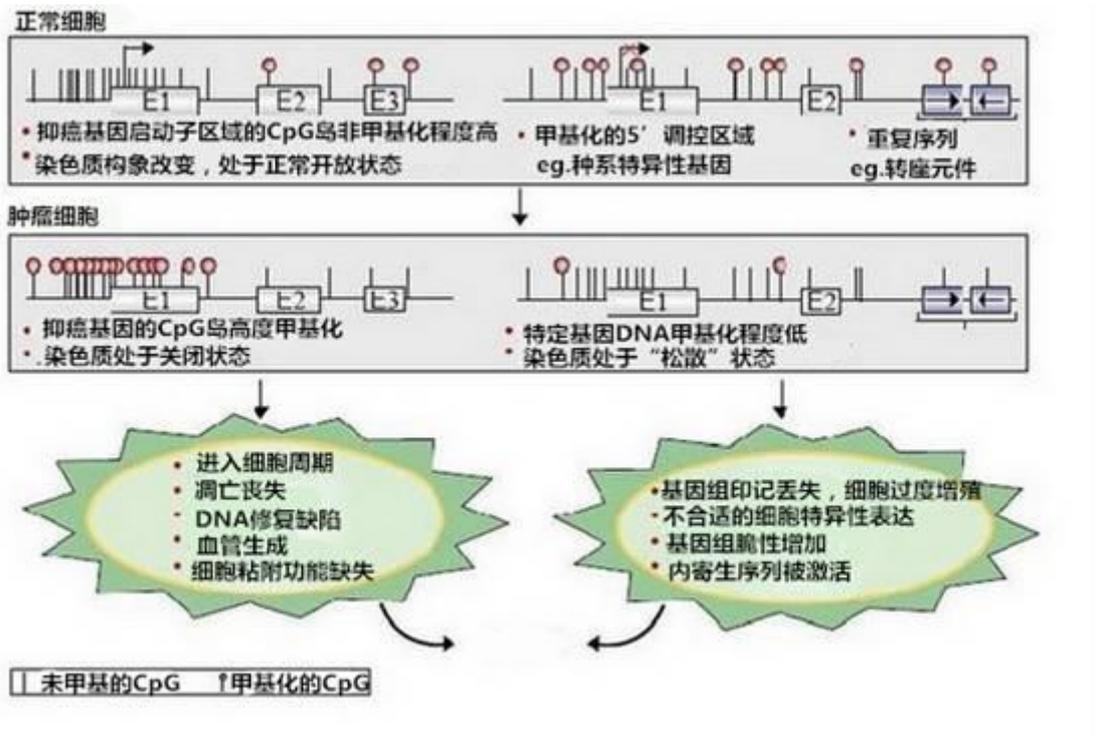
如基因组里的“捣蛋鬼”—转座子

一旦这把锁被意外打开

这些捣蛋鬼就会将基因组搞得一团糟

从而导致身体出现诸多问题

如肿瘤、精神疾病等



想来，大多数科研汪都对它垂涎已久

其实甲基化研究没那么难

将 SNP 与甲基化结合已成为

该领域中常用的科研套路

这篇 IF>10 分 的文章

可让苦于无从下手的小伙伴们

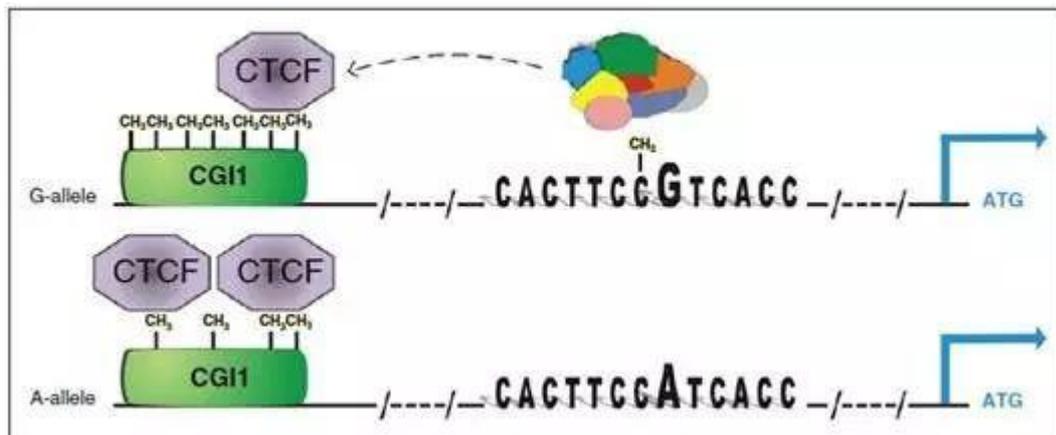
依样画葫芦，一解燃眉之急

PLATELETS AND THROMBOPOIESIS

Allele-specific DNA methylation reinforces *PEAR1* enhancer activity

Benedetta Izzi,¹ Mariaelena Pistoni,² Katrien Cludts,¹ Pinar Akkor,¹ Diether Lambrechts,³ Catherine Verfaillie,² Peter Verhamme,¹ Kathleen Freson,¹ and Marc F. Hoylaerts¹

¹Department of Cardiovascular Sciences, Center for Molecular and Vascular Biology, ²Department Development and Regeneration, Stem Cell Institute, and ³Laboratory for Translational Genetics, Vesalius Research Center, Department of Oncology, Flemish Institute of Biotechnology, University of Leuven, Leuven, Belgium



研究背景： 基因PEAF1高表达可促进造血干细胞向单核细胞的分化

1. 查询基因PEAF1的SNP位点rs12041331周围染色质修饰状况

2. H3K4Me1修饰具有增强子活性 (By CHIP-PCR实验)

3. 检测90例正常人rs12041331基因型和甲基化修饰发现G亚型CpG岛的甲基化程度高

4. rs12041331的G亚型比A亚型的PEAF1转录活性更高 (By荧光素酶报告基因实验)

5. G亚型附近胞嘧啶的高甲基化可增强核蛋白结合 (By EMSA实验)

6. 基于Transfac数据库的promo软件预测rs12041331附近转录因子结合位点

7. 基于ENCODE数据库分析CTCF对甲基化序列 (CGI) 的结合

8. PEAF1表达、DNA甲基化修饰与HSC增殖分化的关系

结论： SNP位点Rsl2041331的G基因型中CpG岛甲基化程度高使得其与转录因子CTCF的结合减弱，增强Enhancer功能

另外，随着高通量测序技术 (NGS) 的发展

DNA 甲基化测序也成为了

破解“基因之锁”的利器



然而，由此衍生出 DNA 甲基化测序方法

有千千万万种

反而让眼花缭乱的小伙伴们

不知道该如何选择

小鱼整理出了最常见的 10 种测序方法

供大家参考



测序方法	原理	优缺点
1)全基因组重亚硫酸盐转化测序 (WGBS)	利用重亚硫酸盐将基因组未甲基化的C转换成U, 再经过PCR转变为T, 结合NGS可高效准确地分析基因组中所有甲基化位点。	可以从单个碱基水平化的胞嘧啶。但比转请随意
2)重亚硫酸盐处理后接头标记技术 (PBAT)	通常会在重亚硫酸盐处理后进行接头连接和随机引物的扩增。	可避免重亚硫酸盐处
3)内切酶-重亚硫酸盐靶向测序 (RRBS)	利用内切酶 (如MspI) 富集CpG位点区域, 经重亚硫酸盐转化后, 进行高通量测序。	该方法覆盖了绝大多CpG岛区域, 极大地用率, 成本较低
4)氧化-重亚硫酸盐测序 (oxBS-Seq)	该法可使5'hmC被氧化转变成尿嘧啶, 结合NSG技术, 可从单个碱基水平分辨(5'hmC)和5'mC。	弥补了重亚硫酸盐测5' mC进行区分的缺陷
5)甲基化DNA免疫共沉淀测序 (MeDIP-seq)	可用抗体或甲基化DNA结合蛋白来富集甲基化DNA。	该方法可发现高度甲(岛), 但不能进行单
6)TET辅助的重亚硫酸盐测序 (TAB-seq)	用葡萄糖亚胺与5' hmC相互作用以避免受TET蛋白的氧化, 而5' mC和未甲基化的C被氧化为U。	可从单个碱基水平鉴
7)甲基化敏感性的限制酶测序 (MRE-seq)	将甲基化作用的敏感性和限制酶的特异性结合起来	可鉴定CpG岛的甲基
8) HELP-Seq	用HpaII及其甲基化不敏感的限制性内切酶MSP1处理, 来对基因组内及基因组间的甲基化位点进行比较, 进而实现甲基化测序。	
9) 甲基化结合域捕获技术 (MBD-CAP)	用甲基化DNA能够结合蛋白MeCP2, MBD1-2 和 MBD3LI来对甲基化的DNA进行免疫沉淀。	可以发现基因组中高不能从单个碱基水平
10) 基于探针的靶向富集技术	通过合成寡核苷酸探针来捕获CpG岛、基因启动子区域以及其他一些显著性甲基化的区域。	目前, Agilent 和 司已有这种商品化的

另外, 小鱼也为大家推荐三类

DNA 甲基化数据分析工具

第一类: 基于引物设计功能的软件

主要是针对重亚硫酸盐序列进行甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MS-PCR or MSP) 和重亚硫酸盐测序 (bisulfite sequencing, BS) 引物的设计。

#1: MethPrimer (甲基化 PCR 引物设计经典软件)

网址: <http://www.urogene.org/methprimer>

#2: BiSearch (注册后可使用)

网址: <http://bisearch.enzim.hu/>

#3: BioToolKit300 - Primo MSP 3.4 (60 天试用期)

网址: <http://www.changbioscience.com/>

软件: CpG Ware (需付费使用)

网址: <https://apps.serologicals.com/cpgware/>

第二类: CpG 岛序列分析软件

此类软件根据一定的规则对基因组 DNA 序列的 CpG 岛进行准确预测 (这是 MSP 和 BS 引物设计的基础)。

#1: CpGPlot/CpGReport/Isochore

网址: <http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>

#2: CpGProD

网址: http://pbil.univ-lyon1.fr/software/cpgprod_query.html

#3: CpG Island Searcher

主页: <http://www.cpgislands.com/>; <http://cpgislands.usc.edu/>

第三类: CpG 位点甲基化状态作图软件

此类软件以重亚硫酸盐测序结果为基础, 以线图或点图形式表现每个 CpG 位点的甲基状态 (或发生频率), 从而为不同疾病状态的 DNA 甲基化特异性图谱提供直接实验依据。

#1: MethTools (免费软件)

网址: <http://genome.imb-jena.de/methtools/>

该软件可将 CpG 位点的甲基化状态分别以实心点和空白点的形式表示全甲基化和半甲基化

状态。缺点：仅适用于 Linux、Unix 或苹果机操作系统。

#2: BiQ Analyzer

网址: <http://biq-analyzer.bioinf.mpi-sb.mpg.de/>

该款基于 Java 语言的软件可对 CpG 位点的甲基化状态进行简单的线型绘图，可于包括 Windows、Linux、Unix 等多种操作平台上运行。

DNA 甲基化测序常用方法

作者：子非鱼

随着高通量测序技术（NGS）技术的发展，使我们能够从全基因组水平来分析 5' 甲基胞嘧啶及组蛋白修饰等事件，由此能够发现很多传统的基因组学研究所不能发现的东西，这就是所谓的“DNA 甲基化测序”！

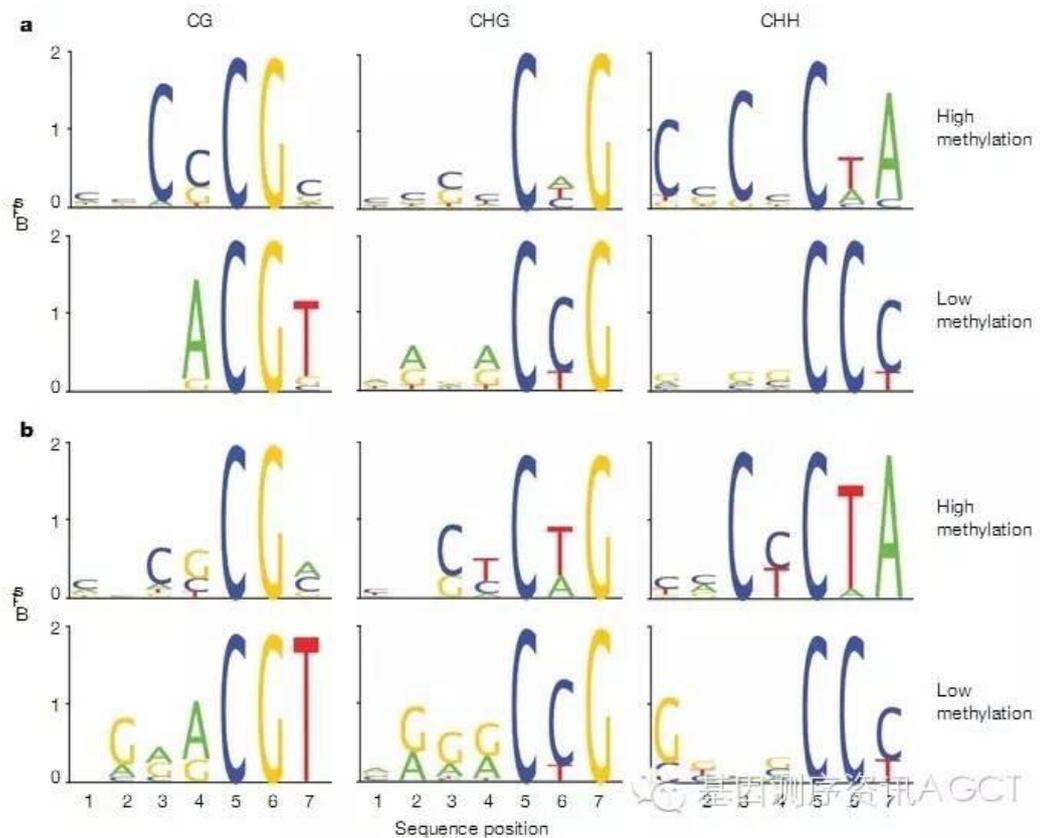
DNA 甲基化测序方法按原理可以分成三大类：

- 1、重亚硫酸盐测序；
- 2、基于限制性内切酶的测序；
- 3、靶向富集甲基化位点测序；

基于以上原理又有数种不同的测序方法，下面，就介绍 10 种 DNA 甲基化测序的常用方法：

1) 重亚硫酸盐测序

该方法可以从单个碱基水平分析基因组中甲基化的胞嘧啶。首先，利用重亚硫酸盐对基因组 DNA 进行处理，将未发生甲基化的胞嘧啶脱氨基变成尿嘧啶。而发生了甲基化的胞嘧啶未发生脱氨基，因而，可以基于此将经重亚硫酸盐处理的和未处理的测序样本进行比较来发现甲基化的位点。



2) 重亚硫酸盐处理后接头标记技术(PBAT)

为了避免重亚硫酸盐处理时模板的丢失,通常会在重亚硫酸盐处理后进行接头连接和随机引物的扩增。

3) 限制性内切酶-重亚硫酸盐靶向测序(RRBS)

该技术是指对基因组上 CpG 岛或 CpG 甲基化较密集的区域进行靶向测序。样本首先经几种限制酶进行消化处理,然后经重亚硫酸盐处理,最后再测序。这种方法可以发现单个核苷酸水平的甲基化。

4) 氧化-重亚硫酸盐测序(oxBS-Seq)

5'羟甲基胞嘧啶(5'hmC)是 5'甲基胞嘧啶脱甲基成胞嘧啶过程的中间产物,重亚硫酸盐测序无法对二者进行区分。通过氧化-重亚硫酸盐测序,5'甲基胞嘧啶保留,而 5'羟甲基胞嘧啶(5'hmC)

被氧化，进而脱氨基成尿嘧啶。通过将经过氧化处理和未处理的样本进行测序比较，即可从单个碱基水平分辨 5'羟甲基胞嘧啶(5'hmC)和 5'甲基胞嘧啶。

5) TET 辅助的重亚硫酸盐测序(TAB-seq)

TAB-seq 采用葡萄糖亚胺与 5'羟甲基胞嘧啶(5'hmC)作用来保护免受 TET 蛋白的氧化。5'甲基胞嘧啶和未甲基化的胞嘧啶被脱氨基成尿嘧啶，进而可以从单个碱基水平鉴定 5'羟甲基胞嘧啶(5'hmC)。

6) 甲基化敏感性的限制酶测序(MRE-Seq)

MRE-Seq 将甲基化作用的敏感性和限制酶的特异性结合起来进而鉴定 CpG 岛的甲基化状态。

7) HELP-Seq

HELP-Seq 采用 HpaII 及其甲基化不敏感的限制性内切酶 MspI 处理，来对基因组内及基因组间的甲基化位点进行比较，进而实现甲基化测序。

8) 甲基化 DNA 免疫共沉淀测序(MeDIP)

MeDIP 是一种采用抗体或甲基化 DNA 结合蛋白来捕获富集甲基化 DNA 的技术，这种技术可以发现基因组中高度甲基化的区域，如 CpG 岛，但不能进行单个碱基水平的分析。

9) 甲基化结合域捕获技术(MBD-CAP)

MBD-CAP 技术利用甲基化 DNA 能够结合蛋白 MeCP2, MBD1-2 和 MBD3LI 来对甲基化的 DNA 进行免疫沉淀。与 MeDIP 技术相似，该技术也是可以发现基因组中高度甲基化的区域，不能从单个碱基水平分析甲基化。

10) 基于探针的靶向富集技术

甲基化测序靶向富集技术采用合成寡核苷酸探针来捕获 CpG 岛、基因启动子区域以及其他一些显著性甲基化的区域。目前，Agilent 和 Roche Nimblegen 公司已有这种商品化的试剂盒。

最后，Pacific Biosciences (Pacbio) 公司的这项 SMRT DNA 测序技术采用动力学原理来直接检

测甲基化的胞嘧啶。

1.7 测序与芯片技术

测序数据可视化，你需要配备哪些软件？

工欲善其事，必先利其器。对于复杂的基因组数据，用恰当的可视化工具做分析是必不可少的。从基因组测序诞生至今，各种工具、可视化方法也都在同步演进，现在已经像万花筒一样斑斓。选对了工具，那么检验假设、发现新东西就是小菜一碟。

下面就从三个研究层面来推荐几个常用工具。

基因组浏览器

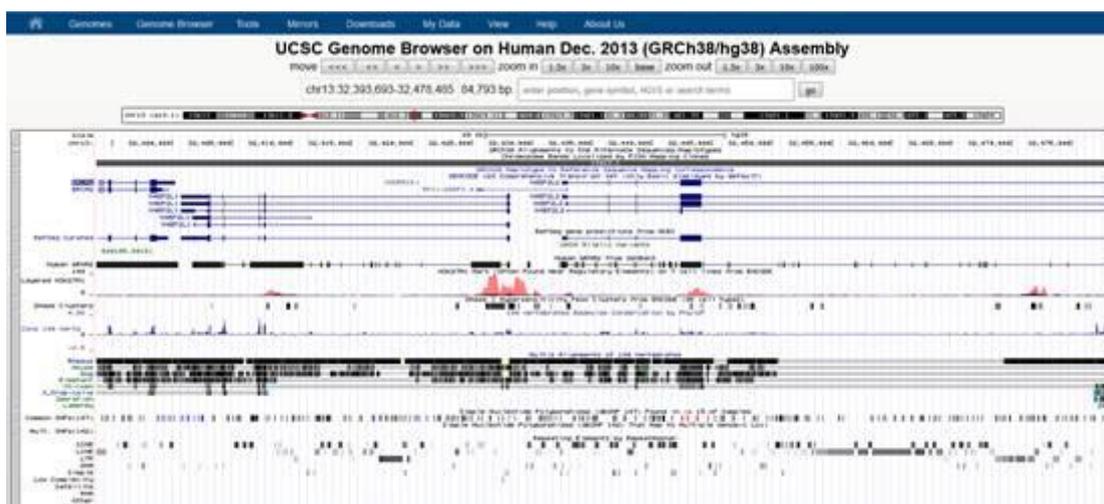
首先咱们要了解待研究的对象，即核酸序列和其中的各种结构单元。基因组浏览器，就是用来浏览基因组数据的图形交互界面。它们免费向公众开放，并提供各种工具用于基因组数据检索、浏览、分析，以简洁紧致的图形方式呈现。

它们会详细展现已知基因的位置，以及每个基因的功能类别。还整合了各种基因组数据，可查到 SNP、EST 和保守序列模式的详细情况。

你也可以上传自己的研究数据（如序列和注释）与别人共享。

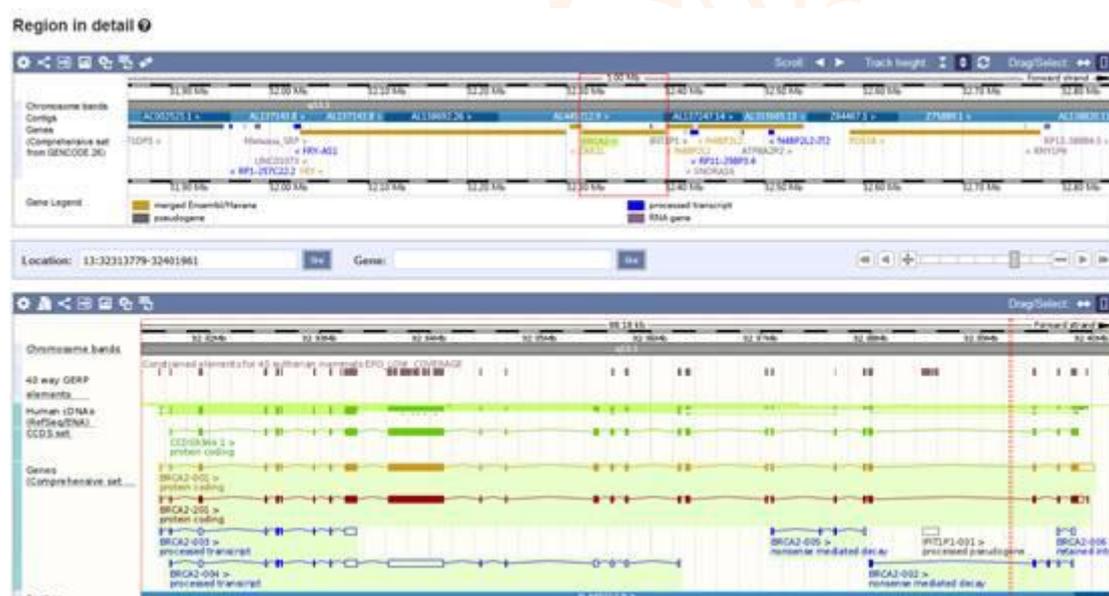
UCSC Genome Browser

地址：<https://genome.ucsc.edu/>



Ensembl

地址: <http://asia.ensembl.org/index.html>

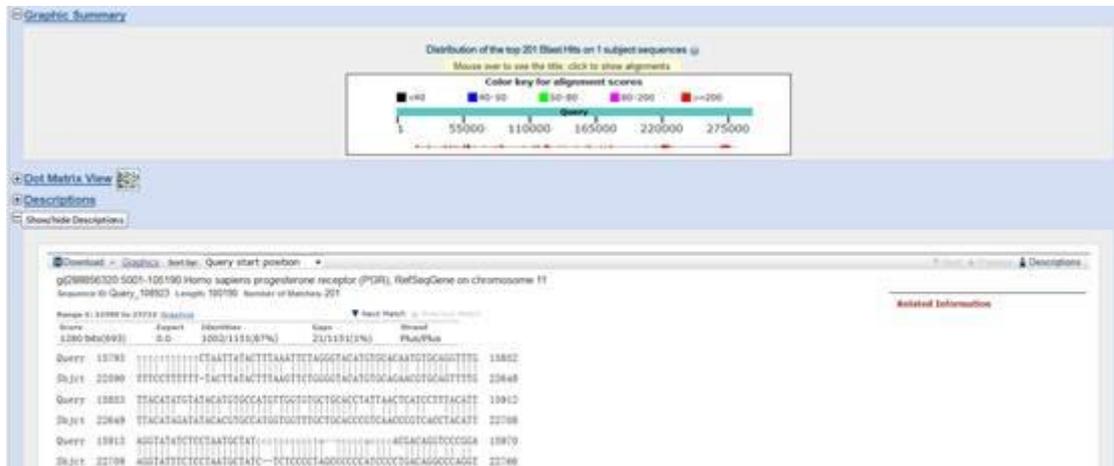


序列比对

在了解单个基因或基因组信息的基础上, 我们就会想要往横向看看。序列比对就是一种常用的横向研究方法, 包括核酸序列和蛋白质序列的比对, 通过检测两个或以上序列的相似性, 推测其功能、结构和进化信息

NCBI BLAST

地址：<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>



虽然没什么美感，但是报告详细啊

TOPALI

地址：<http://www.topali.org/>



比较基因组学

比较基因组学与序列比对有重合之处，但更为复杂，诸如探索基因组的各个区域、确定直系

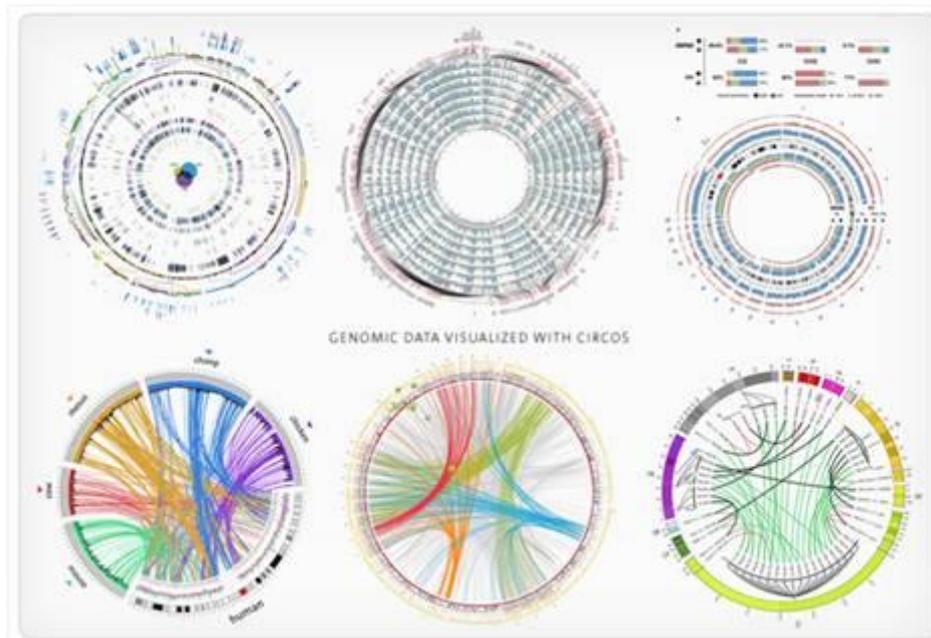
同源体和旁系同源体、分析 SNP 和 CNV 等等。于是也就有多种工具应运而生，能直观地展示分析结果，表现形式也多种多样。

Circos

地址：<http://circos.ca/>

VISUALIZING GENOMIC DATA

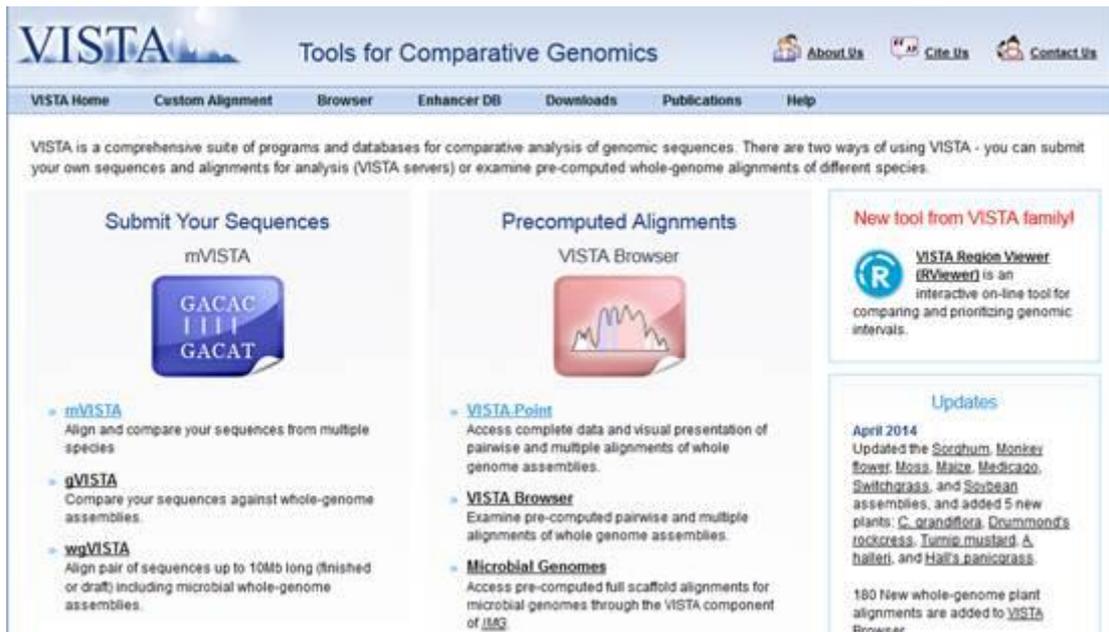
For an example of how Circos can be used in genomics, see the [Guide to Use in Genomics and Sequence Analysis](#).



多层次展示信息的圈图，但此法也有相应的 R 包可选

VISTA

地址：<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>



多种工具适应多种研究需要

参考来源:

<http://bitesizebio.com/32055/genomics-software-sequence-comparisons/>

工具 | DNA 芯片数据分析软件大盘点，藏起！

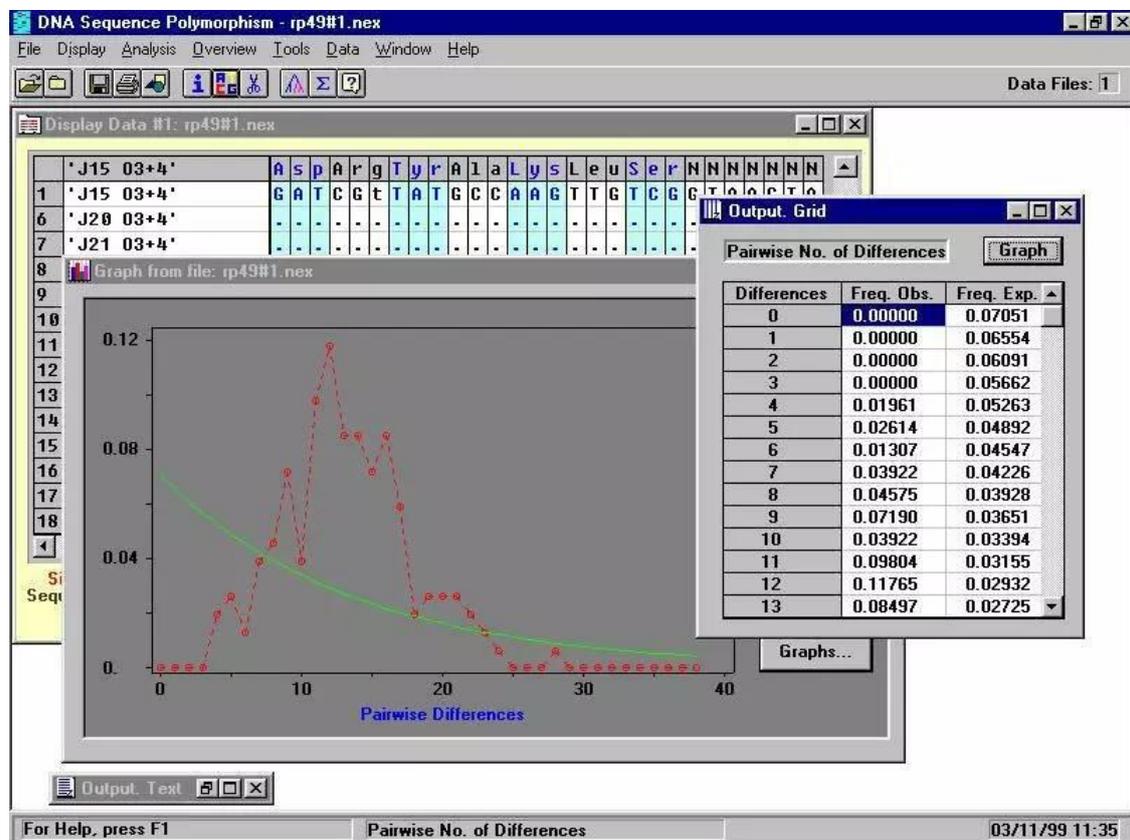
作者：毛博

随着大数据概念被炒得热火朝天，DNA 芯片表达数据的分析软件的开发已越来越受到科学家和开发者的重视，不断有新的统计方法软件推出。下面，毛博为大家简单介绍一下这些常用的软件。对于免费软件，还有下载链接附送。

1.ArrayVision 7.0

这是一款功能强大的商业版 DNA 芯片分析软件，不仅可以进行图像分析，还可以进行数据

处理，方便的 protocol 的管理功能强大。不过美中不足的是太贵啦。商业版的价格是 6900 美元。确实挺贵的。如果不是土豪实验室的话，真心不建议买这么高大上的软件。

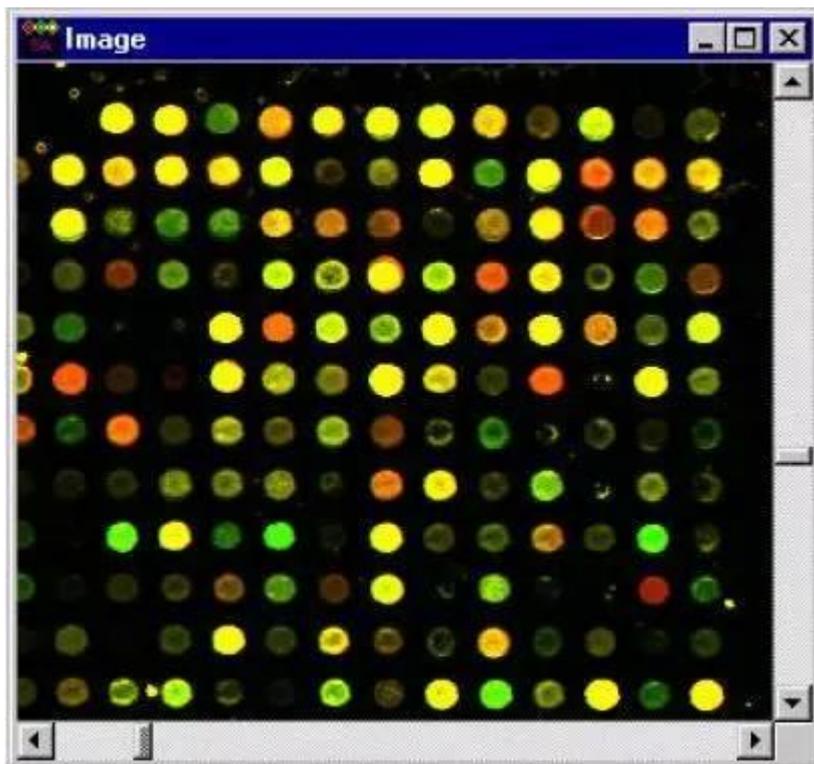


2.Array Pro 4.0

这是 Media Cybernetics 公司的产品。提到这个公司大家不一定知道。但是提到这个公司的一个著名的产品，大家十有八九听说过。这就是大名鼎鼎的：Image Pro。相信做过免疫组化的童鞋们都知道这个软件。

3.ScanAlyze 2.44

这是美国斯坦福大学开发的 DNA 芯片阅读软件，能够进行微矩阵荧光图像分析，包括半自动定义格栅与像素点分析。输出格式为分隔的文本格式，可以很容易地转化为任何数据库的格式。



4.Cluster

这又是一个斯坦福大学开发的软件。能够对大量微矩阵数据组进行各种簇（Cluster）分析与其它各种处理。这个软件有一个好处。就是免费。

下载地址如下：<http://smd.princeton.edu/resources/restech.shtml>

5.TreeView 1.5

又是斯坦福大学开发的一款软件。是专门用来显示 Cluster 软件分析后产生的图形化结果。现在已经和 Cluster 成为了基因芯片处理的标配软件。根据毛博自己的经验，其实一个 Cluster，一个 Treeview，双剑合璧，对付一般的基因芯片分析就足够啦。对了，Treeview 也是免费的。

下载地址如下：<http://smd.princeton.edu/resources/restech.shtml>。

6.GeneSpring

安捷伦公司开发的经典基因芯片分析软件，已经迭代到了 12.0 版本。在新的版本里面加入了多组学分析功能。一般使用的话，只需要把 DNA 芯片实验数据结果导入即可。安捷伦公司提供了 20 天免费试用版。注意：这个免费试用版和正式版的功能是完全一样的。从这一点来说，安捷伦公司还是比较厚道的。

下载链接如下：http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pagelId=2141&_requestid=41021

7.Array Designer 2.00

最后，再友情赠送大家一个软件。这个软件不是 DNA 芯片数据分析软件，而是 DNA 芯片引物设计软件。也是非常常用的，只要做 DNA 芯片方面的实验，难免要设计引物。用 Array Designer 2.00 设计引物，还是很好用的。这算是 DNA 微矩阵（microarray）软件，可以批量设计 DNA 和寡核苷酸引物工具。网上可以下载免费试用版的。

下载地址如下：<http://www.premierbiosoft.com/jsp/customer/RequestEvaluation.jsp>

综上所述，DNA 芯片的数据分析可以方便地通过软件来实现。如果是像毛博当年那种屌丝实验室的话，本着省着点儿花的精神，可以下载一些免费软件来使用。这里，毛博还是隆重推荐 Cluster 和 Treeview。

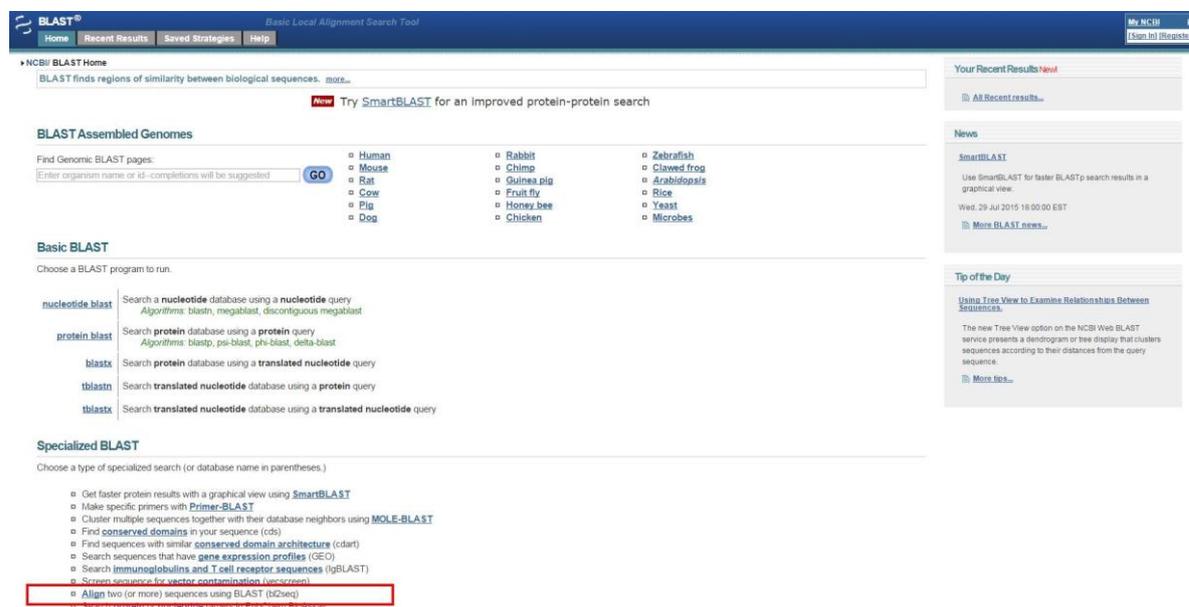
技术 | 借我一双慧眼吧：测序结果分析

作者：毛博

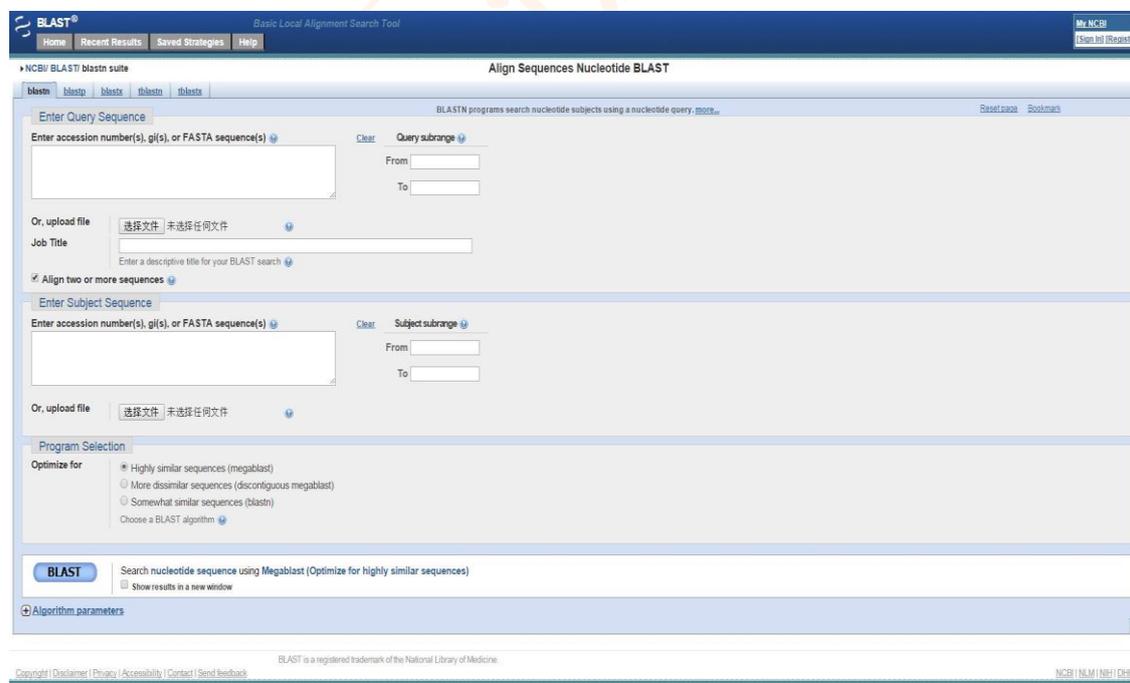
我们经历了九九八十一难，终于把测序做出来了。下面该怎么分析结果呢？这里，毛博简单介绍一下常用的一些分析软件。还有一些小技巧小窍门。都是毛博在使用过程中，自己总结出来的。更有各个软件的在线链接献上。为了服务好大家，毛博也是拼了。

1. Blast

在没有软件的情况下，在线用 **Blast** 其实是最简单的。Pubmed→Nucleotide→Blast。就可以进入 **Blast** 页面。如下图所示。



然后点击上图的红框部分。 **Align two (or more) sequences using BLAST (bl2seq)**。就可以得到下图：



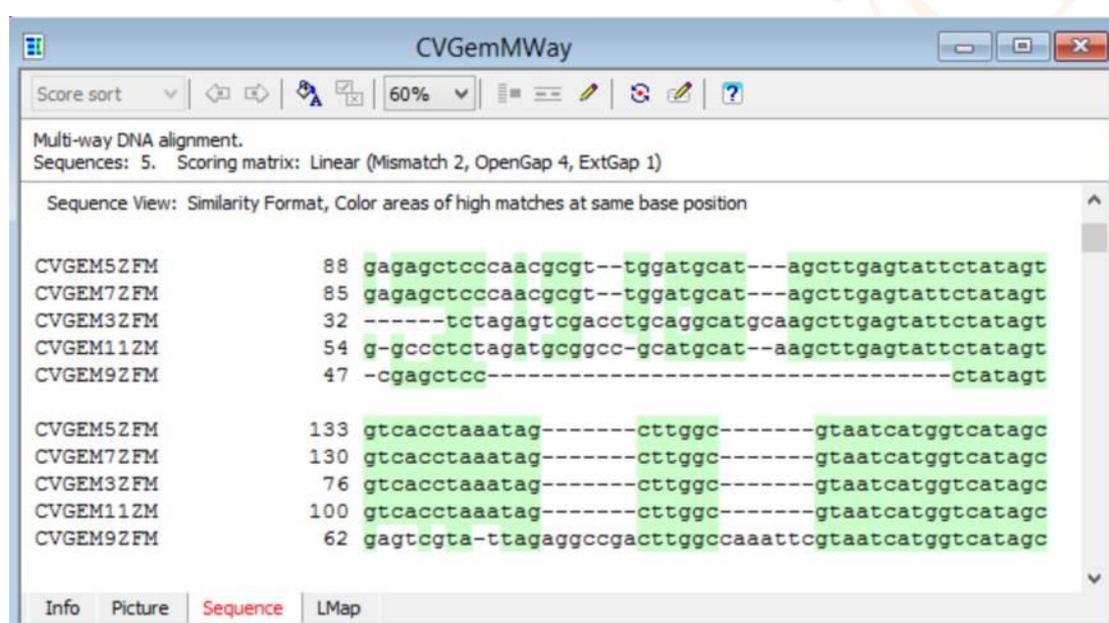
将要比较的序列分别复制粘贴到两个大框里，再点击 **Align**，即可看到结果。怎么样？简单

吧？其实，Blast 还有很多强大的功能。大家没事的时候可以 play around。时不时会有惊喜的。

PubMed 的网址是：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>

2. Clone Manager

Clone Manager 也是一款功能非常全面和强大的软件。用它进行序列对比非常方便。它可以自动进行正向和反向的比对。有碱基序列对比，作图对比等功能。非常直观。见下图。



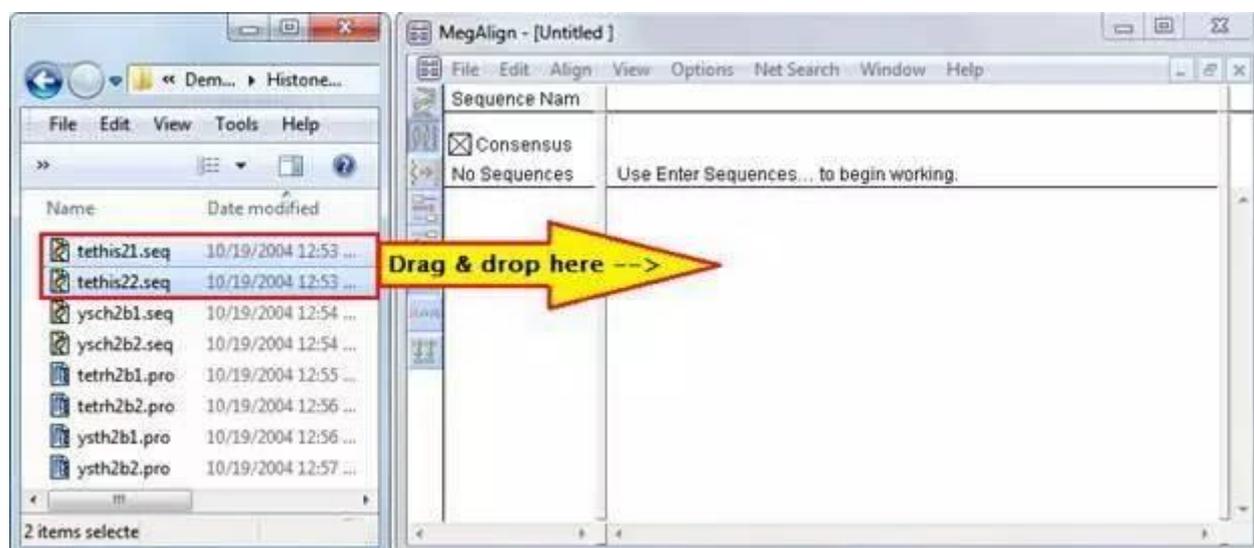
当然，这个软件更重要的功能在于自动绘图，分析酶切位点什么的。序列对比对于它真是 a piece of cake。

Clone Manager 比较贵。但是公司提供了试用版。下载网址是：http://www.scied.com/dl_cmp9d.htm

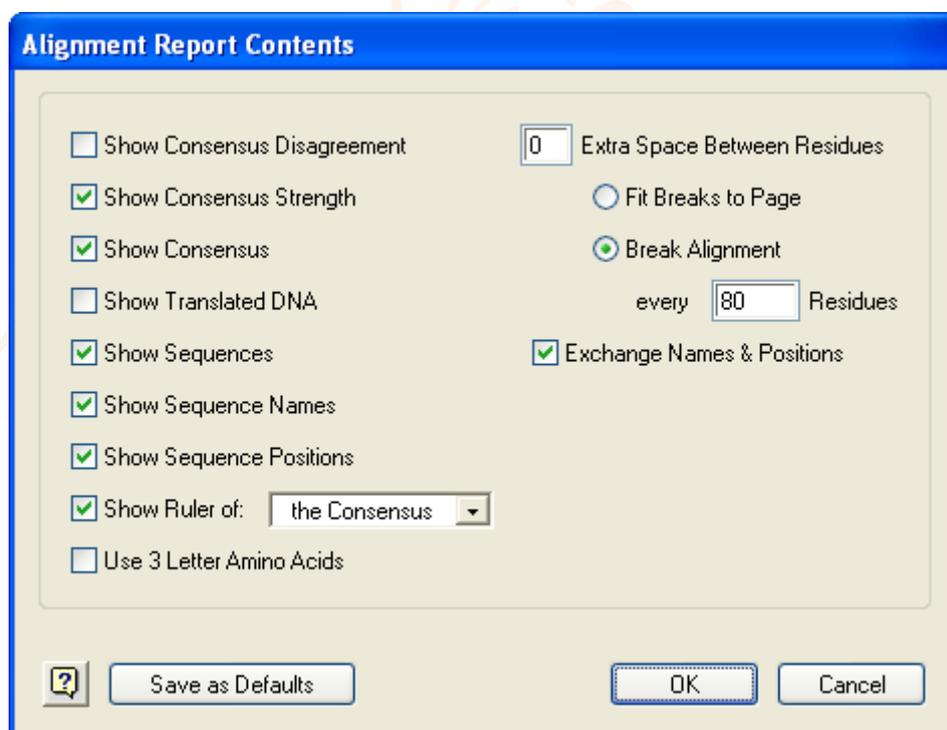
3. DNASTAR

DNASTAR 也是一款功能强大的软件。如果要做测序结果分析，可以用其中的 SeqMen 进行序列对比分析。SeqMen 的使用还是比较方便的，如下图所示，直接把要比对的序列拽过去就

OK了。

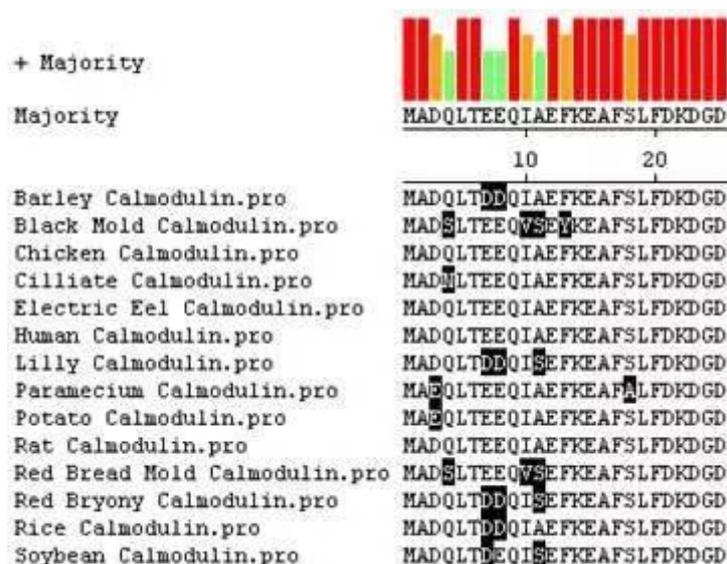


SeqMen 可以选择展示的方式，选择 View → Alignment Report，就会打开一个窗口，选择 Options → Alignment Report Contents，就可以修改展示的方式，选择 Show Consensus Strength，其他的可以用默认值。



然后点击 OK，就会出现一个序列对比窗口。在这个窗口里面，凡是不 match 的部分都会用

阴影表示出来。怎么样？直观吧？



综上所述，测序结果的分析可以采用以上这些软件。类似的软件其实很多，毛博只是选择了一些比较常用的和毛博自己用过的。这些软件的功能很多，不仅仅局限于测序结果的分析，大家可以多学习学习。还有一点，其实现在很多测序公司都会帮你分析好的。但是多学会一种技能总是好的。艺多不压身嘛。

技术 | 那些年踩过的 DNA 测序七大坑

作者：毛博

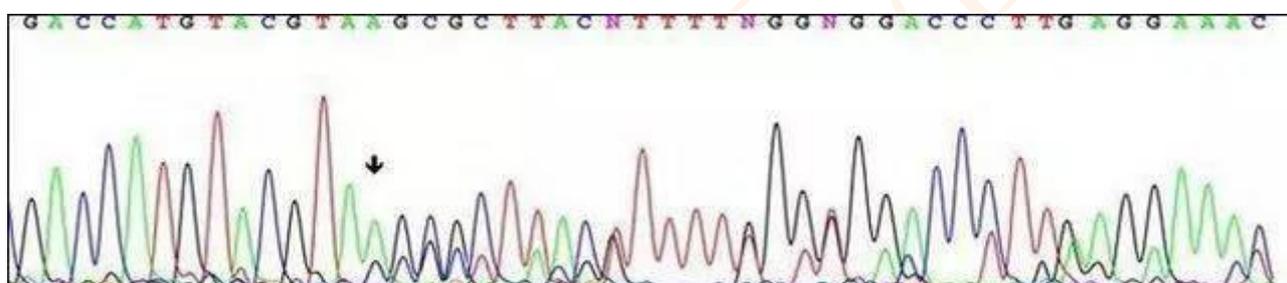
DNA 测序技术自从发明以来，作为一种重要的分子生物学手段，正在科研和临床上得到了越来越广泛的应用。毛博做测序不多，还是去米国以后才开始接触的。但是也踩过不少大坑。也有不少从坑里爬出来豁然开朗的时候。下面，毛博介绍一下自己亲自踩过的坑。也算给大家一个前车之鉴吧。

坑一：信号衰减/中断

测序信号衰减和中断，是测序过程中的常见问题，原因多种多样：模板中含有重复序列，模板中含有高级结构，模板中 GC 含量过高等，都会使得测序信号衰减和中断。另外，引物的质量不好，试剂失活了，都会造成这种问题。解决的方法：反其道而行之，采用反向引物来进行测序，然后通过序列拼接获得全长。有时候就象做拼图游戏。大家 have fun 吧。这里，毛博教大家一个小窍门：在这个过程中，可以适量地加入 DMSO，并且进行扩增。

坑二：重叠峰/乱峰

这个问题一般是由于序列前面有连续的碱基，或者是引物的碱基缺失了。如下图所示，模板中有单一位点的碱基缺失，碱基缺失导致测序结果移码。



现在有很多测序公司，号称可以帮助设计引物；号称引物是 PAGE 级别的。这里，毛博严重不推荐哈。最好还是自己动手，丰衣足食。解决办法：自己设计引物；自己合成引物；自己将引物进行 PAGE 纯化。反正就是掌握一个原则：自己动手，丰衣足食。

坑三：Ploy 结构

有的时候，我们会遇到 Poly 结构，就是 G/C rich，G/C Cluster，Poly A，Poly T 结构等。这种结构的测序容易出现移码现象，导致测序信号衰减和中断（如下图）。解决方法：还是反其道而行之。采用反向引物对模板进行测序，测到该 poly 结构处，进行拼接，不就可以获得序列全长嘛。

解决办法: 还是反其道而行之, 反向测序。有时能够顺利的通过重复序列区域, 但是有时候又不一定能够。全靠运气吧。如果能够的话, 通过多次的测序结果比对, 还是做拼图游戏吧, 拼接可以得到全序列结果。

技术 | 芯片遭遇 RNA-seq, 谁怕谁?

作者: 子非鱼

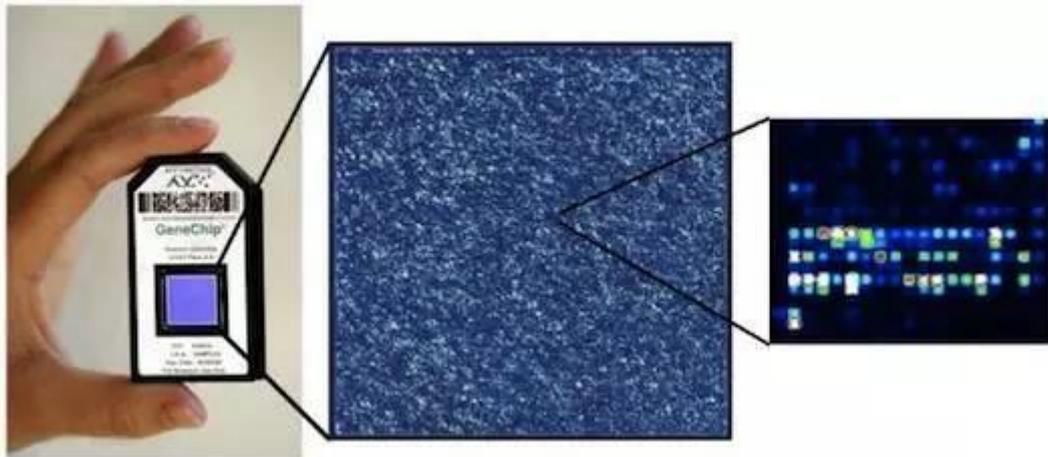
日本推理小说家东野圭吾的作品《白金数据》中描述了这样一个未来世界: 日本政府秘密建立名为“白金数据”的数据库。该库搜集了全国人民的 DNA 数据, 通过对犯罪分子留在现场的毛发、体液等证物进行比对, 警方可以高效、快速、准确锁定真凶。借助“白金数据”的帮助, 一个检举率 100%、冤案率 0%的理想法制社会构建完成。技术的发展可以改变人类的生活, 小说的情节虽然是虚构的, 但随着技术的不断发展和进步, 相信这样的未来世界终究会到来。

小说中所谓的 DNA 技术大概就是 DNA 芯片技术, 芯片技术是基因组表达分析的研究手段。在这一技术最辉煌的时期, 准备研究基因表达模式的人都会想到使用芯片。不过随着测序成本的直线下降, RNA 测序 (RNA-seq) 成为了越来越受欢迎的转录组分析方法。

那么 DNA 芯片技术和 RNA 测序有啥不一样?

DNA 芯片关键是“筛”!

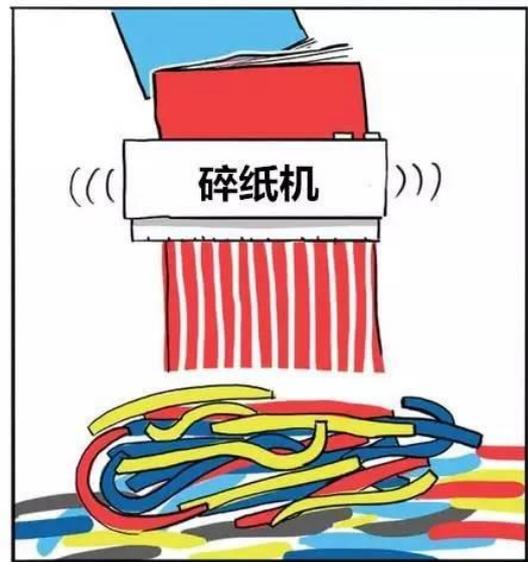
DNA 芯片是通过微加工技术, 将数以万计、乃至百万计的特定序列的 DNA 片段 (基因探针) 有规律地排列固定于 2cm^2 的硅片、玻片等支持物上, 构成一个二维的 DNA 探针阵列, 与电子计算机上的电子芯片十分相似所以被称为基因芯片。通俗地说, DNA 芯片就像一块三维的地图, 上面各种特异的探针就是不同的地方, 你想去哪里就按图索骥找到特定的位置。



基因芯片技术应用领域主要有基因表达谱分析、新基因发现、基因突变及多态性分析、基因组文库作图、疾病诊断和预测、药物筛选、基因测序等。美国总统克林顿在 1998 年 1 月的国情咨文中指出：“在未来的 12 年内，基因芯片将为我们一生的疾病预防指点迷津”。

RNA 测序关键是“测”！

RNA 测序（RNA-seq）即转录组测序技术，就是把 mRNA, smallRNA, and NONcoding RNA 等或者其中一些用高通量测序技术把它们的序列测出来。反映出它们的表达水平。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 和剪接变体，并提供等位基因特异的基因表达。



“生命杂志”的解读流程

如果将某一个物种的基因组比喻成该物种的“生命的读本 (book of life)”，那么转录组就可比作“生命杂志 (newsstand of life)”。RNA 测序技术：就是一霸道总裁把报刊亭里的所有杂志 (RNA) 全都买回去，然后把所有的杂志全都放进碎纸机里，使其成为一大堆碎纸条，然后由一大帮手下来整理碎纸条（现实生活中的计算机程序开发人员），将碎纸条还原成一本本的杂志。还有一群统计狂热分子也跑来凑热闹，他们组织了一场比赛，看看哪些人整理碎纸条的效率最高，准确率最高，能够又快又好地还原出杂志的本来面目（转录组基因序列）。这个整理、拼接碎纸条的工作就是“转录子重建”工作，而转录子重建工作的重点内容之一就是

是将 RNA 测序得到的片段信息与该 RNA 来源细胞的基因组对应起来。

RNA-seq——继往开来的领路人

Life is like a box of chocolates: you never know what you're gonna get. (生活就像一盒巧克力, 你永远也不知道下一个你会拿到什么。) 就像《阿甘正传》的经典台词所传达的那样, RNA 测序是继往开来的领路人, 因为在探索性研究和非模式生物研究中, RNA-seq 的转录组分析是无偏好的, 可以揭示新剪接点、小 RNA 以及芯片漏掉的新基因。它是一个理想的研发平台, 能够获得转录本序列并在此基础上发现突变和融合转录本。

就像“大家一起来找茬”这种小游戏, 找出两幅图的不同之处, 点错会扣分, 点对就得分, 芯片分析就是依赖于已知的基因组信息确定未知的基因组信息, 这也是该技术的最大局限。

RNA-seq——更加灵敏, 可减少漏网之鱼

研究指出, 在检测丰度较高的基因时, RNA-seq 和芯片的结果基本一致。但在检测表达水平低的基因时, RNA-seq 更加准确。为什么?

当基因低水平表达时, 芯片中结合探针的 cDNA 发出较弱的荧光, 难以压倒背景荧光。对于 RNA-seq 而言, 覆盖度越高能检测的转录本水平就越低, 没有绝对的下限。当然, RNA-seq 也没有绝对的检测上限。而芯片在检测表达量很高的基因时, 可能会出现饱和。

然并卵, 姜仍是老的辣!

尽管 RNA-seq 有那么多的优点, 大家对芯片仍是情有独钟。那是因为, 相比较于 RNA-seq, 芯片技术更加成熟, 尤其是样本量比较大的研究。芯片在临床研究中也很吃香, 因为它的数据处理又快又简单。芯片能提供高度一致的数据, 分析软件也相当成熟。通过分析成百上千的样本, 基因和 miRNA 的表达特征已经被赋予了临床上的诊断价值。

MitoGenetics 公司的 Kirk Mantione 就是钟情于芯片技术的典型例子。他说“我会一直使用芯片, 其结果更容易解读。”

Mantione 使用芯片对自己开发的药物进行评估, 在细胞系和动物中分析这些药物对基因表达的影响。芯片可以快速给出结果, 展示药物对特定基因的作用。不过 Mantione 也希望用 RNA-seq 研究那些还不成熟的生物模型, 或者寻找之前没有发现的转录本多态性。

对芯片仍是情有独钟有时候只是想要对新数据和旧数据进行比较, 因为所有的数据以同样的

方式获得，比较起来自然更为容易。

精明做法:强强联手,效果翻倍!

Affymetrix 公司建议大家先用芯片快速筛查大量样本，然后用这些结果指导 RNA-seq。此外，芯片也可以用来验证 RNA-seq 的数据。

了解高通量测序,一篇就够了!

作者: Dr. Zhang and Dr. Huang

说到近十年来发展最迅猛的生物技术，Dr.Zhang and Dr.Huang 首先想到了高通量测序,我们研究基因组学都离不开它。目前，高通量测序已经深入到生命科学的各个领域，不仅有力地推动了基础研究的发展，也在逐渐征服临床应用。



所谓的高通量测序技术，又名大规模平行测序，是将 DNA（或者 cDNA）随机片段化、加接头，制备测序文库，通过对文库中数以万计的克隆(colony)进行延伸反应，检测对应的信号，

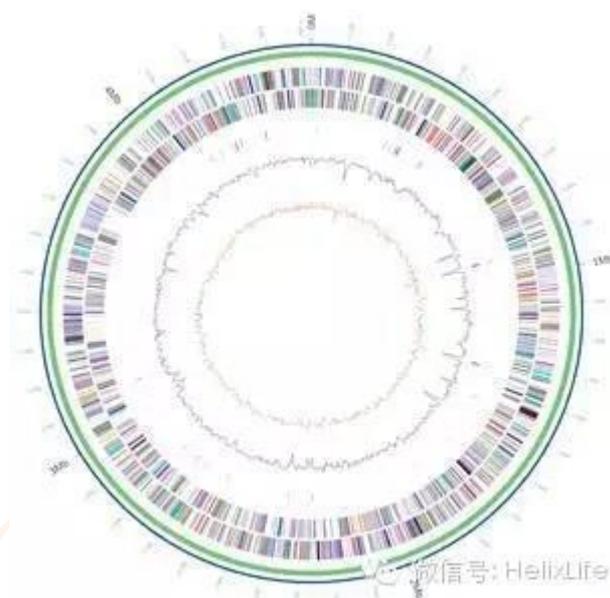
最终获取序列信息。与 Sanger 法为代表的传统测序法相比，高通量测序技术在处理大规模样品时具有显著的优势，又快（两天）又多（数百万克隆），成为目前组学研究的主要技术。

当前主要的测序技术平台，主要分为：

*solexa 测序技术（即大家耳熟能详的 illumina 测序平台）；

*454 测序技术（读长长，但是准确度较低，成本较高，即焦磷酸测序技术，少量市场占有）；

*solid 测序技术（双色编码技术，目前基本在市场上见不到了）。

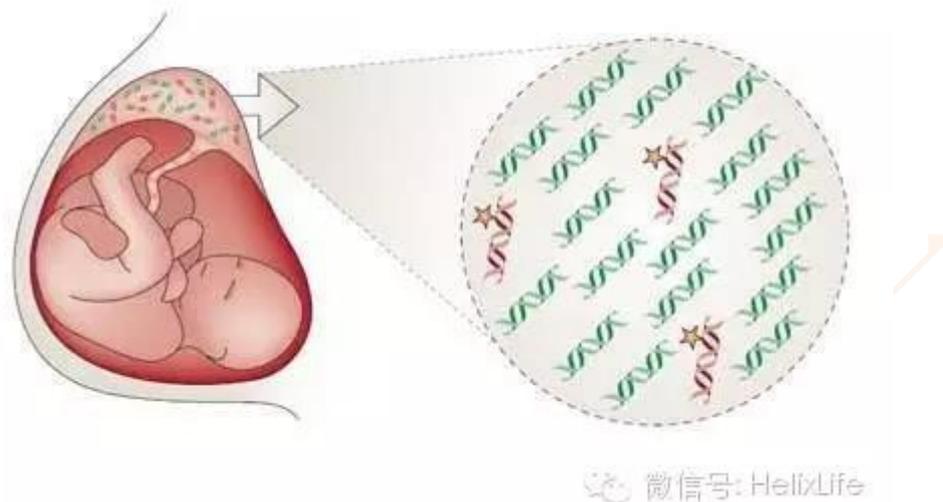


那么高通量测序技术可以帮助我们做到什么呢？

首先是基因组层面的应用。

对于疾病诊断领域，**全基因组重测序技术**是一种非常有力的手段。所谓的全基因组重测序，即对基因组序列已知物种的个体（比如人，小鼠等）进行基因组测序，并进行差异信息分析的方法。基于全基因组测序，可以快速的寻找到大量的遗传差异，从而实现遗传进化分析及重要性状候选基因的预测，找到大量的 **SNP**，**InDel**，**结构变异 (SVs)** 等变异信息，从而获取生物群体的遗传特征。临床上，常规的产前诊断技术是需要通过穿刺（绒毛穿刺、羊膜腔穿刺等）的方法取得胎儿的组织进行遗传学检测，这可能导致一定的流产风险。而在 1997 年，Lo 团队[1]发现了孕妇外周血中存在有胎儿的游离 DNA，而高通量测序技术可以针对短

序列 DNA 进行精准的测序。2010 年, Lo 团队借助测序技术完成了母血中胎儿的全部组基因组图谱的绘制[2], 证实了利用 cffDNA(cell free fetal DNA)进行胎儿基因检测是完全可行的。目前应用高通量测序技术的三体综合征产前基因诊断技术已经开展临床试点。



在动物学研究方面, Xia 等人[3]运用新一代测序技术对 29 种家蚕(*Bombyx mori*)和 11 种野蚕(*Bombyx mandarina*)进行了基因组重测序, 构建了一个单碱基分辨率的家蚕遗传变异图谱. 每个个体测序约 3X, 覆盖基因组序列的 99.88%, 鉴定出 1600 多万个 SNPs, InDels 和 SVs. 分析结果表明, 驯化家蚕由野生蚕分化而来, 且在驯养过程中, 人为选择优良品种, 性状相对单一。同时, 还发现了 354 个受到驯化和人工选择压力影响的蛋白编码基因, 主要参与调控蚕的丝蛋白合成, 能量代谢, 生殖特性和飞行能力。

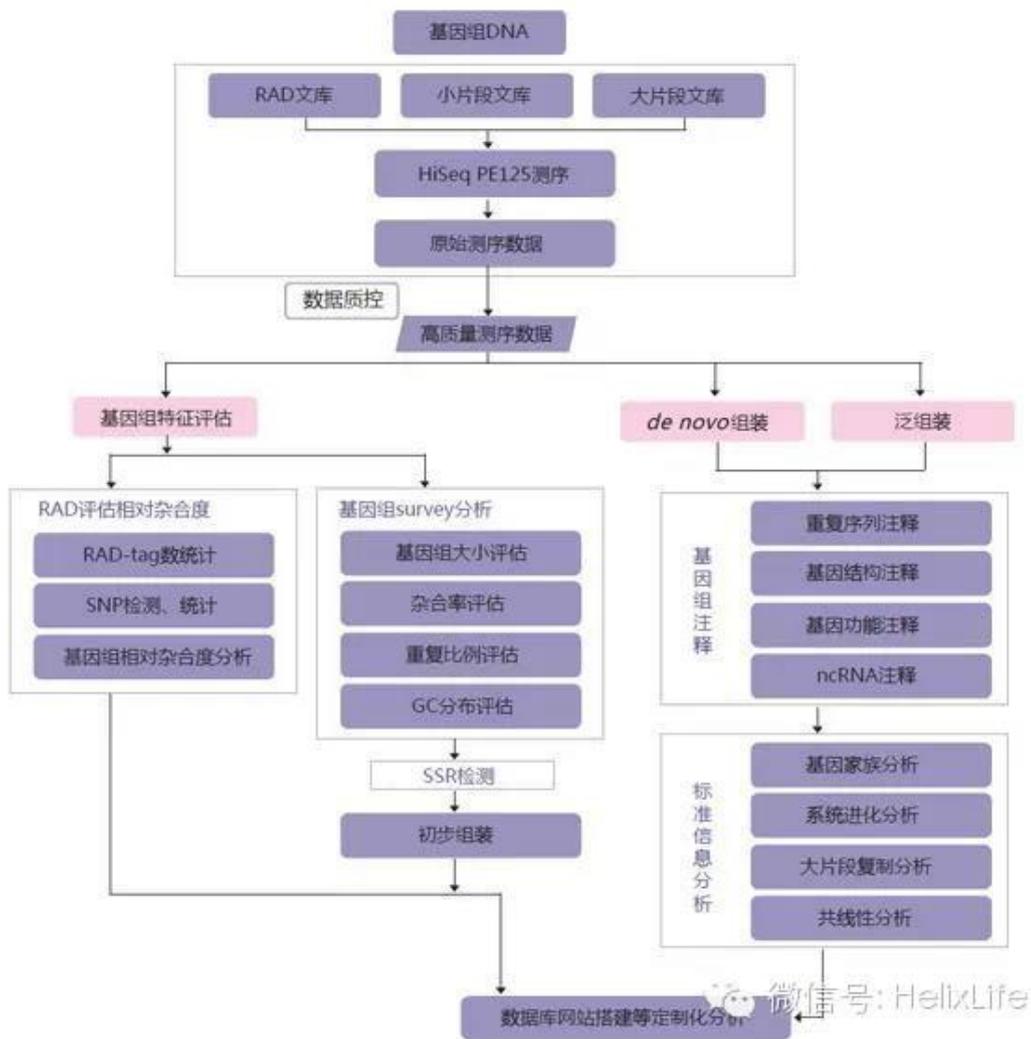


图 1. 动植物基因组分析流程（引用自诺禾致源）

一个人样品的全基因组测序，目前的价格在 **1.3 万人民币左右**。然而大量的基因组区域是不编码蛋白质的，甚至对于特定疾病或者表型来说，参与调控的关键基因是已知的，所以研究者更关心的是某一个特定区域的表达情况。这时候，外显子组和目标区域测序就非常合适了。所谓的外显子组(exome)是一个物种基因组中全部外显子区域的总和，通过探针法捕获基因组中全部外显子序列，然后使用高通量测序技术对外显子组测序，可以直接的发现与蛋白质功能变异相关的遗传突变。相对于全基因组测序，外显子测序更加的经济，只需 **9000 人民币**。而对于感兴趣的特定基因组区域，可以进行目标区域的深度测序。这就更便宜了，**200 个扩增子（产物长度<300bp）**，如果来自同一个模板，则只需 **400 块**！

那么，除了以上介绍的两种主流的基因组测序方法之外，还衍生出了其他的分析方法，比如**简化基因组测序**，可以对重要的和复杂性高的 QTLs（quantitative trait loci,数量性状位点）精

细定位。简化代表文库测序，对群体中不同基因型的个体采用相同的内切酶酶切，回收相同大小范围的酶切片段并测序，可以降低基因组分析的复杂性。**酶切位点相关 DNA 测序 (RAD-seq)** 等一些新兴的测序分析技术。



在基因组分析上更进一步，我们会对基因表达，可变剪切，基因结构变化等内容感兴趣。所以我们需要使用到转录组测序，即 **RNA-seq**。即从总的 RNA 中富集出单链 mRNA，再反转录成双链 cDNA，随后进行高通量测序，并与基因组 DNA 序列进行比对。比如，Gruber 等[4]对 14 例儿童非唐氏综合征急性巨核细胞白血病患者进行转录组测序，发现了一个隐匿的 16 号染色体倒位， $inv(16)(P13.3q24.3)$ ，形成 CBFA2T3 - GLIS2 融合蛋白，CBFA2T3-GLIS2 在果蝇和鼠的造血细胞里的表达能够诱导成骨蛋白信号系统的激活，从而促进造血祖细胞的自我更新，研究结果表明 CBFA2T3-GLIS2 融合蛋白的表达可能促进白血病的发生。Zhang 等人[4]以水稻 9311 的愈伤组织、根尖、茎尖、叶、稻花/稻穗为材料，进行转录组测序，展示了栽培水稻不同器官的转录组图谱。采用高通量双末端测序，检测到了 7232 个新转录本，这些转录本表达丰度低，且具有组织特异性。共发现了 23800 个可变剪接，说明转录融合事件比我们原来预想的要更加的常见。

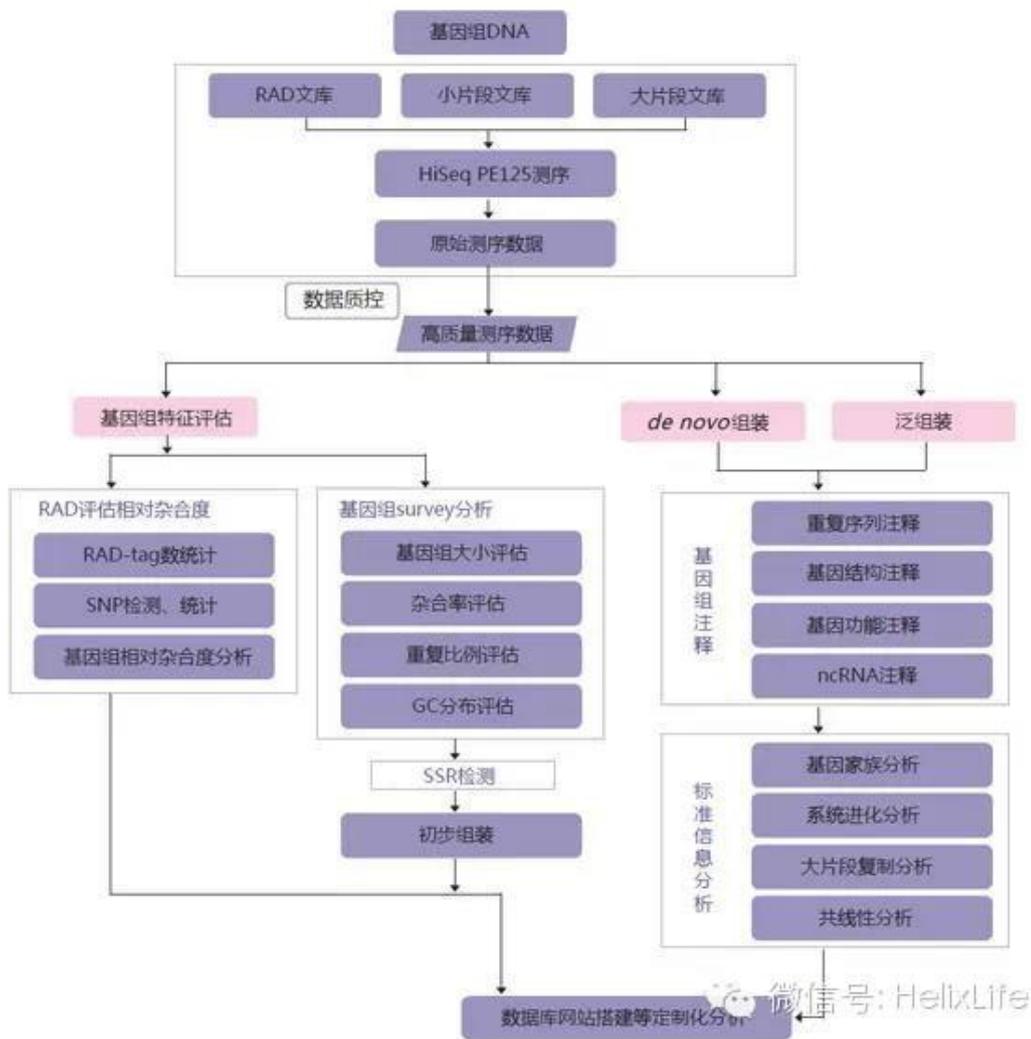


图 2 RNA-seq 分析标准流程（引用自诺禾致源）

通过 RNA-seq，还可以发现新的转录物。**长链非编码 RNA(lncRNA)**是当前研究的热点，其功能广泛，涉及到个体发育、干细胞分化、细胞代谢、肿瘤发生发展等众多方面。最早的大规模发掘 lncRNA 的工作是通过芯片完成的，但是后来人们发现，**高通量测序特别适合用于发掘新的 lncRNA**。近年来，在人、小鼠、大鼠、果蝇、斑马鱼、猪等物种中，通过 RNA-seq，发现了一大批的 lncRNA。进一步研究证实有的 lncRNA 具有调控各种生物过程的能力。这方面的工作比较简单，也形成了一定的套路，对于广大的生命科学研究人员来说是较容易出成果的一个领域。

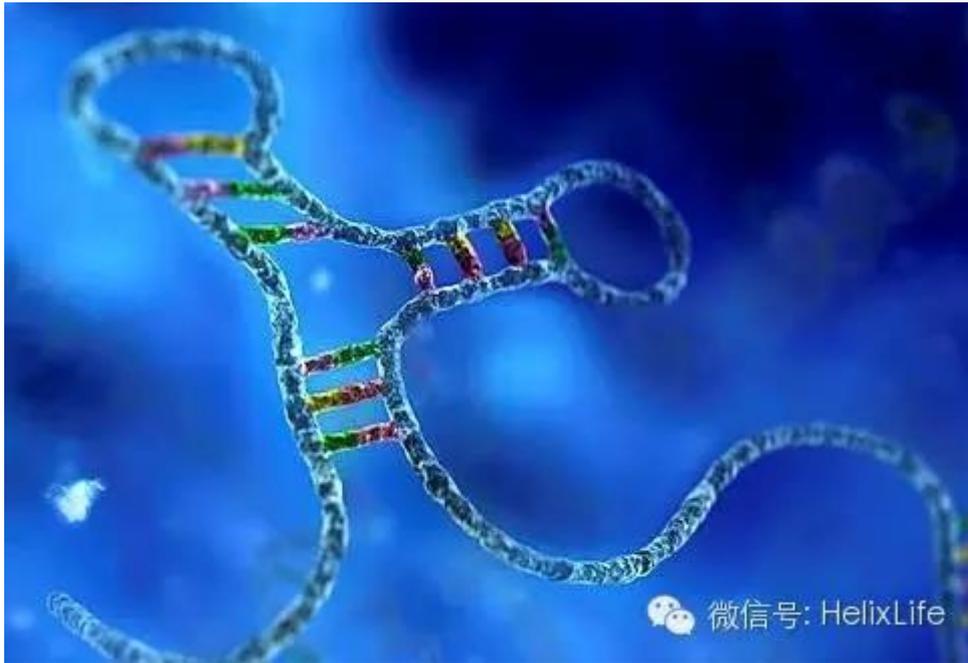
除 lncRNA 外，**环状 RNA (circular RNAs ,circRNAs)** 研究也是 RNA-seq 的一个重要应用方向。circRNAs 是一类特殊的非编码 RNA 分子，也是 RNA 领域最新的研究热点。与传统的线性 RNA (linear RNA，含 5'和 3'末端) 不同，circRNA 分子呈封闭环状结构，不受 RNA 外切酶影响，

表达更稳定，不易降解。有研究表明 circRNA 可能通过 miRNA-sponge 的方式来调控 miRNA 对靶基因的抑制作用，在某些疾病中具有重要意义。通过 RNA-seq，可以找到融合(fusion)的序列接口，从而发掘新的 circRNA。这项技术已经得到了许多重要的应用。



同时，我们也常常用到 DGE (digital gene expression) 技术。其基本原理是对 cDNA 进行双酶切，从而每一条 mRNA 都会得到一个对应的标签，随后进行高通量测序，比较不同样本之间各种标签的数目，从而找出差异化的标签，即差异化的 mRNA。

microRNA 测序也是目前常用的测序项目。microRNA 是一类内源小分子 RNA，通常在转录后水平，负调节基因表达来发挥作用，控制了多种生物和代谢途径中众多基因的表达，在生物生长和发育中扮演重要角色，目前 microRNA 测序技术普遍用于动植物表观遗传学研究。



除以上介绍的测序技术之外，常用的测序技术还有：

MeDIP-Seq 技术 (methylation DNA immunoprecipitation sequencing, 甲基化 DNA 免疫共沉淀)，是研究甲基化的一种有效的手段。由于在哺乳动物中甲基化一般发生在 CpG 的胞嘧啶 5 位碳原子上，所以可通过特异性结合甲基化 DNA 的蛋白 MBD2b 或 5'-甲基胞嘧啶抗体富集高甲基化的 DNA 片段，并结合第二代高通量测序，对富集到的 DNA 片段进行测序，从而检测全基因组范围内的甲基化位点。

ChIP-seq, 染色质免疫共沉淀技术，研究体内蛋白与 DNA 相互作用的一种方法先通过 ChIP 特异性地富集与目的蛋白相结合的 DNA 片段，而后对所得 DNA 片段进行高通量测序。

总体来说，高通量测序技术的诞生可以说是基因组学研究领域一个具有里程碑意义的事件。该技术使得核酸测序的单碱基成本与第一代测序技术相比急剧下降。但是同时由于数据量的大幅度上升，全基因组测序临床应用的瓶颈在于信息的分析和解读能力不足。如何更好的分析数据，挖掘数据，验证结果，随之而来的生物信息学解决方案可以为基因组学研究带来更大的机遇。

参考文献：

[1] Lo Y M, Corbetta N, Chamberlain P F, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350(9076):485-487

[2] Lo Y M, Chan K C, Sun H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus [J]. Sci Transl Med, 2010,2(61):61r-91r

[3] Xia Q, Guo Y, Zhang Z, et al. Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (Bombyx). Science, 2009, 326: 433 - 436

[4] Gruber TA, Larson Gedman A, Zhang J, et al. An Inv(16)(p13,3q24.3)-encoded CBFA2T3-GLIS2 fusion protein defines an aggressive subtype of podiatric acute megakaryoblastic leukemia [J]. Cancer Cell, 2012, 22(5):683-697

2 RNA 技术

2.1 RNAi 与 siRNA 技术

基因敲除： 我的老鼠只有我懂

作者：遥遥

如果是在做动物实验，而且是基因敲除鼠的实验，那么就会做大批量的小鼠基因型鉴定试验，来确定自己小鼠的基因型，然而，再做实验的过程中往往会出现一些意想不到的结果，我作为一只实验狗在这里为大家提一点点小建议。

提取 DNA

1、组织提取 DNA 剪下老鼠 0.5-1.2cm 尾巴或者耳朵或者称取 20mg 组织样本，将样本剪碎放在 1.5ml 的 EP 管中。

2、在每个 EP 管中加入 275 微升的裂解液（我们实验室使用的是 promega 的试剂盒）将加入裂解液的组织放在 55 摄氏度的水浴箱中过夜（16—18h）裂解完全的标志是组织完全溶解。

3、第二天振荡每一个 EP 管，混匀后再离心，转速 13000rpm 时间是 3 分钟，取上清分离毛发，将取的上清加到柱型管中（有滤网的小柱型管，柱型管套装在 1.5 的 EP 管中）。

4、在每个柱型管中加入 250 微升的 Wizard SV lysis Buffer，此裂解液需要提前水浴 30min，55 摄氏度。

5、离心 3min 转速 13000rpm ，倒掉滤液。

6、在每个管中加入 650 微升 wash solution 离心 1min 转速 13000rpm，这一步骤重复四遍，每一次都弃去管底的废液。

7、4 次洗完之后，什么都不加再离心一次，1min 转速 13000rpm。

8、离心之后取出，放入到新的 EP 管中，每一个 EP 管中加入 50 微升 Nuclease-free-water（无核酸酶水）需要提前水浴 30min 中 55 摄氏度。加的过程中要充分覆盖管底，静置 2min，离心 2min，保留 EP 管中的液体，此步骤重复两次。（如果要搁置需要保存在-20 冰箱中）。

自此 DNA 已经提取完成。

显影

1、将获得的液体加入 PCR 混合液中，凝胶电泳，鉴定基因型。

PCR 混合液的配制方法 ddH₂O 9.5 微升，Taq 12.5 微升，上游引物 0.5 微升，下游引物 0.5 微升。每一个 EP 管中的总量是 24 微升，提取的 DNA 只加 1 微升。

2、PCR 扩增：将样品放入 PCR 仪扩增。

3、制胶——1%的胶。

小胶：琼脂糖 0.25g+25mlTEB1%

中胶：琼脂糖 0.5g+50mlTEB1%

大胶：琼脂糖 1g+100mlTEB1%

4、将琼脂糖加入 TEB 溶液后微波炉加热 3min，冷却后加入核酸染料 EBC，倒入制胶器制胶，30min 后取出胶放入电泳槽中，黑线朝向正极。

5、加样，加 Maker。

6、电泳。

7、显影。

个人经验

1、提取 DNA 的第一步中建议用小鼠的尾巴，优选小鼠尾巴，减轻动物疼痛且便于操作，在标记过程中每一个 EP 管要标号无论盖子顶部还是管壁，都要做标记，因为要在水浴箱中进行裂解。

2、在配裂解液的过程中，一般要多配出 2 份的量，因为在加样的过程中会有液体遗失，以防万一试剂缺如多配制 2 份。

3、在制备 pcr 混合液的时候无论是上游还是下游引物总量都不能过多，否则显影的时候会出现引物二聚体，出现重影。

4、加入核酸染料的量是 3 到 5 微升。

5、加入的 maker 和样品的量建议是 5 微升。

6、电泳的电压建议 100v，时间是 45min。

7、使用离心机的时候要注意用常温的离心机，非 4 度，因为无论是裂解液还是无核酸酶水都是经过水浴箱 55 度温浴过的，所以，用常温的离心机即可。

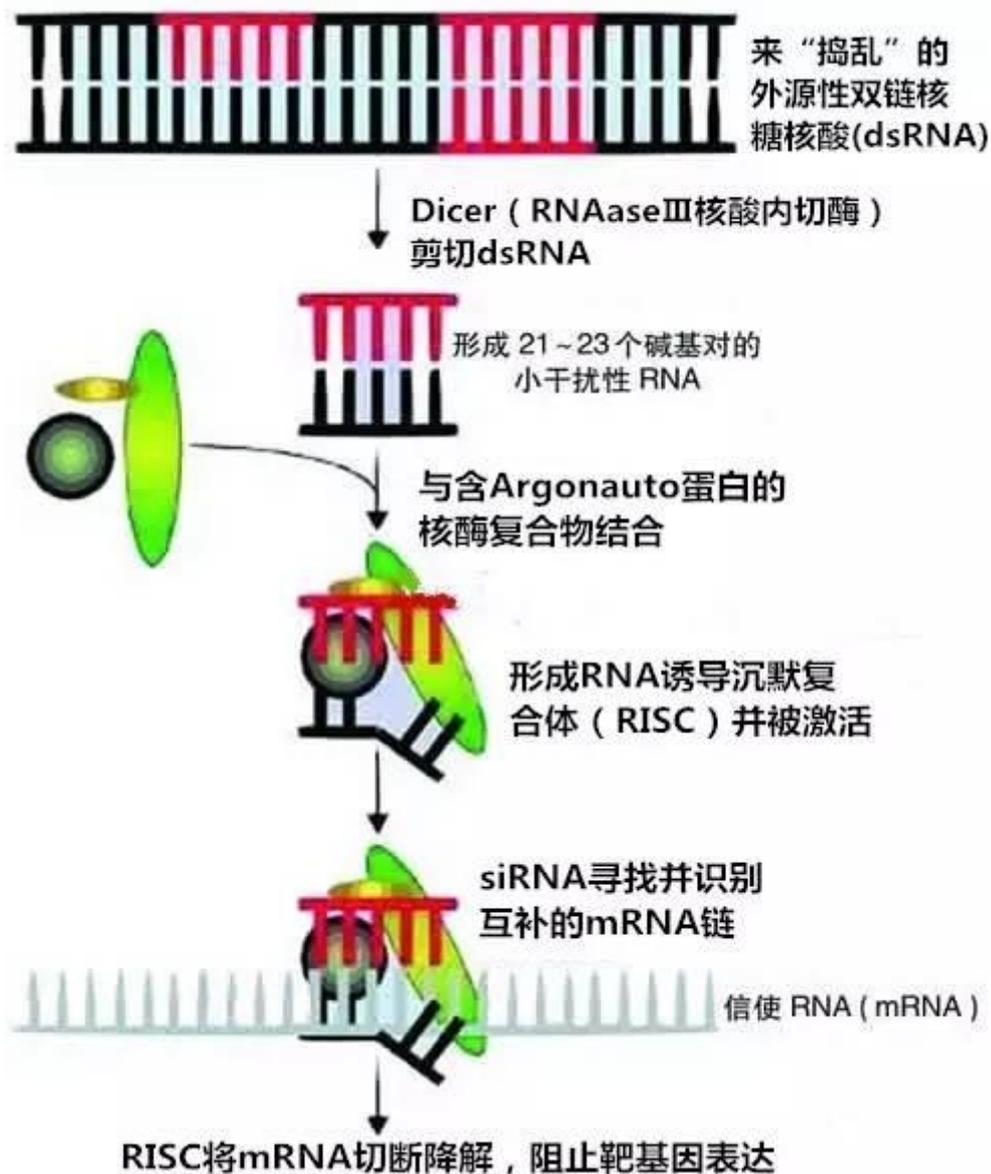
技术 | 新型 RNAi 载体诞生，让基因沉默 来得更猛烈一点

作者：子非鱼

近日，中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所国家蛋白质科学中心吴立刚研究组在 *Nature Communications* 上发表文章，公布一项新的研究成果：发明了一种比传统 shRNA（short hairpin RNA）更为安全的高效 RNA 干扰（RNAi）载体—saiRNA。

RNAi 技术的前世今生

造物真的很神奇。生物体有很多机会被来自病毒、细菌等外源性基因随机整合到宿主细胞基因组内。但宿主会说，“你有张良计我有过墙梯”，这个过墙梯就是 RNAi：宿主细胞会对这些外源性基因 dsRNA 随即产生反应，被核酸内切酶 Dicer 切割成小片段 RNA（即 siRNA）。siRNA 再与体内一些酶结合形成 RNA 诱导的沉默复合物（RNA-induced silencing complex, RISC）。RISC 与外源性基因表达的 mRNA 进行特异性结合并将其切割，使得 mRNA 降解。然后 siRNA 还会“乘胜追击”，可作为引物与靶 RNA 结合并在 RNA 聚合酶作用下合成更多新的 dsRNA，新合成的 dsRNA 再由 Dicer 切割产生大量的次级 siRNA，从而使 RNAi 的作用进一步放大，最终将靶 mRNA 完全降解。



(RNAi 的作用机制)

在 RNAi 感染过程中,产生 dsRNA 的一个有效方法就是在体内表达一个短发夹 RNA 分子,这种 shRNA 包含两个短反向重复序列(其中一个与目的基因互补),中间由一个 loop 序列分隔,组成发夹结构。在体内 shRNA 可以被加工 siRNA。

传统 shRNA 脱靶作用大且抑制 miRNA

众所周知,利用生物体的 RNAi 现象发展出来的 RNAi 技术是目前最“喜闻乐见”的基因沉默

技术。

在科研中制备 siRNA 的方法主要有化学合成法和转录法。其中，转录法，通俗点说就是“借腹生子”。就是通过 DNA 载体，利用细胞内源的 RNA 聚合酶Ⅲ（RNA PolⅢ），如 U6、H1 等的启动子驱动转录表达 shRNA，转录产生的发夹状 shRNA 可以被细胞内源的 Dicer 蛋白识别并加工成 siRNA，然后与 Ago 蛋白结合发挥作用。将这些 shRNA 的表达框用质粒或者腺病毒等包装一下转入宿主体内，就可以实现在动物整体或特定组织中沉默靶基因。

虽然这项技术可以实现在动物整体或特定组织中沉默靶基因，但是不可避免的是在这个过程中 siRNA 会“乱来”，比如，偶尔会饥不择食，慌不择路地与非特异的 RNA 序列结合，把人家该正常表达的“无辜”基因沉默掉，这就是所谓的脱靶作用（off-target）。

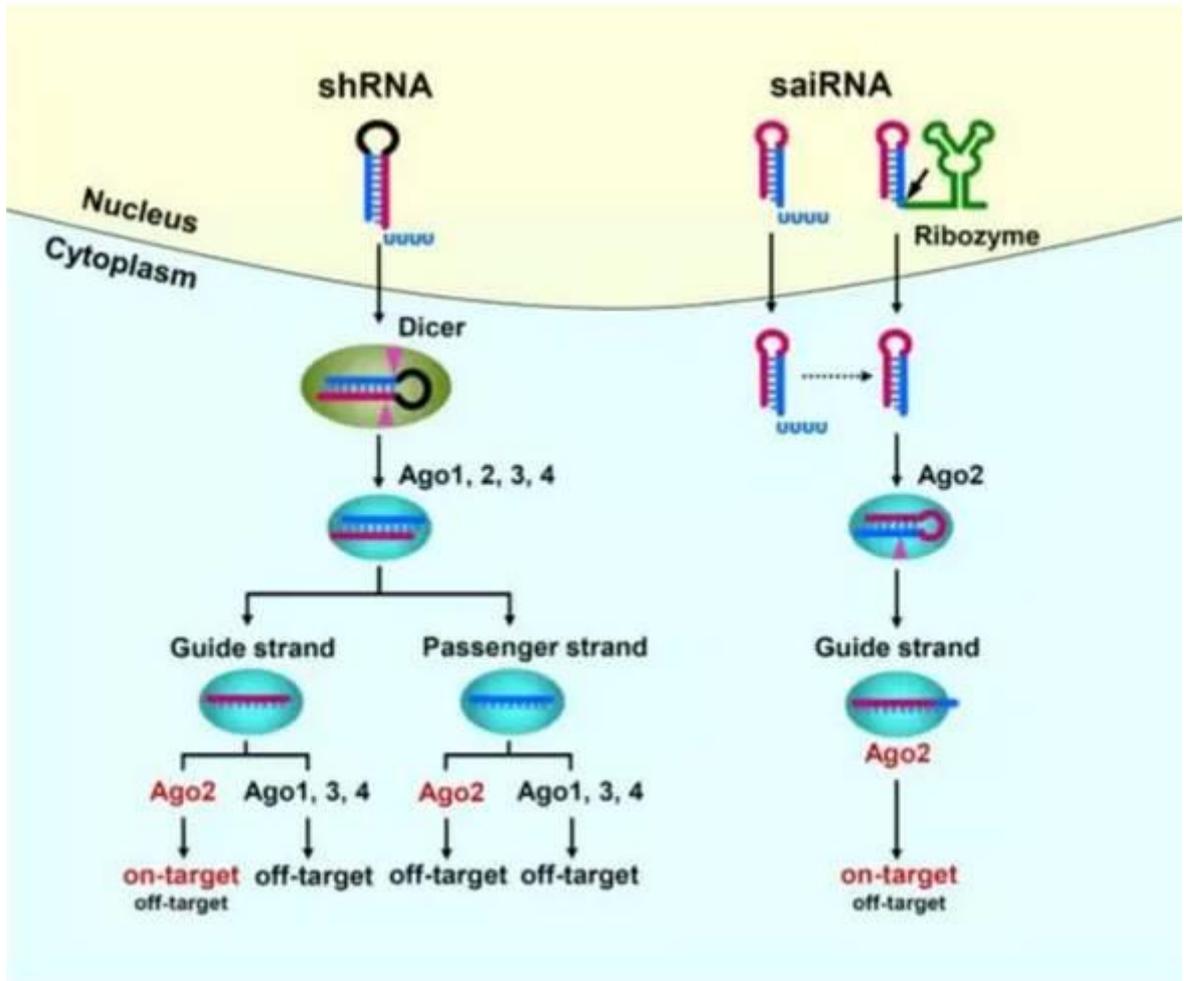
作为 siRNA 的前身 shRNA 也会瞎捣弄，就是对细胞内源 miRNA 的竞争抑制。由于 shRNA 的加工需要细胞内的 Dicer、Exportin-5、Ago 等蛋白质因子协助，而这些万人迷般的蛋白质因子也是细胞内源 miRNA 加工成熟所必须的。由于 miRNA 是细胞功能的重要调控分子，过表达的 shRNA 与内源 miRNA 竞争相同的加工机器，必然对内源 miRNA 的表达和功能造成抑制作用。shRNA 瞎捣弄的后果可以很严重，比如在小鼠肝脏中长期高表达 shRNA 会造成严重的肝脏损伤并引发肝癌导致动物死亡。

因此，设计一种低毒副作用的 RNAi 载体进行高效沉默靶基因很重要。

saiRNA 的优越性：高效率、低脱靶

而吴立刚研究组对具有不同茎环结构的 siRNA 前体的加工和功能进行了深入研究，并在此基础上发明了一种比传统 shRNA 效率更高，脱靶作用更少的新型 RNAi 载体——saiRNA（single-strandedAgo2-processed interfering RNA）。

在 RNAi 发挥基因沉默功能的过程中，RISC 复合物是核心成分，主要由外源提供的 siRNA 与细胞内的 Ago 家族蛋白质组装形成。哺乳动物中其蛋白家族有四成员：Ago1、2、3、4，但只有 Ago2 是 RNAi 的“真爱”，具有 RNAi 活性（切割完全互补配对 RNA 的核酸内切酶活性），而 Ago1、3、4 没有 RNAi 活性却会引起较强的脱靶作用。传统 shRNA 产生的 siRNA“很博爱”，能与所有 Ago 蛋白结合不同，但吴立刚研究组发明的 saiRNA 只有与 Ago2 结合后才能被加工产生成熟的 siRNA，因此有效避免了与 Ago1、3、4 介导的脱靶作用，从而显著增强了其对靶基因的沉默效率。



(shRNA 和 saiRNA 加工及作用机制图)

saiRNA 的“专一”还体现在：与 Ago2 结合后加工产生成熟的 siRNA，其特殊的加工方式只产生一条导向链 (guide strand，具有基因沉默功能的 siRNA 链)，不会产生 passenger strand (与 guide strand 互补配对的没有基因沉默功能的 siRNA 链)，因此也就完全避免了由 passenger strand 与 Ago 蛋白结合后产生的脱靶作用。

saiRNA 的优势还在于对细胞内源 miRNA 的影响小。这个逻辑有点绕，就是，不论是化学合成的 saiRNA，还是基于 RNA 聚合酶 III 的 DNA 表达载体在细胞内转录生成的 saiRNA，因为对 Ago2 的专一，其被加工后产生的 siRNA 的单位浓度分子对靶基因的抑制效率都高于传统的 shRNA。因此，在同样的沉默效率下，saiRNA 产生的成熟 siRNA 在细胞内的积累量要远低于 shRNA，避免了占用大量 Ago 蛋白，并且其加工不需要 Dicer 等 miRNA 加工所必须的“万人迷”蛋白质因子，因此不会跟细胞内源 miRNA 争抢，更不会对内源 miRNA 的表达和功能造成抑制作用。

所以，*saRNA* 作为一种新型的 RNAi 载体，具有高效和低脱靶的特点，通过对 *saRNA* 设计的继续优化，以及动物整体的基因沉默实验，将为科学研究和基因治疗应用提供更为安全高效的工具。

快速设计 shRNA，方法不止一个

作者：翠花

在研究基因功能中，RNAi 由于可以特异地使基因沉默或表达量降低而成为生物实验的强有力工具。其中 shRNA 慢病毒载体应用颇广，今天小编告诉大家 2 种方法可以快速设计构建到慢病毒载体中的 shRNA。

1.Sigma 网站

Sigma 公司做了一个针对人和小鼠的 shRNA 库，而且部分基因的 shRNA 序列经过验证，因此直接使用 Sigma 公司已验证过的 RNAi 序列最为方便。

首先打开网址：<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/sirna/mission-predesigned-sirna.html>，以 **Flil1** 为例，直接输入基因名，点击 search，出现以下界面：



Search Results: 4

 **FLI1**
Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor

Synonyms: EWSR2 SIC-1

Species: Human FLI1 (2313), Mouse Fli1 (14247), Rat Fli1 (315532), chicken FLI1 (419723), dog FLI1 (489286), ...More

Summary: This gene encodes a transcription factor containing an ETS DNA-binding domain. The gene can undergo a...More

Products: Antibodies, shRNA Panels, esiRNA, miRNA Mimics, Zinc Finger Nuclease, **shRNA**, Green Primers, Custom CRISPR Plasmid

在 Products 中找到并点击 shRNA 选项，然后出现这个界面：

点击“MISSION shRNA Lentiviral Transduction Particles”这一行的 **PRICING**，这时会弹出界面展示针对目的基因的 shRNA：

当出现 **VALIDATED** 时，恭喜你，这个基因有被 sigma 验证过，下拉可以找到验证过的 shRNA，用来构建慢病毒，简单有效，敲减效率基本上是有保证的。如果没有验证过的 shRNA，则根据需要多选择几条 shRNA 也是一样能筛选到有效的靶点。提示：小编倾向选择 CDS 区的 shRNA，3UTR 基本不选，而且选择的每一条 shRNA 都会在 NCBI 上做 BLAST，确保靶点是特异性的。Blast 比对后最终确认选择下面 2 条 FLI1 基因的 shRNA：

TRCN0000005325	0.2 ml	10 ⁶ TU	pLKO.1	350.00	140.00
Product Details	Region:CDS	Mean KnockDown Level: 0.75	Cell Line: A3		
TRC Version: 1	Clone ID:NM_002017.2-1315s1c1				
Sequence:CCGGCCCTTCTGACATCTCCTACATCTCGAGATGTAGGAGATGTCAGAAGGGTTTTT					
Availability: Produced on-demand (St. Louis, USA), standard format typically within 4 weeks, custom formats typically 6-8 w					
TRCN0000005323	0.2 ml	10 ⁶ TU	pLKO.1	350.00	140.00
Product Details	Region:CDS	Mean KnockDown Level: 0.56	Cell Line: MCH58		
TRC Version: 1	Clone ID:NM_002017.2-467s1c1				
Sequence:CCGGCCCATGAACACAGCTATCTCGAGATAGCTGTTGTAGTTCATGGGTTTTT					
Availability: Produced on-demand (St. Louis, USA), standard format typically within 4 weeks, custom formats typically 6-8 w					

需要特别提醒，如果要构建到慢病毒载体上，合成出去的 shRNA 引物会根据载体有些不一样，sigma 用的是 pLKO.1 载体，小编常用 SBI 的 pGreenPuro(CMV) 载体，两端的酶切位点是 BamHI/EcoRI，设计出去的引物最终是这样的（不同 shRNA 替换中间红色部分）：

Sense: **GATCC**CCCTTCTGACATCTCCTACATCTCGAGATGTAGGAGATGTCAGAAGGGTTTTT**G**

Anti-sense: **AATTC**AAAAA**CCCTTCTGACATCTCCTACATCTCGAGATGTAGGAGATGTCAGAAGGGG**

2.Life Technologies 网站

Life Technologies 公司有个非常实用的在线 shRNA 设计软件，操作非常方便，而且设计出来的 shRNA 不再需要到 NCBI 上 Blast，直接可以用的。

首先打开网站：<http://rnaidesigner.lifetechnologies.com/rnaiexpress/>，在 Target Design Options 处选中 shRNA，以 Fli1 为例，输入 **Accession number** 或 **Nucleotide sequence**，其他条件不变：

BLOCK-iT™ RNAi Designer

HELP

The easiest way to design effective RNAi molecules for great results

See also:

[BLOCK-iT™ RNAi Express](#): Simplified online ordering of pre-designed and validated Stealth Select RNAi™ siRNA.

[Synthetics for in vivo RNAi](#)

[Plate Select™](#): Order made-on-demand RNAi in customizable plate format at 1nmole scale!

Target Design Options: [Stealth RNAi™ siRNA](#) [siRNA](#) [miR RNAi](#) [shRNA](#) [siRNA to Stealth RNAi™ siRNA](#) [siRNA to shRNA](#)

Step 1: Enter an accession number or provide a nucleotide sequence

Accession number:

NM_002017

OR

Nucleotide sequence: Enter only A, C, G, T, and U. See the online Help for additional information

微信号: HelixLife

下拉到底点击 **RNAi Design**，然后出现推荐的 **10 条靶点序列**：

Recommended shRNA

Gene Name: FLI1 Accession: [NM_002017](#) GI: 401871074
Organism: Homo sapiens Length: 3995 ORF Region: 344-1702
Definition: Homo sapiens FLI-1 proto-oncogene, ETS transcription factor (FLI1), transcript variant 1, mRNA.
shRNA orientation: Sense-loop-Antisense
Sequence: NM_002017

Design shRNA Oligos

View Blast Results

Sort By: Start

10 shRNA Sequences (Up to 10 top scoring target sequences are reported, sorted by the Start position and ranked as ★★★★★ to ★★☆☆☆ to indicate knockdown probability). Select the sequence to order and click "Design shRNA Oligos"

Select	No.	Start	Target sequence(DNA)	Region	GC%	Rank
<input type="checkbox"/>	1	546	GGGAGTATGACCACATGAATG	ORF	47.62	★★★★★
<input type="checkbox"/>	2	547	GGAGTATGACCACATGAATGG	ORF	47.62	★★★★★
<input type="checkbox"/>	3	586	GGACTGCAGCGTTAGCAAATG	ORF	52.39	★★★★★
<input checked="" type="checkbox"/>	4	594	GCGTTAGCAAATGCAGCAAGC	ORF	52.39	★★★★★
<input type="checkbox"/>	5	776	GCCATAAAGGAGTACAGCTTG	ORF	47.62	★★★★★
<input checked="" type="checkbox"/>	6	823	GAACATGGATGGCAAGGAAGT	ORF	47.62	★★★★★
<input checked="" type="checkbox"/>	7	901	GCTGTTGCACACCTCAGTTA	ORF	47.62	★★★★★
<input checked="" type="checkbox"/>	8	1080	GGCCACAAACGATCAGTAAGA	ORF	47.62	★★★★★
<input checked="" type="checkbox"/>	9	1354	GGCCCTCCGTTATTACTATGA	ORF	47.62	★★★★★
<input type="checkbox"/>	10	1493	GACATCTCTACATGCCTTCC	ORF	52.39	★★★★★

Design shRNA Oligos

微信号: HelixLife

根据 **Rank** 评星，选择其中需要的（**翠花**一般选择 **4 条**，不同位置各一条），点击 Design shRNA Oligos:

Designing shRNA Oligos

Select one of the default loop sequences or specify a custom loop sequence for each target sequence to generate shRNA oligos for cloning into Invitrogen's [BLOCK-IT™ Inducible H1 RNA Entry Vector \(pENTR™/H1/TQ\)](#)

4 selected targets

Select	No.	Start	Sense Sequence	Default Loop Sequence	Custom Loop Sequence
<input checked="" type="checkbox"/>	1	594	GCGTTAGCAAATGCAGCAAGC	CGAA	CTCGAG
<input checked="" type="checkbox"/>	2	823	GAACATGGATGGCAAGGAACT	CGAA	CTCGAG
<input checked="" type="checkbox"/>	3	1080	GGGCACAACGATCAGTAAGA	CGAA	CTCGAG
<input checked="" type="checkbox"/>	4	1354	GGCCCTCCGTTACTATGA	CGAA	CTCGAG

[Design](#) [Reset Form](#)

微信号: HelixLife

然后在 Default Loop Sequence 选择合适的序列（翠花用的载体是 pGreenPuro，不需要这个序列，就默认了，后面合成引物的时候要去掉的），在 Custom Loop Sequence 处输入 CTCGAG，点击 Design:

shRNA Oligo Features:

Linker Sense Sequence Loop Sequence Antisense Sequence

Note: You have to order both the top and bottom DNA strands (Minimum scale of synthesis = 50 nmole; 5' modifications = None; 3' Modifications = None; Purity = Desalted). Anneal the top and bottom strand oligos ([shRNA Annealing Protocol \(PDF\)](#)) to generate a double-stranded oligo with 4-nucleotide overhangs suitable for directional cloning into Invitrogen's [BLOCK-IT™ Inducible H1 RNA Entry Vector \(pENTR™/H1/TQ\)](#)

4 selected oligos

Select	No.	Start	Oligo Type	Oligo Sequence
<input checked="" type="checkbox"/>	1	594	Top Strand	5'- CACCGGTTAGCAAATGCAGCAAGCCTCGAGGCTTCTGCTGCAITTCCTAACGC -3'
			Bottom Strand	5'- AAAAGCGTTAGCAAATGCAGCAAGCCTCGAGGCTTCTGCTGCAITTCCTAACGC -3'
			ds Oligo	5'- CACCGGTTAGCAAATGCAGCAAGCCTCGAGGCTTCTGCTGCAITTCCTAACGC -3' 3'- CCGAATCGTTTACGTCGTTCTCGAGGCTCGAAGGACGTAAACGATTCGAAAA -5'
<input checked="" type="checkbox"/>	2	823	Top Strand	5'- CACCGAACATGGATGGCAAGGAACCTCGAGGCTTCTGCTGCAITTCCTAACGC -3'
			Bottom Strand	5'- AAAAGAACATGGATGGCAAGGAACCTCGAGGCTTCTGCTGCAITTCCTAACGC -3'
			ds Oligo	5'- CACCGAACATGGATGGCAAGGAACCTCGAGGCTTCTGCTGCAITTCCTAACGC -3' 3'- CTTGTACCTACCGTTCCTTGGAGCTCTCAAGGACGCTAGGTACAGAAAA -5'
<input checked="" type="checkbox"/>	3	1080	Top Strand	5'- CACCGGCACAACGATCAGTAAGACTCGAGGCTTCTGCTGCAITTCCTAACGC -3'
			Bottom Strand	5'- AAAAGGCACAACGATCAGTAAGACTCGAGGCTTCTGCTGCAITTCCTAACGC -3'
			ds Oligo	5'- CACCGGCACAACGATCAGTAAGACTCGAGGCTTCTGCTGCAITTCCTAACGC -3' 3'- CCGGTGTTTGTAGTCAITTCGAGCTCAGAATGACTAGCAAAACACGGAAAA -5'
<input checked="" type="checkbox"/>	4	1354	Top Strand	5'- CACCGCCCTCCGTTACTATGACTCGAGGCTTCTGCTGCAITTCCTAACGC -3'
			Bottom Strand	5'- AAAAGCCCTCCGTTACTATGACTCGAGGCTTCTGCTGCAITTCCTAACGC -3'
			ds Oligo	5'- CACCGCCCTCCGTTACTATGACTCGAGGCTTCTGCTGCAITTCCTAACGC -3' 3'- CCGGAGGCAATAATGATGACTGAGCTCAGTATCAITTCCTCCCGAAAA -5'

得到 shRNA

提醒: 合成出去的引物需要做微调，根据载体的要求，和 sigma 的设计一样，需要在前后加上酶切位点的，最后大功告成。

CRISPR PK RNAi, 你更看好谁?

作者: 子非鱼

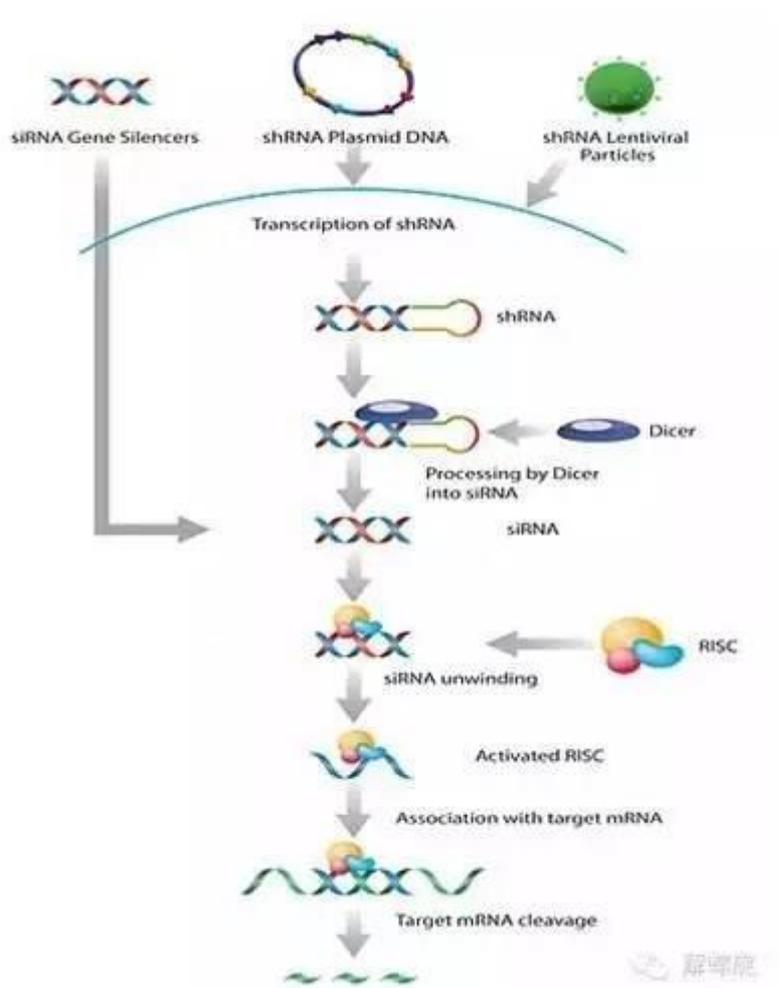
RNAi 作为基因沉默领域中江湖大佬, 也曾叱咤风云过, 甚至曾连续两度被《Science》评为年度十大突破技术之一。然而, 由于近年来的后起之秀 CRISPR 的出现, RNAi 风光不再, 似乎已经从期望的峰顶跌落至幻灭的低谷。难道 RNAi 真的 OUT 了么? 在 RNAi 和 CRISPR 之间, 我们又该如何选择呢?

RNAi 一般是向细胞中引入 siRNA 或 ShRNA (经 Dicer 酶剪切后可形成 siRNA), 进而降解相应的 mRNA, 通过功能缺失表型来进行基因筛选。

RNAi 原理视频:



(扫码可看视频)



由此可知，RNAi 主要标靶成熟的 RNA，是一种基因下调（knockdown）方法，但该技术并不能完全去除基因的功能。

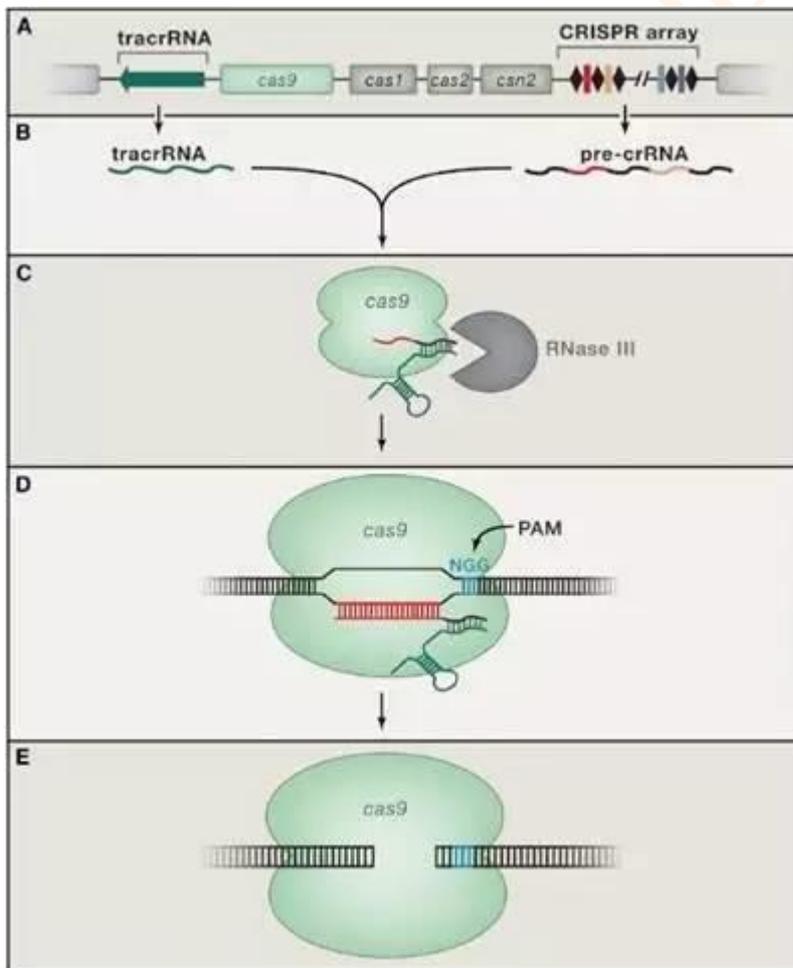
而真正能够实现基因完全功能丧失的是锌指酶 ZFN 和 TALEN，它们通过 DNA 结合结构域(DBD) 识别特定的 DNA 序列，并用核酸酶向目的基因引入双链断裂（DSB）和突变，而达到敲除基因的作用。然而，ZFN 和 TALEN 的光芒很快就异军突起的 CRISPR 系统所掩盖。

CRISPR/Cas9 作为细菌的免疫系统，可在引导 RNA 的指导下，与目的核酸片段（不论是否具有编码功能）进行靶向结合并进行切割。

CRISPR/Cas9 的视频：



(扫码可看视频)



依据功能元件的不同，CRISPR 系统可分为 I 类系统、II 类系统和 III 类系统。目前使用最广泛

的是酿脓链球菌的 II 型 CRISPR/Cas9，它已经被成功用于编辑人类基因组。

Table 1. Classification and Examples of CRISPR Systems

Class	Type	Subtype	Hallmarks	Example effector	Example organism	Studies Cited
Class 1	Type I		multisubunit effector complex; Cas3	Cascade	<i>E. coli</i>	Brouns et al., 2008
	Type III	III-A	multisubunit effector complex; Csm effector module; DNA targeting	Cas10-Csm	<i>S. epidermidis</i>	Maraffini and Sontheimer, 2008
		III-B	multisubunit effector complex; Cmr effector module; RNA targeting	Cmr	<i>P. furiosus</i>	Hale et al., 2009
Class 2	Type II		single protein effector; tracrRNA	Cas9	<i>S. thermophilus</i>	Bolotin et al., 2005; Barrangou et al., 2007; Sapranuskas et al., 2011; Gasiunas et al., 2012
					<i>S. pyogenes</i>	Datcheva et al., 2011; Jinek et al., 2012; Cong et al., 2013; Mali et al., 2013
	Type V		single protein effector; single-RNA guided	Cpf1	<i>F. novicida</i>	Zetsche et al., 2015

CRISPR systems are currently organized into two overarching classes: Class 1, which contain multi-subunit effectors, and Class 2, which contain single protein effectors. These classes are subdivided into five types (Makarova et al., 2015), with type IV remaining a putative type within Class 1. Although only Class 2 systems have been adapted for genome engineering, the results described in this review emerged from studying a diversity of CRISPR-Cas systems. (Type III-B systems are not discussed but represent an unusual system that targets RNA rather than DNA [Hale et al., 2009].)

同时，CRISPR 系统有着很强的可扩展性，并从中衍生出了 CRISPRi 技术，即通过将催化失活的 Cas9 (dCas9) 连接上了一个转录沉默子 (KRAB) 结构域，可抑制基因的转录。该系统不仅可阻止转录的起始，也可以靶标细胞核内的转录本（这点 RNAi 很难做到）。当研究核心是转录活动而非 RNA 产物时，CRISPR 系统更有优势。

尽管 RNAi 和 CRISPR 系统均存在脱靶问题，但由于 CRISPR 系统必须在转录起始位点附近才能发挥作用，其脱靶效率要远低于 RNAi。

为了全面比较这两种技术，斯坦福大学的研究人员将这两种技术用于人类慢性粒细胞白血病细胞系 K562，平行筛选影响细胞生长速度的必需基因。他们通过慢病毒将 shRNA 和 sgRNA 文库分别引入细胞，观察细胞呈现出的表型。

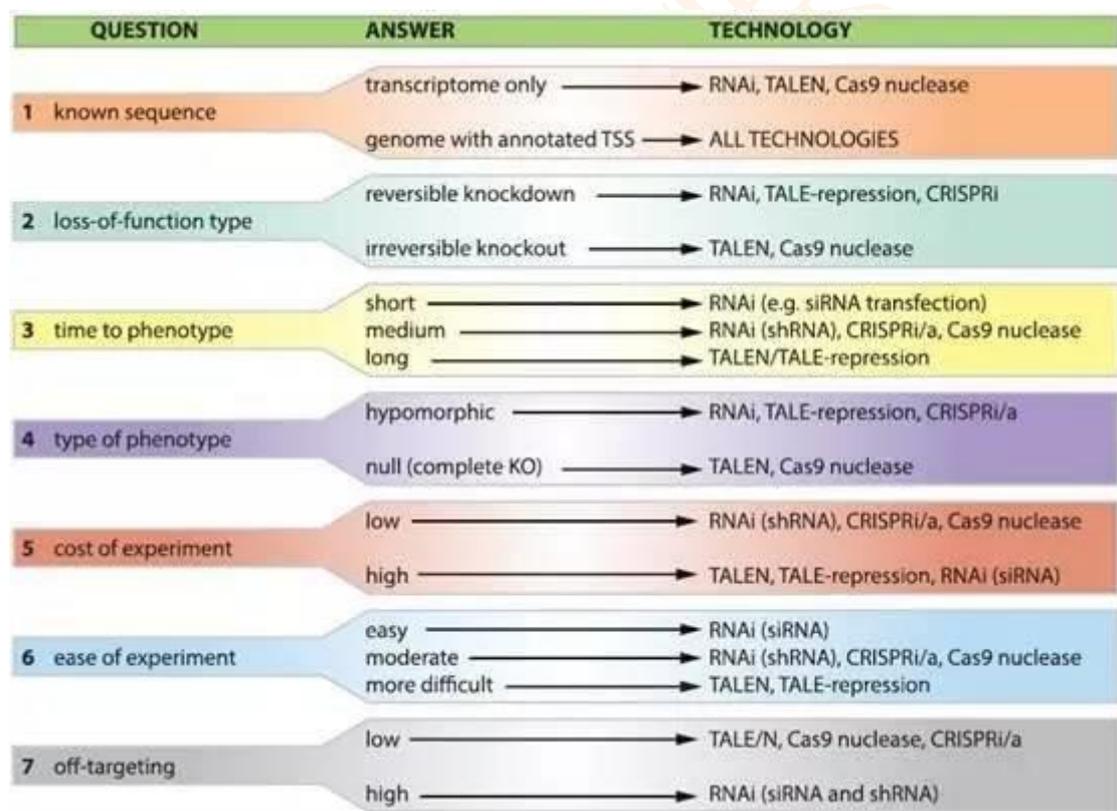
研究显示，RNAi 和 CRISPR 系统的基因筛选精确性都很高，但是两者筛选出的基因并不相同，且 CRISPR 鉴定出的必需基因更多。实验结果证明了 CRISPR/Cas 技术最优，具有低噪音，最小的脱靶效应及试剂间一致的活性。同时，本文的研究者认为可将 RNAi 和 CRISPR 数据结合起来，对生长调控基因能有更加全面的认识。

无独有偶，之前也有哈佛学院的研究小组通过 CRISPR 系统及 RNAi 技术鉴定出了三个对肿瘤细胞生长很重要的基因。在这项研究中，研究小组聚焦结节性硬化症 (TSC)，该肿瘤是由 TSC1&TSC2 突变引起的。他们利用 CRISPR 构建了 TSC1/TSC2 缺陷的突变果蝇细胞系，随后通过 RNAi 筛查昆虫所有的激酶和磷酸酶，并发现三个基因的 knockdown 可降低 TSC1&TSC2 缺陷型细胞的生长速度。

另外，Molecular Cell 杂志中的一篇文章对 RNAi、TALEN 和 CRISPR 三大工具的核心技术进行全面比较，且为基因功能研究提供了一份实用指南。那么小鱼就将这三种技术的区别及选择指南分享给大家；研究者们可依据自己的需要，简单直观的找到最合适自己的技术。

Table 1. Comparisons between RNAi, TALE, and CRISPR Centric Technologies

	RNAi	TALE Repression	TALEN	Cas9 Nuclease	CRISPRi	CRISPRa
Loss-of-function mechanism	Post-transcriptional RNA degradation	Repression of transcription	Frame shift DNA mutation	Frame shift DNA mutation	Repression of transcription	Activation of transcription
Result	Reversible knockdown	Reversible knockdown	Permanent knockout	Permanent knockout	Reversible knockdown	Reversible activation
Transgenes	si/shRNA	TALE-KRAB	TALEN	Cas9 nuclease sgRNA	dCas9-KRAB sgRNA	dCas9-VP64 sgRNA
Guiding sequence	si/shRNA	DBD	DBD	sgRNA	sgRNA	sgRNA
Required sequence information	Transcriptome	Annotated TSS	Transcriptome	Transcriptome	Annotated TSS	Annotated TSS
Off-target space	Transcriptome	Window around TSS	Genome; requires FokI dimerization	Genome; cuts as monomer	Window around TSS	Window around TSS
Transcript variants	All variants via conserved region	Only variants from the same TSS	All variants via conserved region	All variants via conserved region	Only variants from the same TSS	Only variants from the same TSS



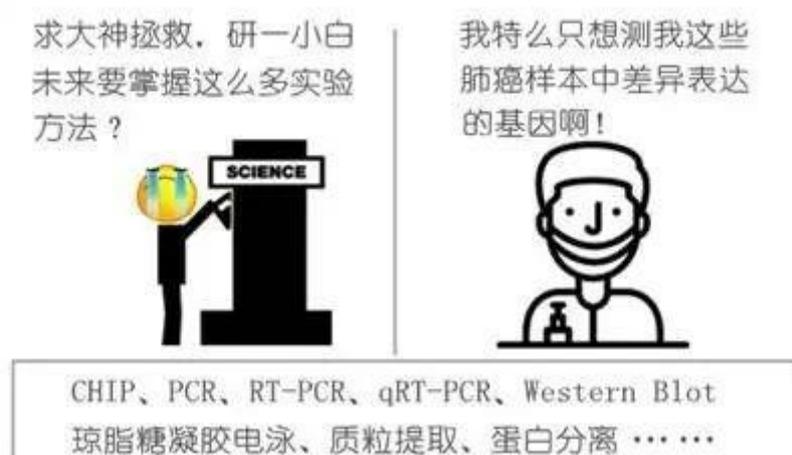
参考文献: 1 Systematic comparison of CRISPR/Cas9 and RNAi screens for essential genes
 2 The Heroes of CRISPR
 3 Choosing the Right Tool for the Job : RNAi, TALEN, or CRISPR

2.2 cDNA 合成

RNA 转录的实验方法选择和步骤

作者：麦子

正规化管理的实验室都会给新人进行相关技能体系的培训，但是被老板散养的研究僧或者无奈从 0 开始做科研的临床医生也不在少数。他们在初始接触分子实验时，手持《现代分子生物学实验指导》这本宝典，很容易被五花潦乱的实验方法乱了阵脚……



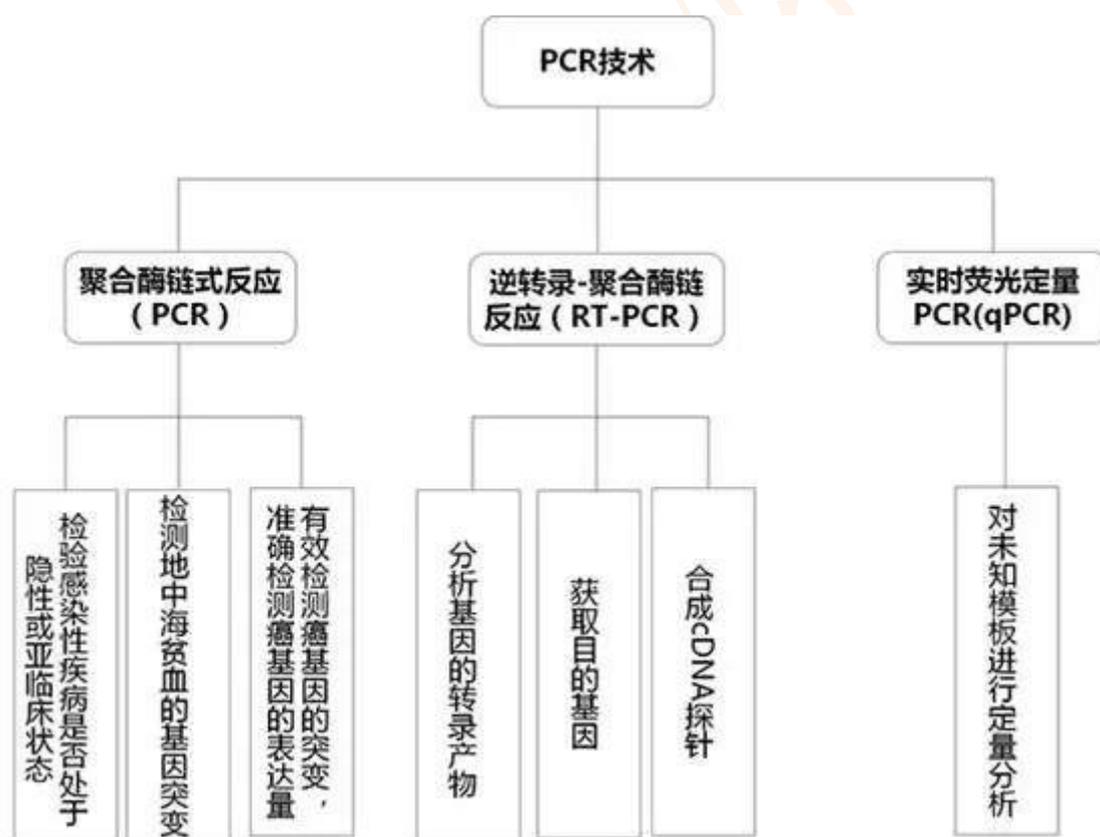
连转录和反转录都不太搞得清楚的科研新人如何根据自己的实际情况各取所需呢？首先，明确自己的定位，你目前要解决的是单问题而不是一口吃成一个大胖子，然后**关键是明确实验对象和实验目的**。

举个栗子，我现在手头上的样本是某个类型肿瘤临床患者切除的组织，我的目的是检测这些样本与正常组织样本中几个“明星分子（如 P53 等与癌症密切相关的分子）”是不是有差异表达，我该怎么做？

1.明确自己最后一步实验是什么

根据我的实验目的，我最后一步的实验其实已经确定了，就是从分子层面比较不同样本中几个基因的表达，但是分子层面可以是 RNA 转录水平，也可以是蛋白质表达水平。作为新人，自然选择前者，因为经打听和查资料后我发现，RNA 转录使用实时荧光定量 PCR (qPCR) 方法就好，容易上手出结果快，而对比蛋白质表达水平的 Western Blot (WB)，在抗体成本和摸索实验体系的时间成本上都不合算（当然，很多实验中如果 RNA 转录水平出现差异，还是很有必要在蛋白水平进行验证的，这个我们会在以后的文章中详述）。

所谓 qPCR 技术，是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。该技术实现了 PCR 从定性到定量的飞跃，它以其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点成为了分子生物学研究中的重要工具。



PCR 技术整体图示

2.找出所有涉及到的分子实验

从最后一步实验往前推，qPCR 需要哪些基本的元素？具体如下：

*qPCR 的模板→当然不能直接用肿瘤组织和正常组织→查资料发现模板是 cDNA→怎么制备 cDNA？→提取所有组织样本的 RNA 进行反转录（逆转录-聚合酶链式反应，RT-PCR）→我需要 RNA 抽提试剂盒和反转录试剂盒→完成 RNA 的提取和 cDNA 的合成（放心，试剂盒里都会有非常具体的操作说明书，但是自己要多查资料了解原理，不然你和流水线操作员何异？）

*qPCR 的引物→根据已经确定的分子自己使用引物设计软件设计或者查找文献找到经过验证的引物，不要忘了 GAPDH 或者其他内参的引物

*SYBR® GREEN→商业试剂盒

*酶→包含在 SYBR® GREEN 试剂盒中

*RNase-free H₂O→一般在 SYBR® GREEN 中会有对应的 H₂O，小伙伴们千万不要使用正常 PCR 中使用的高温灭菌 H₂O，否则溶解曲线让你分分钟想撞墙。

3. Just do it

根据 SYBR® GREEN 试剂盒说明书中的体系要求完成实验操作（冰上操作）和对 qPCR 仪器的设置，具体仪器的使用方法一定要多多问别人。

RNA 反转录又失败了？填坑还得看这六大要素！

作者：子非鱼

老话说的好，万事开头难。而这话在 RT-PCR 中则体现的淋漓尽致，其开头的第一步——将 RNA 反转为 cDNA，表面上看似简单，实际上则暗潮汹涌，指不定就在哪里挖个坑，就会让斗志高昂的实验汪们摔的鼻青脸肿，而且还不知道是咋掉坑的。

显然，RNA 的反转录成功，不是想有就能有。大家之所以屡败屡战、屡战屡败，就是因为忽略了以下这 6 个必备要素，不然此坑早就被填平，又何至于整日里看着悲催的实验结果唉声叹气呢？

1. RT Primer 的最佳选择

通常 RT primer 可分为三类：oligo dT，随机引物以及基因特异性引物。Oligo dT 引物之所以应用范围更加广泛，是因为可由此获得 mRNA 的全长拷贝。

然而如果 mRNA 长度过长 >4kb，或者没有 polyA 尾（原核 mRNA 或 rRNA），就需要考虑使用随机引物进行 RNA 的反转录。随机引物虽能确保长基因的 5' 末端的转录，但并不能获得整个基因全长的 cDNAs，且对 RNA 样品质量要求比较高，此时可用 6-8 个核酸聚合体来提高 cDNAs 的合成量。

而对于真核生物的 qPCR，长随机引物和 Oligo-dT 引物的混合物似乎能给出一个漂亮的结果。针对此类优化混合引物，已有两家公司的试剂盒或可助大家一臂之力：Qiagen QuantiTect Rev. Transcription Kit 和 BioRad iScript Kit。

第三个选择就是基因特异性引物，仅扩增需要的 cDNA，适用于目的序列已知的情况。通常在一步 RT-PCR 法中可使用此类引物，因为该引物也可用作 PCR 中的反向引物。

2. RNA 的二级结构

若要获取全长 RNA 的反转录，那么 RNA 二级结构的问题就不可忽略，因为反转录酶在遇到此类结构后会终止反应或从模板上脱落下来。

也许你很难判断 RNA 是否具有二级结构，但如果基因中 GC 含量较高，通常意味着 RNA 很难被变性且不可能是单链，此时就需要在 65°C 5min 对其进行充分变性，以避免其对实验结果的影响。

另外，还有一种方法可解决此问题，即使用一种最适温度高于正常标准（37°C-42°C）的逆转

录酶。比如来自 Life Technologies 的 ThermoScript 酶就常用于具有复杂结构 RNA 的逆转录。当然也存在一些即使在常规逆转录温度（37°C-42°C）的条件下，也能跨过 RNA 二级结构的高效率逆转录酶，即使是针对富集 GC 序列的 RNA 也能得到很好的结果，如 Qiagen 公司的逆转录酶 Omniscript 和 Sensiscript，以及 Takara Bio 公司的 PrimeScript RT enzyme。

3. 去除 gDNA

RNA 中存在的基因组 DNA（gDNA）污染可能是最终 PCR 反应中假阳性结果出现的原因，目前已存在很多方法去除 gDNA，比如通过 DNAase 对提取的 RNA 进行预处理。

以上方法无可避免会造成 RNA 的蛋白污染，因而这里介绍一种可绕开酶处理的方法，即针对 RNA 设计一种包含内含子或内含子-外显子边界的引物，如此 DNA 就不会产生扩增抑或即便扩增了其条带大小也与 cDNA 不同。

但值得注意的是，使用该方法时基因中要没有假基因存在，假基因（pseudogene）是插入到基因组中剪切 mRNA 的 DNA 拷贝，否则也会产生假阳性结果。

而对于没有内含子的原核 RNA，gDNA 的去除则更是基因表达准确测量的一个至关重要的因素。使用 DNAase 处理 RNA 是唯一的方法，Quantitect Rev.Transcription Kit 中所包含的 gDNA 清除缓冲液就可在无需加热或 EDTA 失活的条件下降解 DNA。此外，具有 gDNA Eraser（Takara Bio）的 PrimeScript RT 试剂盒也可去除 gDNA，且能在不到 20 分钟之内快速完成 RNA 的 cDNA 合成。

4. 检测 RNA 分子的完整性

毫无疑问，RNA 质量对 cDNA 合成结果会产生重要的影响，而不同批次间 RNA 质量差异也导致 RT-PCR 产生不同的结果。所以在进行 RT-PCR 前，应该检查 RNA 条带的质量，可通过琼脂糖凝胶电泳进行检测。通常完整的真核 RNA 应包括 28S 和 18S RNA 条带，且较大的条带的强度应是较小条带的两倍左右，另外两个条带强度大致相同也是可以的。

而另一种准确测量 RNA 质量的方法是使用 Agilent BioAnalyzer 仪器，它可将 RNA 分子可视化并能在分析 RNA 完整数值（RNA Integrity Number, RIN）后给出一个质量的量化标准。RIN 为 8-10，则表示 RNA 质量非常好；当 RIN 值低于 7，则说明 RNA 可能有降解，可能会导致一些罕见信息的丢失等问题。

5.RNA 定量

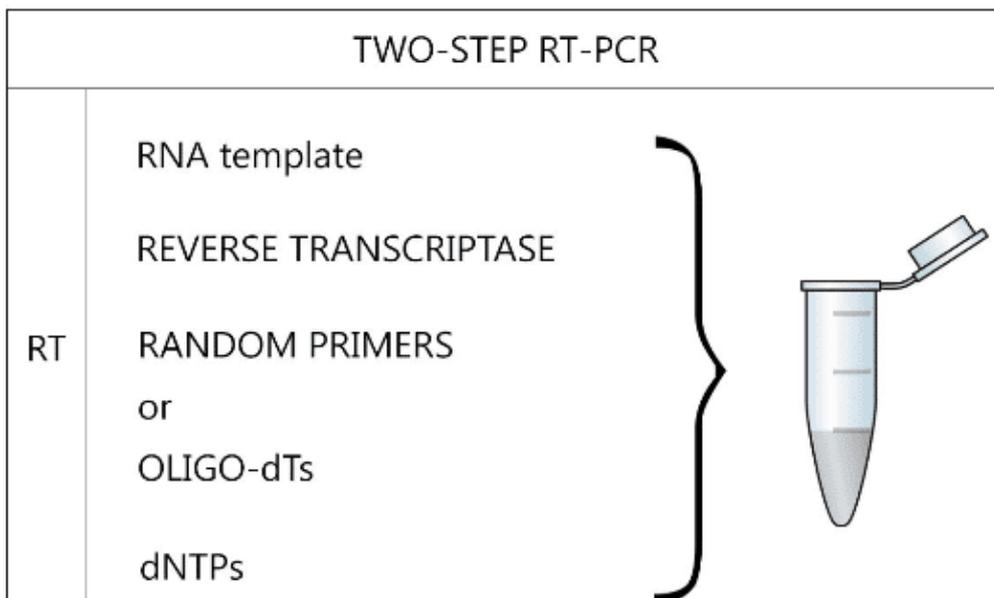
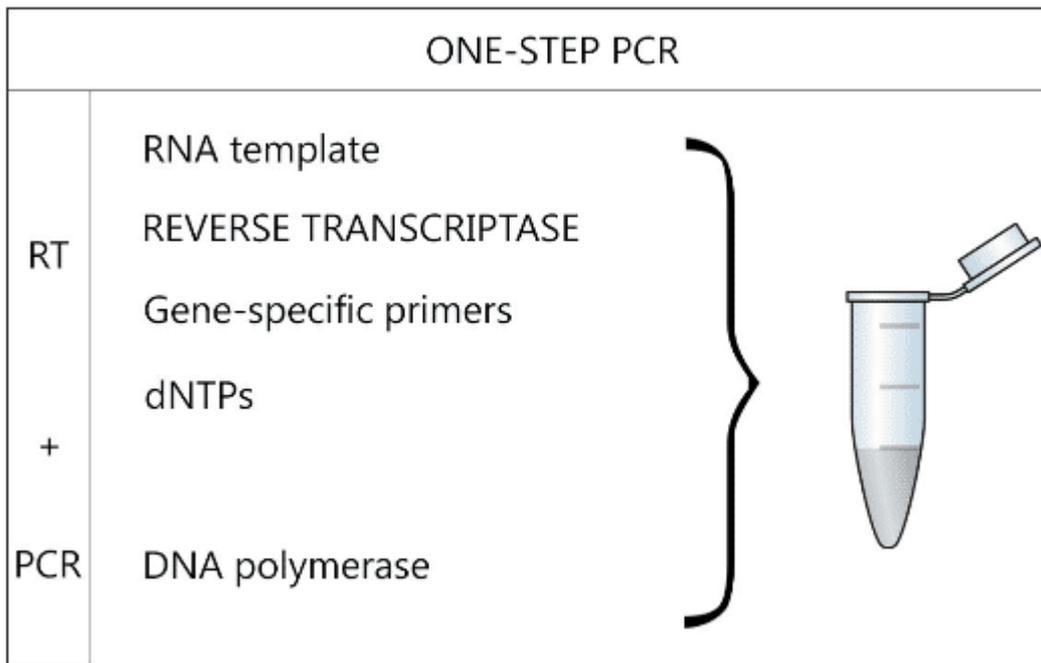
除了掌握 RNA 的完整性之外，准确评估产量也很重要。产量的准确性会受到以下因素的影响：测量仪器的准确性、DNA 的污染、盐的污染以及降解程度。而为了准确测量产量，小编更喜欢使用 Nanodrop 进行 UV 定量。

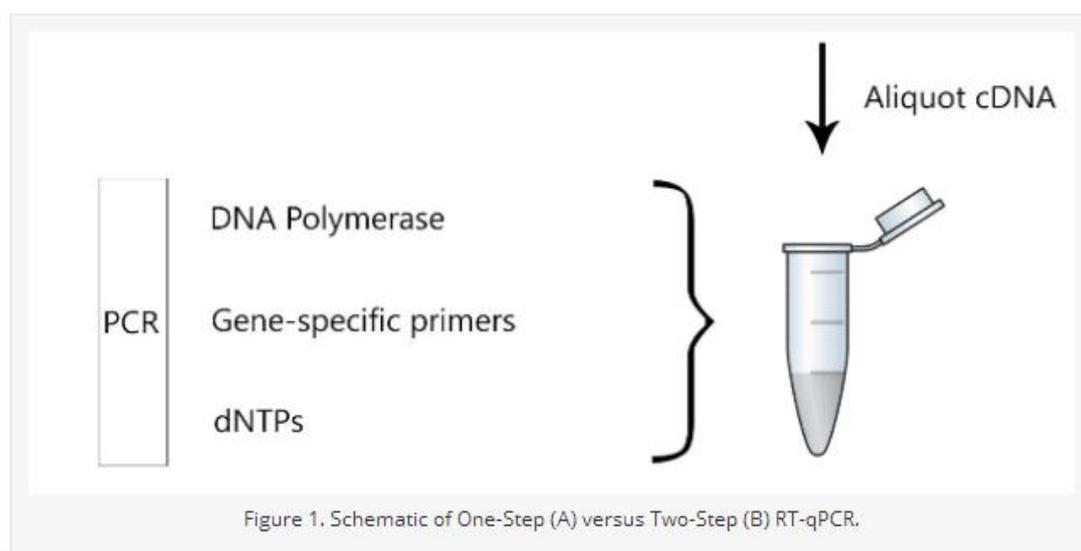
该仪器不需要稀释样品，并且具有非常宽的测量 RNA 的范围。以小编的经验，它可以准确读取到 10ng/ul。而传统的紫外分光光度法应避免使用大容量的比色皿，因为这需要耗费大量的样品。此法的缺点是也可在样品中测量基因组 DNA，如果从 RNA 提取过程残留盐或酚，则会增加吸光度，使得 RNA 的 OD 值变得更高。

而解决此问题一个方法是使用荧光染料，Ribogreen 是一种 RNA 特异性染料，可通过荧光来测量 RNA 产量。现在，Nanodrop 已经具备检测 Ribogreen 所发出荧光的功能。

6.两步法或一步法 RT-PCR

RT-PCR 也分两种类型：一步法（One-step PCR）和两步法（Two-steps PCR），具体操作见下图。前者，RT 反应和 PCR 扩增是在同一个反应管中进行的；而后者，RT 反应与 PCR 扩增反应单独进行。





尽管这两种方法都能得到最终的结果，但是每种方法都有优缺点。选择哪种方法取决于各种因素。如下总结它们的优缺点。

一步 RT-PCR 消除了样品转移步骤，不仅消除了控制物污染的潜在来源，而且需要较少的准备和操作时间。又因一步 RT-PCR 中所使用的引物是基因特异性的，灵敏度高，常用于分析低表达水平基因。而其不足在于同一样本中只有有限数量的目的基因被扩增，且需要在转录和扩增间寻找一个平衡。

所以当时间对实验很重要时，一般采用一步法，如检测 RNA 病毒，也适用于高通量分析。由于该法的检测结果准确率高，因而在需要测量表达水平上的细微差异时，也可采用此方法。

而两步 RT-PCR 可将大批量的 RNA 转化为 cDNA，然后储存 cDNA 用于后续实验，可检测大量基因；在分别优化 RT 和 PCR 步骤后，可更好地控制实验过程；又因只有少量的转录本被用于 PCR，则任何可能从 RNA 分离到 RT 反应的抑制剂（如乙醇、酚及胍盐等）都被稀释了。

但是两步 RT-PCR 更耗费时间，且带来污染的可能性更高；RT 过程应以相同效率反转录 RNA，否则会影响 qPCR 的启动效率，进而带来不同的实验结果，因此对于每个 RT 反应应使用相同的条件。

如果你需要对同一样本的多个目标进行分析时，可选择两步 RT-PCR。另外，当 RNA 的存储是个问题时，最好是进行两步 RT-PCR，因为 cDNA 在 -20℃ 是稳定的。

参考文献: 1. Six Important Factors for Successful Reverse Transcription
2. How to Choose the Correct Reverse Transcription Method

基因研究不知道转录本，做什么引物设计？！

作者：阳光

我们平常通过数据库查找某个基因的相关信息时，会发现该基因有多个转录本。为什么一个基因可以有多个转录本呢？转录本能干什么？

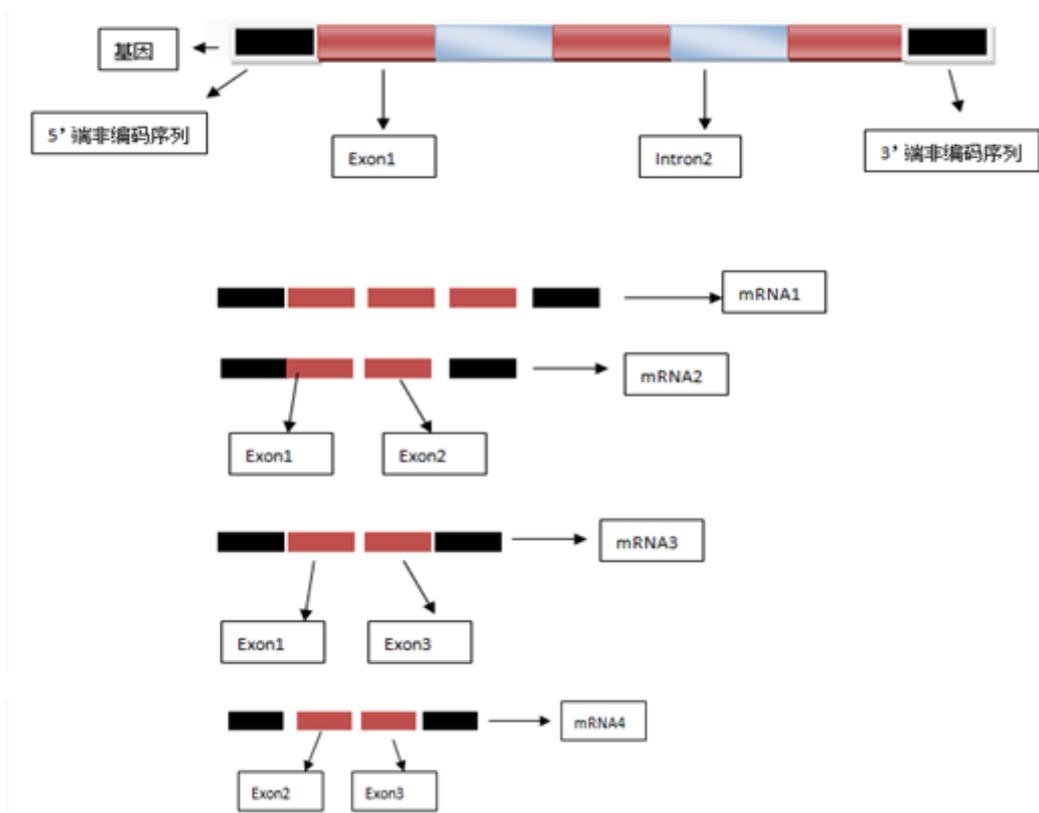
转录本其实就是基因通过转录形成的一种或多种可供编码蛋白质的成熟的 mRNA。

一个基因有可能有多个转录本，原因是由于不同的剪接方式造成的。我们都知道，基因转录之后，首先是形成前体 mRNA，通过剪切内含子连接外显子，5'端加帽及 3'端加尾之后形成成熟的 mRNA。

但是在剪切的过程中可能会剪切掉外显子，也有可能保留部分内含子，这样就形成了多种 mRNA 即多个转录本。

举个栗子：这是一个

三个外显子两个内含子的基因结构图



该图通过不同的剪接方式得到了四种 mRNA 即四种转录本（我只是列出了部分可能性），实际中可能该基因只具有其中的一种或两种转录本，也有可能都具有。

我们需要特别注意的是大多数基因有多个转录本，而且有可能每个转录本都会编码产生相应的蛋白，这样就有可能造成一个基因有多种功能。

我们平常研究某个基因时（该基因有多个转录本），其实我们研究的是它的其中一个转录本所编码的蛋白的功能。虽然该基因有多个转录本，而且每个转录本都编码蛋白，但是一般情况下它的不同的转录本分布在不同类型的细胞中，当然也有可能多种转录本同时存在于某一细胞中。

那我们研究该基因时应该怎么做呢？

首先，我们需要确定我们应该研究该基因的哪个转录本。

因为我们平常研究某个基因的功能的时候，是因为该基因在某一特定的组织和细胞中表达，它在这些组织和细胞中具有特定的功能，所以我们只需要确定该基因的哪个转录本在这些组

织和细胞中表达即可。

确定的方法当然就是设计每种转录本特异性引物，然后通过 RT-PCR 就可知道哪种转录本在组织和细胞中特异性表达。那这个转录本就是我们要研究的。

之所以要确定我们应该研究哪个转录本，那是因为它关系到引物的设计以及蛋白分子量的计算。

当我们研究某个基因的功能时，通常会抽提总的 RNA，然后反转录得到 cDNA，然后将 cDNA 连接到表达载体中转化到原核或真核细胞中进行表达，然后进行接下来的研究。

通过反转录获得 cDNA 时，引物的设计就是根据转录本设计的。而且之后我们会将表达的蛋白跑电泳后进行分析，那蛋白的大小是如何计算的呢，当然也是通过该转录本编码的蛋白的氨基酸序列计算的啊。

2.3 RNA 提取

技术 | RNA 抽提的三大纪律八项注意

作者：毛博

“革命军人个个要牢记，三大纪律八项注意！”大家可能会很奇怪。军训季已经结束了，毛博怎么还在唱红歌？其实，今天毛博想谈一谈 RNA 抽提的问题。为了方便大家记忆，就总结出了“三大纪律八项注意”。

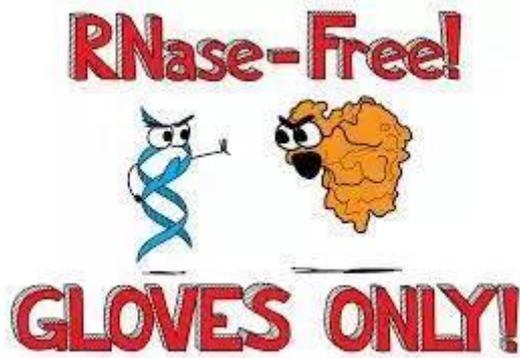
纪律一：无外源酶的污染。

外源酶会造成 RNA 的降解，造成 RNA 得率太低，或者彻底失败。而外源酶又是无处不在的。这就要求注意以下三点：

注意一：严格戴好口罩，手套。手指和呼吸时重要的外源酶的来源。所以童鞋们做 RNA 抽提的时候，还是要全副武装起来。这对自己也是一种保护措施。

注意二：实验所涉及的离心管，枪头，移液器，实验台面等要彻底处理。离心管和枪头要用 DEPC 处理过，单纯的消毒灭菌可不行呀。移液器和实验台面等要用 75% 的酒精擦过。

注意三：实验所涉及的试剂/溶液，尤其是水，必须确保 RNase-Free。



纪律二：无内源酶的活性。

这个和纪律一是一脉相承的。目的都是减少 RNA 的降解，提高最终的得率。而所有的组织都含有内源酶，这就要求我们在实验过程中，千方百计灭活内源酶。这也就诞生了下面的四大注意事项：

注意四：选择合适的匀浆方法。新鲜样品取材后应立即置于液氮中速冻，然后可以移至 -70°C 冰箱保存。在碾磨前，碾磨用具也必须预冷。在碾磨过程中，一边碾磨，一边补充液氮。样品碾碎后，在液氮刚刚挥发完时，将样品迅速转移到含裂解液的容器中，立即混匀匀浆。



注意五：选择合适的裂解液。现在市场上常用的裂解液几乎都能抑制 **Rnase** 活性。但是，高内源酶含量的样品，如肝脏，脾脏等组织，建议使用含苯酚的裂解液。苯酚的灭活内源酶的能力是很强的。

注意六：控制好样品的起始量。如果样品的块头太大，所有的细胞无法迅速和裂解液接触。里面没有接触到细胞的 **RNA** 很快就会被内源酶降解。所以，起始量不要太大。如果块头太大，要把它切成小块小块的。

纪律三：明确抽提目的。

我们做每一个实验，甚至每一个步骤，都要清楚这样子做的目的是什么。**RNA** 用于不同的实验，其质量的要求是不一样的。那么，这就诞生了下面的最后两条纪律：

注意七：任何裂解液系统在接近样品最大起始量时，抽提成功率急剧下降。所以，要进行样品的破碎和匀浆。其目的是为了 **RNA** 彻底地完整地释放出来。如果样品是细胞，则无须破碎即可直接匀浆；如果是组织，甚至器官，那就需要破碎后才能匀浆；如果是酵母菌和细菌，则需要先用相应的酶破壁后才能匀浆。



注意八：RNA 抽提成功的唯一经济的标准是后续实验的一次成功，而不是得率。我们为什么要抽提 RNA？是为了后面的实验，例如原位杂交，免疫沉淀等等。所以，一定要明确后面到底是要干嘛？cDNA 文库构建要求 RNA 完整而无酶反应抑制物残留；Northern 对 RNA 完整性要求较高，对酶反应抑制物残留要求较低；RT-PCR 对 RNA 完整性要求不太高，但对酶反应抑制物残留要求严格。不用每次都以获得最高纯度的 RNA 为目的，从而造成不必要的浪费。

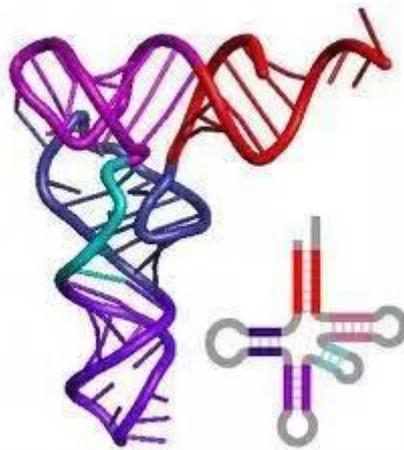
综上所述，对大部分实验狗来说，RNA 抽提比 DNA 抽提要困难得多。所以，我们要个个牢记，三大纪律八项注意。

打造五星级 RNA 二级结构

作者：子非鱼

RNA 自从在中心法则中占有一席之地以后，大家就开始争相热捧。RNA 的单链性质导致它与 DNA 不同，分子中的一部分核苷酸可与其他部分的核苷酸互相配对，即 RNA 可产生折叠。我们知道生物分子的功能与结构是密切相关的，折叠的 RNA 能部分甚至完全解释 RNA 分子的功能。对于当前的三维结构还是过于复杂，所以我们主要专注于二级结构的预测。

有关二级结构的预测，小鱼今天就为大家介绍一款性价比极高的软件：**RNAstructure**。

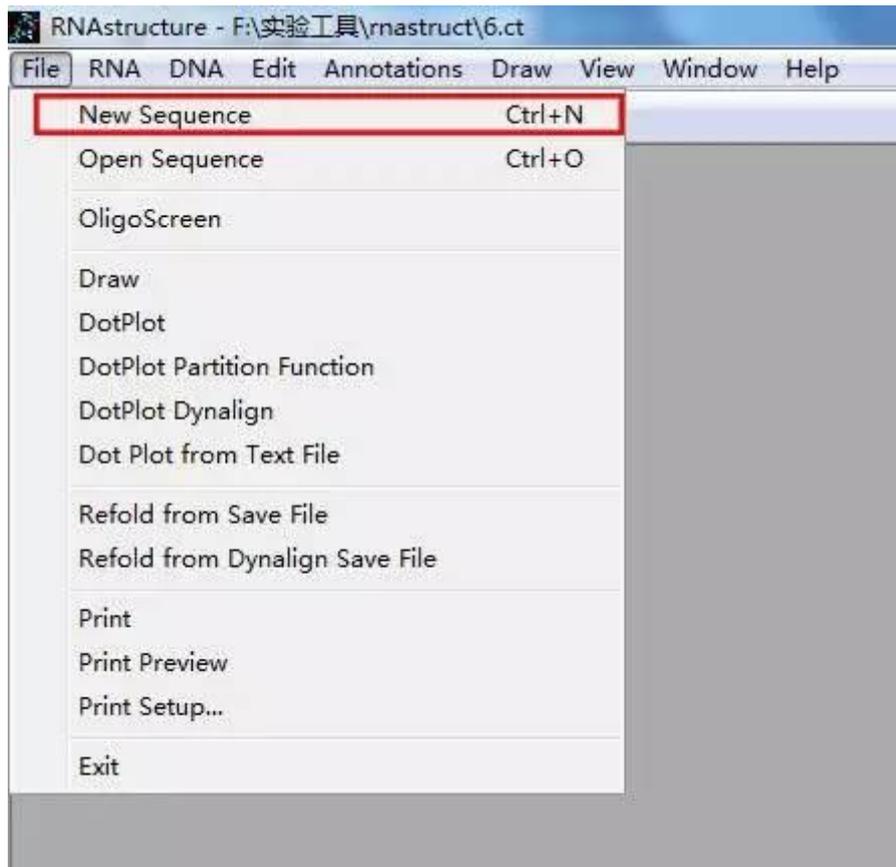


RNAstructure 利用 Zuker 算法 (Zuker Algorithm), 根据最小自由能原理 (minimizing free energy), 通过 RNA 一级序列预测 RNA 二级结构。预测所用的热力学数据是最近由 Turner 实验室获得。该软件使用了一些模块来扩展 Zuker 算法的能力, 并使之成为一个界面友好的 RNA 折叠程序。

为什么说性价比高呢? 除了可以检测 RNA 单链折叠, 还可以进行 DNA 单链折叠、RNA 或 DNA 分子间折叠、还有高大上的 Refold 功能: 重新折叠选项可读取一个由任何折叠模块生成的存盘文件*.sav, 并生成一个不同的次优结构。(就是“折上再折”, 折到你满意为止!)

小鱼今天就给大家介绍如何使用 RNA structure 对 RNA 进行二级结构的预测。

打开 RNAstructure, 点 File-new sequence,将序列粘贴到指定的位置, 命名并保存序列。



点击 RNA 一栏，可以看到许多重要的菜单，比如：

Fold RNA Single Strand: 此项使用 RNA 参数打开折叠窗口；

Fold RNA Biomolecular: 此项使用 RNA 参数折叠两个单体；

MaxExpect: Predict RNA EMA Structure: 此项可预测最大期望精确度的 RNA 结构；

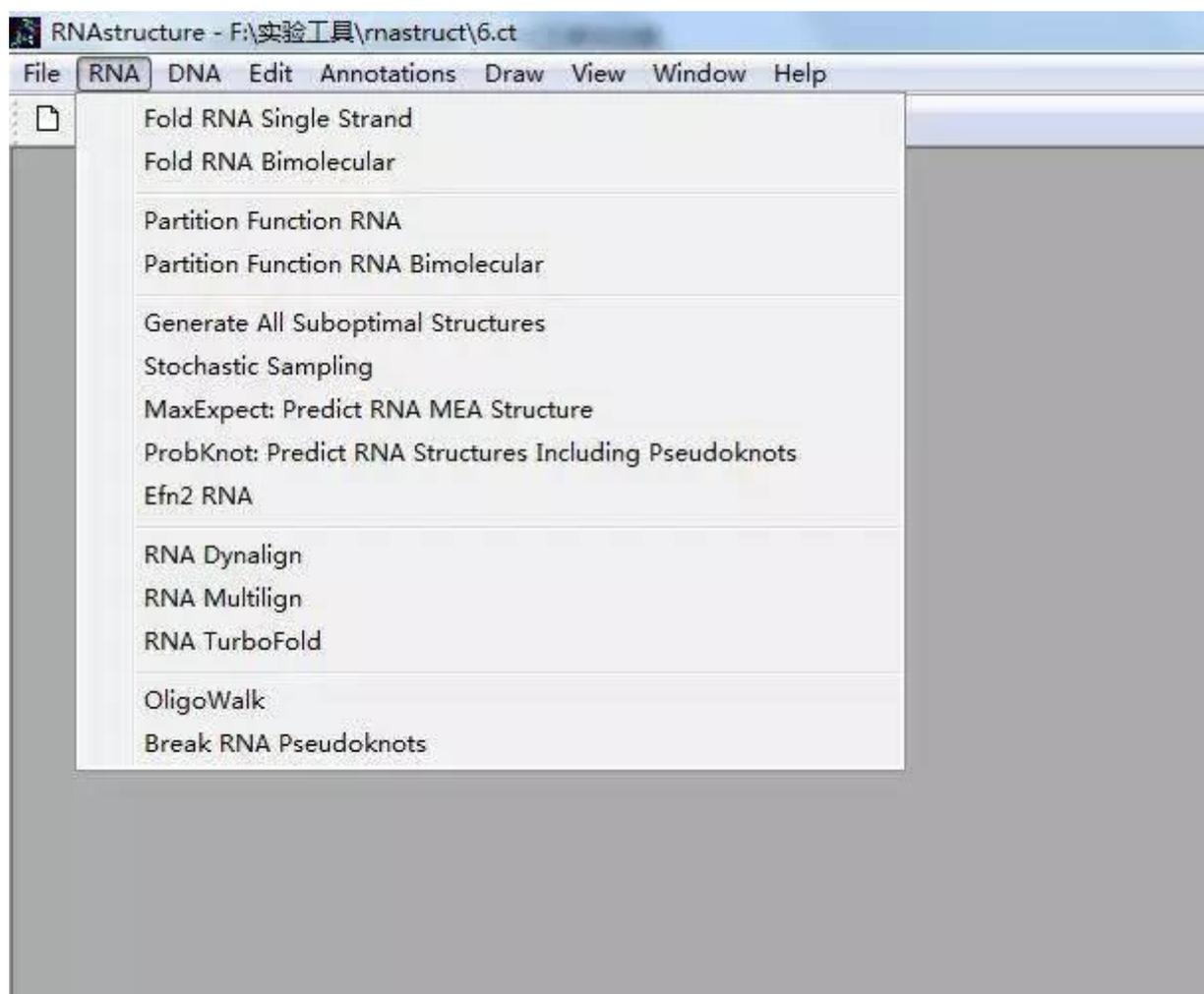
Efn2 RNA: 此项测定生成的 RNA 二级结构的自由能，储存在 ct 文件格式中；

Dot Plot: 此项可计算任何折叠的序列的点阵图，用于已经折叠并存盘的序列；

Oligo Walk: 打开 Oligo Walk tool 帮助确定一个与 RNA 对象紧密杂交的寡聚体；

MaxExpect: Predict RNA EMA Structure;

本例选择进行 RNA 单链折叠，点击“**Fold RNA Single Strand**”：

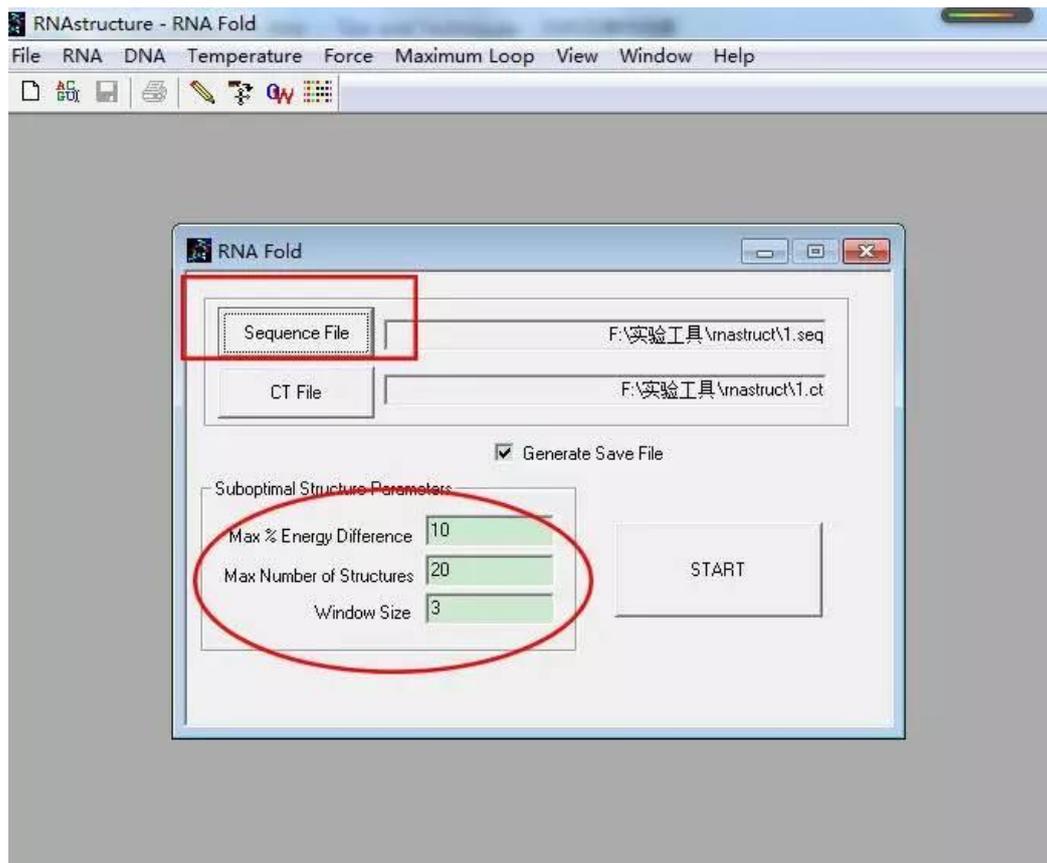


弹出 RNA Fold 窗口，点击“Sequence File”选择要预测的序列，窗口还有以下重要选项：

Max% Energy Difference (最大能量差异百分值)： 设定所允许的输出结构自由能与最小自由能的差异百分数数值。例如：如果结构的最小自由能为-100 kcal/mol，最大能量差异百分值，则会排除任何等于或大于-90 kcal/mol 的结构（大于即为负值更小）。

Max number of structures (最大结构数)： 所预测的可能结构的数量的绝对上限值。最大为1000。

Window size (窗口大小)： 此参数设定所生成的次优结构之间的差异程度。Windows size 设定值越小，则生成的结构则越接近的结构；反之，Windows size 设定值越高，则生成的结构则差异越大。



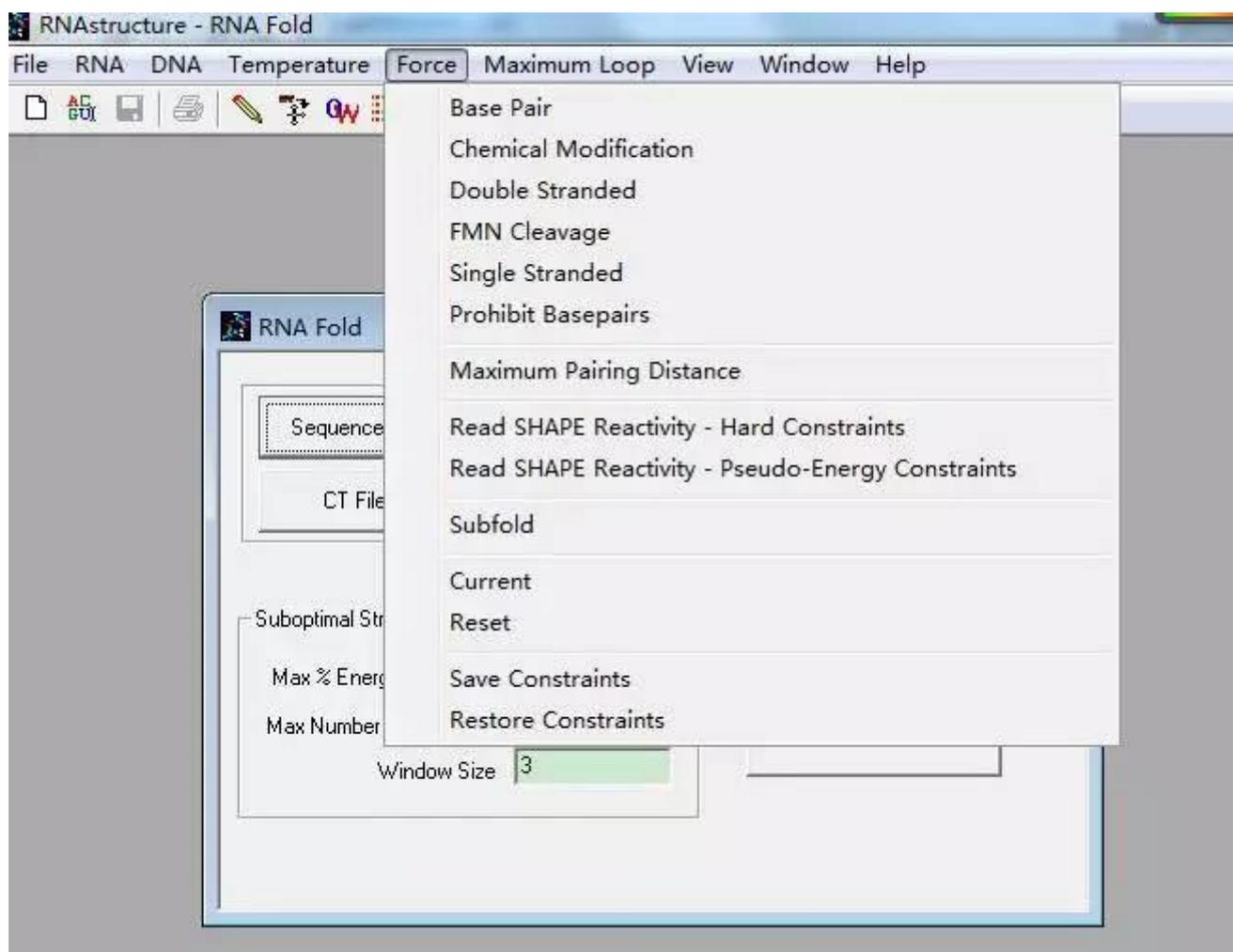
在菜单栏点击 Force:强制选项,就是各种高级设置,只为打造更个性化更 special 的 RNA 结构!
比如:

Base pair:强制某个碱基配对;

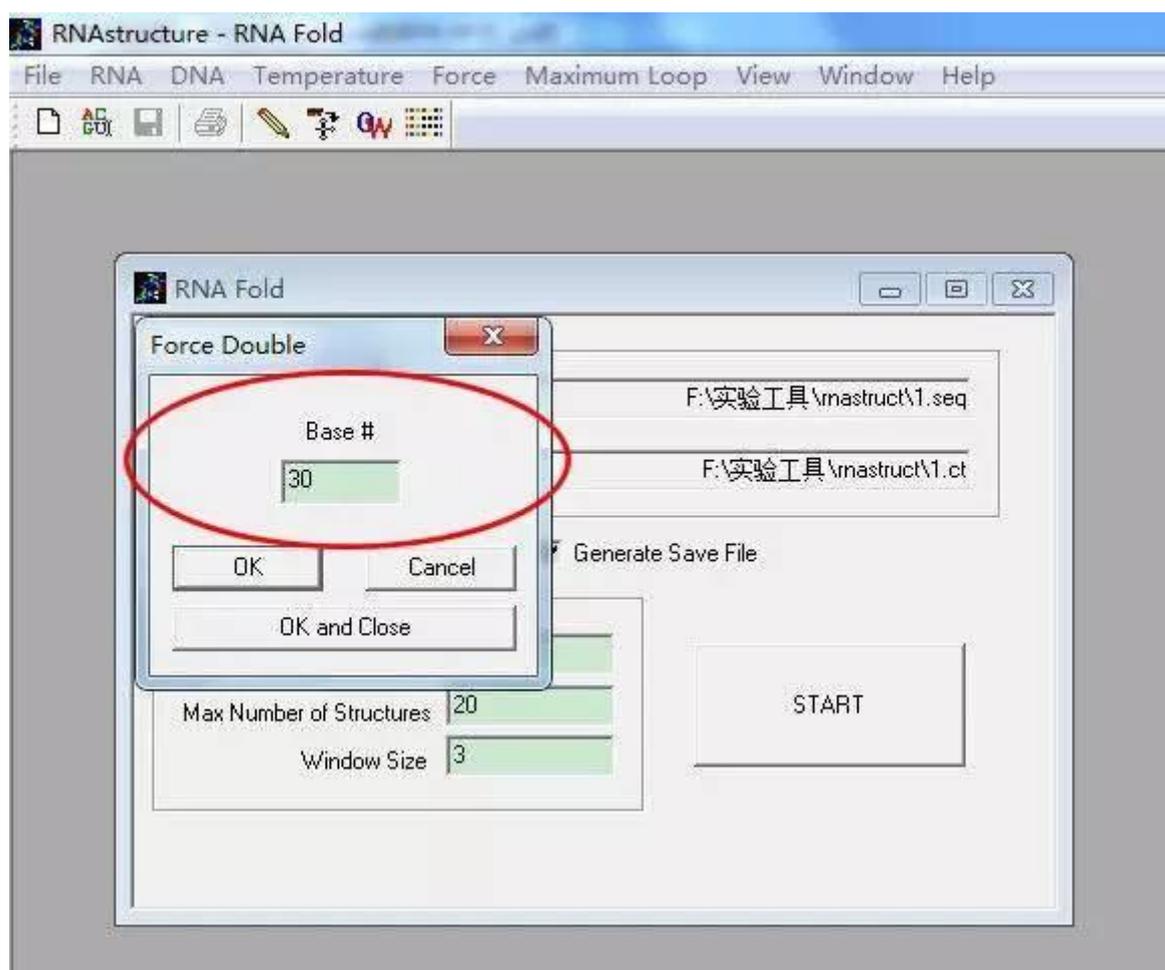
Chemical Modification: 强制某个碱基进行化学修饰;

Double Stranded:强制某个碱基为双链模式

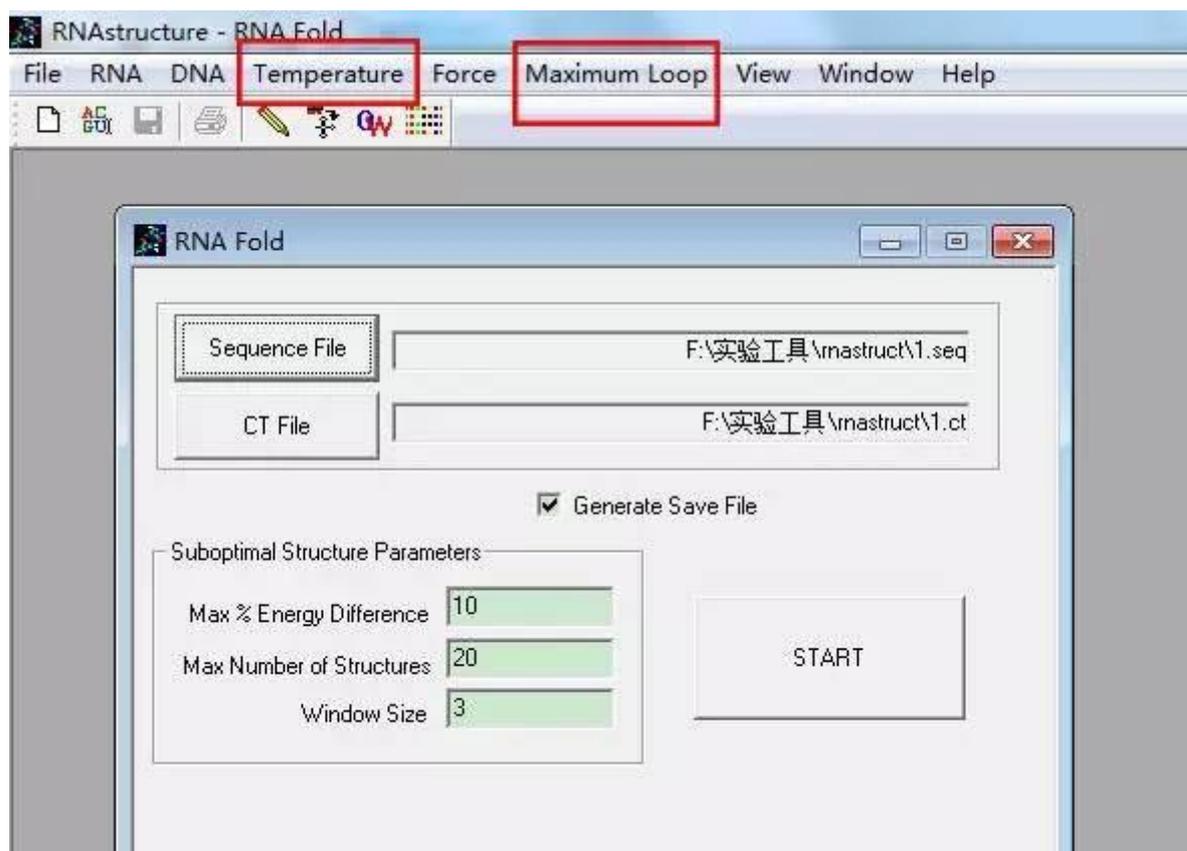
不过筛选条件越苛刻,获得合适的 RNA 二级结构就越少甚至没有



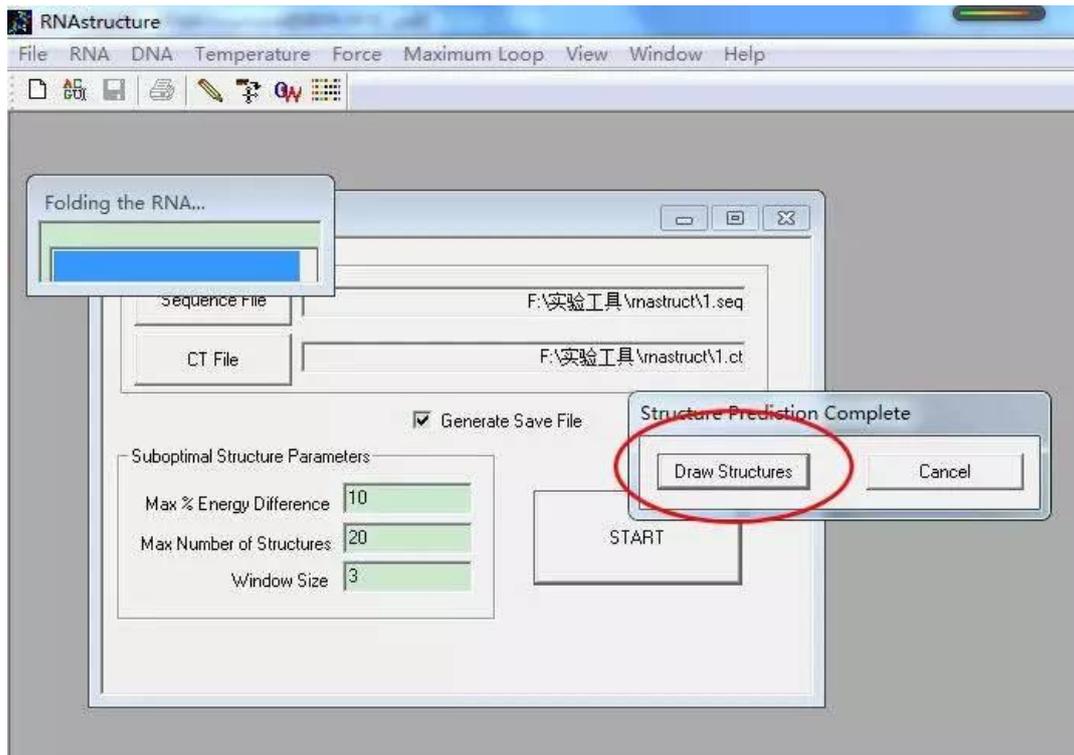
此处选择强制第 30 个碱基为双链模式，点击 Double Stranded，弹出“Force double”窗口，在指定位置输入“30”，点击“OK and Close”：



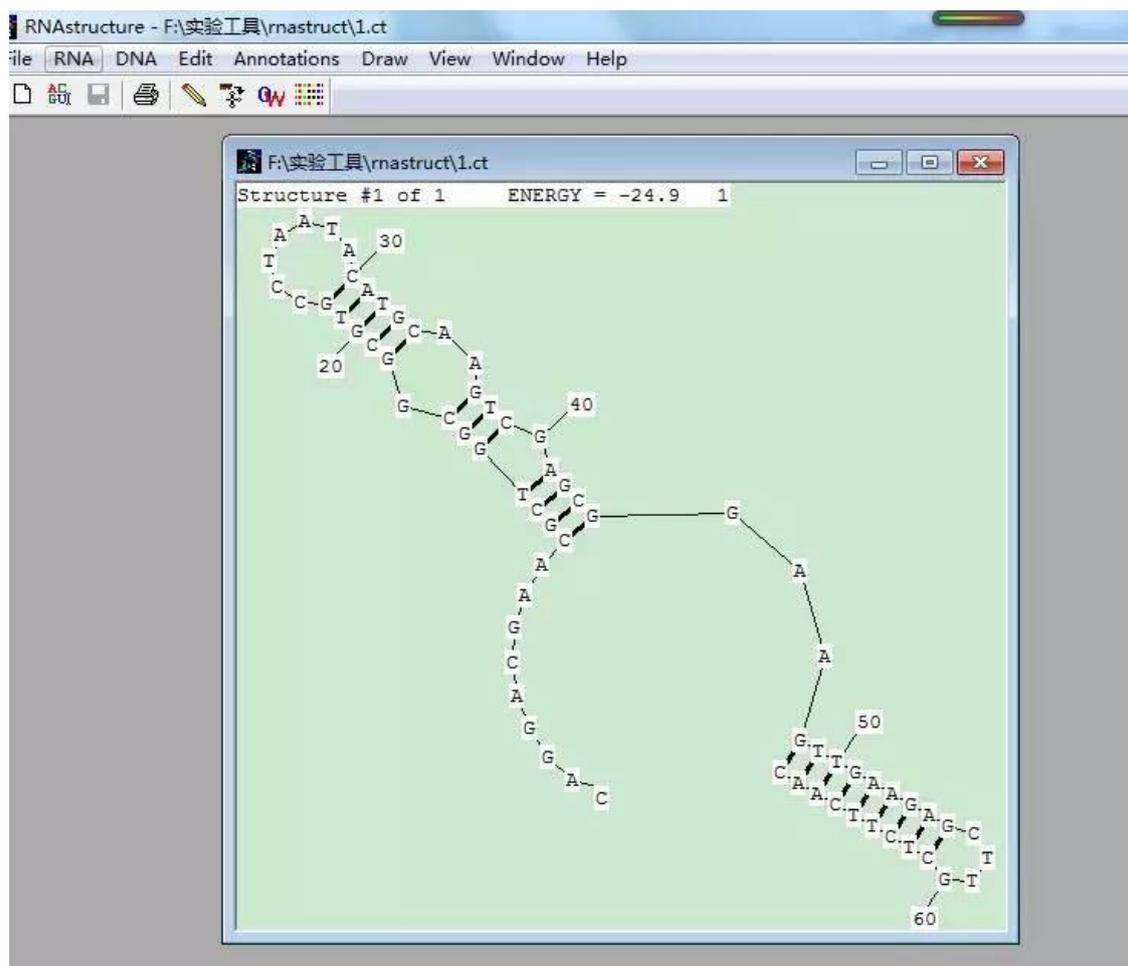
点击“Temperature”和“Maximum Loop”可以设置温度和最大茎环数~



经历了这么多的繁文缛节，终于到高潮了！点击 RNA Fold 窗口中的“START”，再点击“Draw Structures”：



千呼万唤，终于粉墨登场，我的 RNA 二级结构：



最后，选择 Edit-Copy 菜单将结果图拷贝到剪贴板，并可复制到其它应用程序。

RNA 二级结构的预测，听起来好高大上，跟着小鱼操作一遍，你会发现其实很简单哦！

RNA 抽提的故事（干货）

作者：猫大

首先，请向下面这位帅帅的 Piotr Chomczynski 老爷爷和旁边的 Nicoletta Sacchi 老奶奶致敬!!!



Dr. Piotr Chomczynski

Dr. Nicoletta Sacchi

在很久很久以前，年轻的 Piotr Chomczynski 老爷爷和 Nicoletta Sacchi 老奶奶在美国 NIH 大院里相遇，互相感慨科研经费不好拿啊，仪器设备都贵啊，咱得省着点花钱啊，于是两人一合计，发明了简单便宜的 **TRizol** 抽提 RNA 的方法（Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. 1987. Analytical Biochemistry）。正是因为他们的发明让 RNA 抽提迅速简便，从此开启了 RNA 研究的热潮。

Nature Protocols 曾高度评价这个伟大发明“大大加快了 RNA 相关研究的进程，并使 non-coding RNAs 的发现成为可能”。



现在我们所熟知的 TRizol 是 Life Technologies 公司的商品名，而同样的试剂在 Piotr Chomczynski 老爷爷创办的 MRC 公司则被命名为 **RNAzol**（据 Piotr Chomczynski 老爷爷自己透露，他们已经将 RNAzol 改进，使抽提得到的 RNA 无基因组 DNA 残留）。事实上，这种 RNA 抽提的方法应该叫做“**异硫氰酸胍-酚-氯仿抽提法**”。

TRizol 作用原理:

在匀质化或溶解样品中，TRizol 试剂可保持 RNA 的完整性，同时能破坏细胞及溶解细胞成分。加入氯仿离心后，裂解液分离成水相和有机相。RNA 存在于水相。水相转移后，RNA 通过异丙醇沉淀回收。移去水相后，用乙醇沉淀可从中间相得到 DNA，加入异丙醇沉淀可从有机相得到蛋白质。

需自备的耗材试剂:

- **RNase free 的一次性带盖透明聚丙烯管**（比如 AXYGEN 的 1.5ml EP 管，RNase free 的，可以拆包即用。话说，我要不要问 AXYGEN 收广告费啊ヽ(´▽`)/?)
- **RNase free 的枪头**（比如 AXYGEN 的 RNase free 的枪头，有盒装的和袋装的，拆包即用）
- **RNase free 玻璃瓶**：玻璃瓶 200°C 烘烤 2h 即可去除 RNase，塑料瓶盖可浸泡 10 分钟的 0.5 M NaOH 溶液，然后用 RNase free 水彻底冲洗，并高压蒸汽灭菌。
- **氯仿**（国产分析纯的即可，比如国药集团产的）
- **异丙醇**（国产分析纯的即可）
- **RNase free 水**：即 DEPC treated 水。把水加入 RNase-free 玻璃瓶中，加入 0.1% (v/v) DEPC 用力摇匀，37°C 过夜，高温高压灭菌。灭菌时瓶口需拧松，DEPC 受高温会分解出大量 CO₂，注意安全！
- **75%乙醇**（无水乙醇溶于 RNase free 水中）

简明抽提流程:

裂解

- a) 新鲜取材的组织液氮急冻后，每 50-100mg 组织加 1ml TRizol，使用强力匀浆机匀浆；

b) 贴壁细胞则弃培养基后每 87.5px 皿中加入 TRizol 试剂 1ml 吹打裂解;

c) 悬浮细胞则离心沉淀细胞弃培养基, 每 $5-10 \times 10^6$ 个细胞中加入 1ml TRizol 吹打裂解。

Tips: 使用 TRizol 试剂前避免洗涤组织和细胞, 因为这增加了 mRNA 降解的可能性。

↓

室温孵育 5-10min

↓

每 1ml TRizol 中加 200ul 氯仿, 用手大力摇管 15s,

室温孵育 2-3min

↓

2-8°C、12000 g×15min

离心后, 混合物分离为下层红色的酚-氯仿相、中间相以及上层无色水相。RNA 存在于水相。

↓

转移水相到一个新管, 加入 500ul 异丙醇上下颠倒混匀, 室温孵育 10min

Tips: 转移水相时, 枪尖随着液面下移而下移, 避免扰乱分层, 慢慢吸取, 避免吸到中间相和下层有机相, 更不要贪心吸太多, 吸大约 400ul 就好。

↓

2-8°C、12000 g×10min

往往离心前 RNA 不可见, 离心后再管侧面和底部形成白色沉淀

↓

弃上清，1ml 75%乙醇洗涤一次，2-8°C、7500 g×5min

Tips: 加入 75%乙醇时轻轻加进去就好，尽量不要把 RNA 沉淀吹散，把沉淀保持在原位最好了，因为有时候 RNA 太少，吹散了再离心下来时 RNA 碎片不一定能聚集到一起形成肉眼可见的沉淀，导致后面的“盲操作”。而不小心吹散的话也没关系，对 RNA 质量不会有影响。

↓

尽量吸除上清，室温干燥 5-10min，以 RNase free 水溶解，并保存于-70°C

Tips: 密切注意 RNA 沉淀的干燥程度，不要完全干燥，这将大大降低其溶解度。部分溶解的 RNA 其 A260/280 比值会偏低。最佳干燥度为 RNA 沉淀仍然是白色的，微微湿润呈啫喱状。

OK，搞定！



附言：猫大一直坚信，只要一直奔跑，那一边就是天涯海角！小伙伴们，跟猫大一起加油吧!!!
▽ #)



小改变，大不同——RNA Trizol 抽提

作者：老谈

PCR、qRT-PCR 最最初始，都离不开 RNA 的抽提，RNA 质量的好坏，直接影响到后续的反转录及 PCR 等过程。很多时候，小伙伴们明明跟着 Trizol 步骤一步一步来的，谨小慎微，不敢懈怠，但就是 RNA 抽提不过关。其实 Trizol 抽提 RNA 是个细活儿，小伙伴们根据自身的实战经验，做一下优化很有必要~

Trizol 标准抽提步骤（打勾勾的自然是要注意的地方）：

1. 将裂解后样品或匀浆液室温放置 5-10 min，使得核蛋白与核酸完全分离。

✓ 样品中如含有较多的蛋白质、多糖、脂肪或其他细胞外基质，可以 12,000 rpm 离心 10 min，移去漂浮的油脂，取上清。

2. 加入 0.2 ml 氯仿，剧烈振荡 15 sec，室温放置 3 min。12,000 rpm 4°C 离心 10 min。

✓ 如不能旋涡混匀，可手动颠倒混匀 2 min。

✓ 样品会分成三层：上层水相，中间层和下层有机相。RNA 在上层水相中。

3. 吸取上层水相转移至干净的离心管中，加入等体积异丙醇，混匀，室温放置 20 min。

✓ 不要吸取任何中间层物质，否则会出现染色体 DNA 污染。

4. 12,000rpm 4°C 离心 10 min，弃上清。

✓ 离心前 RNA 沉淀通常是不可见的，离心后在管侧和管底形成胶状沉淀。

5. 加入 1 ml 75%乙醇洗涤沉淀。12,000 rpm 4°C 离心 3 min，弃上清。室温干燥 5-10 min。

✓ 75%乙醇用 DEPC 处理过的水配制。

✓ 通常 1 ml Total RNA Extractor 需用 1 ml 75%乙醇洗涤沉淀。

✓ 不要倒出沉淀，剩余少量液体短暂离心，然后用枪头吸出，不要吸沉淀。

✓ 不要晾的过干，RNA 完全干燥后很难溶解，大约晾干 5 min 左右。

6. 加入 30-50 μ l RNase-free ddH₂O，充分溶解 RNA。将所得到的 RNA 溶液置于 -70°C 保存或用于后续试验。

✓ 对于肝、胰腺、肾等组织中 RNase 含量很高，沉淀用 100%去离子甲酰胺溶解。

额外的小 TIP~（第三步）:

很多刚开始学抽提的小伙伴吸取上层水相总是吸到中间层物质。老谈觉得，既然吸上层手容易抖，那不妨吸下层遗弃然后把剩余的再进行离心。这样多一步，离完心剩下的基本就是上层水相和中间层沉淀，再吸取想要的目标就能轻松改掉手抖啦~

Protocol 改善的地方~(哈哈，还是第三步):

3.吸取上层水相转移至干净的离心管中，加入 2.5 倍体积乙醇，1/10 倍体积 3M 醋酸钠，以及糖原。混匀，-80°C 放置 30-60min。

- ✓ 不要吸取任何中间层物质，否则会出现染色体 DNA 污染。
- ✓ 加入糖原，使溶液中糖原的最终浓度达到 50ng/μl。
- ✓ 混匀后，-80°C 放置 30 -60min，适当增长孵育时间或者降低孵育温度将有助于小 RNA 的沉降。
- ✓ 以取 500μl 上层水相为例，则需加入 1250μl 乙醇，50μl 醋酸钠以及 4.5μl 糖原原液（原液浓度为：20mg/ml）。

新型 RNA-RNA 相互作用工具诞生

作者：麦子

非编码 RNAs (ncRNAs) 种类颇丰：rRNA、tRNA、snoRNA、miRNA、lncRNA……我们曾经相信，ncRNAs 只是制造转录 mRNA 时没有作用的副产品，然而逐渐发现了它们对基因调控的关键作用，或为其他蛋白质和 RNA 提供了一个支架，但对这些 ncRNAs 如何相互作用以及控制细胞功能所知甚少，偶尔掀开了其裙角却发现它还穿着 N 条打底裤……

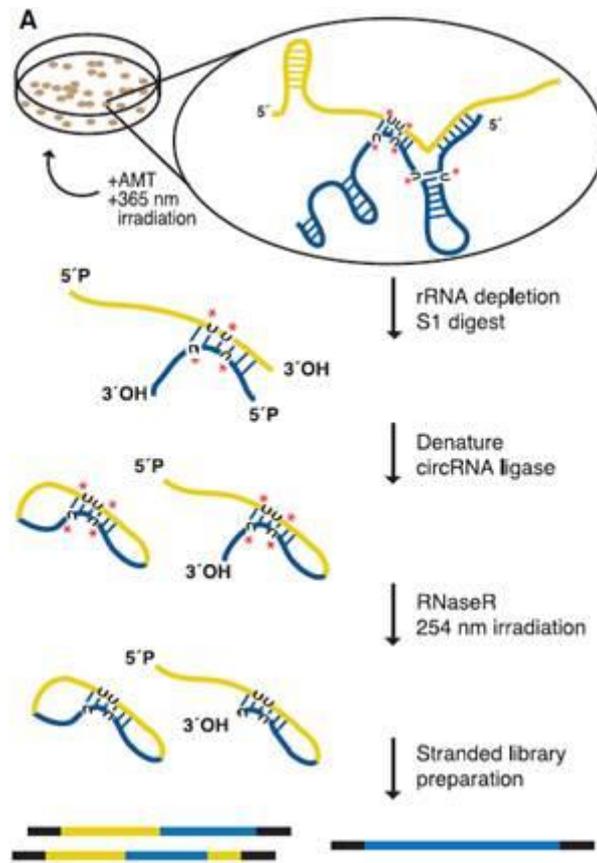
对 ncRNAs 研究限制的最大因素是缺乏可以使用的 RNAs 互作方法，《Molecular Cell》上最新的一篇论文介绍了研究进行 ncRNAs 的系统功能分析，捕捉不同 RNA 分子之间的相互作用的新技术 LIGR-seq。当两个 RNA 分子有相匹配的序列时，它们会像尼龙搭扣一样粘在一起。然后，将成对的 RNA 结构从细胞移除，并采用最先进的测序方法进行分析，以精确地确定粘在一起的 RNA。或许正是我们所需要的。

LIGR-seq 技术总览

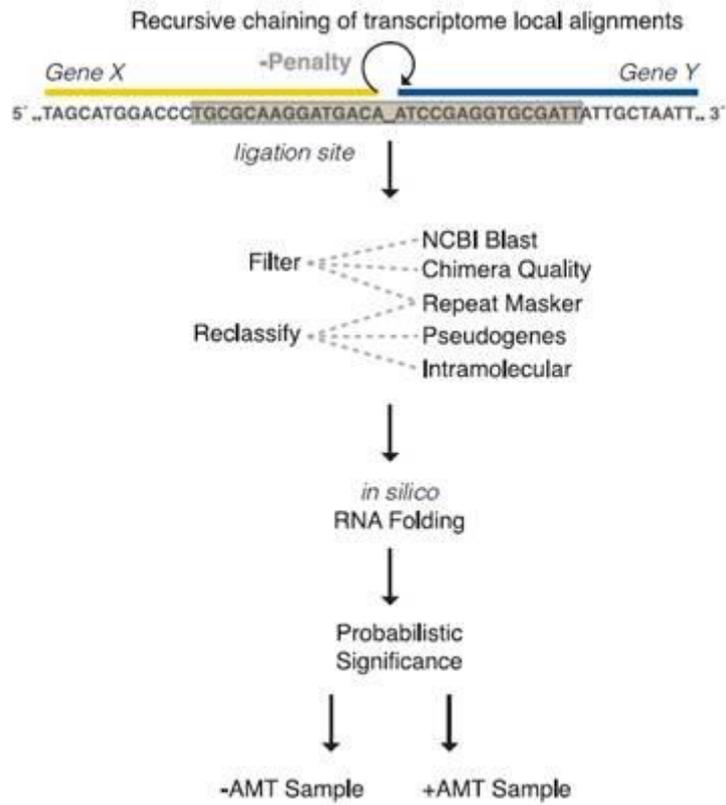
(A) LIGR-seq protocol 原理图

细胞与 AMT（可以嵌入 RNA 二倍体）一起孵育，365 nm 的紫外光辐射。RNA 提取后使用 DNase1 处理，去除 rRNA；接下来，使用 S1 核酸酶消化 RNA 生成的末端可以与 circRNA 连接酶的连接反应兼容。使用 RNase R 富集交联的 RNA，254 nm 的紫外光辐射逆转交联。平行

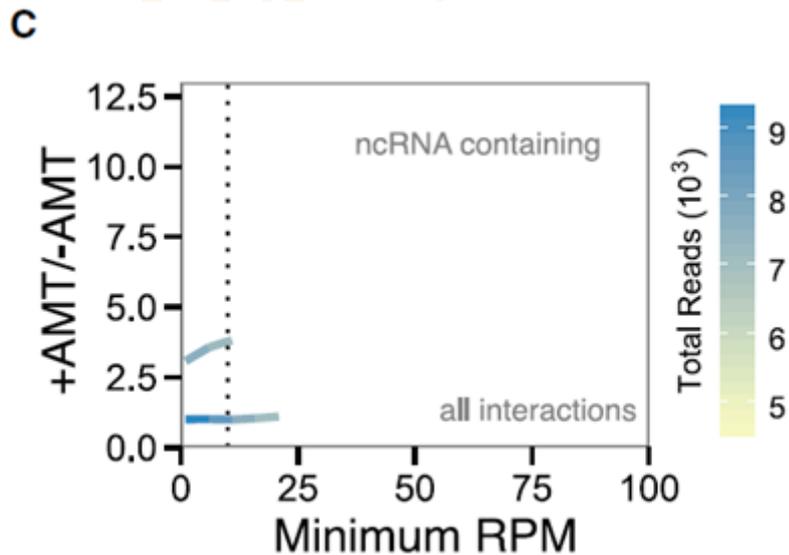
处理的对照样本以不添加 AMT 或者连接酶的方式处理。



(B) 对 RNA-RNA 嵌合阅读框显著性检测和打分的“Aligator”分析方法原理图

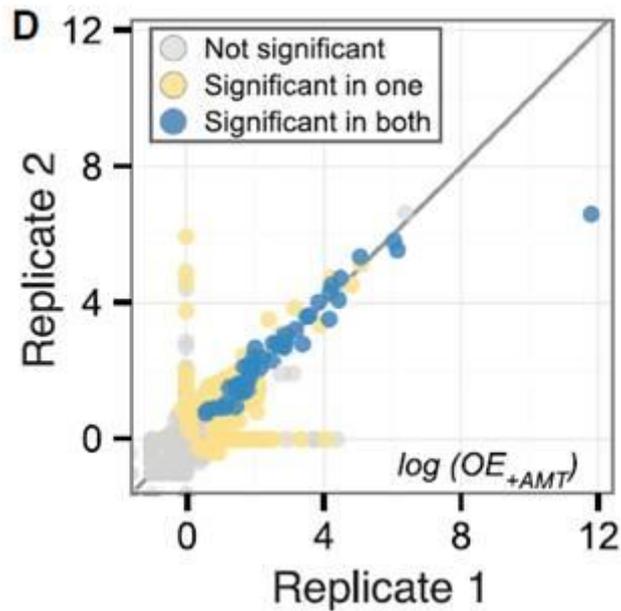


(C) 嵌合阅读框比例代表着+AMT VS-AMT s 样本中显著的 RNA-RAN 相互作用， +AMT 样本中观察到的相互作用显著高于-AMT s 样本。



(D) “观察到的/预测的”+AMT VS-AMT 样本中相互作用显著性（蓝色）和非显著性（黄色）的

Log 倍数比例相关性。在+AMT 样本中，“观察到的/预测的比例（OE）”高于-AMT 样本。



LIGRseq 检测优势

- 你不需要通过芯片等常规方法预选 RNA，就能看到在细胞中整体发生了什么，以及它们是怎样影响细胞功能的；
- 可以观察发生在活细胞内的 RNA 相互作用
- 本文 LIGR-seq 数据揭示了小核仁 RNA(snoRNA)和 mRNAs 之间的相互作用，来控制靶标 mRNA 的稳态水平。所以通过该方法，我们可以揭示出 snoRNA 直接影响哪些 mRNA，从而影响蛋白质的表达和丰度，从而在细胞生物学中添加了一个新的控制水平。未来研究人员将利用这个方法在不同细胞、组织、疾病进展阶段和物种类型中检测 RNA 的表达丰度，进一步促进我们对多种转录涉及的 ncRNAs 角色理解，让我们拭目以待。

2.4 RNA 电泳

练好几招“把妹”套路，不怕 RNA 妹子玩失踪

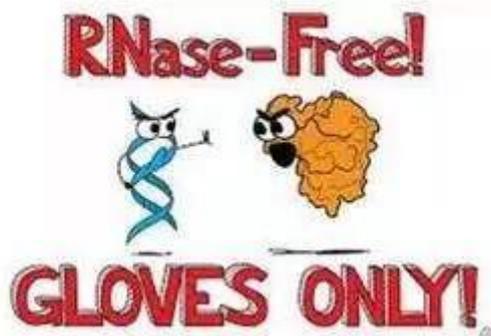
作者：子非鱼

现如今，在 RNA 提取的江湖上，小鱼我终于算是学成出山了，并走上了 RNA 提取的巅峰。回想起当年抽提 RNA 的青葱岁月，真是往事不堪回首！RNA 向来身娇肉贵，一直都不是一个让人省心的主儿，稍有不慎，就会分分钟消失给你看。为了不让大家重蹈覆辙，小鱼这就告诉你如何达到提取 RNA 的最高境界。



免除 RNase 的困扰

众所周知，RNA 分子异常脆弱，很容易就会被无所不在的 RNase 降解，轻轻松松的就让实验人员的种种努力付之东流。尤其是当样品极其稀少且珍贵时，RNA 的降解更是让各位小伙伴们想自挂东南枝。因而 RNase 可谓是 RNA 提取的大敌，那么为了保护好 RNA 分子，就必须把 RNase 给 KO 掉。



当然针对外来的敌人，只要注意这三个小细节，那么绝对可以克敌制胜。

- 1) **严格戴好口罩、手套。**手指和呼吸是外源性 RNase 的主要来源，所以在提取 RNA 时，一定全副武装起来，才好擒获 RNA 分子。
- 2) **实验中所涉及的离心管、枪头、移液器、实验台面一定要经过彻底处理。**比如，离心管和枪头要用 0.1%DEPC 浸泡后并高压灭菌处理，移液器、实验台面要用 75%的酒精擦拭过，玻璃器皿应在使用前用 180°C的高温下干烤 6h 或更长时间。
- 3) **实验所涉及的试剂/溶液，尤其是水，必须确保 RNase-Free。**另外，还需要注意 RNA 的保存时间，一般 RNA 37°C稳定存放 1 天，25°C稳定存放一周，4°C可存放一个月或-20°C长期存放。

可是有时即便小伙伴已经如此小心翼翼了，RNA 分子仍会消失的无影无踪，细究其原因，才发现竟是内源性 RNase 在搞鬼，这不禁让人感叹道，不是我们太粗心，实在是敌人太狡猾。为了打击内源性 RNase 的嚣张气焰，我们只能千方百计的灭活内源酶，因而便诞生了以下三个妙招。

- 1、**选择合适的匀浆方法。**新鲜样品取材后应立即置于液氮中速冻，然后可移至-70°C冰箱中保存。在碾磨前，碾磨用具也必须预冷。在碾磨过程中，一边碾磨，一边补充液氮。样品碾碎后，在液氮刚刚挥发完时，将样品迅速转移到含裂解液的容器中，立即混匀匀浆。



2、选择合适的裂解液。现有市场上常用的裂解液几乎都能抑制 RNase 活性。但是高内源酶含量的样品，如肝脏、脾脏等组织，建议使用含苯酚的裂解液。苯酚的灭活内源酶的能力还是很强的。

3、控制好样品的起始量。如果样品的个头太大，细胞中就会有些“漏网之鱼”免于和裂解液接触，致使 RNA 很快就会被内源酶降解。因而，起始量不要太大，如果组织块过大，可以将切碎后再抽提 RNA。

明确抽提 RNA 的目的

一般，抽提 RNA 的目的无外乎有两个。首先，最直接的目的就是要让 RNA 彻底地完整的释放出来。此时对样品的处理就至关重要，如果样品是细胞，则无须破碎即可直接匀浆；如果是组织甚至器官，那就需要破碎后才能匀浆；如果是酵母菌和细菌，则需要先用相应的酶破壁后才能匀浆。

其次，RNA 在不同的实验中其质量的要求是不一样的，那么后续实验就是我们必须要考虑的。通常 cDNA 文库构建要求 RNA 完整而无酶反应抑制物残留；Northern 对 RNA 完整性要求较高，对酶反应抑制物残留要求较低；RT-PCR 对 RNA 完整性要求不太高，但对酶反应抑制物残留要求严格。因而，不用每次实验都以获得最高纯度的 RNA 为目的，从而造成不必要的浪费。

RNA 提取之疑难杂症

1.RNA 产量低

原因分析	解决方法
1、样品裂解或匀浆不彻底	液氮淹没尽量完全，加入裂解液RL后剧烈震荡或用枪头吹打
2、使用的样品或裂解物在-20℃或-70℃存放太久	应尽快处理样品或裂解物，提取时适量多加部分样品
3、组织本身RNA含量少	不同类型的组织和细胞含有不同量的RNA，对于含量少的组织应当适当提高起始处理量
4、超过了吸附柱的最大吸附能力	同一个样品用多个吸附柱，洗脱后合并得到的RNA
5、去蛋白质RE和漂洗液RW后忘记加乙醇	初次实验时，漂洗液RW和70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇

2. OD260/OD280 < 1.6

原因分析	解决方法
1、检测吸光度时，RNA样品不是溶于TE，而是溶于水	检测时用TE稀释样品
2、污染了蛋白或苯/酚	吸取上清水相时不要吸取到中间相和下层有机相

3. 基因组 DNA 污染

原因分析	解决方法
1、起始样品超出了裂解液的处理范围	选择合适的起始处理量
2、样品中含有有机试剂（乙醇、DMSO等），强缓冲液或碱性溶液	避免这些可改变裂解液RL性质或PH值的物质
3、吸取上清时吸入了中间相	吸取上清水相时不要吸取到中间相

4. RNA 降解

原因分析	解决方法
1、RNA提取所用物品和试剂中没有灭活RNA酶	按照注意事项准备提取RNA的各种用品
2、组织去除后没有马上处理或冷冻，提取前已降解	应尽快处理组织，不能及时处理的组织应尽快保存于液氮或-70℃
3、样品提取过程中降解	提取动作尽量要快，离心应低温进行，在冰上进行操作。

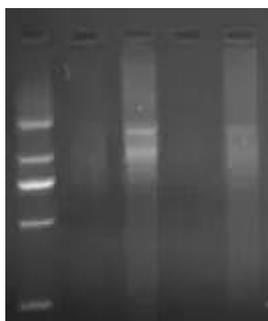
5.下游的 RT-PCR 实验不成功

原因分析	解决方法
1、吸附柱取出时下端碰到了收集管里的漂洗液，造成洗脱下来的RNA中含有乙醇，抑制了逆转录反应	小心取出吸附柱，在室温中晾几分钟，让残留乙醇挥发。
2、残留了多糖多酚抑制物	选择合适的RNA提取试剂盒去除多糖多酚

RNA 电泳图谱剖析

提取RNA后,为了更好的进行后续的实验反应需要通过琼脂糖电泳来判断RNA质量的好坏。在此，小鱼将剖析电泳图上的秘密，帮助大家提高RNA抽提的成功率。

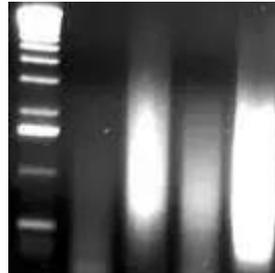
1.RNA 条带不亮或缺失



原因分析：1) 上样量不足。2) RNA 跑出凝胶。电泳至溴酚蓝至凝胶的 2/3 即可停止电泳。3) RNA 在凝胶中发生扩散。避免长时间的电泳，否则小片段容易扩散。5) RNA 降解。最大限度减少在紫外线下暴露的时间，使用新鲜电泳缓冲液、新制的凝胶，电泳槽及制胶的模

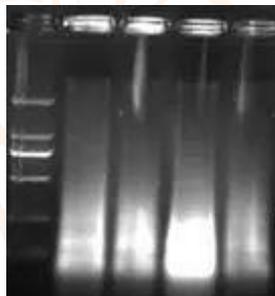
具梳子等用双氧水浸泡，高电压短时间电泳（20min）。也可能使用的组织材料不够新鲜（冷冻的材料必须在化冻之前将其磨碎）。

2. RNA 条带弥散



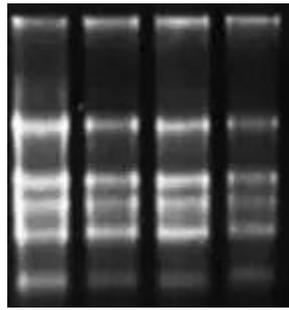
原因分析：1) RNA 被核酸酶降解。要用新的缓冲液，制胶用的模具要清洁，枪头要灭菌。2) 电压过高造成电流过大所造成的。一般为 5—8V/cm。为了增加条带的清晰度，电泳开始的几分钟建议使用低电压。3) 上样量过大。根据沉淀量的多少确定点样的量，一般 1—3ul。

3. 点样孔发亮



原因解析：1) 上样量过大。2) 胶孔未凝固好，使样品无法往前移动。3) RNA 样品中含有污染物，如残留的蛋白质容易引起此现象。可能 trizol 量太少，应加大 trizol 用量。另外若残留 DNA 也应考虑加大 trizol 用量。

4. 出现多条带



原因解析：1) RNA 降解。提取过程中出现降解或电泳过程中出现降解（可能性较小）。2) 上样量过大。RNA 由多种类型组成，若上样量过大则会导致各种类型的 RNA（tRNA，mRNA 等）均会出现条带。

2.5 非编码 RNA 研究套路

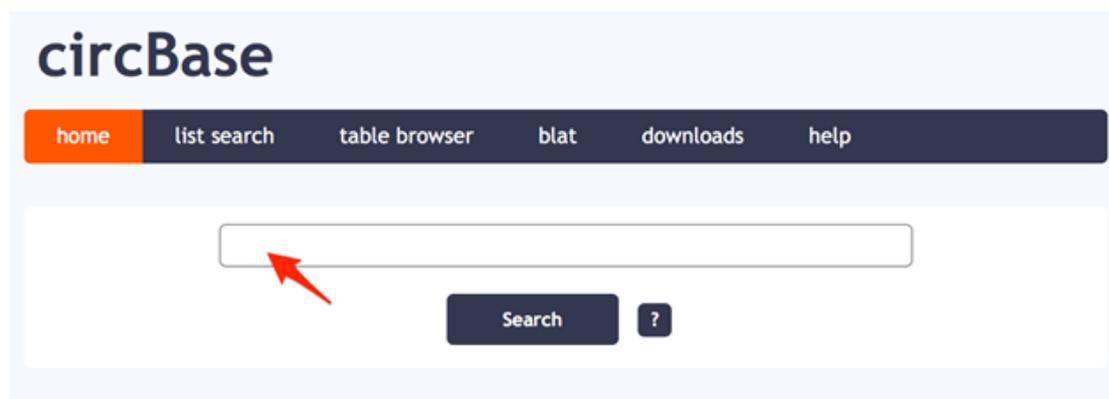
蹭自然热点 circRNA, 不会 circbase 怎么行?

作者：FoMo

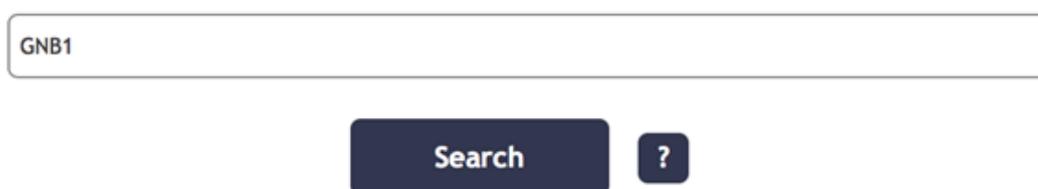
昨天自然的结果公布了，想必今年的 circRNA 应该是个热点。

但是研究基因怎能少了数据库的帮助呢。下面我介绍一个 circRNA 的数据库：circBase (<http://www.circbase.org>)，这个数据库主要的功能有：

- 1、基于序列的搜索；
- 2、通过标识符、基因描述、基因组位置等搜索数据库；
- 3、使用 table browser 通过设定一组条件来检索一组数据集（用法类似 UCSC）；
- 4、以多种形式导出表格；
- 5、导出含基因组序列的 FASTA 文件。最近一次的更新在 17 年的 7 月。



在这个搜索框中输入要搜索的内容，可输入的内容有：circBase 标识符（例如 mmu_circ_0000010）、refseq 转录本 ID（NM_027671），基因名称（Pvt1），genomic coordinates（基因组位置的输入格式和 UCSC 的一样：chr:start-end，如 chr11: 123456-7891011）或 Gene Ontology term identifiers。搜索不区分大小写。



比如我想搜索和 GNB1 相关的 circRNA，输入后点 Search。

circBase

home list search table browser blat downloads help

Export results: xls xlsx txt csv fasta

organism	position (genome browser link)	strand	circRNA ID	genomic length	spliced length	samples	score	repeats	annotation	best transcript	gene symbol	circRNA study
hsa	chr11:1716724-1718492	-	hsa_circ_0009325	1768	1768	Shuk, K362, Homin, HepG2, Sknsbra	NA, NA, NA, NA, NA	NA	ANNOTATED, coding, OVERLAPTX, OVERXON, UTR3	NM_002074	GNB1	Selzman2013
hsa	chr11:1716724-1718876	-	hsa_circ_0009326	2152	1884	Huvec, Ag0450	NA, NA	NA	ANNOTATED, CDS, coding, OVERLAPTX, OVERXON, UTR3	NM_002074	GNB1	Selzman2013
hsa	chr11:1716724-1724750	-	hsa_circ_0009327	8026	2370	BJ, Ag0450, A549	NA, NA, NA	NA	ANNOTATED, CDS, coding, OVERLAPTX, OVERXON, UTR3	NM_002074	GNB1	Selzman2013
hsa	chr11:1716724-1736020	-	hsa_circ_0009328	19296	2533	Huvec, Huvec	NA, NA	NA	ANNOTATED, CDS, coding, OVERLAPTX, OVERXON, UTR3	NM_002074	GNB1	Selzman2013
hsa	chr11:1716724-1737977	-	hsa_circ_0009329	21253	2397	K562	NA	NA	ANNOTATED, CDS, coding, OVERLAPTX, OVERXON, UTR3	NM_002074	GNB1	Selzman2013
hsa	chr11:1716724-1749314	-	hsa_circ_0009330	32590	2743	Huvec, BJ, Sknsbra	NA, NA, NA	NA	ANNOTATED, CDS, coding, OVERLAPTX, OVERXON, UTR3	NM_002074	GNB1	Selzman2013

这是出来的结果，有物种信息、染色体中的位置，在双链 DNA 的哪条链上等，蓝色的内容可以进一步点进去查看；Export results 中点击可下载结果。

list search table browser blat downloads help

Organism: Human (hg19)

Search list:

CTLA4
ERBB2
ARHGAP10
GBE1
METAP2

Upload file: 选取文件 未选择文件

Search Reset Form ?

使用 list search 可以搜索多个 circRNA。在 Organism 中选好物种，有人、小鼠、线虫等，在 list 中输入 circRNA 的名字或者与 circRNA 相关的基因名即可。

home list search table browser blat downloads help				
Putative spliced circRNA sequences				
<i>Homo sapiens</i>	hg19 assembly	fasta		
<i>Mus musculus</i>	mm9 assembly	fasta		
Custom scripts for finding circRNAs				
find_circ.tar.gz	Scripts used in Memczak et al. (2013)	.tar.gz		
circBase ID cross-references				
<i>Homo sapiens</i>		.txt		
<i>Mus musculus</i>		.txt		
<i>C. elegans</i>		.txt		
Database schema				
<i>Homo sapiens</i>	database schema graph for <i>H.sapiens</i> tables	.png		
circRNAs				
<i>Homo sapiens</i>	all <i>Homo sapiens</i> circRNAs	.txt	.xlsx	.bed
Rybak-Wolf 2015				
cerebellum				
diencephalon				
frontal cortex				
occipital lobe				
parietal lobe				
temporal lobe				

在 download 中可以下载各物种中的 circRNA 数据，如果发现自己测序得到的 circRNA 不在这里面，那有可能就是新发现的 circRNA 啦。

搞懂 RNA 命名，miRNA、lncRNA、circRNA 不再傻傻分不清

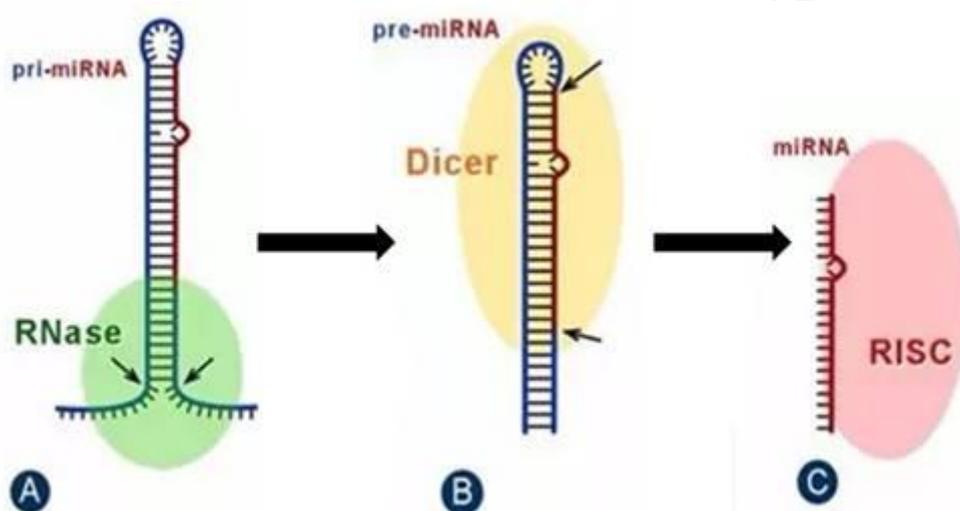
作者：子非鱼

最近，ncRNA 的世界里百花齐放，miRNA、lncRNA、circRNA 三个“大腕”轮番上阵，真真是你

方唱罢我登场，让人感到眼花缭乱、应接不暇。ncRNA 的故事个个精彩纷呈，好评如潮，晋升为科研界的大 IP。可是故事中的角色太多，让绝大多数“脸盲”的科研者头疼不已。为了增加各位“大腕”的辨识度，今天就和大家聊一聊 ncRNA 命名的那些事儿。

miRNA 变身记

miRNA 可以算是老牌明星了，一直占据 RNA 世界中北方辽阔的疆土。其中，pri-miRNA，pre-miRNA，mature miRNA 是 miRNA 的三种形态。

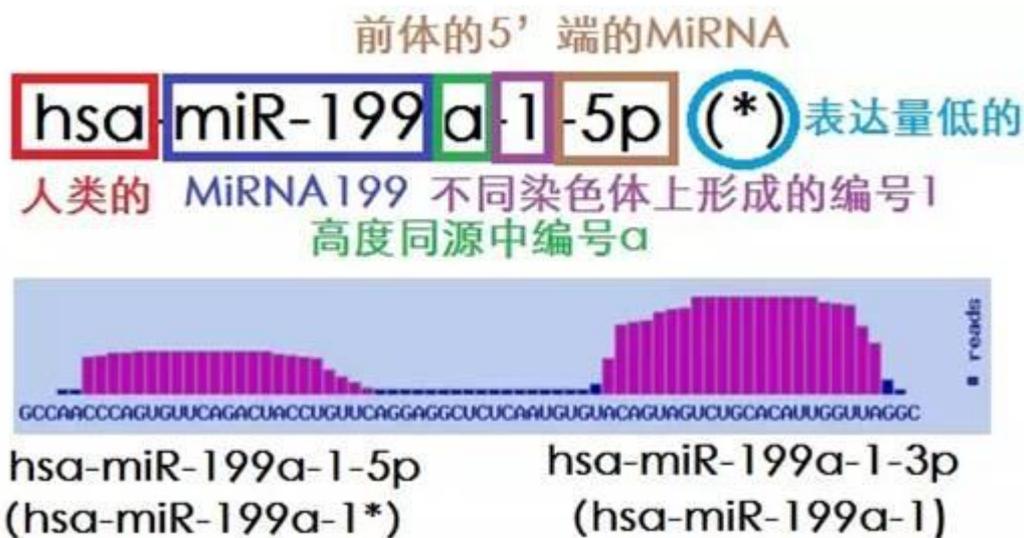


pri-miRNA→pre-miRNA→miRNA 加工流程示意图

miRNA 的命名规则(以动物 miRNA 为例)

一般，pre-miRNA 以“mir”命名，其编号以“MI”编号，如人的 miRNA 122 的前体 ID 为 hsa-mir-122，Accession 为 MI0000442；而 miRNA 的成熟链以“miR”命名，其编号以“MIMAT”编号，如人的 miR-122 的一个成熟体的 ID 为 hsa-miR-122-5p，Accession 为 MIMAT0000421。

可是仍有小伙伴对 miRNA 名字中的 hsa、3p、5p 等符号表示一脸懵逼，完全看不懂有没有？在此小鱼为大家解读一下，如下图。



其中，在确定命名规则之前发现的 miRNA，依然保留原来名字，如 hsa-let-7。miRNA 后的阿拉伯数字表明被发现的先后顺序，如 hsa-miR-122；尽管曾经还用*表明表达量低的 miRNA，但现在这种命名方式已被取消。

此外，病毒 miRNA 的命名方式与动物相一致，但是植物的却有些与众不同。通常植物的 Pre-miRNA 以 MIR 命名，如 ath-MIR156a；miRNA 则以 miR 来命名，如 ath-miR156a。注意：MIR/miR 与命名顺序之间没有“-”。

lncRNA 的华丽转变

曾经 lncRNA 这匹千里马因为缺少伯乐的赏识以及伯乐尚不到火候的技术而备受冷落，可如今 lncRNA 已经风靡全球，其相关研究也是如火如荼。然而对刚涉及这一领域的菜鸟而言，lncRNA 的名字就像一锅大杂烩，五花八门的，看的人晕晕乎乎的。

实际上，目前 lncRNA 的命名还没有一个统一的原则，但为了让 lncRNA 的命名具有唯一性、准确性并最大程度上反映其功能，雨果基因命名委员会（HGNC，唯一的制定人类基因命名标准的官方授权机构）提供了一个命名指导指南，以供参考。

lncRNA 命名指南

首先，每条 lncRNA 的名字应具有唯一性，不能发生一个基因几个名字或存在重名的现象。因而，作者在发表新 lncRNA 时，可先获取 HGNC 的认可，如果作者发布的名字已在其他地

方使用过，HGNC 将会指定一个新名字供作者选择。

lncRNA 的名字应是描述基因的缩写，便于人们理解名字的含义。如 BANCR 就是 BRAF-activated non-protein coding RNA 的缩写。

lncRNA 的名字应仅由拉丁字母和阿拉伯数字组成，不应出现标点符号。连字符仅在特殊场合使用，如：反义编码蛋白基因可在标识中加连字符（BACE1-AS 就是 BACE1 antisense RNA 的名字）。

lncRNA 的名字中的字母应为大写，为了与其它种类物种的基因区别开来（如啮齿动物基因的标识只要求首字母大写，其余小写），人类基因标识中的字母都应为大写，例如 HOTAIR 基因，在人类中叫 HOTAIR，而在老鼠中写成 Hotair。

lncRNA 的名字中不应涉及具体的物种类型，例如：如果基因名字中有 H/h（代表人类），由于牵涉到同源基因的问题，就会造成一些疑惑和误导。

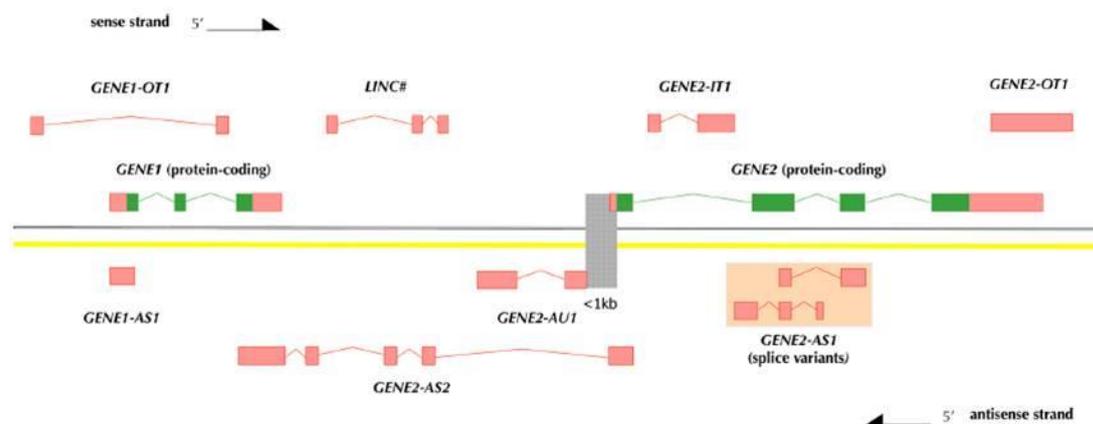
lncRNA 的命名应避免采用一些常用的词汇，否则会给分析研究带来很多问题，比如：“AIRN”基因最初公布时叫“AIR”，从公共数据库中搜索可得到 22 万条不相关的信息，而搜索“AIRN”则只有 10 条信息。

lncRNA 的命名应尽可能的反映其功能，如 XIST 基因是“X(inactive)-specific transcript”的缩写，该基因的作用是参与沉默一对 X 染色体的转录。命名的时候尽量反映基因通常的功能，而不体现其突变表型。其命名应简洁明了，不应包含以下信息：

- *具有攻击或轻蔑的色彩。
- *具有个人及地方色彩。
- *含有神化，虚构或历史人物的名字。
- *含有“臆想”和没什么意义的信息。

功能性转录假基因在命名时应保留它们假基因名称且不应改变其基于功能的名称。为了方便搜索，这个功能应加在名字的最后。eg: PTENP1 是“phosphatase and tensin homolog pseudogene 1 (functional)”。

而对于未知功能的 lncRNA 应依据基因组上下文来命名，下图则给出了系统化的命名的规则。



如果有一个很接近的蛋白编码基因，lncRNA 的名字应该以这个编码基因名字开始，再加后缀即可。

后缀的分类：

反义 (antisense, AS), eg: BACE1-AS;

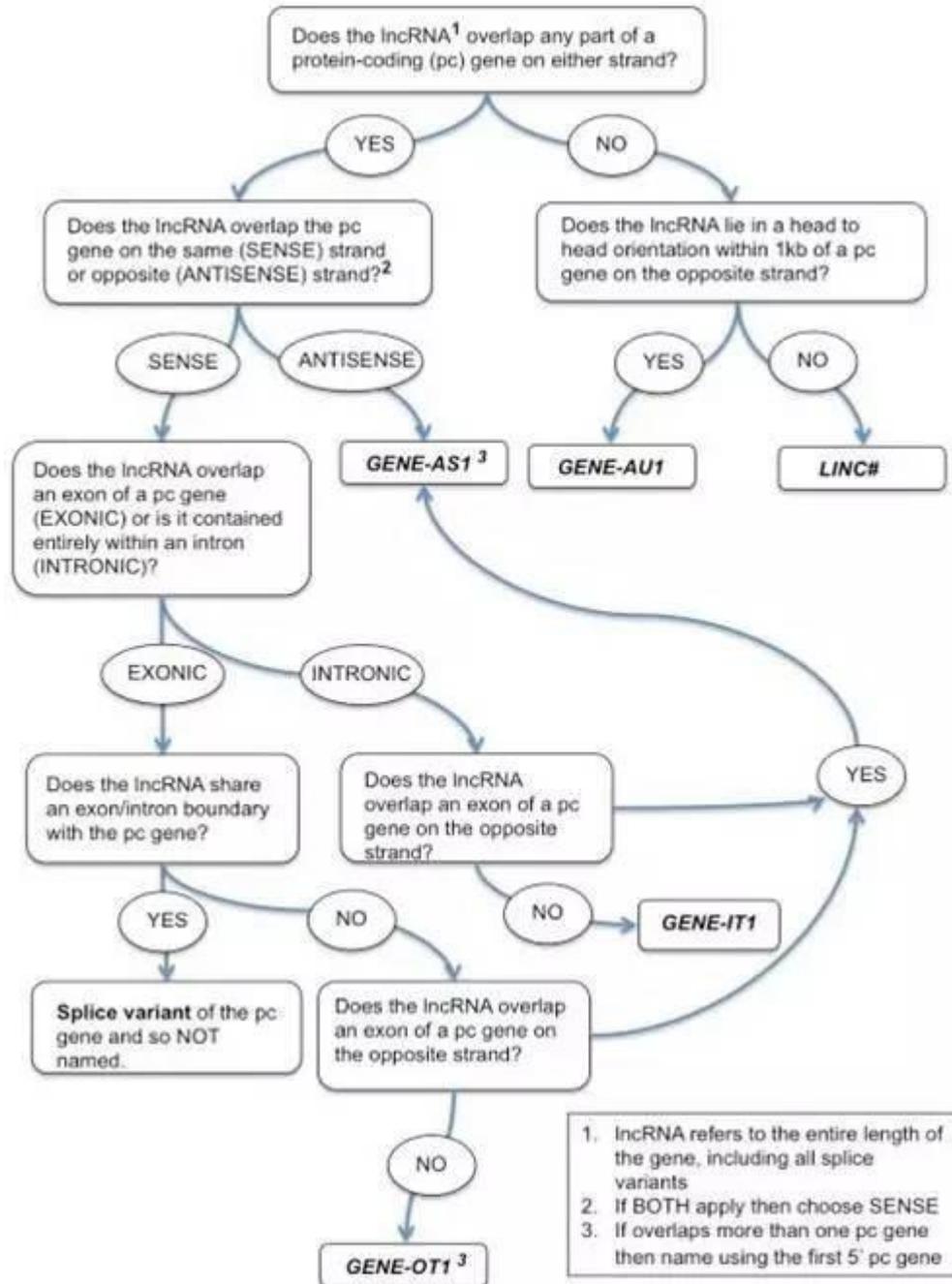
内含子(intronic, IT), eg: SPRY4-IT1;

重叠 (overlapping, OT), eg: OSX2-OT;

长链基因间 lncRNA (Longintergenic lncRNAs, lincRNAs), 以 LINC 为前缀, 数字为后缀, eg: LINC00485。

此外, 有些 lncRNA 与编码基因是头碰头 (headto head), 可推断它们拥有双向启动子, HGNC 推荐将其命名为反义上游 (Antisense upstream, AU), 例如, GENE2-AU1。

HGNC decision tree for naming lncRNA genes with unknown function



参考文献: A short guide to long non-coding RNA nomenclature

基因研究，我该拿你怎么办？

作者：老谈

有时候小伙伴们拿到一个 Gene-A，可能是芯片筛查的结果，可能是导师拍脑袋的结果，这个 A 很低调，被人研究的颇少，作为一个基础研究的新手，简直一头雾水！

神灯神灯告诉我，我该拿它怎么办？



凡是都有规律可循。如果你文献看的没有那么多，脑洞未开，下面的保守方法可以适合你进行初步的尝试。但是老谈要提醒小伙伴们不时的追踪一下文献研究进展，更多的时候不是为了知道某个分子或者某个领域研究的最新情况，这些对于我们基层科研人员的意义并不是很大；而是为了发散自己的思维，提炼别人的研究设计思路！

下面这几步，对于刚刚上手实验的小伙伴来说，应该有所帮助。

1. 确定 A 研究的价值，即临床组织样本/相关细胞系中有没有差异性表达



2. 确定 A 能够对某一细胞表型产生一定的影响



3. 确定 A 能够对小鼠的肿瘤形成的作用是否与上一步较为一致。

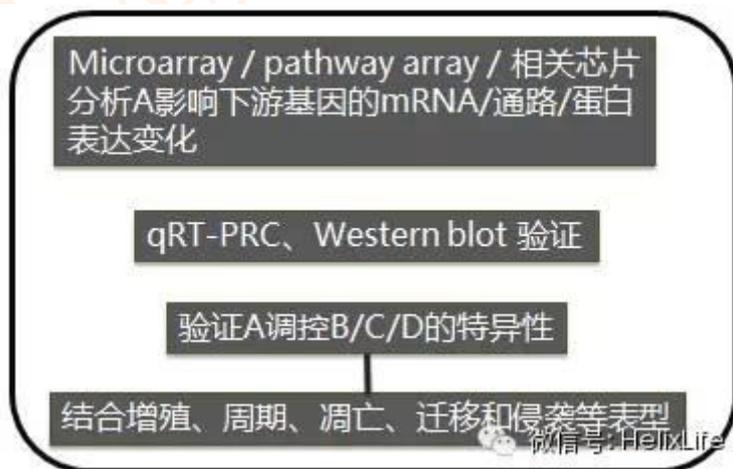
选择动物模型进行功能验证，一般选择裸鼠进行成瘤实验

裸鼠种植瘤需注意：

- 肿瘤细胞的状态
- 细胞的数量:每只注射 $2 \times 10^6 - 10^7$
- 裸鼠的选择：5-8周龄
- 种植部位：血供丰富区域，如腋窝中后部、腹股沟中上部。

微信号: HelixLife

4. 找出 A 的作用机制



另外还可以同步研究一下 A 本身是否受到甲基化或者乙酰化等表观遗传调控。

这样是否简单易懂呢？小伙伴们不妨针对自己的某基因研究，做出一个类似的技术路线图，做完一步划掉一步。那些表型也不是都做的，要看文献或者自己分析一下你研究的基因 A 是否跟一些例如增殖相关基因或者周期相关基因等有联系，或者涉及到某些明星通路等。

以上为常规手段，可为基础薄弱的小伙伴寻求大方向。如果想要高大上的研究设计，每步还请自行查阅文献加以创新。

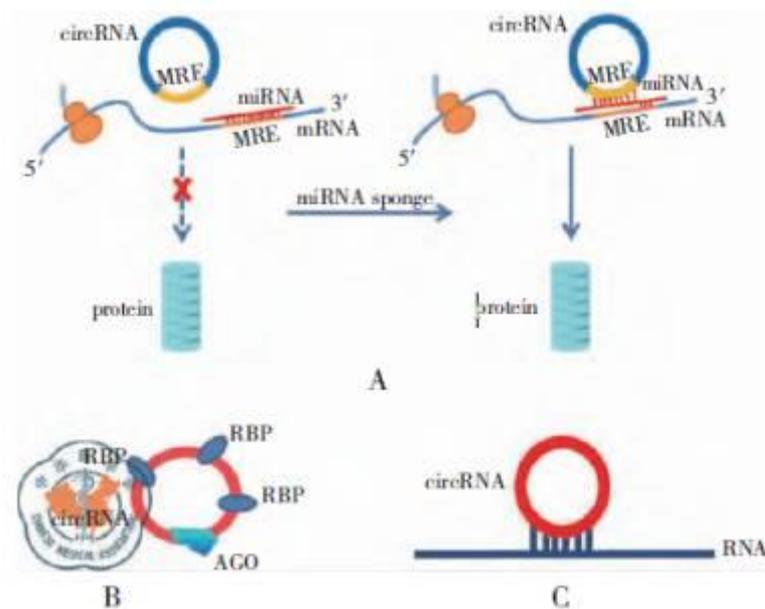
技术 | miRNA 小伙伴 circRNA 之检测知多少？

作者：燕子

小伙伴们对 miRNA 这种线状单链 RNA 一定不陌生，其在基因表达、蛋白质合成和细胞凋亡等生物过程的作用的逐渐被人们发现，发现原癌基因作用的 bantam miRNA 及两个 miRNA 水平下调与慢性淋巴细胞白血病之间有显著相关等。然而由于技术限制等原因，miRNA 的一个小伙伴—circRNA 一种环状的 RNA, 尽管 circRNA 已经被发现已有三十多年, circRNA 却一直处在被学术界忽视的地位。

但随着近年有关 circRNA 的几项突破性研究的发现，尤其是国际著名权威刊物 Nature 发表两篇有关 circRNA 生物学功能的论文，震惊学术界。

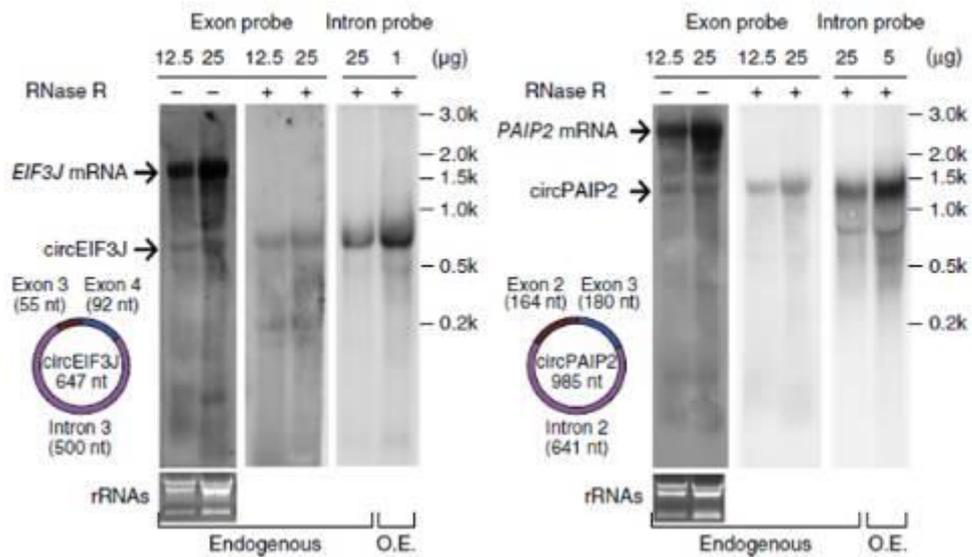
有些 circRNA 分子富含微小 RNA 结合位点，可通过充当竞争性内源 RNA 的角色来起作用，如 CDR1as 对 mi-R7 的海绵作用与肺癌、乳腺癌、胶质瘤及肌萎缩性脊髓侧索硬化等疾病发生相关。circRNA 已引起国内外学术界的关注，并掀起研究热潮。



基于 circRNA 具有以下:1)表达水平差异较大;2)不易被核酸外切酶降解;3)具有序列保守性等特点。环状 RNA(circRNA)与线性 RNA 的检测方法还是有一定差异的,下面让小编带您来了解一下目前已知的 circRNA 检测方法。

分子生物学方法

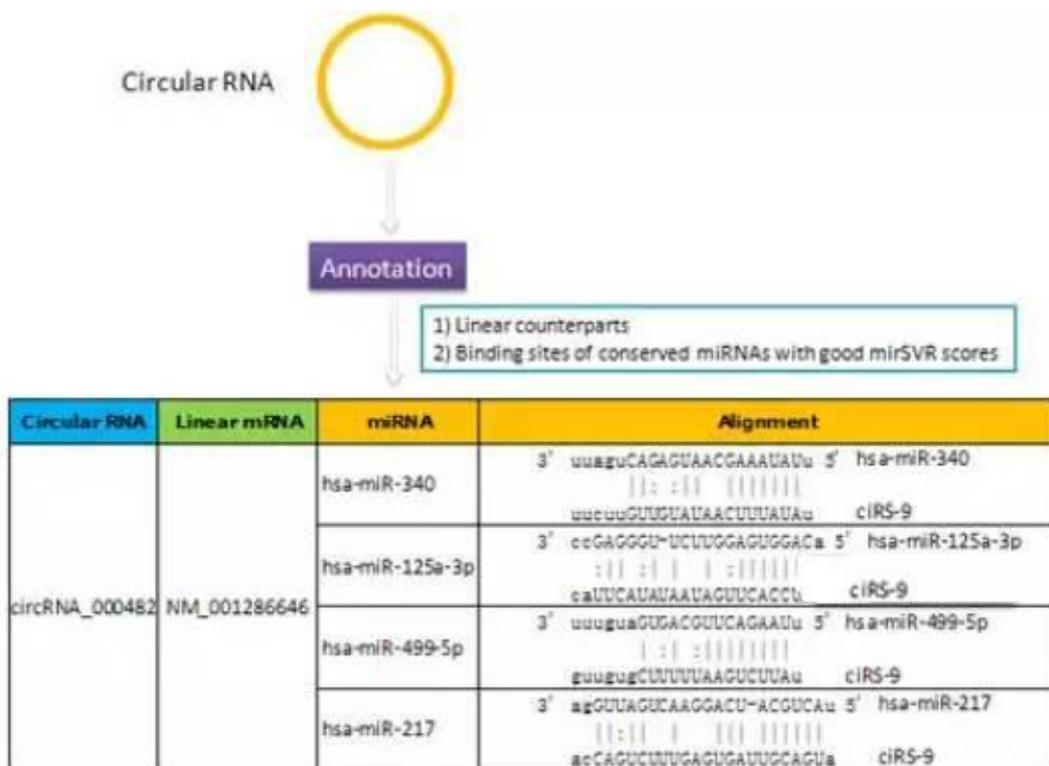
相较于线性的 RNA,circRNA 没有 3' 端,在凝胶电泳中移动的速度比相通的长度的线性 RNA 要慢,因此可以用增强型交联凝胶法放大。但是由于 circRNA 的总核苷酸序列更少,与在同源基因形成的其他转录物比较在弱交联凝胶电泳中跑的会比较慢。基于此可以通过 northern blot 甄别 circRNA。经酶或其他方式水解后,变成小片段,可以通过双向凝胶电泳和琼脂糖凝胶电泳分离并检测进一步确认它的环化。



RNA 凝胶显像

基因组学的方法

目前 circRNA 基因组学方法有两条途径: 一是从已存在的转录物模型(transcript models) 中选取候选接头, 另一条是通过与基因组序列阅读框匹配来识别接头。第一条途径主要对来自单一 cDNA 片段另一端的末端配对阅读序列(paired-end readssequence) 的独立遗传图谱进行分析。第二条途径则是通过识别来自于从哺乳动物到线虫的损耗型 circRNA 的 RNA-seq 资料中的索尾插接序列遗传密码, 对此类损耗型 circRNA 文库(circRNA-depleted libraries) 进行分析统计以鉴别出 circRNA。



其他方法

近期, Glazar 等建立了 circRNA 专用数据库“circ Base”, 该数据库通过对已发表的 circRNA 信息进行统一整合, 同时提供新的及已有的 circRNA 测序资料, 为了 circRNA 的研究者们提供一个较好的交流平台。率先开发的世界上第一款商业化 circRNA 芯片, 为系统探索不同生理及病理条件下 circRNA 的表达规律提供实验研究平台。circRNA 更好的研究方法需要有待各位小伙伴们进一步发现完善。

RNA 提取的几个小建议

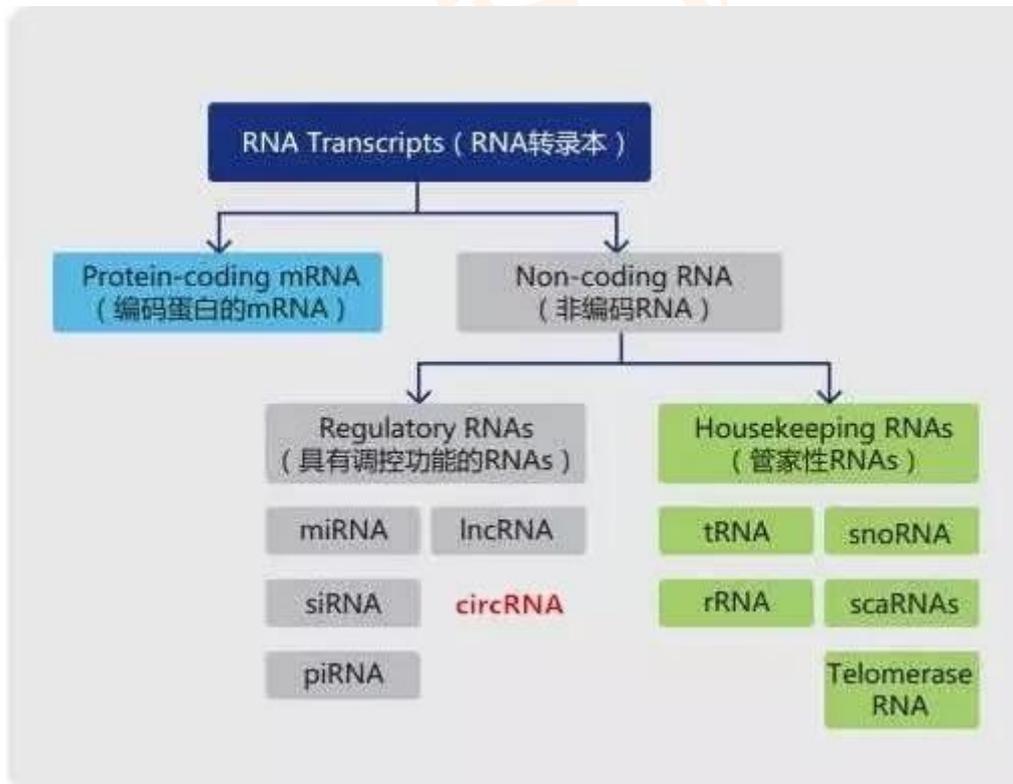
RNA 裂解液及试剂盒琳琅满目, 伙伴们在选择时有一种无从下手的感觉, 有木有? 小编在这告诉大家, 无论你选择了哪家的试剂盒, 都要记住 RNA, 高温易损, 遇酶易断, 菌染则无以为继。①裂解时需低温; ②无论是从细胞系、组织、还是血液中提取 RNA, 都必须牢牢记住 RNA 分子量小, 极其已被提取过程中的酶破坏, 所以全程操作一定得无酶; ③若是 RNA 被细菌等污染时, 接下来的分离显像的结果就会显得差强人意了, 因此就得全程无菌操作。④辛苦半天, 酒精熏得也够够的了, 这个时候你的 RNA 已经提取出来了, 一般这批 RNA 都不需要全部逆转录为 DNA, 那么你需要找一个靠谱的-80°C冰箱储存你的宝贝了。

lncRNA 的撩妹大招

作者：子非鱼

RNA 曾被认为只是细胞中的信使分子，后来人们逐渐意识到，RNA 具有许多不同的形态和出人意料的功能。近年来，神秘的长链非编码 RNA (lncRNA) 受到了广泛关注。

曾经，在 RNA 这个大家族里，
ncRNA 被看成是基因组中的“丑姑娘”
一直备受冷落，甚至要被雪藏起来



直至 miRNA 异军突起、崭露头角，

ncRNA 的神秘面纱才算是被掀开了一角

其露出的绚烂的光景

撩的众位科研者心猿意马

纷纷开启了对 miRNA 的求爱之路



然而，时至今日 miRNA 已经是半老徐娘

尽管风韵犹存，却已成为“旧爱”

“朝三暮四”的科研者们早就

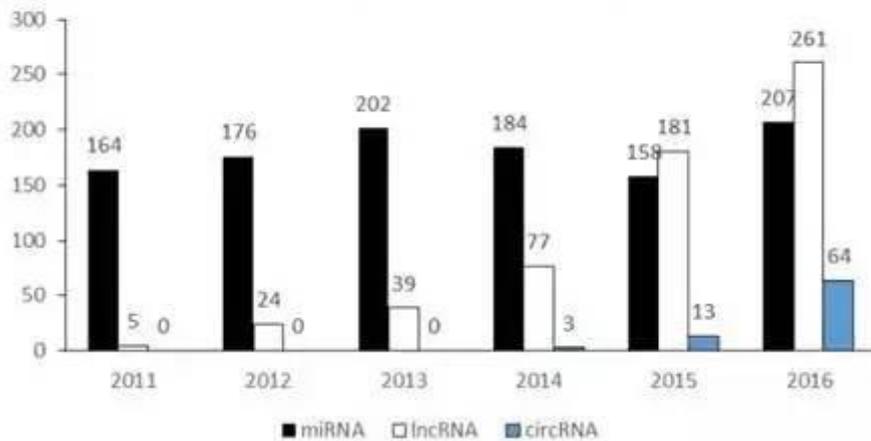
对新欢 lncRNA 展开了猛烈的攻势

这不，近年来 lncRNA 的相关研究

已经形成了井喷之势

似乎整个学术界都在为其着迷

5年国自然相关RNA资助情况



为了拔得头筹及尽早抱得美人归

众位“追求者”可谓是绞尽脑汁

然而，

只要套路玩的深，铁杵也能磨成针

那么下面的“撩妹”大招

可让你分分钟赢得 lncRNA 的青睐

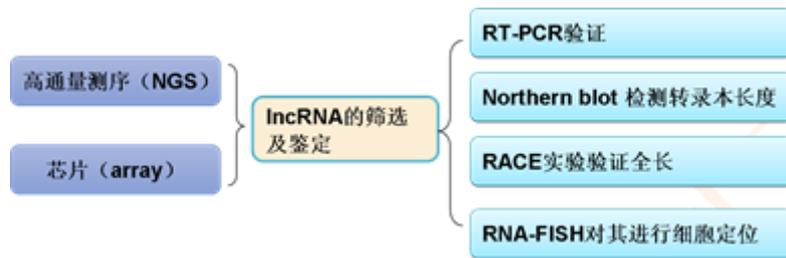
套路是我学的，
撩你是真心的！



在追求 lncRNA 之路中，首当其冲的

就是要先找到你的“真命天女”——

一个真正属于你的 lncRNA 分子



然后就要亲自登门拜访你所看中的 lncRNA

一般而言，lncRNA 要么定居在核内

要么已经移民到细胞质里

此时小伙伴们可以兵分两路

去攻略美人 lncRNA 的芳心

通常移民的 lncRNA 好胜心很强

为了争夺 microRNA 的宠爱

总是要跟 mRNA 一较高下

而后才能将靶基因的

转录后调控进行到底

CeRNA 调控机制研究

靶定lncRNAs的miRNA预测

通过miRcode/starBase筛选lncRNAs潜在的MREs

预测miRNA靶定的mRNA

通过miRTarBase预测miRNA的靶基因

确认lncRNA和mRNA的表达相关性

两者之间应该是共表达的，成正相关性

确认lncRNA影响miRNA和mRNA的表达

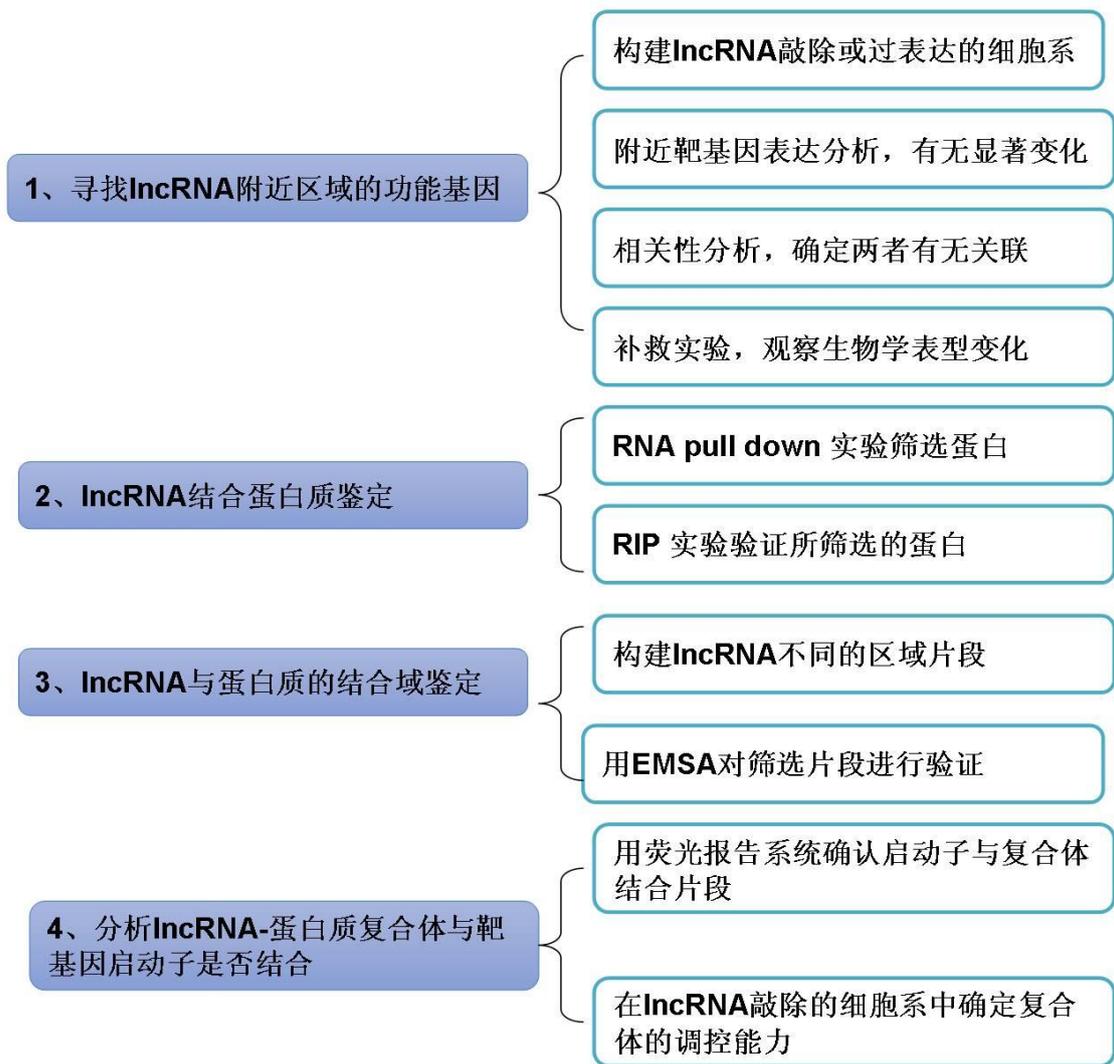
验证lncRNA的生物学功能

而定居核内的 lncRNA 控制欲较强

总喜欢通过 cis 或 trans 调控方式来掌控

下游靶基因的命运

Cis 调控机制研究（顺式作用元件与靶基因位于同一染色体）



trans 调控机制研究（顺式作用元件与靶基因在不同染色体）



俗话说，好事多磨

也许会有人早你一步捷足先登

但这并不意味着你就失去了所有的机会

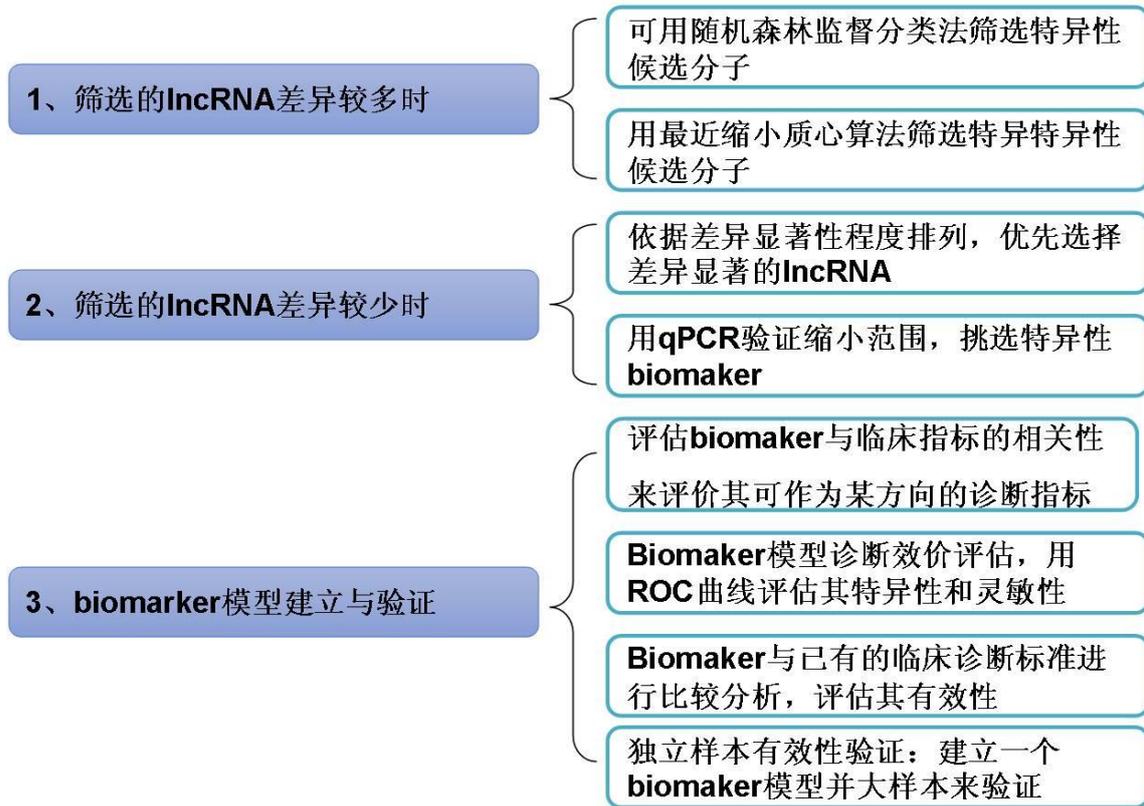
因为 lncRNA 并不仅仅是

在功能机制研究中大放异彩

它还可以成为疾病诊断的 biomaker

并受到了临床医生的热烈追捧

lncRNA 疾病诊断的 biomaker 研究



如此下来，

你即可以不费吹灰之力搞定 lncRNA 研究

也可以获得 lncRNA 相关的“嫁妆”

（如文章、基金、项目等）

那么未来你走上人生巅峰的时刻

不就指日可待了么？

LncRNA 数据库推荐

同时，为了让各位在追求之路上

少走弯路，尽早找到正确的方向

在此，分享 5 个 lncRNA 的研究利器

1. Noncode

网址: <http://www.noncode.org>

提供对长链非编码 RNA 的全面注释，包括表达和该团队开发的 ncFANs 计算机软件预测的 lncRNA 功能。这是非编码 RNA 研究的知名数据库，已经更新到 2014 年的 8 月了。



2. lncRNadb

网址: <http://www.lncrnadb.org/>

提供有生物学功能的长链非编码 RNA 的全面注释。这是长链非编码 RNA 研究领域的大牛 John mattick 实验室构建的网站。

Long Noncoding RNA Database v2.0: The Reference Database For Functional Long Noncoding RNAs

Search Incrnadb

Set filter

Any Species Output Per Page: 10

Blast Incrnadb

Enter Sequence...

3.LncRNome

网址: <http://genome.igib.res.in/LncRNome>

超过 18000 转变本目前已作为 lncRNA 标注, 覆盖先前注释非编码转录本, 包括大型基因间非编码 RNA, 反义 RNA 和加工的假基因。但在提供稳定的注释, 交叉引用和生物相关的信息资源方面有显著的差距。由印度 CSIR 基因组和整合生物学研究所研究人员开发的 lncRNome, 旨在填补这一空白, 他们通过把生物显著性的各种各样的信息注释整合到一个全面的知识库。

About IncRNome

IncRNome is a comprehensive searchable biologically oriented knowledgebase resource hosts information on over 17000 long noncoding RNAs in Human. The chromosomal locations, description on the biological functions and disease associations. In addition, it provides access to datasets on protein-lncRNA interactions and ger also provides a browsable interface for the datasets.

Search for lncRNAs

Example: [HOTAIR](#), [NBPF1](#), [ENST00000547088.1](#), [hsa-mir-196a](#)

4. LncRNADisease

网址: <http://cmbi.bjmu.edu.cn/lncrnadisease>

提供了文献报道的疾病相关的长链非编码 RNA 的注释。



5. LncVar

网址: <http://bioinfo.ibp.ac.cn/LncVar>

数据库收集了 NONCODE 数据库的 lncRNA 数据, 评估了它们的保守性, 并系统性的整合了 lncRNA 的转录因子结合位点、m6A 修饰位点以及 SNPs 对于 lncRNA 转录和修饰的影响。LncVar 数据库作为一个资源平台可以评估遗传变异对于 lncRNA 生物功能的影响。

Welcome to LncVar !

ex: NONHSAG000001,rs543561574,CNVHSA000001,FUSHSA000003



Search example | Advanced search

科研老司机的套路哲学（六）

作者：子非鱼

如火如荼的里约奥运会

终于于近日在一片吐槽与质疑声中

徐徐落下帷幕

在此期间

奥运会以霸屏之势占据了各大头条

然而在科研界中

比五环更火的还有此环

——circRNA

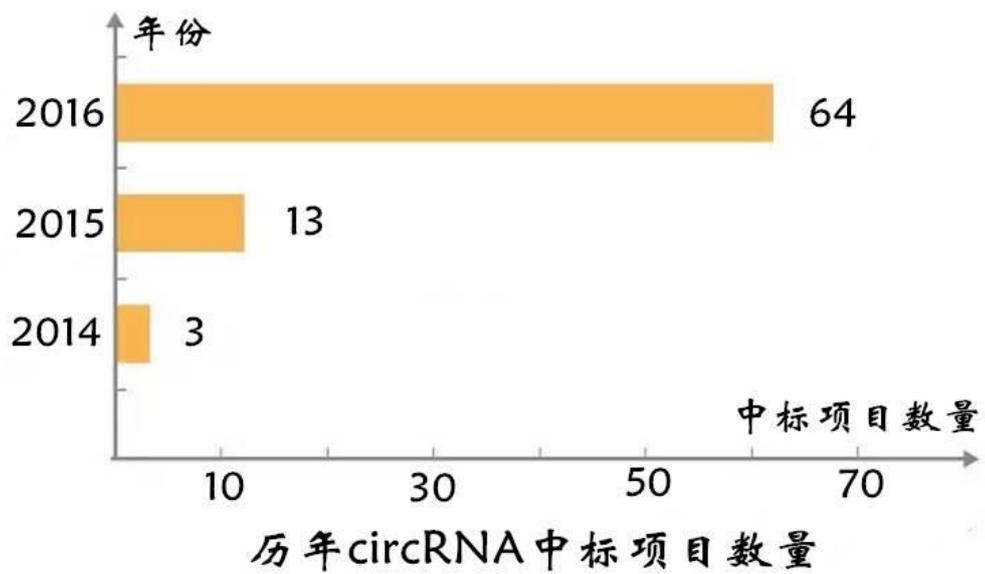
自从国自然基金结果放榜以来

大放异彩的 circRNA 以傲人之资荣登榜上

其相关基金资助集体大爆发

这简直就是分分钟上天的节奏啊！

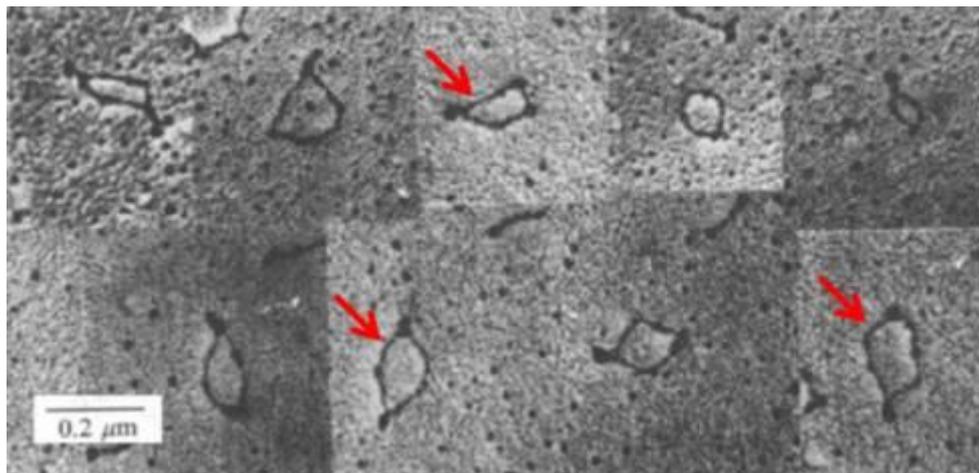
显然 circRNA 未来形势一片大好！



其实早在上世纪 70 年代

具有高度热稳定性的 circRNA

就已经横空出世



真核细胞质中 circRNA 的电镜图片



可由于当时的科研技术和知识储备跟不上

circRNA 被看成 RNA 转录剪切的副产物

而备受科学家们的冷落

以致其在科研冷宫一待多年



本宝宝不服！
本宝宝有小情绪了！

直至最近几年里

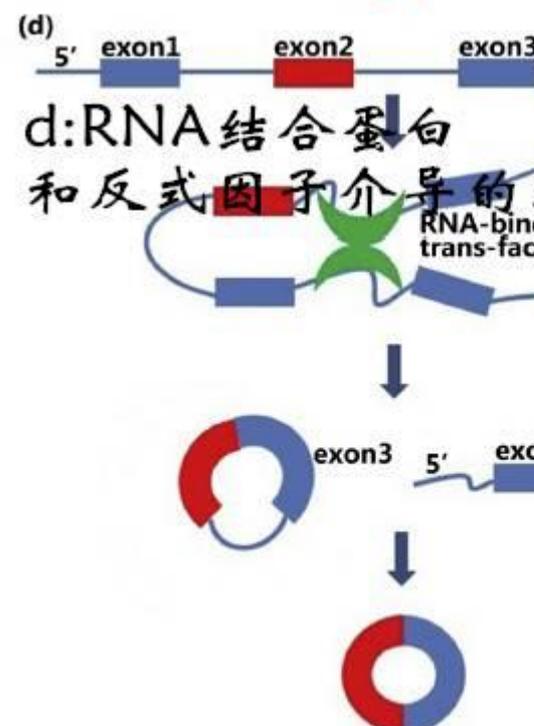
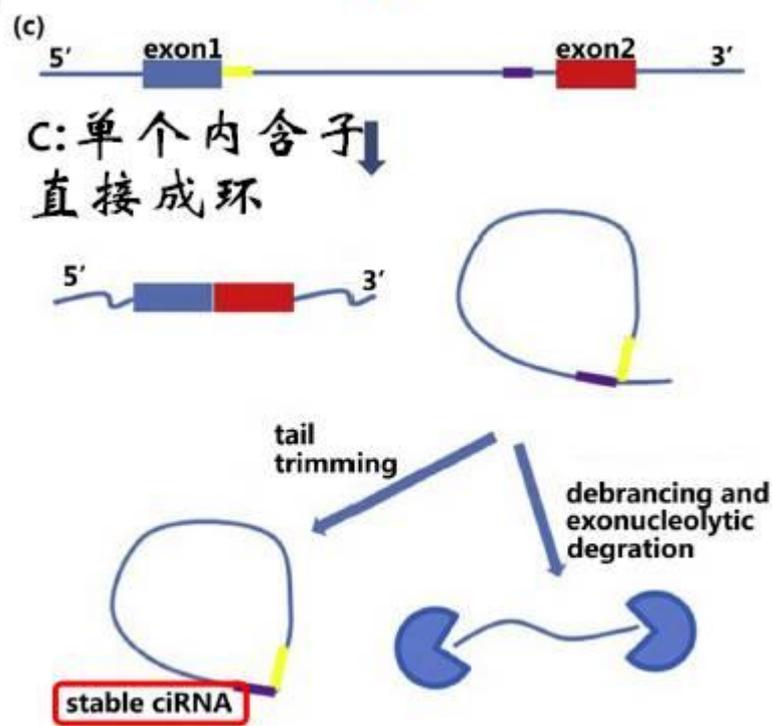
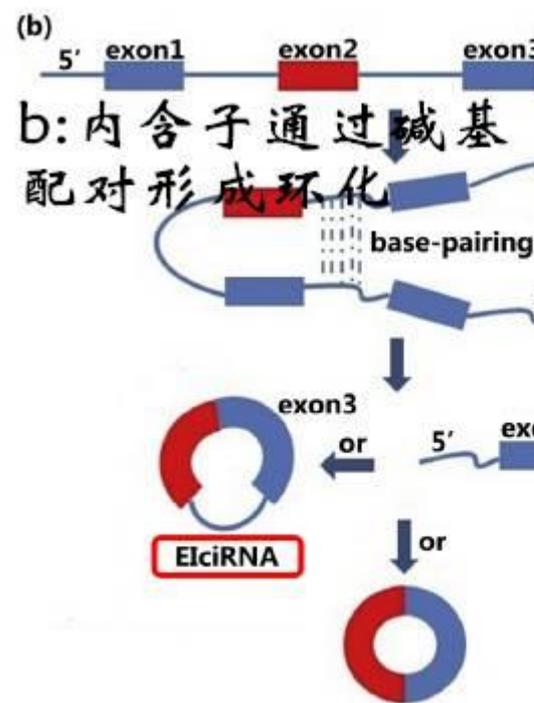
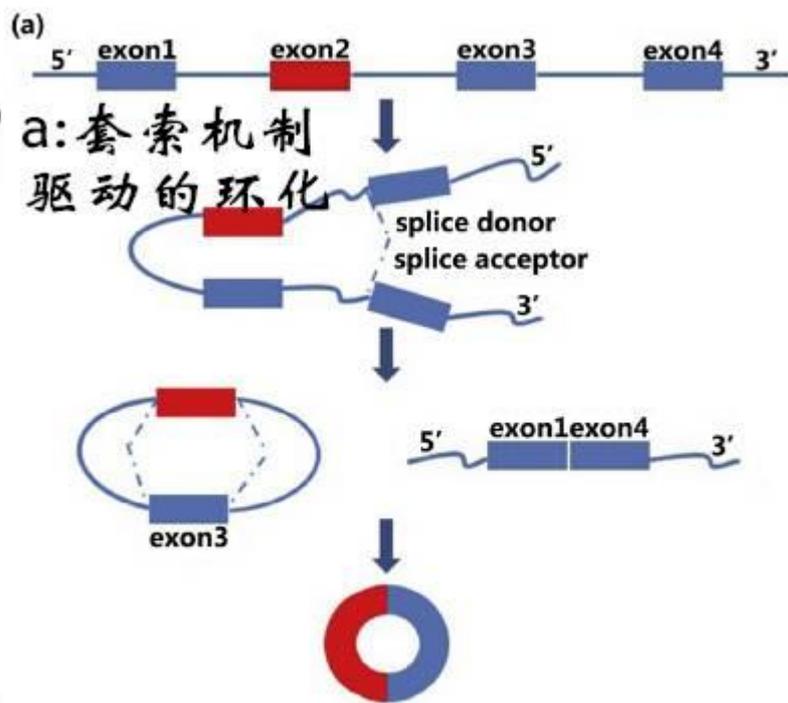
二代测序技术（RNA-seq）的成熟

才逐渐掀起了 circRNA 神秘的面纱

尽管 circRNA 主要来源于基因外显子

但是其复杂的形成机制

使得 circRNA 家族再添新丁



而 circRNA 之所以能从科研冷宫

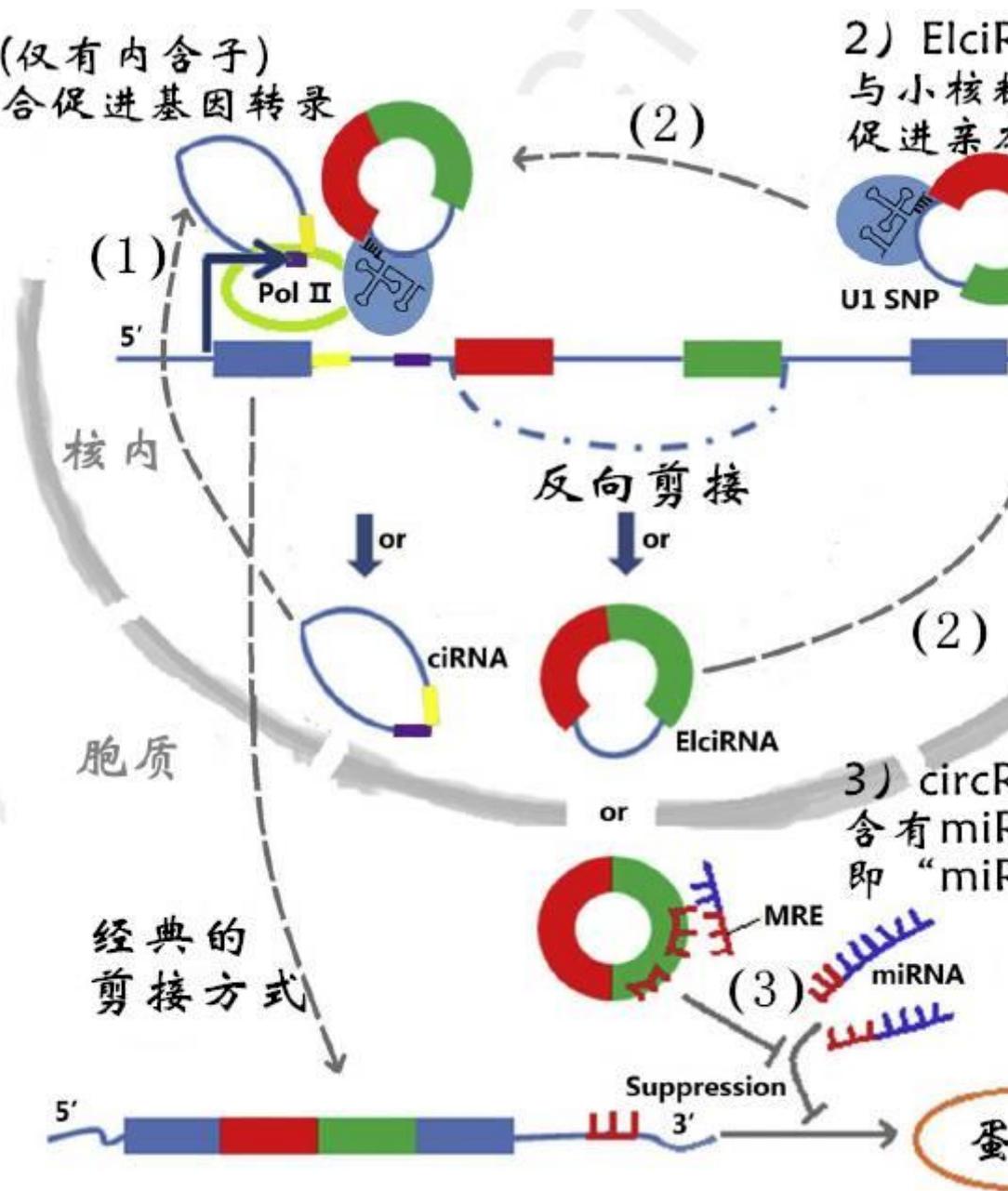
杀出重围，回归 RNA 正殿

成为科研界的新宠

无外乎是有着以下三大法宝傍身

1) ciRNA(仅有内含子)
与pol II结合促进基因转录

2) ElciRNA
与小核糖体
促进转录



自然，奔走在最前线的科研汪们

为了获得 circRNA 的青睐

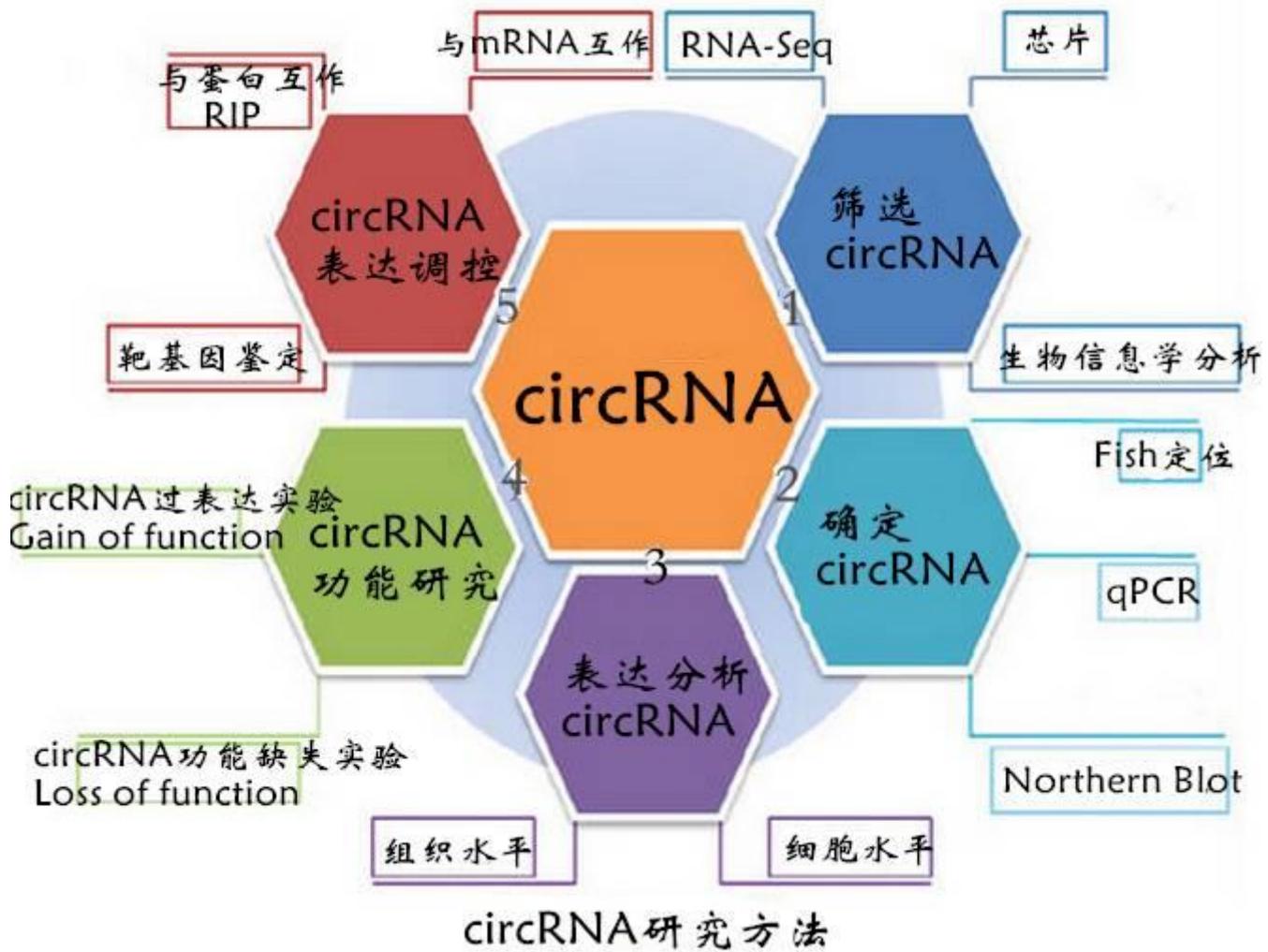
可谓是前赴后继，呕心沥血

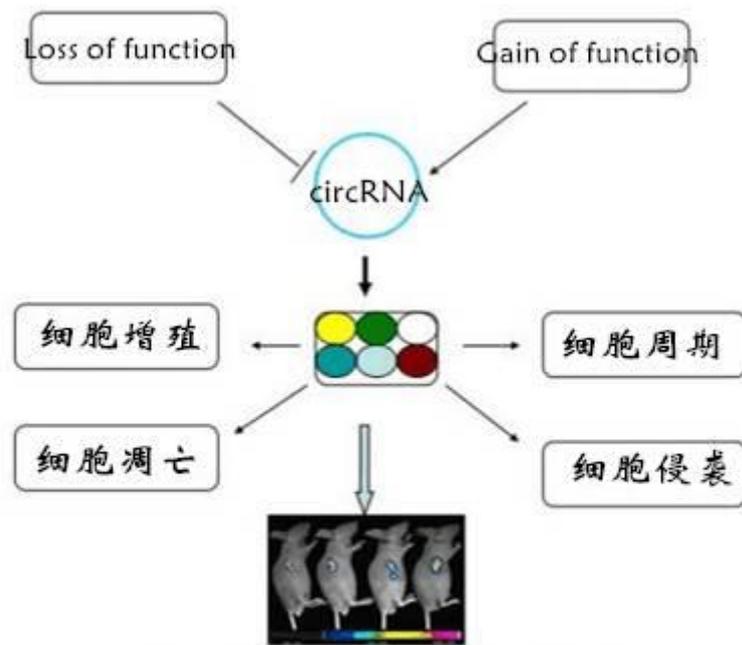
力争要在该领域里拔得头筹

在此，小鱼就将 **circRNA 研究五部曲**拱手奉上

希望能助大家一臂之力

(见下图)





circRNA的功能研究

诚然，在如火如荼的 RNA 研究世界中

风光无限的 miRNA 一路绝尘

掀起了 ncRNA 研究热潮然

但是，近年来 miRNA 相关的文章

已经严重供过于求

仍想按传统套路来发高影响因子文章

恐怕不会那么容易了



然而，如果 miRNA 碰上 circRNA

估计就会形成另一番风景

那么，为了尽早手握高分文章

让 circRNA 携手 miRNA 共同助力科研

可使你的研究老树开新花

为了给科研汪们一个更直观的感受

举个栗子

LETTER

doi:10.1038/nature1

Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges

Thomas B. Hansen¹, Trine I. Jensen¹, Bettina H. Clausen², Jesper B. Bramsen^{1,3}, Bente Finsen², Christian K. Damgaard¹ & Jørgen Kjems^{1,3}



看罢之后，

各位摩拳擦掌、跃跃欲试的小伙伴们

是不是对 circRNA 研究更加胸有成竹了呢？

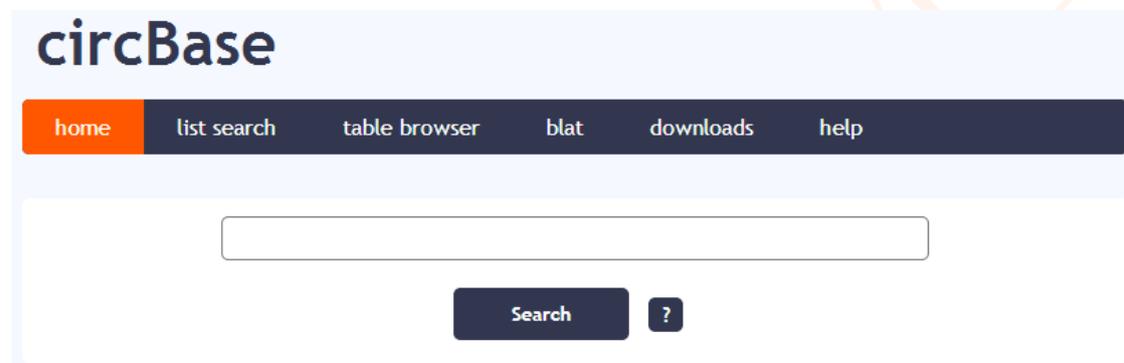
另外，小鱼也要给大家良心推荐

六个 circRNA 研究常用的数据库

circBase

网址：<http://www.circbase.org/>

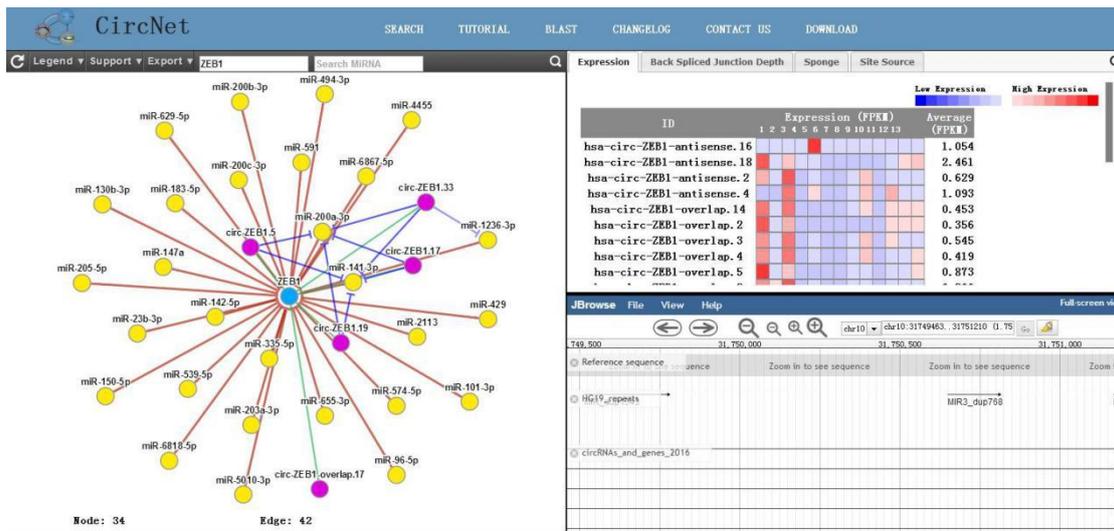
一个通过收集和整合已发布的 circRNA 数据构建的数据库。目前该数据库收集包括以下 6 个物种的 circRNA 信息：人 (hg19)、小鼠(mm9)、秀丽线虫(ce6)、黑腹果蝇(dm3)、矛尾鱼(latCha1)、腔棘鱼(latCha1)。该数据库最新版本发布时间为 2014 年 1 月。



circNet

网址：<http://circnet.mbc.nctu.edu.tw/>

利用 464 个 RNA-seq 测序数据，进行新 circRNA 预测及基因组注释，并计算已知的及新预测的 circRNA 表达情况，构建 circRNA-miRNA-genet 调控网络，以上信息均可从该数据库获得。版本发布时间：2015 年 12 月。



Deepbase

网址: <http://deepbase.sysu.edu.cn/>

该平台收集了大约 15 万多的 circRNA 基因（人、鼠、果蝇、线虫等），并构建了最全面的 circRNA 的表达图谱。最新版本发布时间：2015 年 10 月。

deepBase
Deeply Exploit the Deep Sequencing Data

Home Browser nasRNA pasRNA RasRNA Cluster Heatmap Prediction Search Statistics Download Tutorial

About the deepBase Site

Welcome to deepBase

deepBase, a platform for annotating and discovering small and long ncRNAs (microRNAs, siRNAs, piRNAs...) from next generation sequencing data. deepBase allows the mapping, storage, retrieval, analysis, integration, annotation, mining and visualization of next generation sequencing data from different technological platforms, tissues and cell lines of different organisms. deepBase also provided an integrative, interactive and versatile web graphical interface to display multidimensional data, and facilitate transcriptomic research and the discovery of novel ncRNAs. [>>Tutorial](#)

How to cite:
If you make use of the data presented here, please cite the following article in addition to the primary data sources:
Jian-Hua Yang, Peng Shao, Hui Zhou, Yue-Qin Chen, and Liang-Hu Qu.
deepBase: a database for deeply annotating and mining deep sequencing data.
Nucleic Acids Res. 2010 Jan;38(Database issue):D123-D130. Epub 2009 Dec 4.
[\[Full Text\]](#) [\[Print PDF\]](#) [\[Screen PDF\]](#) [\[Supplementary Data\]](#)

Starbase

网址: <http://starbase.sysu.edu.cn/mirCircRNA.php>

该数据库整合已发表的 circRNA 数据，构建 miRNA 与 circRNA 及 circRNA 与 RNA 结合蛋白（RBP）的互作网络。最新版本发布时间：2013 年 12 月。

circRNABase: miRNA-circRNA interactions

1. clade: genome: assembly:

2. microRNA:

3. Number of supporting Experiments>=

4. circRNA Symbol(e.g. "CDR1as")

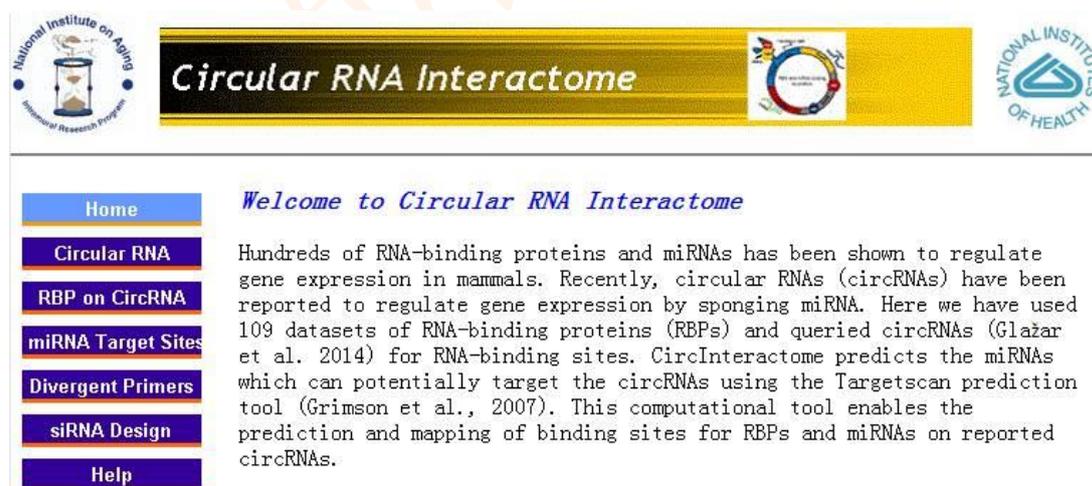
circRNABase: miRNA-circRNA interaction Descriptions

View the predicted miRNA-circRNA interactions by scanning circRNA sequences overlapping with CLIP-Seq peaks for potential microRNA targets (miRanda/mirSVR) and then output the detailed information. Here, we list predicted miRNA-target interactions overlapped with CLIP-Seq data.

CircInteractome

网址: <http://circinteractome.nia.nih.gov/>

该数据库预测了已知的 109 个 RNA 结合蛋白数据集与 circbase 中的 circRNA 的结合位点，并利用 Targetscan 软件预测了 miRNAs 与 circRNA 的潜在结合位点。最新版本发布时间：2015 年 12 月。

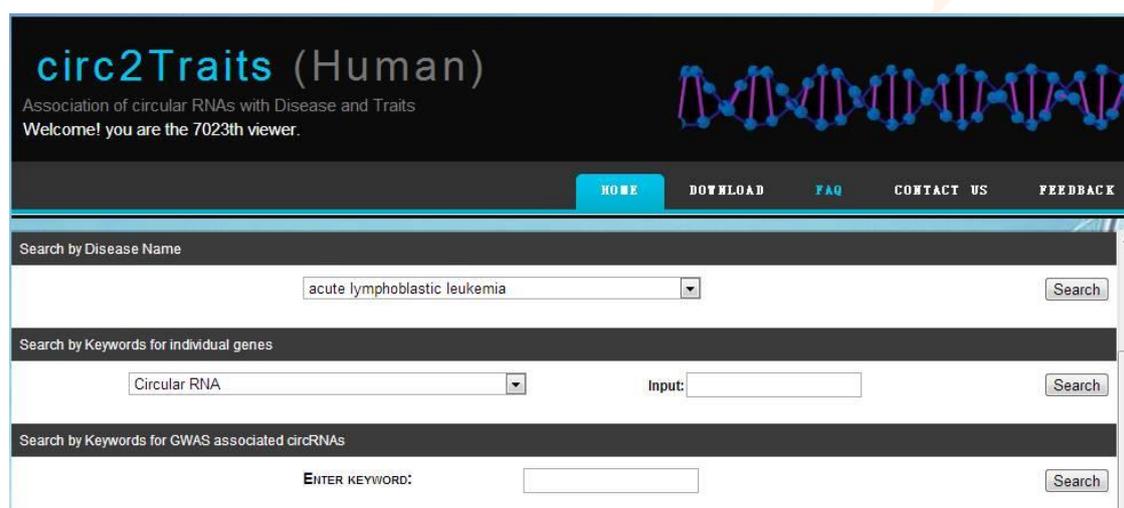


The image shows the header and navigation menu of the Circular RNA Interactome website. It features logos for the National Institute on Aging and the National Institutes of Health. The main title is "Circular RNA Interactome". Below the title is a navigation menu with buttons for Home, Circular RNA, RBP on CircRNA, miRNA Target Sites, Divergent Primers, siRNA Design, and Help. A welcome message follows, stating: "Welcome to Circular RNA Interactome. Hundreds of RNA-binding proteins and miRNAs has been shown to regulate gene expression in mammals. Recently, circular RNAs (circRNAs) have been reported to regulate gene expression by sponging miRNA. Here we have used 109 datasets of RNA-binding proteins (RBPs) and queried circRNAs (Glažar et al. 2014) for RNA-binding sites. CircInteractome predicts the miRNAs which can potentially target the circRNAs using the Targetscan prediction tool (Grimson et al., 2007). This computational tool enables the prediction and mapping of binding sites for RBPs and miRNAs on reported circRNAs."

Circ2Traits

网址：<http://gyanxet-beta.com/circdb/>

一个收集与人类疾病或性状潜在关联的 circRNA 数据库，可通过预测 miRNAs 和人类的蛋白质编码基因、长链非编码基因及环状 RNA 间的相互作用关系，构建了相互作用网络，并对 miRNAs-circRNA 相互作用组中的蛋白编码基因进行了 GO 富集分析；此外，将与疾病相关的 SNPs 位点定位到 circRNA 基因座上，并鉴定了环状 RNAs 上的 Ago 相互作用位点。最新版本发布时间：2013 年 12 月。



参考文献：

- 1、Circular RNA: A new star of noncoding RNAs
- 2、Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges

科研老司机的套路哲学（一）

作者：子非鱼

科研老司机说：一切皆有套路（规律），科研也不例外。miRNA 作为当家花旦，在科研这个大舞台上摇曳生姿已久；而肿瘤治疗身为老牌明星，自然也保持长盛不衰之势，那么当 miRNA 碰见肿瘤治疗，是怎么碰撞出美丽火花，形成深得人心的 CP 呢？

然而，老牌明星出道已久，CP 组合自然花样繁多，Car-T 疗法、DNA 甲基化修饰等等，无一不是科研汪们热捧的对象，那么 miRNA 小鲜肉要想一直得到肿瘤治疗明星大腕的青睐，没

有几个傍身秘籍又怎么能行呢？好在自古深情留不住，总是套路得人心，那么小鱼通过两篇相关文章来深入分析下科研中用 miRNA 进行肿瘤研究的两个经典套路。

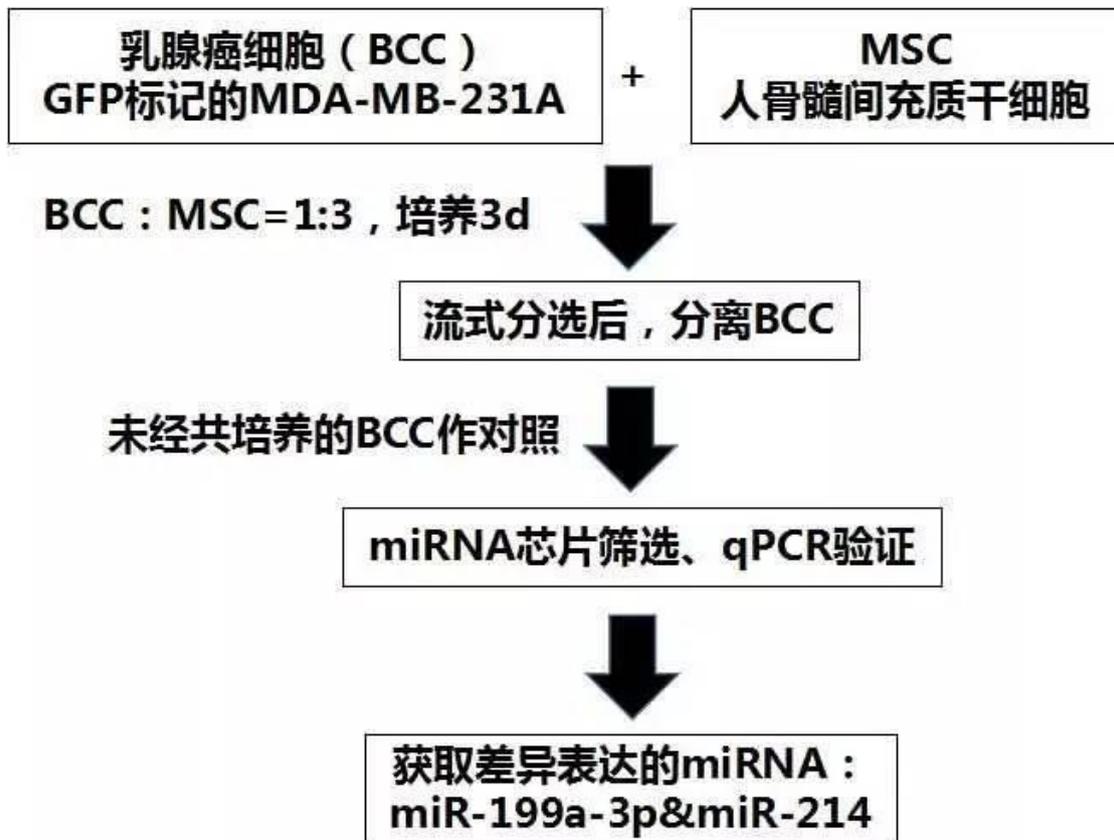
经典套路一

Cell Stem Cell
Article

MSC-Regulated MicroRNAs Converge on the Transcription Factor FOXP2 and Promote Breast Cancer Metastasis

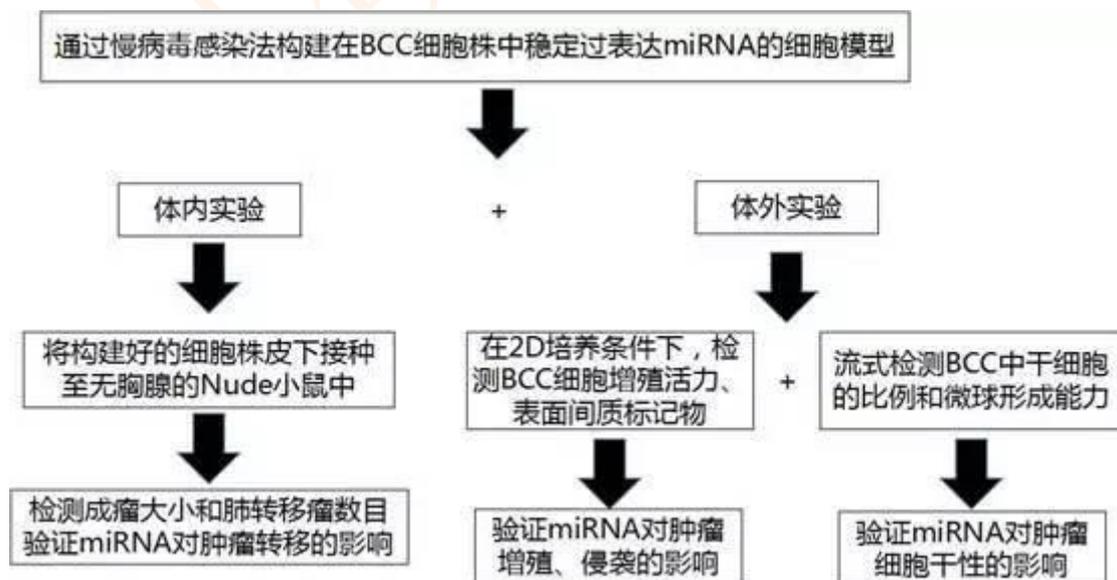
基于前期研究，已有报道揭示了 MSC 可作为催化剂促进癌症进展、侵袭和转移，然而其具体的分子机制并未阐明，因而，这篇文章通过一套完整的研究流程，阐明了肿瘤间充质干细胞(MSC)诱发的 miRNA 调节网络，并证实了转录因子 FOXP2 在乳腺癌转移中的关键角色。其文章研究思路如下：

1.miRNA 筛选，获取研究对象



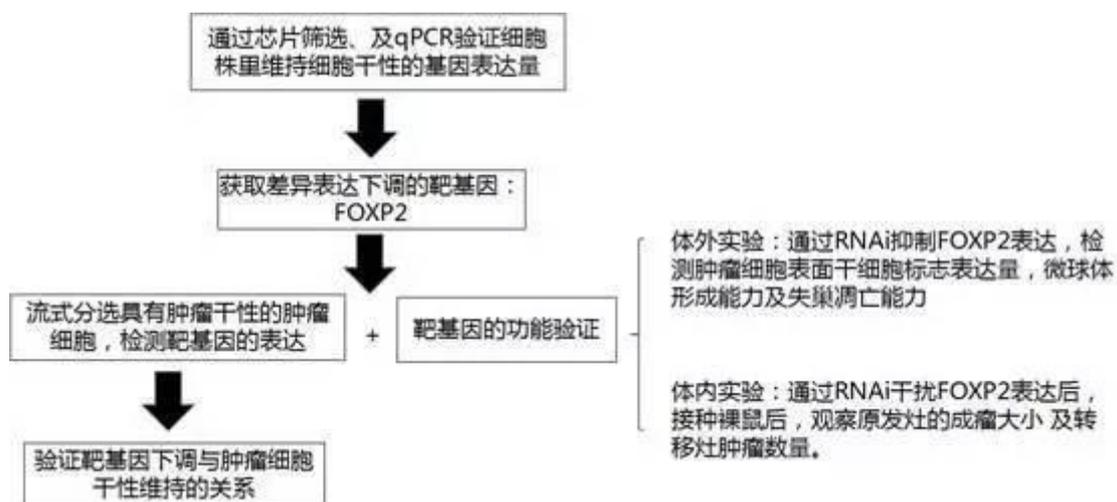
此外，还需要排除细胞模型的特异性，即先用不同品系的乳腺癌细胞（BCC）与不同来源 MSC 共培养 3 天，检测所筛选的 miRNA 的表达率变化。

2.对筛选出的 miRNA 进行功能验证



研究者发现所得的 miR-199a-3p 可促使肿瘤干细胞的标记物乙醛脱氢酶 (ALDH1) 的表达水平显著提高, 并增强肿瘤的始发能力。

3. 寻找并验证 miRNA 的靶基因



因不同体内细胞环境对 miRNA 的影响不同, 可再次进行基因芯片筛选 miRNA 的靶基因, 并关注那些与获得或维持肿瘤细胞干性有关的因素。

4. 从靶基因的角度阐明 miRNA 的调控分子机制

从TCGA数据库，GEO数据库中挖掘miRNA和FOXP2的临床意义
并对miRNA的调控机制进行深入研究



采用RNAhybrid、miR-Walk、Targetscan和Pictar
分析靶基因FOXP2近端3'UTR的miRNA结合位点



未发现FOXP2与miRNA-199a-3p的结合位点；
却发现其他miRNA结合位点



验证这几个miRNA能否抑制FOXP2的表达及与
miRNA-199a-3p的之间是否具有正相关性



验证miRNA调节网络对乳腺癌细胞的
转移能力的调节作用

经典套路二

当然，如果你已确定某一种 miRNA 与肿瘤的增殖、转移及治疗密切相关，而你又想知道其与某种肿瘤发生发展过程中的调控关系，可参考下面这篇文章的研究思路。



Contents lists available at ScienceDirect

Cancer Letters

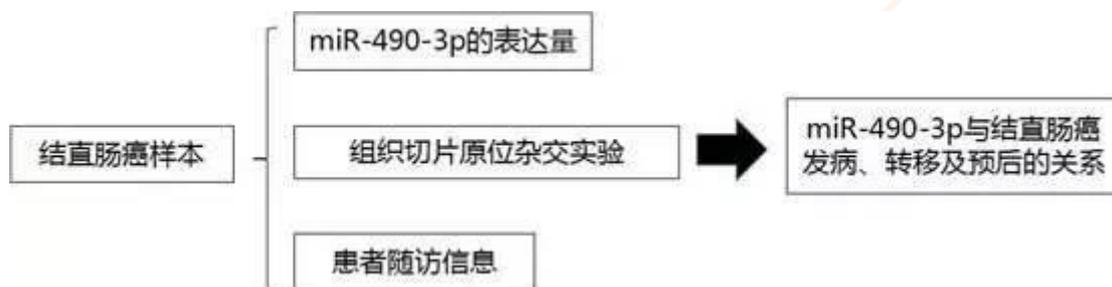
journal homepage: www.elsevier.com/locate/canlet

Original Articles

Epigenetic silencing of miR-490-3p promotes development of an aggressive colorectal cancer phenotype through activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway

前期已有报道说明 miR-490-3p 与肿瘤的增殖、转移及治疗密切相关，但仅局限于现象性研究，具体涉及的信号通路仍未阐明。同时，尚未有文献报道 miR-490-3p 对结直肠癌发病和转移的作用及相关机制。因而本文研究者通过体内外实验，明确了 miR-490-3p 与结直肠癌转移的关系及相关机制。其研究思路如下：

1. 验证 miR-490-3p 与结直肠癌发病、转移及预后的关系



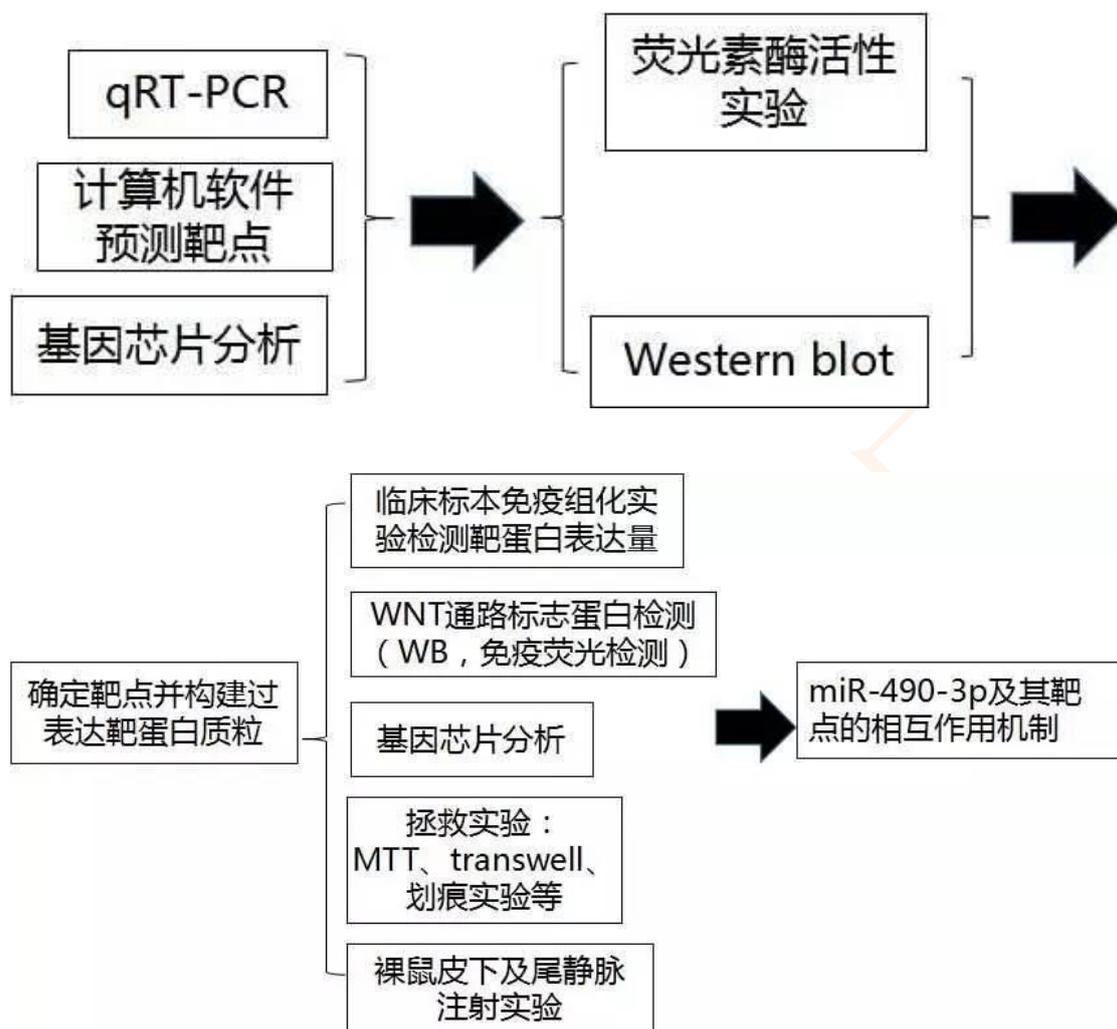
通过实验证明 miR-490-3p 在结直肠癌中的表达呈下调趋势，且与肿瘤的转移相关。且其高表达与病人的良好预后成正相关性。

2. 验证 miR-490-3p 对结直肠癌肿瘤细胞增殖和转移的影响



结果证明，过表达 miR-490-3p 可抑制肿瘤细胞的成瘤能力及转移能力。

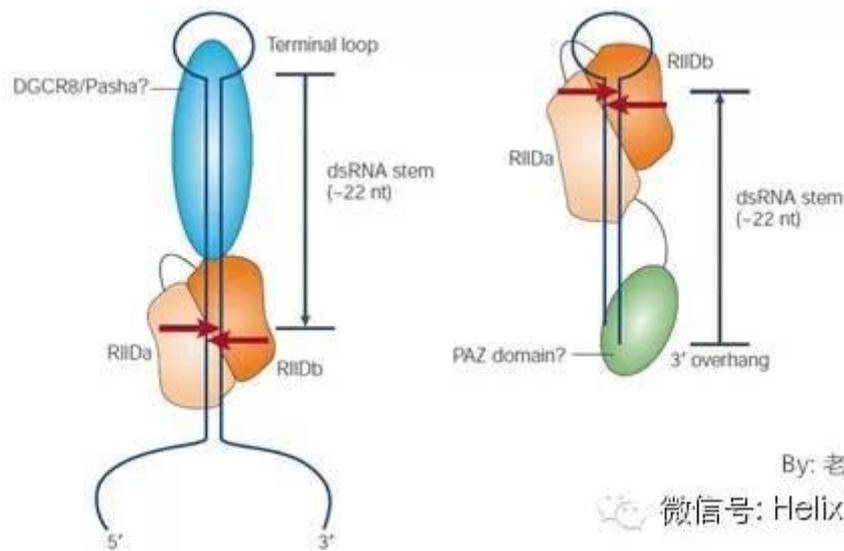
3. 验证 miR-490-3p 及其靶点 FRAT1 的相互作用机制



通过实验证明已明确 miR-490-3p 的靶基因为 FRAT1，进一步通过体外拯救实验，证实 FRAT1 能够恢复 miR-490-3p 对结直肠癌肿瘤细胞转移的抑制作用。此外，miR-490-3p 靶向调控 FRAT1 的表达，促进 β -catenin 的降解，抑制其核内定位，从而介导 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性，影响结直肠癌的转移。

【科研热点】肿瘤中的 miRNA (二)

作者：老谈



miRNAs 是一类由发卡结构的转录物而形成的短的单链非编码 RNA，长度一般在 19-25 个 nt。miRNA 发挥作用的方式是通过和编码蛋白的 mRNA 的 3'UTR 区域进行互补结合，从而抑制 mRNA 的翻译或者直接导致 mRNA 的降解，起到一个负向调控基因表达的效果。

通过计算机模拟计算，研究人员发现单个 miRNA 平均可以抑制超过 100 个 mRNA 的表达（或者降解）。如果大家还记得上一篇文章中的内容，目前在人类中发现的 miRNA 超过 2000 个，从理论上而言，miRNAs 总共可以抑制超过 20 万个 mRNA，由于 miRNA 的下游靶基因在一定程度上具有重叠，因此目前的理论认为：**超过 60% 的人类蛋白编码基因的 3'UTR 都含有 miRNA 结合位点。**

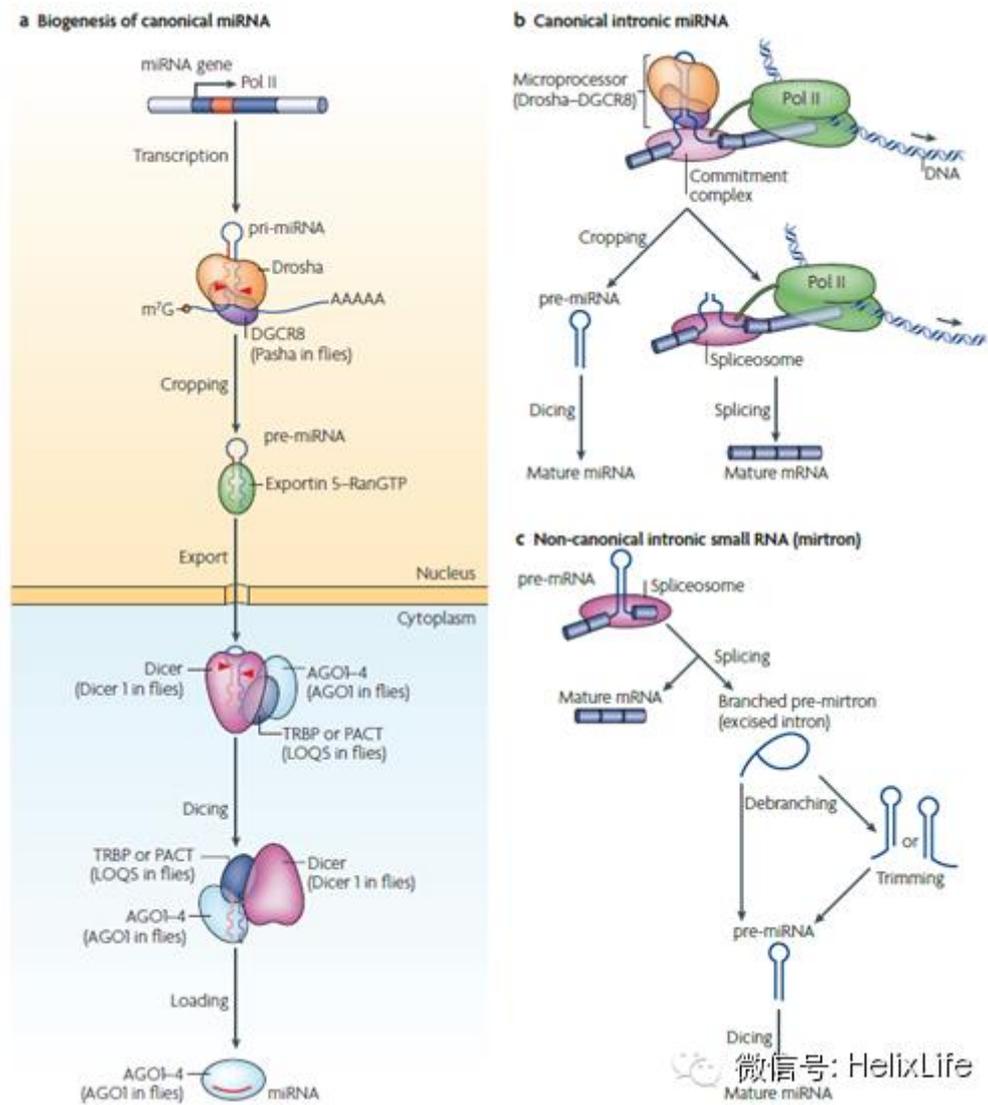
由此，我们完全有理由将 miRNAs 看成是人体内最为复杂及庞大的一大类基因调控分子。基于 miRNAs 对于基因表达的强大调控作用，这类分子在病理情况下也同样发挥了重要的作用并不会让研究者感到意外（前几年对于 miRNAs 研究的追捧也印证了这类分子对于研究人员的吸引力）。从本篇开始，老谈将就 miRNA 在肿瘤中的作用进行一次较为全面的梳理和介绍。

（哈哈，请大家相信老谈一定可以介绍清晰，而不是仅仅像酸菜那样口若悬河、滔滔不绝，看时心潮澎湃，看完内心依旧虚无……）

miRNA 的生物合成及功能

整个 miRNA 在体内的生物合成过程始于细胞核，终于胞质，可以将整个 miRNA 的生物合成过程分为三个主要的事件：收获（cropping），核转运（nuclear export）及修剪（dicing）【参考文献 1-4】。由于老谈平时英文文献看得多，但是对于英文词汇的翻译功夫花得时间少，因

此如果翻译不太准确，请大家见谅。

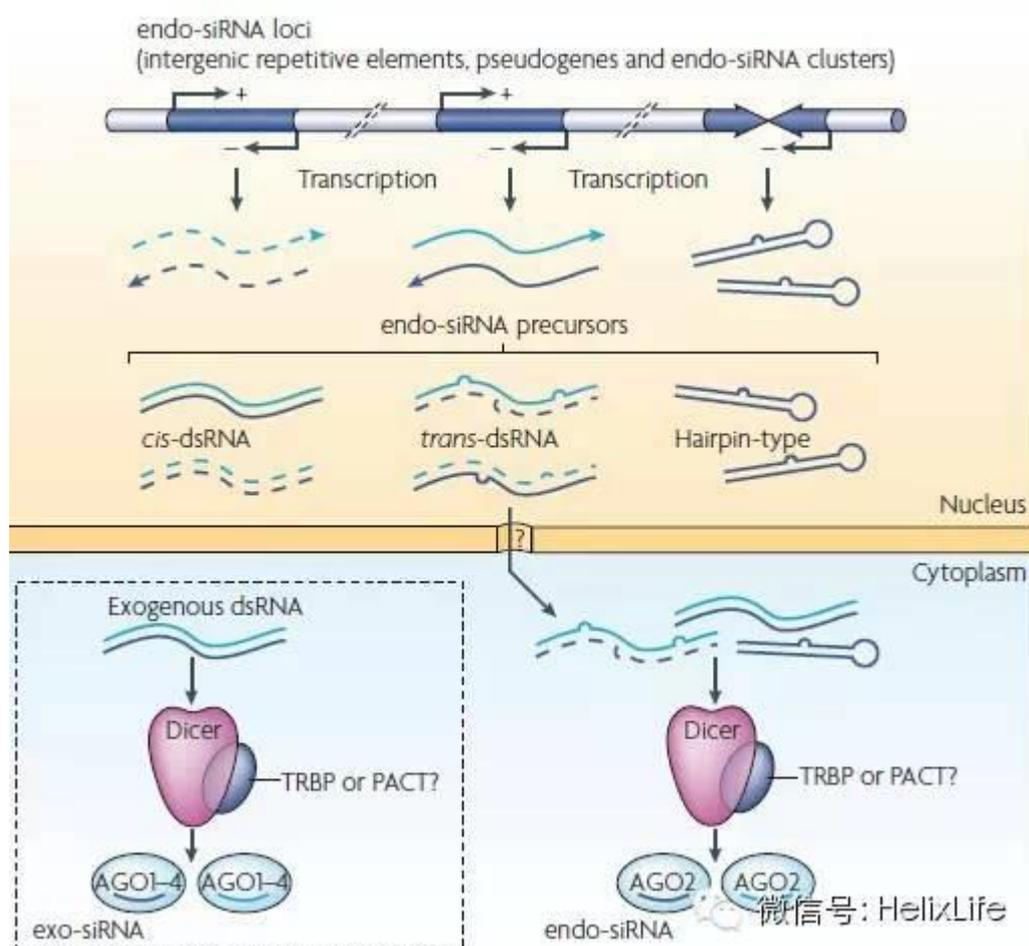


首先，含有 miRNA 序列的基因通过 RNA 聚合酶 II (Pol II) 进行转录，形成带有 5'帽子 (5'cap) 及 3'PolyA 结构的原始 miRNA 分子 (primary miRNAs, pri-miRNAs)。这类 pri-miRNAs 长度往往有几个 kb 长，通常呈现出茎环结构 (stem-loop)，而成熟的 miRNA 序列则包含在这些茎环结构中。

在原始 miRNAs (pri-miRNAs) 向成熟的 miRNA 形成过程中，首先发挥作用的是 **Drosha/DGCR8 异源二聚体 (heterodimer)**。它的作用切割原始 miRNAs 的茎环并形成长度约 60-100nt 的呈发卡结构 (hairpin-structure) 的前体 miRNA (precursor-miRNA, pre-miRNAs)。从原始 miRNAs 中切割出发卡结构的前体 miRNAs 的过程，被称为收获 (cropping)。

呈发卡结构的前体-miRNA 可以被 Exportin-5 (XPO5) 及其协同蛋白 Ran-GTP 所识别, 并将前体-miRNA 从细胞核中转运到胞浆内。

前体-miRNA 在胞浆内被 RNase III 酶 Dicer 所切割, 并释放长度约 22 nt 的双链 miRNA。人体内 Dicer 酶可以和两个相关的蛋白相互作用, 一个是 TRBP (transactivation response RNA-binding protein); 另一个是 PACT (protein activator of the interaction, 也有被称为 PRKRA)。老谈之所以要提到 TRBP 和 PACT 这两个分子, 不是因为它们对于 Dicer 酶的活性有影响, 而是因为这两个分子会影响 miRNA 的功能。但是 TRBP 和 PACT 介导的详细分子机制还不清楚。



当双链 miRNA 形成后, 它们和 Argonaute (Ago) 相互作用, 从而形成 RISC 复合物 (RNA-induced silencing complex, RNA 诱导的沉默复合物)。两条 RNA 链中的一条链保持和 Ago 蛋白的结合, 这条链就是成熟的 miRNA (有时也被称为导向链, guide strand); 另一条链 (有时也被称为 passenger strand 或者用 miRNA* 表示) 被降解。miRNA 通过与靶标 mRNA 的结合, 将 Ago 蛋白靶向至靶标 mRNA。

由于 miRNA 是通过调控靶标 mRNA 后发挥作用的，因此**如何发现及鉴定 miRNA 下游的靶标 mRNA 是该研究领域内最为重要的课题和方向。**

在预测 miRNA 下游靶标的领域内，最新的计算机算法会考虑如下的因素：

- 1) 物种间的进化保守性；
- 2) 种子序列；
- 3) 靶标中的 miRNA 结合位点的数量；
- 4) 结合区域周围的序列影响。

现在常见的 miRNA 靶标分析算法根据是否考虑物种间的保守性，可以分为两大类：

- 1) 基于物种间保守性的算法和
- 2) 不考虑物种间保守性的算法。

目前常用的 miRNA 下游靶基因预测的软件/算法都是基于物种间保守性的，常见的算法/网站，包括 **miRanda**, **PicTar**, **TargetScan** 和 **DIANA-microT**。PITA 和 rna22 算法不仅考虑了物种间的保守性，还考虑了其他的参数，例如 miRNA 与靶基因结合的**自由能 (free energy)** 及**结合区域的二级结构**。

尽管 miRNA 的靶基因在持续地发现，但是考虑到至少 60% 的基因都可能受到 miRNAs 的调控，目前所发现的受到 miRNA 调控的靶基因依然只是极少部分。因此，如何有效、快速地发现 miRNAs 下游的靶基因，不仅是一个科学问题，更可以加深我们对于 miRNA 调控机制的研究并指导我们开发具有治疗意义的 miRNA 靶标。

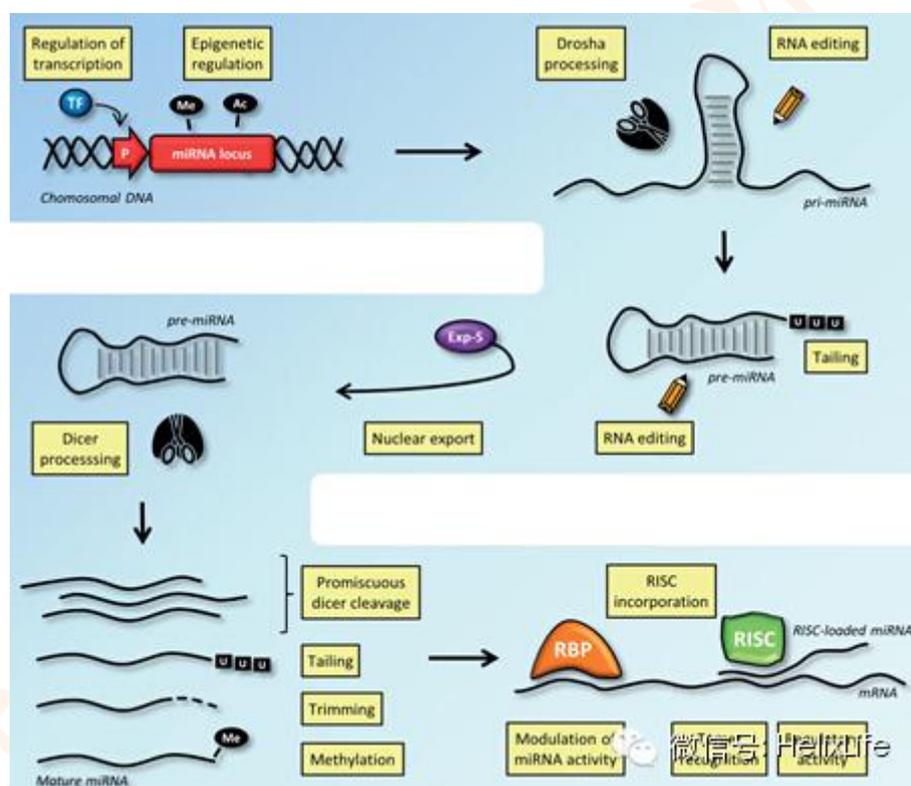
【参考文献】：

1. Kim VN, HanJ, Siomi MC. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:126 - 39
2. Kim VN. 2004. MicroRNA precursors in motion: Exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol.* 14:156 - 59
3. Kim VN. 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:376 - 85

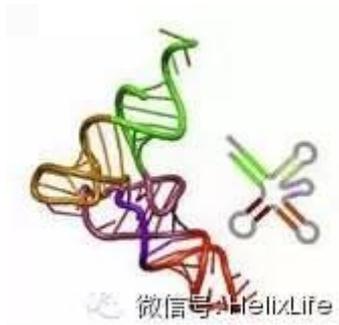
4. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. EMBO J. 1:4663 - 70

【科研热点】肿瘤中的 miRNA (一)

作者：老谈



虽然 miRNA 的研究已经没有前几年那么热门了，但是任谁都无法否认肿瘤细胞中的 miRNAs 在肿瘤发生、发展及转移中起到的重要作用。因此，老谈选择 miRNA 作为切入点，是希望对过往在 miRNA 研究领域内的发现，做一次梳理。



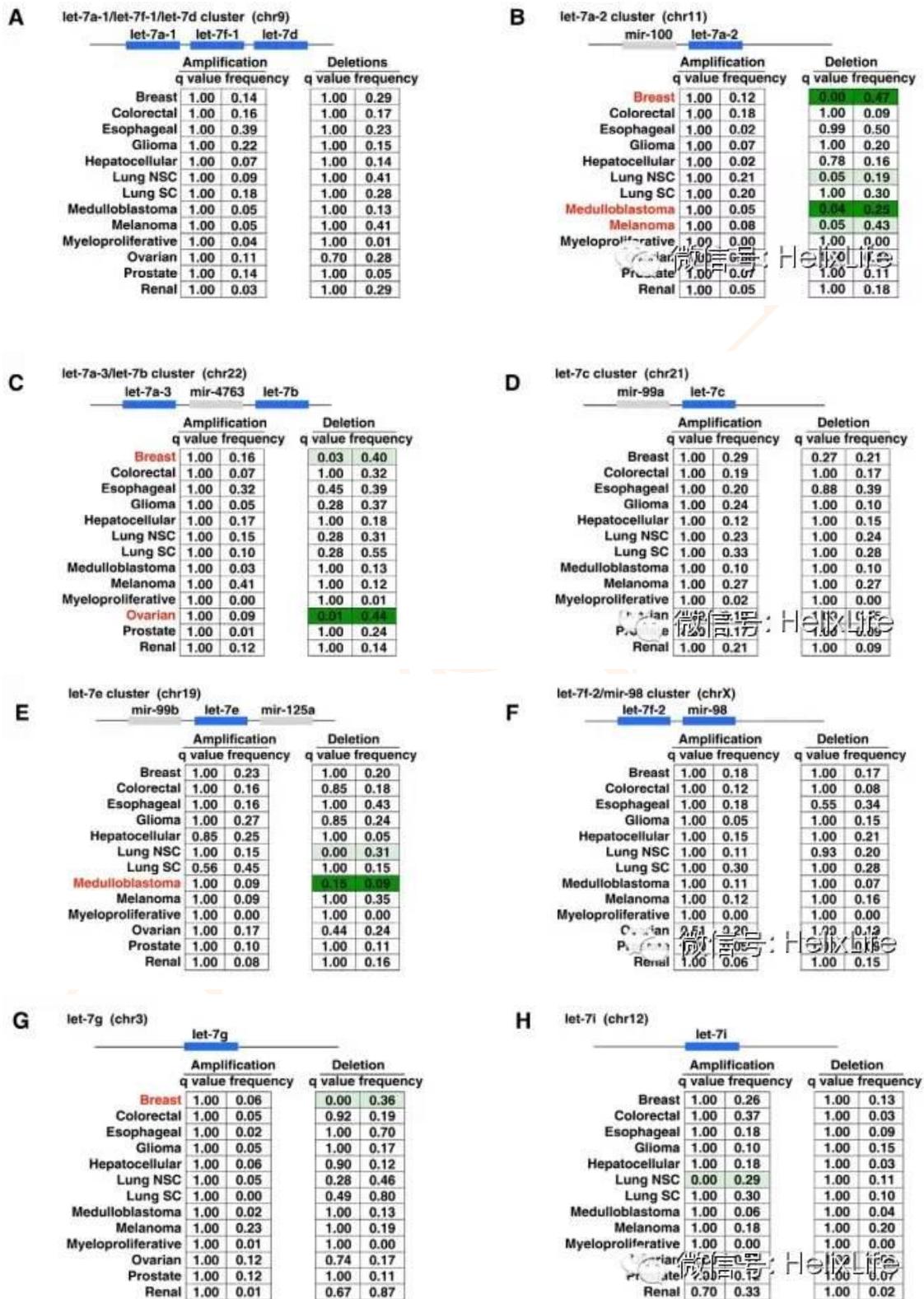
第一个 miRNA 是在 1993 年被发现的。当时两项独立的研究发现，在线虫（*Caenorhabditis elegans*）中有一个基因 **lin-4** 是一个非编码的 RNA（noncoding RNA, ncRNA）。

在当时，由于认知的局限性，这个非编码的 RNA 被认为是线虫中的一种特殊的调控工具，被线虫用来调控编码基因（coding genes）表达的。这一发现在当时并未引起学术界的重视。

直到 7 年后，Reinhart 等人发现了另外一个小的非编码 RNA--**let-7**。他们发现这两个非编码 RNA 都可以通过 **3'非翻译区（3'-untranslated Region, 3'-UTR）** 介导的 RNA-RNA 相互作用，调控下游基因及其信号通路。这项发现极大地激发了科学家们的科研热情，鼓舞他们去探寻新的非编码 RNA。

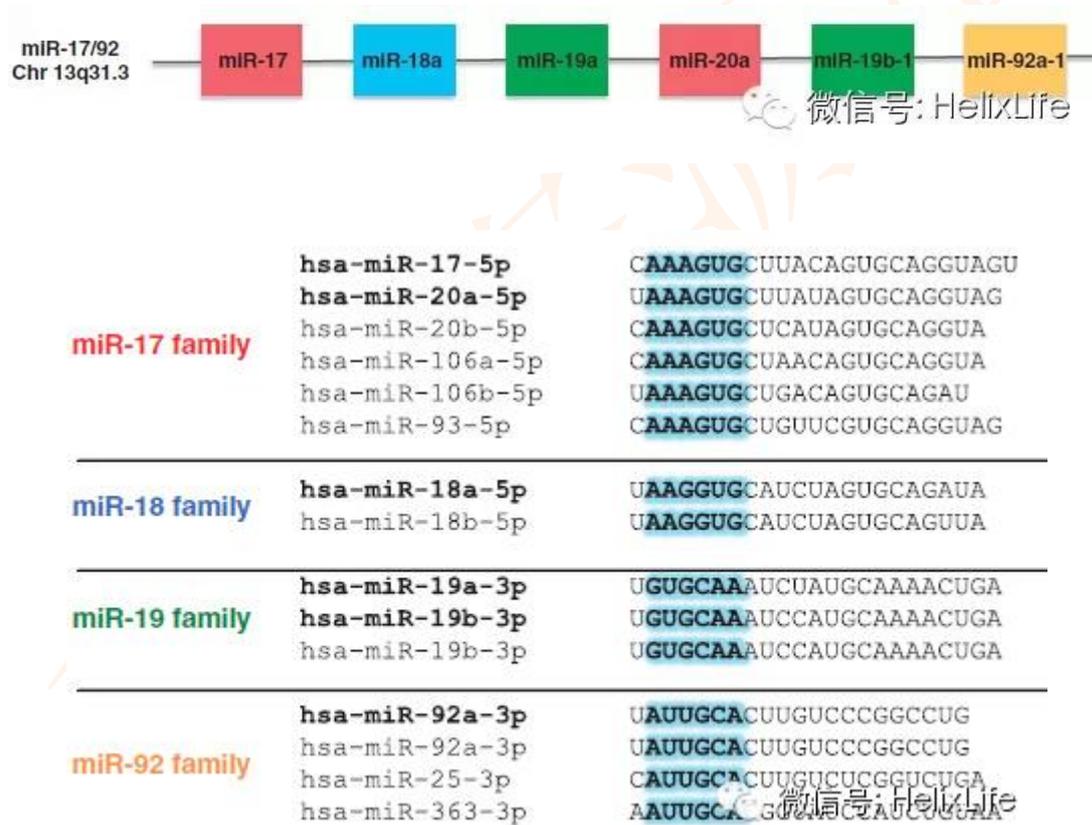
2001 年时，三个不同的课题组分别在不同的物种和细胞内发现了与线虫中类似的短链非编码 RNA。至此，学术界终于认可，在生物体内存在一大类短链非编码 RNA，它们具有强大的调控功能。这类分子，最终被赋予了一个名称--miRNA（小 RNA）。从那以后，几乎所有的植物和动物物种中，都发现了 miRNA 的存在。据最新的报道，在人类中成熟的 miRNA 超过 2000 条，在小鼠中超过 1200 条。

动物细胞内的 miRNAs 在进化上是比较保守的，有证据显示低等动物线虫中有大约 55% 的 miRNAs 可以在人类细胞中找到**同源基因（homologs）**。在高等动物（尤其是哺乳动物）中，由于进化的缘故，导致基因组发生**复制（duplication）**，从而产生多个亚型/异构体（或者被称为**旁系同源基因（paralogs）**），例如人类的 let-7 基因有 8 个不同的**亚型（isoforms）**，分布于 11 个不同的**基因座（genomic loci）**。



Members of the let-7 family show copy number deletions in medulloblastoma, breast, and ovarian cancers. (Wang Y, Hu X, Greshock J, Shen L, Yang X, et al. (2012) Genomic DNA Copy-

大多数（超过 50%）的 miRNAs 都是成簇的，并且在转录时以多顺反子（**multicistronic**）（注 1）的形式进行转录。一般情况下，miRNA 的不同亚型/旁系同源基因都以成簇方式存在，主要的原因是因为这些亚型/旁系同源基因的种子序列（**seed region**）（注 2）是相同的，因此它们在生物体内往往发挥冗余的功能。例如，miR-17/92 簇能转录出一个多顺反子的前体。该多顺反子成熟后，形成 6 个不同的 miRNAs。这些成熟的 miRNAs 又分别属于 4 个不同的 miRNA 家族：**miR-17 家族（miR-17 和 miR-20）**，**miR-18**，**miR-19 家族（miR-19a 和 miR-19b）** 及 **miR-92**（见下图）。



少数 miRNAs 是位于**基因内部（intragenic）**的，因为他们位于其他基因的序列内并且有相同的转录方向。包含 miRNA 序列的**宿主基因（host gene）**可以是编码蛋白的基因，也可以是非编码的基因。在非编码的转录本中，有大约 40%的**基因内 miRNA（intragenic miRNAs）**位于类内含子区域，有大约 10%位于类外显子区域（注 3）。在编码序列中，大多数 miRNA 位于内含子中。

绝大多数的 miRNA 由 **RNA 聚合酶 II (Pol II)** 转录形成，因此在结构上前体 miRNA 结构类似 mRNA，都有 5'加帽区和 3'polyA 的尾部。但是，一小部分含有 Alu 重复序列（注 4）的 miRNA 却是由 **RNA 聚合酶 III (Pol III)** 而转录形成。

注释

注 1. **多顺反子**指一个 mRNA 分子编码多个多肽链。在 miRNA 领域内所谓的多顺反子指一条前体 miRNA 可以编码多个成熟的 miRNA 分子。这些编码 miRNA 的 DNA 片段往往位于同一转录单位内，享用同一对起点和终点。

注 2: **seed region** 指 miRNA 序列中与靶标 mRNA 的 3'UTR 区域，相互结合的核心序列，一般长度在 8 个 nt 左右。

注 3: 由于非编码序列不编码蛋白，因此非编码的 RNA 没有内含子(intron)和外显子(exon)的概念，但是有类似的**类内含子区域 (intronic region)**和**类外显子区域 (exonic region)**。

注 4: **Alu 重复序列**是人类基因组中一族散布的，长度大约为 300bp 的中等重复序列（重复频率 10~104）。它是短分散重复序列（short interspersed element, SINEs, ≤500bp）中最大的一个家族，约占基因组的 3%~6%，以平均间隔 5kb 随机分散于整个基因组中。

视频详解：miRNA 的诞生之旅

作者：亢小玉

扫码看视频



miRNA 是由内源性发卡结构转录产物衍生而来的一种长为 19-25nt 左右的单链 RNA。

miRNA 基因最先被 RNA polymerase II 转录生成 5' 盖帽和 3' 加尾的初级转录体, 称为 pri-miRNA, 长度约为 300-1000bp;

第二, 经 RNase III enzyme Drosha 和 DGCR8 剪切生成由 70 个核苷酸组成的不完全的发卡结构, 并且在 3' 端末端具有 2 个核苷的悬垂, 此末端则为成熟的 miRNA 的末端, 上面有一些凸起和环状结构, 称为 pre-miRNA。DGCR8 是属于 Pasha 蛋白家族的。该茎环结构可以在 miRBase 数据库中查询到。如视频中显示剪切过程。

第三, 该茎环结构的前体 miRNA 被核内转运蛋白 Exportin5 捕获到, 并且通过细胞核孔复合体被运输到细胞外。如图中显示运输过程。

第四, 运输到细胞外的 pre-miRNA 很快被 Dicer 酶与 GTP 酶 Ran 和 TRBP 等组成的复合物识别, 并且开始消化该 pre-miRNA, 切掉其环状结构, 直至其变成不稳定的双链 RNA, 也称为 dsRNA 或者是 miRNA/miRNA*。如视频中显示胞浆中酶消化过程。

第五, dsRNA 的不稳定可以被 AGO 蛋白以及 RNA 解旋酶复合物解链成为两个单链, 并且其中一条被降解, 另一条则成为 20-23nt 的 mature microRNA, 成熟的 miRNA 序列可在 miRBase 数据库中查询到, 如视频中显示 dsRNA 变为成熟 miRNA 的过程

miRNA 成熟过程中的关键性酶和蛋白

RNA polymerase II: 一般认为 miRNA 基因由 RNA polymerase II 转录而来。可将 miRNA 基因转录成 5'端盖帽 m7G 和 3'端加尾 polyA 结构。

Drosha: Drosha 蛋白为 RNase III enzyme 家族中的成员之一，主要作用就是剪切 Pri-miRNA 成为具有 3' 端 2nt 悬垂的 pre-miRNA。

DGCR8: 是第一个被鉴定出来的参与了体内 miRNA 加工过程的 Pasha 蛋白，参与了 Drosha 蛋白对底物的识别。

Exportin5: 为核转运受体家族的一个成员，其作用过程通过核孔复合体进行。Exp5 与 Ran-GTP 以及 Pre-miRNA 形成一个三聚体，通过细胞核孔运输到胞浆，Ran-GTP 则变为 Ran-GDP，从而释放出 Pre-miRNA。Ran-GTP 属于核转运受体家族的辅助因子。

Dicer 酶: 属于 RNase 超家族的第三类酶，经典的 DCR 结构域包括 N 端的 DEXH RNA 解旋酶/ATP 酶结构域，PAZ 结构域和两个相邻的 RNaseIII 样结构域以及一个 dsRNA 结合结构域。

Dicer 酶是成熟的 miRNA 产生所必须的，可以剪切 pre-miRNA 5'端臂，也可以剪切 3' 端臂，或者同时剪切两条臂。

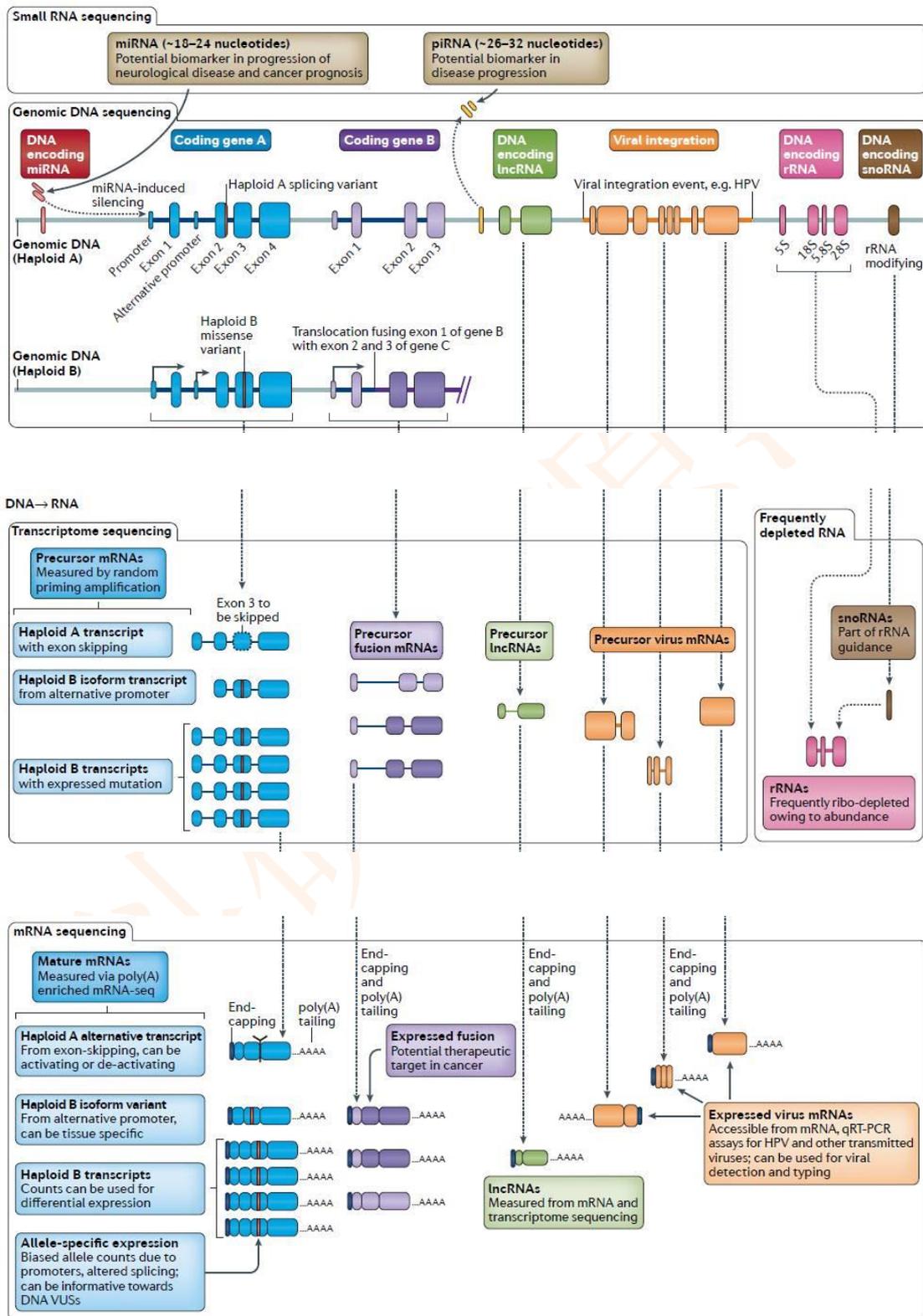
小编辛辛苦苦将此过程展示成动态的过程，另为方便大家更好的理解和熟悉成熟 microRNA 的生物起源，录了个小小的视频，谢谢大家的关注。

一文读懂 | RNA 家族的临床应用价值（图文）

作者：麦子

RNAs 不再仅仅是我们口中的研究热点、基金热点，随着 RNA-seq 技术的出现和各种研究的推进，RNA 家族的一系列成员在包括癌症和传染病在内的许多疾病中显示出了诊断、预后和治疗的潜力，在临床上充满机遇。RNA 种类的多样性也帮助它们具有多方面的临床适用性，目前胞外 RNAs 也具有潜力成为很多疾病的非侵入性诊断指标。今天麦子就和大家一起看下，目前和未来 RNA 家族将如何进驻临床应用领域。

通过各种 seq 方法可以检测到的多种 RNA 类型:



表一：目前基于 RNA 的临床应用

RNA种类	方法	例子	应用
Viral RNA (病毒RNA)	qRT-PCR	• Influenza virus (流感病毒)	病毒检测 和分型
		• Dengue virus (登革病毒)	
		• HIV	
		• Ebola virus (埃博拉病毒)	
mRNA	qRT-PCR	• AlloMap (CareDx; heart transplant)	诊断
		• Cancer Type ID (BioTheranostics)	
	Microarray	Afirma Thyroid Nodule Assessment	诊断
	qRT-PCR	• OncotypeDx (Genome Health; breast, prostate and colon cancer)	预后
		• Breast Cancer Index (BioTheranostics)	
		• Prolaris (Myriad; prostate cancer)	
	数字条形码 mRNA分析	Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature (Nanostring)	预后
	Microarray	• MammaPrint (Agendia; breast cancer)	预后
• ColoPrint (Agendia; colon cancer)			
• Decipher (Genome Dx; prostate cancer)			

miRNA	Microarray	Cancer Origin (Rosetta Genomics)	诊断
融合转录本	qRT-PCR	AML (RUNX1-RUNX1T1)	诊断
	qRT-PCR	BCR-ABL1	监测治疗过程中的分子应答
	qRT-PCR (核外RNA)	ExoDx Lung (ALK) (Exosome Dx)	检测融合
	RNA-seq	FoundationOne Heme	

表二：非编码 RNA 的临床应用潜力

种类	介绍	潜在的临床应用
miRNA	约18-24个核苷酸序列，ncRNA中最具抑制基因表达特征的群体。	包括癌症、阿尔茨海默症、心血管疾病等广泛的疾病中，miRNA都可以作为潜在的生物标志物。基于microarray的miRNA测试目前用来在临床上描述癌症起源。
piRNA	约26-32个核苷酸序列，在抑制转座子和维护生殖基因组完整性方面起作用。	piRNA表达的增加与软组织肉瘤预后不良之间存在关联。
snRNA	约100-300个核苷酸序列，在RNA加工和拼接过程中发挥作用。	U2 snRNA (RNU2-1f) 循环水平已经被提议作为在包括胰腺癌和结肠癌在内的多种肿瘤的潜在生物诊断标志物。
snoRNA	主要两种类型：box C/D snoRNAs(约60-90核苷酸)和box H/ACA snoRNAs(约120-140核苷酸)。在核糖体生物合成和rRNA修饰过程中起到关键作用。	snoRNA表达水平和/或它们的功能片段已经被提议作为癌症和神经退行性疾病等领域的潜在临床诊断物。两个snorna最近在痰样品中得到确认，具有作为肺癌诊断标志物的潜力。

lncRNA	代表着一类长于200核苷酸序列的ncRNA，功能是调控基因的表达。	lncRNAs已经被证明与癌症预后相关联，可以作为癌症的生物标志物。ExoIntelliScore Prostate测试已经将其列在标志物列表中。
circRNA	circRNAs是在3'和5'端具有共价键从而可以形成稳定环状结构的lncRNA。circRNAs可以作为miRNA海绵以及调节剪切和转录过程	初步研究正在探索circRNA水平作为癌症的潜在生物标志物。最近的一项研究显示胃癌中与相邻非肿瘤组织比较，特定circRNA (hsa_circ_002059)水平减少。
tRNA	tRNA在mRNA翻译成蛋白质的过程中起作用。tRNAs高度结构化，碱基具有多处修饰，使得测序非常困难。	最近的研究显示在缺氧或其他压力条件下，tRNA片段可以断裂。在某些情况下，它们可以充当RNA结合蛋白的诱饵，导致其他转录本的不稳定性。

RNAs 从研究到应用到临床哪有那么容易，还是需要过五关斩六将的！这一路的披荆斩棘如下：

临床试验开发和采纳的标准

♥分析有效性

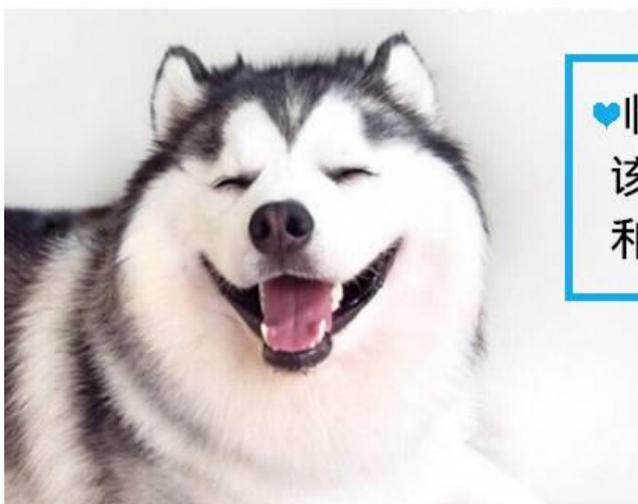
衡量一个特定生物标志物测试的准确性和可靠性

♥临床有效性

该测试检测或预测临床诊断结果效果到达何种程度的准确性

♥临床应用价值

该测试告知临床决策和改善结果的可能性



专栏 | 一文总结 LncRNA 研究思路

作者：老谈

LncRNA 参与了 X 染色体沉默，基因组印记以及染色质修饰，转录激活，转录干扰，核内运输等多种重要的调控过程，很多人看到 LncRNA 的热点还没有过去，经常会问老谈如果没有相关的工作基础，如何开始 LncRNA 的研究?今天我们就褪去虚伪假衣，研究的大方向是这样子的：

1. 寻找到 lncRNA 分子
2. lncRNA 分子表型研究
3. lncRNA 通过何种机制调节表型？

老谈将这些研究方向及实验手段按层次的方式绘成流程图，如下所示：

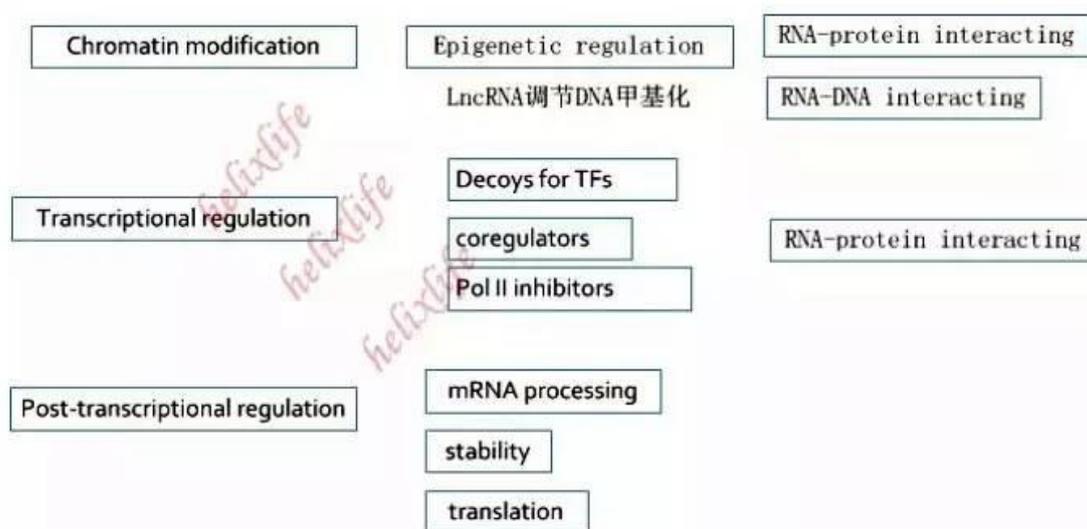


首先，是样本的准备与收集，高质量的样本是实验结果具有可靠性的前提。

其次，是 lncRNA 检测，可以先通过芯片的方式高通量筛选到目的基因，然后通过 q-PCR 或 Northernblot 的方法验证所得到的芯片结果。

再次，其研究方向根据研究目的而定。如果是研究生物标志物，那么可以通过收集更多的临床样本，研究 lncRNA 对疾病的指示作用。如果是研究其功能，则是研究其细胞表型，分子表型及机制。

小伙伴们是不是觉得这和 miRNA 的总体研究思路相似呢？这时可以根据各自的实验平台条件选择相应的研究。值得注意的是，lncRNA 的功能研究并不像 miRNA 一样通过 3'UTR 影响翻译套路，总的来说 lncRNA 机制研究套路还不成熟。对于很多科研工作者，lncRNA 分子的获得及其细胞表型的获得并非难事，关键在于如何进一步进行研究，这时候就要涉及到对功能研究的定位。归纳如下：

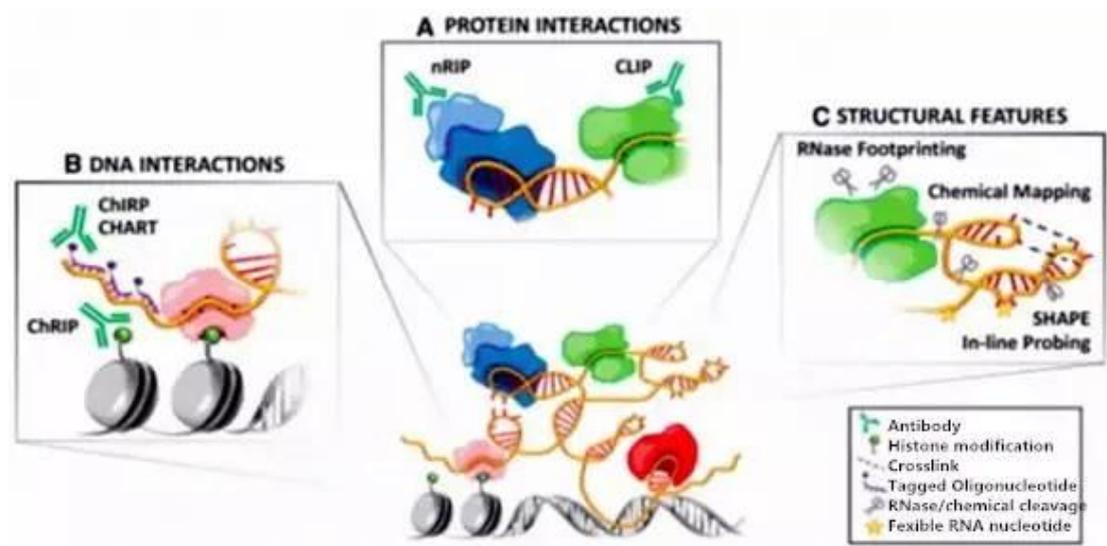


lncRNA 的功能分为 3 方面：

1. 是通过修饰染色体参与表观调节；
2. 通过与转录因子的相互作用参与转录调节；
3. 通过影响 mRNA 处理过程参与转录后调节。

在以上 3 个方向的研究中，其中转录后调节相对简单，大家在选择 lncRNA 的时候，可以对其序列做一下分析，看看自己研究的 lncRNA 是作为 miRNA 的 sources 还是 sinks？

另外两方面的调节机制均涉及 RNA-蛋白质的相互作用。在没有目的蛋白的时候，此时不得使用先进技术，用于检测 RNA-蛋白质相互作用的实验手段如下：



RNA-蛋白质相互作用的检测手段有 nRIP, CLIP; lncRNA 由于其长片段核苷酸序列, 碱基之间相互作用, 通常二级结构, 可通过 RNase 足迹等实验手段进行探讨; 在染色体结构修饰作用中, 还会涉及 RNA-RNA 的相互作用, 可通过 ChIRP 等实验手段来研究。

由于上述实验手段比较难得, lncRNA 的机制研究相对还是比较困难。那我们该怎样进行 lncRNA 研究呢? 咱换个思路, 不要将 lncRNA 作为一个调节分子, 而是把 lncRNA 当做和 mRNA 一样的分子来研究, 尽管很少表达蛋白。在体外, 可以通过分子干扰手段, 进行分子及表型研究; 在体内, 也是如此。两者通过各种组合, 那就等着发 5 分的文章吧。

circRNA 研究必备神器之傻瓜攻略大全

作者: 子非鱼

circRNA 很红, 这个大家都知道。尤其是它身上那份高大上的神秘感, 引得一众科学家瞬间产生扑倒 circRNA 的好奇感, 并期望能看到该领域中更多不一样的风景。

但眼下 circRNA 研究的一个巨大挑战就是, 有关 circRNA 的可参考信息不多, 怎么往下研究也没有目标。为了让大家早日玩转 circRNA, 则本文推荐六款非常 Powerful 的在线分析神器

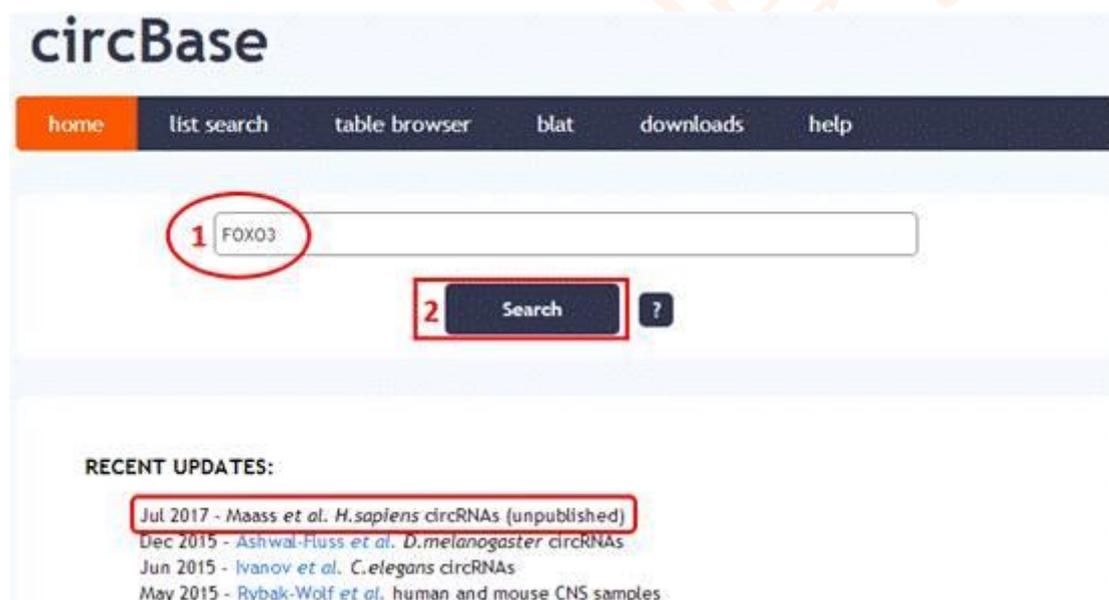
来助大家一臂之力。

circRNA 基本信息分析神器：circBase

目前，数据库 circBase (<http://www.circbase.org/>) 收集包括以下 6 个物种的 circRNA 信息：人 (hg19)、小鼠(mm9)、秀丽线虫(ce6)、黑腹果蝇(dm3)、矛尾鱼(latCha1)、腔棘鱼(latCha1)。

该数据库最新版本发布时间为 2017 年 6 月，可帮助大家对筛选验证的 circRNA 有个具体的认识，还可直接下载到相关序列信息和注释信息，其界面打开如下。

在主页中间搜索框中输入基因名称，这里以“FOXO3”基因为例进行操作演示，点击“search”按钮。



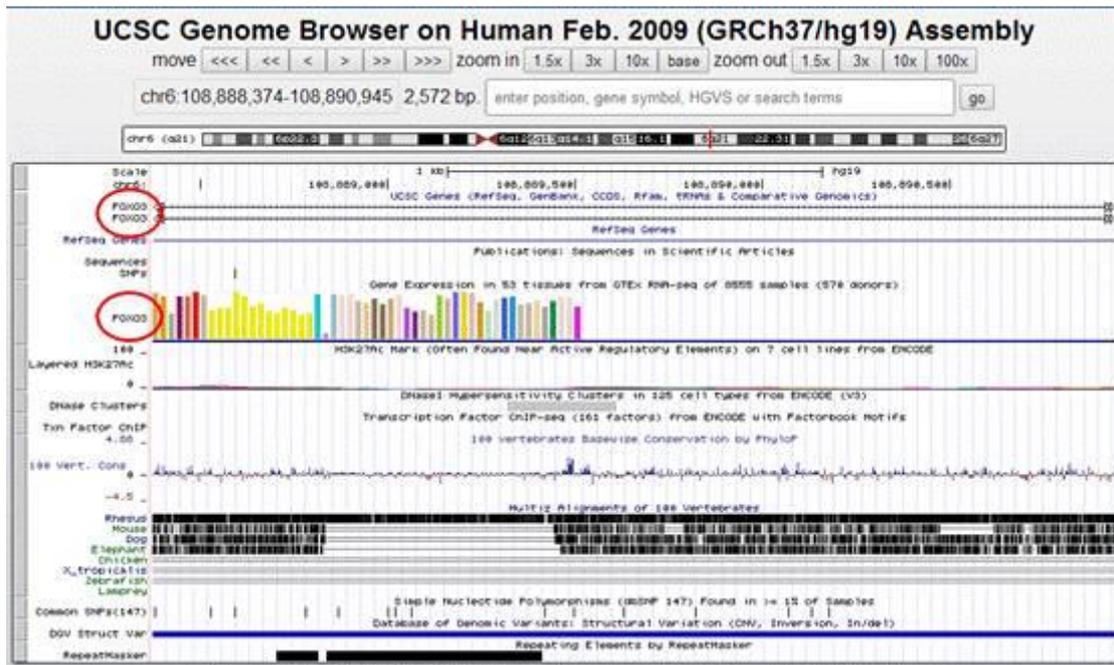
对照搜索结果，对 circRNA 信息进行核对，下图可以看出人的 FOXO3 基因组序列上对应两个 circRNA，分别是 hsa_circ_0130221 和 hsa_circ_0006404。

Export results:												
organism	position (genome browser link)	strand	circRNA ID	genomic length	spliced length	samples	scores	repeats	annotation	best transcript	gene symbol	circRNA study
hsa	chr6:108888374-108890945	+	hsa_circ_0130221	2571	2571	diencephalon, frontal_cortex	3, 2	NA	ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, intronic	NM_001455	FOXO3	Rybak2015
hsa	chr6:108984657-108986092	-	hsa_circ_006404	1435	1435	Hs68_control, Hs68_RNase, A549, Ag04450, Bj, Gm12878, H1hesc, Helas3, Hepp2, Hsmm, Huvec, K562, Mcf7, Nhek, Nhlh, Sknshra	NA, NA	None	ANNOTATED, CDS, coding, INTERNAL, OVCODE, OVEYON, UTR3	NM_001455	FOXO3	Jeck2013, Salzman2013
mmu	chr10:41902493-41902614	-	mmu_circ_0002205	121	121	cerebellum	2	NA	ALT_ACCEPTOR, ALT_DONOR, coding, INTERNAL, OVEYON, UTR3	ENGMUST00000105502	Foxo3	Rybak2015
mmu	chr10:41903167-41903329	-	mmu_circ_0002206	162	162	hindbrain	12	NA	ANTISENSE, coding, INTERNAL, OVEYON, UTR3	ENGMUST00000105502	Foxo3	Rybak2015
mmu	chr10:41916271-41917707	-	mmu_circ_0002207	1436	1436	cerebellum, frontal_cortex, P19_exp1_D12, P19_exp1_D4, PH_D14	3, 3, 2, 2, 2	NA	ANNOTATED, CDS, coding, INTERNAL, OVCODE, OVEYON, UTR3	ENGMUST00000105502	Foxo3	Rybak2015

上述搜索结果表格中的蓝色字体标记的文字都包含超链接，可以进一步点开查看详细信息。在点击 [hsa_circ_0130221](#) 后，可跳转其详细信息界面。

ID	hsa_circ_0130221					
Position	chr6:108888374-108890945					
Strand	+					
Genomic length	2571					
Spliced sequence length	2571					
Annotation	ALT_ACCEPTOR ALT_DONOR coding INTERNAL intronic					
Repeats	NA					
Best transcript	NM_001455					
Gene symbol	FOXO3					
Scores	circRNA study	Sample	total reads circular junction	unique reads circular junction	unique reads linear-5' junctions	unique reads linear-3' junctions
	Rybak2015	frontal_cortex	2	2	0	0
		diencephalon	3	2	0	0

点击 [hsa_circ_0130221](#) 下行的 Position，则跳转 UCSC 基因组浏览器界面。下图即可形象地展示 FOXO3 相关 circRNA [hsa_circ_0130221](#) 的基因组信息了。



输出 circRNA 的序列时，可在搜索界面中点击 export results 中的 Fasta，可跳转以下界面：

circRNA sequence: genomic spliced

Extend upstream by: bases

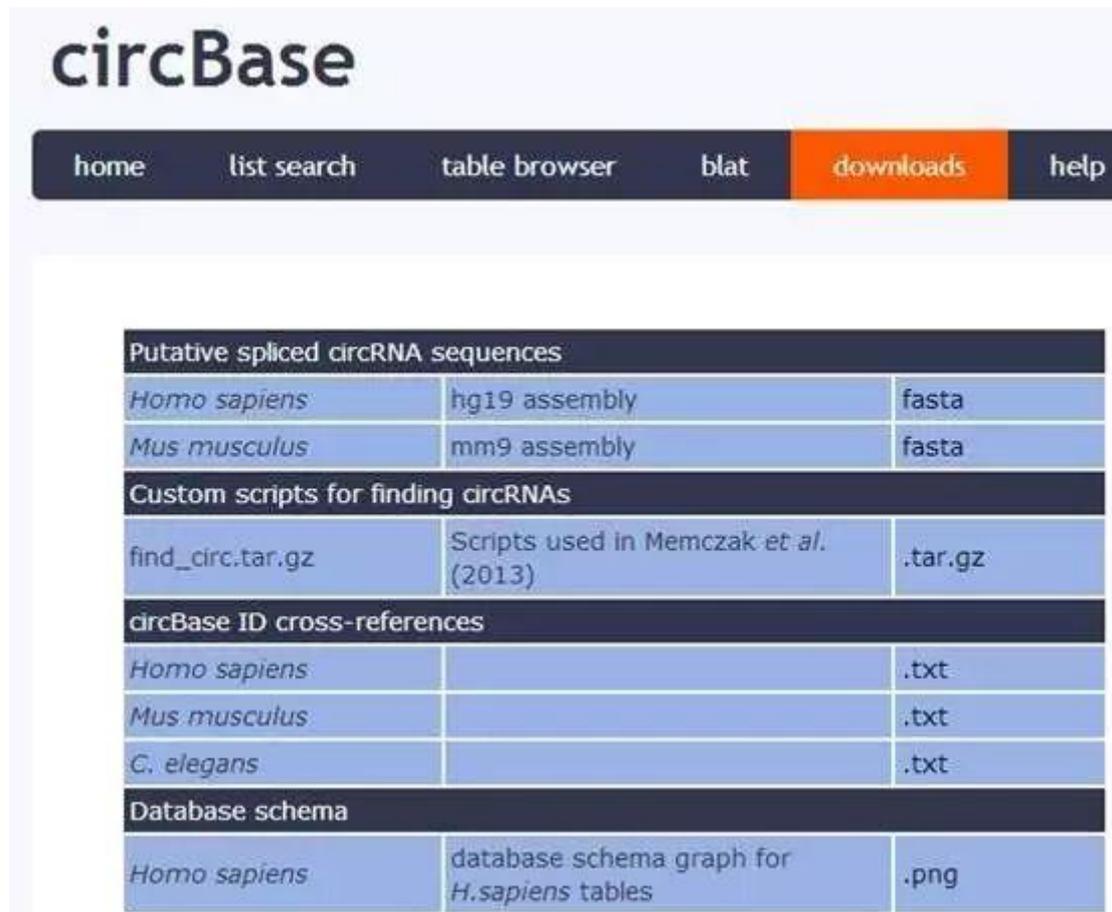
Extend downstream by: bases

Sequence around splice sites only: bases upstream
 bases downstream



在 circRNA sequence 中选择“spliced”，下方选“search”后即可得到成环序列；选择“genomic”，下方选择“Extend upstream by 1000 bases”即可得到上游延伸 1000bp 的包含成环以及内含子的序列。

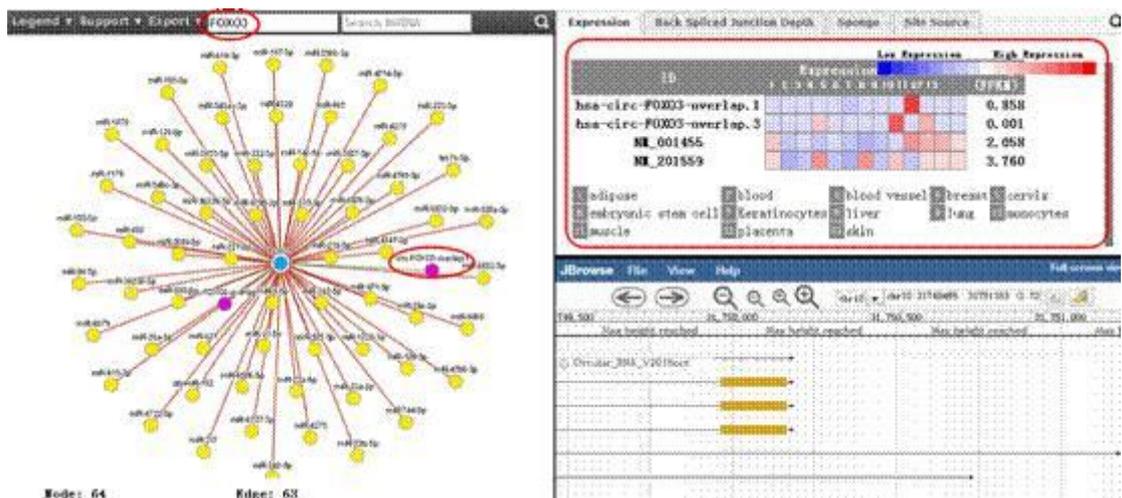
可能有些做组学研究的小伙伴们需要整个物种的 circRNAs 序列信息，在这种情况下，大家只需要在工具栏“downloads”项进行选择，找到对应的物种，点击下载就可以了：



ceRNA 功能研究数据库: circNet

CircNet (<http://circnet.mbc.nctu.edu.tw/>) 利用 464 个 RNA-seq 测序数据, 进行新 circRNA 预测及基因组注释, 并计算已知的及新预测的 circRNA 表达情况, 构建 circRNA-miRNA-gene 调控网络, 以上信息均可从该数据库获得。

以 FOXO3 为例, 在打开的界面中, 直接在搜索框中输入 FOXO3, 其结果如下:



如图所示，不仅显示了 FOXO3 相关的环状 RNA circ-FOXO3.1，还显示了 microRNA，右侧上面点击 Expression 则会显示 circ-FOXO3.1 在不同组织中的表达水平，右侧下面可以根据位置对 circ-FOXO3.1 进行查询显示。

circRNA 人疾病相关联数据库：circ2Traits

Circ2Traits (<http://gyanxet-beta.com/circdb/>) 是一个收集与人类疾病或性状潜在关联的 circRNA 数据库，可通过预测 miRNAs 和人类的蛋白质编码基因、长链非编码基因及环状 RNA 间的相互作用关系，构建了相互作用网络，并对 miRNAs-circRNA 相互作用组中的蛋白编码基因进行了 GO 富集分析；此外，将与疾病相关的 SNPs 位点定位到 circRNA 基因座上，并鉴定了环状 RNAs 上的 Ago 相互作用位点。

其界面打开后可看到三个功能模块，如下图所示。在下拉框中选择相应疾病名称后，点击 Search 即可查看与该疾病相关的 circRNA。

Search by Disease Name

1.选择疾病名称

Search by Keywords for individual genes

2.用关键词搜索单个基因

Search by Keywords for GWAS associated circRNAs

3.用关键词搜索GWAS关联的circRNAs

以 BRCA 基因为例，在 Search by keywords for individual genes 中左下拉框中选择 Protein coding

gene，并在 Input 后输入 BRCA 基因后，点击 search 按钮。

Search by Disease Name

breast cancer Search

Search by Keywords for individual genes

Protein coding gene Input:BRCA Search

Search by Keyword

Protein coding gene
Circular RNA
microRNA
lncRNA gene

ENTER KEYWORD: Search

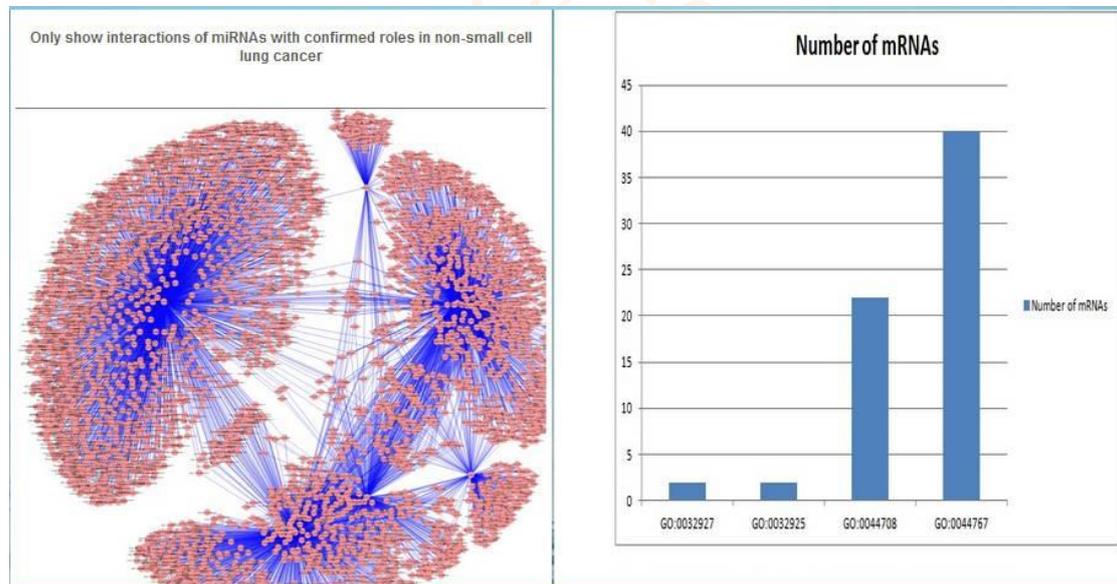
Your Search Results for Protein coding gene BRCA

Click on individual disease names to get detailed network of miRNA-circRNA-mRNA-lncRNA interactions

Showing results 1 to 1 of 1

Serial no.	Gene Name	Associated Disease
1	NM_020993;BRCA1	non-small cell lung cancer

其结果如下，点击 Associated Disease 中的 non-small cell lung cancer 后，可跳转至新的界面。

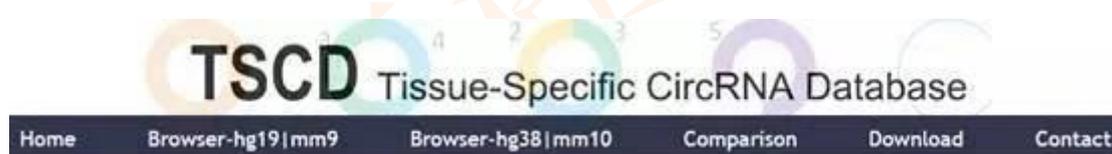


点击左图中任一个橙色点，则会出现以下结果：

Serial no.	miRNA Name	Regulation/Experiment type	circular RNA Target	mRNA target
1	hsa-let-7a	down-regulated, Northern blot	hsa_circ_002136 hsa_circ_001621 hsa_circ_000541 hsa_circ_000040 hsa_circ_000570 hsa_circ_000044 hsa_circ_001483 hsa_circ_001013 hsa_circ_001839 hsa_circ_002024 hsa_circ_000019 hsa_circ_001555 hsa_circ_001450 hsa_circ_001903 hsa_circ_000079 hsa_circ_001625 hsa_circ_000791 hsa_circ_000546 hsa_circ_000816 hsa_circ_001371 hsa_circ_000826 hsa_circ_000808 hsa_circ_002157	ABHD13 (NM_032859) ABL2 (NM_001168239) ACSL4 (NM_004458) ACTL6A (NM_004301) ACVR1B (NM_004302) ACVR2B (NM_001106) ADAMTS1 (NM_006988) ADCY9 (NM_001116) ADIPOR2 (NM_024551) AEN (NM_022767) AFF1 (NM_005935) AFF4 (NM_014423) AKAP11 (NM_016248) AKT3 (NM_005465) ANTXR1 (NM_032208) APP (NM_000484) APP (NM_001136130) APPBP2 (NM_006380) ARF1 (NM_001024228) ARG2 (NM_001172) ARHGAP1 (NM_004308) ARHGAP28 (NM_001010000) ARID3A (NM_005224)

circRNA 组织特异性分布数据库：TSCD

TSCD 数据库 (<http://gb.whu.edu.cn/TSCD/>) 是检索人和小鼠中组织特异性的 circRNA 信息的数据库，也包括成人和胚胎的不同组织。对于想了解不同组织中的特异性表达的 circRNA，可以在该数据库进行检索。



以查询“人的胎儿心脏和肝脏组织共有的 circRNA”为例，首先进入网站后点击 Comparison，选择“Heart”和“liver”



submit 提交得到一份结果文本，文本中收录的便是心脏和肝脏组织共有的 circRNA 信息。

CircRNA_ID	chromos	junction	strand	Gene_loc	CircRN	Tissues	Samples
chr10:101800241 10	chr10	2,4	-	MGEA5	exon	heart,liver	heart_adult_34_year_male,liver_adult_32_yea
chr10:101806044 10	chr10	2,3	-	MGEA5	exon	heart,liver	heart_adult_34_year_male,liver_child_6_year
chr10:112155863 11	chr10	3,12,6	-	GPAM	exon	heart,liver	heart_adult_34_year_male,liver_adult_32_yea
chr10:12081471 120	chr10	3,4,3,7	+	DHTKD1	exon	heart,liver	heart_RA_adult_51_year_female,heart_adult
chr10:12160929 121	chr10	6,3	+	SEC61A2	exon	heart,liver	heart_LV_adult_53_year_female,liver_adult
chr10:15159770 151	chr10	2,3	-	NMT2	intron	heart,liver	heart_adult_34_year_male,liver_child_6_year
chr10:18609844 186	chr10	2,2	-	NSUN6	exon	heart,liver	heart_LV_adult_51_year_female,liver_child_6
chr10:32451591 325	chr10	4,2	+	CCDC7	exon	heart,liver	heart_adult_34_year_male,liver_adult_32_yea
chr10:32472480 325	chr10	5,3	+	CCDC7	exon	heart,liver	heart_adult_34_year_male,liver_adult_53_yea
chr10:37833024 378	chr10	2,2	-	ZNF248	exon	heart,liver	heart_adult_34_year_male,liver_adult_32_yea
chr10:45728905 457	chr10	2,2	+	FAM21C	exon	heart,liver	heart_adult_34_year_male,liver_child_6_year

以查询“人的心脏组织中以 A2M 为线性母本基因形成的 circRNA”为例。进入网站 TSCD 后点击 Browser-hg19/mm9，选择 Human-Adult 和 Heart，并在搜索框内键入“A2M”，得到如下结果：

Sample_ID	circRNA_ID	chromos	donor_site	acceptor_site	junction	strand	algorithm	Gene_symbol	CircRNA_type	Region	genomic	MRE
1 heart_adult_34_year_male	chr12:9229502 9231922	chr12	9229502	9231922	2	-	find_circ	A2M	exon	mRNA	2420	MRE
2 heart_LV_adult_53_year_female	chr12:9225317 9227311	chr12	9225317	9227311	5	+	find_circ	A2M	exon	mRNA	1994	MRE
3 heart_adult_34_year_male	chr12:9247568 9266139	chr12	9247568	9266139	4	+	circRNAfinder,CIR	A2M	exon	mRNA	18571	MRE
4 heart_LV_adult_53_year_female	chr12:9229351 9229484	chr12	9229351	9229484	2	+	find_circ	A2M	exon	mRNA	133	MRE

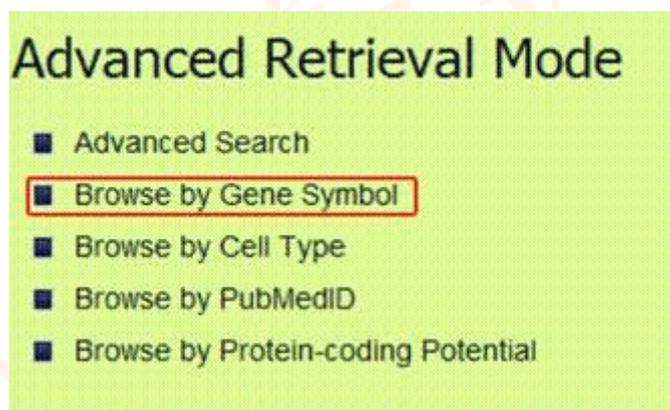
点击“A2M”，可以查看 A2M 作为线性母本形成 circRNA 的情况，并以图片和表格两种形式呈现。

circRNA 编码蛋白数据库：circRNADB

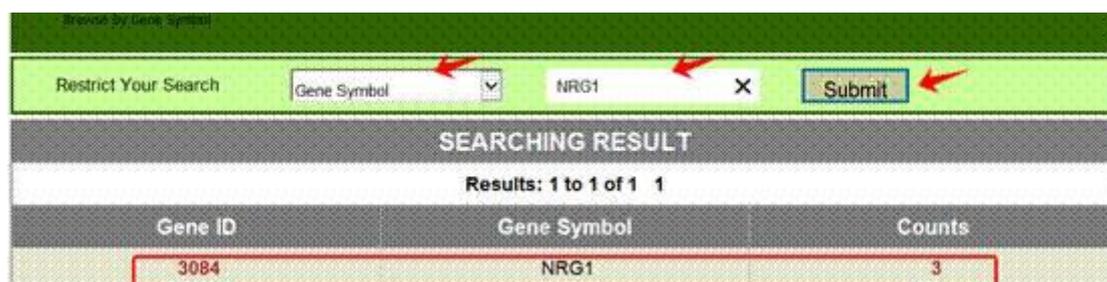
circRNADB 数据库 (<http://202.195.183.4:8000/circnadb/circRNADB.php>) 共收录了 32914 条人类外显子 circRNA 记录，每条记录都包括基因组位置信息，RNA 编辑情况，所对应的基因组序列，IRES 序列元件，预测的 ORF (Open Reading Frame) 以及相关的参考文献。



该网站主界面清晰，设计人性化，在 Advance Retrieval 可以根据基因名称（Gene symbol），PubMed ID 及细胞或组织类型等多种检索条件，满足不同查询需求。查询以 NRG1 基因为线性基因的 circRNA 为例。



点击 Advance Retrieval——Browse by Gene Symbol，选择 Gene Symbol 后，在搜索框中输入“NRG1”，提交后可发现 NRG1 这个基因可形成 3 种 circRNA。



点击进入新的界面,这三个 circRNA 分别是 hsa_circ_13061、hsa_circ_00907 和 hsa_circ_14429,具体情况可点击名称进一步查看。

NRG1							
Summary							
Official Symbol	NRG1						
Official Full Name	neuregulin 1						
Gene Type	protein-coding						
Organism	Homo sapiens (human)						
See Related	Gene ID: 3084; Ensembl: ENSG00000157168						
Location	8p12						
Circular RNA Isoforms							
Circ_id	Chrom	Start	End	Strand	genomic_length	best_transcript	spliced_seq_len
hsa_circ_13061	chr8	32453343	32463201	+	9858	NM_001159995	302
hsa_circ_00907	chr8	32453343	32472082	+	18739	NM_001159999	353
hsa_circ_14429	chr8	32453345	32474403	+	21058	NM_013964	402
Total : 3							

预测结合靶点的数据库: CirInteractome

数据库 CirInteractome (<https://circinteractome.nia.nih.gov/>) 预测了已知的 109 个 RNA 结合蛋白数据集与 circbase 中的 circRNA 的结合位点,并利用 Targetscan 软件预测了 miRNAs 与 circRNA 的潜在结合位点。可进行 circRNA 分子检索、circRNA 结合蛋白预测、PCR 引物设计、siRNA 干扰序列设计等操作。

1、circRNA 分子检索:以 hsa_circ_0000284 为例,在 circular RNA 的界面中输入 hsa_circ_0000284 后,点击 cirRNA search 即可获取 circRNA 详细信息。

- Home
- Circular RNA**
- RBP on CircRNA
- miRNA Target Sites
- Divergent Primers
- siRNA Design
- Help

This tool will search for Human circRNA and Interacting RBPs

Step1: Enter your circRNA of interest / Gene of interest or select your cell line/tissue of interest

CircRNA (Max: 20 chars)

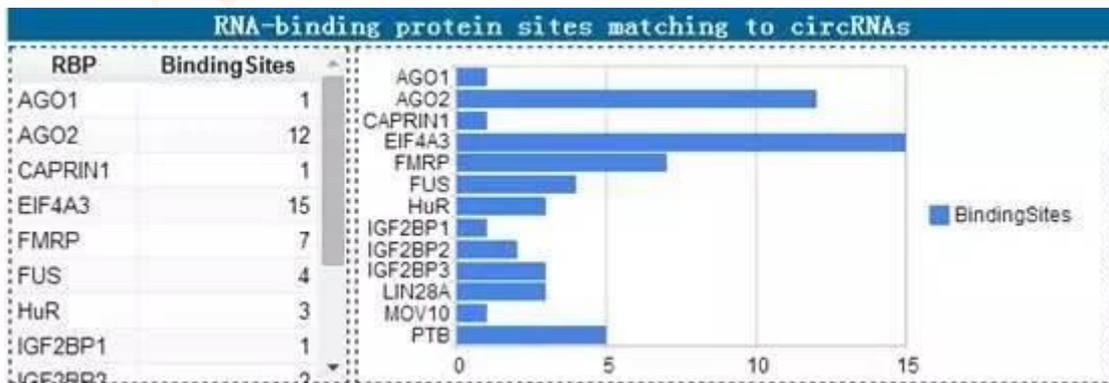
Gene Symbol (Max: 20 chars)

Cell line/Tissue

Step2: Click on "circRNA Search" button to search

CircRNA ID	hsa_circ_0000284	Location	chr11:33307958-33309057
Genomic Length	1099 bp	Spliced Seq Length	1099 bp
Best Transcript	NM_005734 Primers	Gene Symbol	HIPK3
Samples	HEK293, cd_19, cd_34, neutr, Hs68_RNase, Hs68_control, K562, Huvec, Hsmm, Hepg2, Helas3, Hlhesc, Gm12878, Bj, Ag04450, A549, Nhek, Nhlf, Sknshra, Mcf7, SY5Y_exp2_D0, diencephalon, Sy5y_exp1_D4, cerebellum, Sy5y_exp1_D0, occipital_lobe, frontal_cortex, Sy5y_exp1_D2, parietal_lobe, SY5Y_exp2_D8, temporal_lobe, SY5Y_exp2_D4	Study	Jeck2013, Memczak2013, Rybak2015, Salzman2013
GenomicSeq	hsa_circ_0000284	Mature Seq	hsa_circ_0000284

此外，还会显示 circRNA 的上 RBP 结合位点，分析 circRNA 作为 RBP 蛋白‘sponge’或‘decoy’的可能性；以及 circRNA 的 junction 和 Flanking 序列可能结合的 RBP 蛋白信息，其结果如下图所示：



RNA-binding protein sites matching circRNA junction	
RNA-binding Protein	# Tags
EIF4A3	1
IGF2BP2	1
IGF2BP3	1
RNA-binding protein sites matching flanking regions of circRNA	
RNA-binding Protein	# Tags
EIF4A3	3
IGF2BP1	1
IGF2BP2	1
IGF2BP3	1

而当你想知道某个 RBP 是否能结合感兴趣的 circRNAs 时，只要在该网站 RBP on CircRNA 这个界面中进行检索预测即可。

Home
Circular RNA
RBP on CircRNA
miRNA Target Sites
Divergent Primers
siRNA Design
Help

This tool will search for RNA Binding Protein Cluster Tags matching with Human circRNA

Step1: Enter your RNA-binding protein of interest (e.g., HNRNPC)
感兴趣的蛋白 (Max: 20 chars)

Step2: Enter your circRNA of interest
hsa_circ_0000284 (Max: 20 chars)

Step3: Select Output Type (Download Excel File or Online)
Excel file download ▾

Step4: Click on "RNA-binding Protein Search" button to search circRNA Database
RNA-binding Protein Search 重置

点击、输入、点击

2、circRNA 结合 miRNA 预测：目前最常见的 circRNA 功能研究就是其以 ceRNA 机制发挥生物学功能。因而只要输入感兴趣的 circRNA 和感兴趣的 miRNA，就可以预测到他们可能的结合位点信息。如果结果显示有，您只要根据该信息就行后期验证就可以了。

This tool will search for miRNAs targeting Human circRNA

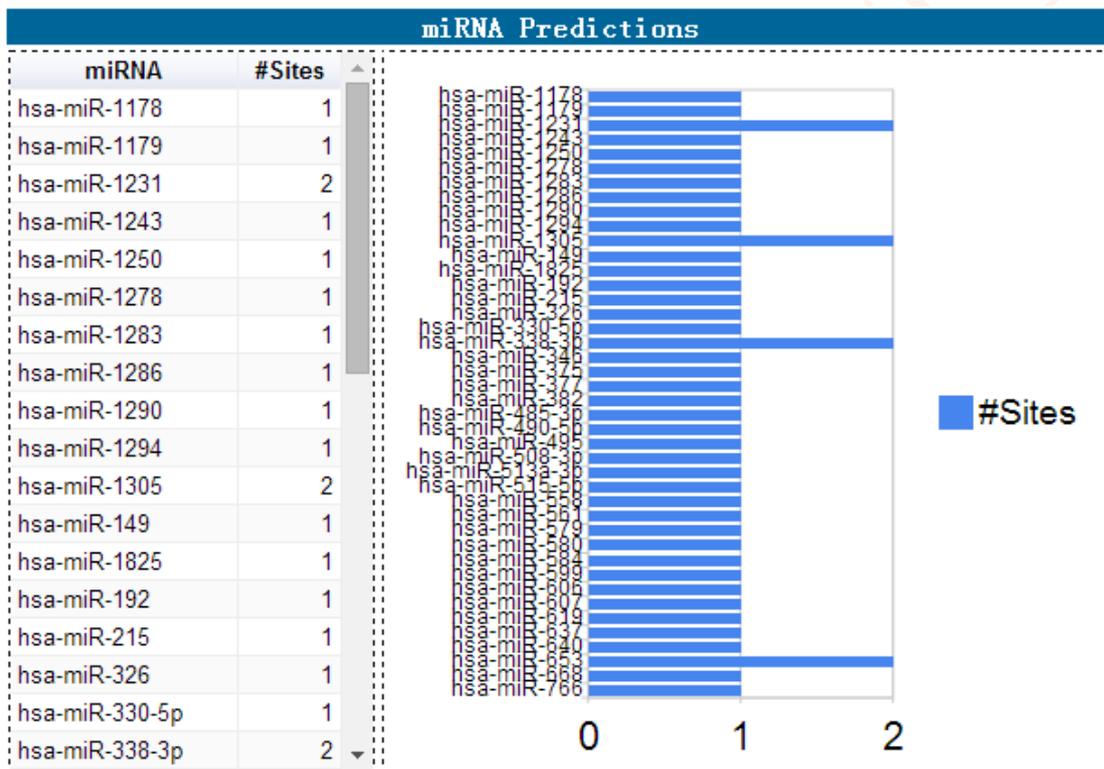
Step1: Enter your circRNA of interest
 (Max: 20 chars)

Step2: Enter your microRNA of interest (e.g., hsa-miR-647)
 (Max: 20 chars)

Step3: Click on "miRNA Target Search" button to search circRNA Database

Home
 Circular RNA
 RBP on CircRNA
 miRNA Target Sites
 Divergent Primers
 siRNA Design
 Help

点击、输入、点击



3、circRNA 验证反向引物设计：输入 circRNA 分子后，点击 Divergent primers search，即可获得所查询 circRNA 分子的 junction sequence，下面还附带了 2 个 PCR 引物设计工具 primer3 和 NCBI primer design，研究者可自行选择。

Home
Circular RNA
RBP on CircRNA
miRNA Target Sites
Divergent Primers
siRNA Design
Help

This tool will generate Divergent Primers for Human circRNA

Step1: Enter your circRNA of interest (full symbol or partial symbol)

hsa_circ_0000284 (Max: 20 chars)

Step2: Click on "Divergent Primers Search" button to generate circRNA Divergent Primers

Divergent Primers Search 重置

点击、输入
点击

hsa_circ_0000284 junction sequence (3' End - 5' End of circRNA)

CTGTTCCGCAGCCCTTACAGGGTTAAAGTAATAGACTTTGGGTCGGCCAGTCATGTATCAAAGACTGTTTGGTCAACATATCTACAATCTCGGTACTACAG
GTAIGGCCCTCACAAGTCTTGGTCTACCCACCATATGTTTATCAAACCTCAGTCAAGTGCCTTTTGTAGTGTGAAGAAACTCAAAGTAGAGCCAAAGCAGTTG

Divergent primer design tools

Primer3 NCBI Primer Design

点击 Primer3, 页面跳转到 Primer3 网站, 点击"Pick Primers"按钮。即可获得特异性引物序列。

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.

There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3>

Paste source sequence below (5' ->3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as | sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a [Mispriming Library \(repeat library\)](#): NO

>hsa_circ_0000284
CTGTTCCGCAGCCCTTACAGGGTTAAAGTAATAGACTTTGGGTCGGCCAGTCATGTATCAAAGACTGTTTGGTCAACATATCTACAATCTCGGTACTA
CAGGTATGGCCTCACAAGTCTTGGTCTACCCACCATATGTTTATCAAACCTCAGTCAAGTGCCTTTTGTAGTGTGAAGAAACTCAAAGTAGAGCCAAAG
CAGTTG

Pick left primer, or use left primer below: Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:

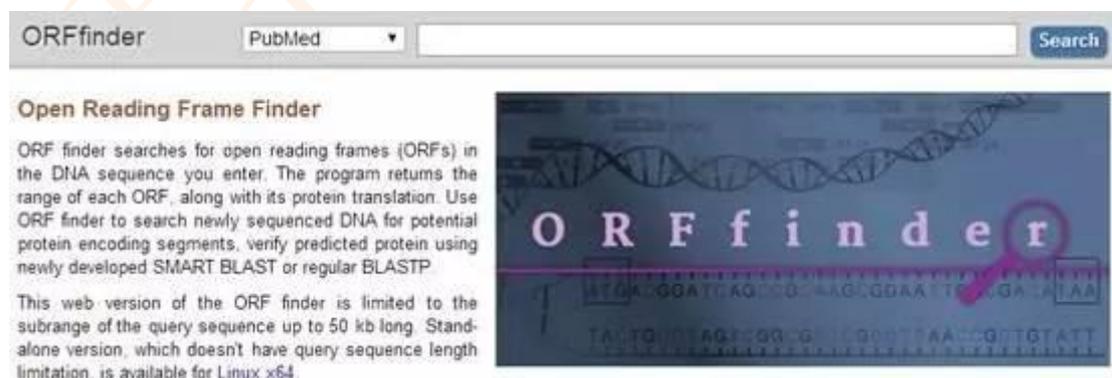
Pick Primers Reset Form

hsa_circ_0000284 - Potential siRNA Target Sequences (Sense Strand)	
S. No.	siRNA Target Sequence Please click on siRNA Target Sequence link to run blast search on NCBI server
1	ACTACAGGTATGGCCTCACAA
2	TACAGGTATGGCCTCACAAGT
3	TACTACAGGTATGGCCTCACA
4	GGTACTACAGGTATGGCCTCA
5	TCGGTACTACAGGTATGGCCT
6	ATCTCGGTACTACAGGTATGG
7	AATCTCGGTACTACAGGTATG
8	CTACAGGTATGGCCTCACAAG
9	TCTCGGTACTACAGGTATGGC
10	GTACTACAGGTATGGCCTCAC
Dharmacon Custom siRNA IDT siRNA Please add "dTdT" 3' DNA overhang	

circRNA 翻译潜能预测网站

circRNA 是否具有翻译潜能，首先得看其是否拥有开放阅读框（ORF），其次得看其是否具有内在的核糖体进入结合位点（Internal Ribosome Entry Site, IRES）。为此，这两款在线软件大家就一定要记住了。

1、ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)，只要输入 circRNA 的序列信息，就可以直接看到 ORF 区域了。



2、IRESite (http://iresite.org/IRESite_web.php)，基于已有 68 个病毒和 115 个真核细胞的实

验数据，收录了大量的具有 IRES 位点的基因。因此，将感兴趣的 circRNA 的序列输入比对，就能预测 circRNA 是否具有 IRES 位点。



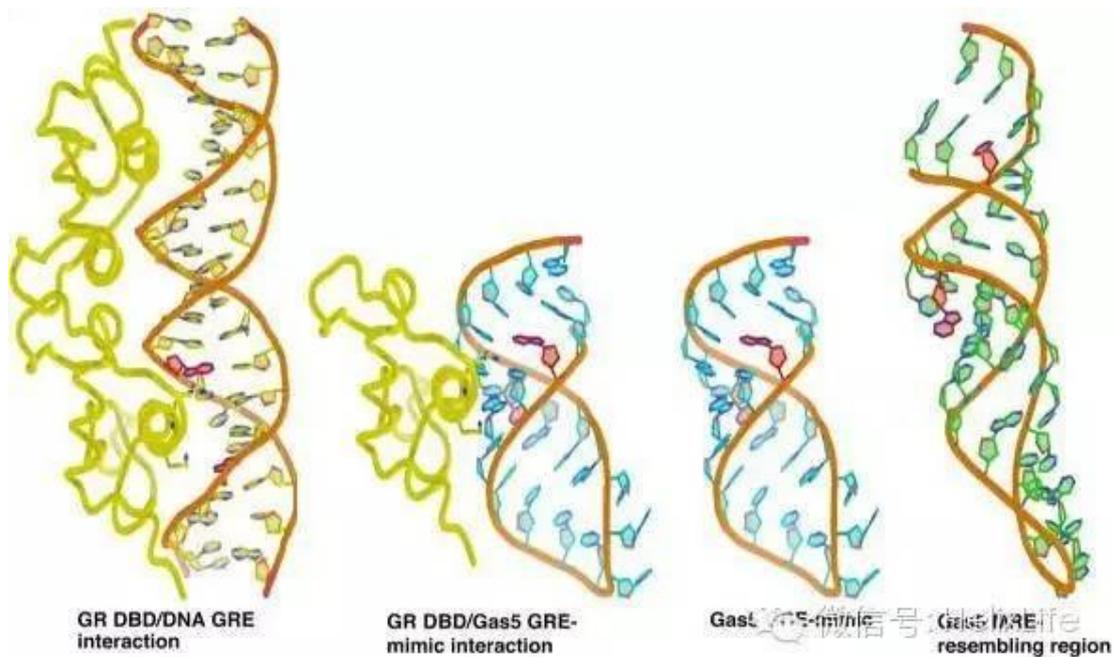
lncRNA 系列：lncRNA 的生物学功能 (二)

作者：老谈

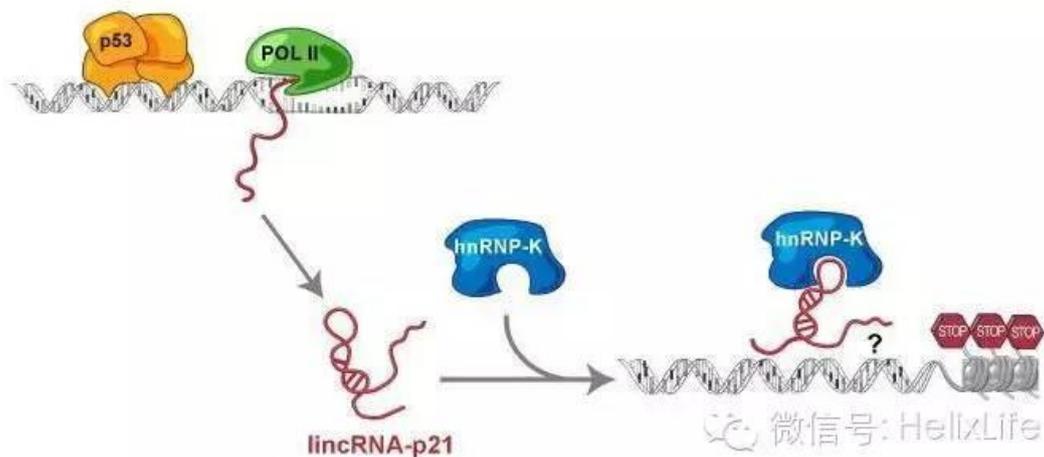
(一) lncRNA 对于细胞周期及凋亡的调控作用

有研究报道，lncRNA 可以通过调节细胞周期和凋亡的方式，来影响细胞的增殖。

例如，Gas5 (growth arrest-specific 5, 非编码 RNA) 在细胞周期阻滞的细胞内大量集聚。其发挥作用的机制是抑制对于糖皮质激素敏感的基因表达，使得细胞发生凋亡。Gas5 能与糖皮质激素受体上的“糖皮质激素反应元件” (glucocorticoid response element, GRE, 该反应元件位于糖皮质激素受体的 DNA 结合结构域内) 相结合，通过竞争性抑制的方式抑制由糖皮质激素受体诱导的 DNA 转录反应。



第二个例子是 lincRNA-p21 (Long intergenic non-coding RNA-p21)。该分子由 p53 激活并在 p53 信号通路中发挥重要作用并诱导细胞凋亡。lincRNA-p21 和 hnRNP-K (heterogenous nuclear ribonucleoprotein-K) 相互结合，并介导下游 hnRNP-K 的转录抑制作用。



第三个被详细研究的分子是 lincRNA PANDA。lincRNA PANDA 位于 CDKN1A 基因转录起始位点上游 5kb 处，它的序列正好和 CDKN1A 的序列互补。它在 DNA 损伤引起的反应中发挥了重要的作用。在 DNA 损伤后，p53 激活了 CDKN1A、PANDA 和 lincRNA-p21 的转录。PANDA 被转录后，和转录因子 NF- κ B 相互结合并抑制凋亡。PANDA、lincRNA-p21 和 CDKN1A 这三个基因协同作用，最终影响了细胞周期阻滞和细胞凋亡。

（二）lncRNA 对于 mRNA 降解的调控作用

mRNA 在细胞内的丰度往往决定了蛋白表达的高低(虽然不绝对,但是大多数情况下如此)。而 mRNA 在细胞内的丰度,通常有两个方面的原因决定:

- 1) 转录的多少;
- 2) 降解的快慢。

其中, mRNA 的降解有多条途径,而 lncRNA 则参与了其中 **Staufen 1** 介导的 mRNA 降解途径(**Staufen 1-mediated mRNA decay, SMD**)。lncRNA 1/2-sbsRNA (Half-STAU1-binding site RNA) 上的 Alu 元件 (Alu element) 能与 SMD 途径中的靶分子上的 3'UTR 区域的 Alu 元件相互结合,形成完整的 STAU1 (Staufen1) 结合位点 (STAU1-binding site)。这个完整的位点激活了 STAU1,并介导了 STAU 与 mRNA 的结合。这是一种全新的 mRNA 降解机制,通过诱导蛋白与 mRNA 结合并调控 mRNA 的降解。

（三）lncRNA 调控蛋白翻译

lncRNA 同样可以直接调控蛋白的翻译。在小鼠模型中发现了一条 lncRNA,它能直接和泛素羧基端水解酶 L1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1, UCHL1) 结合,通过 SINEB2 重复序列 (SINEB2 repeat) 的介导,增加 UCHL1 的蛋白合成。另一个例子是, BACE-AS (一条 lncRNA 分子) 是 BACE1 (β -site APP cleaving enzyme1) 分子的反义转录产物。通过 BACE-AS 与 BACE1 mRNA 序列的互补结合,增强了 BACE1 mRNA 的稳定性,增加了 BACE1 蛋白在细胞内的表达量,最终参与了阿尔斯海默症的发生。

当然, lncRNA 的作用方式分类方法有很多,上述分类方法是通过 lncRNA 发挥的功能来进行分类的。同样,还可以根据 lncRNA 的作用方式来进行分类。

lncRNC 系列二：关于 lncRNA，你必须知道秘密（内附彩蛋）

作者：老谈

lncRNA 一开始被认为是由 RNA 聚合酶 II 转录形成的转录副产物，并没有生物学功能，只是一种转录噪音(遗传噪音)。然后，现在越来越多的研究发现 lncRNA 有及其重要的生理功能，这些功能包括：遗传印记 (genetic imprinting)、基因组重排 (genome rearrangement)、染色质修饰 (chromatin modification)、细胞周期调控、转录、剪切、mRNA 降解及蛋白的翻译。

lncRNA	Size (kb)	Biological function
H19	2.3	Genomic imprinting
RepA	1.6	X chromosome inactivation
HOTAIR	2.2	Recruitment and binding of chromatin remodeling complexes to HOXD
lincRNA-p21	3.1	Represses many genes transcriptionally regulated by P53
Gas5	0.6	Bait of glucocorticoid receptor
PANDA	1.5	Limits apoptosis through binding to transcription factor NF-YA
l/2-sbsRNA	0.532	Mediates decay of mRNA
BACE1-AS	2.0	Increases stability of mRNA
MALTA1	6.9	Controls cell cycle progression by regulating B-MYB
LALR1	1.1	Accelerates hepatocyte proliferation by accelerating Wnt/β-catenin signaling
TINCR	3.7	Controls human epidermal differentiation by interacting with a range of differentiation mRNAs
slincRAD	136	Causes lipid accumulation in abiogenesis

lncRNA 的部分生物学功能

研究发现，数以千计的 lncRNA 参与调控了哺乳动物的基因调控。很多关于 lncRNA 调控基因的机制研究，也层出不穷。但是总的来说，lncRNA 对于基因表达的调控作用主要体现在三个方面：

- 1) 表观遗传层面；
- 2) 转录调控层面；
- 3) 转录后调控层面。

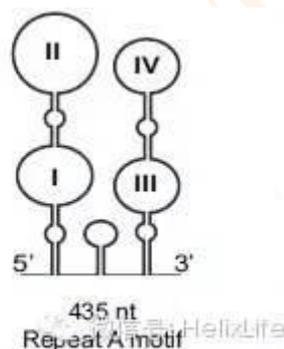
(一) 与印记 (imprinted region) 相关的 lncRNAs

所谓的印记基因是指仅一方亲本来源的同源基因表达，而来自另一亲本的基因不表达的现象。在肿瘤细胞中发现，很多肿瘤细胞内印记基因出现丢失的现象，导致了基因表达的紊乱。这可能是导致肿瘤发生的一个很重要的原因。很大一部分 lncRNA 定位于基因组的印记区域。在过去十年中，H19、Xist 和 Meg3 等 lncRNA 被报道位于基因组的印记基因座 (imprinted genomic loci)。

H19 是一个 2.3 kb 的 lncRNA，而且该分子特异性地在女性体内表达。H19 和胰岛素样生长

因子 2 (insulin-like growth factor 2, IGF2) 都定位于染色体的 11p15.5, 而且这两个基因间的间隔仅 90 kb。H19 在脊椎动物胚胎期表达很高, 但是在出生后, 表达迅速降低。H19 和 IGF2 基因之间有印记控制区 (imprinting control region, ICR)。ICR 区域内会发生甲基化, 这是参与调控基因印记的最主要的途径。当来源于母本的 ICR 区域没有发生甲基化时, ICR 区域可以和转录因子 CTCF (CCCTC-binding factor) 结合, 导致 H19 表达, 而 IGF2 表达沉默。但是在父本来源的 ICR 区域, 由于发生了甲基化现象, 导致了相反的基因表达情况。

在母系来源的细胞中, 由于存在两条 X 染色体, 在生长发育的调控过程中, 其中一条 X 染色体会失活, 这一现象被称为 **X 染色体失活 (X-chromosome inactivation)**。在这一过程中, 长度为 17kb 的 lncRNA 分子 XIST 发挥了重要的作用。XIST 表达后, 其 5' 端编码了另一个 lncRNA 分子, Repeat A (RepA)。RepA 可以直接和 PRC2 分子 (polycomb repressive complex 2) 相互结合, 促进 XIST 进一步地表达。大量表达的 XIST 分子附着在其中一条 X 染色体的表面, 并诱导组蛋白的甲基化, 最终导致 X 染色体的失活。



One possible structure of Repeat A (Maenner et al., 2010)

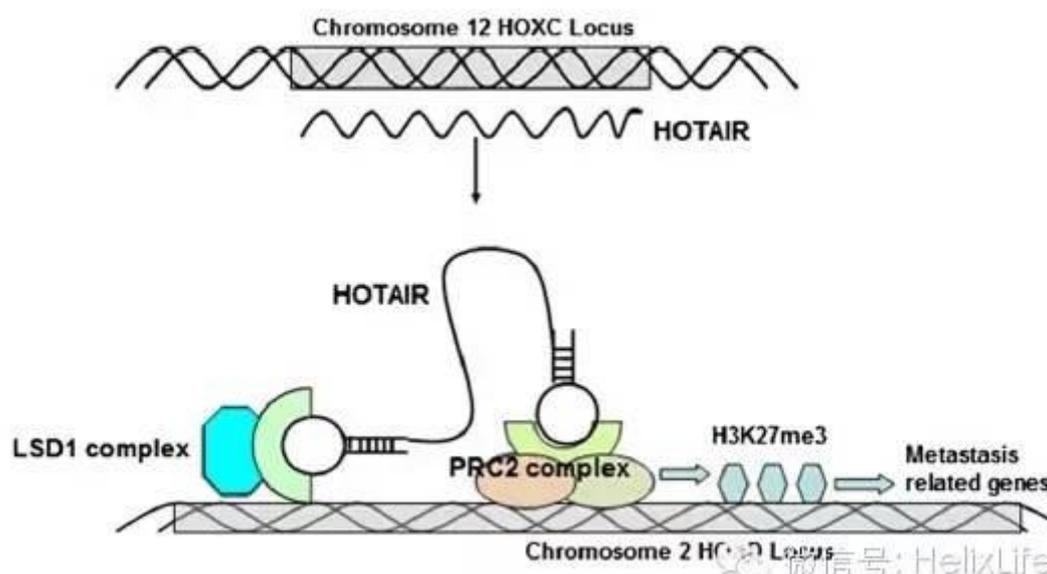
(二) lncRNA 对于染色质修饰 (Chromatin modification) 的作用

lncRNA 可以调控转录, 其机制是形成**沉默复合物 (silencing complex)**并导致**染色质重排 (chromatin remodeling)**。lncRNA 介导基因调控的最主要的机制就是形成染色质重排复合物 (chromatin remodeling complex)。有研究表明, lncRNA (HOTAIR、Kcnq1ot1 和 Air) 可以和染色质重排复合物(例如, PCR1 和 PCR2)结合, 介导下游的泛素化和组蛋白的甲基化。

在 Kcnq1 基因座, lncRNA Kcnq1ot1 可以与 PRC1 和 PRC2 结合形成复合物。在 Igf2r 基因座, Air 能与组蛋白甲基转移酶 G9a 相互作用。在 HOXD 基因座, HOTAIR 可以招募 PRC2 形成复

合物并导致下游靶基因的表达沉默。进一步的研究表明，染色质重排复合物与 lncRNA 的结合是介导下游靶基因沉默特异性的重要原因。

HOTAIR 是一条长度为 **2.2 kb** 的 lncRNA，位于染色体 12q13.13 的 HOXC 基因座。HOTAIR 能与 **PRC2** 和 **LSD1/CoREST/REST** 复合物相互结合。作为一个起到分子骨架(molecular scaffold)作用的 lncRNA，HOTAIR 的 5'区域和 PRC2 结合，介导了组蛋白的甲基化；HOTAIR 的 3'区域又能和 LSD1 结合，介导组蛋白的去甲基化。HOTAIR 所起到的作用就是将染色质重排复合物定位到 2 号染色体的 HOXD 基因座位点，其结果是在转录过程中沉默大约 40kb 的 HOXD 区域。HOTAIR 的过度表达，可以使 PRC2 在染色体上的定位发生变化，导致基因表达和染色质状态的改变，最终促进了肿瘤的转移。



Long noncoding RNA HOTAIR involvement in cancer (Wu et al., 2014)

microRNA 功能研究必备神器，你值得拥有！（内含操作流程）

作者：子非鱼

研究 microRNA 时，自然少不了高通量筛选验证以及功能分析。至于后者，除了 microRNA（敲除/过表达）引起的生物学表型外，可能大家会去寻找 microRNA 结合的生物分子（靶 mRNA 及 ncRNA）以及相关的信号通路。然而，实验的方法总是耗时费力，那么本文推荐四款功能分析神器帮大家比较短的时间里，多快好省地找到这些生物分子及相关通路。

miRNA 基本结构分析神器：YM500v2

数据库 YM500v2 (<http://ngs.ym.edu.tw/ym500v2/index.php>) 可帮助大家对筛选验证的 miRNA 有个具体的认识，其界面打开后可看到六个功能模块，如下图所示：



已知 miRNA 表达水平查询

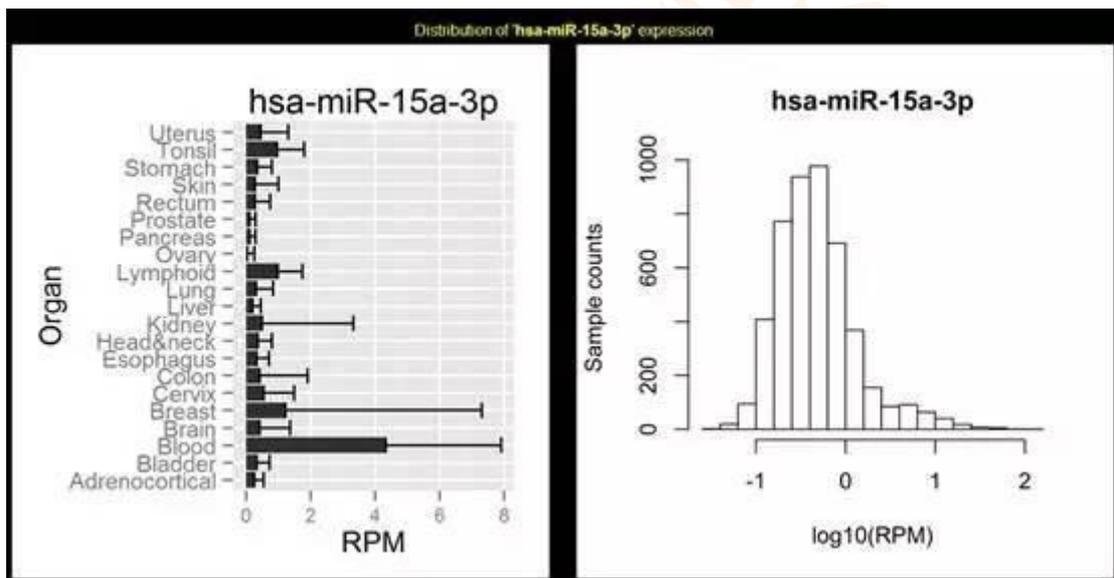
第一个功能模块提供了四种查询方式。

The screenshot shows a web interface for miRNA analysis with the following sections:

- Mature miR Search:** A form with a text input for "miRNA ID" and a "Search" button. A red label "单个miRNA查询" (Single miRNA query) is next to it.
- Mature miR List Search:** A form with a large text area for "Paste a list of miRNAs" and a "Search" button. A red label "多个miRNA查询" (Multiple miRNA query) is next to it. Below the text area, it says "OR" and "Choose from a file" with a file selection button.
- miR cluster expression:** A form with a text input for "Pre-miR ID" and a "Search" button. A red label "miRNA cluster查询" (miRNA cluster query) is next to it.
- Genomic Location Search:** A form with inputs for "Chromosome" and "Location", and a "Range" input. A red label "染色体特定区域 miRNA查询" (Chromosome-specific region miRNA query) is next to it.

At the bottom of the interface are "Reset" and "Next" buttons.

其中，1) 单个 miRNA 表达查询最为简洁，分别提供了该 miRNA 在不同种类组织里面表达水平及表达量分布等信息。



2) 多个 miRNA 表达查询需要选择标本类型 (可多选)，查询返回的是样品来源类型及表达量信息，点击 next 按钮之后会自动画出热图及提供表达水平量数据的下载。

Selected mature miR +

let-7a-5p let-7e-3p miR-30d-3p miR-210 miR-215 输入多条miRNA名称

Samples +

Note: Please select/highlight tissues.

Species: **Homo sapiens**

样本选择类型

- Adrenocortical (80)
- Bladder (233)
- Blood (152)
- Brain (361)
- Breast (1361)
- Cell Line (48)
- Cervix (166)
- Colon (444)
- Esophagus (81)
- Head&neck (1994)

[use Shift or Ctrl to select multiple options]

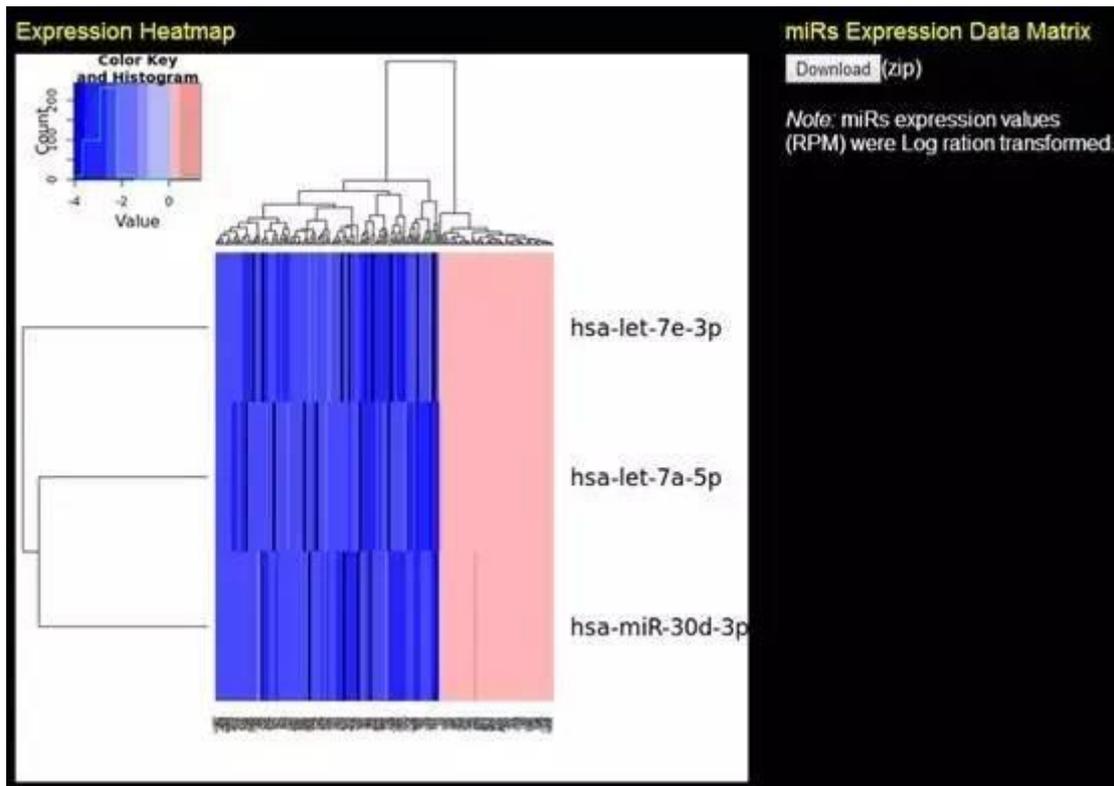
Samples +

Check All

Sample ID	S_ID	source	SS_id	issue	disease_name	sample_type_name
<input checked="" type="checkbox"/> ACV	TCGA-AB-2929	TCGA	TCGA-AB-2929-03A-01T-0735-13	Blood	Acute Myeloid Leukemia	Primary Blood Derived Cancer - Peripheral Blood
<input checked="" type="checkbox"/> ADL	TCGA-AB-2897	TCGA	TCGA-AB-2897-03A-01T-0735-13	Blood	Acute Myeloid Leukemia	Primary Blood Derived Cancer - Peripheral Blood
<input checked="" type="checkbox"/> AGR	TCGA-AB-2876	TCGA	TCGA-AB-2876-03A-01T-0734-13	Blood	Acute Myeloid Leukemia	Primary Blood Derived Cancer - Peripheral Blood
<input checked="" type="checkbox"/> ALI	TCGA-AB-2927	TCGA	TCGA-AB-2927-03A-01T-0740-13	Blood	Acute Myeloid Leukemia	Primary Blood Derived Cancer - Peripheral Blood
<input checked="" type="checkbox"/> ANJ	TCGA-AB-2855	TCGA	TCGA-AB-2855-03A-01T-0736-13	Blood	Acute Myeloid Leukemia	Primary Blood Derived Cancer - Peripheral Blood
<input checked="" type="checkbox"/> AOH	TCGA-AB-2975	TCGA	TCGA-AB-2975-03A-01T-0734-13	Blood	Acute Myeloid Leukemia	Primary Blood Derived Cancer - Peripheral Blood
<input checked="" type="checkbox"/> AOK	TCGA-AB-2957	TCGA	TCGA-AB-2957-03A-01T-0734-13	Blood	Acute Myeloid Leukemia	Primary Blood Derived Cancer - Peripheral Blood
<input checked="" type="checkbox"/> APX	TCGA-AB-2817	TCGA	TCGA-AB-2817-03A-01T-0736-13	Blood	Acute Myeloid Leukemia	Primary Blood Derived Cancer - Peripheral Blood
<input checked="" type="checkbox"/> AVQ	TCGA-AB-2945	TCGA	TCGA-AB-2945-03A-01T-0735-13	Blood	Acute Myeloid Leukemia	Primary Blood Derived Cancer - Peripheral Blood
<input checked="" type="checkbox"/> AWU	TCGA-AB-2815	TCGA	TCGA-AB-2815-03A-01T-0734-13	Blood	Acute Myeloid Leukemia	Primary Blood Derived Cancer - Peripheral Blood

More... (182%)

点击改图下方的 expression 按钮，则可得到热图。



3)按照 miRNA 聚类查询是以候选 miRNA 作为中心选择 100Kb 以内的 miRNA 作为候选集合，然后进行多个 miRNA 查询。特定区域 miRNA 表达查询和前面的类似，在这里就不详细讲述了。

新 miRNA 的预测

Search for Novel miRNA

Sequence Search

Novel mature sequence: Example 依据序列查询

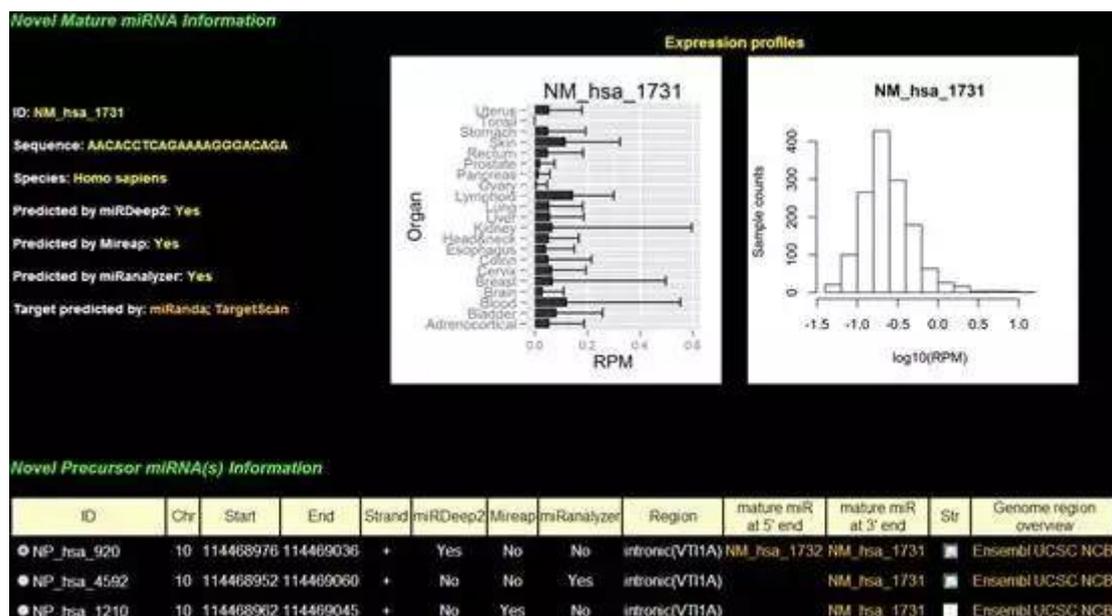
Genomic Location Search

+ Chromosome:

+ Location: 依据位置查询

+ Range:

该模块可以提供依据序列或者基因组位置信息进行预测，预测方法是基于 miRDeep2, Mireap 和 miRanalyzer 三个软件，只要有一个预测到就会显示出来。此外点击 UCSC 等数据库链接还能看到序列在基因组的情况。



miRNA 异构体分析

以 hsa-miR-21-5p 为例进行搜索。

Search for miRNA Isoform

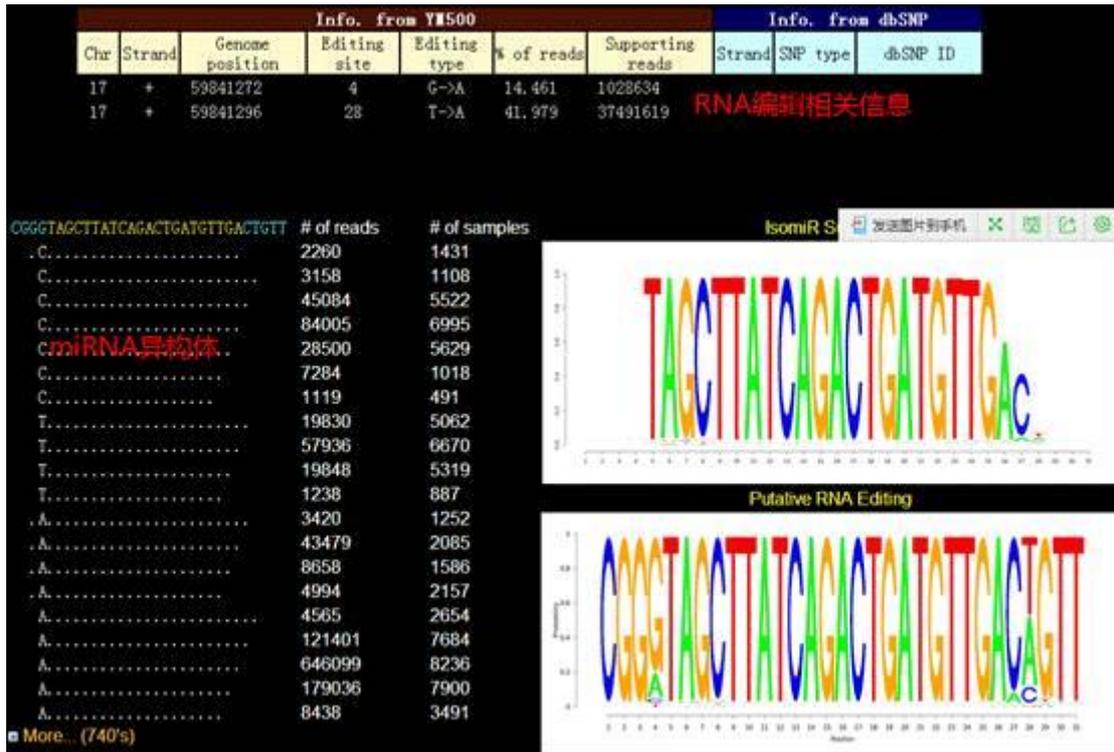
● Mature miR ID Search

miRNA ID: Example **输入miRNA名称**

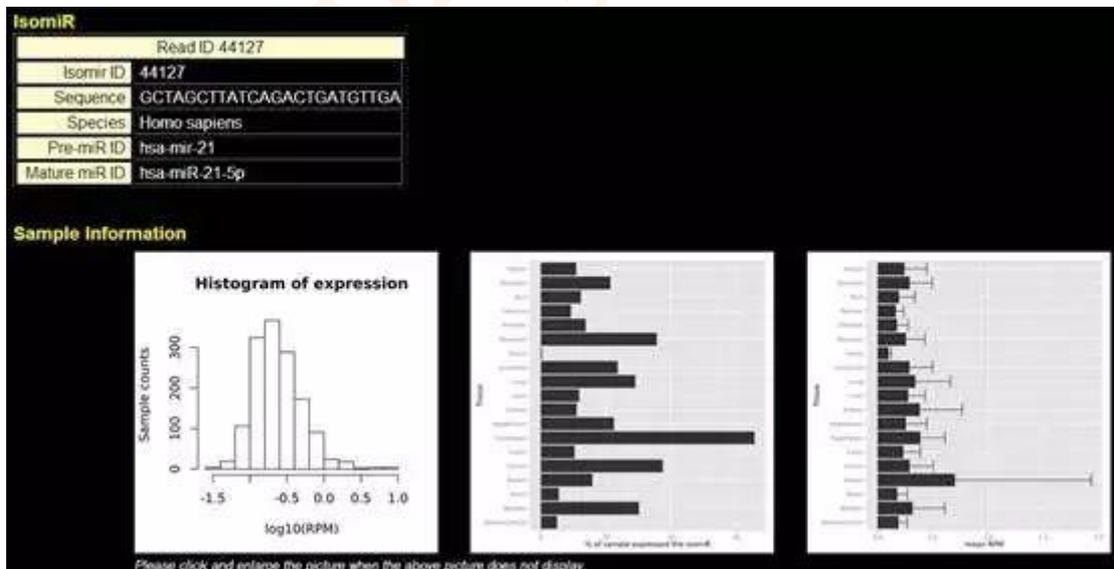
● Sequence Search

Sequence: Example **输入miRNA序列**

查询结果如下：



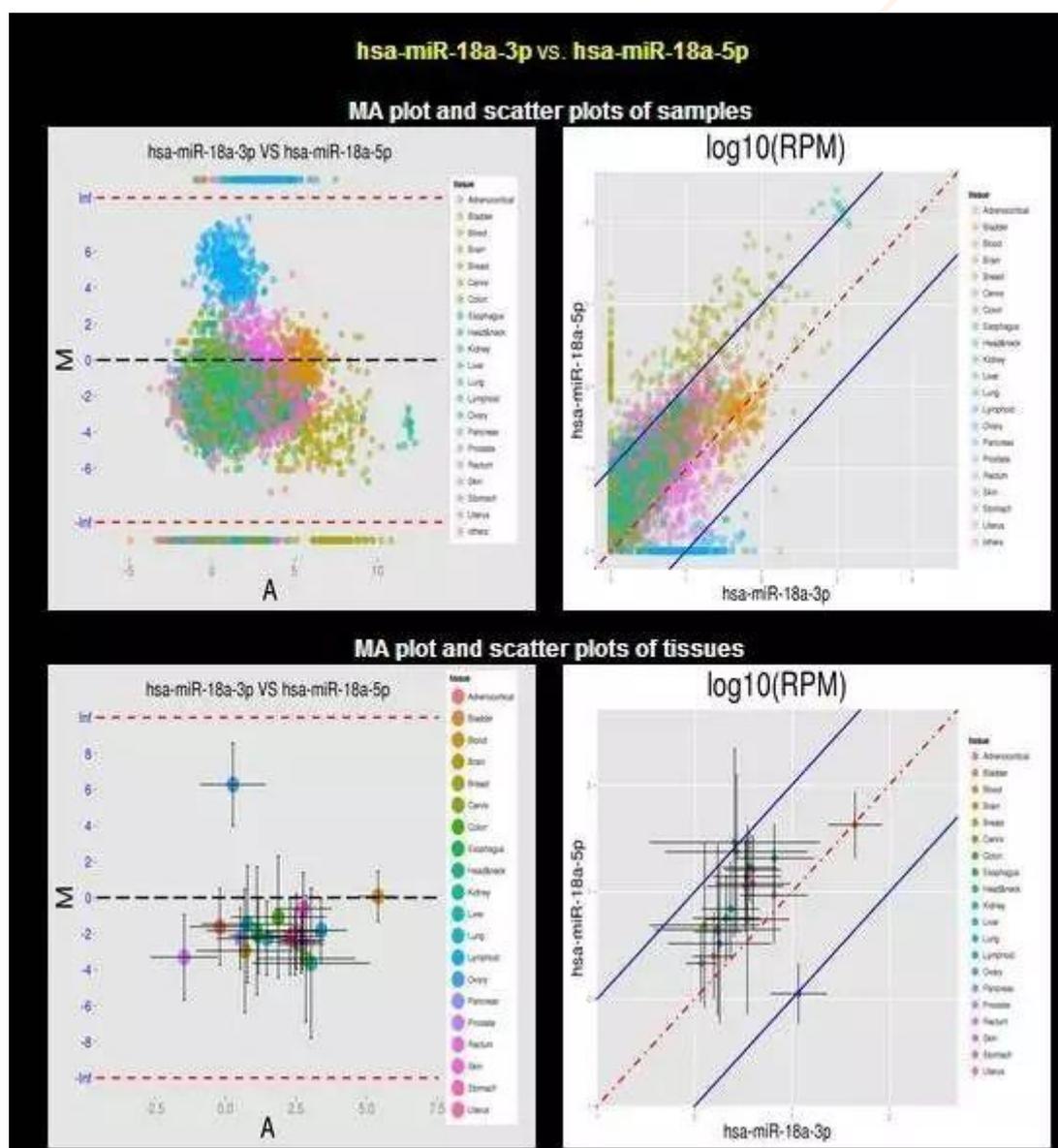
里面包括了具体的 miRNA 编辑位点及基于测序 reads 的支持情况，还有简并碱基情况。点击每条异构体会提供表达量分布及每个样品表达水平等详细信息（以下划线的异构体为例）。



5' 和 3' miRNA 搜索



搜索之后返回同一条 miRNA 前体产生的两条不同 miRNA 差异表达情况，不同颜色的点代表不同类型的样品，在蓝线之外的就是具有差异表达的样品。



组间 miRNA 差异表达比较

Sample Search

Group One	Group Two (Please finish Group One selection first)
Dataset: Acute_Myeloid_Leukemia	Dataset: Lung_adenocarcinoma
Count: 190	Count: 542
Sample Type Name: [Primary Blood Derived Cancer - Peripheral Blood]	Sample Type Name: [Primary Solid Tumor]; [Solid Tissue Normal]; [recurrent Solid Tumor];
Clinical Criteria: NULL	Clinical Criteria: NULL

Please enter your e-mail address:

[Send to Analyze](#) [Total Reset](#)

选择两个 group 样品类型及填写邮箱信息，然后提交任务即可。任务完成之后会邮件通知分析完成，打开邮件链接即可看到分析结果（数据只能保存 7 天），并且所有分析结果都可以下载。

Differentially Expressed miRNAs

Heatmap of differentially expressed miRNAs:

Heatmap of differentially expressed miRNAs: [Download \(pdf\)](#)

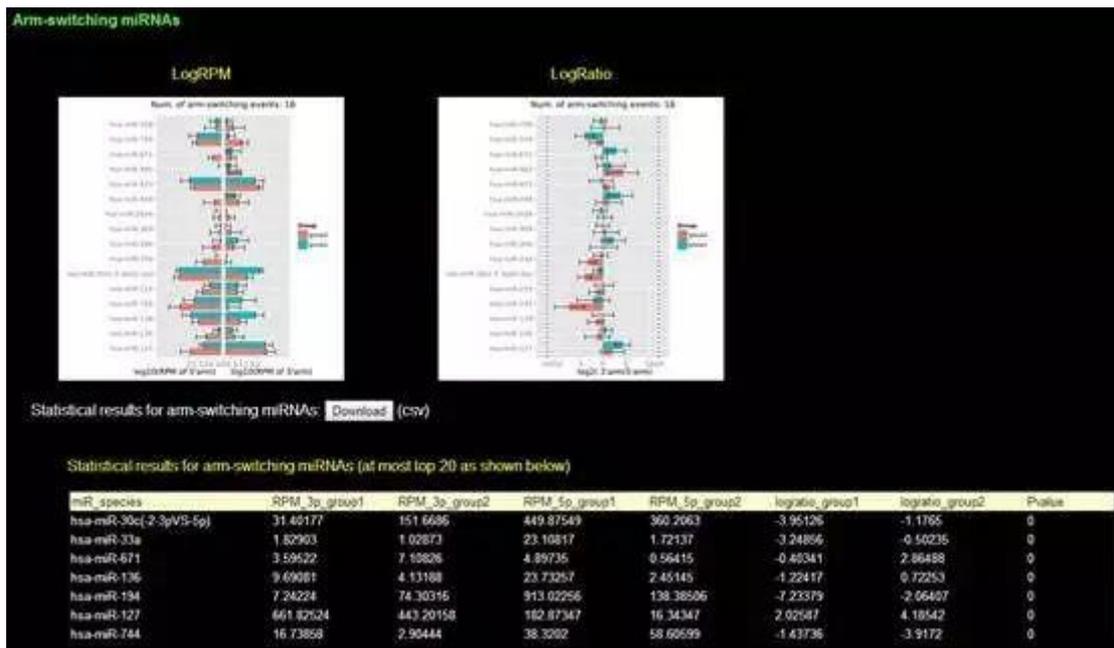
Expression matrix of significant miRNAs: [Download \(zip\)](#)

Statistical results for all miRNAs: [Download \(csv\)](#)

Statistical results for significant miRNAs: [Download \(csv\)](#)

Statistical results for significant miRNAs (at most top 20 as shown below)

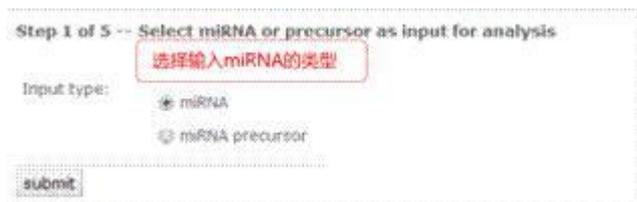
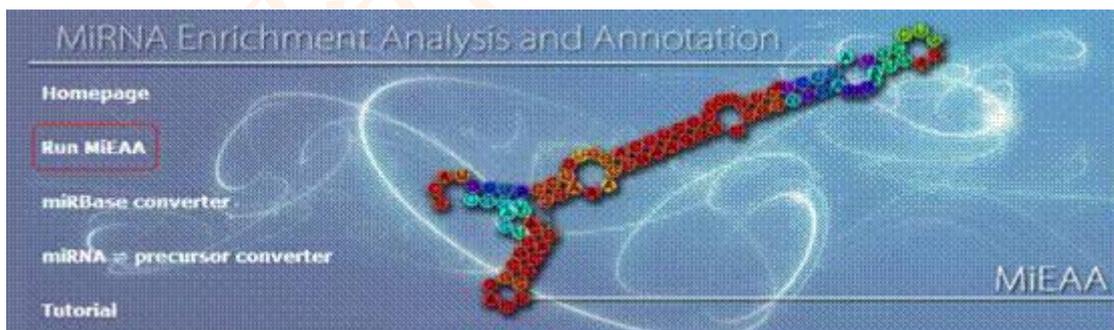
miR Name	Mean expression	Group 1 Mean expression	Group 2 Mean expression	foldChange	log2(foldChange)	pval	padj
hsa-let-7a-2-3p	51.60466	16.45768	54.87746	3.33446	1.73745	0.00013	0.00338
hsa-let-7a-5p	68175.41193	190220.27541	56812.00359	0.29666	-1.7434	0	0.0002
hsa-let-7c-5p	35982.3527	92508.55224	30718.77947	0.33206	-1.59047	0.00099	0.01559
hsa-let-7e-5p	13979.54549	37081.06228	11828.39024	0.31899	-1.64843	1.0E-5	0.00051
hsa-let-7f-5p	38410.93976	108339.3212	31899.39608	0.29444	-1.76396	0	9.0E-5
hsa-let-7g-3p	181.91952	40.93211	195.0479	4.76516	2.25252	8.0E-5	0.0023



miRNA 功能分析神器：miEAA

而后如果我们需要分析这些 microRNA 的功能、信号通路、疾病等进行分析，可以用今天介绍的网站 miEAA (https://ccb-compute2.cs.uni-saarland.de/mieaa_tool/)。

其页面打开如下，点击 Run MiEAA 选项，则可以进入 microRNA 动能分析的第一步。



点击 submit 后进入第二步，此时一般选择 GSEA 模式。



Step 2 of 5 -- Select type of enrichment analysis

Analysis type:

Over-Representation Analysis (ORA)

miRNA enrichment analysis (GSEA)

submit

同样提交后，进入第三步上传 miRNA 列表。



Step 3 of 4 -- Paste or upload testset

paste example

Testset:

Testset file:

submit

在第四步中，可选择要分析哪些内容，选项分别是器官、通路、疾病、GO 分析、染色体定位、物种保守性、靶基因、文章发表的疾病研究、年龄性别和免疫细胞。P 值矫正方法选 FDR（或者其它），下面 0.05 和 2 不变，提交后就等结果了：

Step 4 of 4 -- Select additional parameters for analysis

un/check all categories

Categories:

- Organs (miRWalk)
- Pathways (miRWalk)
- Diseases (miRWalk)
- Gene Ontology (miRWalk)
- Chromosomal location (miRBase)
- Conserved (in at least 5 species) (miRBase)
- Target genes (miRTarbase)
- Diseases (published studies about miRNA profiles from peripheral blood)
- Age/Gender dependent miRNAs
- Immune cells

p-value adjustment method:

- no adjustment
- FDR adjustment
- Bonferroni adjustment

Significance level:

Threshold level:

其分析的结果如下图所示:

Results for input list

- Download results as [text file](#)
- Download results as [Excel file](#)
- View significant [annotations](#) for the uploaded miRNAs/precursors
- View [sequence properties](#) for the uploaded miRNAs/precursors

Category	Subcategory	running sum	Enrichment	p-value	observed	miRNAs/precursors
1	Organs (miRWalk)	Breast	enriched	0.019306	6	hsa-miR-20b-5p; hsa-miR-17-5p; hsa-miR-20a-5p; hsa-miR-222-3p; hsa-miR-106a-5p; hsa-miR-18a-5p

点击 annotations, 可查看以下结果:

Annotations for analyzed miRNAs/precursors

miRNA/precursor	category	number significant subcategories	subcategory
hsa-miR-20a-5p	Diseases (miRWalk)	3	Breast Neoplasms; Lung Neoplasms; Choriocarcinoma
	Organs (miRWalk)	3	T-Lymphocytes; Breast; Gastrointestinal Tract
	Immune cells	4	CD56 expressed; CD19 expressed; CD3 expressed; CD14 expressed
	Pathways (miRWalk)	21	hsa04115 p53 signaling pathway; WP474 Endochondral Ossification; P00056 Interleukin signaling pathway; P00056 VEGF signaling pathway; WP1539 Angiogenesis; hsa05220 Chronic myeloid leukemia; P04398 p53 pathway feedback loops 2; WP45 G1 to S cell cycle control; hsa04150 mTOR signaling pathway; WP22 IL-9 signaling pathway; hsa05214 Glioma; hsa04012 ErbB signaling pathway; WP138 Androgen receptor signaling pathway; hsa05221 Acute myeloid leukemia; hsa05216 Thyroid cancer; P00030 Hypoxia response via HIF activation; WP1545 mRNAs involved in DDR; hsa05218 Melanoma; WP710 DNA damage response only ATM dependent; P00048 PI3 kinase pathway; WP707 DNA damage response
	total number	33	
hsa-miR-20b-5p	Diseases (miRWalk)	3	Breast Neoplasms; Choriocarcinoma; Leukemia
	Organs (miRWalk)	3	T-Lymphocytes; Breast; Gastrointestinal Tract
	Immune cells	4	CD56 expressed; CD19 expressed; CD3 expressed; CD14 expressed
	Pathways (miRWalk)	20	WP474 Endochondral Ossification; P00056 Interleukin signaling pathway; P00056 VEGF signaling pathway; hsa04115 p53 signaling pathway; hsa05220 Chronic myeloid leukemia; P04398 p53 pathway feedback loops 2; WP45 G1 to S cell cycle control; hsa04150 mTOR signaling pathway; WP22 IL-9 signaling pathway; hsa05214 Glioma; hsa04012 ErbB signaling pathway; WP138 Androgen receptor signaling pathway; hsa05221 Acute myeloid leukemia; hsa05216 Thyroid cancer; P00030 Hypoxia response via HIF activation; WP1545 mRNAs involved in DDR; hsa05218 Melanoma; WP710 DNA damage response only ATM dependent; WP1539 Angiogenesis; WP707 DNA damage response
	total number	30	

miRNA 靶向基因及 ncRNA 预测神器：StarBase

Starbase (<http://starbase.sysu.edu.cn/index.php>) 是个交叉预测网站，既可以通过靶基因预测 microRNA 也可以通过 microRNA 预测靶基因。其界面如下：



根据 microRNA 找 mRNA 靶点



点击进入如下设置界面，并对 miRNA 类型、筛选严格程度、肿瘤类型数目进行选择后，点击 search 按钮。

miRNA-mRNA interactions

1. **clade:** mammal **genome:** Human **assembly:** hg19

2. **microRNA:** hsa-let-7a-5p

3. **Number of supporting Experiments** >= low stringency(>=1)

4. **Number of Cancer Types(Pan-Cancer)** >= 1 cancer type

5. **Gene Symbol: (e.g. "E2F1")** Enter a Gene Symbol

Search

预测到了 1837 个 mRNA，而后点击第一个基因的 CancerNum，可看到以下结果：

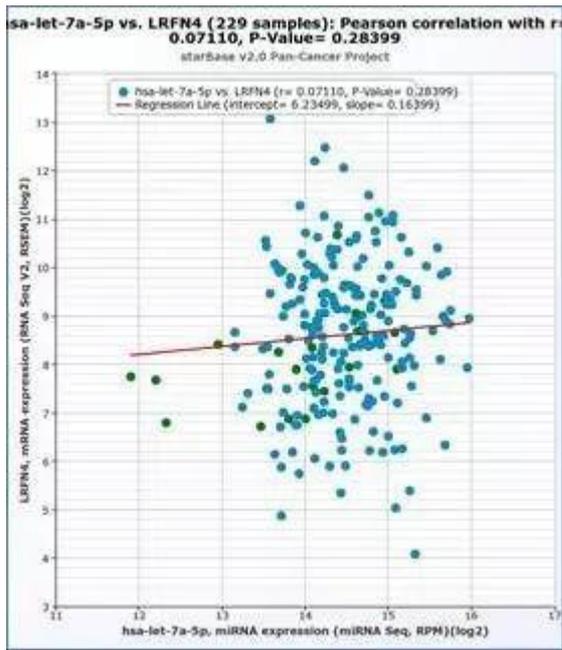
Human miRNA-mRNA interactions: 1837 items

Items 1-20 of 1837 Shows: 20 items Page 1 of 92 previous page next page

name	geneName	targetScanSites	picTarSites	RNA22Sites	PITA Sites	miRandaSites	CancerNum
hsa-let-7a-5p	LRFN4	111-51	111-51	0[0,0]	0[0,0]	0[0,0]	1
hsa-let-7a-5p	RNF160	0[0,0]	0[0,0]	0[0,0]	0[0,0]	113-2701	2
hsa-let-7a-5p	SRGN	0[0,0]	0[0,0]	211-2831	0[0,0]	113-2831	1
hsa-let-7a-5p	SLC11A2	112-341	112-341	110-341	0[0,0]	112-341	1
hsa-let-7a-5p	STX2P5	112-211	112-211	112-211	0[0,0]	0[0,0]	2
hsa-let-7a-5p	KCNJ11	112-249	0[0,0]	0[0,0]	0[0,0]	116-271	4
hsa-let-7a-5p	EBF2	111-51	0[0,0]	111-51	0[0,0]	0[0,0]	2
hsa-let-7a-5p	NAT14	0[0,0]	0[0,0]	0[0,0]	0[0,0]	117-931	4
hsa-let-7a-5p	BCCD1	0[0,0]	214-381	0[0,0]	0[0,0]	0[0,0]	3
hsa-let-7a-5p	IFN2	0[0,0]	0[0,0]	0[0,0]	0[0,0]	116-511	4

miRNA	hsa-let-7a-5p	Target Name	LRFN4[protein_coding]			
Pan-Cancer (14 Cancer Types) miRNA-Target Pearson Correlation Analysis	cancerType	sampleNum	r	rank	p-value	FDR
	Urothelial bladder cancer (BLCA)	229	0.0711	243549	0.28399	0.457662
	Breast cancer (BRCA)	748	-0.17672	61606	1.13310e-06	5.56301e-06
	Colon and Rectal adenocarcinoma (CRC)	299	-0.09338	160589	0.0990134	0.24033
	Glioblastoma multiforme (GBM)	151	0.21145	42660	0.00915454	0.0773303
	Head and neck squamous cell carcinoma (HNSC)	428	-0.17003	83892	0.000391561	0.0018505
	Chromophobe renal cell carcinoma (KICH)	91	-0.18134	181077	0.0853815	0.183093
	Clear cell kidney carcinoma (KIRC)	200	-0.11608	180914	0.0443266	0.0954832
	Acute Myeloid Leukemia (LAML)	172	0.29517	19661	8.46607e-05	0.00157016
	Lung adenocarcinoma (LUAD)	441	-0.27035	15217	7.9726e-09	2.05031e-07
	Lung squamous cell carcinoma (LUSC)	362	-0.2803	34085	5.83788e-08	6.75757e-07
	Ovarian serous cystadenocarcinoma (OV)	265	0.03831	264720	0.534635	0.772274
	Cutaneous melanoma (SKCM)	342	0.06959	206488	0.199184	0.379619
	Papillary thyroid carcinoma (THCA)	557	-0.31674	17873	1.00911e-14	4.22447e-13
Uterine corpus endometrial carcinoma (UCEC)	161	-0.04777	289961	0.54737	0.741014	

同时也可以看到 microRNA 和 mRNA 的表达相关性：



根据 microRNA 找 ncRNA



会遇到相同设置界面，进行相关选择后，点击 search 按钮。

LncRNABase: miRNA-lncRNA interactions

1. clade: mammal genome: Human assembly: hg19

2. microRNA: hsa-let-7a-5p

3. Number of supporting Experiments >= low stringency(>=1)

4. Number of Cancer Types (Pan-Cancer) >= 1 cancer type

5. IncRNA Gene Symbol: (e.g., "HOTAIR") Enter a lncRNA Gene Symbol

Search

在结果中，点击 TargetSites 和 CancerNum,可出现以下结果：

Human miRNA-lncRNA interactions: 3 items

Help Report Items 1-3 of 3 Shows: 20 items Page 1 of 1 previous page next page

name	miRAccession	geneName	targetSites	bioComplex	clipReadNum	CancerNum
hsa-let-7a-5p	MIMAT0000062	XIST	3	19	3912	3
hsa-let-7a-5p	MIMAT0000062	KCNQ1OT1	3	4	0	3
hsa-let-7a-5p	MIMAT0000062	HEAT1	3	1	1975	3

miRNA-Target Information

(1) lncRNA:miRNA XIST-hsa-let-7a-5p

Target Location chrX:73840713-73840734[-]

Target Name XIST

Target Transcripts XIST-002 XIST-008 XIST-009 XIST-001 XIST-005

Clips/seq peak/cluster
 HPKTA_64906[AG02_PRR-CLIP_HEK293] HPR06_81185[AG01_PRR-CLIP_HEK293] HPTK1_31176[AG02_PRR-CLIP_HEK293]
 HH8NH_4246[AG02_HITS-CLIP_293S] HH8SH_4246[AG02_HITS-CLIP_293S] HH8NK_20963[AG02_HITS-CLIP_293S]
 HH8ML_20963[AG02_HITS-CLIP_293S] HH8NA_23291[AG02_HITS-CLIP_293S] HH8SA_23291[AG02_HITS-CLIP_293S]
 HPKMA_11626[AG02_PRR-CLIP_HEK293] HPKMB_8494[AG02_PRR-CLIP_HEK293] HPRT3_27353[AG02_PRR-CLIP_HEK293]
 HPTA3_19719[AG01_PRR-CLIP_HEK293] HPKX7_8277[AG01_PRR-CLIP_HEK293]

Clips/seq Read/um 326.002

miRNA-target
 miRNA 5'-ttgatagcttggatgattgac-3'
 ||| |||||
 mRNA 5'-tggcattgtccttctaccgca-3'

alignScore 152

Pan-Cancer MIRNA-lncRNA Information Expression Profile

miRNA hsa-let-7a-5p

Target Name XIST(lncRNA)

Pan-Cancer (14 Cancer Types) miRNA-Target Pearson Correlation Analysis

cancerType	sampleNum	r	rank	p-value	FDR
Urothelial bladder cancer (BLCA)	229	-0.13956	219	0.0347978	0.134107
Breast cancer (BRCA)	743	0.19322	79	1.00403e-07	1.07647e-06
Colon and Rectal adenocarcinoma (CRC)	299	-0.0224	642	0.899624	0.892511
Glioblastoma multiforme (GBM)	151	-0.06864	384	0.402369	0.784829
Head and neck squamous cell carcinoma (HNSC)	428	-0.07238	395	0.134917	0.291011
Chromophobe renal cell carcinoma (KICH)	91	-0.08478	567	0.424299	0.624101

miRNA 信号通路研究神器：miRPathDB

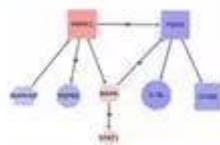
数据库 miRPathDB (<https://mpd.bioinf.uni-sb.de/overview.html>) 可查询参与通路内调控的 miRNAs, 包含了人、鼠两类数据。

Overview



miRNAs

Analyze the number of significant pathways per miRNA for the different target sets.



Pathways

Analyze the number of significant miRNAs per pathway for the different target sets.



Heat maps for pathway databases

Analyze heat maps of significant miRNA signatures for the pathway databases.

miRNA 结合不同位点相关的通路

点击 miRNAs 后，可看到数据库中收录的 2590 多条 miRNA 相关信号通路信息。

Number of significant pathways per miRNA

In this table the number of significant pathways per miRNA are depicted for the different evidence sets.

Show 25 entries

Search

Excel CSV Column visibility

miRNA	Significant pathways (predicted - intersection)	Significant pathways (predicted - union)	Significant pathways (weak experimental evidence)	Significant pathways (strong experimental evidence)	Significant pathways (any experimental evidence)
miR-miR-29b-3p	62	235	41	183	519
hsa-miR-260c-3p	11	783	33	4	418
hsa-miR-145-5p	1	9	26	3	323
hsa-miR-34a-5p	1	349	177	37	516
hsa-miR-155-5p	44	203	169	0	305

可以直接点击或者通过右上角进行搜索相关的 miRNA。以列表中第一个 miRNA——hsa-miR-29b-3p 为例。点击后可得到以下结果：

Targets

In this table all targets of hsa-miR-29b-3p are shown for the different evidence sets.

Show 5 entries

Excel CSV PDF Column visibility 下载格式

Target	Evidence
AACS	predicted (union)
AADAACL4	predicted (union)
AAR2	predicted (union)
ABCA2	predicted (union)
ABCA6	predicted (union)

Showing 1 to 5 of 3,628 entries 靶标数目

这些分子有的是通过预测得到的，有的是通过实验获得的，对后期研究有很好的参考价值。

Significant pathways

In this table pathways are depicted that contain significantly more targets of hsa-miR-29b-3p than expected by chance.

Show 5 entries

Search:

Excel CSV Column visibility

Database	Pathway	Evidence	Hits	Expected hits	P-value	Targets
Reactome	Collagen biosynthesis and modifying enzymes	predicted (intersection)	24	2.029	4.20e-17	ADAMTS2, COL11A1, COL15A1, COL19A1, COL21A1, COL22A1, COL25A1, COL2A1, COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6, COL5A1, COL5A2, COL5A3, COL6A3, COL7A1, COL9A1, COLGALT2, P3H1, TLL1
WikiPathways	Focal Adhesion	experimental (any)	26	2.495	7.31e-17	AKT2, BCL2, CCND2, CDC42, COL1A1, COL2A1, COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL4A6, COL5A2, COL5A3, GSK3B, ITGA6, ITGB1, LAMC2, MAP2K5, PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFRA, PDGFRB, PIK3CG, PIK3R1, PTEN, VEGFA

这些通路中包含了上述预测或实验得到的 miRNAs 相关靶基因，也就说明了 miRNAs 参与了这些通路的调控。同时点击对应数据库下的 pathway，就出现对应的 pathway 内容。

通路中结合不同位点的 miRNAs

点击主页的 Pathways，可出现以下界面。对常见的通路进行数据分析，筛选出有参与调控性的 miRNAs，如点击第一行的 microRNA in Cancer。

In this table the number of significant miRNAs per pathway are depicted for the different evidence sets:

Show 25 entries

Excel CSV Column visibility

Database	Pathway	Significant miRNAs (predicted - intersection)	Significant miRNAs (predicted - union)	Significant miRNAs (weak experimental evidence)	Significant miRNAs (strong experimental evidence)	Significant miRNAs (any experimental evidence)
KEGG	MicroRNAs in cancer	55	1431	52	48	117
KEGG	Pathways in cancer	30	1466	29	36	77
WikiPathways	Signaling Pathways in Glioblastoma	24	1106	24	26	76
WikiPathways	DNA Damage Response only ATM dependent	25	712	20	13	75
KEGG	Prostate cancer	29	815	26	24	74

而后可通过各种预测软件进行预测，参与这条信号通路的 miRNA 分子大概有 1,703 条。

miRNAs that are significantly enriched for this pathway

In this table miRNAs are depicted that have significantly more targets in this pathway than expected by chance.

Show 10 entries

Excel CSV Column visibility

miRNA	Evidence	Hits	Expected hits	P-value	Targets
hsa-miR-200b-3p	experimental (any)	21	1.637	3.15e-15	BCL2, BHL1, CCNE2, CORN1B, DDT4, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, E2F3, EP300, E2H2, IRS1, KRAS, MAPK7, NOTCH1, PLCG1, SHC1, VEGFA, ZEB1, ZEB2, ZFPM2
hsa-miR-200c-3p	experimental (any)	21	1.869	5.06e-14	BCL2, BHL1, CCNE2, CORN1B, DDT4, DNMT3A, DNMT3B, E2F3, EP300, INKB, IRS1, KRAS, MAPK7, NOTCH1, PLCG1, RHOA, SHC1, VEGFA, ZEB1, ZEB2, ZFPM2
hsa-miR-21-5p	experimental (any)	31	6.051	1.16e-11	APC, BCL2, BMP2, BRCA1, CCG1, CDC25A, CDK5, DICER1, E2F1, E2F2, E2F3, EGFR, ERBB2, HIRNPK, MARCKS, MDM4, MMP9, MYC, NFKB1, PDCC4, PRKCE, PTEJL, RECK, SERPINB5, SPRY2, STAT3, TGFB2, TMP3, TP63, TPM1, VEGFA

2.6 启动子序列查询

步步为营，寻找转录因子与基因启动子的“爱巢”（结合点）

作者：子非鱼

听说最近转录因子小姐跟某基因先生走到了一起，并共同购置了爱巢，双宿双栖起来。娱乐圈（科研圈）沸腾了，经过 EMSA、DNase1 足迹实验、甲基化干扰实验、体内足迹实验、Chip-on-chip 等方式，终于落实了某转录因子跟某基因的关系，执着的娱记们哪肯松懈，继续探索转录因子跟该基因的启动子的爱巢（结合位点）在哪里？

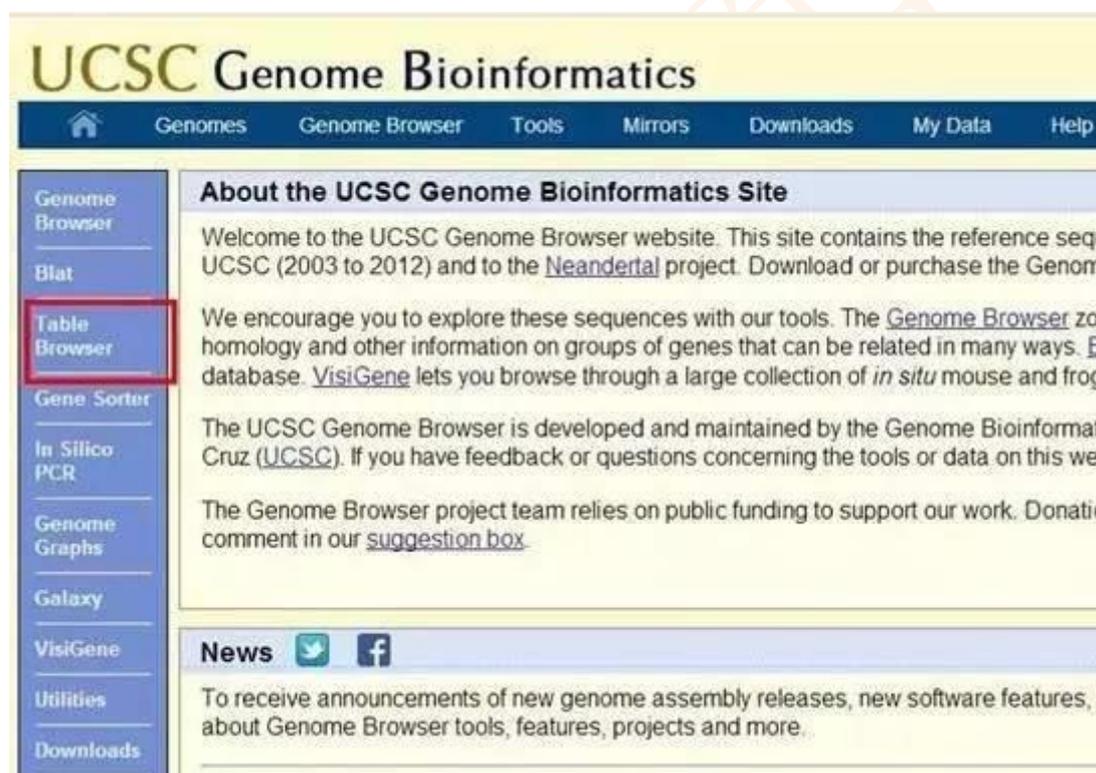
第一步，要确定到他们的爱巢在哪条街？（怎么确定启动子？一般查阅外文文献，老外把从转录起始位点开始上溯 2K—3K 的区间算做是启动子。）

第二步就是要确定家门牌号？（启动子这么长，怎么知道具体的结合位点序列？

如何预测转录因子小姐跟某基因先生的爱巢（启动子结合位点）在哪里？这个活一般的娱记是干不了，还是得听小鱼我的。

干货来了，看这里了（敲黑板！）

以转录因子 Nf-KB 和 Ankh 基因为例，用 UCSC 在线网站锁定启动子范围，在左栏选择 Table browser。



在 clade 选择 Mammal，genome 选择 Human，assembly 选择最新的数据库，gene 中输入 ANKH，在 track 中选择 RefSeq Genes，在 output format 中选择 sequence，点击 get output，根据需要选择序列，选择 genomic-submit。

Table Browser

Use this program to retrieve the data associated with a track in text format, to calculate intersections between tracks, and Browser for a description of the controls in this form, the [User's Guide](#) for general information and sample queries, and for more complex queries, you may want to use [Galaxy](#) or our [public MySQL server](#). To examine the biological function of your diverse computational tools. Refer to the [Credits](#) page for the list of contributors and usage restrictions associated with this page.

clade: Mammal | genome: Human | assembly: Dec. 2013 (GRCh38/hg38)

group: Genes and Gene Predictions | track: RefSeq Genes | add custom tracks | track hubs

table: refGene | describe table schema

region: genome | position | ank | lookup | define regions

identifiers (names/accessions): paste list | upload list

filter: create

intersection: create

correlation: create

output format: sequence | Send output to: Galaxy GREAT GenomeSpace

output file: (leave blank to keep output in browser)

file type returned: plain text gzip compressed

To reset all user cart settings (including custom tracks), [click here](#).

选择 Promoter/Upstream by 2000 bases，选 Exons in upper case, everything else in lower case（外显子大写，其他小写）。

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data

RefSeq Genes Genomic Sequence

Sequence Retrieval Region Options:

Promoter/Upstream by 2000 bases

5' UTR Exons
 CDS Exons
 3' UTR Exons
 Introns
 Downstream by 1000 bases

One FASTA record per gene.
 One FASTA record per region (exon, intron, etc.) with 0 extra bases upstream (5') and

Split UTR and CDS parts of an exon into separate FASTA records

Note: if a feature is close to the beginning or end of a chromosome and upstream/downstream by

Sequence Formatting Options:

Exons in upper case, everything else in lower case
 CDS in upper case, UTR in lower case.
 All upper case.
 All lower case.
 Mask repeats: to lower case to N

结果如下：大写字母是基因外显子区，大写字母前面的 2000 个小写字母就是预测的启动子区，复制粘贴保存到文本中。

```

aggctccctcctggggacacgtttccacgtttctttcgccccccgggagc
ggcacctccatacctcccgggcccgtagtccccgaagcaggccccagcc
ccggcgaagctgctcctccgcagtccccccccggccagccccggcca
ccgccggacggcgccttcccagccccgcggccgctcccagccctcct
cgcgctccgagcccacgtcgcttgccccggctgccaagtcttccagacg
gcccggccctcccggcacagcgcgggaacccccggccccggccccacggg
acgagggctacagggccccggccggagccaggccacccccgggtctcca
ggcgcccaccgcccaccacccccaccggcgtccccaaagccccagaccg
tccccggcgccctcagcgcggccccccccggggccggccgaggctccgc
ggcgagtcccggccagcgcggggaggcggccagccccacggccccagcgt
cgcgagcggccccccggcggccgccaagcgcaggcgcacaggaaag
gaggccggcgcccccggccccccccctcccagcccggccccggggc
cgtggcggtgtccgcgcctccgcgcccggccccgatttcctccggcgg
cggcgccggcgccggcgcctcgtgcgcggttatttatttccgggcccc
AGAGCGCTTATAAATGGAGCCGCTGTCAGCAGAACCTTCGCGCCGCCG
CGCGCCGCGTCCCTCCTCTTTTTTTCCCGGCAGATCTTTGTTGTTG
GGAGGGCAGCAGGGATGGACTTGAGCTTGGGATCCCCTGCTAGAGCAGC
CGCGCTCGGAGAAAGGCGCCGAGCCGCGAGGAGCCGCGCCGCGCCG
CCCGAGGCCCCGCGCCCGCGGCTCTGTCGGCCCGCGCCCGCTCGCCC
CGTCGCCCCGTCGCCCCCTCGCTCCCGCAGAGTCCCCTCGCGGCAGCAG
ATGTTGTTGGGGTCAGCCACGGCGGGACTATGGTGAATTCGGGCGC
TCACGCACTACTGGCCCCTGATCCGGTTCTTGGTGGCCCTGGGCATCACC
AACAATAGCCATCGACTTCGGGGAGCAGgt aagccccggccccggcccc
cggccgctcgccctgccttggccttacacgcccggacacggggggagg
ggagtcaactgctccgagtcctctttatcctgaaacatttggtcgggtg
tcagcttgtcaaggtgacttttccagcaccattccctcctcctc

```

小写字母为promoter
大写字母为基因区

当我们锁定了这一条街道以后，接下来就是敲定门牌号了，好紧张！

打开 PROMO 数据库，业界良心！首页就来送助攻：查找转录因子结合位点操作步骤。

RESEARCH

PROMO

A virtual laboratory for the study of transcription factor binding sites in DNA sequences.

Factor's species:
All species

Site's species:
All species

- [SelectSpecies](#)
- [SelectFactors](#)
- [ViewMatrices](#)
- [SearchSites](#)
- [MultiSearchSites](#)

• [Help](#)

[Transcription factors](#) See information on the transcription factors from TRANSFAC.



PROMO is a virtual laboratory for the identification of species of interest. TFBS defined in the TRANSFAC database. The user can inspect the result of the search.

PROMO is using version 8.3 of TRANSFAC.

If you use the results in your research please cite:

Xavier Messeguer, Ruth Escudero, Domènec Farré, Romà Roset, Mario Huerfano, and Domènec Farré, in biological sequences at the ALGGEN server.

神助攻 !>

Search for putative sites in your sequence

step 1

[SelectSpecies](#): select the species or group of species.

Current factor's species or group: **All species**
Current site's species or group: **All species**

Also you can [SelectFactors](#) to restrict the search.

step 2

[SearchSites](#): input a query sequence to search for putative sites.
or [MultiSearchSites](#): input a set of sequences to search for putative sites.

Other tools:

[ViewMatrices](#): view details on weight matrices.

如助攻提到的，先点击黄色左栏 [SelectSpecies](#),选择物种，点击 Submit。

[Change Species](#) **启动子物种选择**

转录因子物种选择

Considering factors:

- Only human factors
- All factors
- Selected species factors (*)

Considering sites:

- Only human sites
- All sites
- Selected species sites (**)

选择其他物种

(*) Factors of:

All species

(**) Sites of:

All species

再点击黄色左栏 [SelectFactors](#)，选择转录因子，点击 Submit。



接着点击 SearchSites,将之前锁定的启动子区序列粘贴到指定位置，点击 Submit。



目标出现！

[Save link (only for 7 days): http://algsen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promo.cgi?dirDB=TF

Factors predicted within a dissimilarity margin less or equal than 15 % :

NF-kappaB [T00590] ← **找位点, 点这里!!**

Zoom		Data (txt)											
1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	
ANKH													

Distribution of the nucleotides over the given chain:



结果中的一个位点 TGGGAAATACCT 就是预测到的 nf-kb 结合在 Ankh 启动子的最佳位点。

NF-kappaB [T00590]

was predicted in:

ANKH **TGGGAAATACCT**

← **最佳结合位点**

552 563

Dissimilarity 9.69%
 RE equally 0.01776
 RE query 0.02074

Consensus sequence and matrix:

A	1	2	1	10	5	7	0	0	0	0	0	3
C	2	0	0	0	1	1	0	0	13	13	13	6
G	8	1	1	2	3	4	1	0	0	0	0	3
T	1	0	0	0	3	4	1	3	13	0	0	0
	G G G A A A T T C C C C											

Random Expectation (RE) gives the number of expected occurrences of the mat considered:

- (1) Equiprobability for the 4 nucleotides (RE equally),
- (2) Estimate the nucleotide probability as the nucleotide frequencies in th

同一个基因的启动子都是可长可短的，只是不同长度可能启动子的活性不一样。真核生物一般都是认为在第一外显子上游的 2kb 以内（也有 2kb 以外的）。转录因子不同的预测方法（除了 PROMO，还可用 Jaspars、TFSEARCH、TRANSFAC 等数据库）结果都不一样，最终只有实验验证的才准确。

干货 | 7 个步骤教你找到启动子

作者：子非鱼

看到一大串密码一样的序列，要怎么找出启动子呢？其实很简单，也就 7 步，跟着小鱼做就行。

师弟对着电脑上的一大串序列发呆，小鱼问道，“师弟，你这是在格物致知吗？”

AACAGTGACAGTTCCAGTTCCCTCTTTACCAATTTGGATGCCCTTTATTTCTTTCTCTTGCTGATTGCTC
TGCTAGCACCTCCAGTACCATGTTGAAGAGGAGTGGTGAGAGTGGGCATCCTTGCTTGTCCAGTTCT
CAGAGGGAATGCTTTCAACGTTTCTTTATTCAGTATTATGTTGGCTGTGGGTTGTCATAGATGGCTGTT
ATTACATTAAGATATGTCCTTTTATGCTGATTTTGTCTGAGAGTTTAAATCATAAAGGGATGCTGGATTT
TGCAAAATCTTTTTCTGCATGATTCAGATGATCATGTGATTTTTGTTTTAAATCTGTTTATGTGTTG
TATCACGTTTGCATATGTTAAACCATCCCTGCATCCCTGGTATGAAACCCAGCTGGTCATGGTGAATTAT
CTTTTTGATGTGTTGAAATTTGGTTAGCTAGTATTTGTTAAGGATTTTAGCATCTATGTTTATCAAG
GATATTGGTCTGTAGTTTTATTTTTGGTTATGTCCTTTCCCTGATTTTGGTATTAGGGTGTGCTGGCTT
CATAGAATGAATTAGGGAGGGTTCCCTCTTTCTCTATCTTGTTGAATAGTGTCAATAGAATTGGTACCAA
TTCTTTTGAATGCTTTGTAGAATTCGTGTGAATCTGTGTGGTCCCTGGACTTTTTTTCTGGTAAAT
TTTAAATTACCATTTCAATCTCATTGCTTGTATTGGTCTGTTTGGAGATCTAATCTTGTCTGATTTAAG
GTAGGAGGGTTGATTTTTCCAGGAGTTTATCCATCTCTTCTAGGTTTTCTAGTTTATGCGCATAAAAGT
GTTCATAGTAGCCTTGAATGCTTTTTGATTTTCAGTGGCGTCAGTTGTAATACTCCCATTTTCAATTTCTT
AGTGAGATTTTGGATTTTCTATCTTCTTTCTTGGTTAATCTTATTAATGATCTATCAATTTTATTTA
TCTTTTCAAAGAACCAGCTTTTTGTTTCATTTATCTTTTGCATTTTTTTGATTCAATTTTCAATTTAATCT
GTTCTGATCTTGGTTAATTTCCCTTCCCTCTGCTGGGTTTGGGTTTGGTTTGTCTTGTTTTTCTAGTTACT
TGAGGTGTGACCTTAGATTGCCTGTTTGTGCTTTTCAGATTTTTTGATGTAGGCATTTAGGGCTATGAA
CTTTCCCGTTAGCACCATCTTTGCTGTATCCCAGAGGTTTGTATAGGAAATTTCAATCTGTCATTCAGT
TGGAAGAATTTTTCAATTTTCACTTTGATTTGCTTTTTGACCCAATGCTCATTTCAGCAGGTTACTTAAT
TCCATGTACTTGCATGGTTTTGAAGATTTCTTTTGGAGTTGATTTCCAGTTTTATCCACTTTGGTGTGA
GAGAGTGTGGATAAAAATTTCAATTTTCTTAAATGTATTGAGGCTCATTTTATGGCCTATCATATGATCT
ATCTTGGAGAAAGTTCCATGTGCTGTGGAATAGAATGTGATTCTGCAGTTGTTGGATGGAATGTTCTGT
ATATACCTGTTAAGTCCATTTCTTCCAAGGTATAGTTTAAATCCATGTTTCTTTGTTGACTTTCTGTCT
TGGTGACCTGTCTAGTGTGTCATGAGTATTGAAGTCCCTCCATTTATGTTGTACTGTCTGTCTTGT
TTTCTTAGATCTATTAGTAATGTTTTATAAAATTTGGGAGCTCCAGTGTAGGTGCATGTATGTTTAGG
ATTGTGATATTTTCCCTTGGACGAGGCTTTTTTTTTTTTTTGGACGGAGTCTCGCTCTGTGCCAAG
CTGGAGTGCAGTGGCGCAATCTCGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCTGGGTTCAAGTATTCTCCTGTCT
CAGCCTCCCGAGAAGCTGGGATTACAGGCACCCACCACACCAGGGTAATTTGTTGATTTTTAGTAGA
GACAGAGTTTACCATGTTGGTCAGGCTGGTCTTGAACCTCTGACCTCAGGTGATTCACCCCTCAGCC
TCCAAAAATGCTGGGATTACAGGTGTGAGCTACTGGGCTGGCTGGGACAAGGCTTTAACCATTATACA
CTATCCCTCTTTGCTCTTTTAAACCACGTGTGCTTTAAAGTTTATTTTGTCTGATGTAGAAATAGCTACC

“没有啦，我在想怎么把这个基因启动子找出来。”

“试试用 Map viewer 吧！”

下面小鱼就以人的 K-RAS 基因为例讲述一下找基因启动子序列的具体操作步骤：

1. 打开 NCBI 的 Map viewer 页面，

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/index.html>

1 选择物种

Search: Homo sapiens

for: K-ras

2 输入基因名

3 Go

Tools Legend

- Search or Browse the Genome
- BLAST
- Clone Finder
- Go to region on a chromosome
- Genome Resources page

News

- Vertebr
- Mamm
- Prim
- Scientifi
- Callithri
- Chloroc
- Gorilla g
- Homo s
- Macaca
- Macaca
- Nomast
- Otolemt
- Pan par

2. 点击“GO”出现如下页面:

Homo sapiens (human) genome view BLAST search the human genome

Annotation Release 107 statistics [Switch to previous build](#)

Hits: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 X Y MT

Search results for query "K-ras": 123 hits

Hits shown: 1 - 100

Chr	Assembly	Match	Map element	Type	Maps
6	reference	all matches Homo sapiens isolate IND SKP PC3 K-ras (KRAS) gene, exon 1 and...	EF471935.1	SEQUENCE	gbDNA
		Homo sapiens isolate IND SKP PC13 K-ras (KRAS) gene, exon 1 and...	EF471945.1	SEQUENCE	gbDNA
		Human DNA sequence from clone RP11-47D15 on chromosome 6 Contains...	AL356782.14	COMPONENT	Comp
		Human DNA sequence from clone RP11-524H19 on chromosome 6 Contains...	AL512363.11	COMPONENT	Comp
6	CHM1_1.1-Primary Assembly	all matches			

可以查看匹配信息选择你的目的基因!

在Gene前面的小方框里打勾, 然后点击Filter.

Quick Filter

- Gene
- Transcript :
 - all
 - RefSeq

Filter

3. 出现下图, RAS 参考序列给出了两个, 序列有微小的差异, 但总体来说基本相同。现在普

遍采用的是“reference”那个序列。

染色体的红色区域即为你的目的基因所处位置

Search results for query "K-ras AND gene[obj_type]": 7 hits

Chr	Assembly	Match	Map element	Type	Maps
11	reference	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	HRAS	GENE	Genes cyto Genes seq
11	CHM1_1.1-Primary Assembly	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	HRAS	GENE	Genes seq
11	GRCh38.p2-ALT_REF_LOCI_1	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	HRAS	GENE	Genes seq
12	reference	all matches v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	KRAS	GENE	Genes cyto Genes seq
		sarcoSPAN (Kras oncogene-associated gene)	SSPN	GENE	Genes cyto Genes seq
12	CHM1_1.1-Primary Assembly	all matches v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	KRAS	GENE	Genes seq
		sarcoSPAN (Kras oncogene-associated gene)	SSPN	GENE	Genes seq

4. 点击上述两条序列第一条序列（即 12 reference）对应的“Genes seq”，出现新的页面，点击下图出现的“Download/ViewSequence/Evidence”，即可下载查看序列等功能。

Summary of Maps:

Map 1: Genes On Sequence 点这 [Table View](#)

Region Displayed: 25,170K-25,286K bp [Download/View Sequence/Evidence](#)

Total Genes On Chromosome: 2398

Genes Labeled: 3 Total Genes in Region: 3

5. 出现的页面提示 K-ras 基因在染色体上的位置：

Homo sapiens (human) (Annotation Release 107)
 Region to retrieve (in chromosome coordinates):
 Chromosome: 12 Strand: plus

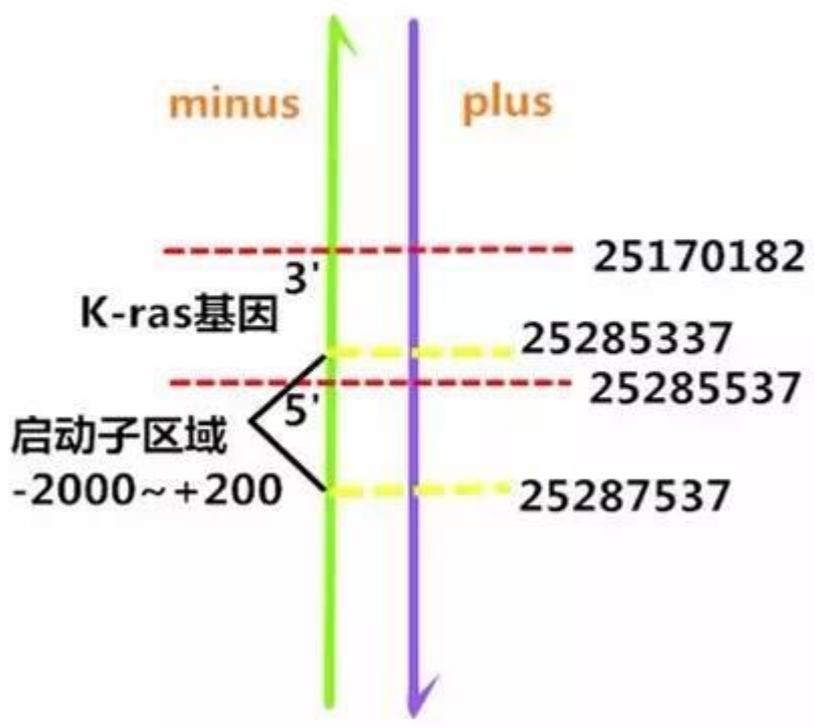
from: 25170182 adjust by: -0K
 to: 25285537 adjust by: +0K **K-ras基因在这个染色体上的位置**
 Change Region/Strand

Sequence Format: FASTA
 FASTA
 GenBank

This chromosome region corresponds to the contig region(s):

Contig	start	stop	strand
NT_009714.18	18085532	18200887	+

[Display](#) [Save to Disk](#) [View Evidence](#)



6.因为启动子一般在-2000~+200 区域，把页面中的参数修改一下：

Homo sapiens (human) (Annotation Release 107)
Region to retrieve (in chromosome coordinates):

Chromosome: Strand: **1**

from: adjust by:

2 to: adjust by:

3

Sequence Format:

This chromosome region corresponds to the contig region(s):

Contig	start	stop	strand	
NT_009714.18	18200687	18202887	4+	<input type="button" value="Display"/> Save to Disk View Evidence

7.那么就得到 K-ras 的启动子区域，如下图：

Homo sapiens chromosome 12 genomic scaffold, C HSCHR12_CTG2

NCBI Reference Sequence: NT_009714.18

[GenBank](#) [Graphics](#)

>gi|568815268:18200687-18202887 Homo sapiens chromosome 12 genomic scaffold
Primary Assembly HSCHR12_CTG2

```
TTACAGGCGTCAGCCACCACGCTGGACCATTTTTCTAACTTTTTATTTTGAATAATTATAAATTCAAGCA
AAGTTGCAAGGAAATATACAGTGAAGTCCCAAGCACACTTCTCCCCATTCAATGTTAACATTTACACAAC
TATTATAAATACCAAAAACCAAGATATTAATATTGGTGCAACCCACAGAGCTTATTCAGACTTCACCTTT
TATACATGCACTTATTTCTGTACATATATCTAGCTCTATATATTTTCCATTTTACAGAAGATGAAACT
GGGGCTTAGAAAGGCTTAGAAATAAGGGTCAC TGAATTTGCCATGGTGAAGATATTCTTTAAATCTGGG
CAATTTGGTACCAGAGTCCATACCTCAATTAAGAATCTCTACTGTAGCACATTGCAATAACTTGAATGC
TTATATCAGCATATCTAAAGAAGGATTGTAACCACCAATATGTGCACAACCTTTATGTGTGTAAGTCGTC
CTTTCAAAGGACAGAGCAACTGTGCCACCCTATAATTGTATAGGGGCAAACATTTGGGGCCAATGGAC
TTCAAATTTGTAGTACAGCCATGATAAAAAGCAATCTAATAATTAATAAAGAGTATCTCTAGATATTCT
ACCTGAAGAATGTATCTCAGGAACAACAAATAGCCCTGTTTTATCCATGACCACGGAGCAATGTTTTA
GCCATCCACTTTCTCTAGTGTCTCATACAACAAATGGGGTCTCAAAAAC TATTATGTAAACTCAACTGC
AAGTTTCTTGAGGACAGAGATGGCATCAGTTCTGTCCATGCTGCCCTTTTGTGAATGAGTGAATGAATGA
ATGAATTGATTAAGTGTGTCAGCGACACCCCTCCCTACTACATTTACCTATAATGTTGAAAATGTTT
GAGTGCTTTTCACTTTTTTATTAATCAATCAATCTTTATATCCTAAGGAGTCTCTACAAGTTTTTCA
TCGTTTTATATATTTTATTTATGTTTTCCCTCCAGCAAATCCGCCATCTTATAGTGTAAACATTGGACAT
GGTACTAATGTAGTTCTACCCACGTAATAGTGAATACACTAGTACCCATGTGCTCTGCTTCCCTTCCCTC
TTGCAACCAGATTTCCCGCTCCTGAGGCCAAGCCTGCCTTCTGTGCTCTTGATTTCAACCTGTCATTTTA
ACAAGGATCTTATTTTCATAAATTTTTCGTTTTCTTTCACTTTCTCCCTCATGGCTAGTTTATTTCCAT
CTGCATACAAAATATGCCTTAATATCATCCCAAGTAAAAATTAATGAATAAAAACAAATCCTTTGATTCAAT
CTTTCTCTGCAGATTCAGGACAAAATTTTTGAACTTATTTATGTTACCTGTCTCCTTTTGCACCTGTGAA
TCACTCCTGTATCCACTATGATCAGACTTTTGTGAATACCACTCTACTGAAATGGCTTTTATTAGGTCAC
TAGATAAATCCATCTTGGAAAACCTCTGCAGGTCAAATTTCCACCCATCATTTGATTTGATCTCTTACCT
AGTCTTTCTTTGTTGAAAACATTTTCTTTTTCTTCTTAGGCTTCCTTCATATCATAGGCTCCTGGCTTTA
TCCTATCATAATAGTTTCTTTTTTCCAGTCTCCTTTGTTCCCTCAGTCCCTCTTTTCTTCTTTAGTGATCTC
ATCCATGCCCATGGTTTTGGATACCTGCCATATGCTTATGACTCCAGGTACATCCAGTTCTGACCTTTG
TCCTGAAATCCAGACTCATATATCCAATTATCTAGTCAACATCTCATCTTGAATATTTAACAGACACCTC
AAACTTAACATTTCCAAAATGGAACCTCTGATCCTTGGCCCTCTTCTTCCCTTCCCACTCCCTCTGCCAAAAT
```

干货 | 寻觅基因启动子，UCSC&Ensembl
来助威！

作者：子非鱼

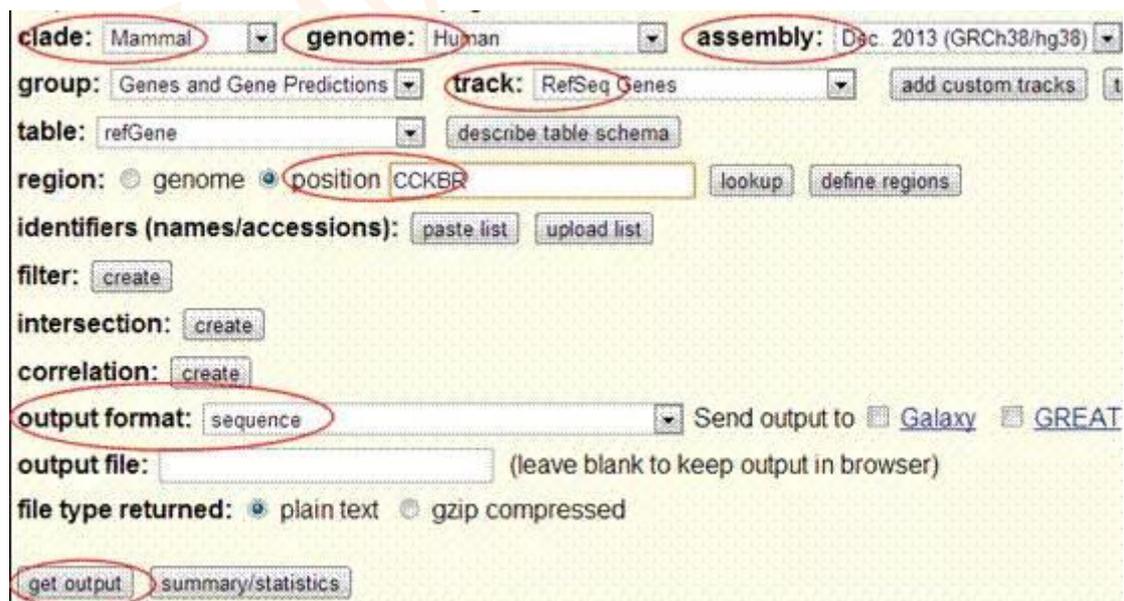
启动子一直都是基因的重要组成部分，它就像开关，决定着基因的活动，是区分基因与“垃圾 DNA”的关键成分，因而，其异常性突变往往会导致基因表达的调节障碍，目前对启动子的研究仍旧是一个热门话题。今天小鱼就用 UCSC 数据库及 Ensembl 数据库查找基因启动子的方法介绍给大家。

用 UCSC 数据库查找基因序列的启动子

方法一：1.打开 UCSC 数据库网址：<http://genome.ucsc.edu/>



2.选择 Tools 中的“Table Browser”则出现以下界面，以人的 CCKBR 基因为例。首先，在 clade 中选择 Mammal, genome 中选择 Human, assembly 中选择最新的数据库, track 中选择 RefSeq Genes, output format 中选择 sequence。其次，在 position 后面的方框内输入待查的基因名称，如 CCKBR。点击 get output。



3.可出现以下界面,点击目的基因的第一个链接,可出现 Select sequence type for RefSeq Genes 界面,并在该界面中选择 genomic 选项。

The image shows a screenshot of a web interface. At the top, there is a section titled "Known Genes" with a list of gene entries. Each entry includes a gene symbol, a RefSeq ID in parentheses, and genomic coordinates. The entries are: CCKBR (uc001mcp.4) at chr11:6259736-6272127 - l; CCKBR (uc057yje.1) at chr11:6259926-6269817 - The; CCKBR (uc057yjd.1) at chr11:6259875-6270255 - The; CCKBR (uc057yjc.1) at chr11:6259806-6272062 - Bel; CCKBR (uc001mct.2) at chr11:6270776-6271214 - cho; CCKBR (uc001mcs.4) at chr11:6259926-6272127 - Rec; PRKD2 (uc002pfi.4) at chr19:46674317-46717127 -; PRKD2 (uc002pfg.4) at chr19:46674320-46714324 - H; NTM (uc001qgp.4) at chr11:131911003-132336822 -; NTM (uc001qgq.4) at chr11:131911462-132335665 - H; NTM (uc001qgo.4) at chr11:131911468-132315070 - H; NTM (uc001qgm.4) at chr11:131370478-132336822 - H; PRKD2 (uc002pfk.4) at chr19:46674275-46717082 - S; PRKD2 (uc002pfi.4) at chr19:46674316-46716596 - S; PTPN11 (uc001ttx.4) at chr12:112418914-1125099; PTPN11 (uc001ttw.2) at chr12:112418909-112486923. Below this list is a section titled "RefSeq Genes" with two entries: CCKBR at chr11:6259674-6272127 - (NM_176875) gast; CCKBR at chr11:6259674-6272127 - (NM_001318029) g. At the bottom, there is a dialog box titled "Select sequence type for RefSeq Genes" with three radio button options: "genomic" (selected), "protein", and "mRNA". There are also "submit" and "cancel" buttons.

Known Genes

CCKBR (uc001mcp.4) at chr11:6259736-6272127 - l
CCKBR (uc057yje.1) at chr11:6259926-6269817 - The
CCKBR (uc057yjd.1) at chr11:6259875-6270255 - The
CCKBR (uc057yjc.1) at chr11:6259806-6272062 - Bel
CCKBR (uc001mct.2) at chr11:6270776-6271214 - cho
CCKBR (uc001mcs.4) at chr11:6259926-6272127 - Rec
PRKD2 (uc002pfi.4) at chr19:46674317-46717127 -
PRKD2 (uc002pfg.4) at chr19:46674320-46714324 - H
NTM (uc001qgp.4) at chr11:131911003-132336822 -
NTM (uc001qgq.4) at chr11:131911462-132335665 - H
NTM (uc001qgo.4) at chr11:131911468-132315070 - H
NTM (uc001qgm.4) at chr11:131370478-132336822 - H
PRKD2 (uc002pfk.4) at chr19:46674275-46717082 - S
PRKD2 (uc002pfi.4) at chr19:46674316-46716596 - S
PTPN11 (uc001ttx.4) at chr12:112418914-1125099
PTPN11 (uc001ttw.2) at chr12:112418909-112486923

RefSeq Genes

CCKBR at chr11:6259674-6272127 - (NM_176875) gast
CCKBR at chr11:6259674-6272127 - (NM_001318029) g

Select sequence type for RefSeq Genes

genomic
 protein
 mRNA

submit cancel

4.点击 submit 后,因一般启动子的长度大约为 2kb,可选择 Promoter/Upstream by 2000 bases。

Sequence Retrieval Region Options:

- Promoter/Upstream by bases
 - 5' UTR Exons
 - CDS Exons
 - 3' UTR Exons
 - Introns
 - Downstream by bases
 - One FASTA record per gene.
 - One FASTA record per region (exon, intron, etc.)
 - Split UTR and CDS parts of an exon into separate records
- Note: if a feature is close to the beginning or end of a gene, it may be omitted.

Sequence Formatting Options:

- Exons in upper case, everything else in lower case.
- CDS in upper case, UTR in lower case.
- All upper case.
- All lower case.
- Mask repeats: to lower case to N

5. 点击 get sequence 即可得到结果。

```

ccaggccccgagcagggagctgcagggaaactacggtagcaatagtgtcac
ggtcactgcccactgcaacacagtacggtaaatgcgctctaggctca
gactaaagcatccgcctcagcaggtgacgcagcagacctggtctcca
acgccacctccacgttccctgatacaccagagaaagatgctggatccgtg
gcagccgtctctacccaaccctcctaccctcccttccccgaaacctccc
cctacgctgccaatactcttgtcttcaatctctctctctctctctctc
tctctctctctctctctctctctcattcctgggaatcgggggtggggg
cgggtgataaagagaggtgggcaggagagaaatctctaaaggagacggg
acacatctagggagggggcagcctggaggacagtgcacagggaggggc
>hg38_refGene_NM_001318029_1 range=chr11:6259674-6259928 5' pad=0 :
agaactcccgagccagggaggggtgcacagtacactggcgggacagagg
ctggcggagggacgggaacccagggcggggcagccgaggagagtgagg
gcaggccctgggctggggcggggaccaggcggggcagggggcagggag
aggagggcggcgggagcctgagccggaatgcagcgtgagcaggtggagc
cgcggtgggagcccggggtcgagctgagtaaggcggcgggctcggcgg
gggcc
>hg38_refGene_NM_001318029_2 range=chr11:6259929-6260079 5' pad=0 :
ATGAGCTGCTAAAGCTGAACCGGAGCGTGCAGGGAACCGGACCCGGGCC
GGGGCTGGCTGGCCCGGGGGCGCCTCTCCTCAACAGCAGCAGTG
TGGGCAACCTCAGCTGCGAGCCCCTCGCATTCGCGGAGCCGGACACGA
G
>hg38_refGene_NM_001318029_3 range=chr11:6260080-6270087 5' pad=0 :
GTGGGTGCTCCCTCAGCCCCCCCCACAAGCTATTTCTACTGTACCCCA
GAACACTAATAGAGTCCCCCAACGAGCTCCACACTACCTTCTCAAACGT

```

↑
putative promoter

5'UTR

start codon

方法二：

1. 在打开 UCSC 数据库后，点击 Genome Browser，可出现以下界面。在 species 中选择 Human，assembly 中选择最新的数据库，Position/search term 中输入 CCKBR 基因。

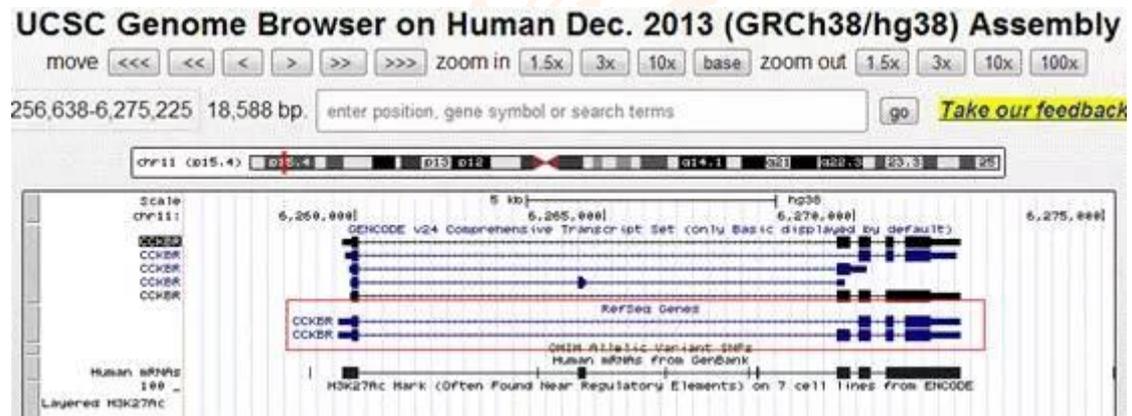


2. 点击 GO，可出现以下界面，点击目的基因的第二个链接。可出现这个序列的图解概要。

Known Genes

[CCKBR \(uc001mcp.4\) at chr11:6259736-6272127](#) - H
[CCKBR \(uc057yje.1\) at chr11:6259926-6269817](#) - The
[CCKBR \(uc057yjd.1\) at chr11:6259875-6270255](#) - The
[CCKBR \(uc057yic.1\) at chr11:6259806-6272062](#) - Belo
[CCKBR \(uc001mct.2\) at chr11:6270776-6271214](#) - chol
[CCKBR \(uc001mcs.4\) at chr11:6259926-6272127](#) - Rece
[PRKD2 \(uc002pfi.4\) at chr19:46674317-46717127](#) -
[PRKD2 \(uc002pfg.4\) at chr19:46674320-46714324](#) - Ho
[NTM \(uc001qgp.4\) at chr11:131911003-132336822](#) -
[NTM \(uc001qgg.4\) at chr11:131911462-132335665](#) - Ho
[NTM \(uc001qgo.4\) at chr11:131911468-132315070](#) - Ho
[NTM \(uc001qgm.4\) at chr11:131370478-132336822](#) - Ho
[PRKD2 \(uc002pfk.4\) at chr19:46674275-46717082](#) - Se
[PRKD2 \(uc002pfj.4\) at chr19:46674316-46716596](#) - Se
[PTPN11 \(uc001ttx.4\) at chr12:112418914-11250991](#)
[PTPN11 \(uc001ttw.2\) at chr12:112418909-112486923](#) -

3.为了获得这个区域更清晰的图像,可以点击紧靠 zoom out 的 1.5x按钮,如下图所示,一般高的块状表示外显子,短的块状表示 5'端和 3'端非翻译区,起连接作用的内含子则用细线条表示,翻译的方向由沿着细线的箭头表示。



4.点击上图中的 RefSeq Genes 中,任一个条形方块,可进入新的界面。在该界面的 Links to sequence 中,选择 Genomic Sequence 即查阅该基因的启动子序列。

Links to sequence:

- [Predicted Protein](#)
- [mRNA Sequence](#) (may be different from the genomic sequence)
- [Genomic Sequence](#) from assembly
- [CDS FASTA alignment](#) from multiple alignment

Sequence Retrieval Region Options:

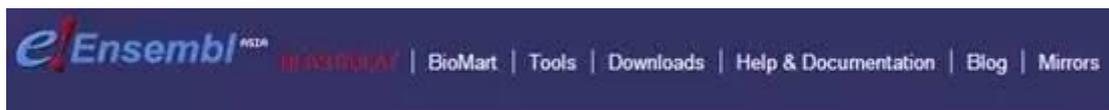
- Promoter/Upstream by bases
 - 5' UTR Exons
 - CDS Exons
 - 3' UTR Exons
 - Introns
 - Downstream by bases
 - One FASTA record per gene.
 - One FASTA record per region (exon, intron, etc.) with
 - Split UTR and CDS parts of an exon into separate
- Note: if a feature is close to the beginning or end of a chr

Sequence Formatting Options:

- Exons in upper case, everything else in lower case.
- CDS in upper case, UTR in lower case.
- All upper case.
- All lower case.
- Mask repeats: to lower case to N

用 Ensembl 数据库查找基因的启动子序列

1. 打开 ensembl 数据库的网址: <http://asia.ensembl.org/index.html>



2. 以人的 ANKH 为例, 在 search 中选择 Human, for 后面的方框中输入 ANKH 基因。



3. 点击 GO，在出现的新界面中，点击左侧的 Gene。



ANKH (Human Gene)

ENSG00000154122 5:14704804-14871778:-1

ANKH inorganic pyrophosphate transport regulator [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15492]

ANKH (Vega gene) is associated with Gene ENSG00000154122

[Variant table](#) • [Phenotypes](#) • [Location](#) • [External Refs.](#) • [Regulation](#) • [Orthologues](#) • [Gene tree](#)

ANKH (Human Gene)

56172 5:14704800-14871778:-1

ANKH (RefSeq gene name) is associated with Gene 56172

[Variant table](#) • [Phenotypes](#) • [Location](#) • [External Refs.](#) • [Regulation](#) • [Orthologues](#) • [Gene tree](#)

4. 点击第一个链接，可查看该基因的详细信息，点击左侧下端的 export data。



5. 在导出数据的界面中，将 5' Flanking sequence (upstream) 后的方框里输入 2000，即启动

子一般长度。同时，将 Genomic 后的方框里选择 5' Flanking sequence，点击 deselect all 取消后续方框的对勾，再点击 Next。

Gene to export: ENSG00000154122 (ANKK1)
Output: FASTA sequence
Strand: Feature strand
5' Flanking sequence (upstream): 2000
3' Flanking sequence (downstream): 0
Next >

Fields marked * are required

Options for FASTA sequence

Genomic: 5' Flanking sequence
Select/deselect all: deselect all

6.在新的界面里，点击 text 格式，即可获取启动子的序列。

Export Configuration - Output Format

Please choose the output format for your export

- [HTML](#)
- [Text](#)
- [Compressed text \(.gz\)](#)

>5' Flanking sequence chromosome:GRCh38:5:14871779:14873778:-1
ATTGTTTTAGGAAAAAAAAAACCTCTTTCCAGAGAATTCCITTAATAACAAGCTCCC
TTTTGTATATTTAAGTTAGATTCAAATATATTTAAACACACCTTTCAGGAACTTGCTCC
TGAAGACAGTCCGTGCCACATGAACCTCCTGTTTTGCTGGGAAATCTTTTAAATACAGTA
TTGCTATTTGACACATTTAAACAATAAACTTACCAAGTTTAAATTTAATCATAGGGAAT
GTAATTTGAGGTTACATCAGAGCTACAAGGTAATTAGCTTCTTATTTTCAAAGCCTGC
TCAAATTTGTTGGAATTTCAAAAAAGTATTTTAAAAAGGATGCAAAATATGGAAATATTT
ATTTATTTATTTATTTATTTTGGAGAGGGAGTCTCACTCTGTCACCCAGGCTGGAGTGCC
ATGGGTGACGCTGCAACCTCCGTCCTCCGGGTTCAAACCATTCCTGCTTACCTCTT
GAGTAGCTGGGGCTACCGGCGCCACCGCTCACGCCGCGCTATGGAAACATTTAACACT
TTCAAAGTAGTTGGGAAATACCTGAAACCCAGGATATGAGGTCTCAAGCTCACTATTTAC
AAAAGCTTTACAAAGCTAAATTTGAGTTAATCGGTTCACTTCTAGGTACAAGATAGTTTC
TTACTTTTAAATAATAAATTACTTTACTTCGTTATATTTATTTAAATGCAGAGATGTGTGTG
AGAGTTGGTATAAAATAGTAAGACCACGATAGGCTACATACTATGCCAGGCCACTACAA
AATGAAAAATGCAGAGACCTTGTTCAAATTCAGAGTGCAACAGCAGCGGTTAGTCCTT
TTAAGTGGGGCCCTCTGTGACTTCACAGATCGCACGCCCCGTAAGCCAGCCCTGCCAG
AGTCCCTTTTCATTCAC TGGGTCCTCCTCCCTCGCGTCACAGTCCTGGGGTGGGGGATG
CTGGCGTTGCTGTACACTGCGGAGCTTTAGGTCAAACCTCTCAGCACCGCGACTAGTTAC
CCTGAAATCACTGGGGCCCGGTATTACAAAACAGAACACACTTTCTCTTTCTTCCCCTT
TATTTAAAAGAGATGATAGGCTTTACGAGTTATTTTAAATAGAAATTTTTTACAATGAAA
AGAATTCGGGCGTACTGTTTCAAACATGCAGCAGACAGGTCGTGAGCGCCCCAGAGGCGG
CCGGCCCCAGCCTGGGAGCCTGCGGGGACCACTCCCTGCTGCCCTGGCGCATGTCTCCCA
GGGACACGGGCCACCGTTGCCCTGGAAACCTGGGGGACAGGCTCCCTCCGGGGCAGCC
TTCCACGTTTCTTTGCCCCCCCCGGAGCGGCACCTCCATACCTCCCGGGCCGCTAGTC
CCCCAAGCAGGCCCCAGCCCCGGCGCAAGCTGCCTCCTCCGCAGTCCCCGCCCCCGCC
AGCCCCGGCCACCGCCGGACCGCGCCCTTCCCAGCCCCGCGCCCCGCTCCCCAGCCCTCCT
CGCGCGTCCGAGCCACGTCGCTTGCCCCGGCTGCCAAGTCTTCCAGACGGCCCGGCCCT
CCCCGCACAGCGCGGGAACCCCGGCCCCCGCCCCACGGGACGAGGGCTACAGGGCCCCGG
CCGGCGAGCCAGGGCACCCCGGGTCTCCAGGCGGCCACCGCCCTCACCCCCACCGGC
GTCCCCAAGCCCCAGACCGTCCCCGCGCGCCCTCAGCGCGCGCCCCCGGGCCGGCC
GAGGCTCCGCGCGAGTCCCGCCAGCGCCCCGGAGGCGCCAGCCCCACGGCCCGAGCGT
GCGCAGCGCCCCCGCGCCGCGCCAAAGCGCAGGCGACGGCACAGGAAAGGAGGCCGCGG
CGCGCCCCGGCCCCCTCCCCAGCCCCCGGGGCGCTGGCGGTGTCGCGCCT
CCGCGCCCCCTGATTTCTCCGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGCCTCGTGCGCGCG
GTTATTTATTTCCGGGCCCC

3 PCR 技术

3.1 PCR 引物

实验新手必读（二）：PCR 设计宝典、软件应用、操作细节.....

作者：子非鱼

遥想当年，小鱼初遇 PCR 时，原以为可以轻松的搞定，谁知 PCR 却是一个不折不扣的大坑。各种假阳性、假阴性结果齐飞，非特异性扩增条带一如狗皮膏药一般挥之不去，在寻找各种原因无果后，小鱼愤怒的捏碎了电泳胶。然而痛定思痛后，小鱼发现 PCR 之所以能成为科研路上的拦路虎，首先，引物设计可算是一大功臣。

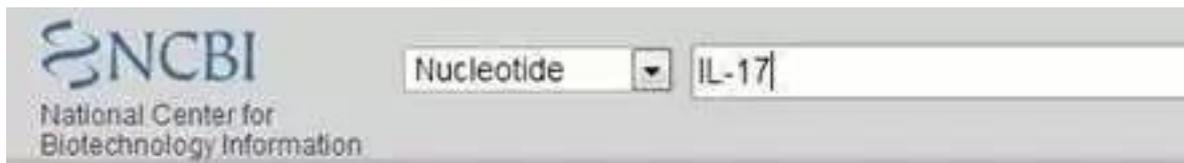
PCR 引物设计宝典

好的引物会让 PCR 实验成功一半，因而，引物设计一直都是 PCR 非常重要的环节。因而，小鱼也从神师兄那里搜刮囊括了几种引物设计方法，在此分享给大家。

当然首推的经典之法就是让 Premier5 携手 oligo，共同设计 PCR 引物。



1\以小鼠的 IL-17 为例，进入 NCBI 界面,选择 Nucleotide 后，输入 IL-17，点击 search。



然后选择人类 IL-17 的 mRNA，在 CDS 选项中，找到编码区所在位置，在下面的 origin 中，选定目的序列。

CDS 45..523

```

/gene="CTLA-8"
/codon_start=1
/product="IL-17"
/protein_id="AA05222.1"
/db_xref="GI:1469918"
/translation="MSPGRASSVSLMLLLLSLAATVKAATIPQSSACPTEAKDFL
QNVKVMKVPNSLGAQVSSRRPQDYLNRSTSPWILRRNEDPDRYPSVIVWGAOCRKRC
VNADGKLLHDMNSVLIQQEILVLKREPSCHPFFRVERKMLVWGCTCVASIVRQAA"

```

ORIGIN

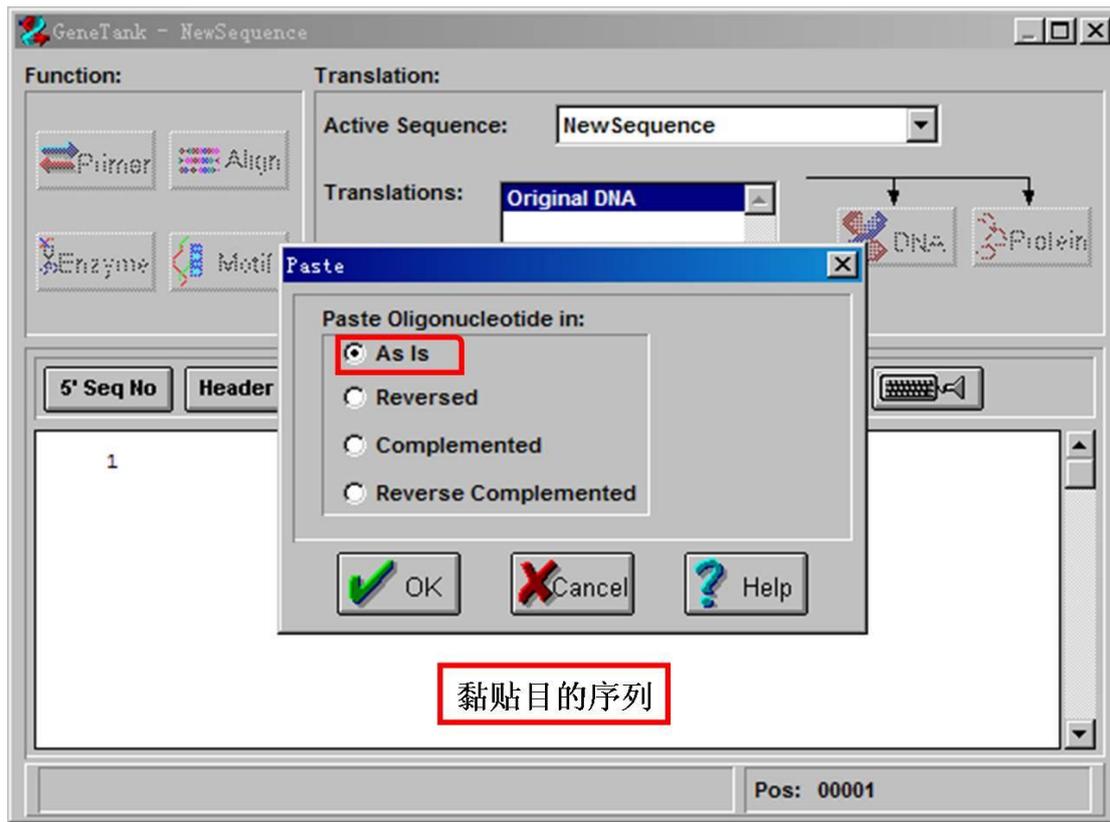
```

1  gaggctcaag  tgcaccgcc  accagctgat  cagcagccct  aaacctgact  ccaaggcagc
61  atctctctct  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct
121  cagggatcat  cctcaccagc  ttagctctct  caaacattca  gctcaaggac  ttctctcaga
181  atctcaagct  caactcaca  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct
241  cctcagacta  cctcaccagt  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct
301  atagataacc  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct
361  agggcaagct  ggcaccacc  agcaattctg  tttctctctc  gcaagagatc  ctgctctctg
421  agggcaagcc  tgcagctctc  cctctcattt  tcaagctctc  caaacctctc  ctctctctct
481  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct  ctctctctct
541  cctcaagaaa  ccccaccgtt  tctcagcaaa  ctctctctct  ttttaaaa  agttctctct
601  attgatcttc  agcaaggact  gtgattctag  agcagatctc  agaattctct  gacctcaca
661  atgaaaagaa  ggtgaaagc  ggtcccacc  tctctctctc  tttttttct  ttgacttta
721  aattatttgt  gtatttaca  tatcccaga  taattttaa  ggcgtaact  attaatgaa
781  gtatctacct  tattattat  tttctctct  aagaagaca  aattcaagac  tcaaaattt
841  tattatttaa  aagtaagcc  tatattata  tgactattt  ataatctat  ttattttct
901  tcaatattt  aagtattag  acaatgatt  tcaatctac  ctagggaagt  cctaatgag
961  attaatatt  aatgaaatt  tcaacttac  tatttggtt  attaaggtt  ctctctctg
1021  aatgggtga  aaaccacc  tagttttat  ttttaaat  ttttaafta  ttgaagattc
1081  aaaaatttg  aatatttag  tctctctct  gttt

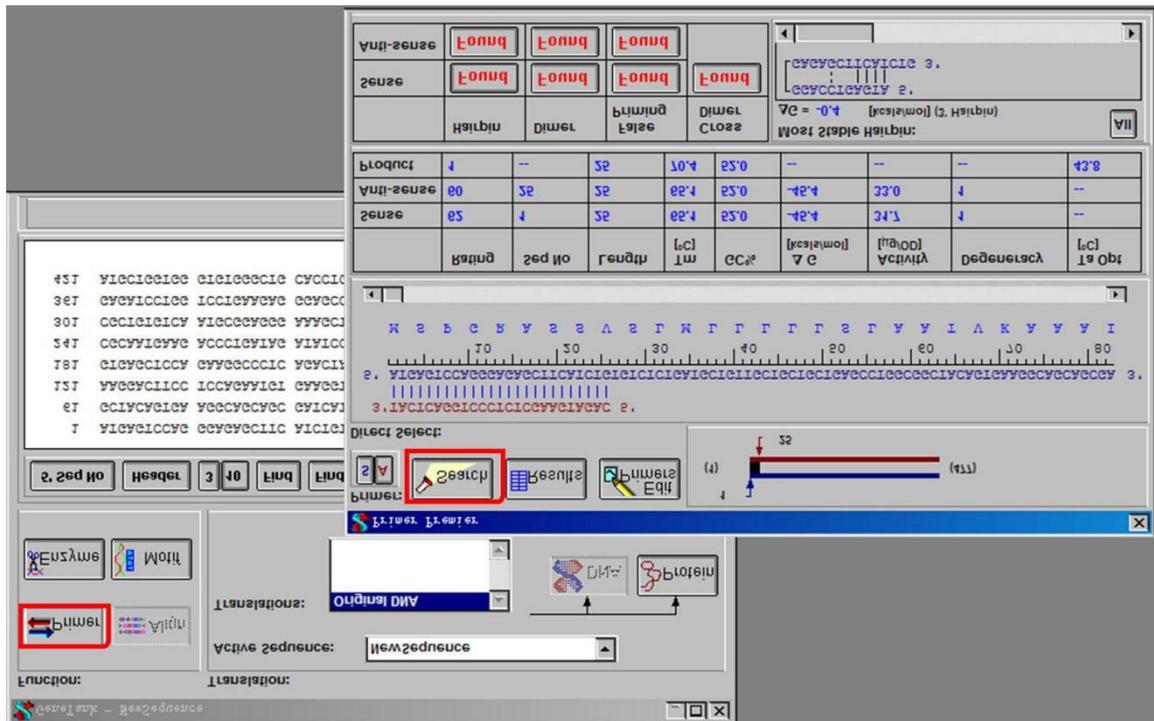
```

目的序列

2、打开 Primer Premier5 软件，点击菜单栏 File|New|DNA Sequence，在出现的对话框里黏贴目的序列，并在 paste 对话框里选择 As Is，点击 OK。

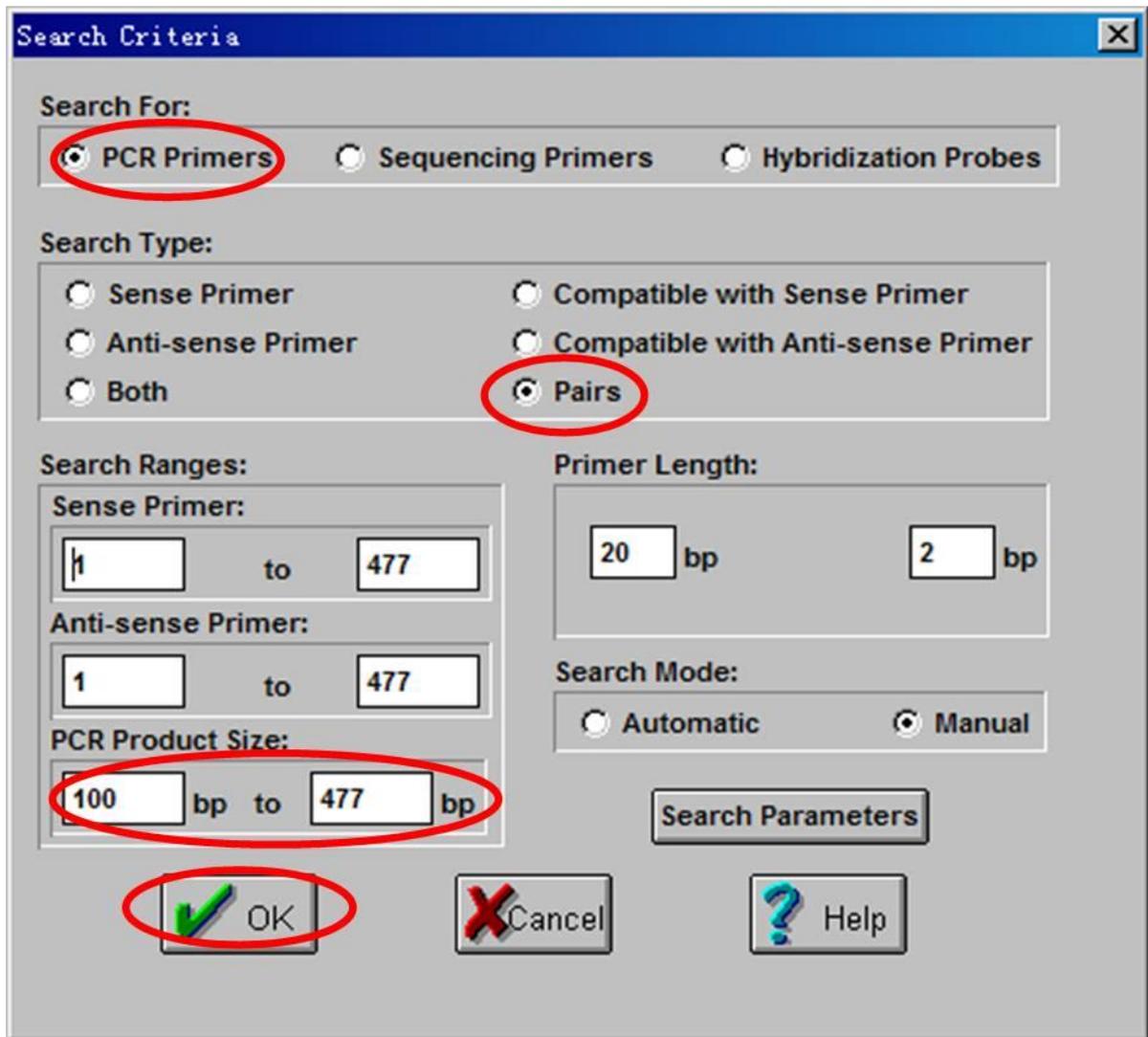


3、点击 Primer，弹出菜单后点击 search 按钮。

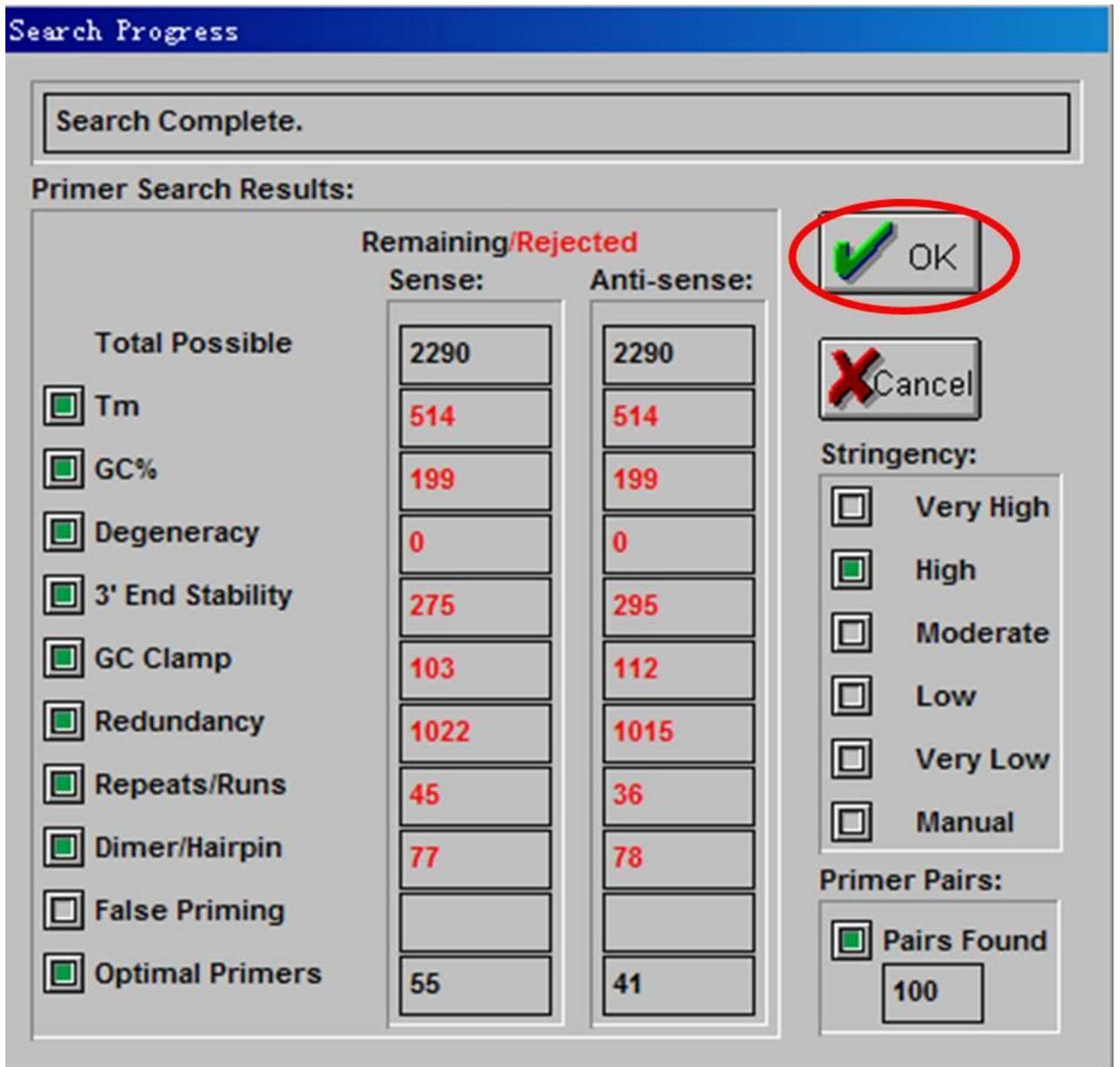


在弹出的 Search Criteria 中，选择 PCR primers，Pairs 参数，并选择所需

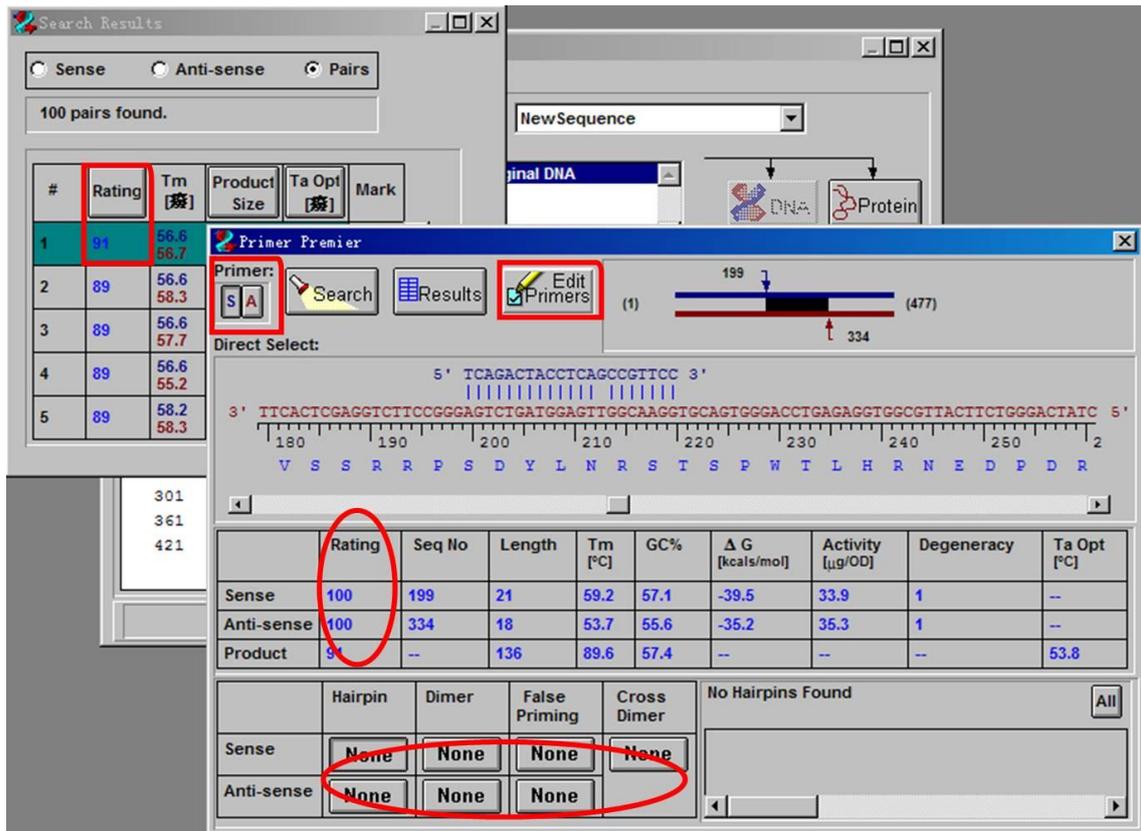
PCR 产物长度，点击 OK。



在弹出的 search progress 菜单中，点击 OK。



4、在搜索出的结果列表里选择 Rating 值高，bug 较少的引物#1，在 Primer Premier 中选择 S（正义链）/A（反义链），点击 edit primer，将所得引物改成为 Rating 值为 100，无 bug 的引物，即无发夹（Hairpin）、无二聚体（Dimer）、无错配（False Priming）和交叉配对（Cross Dimer）的引物。

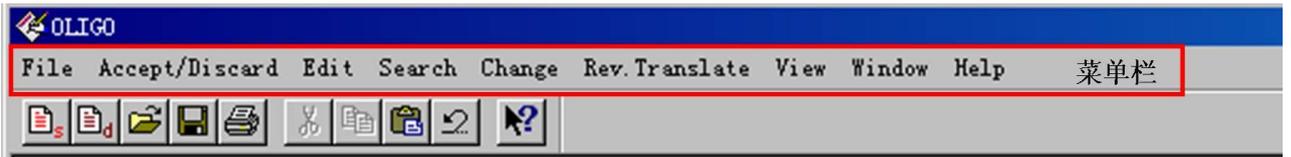


5. 点击菜单栏中 Edit | Copy | Sense Primer/Anti-sense Primer，即可得到设计的引物。

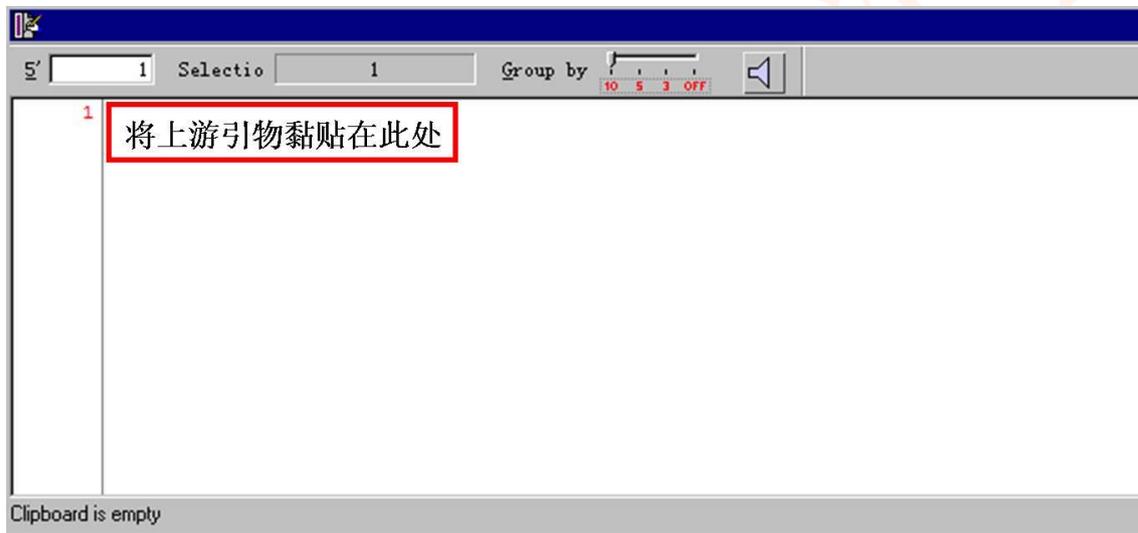
Sense Primer: 5' TCAGACTACCTCAGCCGTTCC 3'

Anti-sense Primer: 5' GGTGGTCCATCTTCCCT 3'

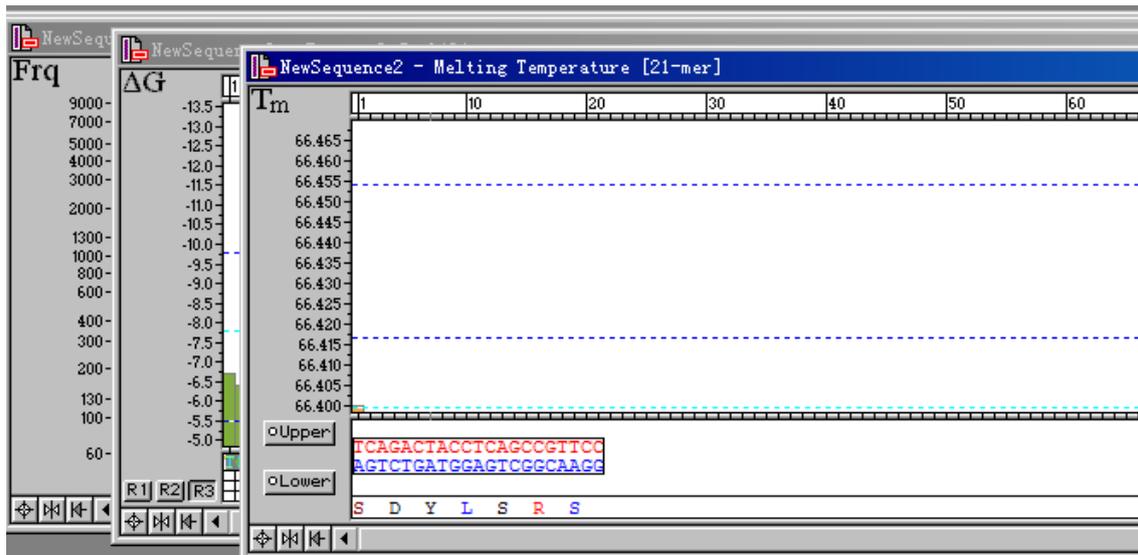
6. 接下来，就要用 Oligo 软件验证评估 Premier5 软件所设计的引物，打开 Oligo 界面如下：



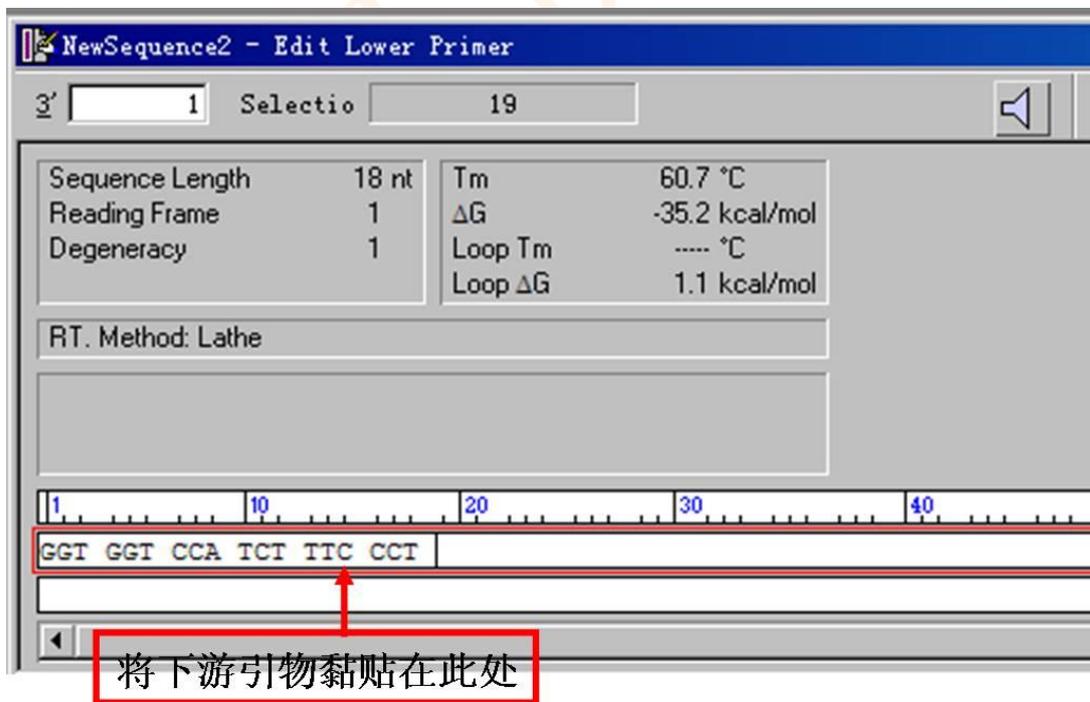
单击菜单栏里 File | New Sequence 可打开以下窗口，并将设计好的上游引物黏贴在空白框里。



7. 点击菜单栏里 Accept/Discard 中的 Accept，则会出现 Tm、 ΔG 和 Frq 三个窗口， ΔG 值反应了序列与模板的结合强度，最好引物的 ΔG 值在 5'端和中间值比较高，而在 3'端相对较低。



8、点击菜单栏里的 Select 中的 Upper Primer 将当前引物设置为上游引物。同时点击菜单栏里的 Edit 中的“Lower Primer”命令，在 Edit Lower 窗口中输入下游引物的序列。



点击 Accept and Quit 命令即可。

9、最后，在菜单栏中 Analyze 完成引物 ΔG 值、 T_m 值、引物二聚体和发夹结构的分析后，可将引物序列送至公司进行合成即可。

然而，此法虽好，但是下载软件总归是件麻烦事儿！有木有更简单粗暴的设计引物的方法呢？答案是 YES！有！这 **3 款简单实用的在线 PCR 引物设计软件**可以说是懒癌晚期患者的福音。

3 款简单实用 PCR 引物设计软件

No.1 NCBI 的 Primer-Blast

1、打开以下网址：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> 进入 Primer-Blast 界面，开始引物的设计。

PCR Template [Reset page](#) [Save search parameters](#) [Retrieve recent results](#) [Publication](#) [Tips for finding specific primers](#)

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [Clear](#)

设计引物
输入目的模板
Accession number /Gi number/FASTA 格式

Or, upload FASTA file 未选择文件

Range

Forward primer From To [Clear](#)

Reverse primer

2、验证引物好坏

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)

PCR product size: Min Max

of primers to return:

Primer melting temperatures (Tm): Min Opt Max Max Tm difference

输入引物序列

设置PCR产物大小

3、外显子内含子 (Exon/intron)

如果设计的引物是跨内含子和外显子的交界处，可在此处设置成为 Primer must span an exon-exon junction。外显子的匹配碱基数和内含子的长度等设置一般选择默认。

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span:

Exon junction match: Exon at 5' side Exon at 3' side

Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction

Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range: Min Max

在这里根据需要设置外显子/内含子选项

4、特异性（Specificity check）

在 specificity check 区，选择设计引物或验证引物时的目标数据库和物种。这一步是比较重要的。其中，数据库中的 RefSeq mRNA 和 Genome (reference assemblies from selected organisms) 是经过专家注释的数据，可得出更准确的结果。

The screenshot shows the 'Primer Pair Specificity Checking Parameters' interface. Key elements are annotated with red boxes and Chinese text:

- Database:** Set to 'Refseq mRNA', with a dropdown menu labeled '选择数据库' (Select database).
- Organism:** Set to 'Homo sapiens', with a text input field labeled '填写物种名称' (Enter species name).
- Entrez query (optional):** A text input field with the annotation '点这里可填入多个物种' (Click here to enter multiple species).
- Splice variant handling:** The checkbox 'Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)' is checked, with the annotation '注意这个选项' (Pay attention to this option).

5、最后建议用 oligo6 或 primer5 验证引物自身的特性：发夹结构、引物自身二聚体、错配和引物间二聚体， ΔG 的绝对值。

No.2 Primer3 Plus

1、点击这个网址：<http://www.primer3plus.com/>可打开 Primer3Plus 软件。

Primer3Plus pick primers from a DNA sequence	Download Primer3	Source Code
	Molbi	Donate

[Run latest Version of Primer3Plus](#)

This is the latest version of Primer3Plus with all the new features.

Other Web Resources

[Primer3Web at the University of Tartu](#)

The latest version of Primer3Web running at the University of Tartu.

[Primer3Web](#)

The latest version of Primer3Web.

[Download Primer3](#)

Get your own copy of Primer3, the command line program.

[Primer3 Development](#)

On this place the efforts of developing Primer3, Primer3Plus and Primer3Web are coordinated. Please go there for bug reports, feature requests and support.

点击 [Run latest Version of Primer3Plus](#) 进入了设计引物的主页面。

Load server settings: apick Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.

Task: generic

Main | General Settings | **Advanced Settings** | Internal Oligo | Penalty Weights

Advanced Sequence

Sequence Id:

Paste template sequence below Or upload sequence file:

粘贴需要设计引物的序列

Mark selected region: <-> [] Clear

Excluded Regions: < > 排出的区域

Targets: [] 目的扩增区域

Included Region: () 包含的区域

2、在 General Settings 中，依照引物设计原则，设置产物长度 ($\leq 400\text{bp}$ ，最好 100-150bp)、GC% (最好为 45%—55%)、引物长度 (最好为 22-24bp)、TM 值 ($58-60^\circ\text{C}$ ，最好 60°C)。

3、点击右上角绿色按钮 **Pick Primers**，可获得若干对引物，并按照 5'到 3'的顺序，包含了引物和产物的一些基本参数。此时，应尽量选择 G、C 结尾的引物进行合成。

Label	Primer Sequence	Start	Length (bp)	Tm	GC %	Any	End	IB	HP	3' Stab	Penalty
上游引物	Left Primer 1: AACAGCATAGAGATTGTG GAGG	644	23	60.1	47.8	0.0	0.0	7.0	0.0	4.3	0.118
下游引物	Right Primer 1: CTTTCATCAGCATTGAGG GGTA	749	23	60.4	47.8	0.0	0.0	9.0	36.9	3.2	0.371
Pair	Product Size: 106 bp					0.0	0.0	15.0			0.489

生成的 5 对引物按照 Penalty 从小到大排序小

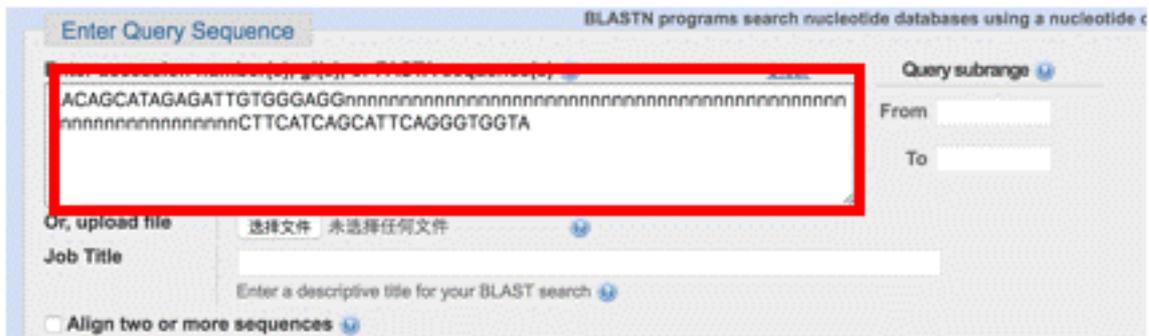
4、设计好引物后，仍需用 NCBI blast 引物验证，点击 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 可出现以下界面。

Basic BLAST

Choose a BLAST program to run:

nucleotide blast	Search a nucleotide database using a nucleotide query <i>Algorithms:</i> blastn, megablast, discontinuous megablast
protein blast	Search protein database using a protein query <i>Algorithms:</i> blastp, psi-blast, phi-blast, delta-blast
blastx	Search protein database using a translated nucleotide query
tblastn	Search translated nucleotide database using a protein query
tblastx	Search translated nucleotide database using a translated nucleotide query

5、点击 Basic BLAST 中的 nucleotide blast 选项，在下面框中，按照 5'—3'顺序，分别输入上游引物和下游引物，上下游引物之间间隔 20 个以上 n。



6、选择物种数据库，如 Human，Mouse 或者 Others（如果是非人和非小鼠物种）。

Choose Search Set

Database

Human genomic + transcript Mouse genomic + transcript Others (nr etc.);

Organism
Optional

Enter organism name or id—completions will be suggested Exclude +

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown

Exclude
Optional

Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences

Limit to
Optional

Sequences from type material

Entrez Query
Optional

Enter an Entrez query to limit search

[You Tube](#) [Create custom database](#)

7、选择 Somewhat similar sequences(blastn)

Program Selection

Optimize for

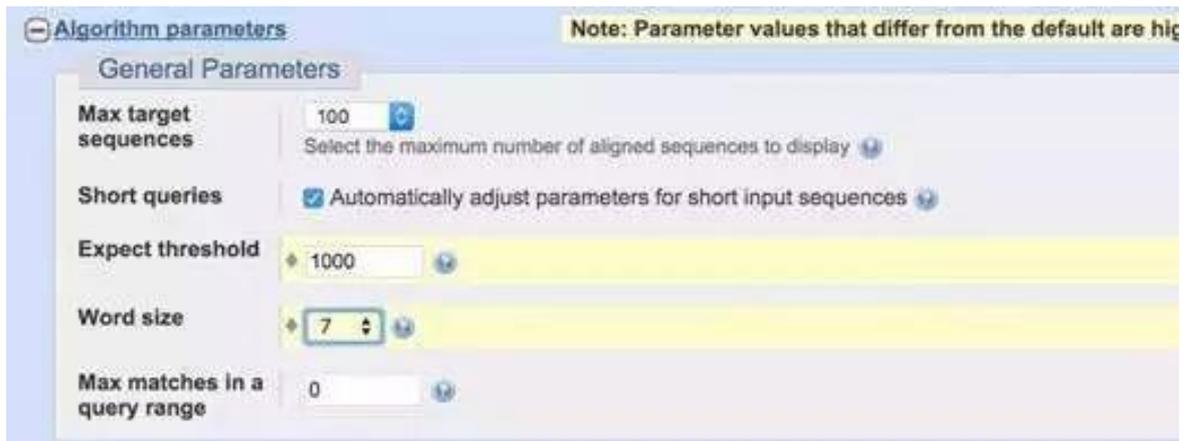
Highly similar sequences (megablast)

More dissimilar sequences (discontiguous megablast)

Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm

8、点击 Algorithm parameters, 在 Expect threshold 输入 1000, 在 Word Size (读长) 输入 7, 便可按照 7 个一组核苷酸序列放到 GeneBank 中进行比对。



9、点击 BLAST 进行比对得出结果。颜色代表得分，选择引物的原则是：列表中大部分是目的基因，说明引物特异性高；但是可能物种不同，说明该基因在不同物种中保守。

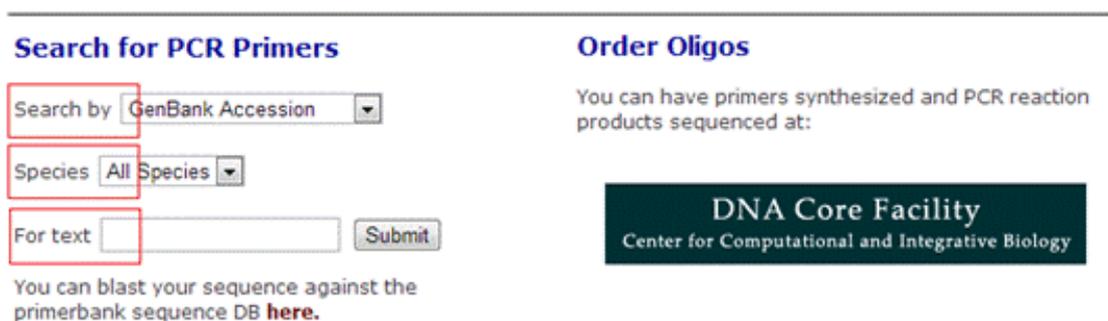


No.3 Primerbank

该数据库是哈佛大学的一个 qPCR 引物数据库，目前有超过 20 万条引物，涵盖了人和小鼠大部分已知的基因，且其引物有效率为 82.7%。

1、点击该网址：<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>，进入搜索界面。搜索类型这里，可以根据 GenBank accession、NCBI protein accession、NCBI gene ID、primerbank ID、NCBI gene symbol 以及 keyword 六个选项进行搜索。

Primer Search



Search for PCR Primers

Search by

Species

For text

You can blast your sequence against the primerbank sequence DB [here](#).

Order Oligos

You can have primers synthesized and PCR reaction products sequenced at:

DNA Core Facility
Center for Computational and Integrative Biology

Primer Search



Search for PCR Primers

Search by

Species

For text

You can ~~blast your sequence against the~~ primerbank sequence DB [here](#).

Order Oligos

You can have primers synthesized and PCR reaction products sequenced at:

DNA Core Facility
Center for Computational and Integrative Biology

2、以小鼠的 beta-actin 为例。首先到 NCBI 上找出 β -actin 的 gene ID，如图，选择 gene，输入 beta-actin，并点击 Results by taxon 中的 Mus musculus，可得到以下结果。

Gene Search

Did you mean beta-actin as a gene symbol?
Search Gene for beta-actin as a symbol.

Search results
Items: 1 to 20 of 258
See also 229 discontinued or replaced items.

Filters: [Manage Filters](#)

Results by taxon

Top Organisms: [Tree](#)

- Homo sapiens (49)
- Rattus norvegicus (22)
- Mus musculus (21)**
- Ran troglodytes (7)
- Gallus gallus (6)
- All other taxa (153)

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
<input type="checkbox"/> Actb ID: 11461	actin, beta [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Chromosome 5, NC_000071.6 (142903115..142906754, complement)	Actx, E430023M04Rik, beta-actin

小鼠 beta-actin 的 NCBI gene ID 是 11461，而 actb 则是小鼠 beta-actin 的 NCBI gene symbol。

3、将 Gene ID:11461 输入到 primerbank 点击 submit，可得到以下结果。

Primer Search

Search for PCR Primers

Search by:

Species:

For text:

You can blast your sequence against the primerbank sequence DB [here](#).

Order Oligos

You can have primers synthesized and PCR reaction products sequenced at:

DNA Core Facility
Center for Computational and Integrative Biology

PrimerBank

The following matches are found for NCBI Gene ID (Mouse): "11461"

Gene Descriptions:

NCBI GeneID	11461
GenBank Accession	NM_007393
NCBI Protein Accession	NP_031419
Species	Mouse
Coding DNA Length	1128
Gene Description	Mus musculus actin, beta (Actb), mRNA.

Primer Pair 1 (Click here for cDNA and amplicon sequence):

PrimerBank ID 145966868c1

Amplicon Size 245

	Sequence (5' → 3')	Length	Tm	Location
Forward Primer	GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	22	60.3	854-875
Reverse Primer	GCCGGACTCATCGTACTCC	19	61.6	1098-1080

4、往下拉动滚动条，还可看到经过验证的引物，点击 Validation Results，即可看到溶解曲线、电泳结果等信息。

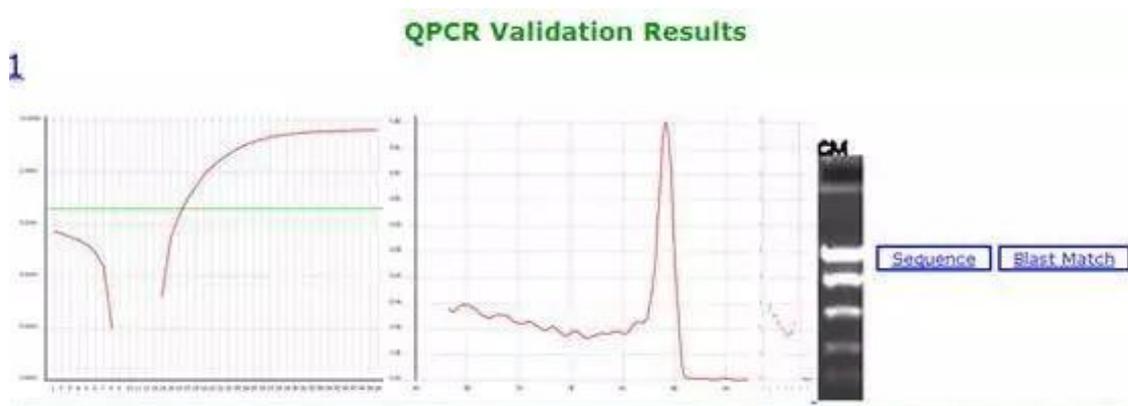
Primer Pair 2 (Click here for cDNA and amplicon sequence):

Validation Results

PrimerBank ID 6671509a1

Amplicon Size 154

	Sequence (5' → 3')	Length	Tm	Location
Forward Primer	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	20	61.8	84-103
Reverse Primer	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	22	61.1	237-216



PCR 操作中必知的 6 大细节

引物设计好后，想必很多小伙伴们都在摩拳擦掌，准备正式开始 PCR 实验了。然而，细节决定成败，为了获取好的实验结果，这些隐藏的细节你不可不知。

1、最好使用一次性进口 tip 头，以避免液体残留；同时，tip 头不要长时间暴露于空气中，避免气溶胶的污染。

2、加样时，tip 头要伸入 PCR 反应管的液面下一点，然后将液体缓缓打入液面下，至恰好打出一个气泡为至；加样过程最好在冰块上操作；移液枪用完之后要归到最大计量的位置，防止久而久之弹簧失去弹性，而导致加样量的不准确。

3、配制反应体系时，若反应物为冻结制品，需在融解后上下颠倒轻轻均匀混合；加入试剂之前，把它混匀一下，以免放置时间长了浓度不均；按照液体体积由大到小的顺序将反应物加入到 PCR 管中；引物和模板和体系所加的比例要合适，模板过量反而会抑制体系的反应。

4、操作多份样品时，可先制备反应混合液，即将 dNTP、缓冲液、引物和酶混合好后分装，这样即可避免污染，又可增加反应的精确度。

5、避免反应液飞溅,打开反应管时为避免此种情况,开盖前稍离心；PCR 产物的电泳检测时间一般为 48h 以内，有些最好于当日电泳检测，大于 48h 后带型不规则甚至消失。

6、如凝胶分析扩增产物只有一条带，不需要用凝胶纯化。如可见其他杂带，可能是积累了大量引物的二聚体。少量的引物二聚体的摩尔数也很高，这会产生高比例的带有引物二聚体的克隆，而非目的插入片段。为此需在克隆前做凝胶纯化。

构建载体一点也不难

作者：阳光

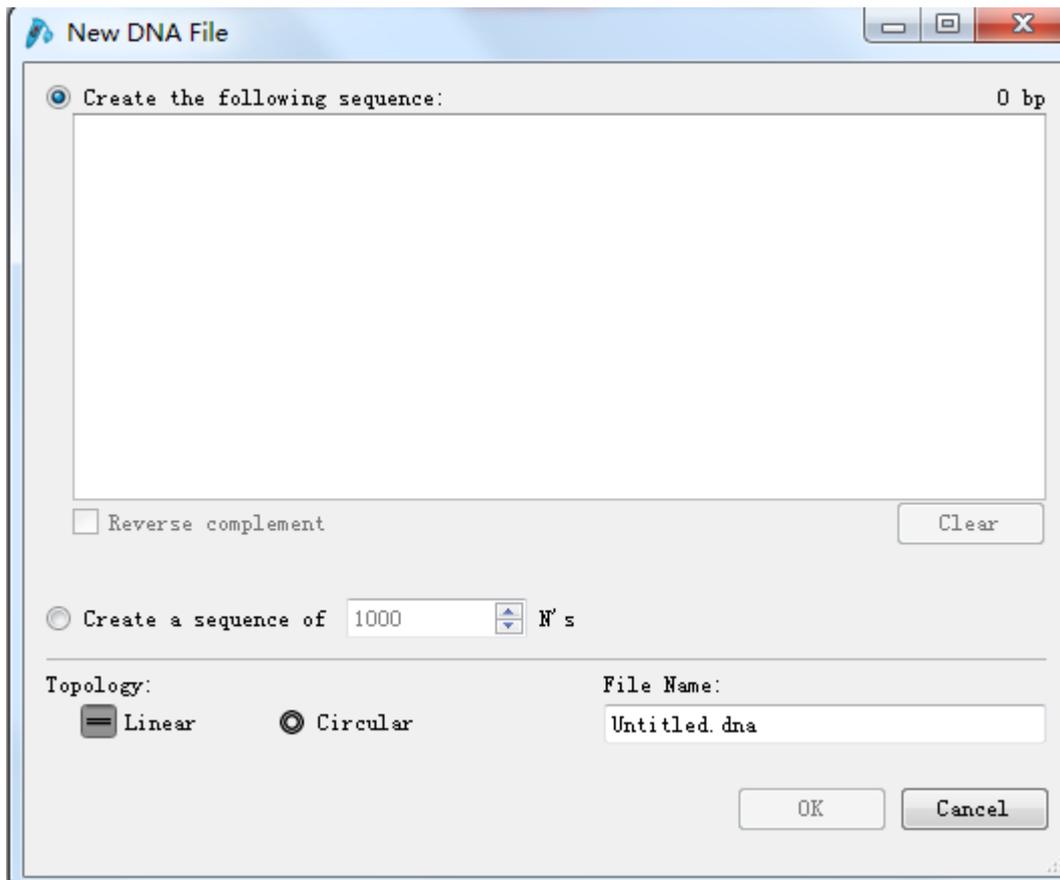
作为一名生物汪，我们在研究基因的功能时，逃脱不掉的就是我们为了我们的实验目的，可能需要构建各种载体，比如表达载体，克隆载体，基因打靶载体等等。很多人在构建载体的时候都感觉很困难，特别是对于一个刚进入实验室的新人来说那更是难上加难，完全摸不着头脑。

那是因为其实构建载体是一个不小的工作量，需要经历很多的过程，比如首先我们需要设计引物引入酶切位点，接下来还需要经历酶切酶连等过程，只要其中的某一环节出现问题，那最终都会导致实验失败。

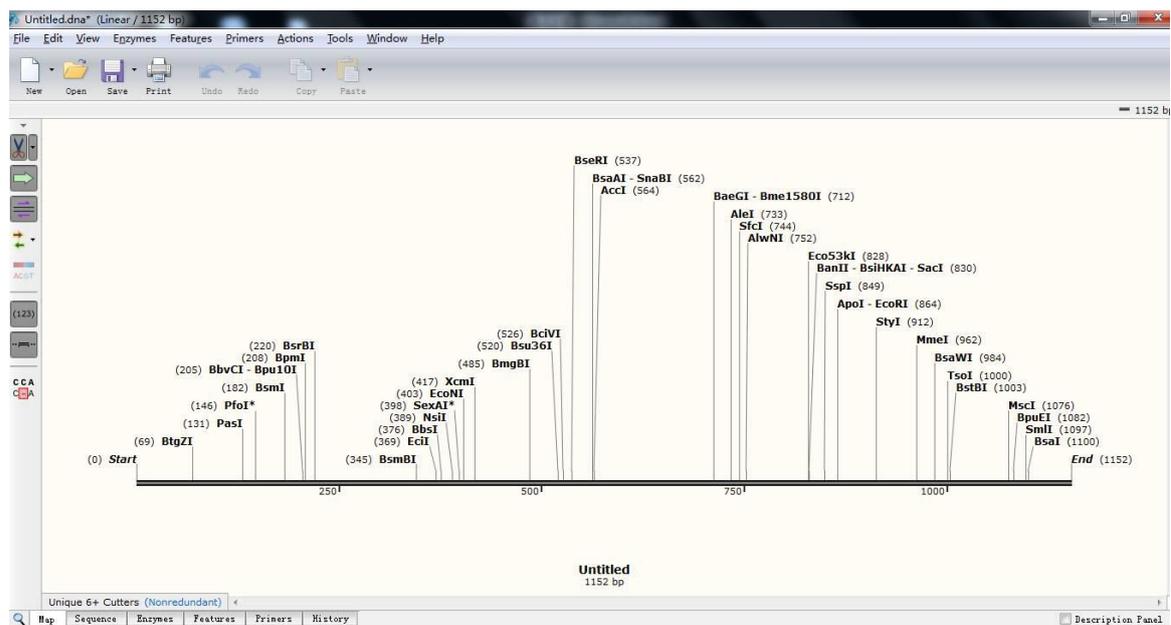
我认为构建载体最关键的一步就是设计引物引入酶切位点，一旦引物设计好，那接下来就非常简单了，今天重点就来教教大家如何利用 **snappgene** 轻松获得构建载体所需的引物序列。

1. 打开软件，选择第一个（红线标记），然后输入基因的 CCDS 序列（基因的 CCDS 序列可在 NCBI 数据库中获得）

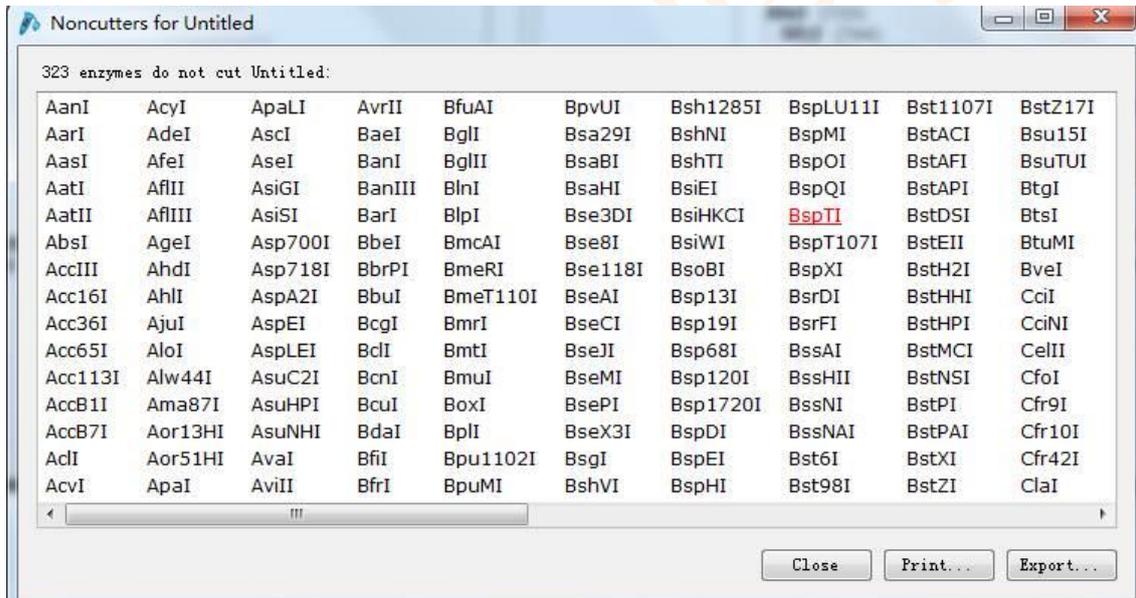
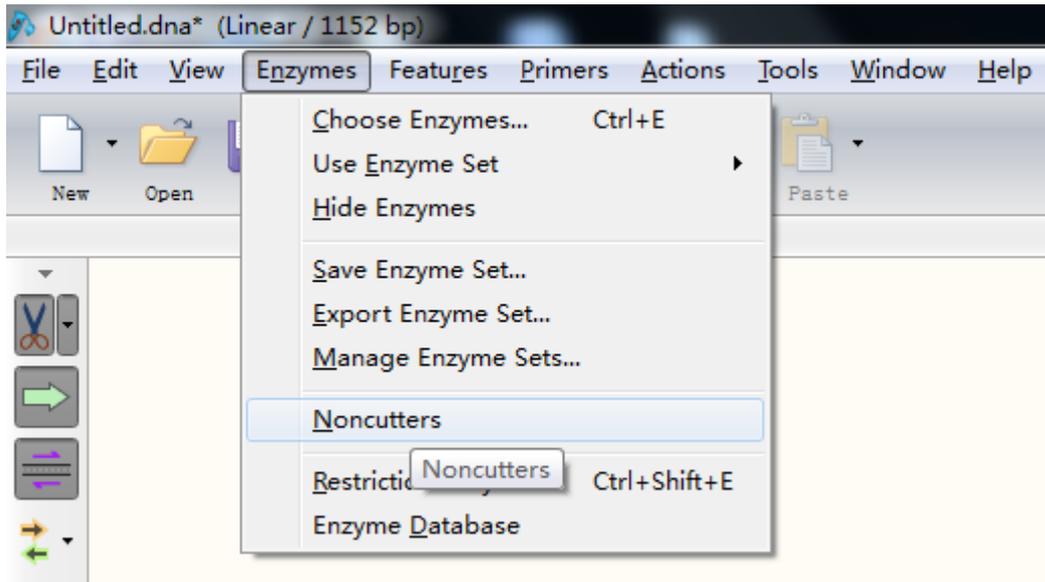




2. 点击 ok 后界面如下，图中显示的是会切割基因编码序列的酶



3. 接下来点击最上面的 **Enzymes Noncutters**，会显示所有不会切割基因编码序列的酶，这些酶都是我们可以用的，选酶的标准：要选择不能切割目的基因序列并且质粒上含有的酶，还有就是最好是实验室有的酶。



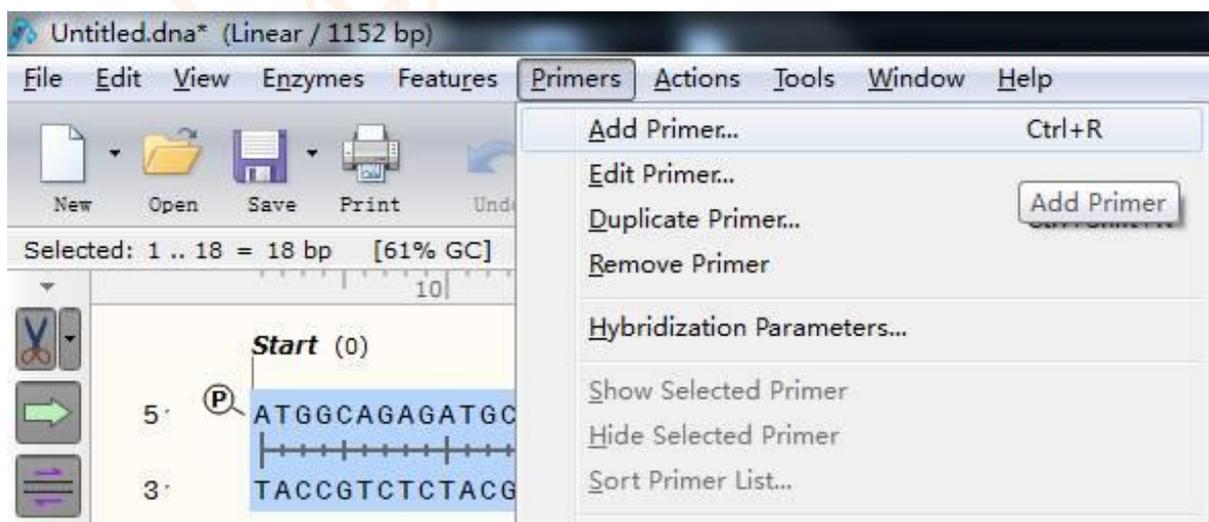
4. 确定了可以用的酶后，接下来需要确定设计引物时用的这两种酶，确定方法：这两种酶最好不要邻近，最好使用双酶切有共同 buffer 的酶,两个酶切位点最好不要是同尾酶（切下来的残基不要互补），否则效果相当于单酶切。

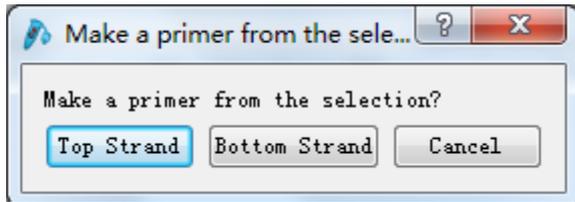
5. 确定了所要用的酶之后，接下来需要做的就是设计引物并引入酶切位点（注意：一定要看清楚载体上 promoter 的方向，将 CDS 正向插入到 promoter 后面）

6. 点击左下角的 sequence，然后拉取上游一部分基因本身的序列，拉取的时候会显示拉取的碱基的个数以及 Tm 值，拉取到 Tm 值 55 度左右就可以（55 度以上最好）

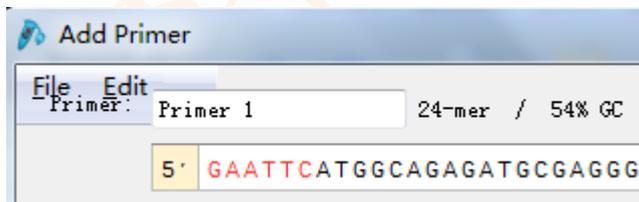
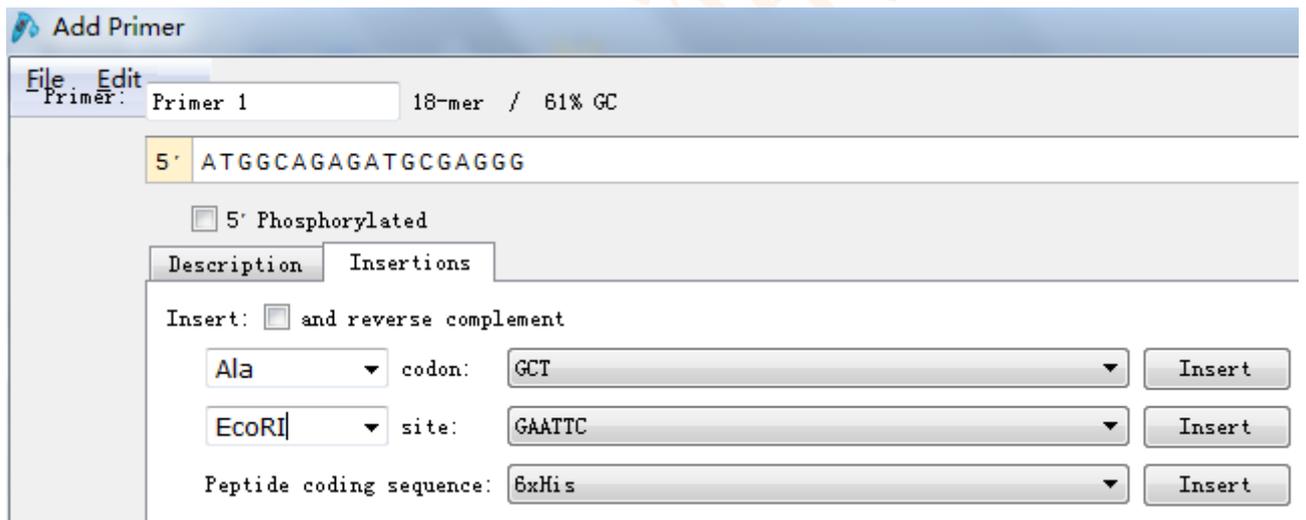


7. 然后点击 primer——add primer，选择 top strand





8. 点击 insertions, 在 site 位置处选择你准备引入的酶, 比如我要引入 EcoR I, 那我就选择它, 然后点击 insert, 这样我们就引入了该酶的酶切位点。



9. 接下来需要添加保护碱基, 我一般所有的酶的保护碱基都加三个, 加哪个碱基没有要求,

使 GC 含量及 Tm 值适中即可。



10. 这样上游引物就设计好了，接下来需要检测一下引物是否会形成发卡结构，可以应用 OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>)，如果发现会形成发卡结构，那就需要对引物序列做出一些调整，直到发卡结构消失。

11. 接下来拉取基因的下游的一部分序列，用同样的方法设计好下游引物，有一点需要注意的是，设计下游引物的时候选择 **bottom strand**。

这样构建载体所需的引物就设计好了，怎么样，是不是感觉其实也没有那么难，接下来就可以构建属于你自己的载体了。

Real-Time PCR 引物设计案例实操版，谁看谁会！

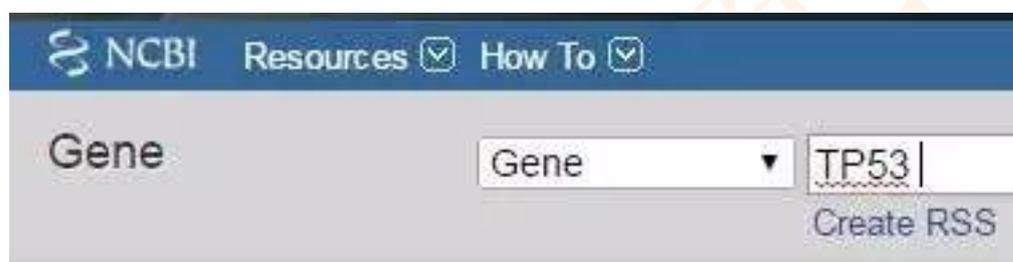
作者：阳光

引物设计道理听了很多，依然做不好一个引物设计？你需要的是实战演习！废话不多说，案

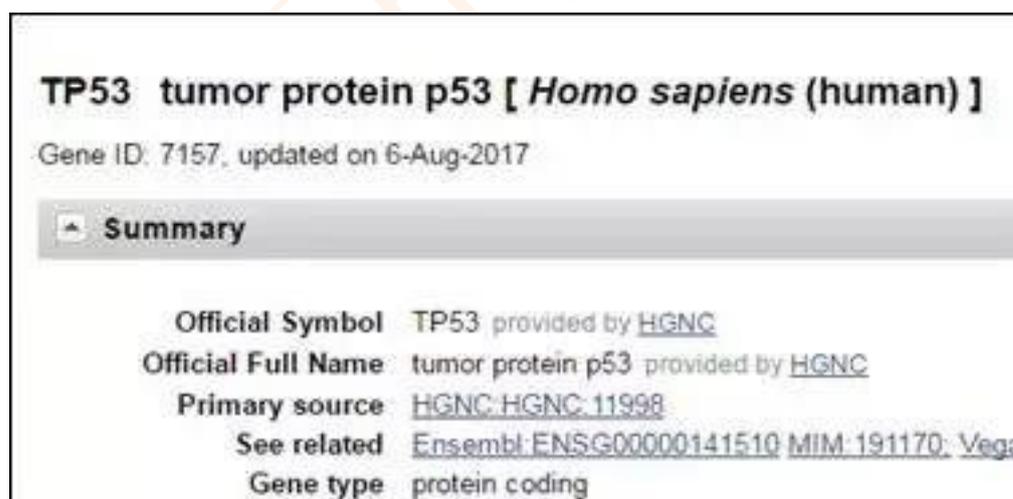
例搬上来:

引物设计具体操作，以设计 TP53 引物为例

1) 首先在 NCBI 中输入基因



2) 点击进入



3) 找到该基因的 mRNA 序列

mRNA and Protein(s)

1. [NM_000546.5](#) → [NP_000537.3](#) cellular tumor antigen p53 isoform a
[See identical proteins and their annotated locations for NP_000537.3](#)

Status: REVIEWED

Description	Transcript Variant: This variant (1) can initiate transcript variant (a, also known as p53alpha) results from transcript isoform a, which is the longest isoform.
Source sequence(s)	AK223026 , DA463049 , DQ186650 , X02469
Consensus CDS	CCDS11118.1

4) 点击进入，在右边可看到 Pick Primer

Homo sapiens tumor protein p53 (TP53), transcript variant 1, mRNA

NCBI Reference Sequence: [NM_000546.5](#)

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#) ☺

LOCUS [NM_000546](#) 2591 bp mRNA linear FRI 18-JUN-2017

DEFINITION Homo sapiens tumor protein p53 (TP53), transcript variant 1, mRNA

ACCESSION [NM_000546](#)

VERSION [NM_000546.5](#)

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE Homo sapiens (human)

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

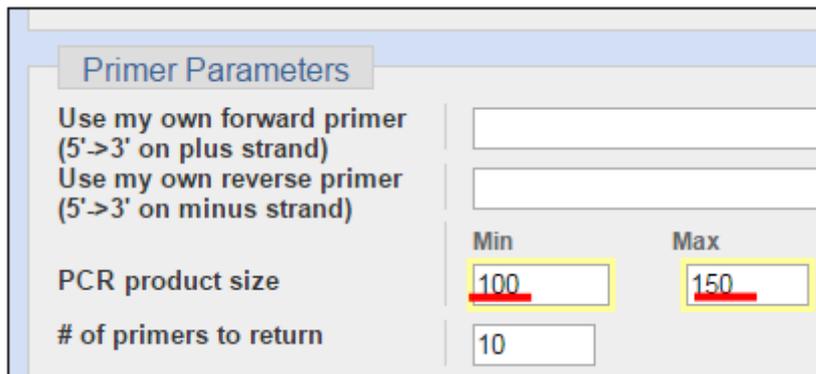
Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

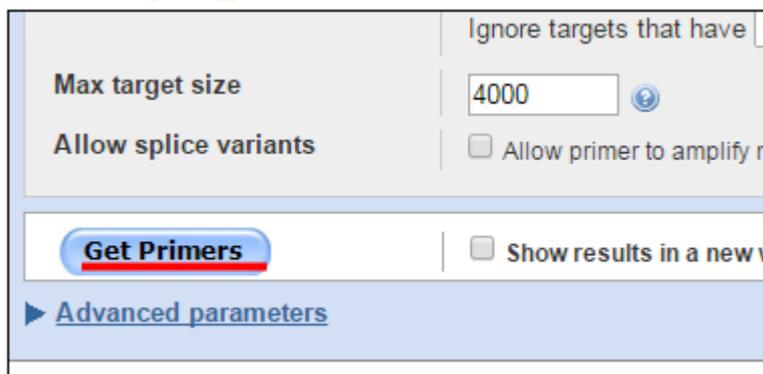
5) 点击 Pick Primer，进入引物设计界面，系统自动把该基因的序列输入到了里面，也可以把你任何想要设计引物的序列输入到对应的框中，设计针对该序列的引物



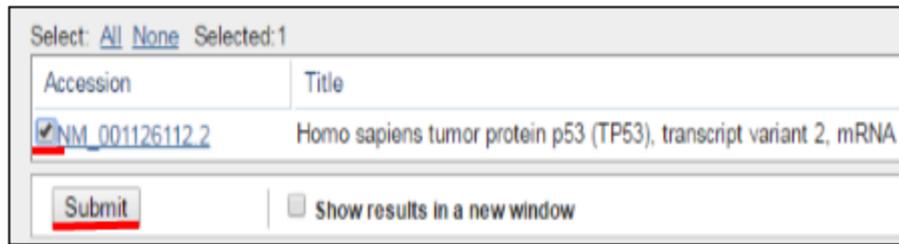
6) 将扩增产物大小设置为 100-150



7) 点击下方的 Get Primer



8) 选择并提交

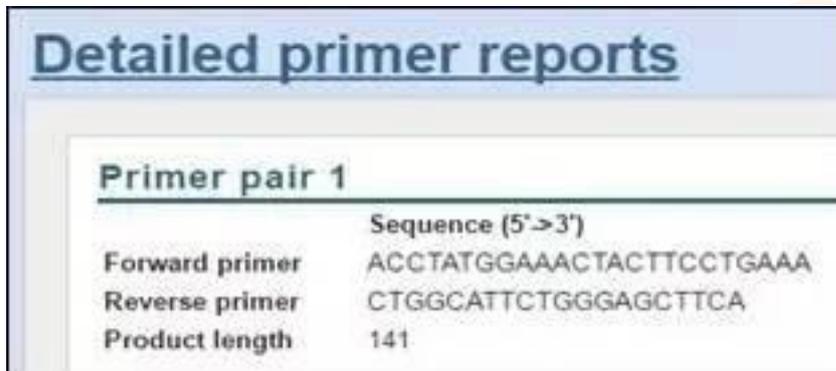


Select: [All](#) [None](#) Selected: 1

Accession	Title
<input checked="" type="checkbox"/> NM_001126112.2	Homo sapiens tumor protein p53 (TP53), transcript variant 2, mRNA

Show results in a new window

9) 提交后即可得到引物序列



Detailed primer reports

Primer pair 1	
	Sequence (5'→3')
Forward primer	ACCTATGGAAACTACTTCCTGAAA
Reverse primer	CTGGCATTCTGGGAGCTTCA
Product length	141

10) 根据引物设计的原则筛选合适的引物

引物设计原则

- 1) 扩增产物长度 100 bp-150 bp 为佳;
- 2) 引物长度 17 bp-25 bp 最好;
- 3) 正向引物和反向引物的 T_m 值最好相差不要超过 1°C 。 T_m 值调整至 60°C - 65°C 为佳;
- 4) 引物的 GC 含量控制在 40%-60% 之间, 最佳为 45%-55%;

- 5) 引物 3'末端碱基最好为 G 或 C 或 A，避免使用 T；
- 6) 避开引物内部或者两条引物之间有 3 个碱基以上的互补序列，二条引物之间的 3'端避开有 2 个碱基以上的互补序列；
- 7) 引物 A、G、C、T 整体分布尽量要均匀，避免使用 GC 或者 TA 含量高的区域，尤其是 3'端，必须避开 GC 含量不均匀的区域；
- 8) 最好跨内含子设计引物。

基因研究不知道转录本，做什么引物设计？！

作者：阳光

我们平常通过数据库查找某个基因的相关信息时，会发现该基因有多个转录本。为什么一个基因可以有多个转录本呢？转录本能干什么？

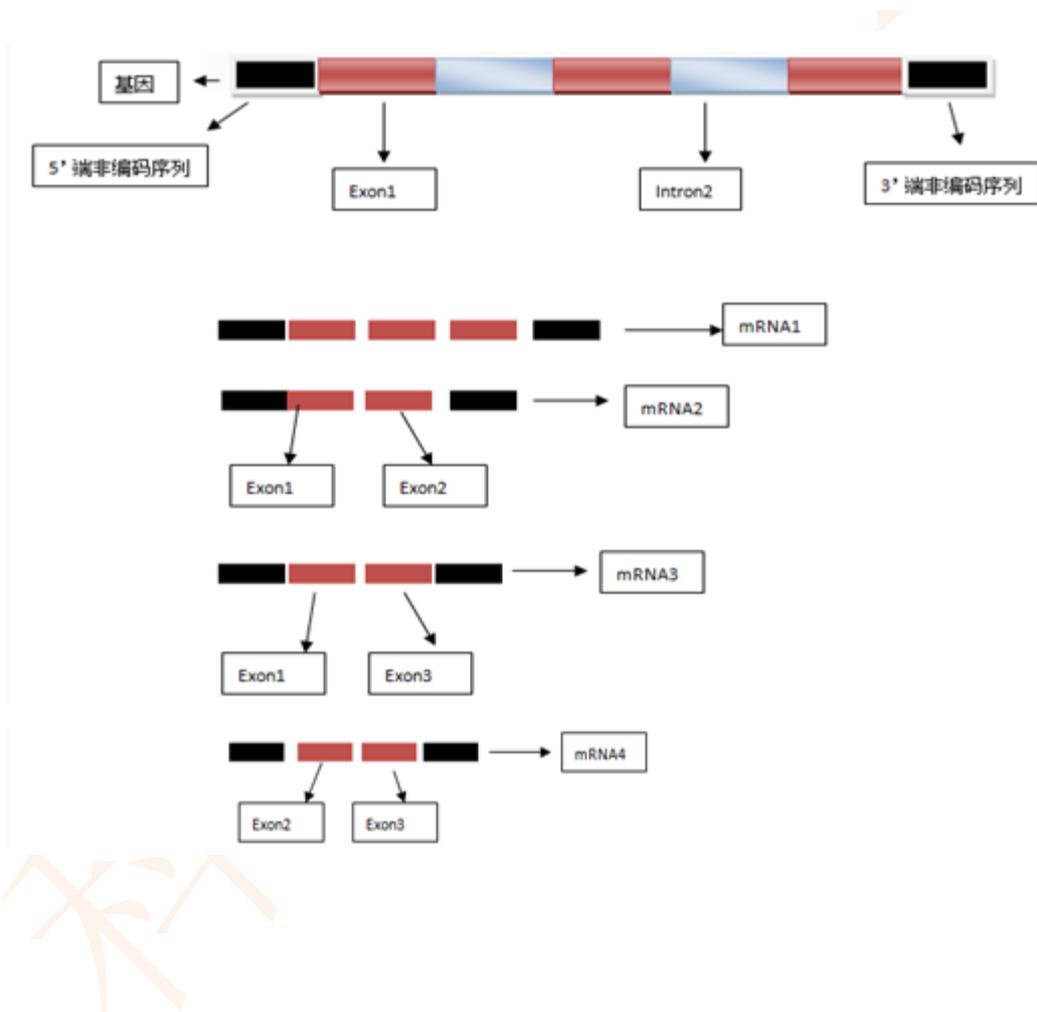
转录本其实就是基因通过转录形成的一种或多种可供编码蛋白质的成熟的 mRNA。

一个基因有可能有多个转录本，原因是由于不同的剪接方式造成的。我们都知道，基因转录之后，首先是形成前体 mRNA，通过剪切内含子连接外显子，5'端加帽及 3'端加尾之后形成成熟的 mRNA。

但是在剪切的过程中可能会剪切掉外显子，也有可能保留部分内含子，这样就形成了多种 mRNA 即多个转录本。

举个例子：这是一个

三个外显子两个内含子的基因结构图



该图通过不同的剪接方式得到了四种 mRNA 即四种转录本（我只是列出了部分可能性），实际中可能该基因只具有其中的一种或两种转录本，也有可能都具有。

我们需要特别注意的是大多数基因有多个转录本，而且有可能每个转录本都会编码产生相应的蛋白，这样就有可能造成一个基因有多种功能。

我们平常研究某个基因时（该基因有多个转录本），其实我们研究的是它的其中一个转录本所编码的蛋白的功能。虽然该基因有多个转录本，而且每个转录本都编码蛋白，但是一般情况下它的不同的转录本分布在不同类型的细胞中，当然也有可能多种转录本同时存在于某一细胞中。

那我们研究该基因时应该怎么做呢？

首先，我们需要确定我们应该研究该基因的哪个转录本。

因为我们平常研究某个基因的功能的时候，是因为该基因在某一特定的组织和细胞中表达，它在这些组织和细胞中具有特定的功能，所以我们只需要确定该基因的哪个转录本在这些组织和细胞中表达即可。

确定的方法当然就是设计每种转录本特异性引物，然后通过 RT-PCR 就可知道哪种转录本在组织和细胞中特异性表达。那这个转录本就是我们接下来要研究的。

之所以要确定我们应该研究哪个转录本，那是因为它关系到引物的设计以及蛋白分子量的计算。

当我们研究某个基因的功能时，通常会抽提总的 RNA，然后反转录得到 cDNA，然后将 cDNA 连接到表达载体中转化到原核或真核细胞中进行表达，然后进行接下来的研究。

通过反转录获得 cDNA 时，引物的设计就是根据转录本设计的。而且之后我们会将表达的蛋白跑电泳后进行分析，那蛋白的大小是如何计算的呢，当然也是通过该转录本编码的蛋白的氨基酸序列计算的啊。

工具 | 手把手教你用 Primer-Blast 设计和验证引物，五星推荐！

作者：老谈

今天老谈给大家推荐 NCBI 的一款在线工具 Primer-BLAST，用于 PCR 的特异性引物设计和特异性检验。

推荐的指数：5 颗星。

理由：操作简单，使用方便，不需要安装程序，而且和 NCBI 数据库已比对，不用担心特异性问题。

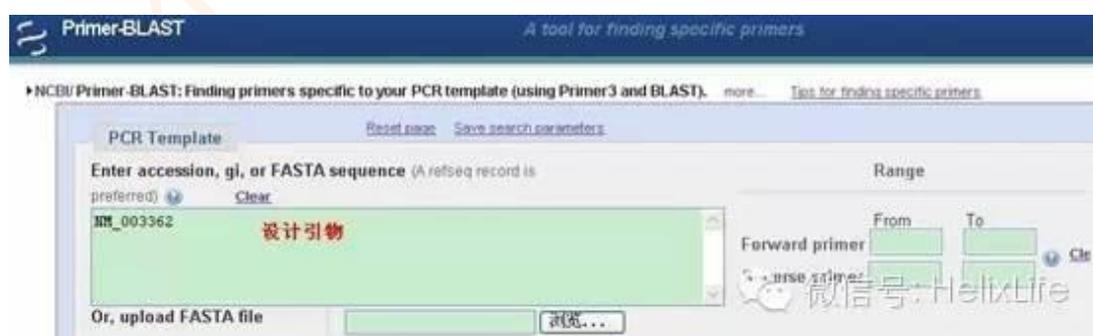
Primer-BLAST 可以直接从 Blast 主页 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 找到，或是直接用下面的链接进入：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>，这个工具整合了目前流行的 Primer3 软件，再加上 NCBI 的 Blast 进行引物特异性的验证。Primer-BLAST 免除了用另一个站点或工具设计引物的步骤，设计好的引物程序直接用 Blast 进行引物特异性验证。更强大

的是 Primer-BLAST 能设计出只扩增某一特定剪接变异体基因的引物。Primer-BLAST 有许多改进的功能，比单个的用 Primer3 和 NCBI BLAST 更加准确。

Primer-BLAST 界面包括了 Primer3 和 BLAST 的功能。提交的界面主要包括 4 部分：PCR Template（模板区），Primer Parameters（引物区），Exon/intron selection（外显子内含子设置）和 specificity check（特异性验证区）。

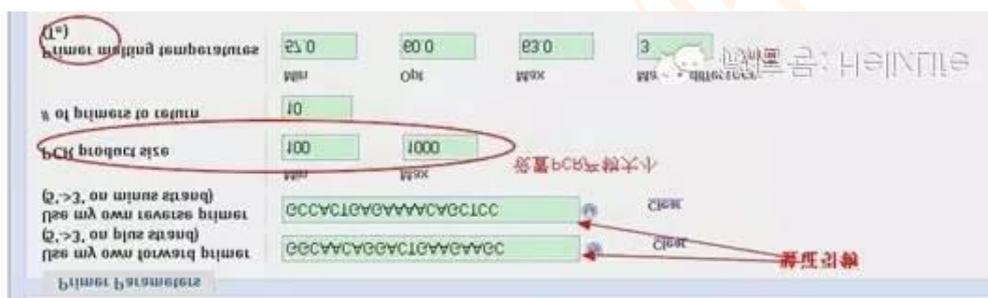
(1) 模板 (Template)

在“PCR Template”下面的文本框,输入目标模板的序列,FASTA 格式或直接用 Accession Number。如果你在这里输入了序列，是用于引物的设计。Primer-BLAST 就会根据你输入的序列设计特异性引物，并且在目标数据库（在 specificity check 区选择）是唯一的。



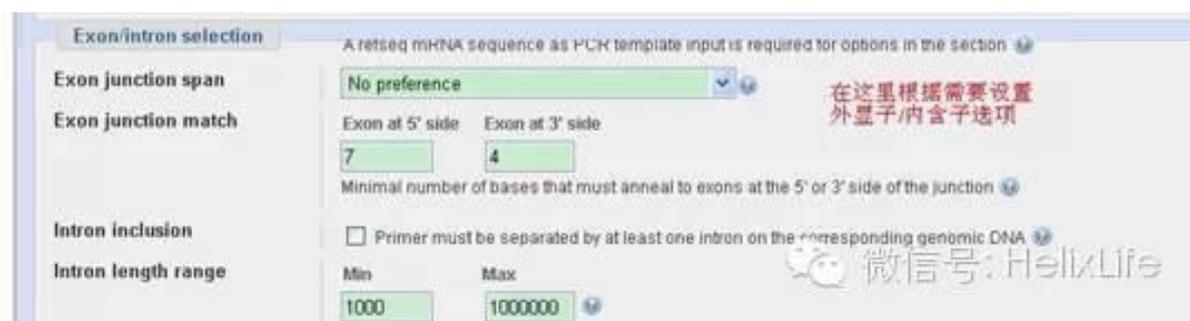
(2) 引物 (Primers)

如果你已经设计好了引物，要拿来验证引物的好坏。可以在 Primer Parameters 区填入你的一条或一对引物。并且选择好验证的目标数据库（在 specificity check 区选择）。根据需要可设置产物的大小， T_m 值等。



(3) 外显子内含子 (Exon/intron)

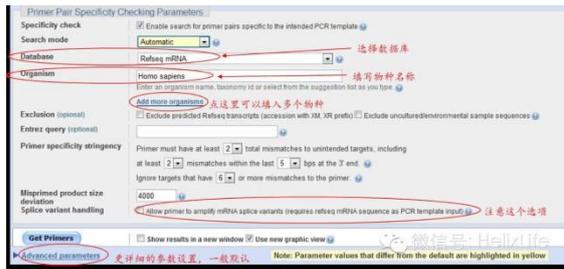
如果你想设计的引物是跨内含子和外显子的交接处，在这里可以设置成 primer must span an exon-exon junction。外显子的匹配碱基数和内含子的长度等设置一般选择默认。



(4) 特异性 (Specificity)

在 specificity check 区, 选择设计引物或验证引物时的目标数据库和物种。这一步是比较重要的。这里提供了 7 种数据库:

RefSeq mRNA, Genome (reference assemblies from selected organisms), RefSeq representative genomes, RefSeq RNA(refseq_rna), nr (the standard non-redundant database), Genome (chromosomes from all organisms)和 custom。前两个数据库是经过专家注释的数据, 这样可以给出更准确的结果。特别是, 当你用 NCBI 的参考序列作为模板和参考序列数据库作为标准来设计引物时, Primer-BLAST 可以设计出只扩增某一特定剪接变异体基因的特异引物。



最后建议用 oligo6 或 primer5 验证引物自身的特性：发夹结构、引物自身二聚体、错配和引物间二聚体， ΔG 的绝对值。

Gene: [PTEN](#), phosphatase and tensin homolog (Homo sapiens)

Accession number: NM_000314

步骤 1: 按下面截图输入 NM_000314.4 和设置 PCR 产物大小 70-300, 其他默认:

► [NCBI Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template \(using Primer3 and BLAST\).](#) [More...](#) [Tips for finding specific primers](#)

[Reset page](#) [Save search parameters](#) [Retrieve recent results](#)

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred)

Range

Forward primer [Clear](#)
 Reverse primer

Or, upload FASTA file 未选择文件

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand) [Clear](#)

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand) [Clear](#)

PCR product size

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m) [Max * difference](#)

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span

Exon junction match

Exon at 5' side Exon at 3' side

Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction

Intron inclusion Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode

Database

Organism
Enter an organism name, taxonomy id or select from the suggestion list as you type

[Add more organisms](#)

Exclusion (optional) Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) Exclude uncultured/environmental sample sequences

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency

Primer must have at least total mismatches to unintended targets, including at least mismatches within the last bps at the 3' end

Ignore targets that have or more mismatches to the primer.

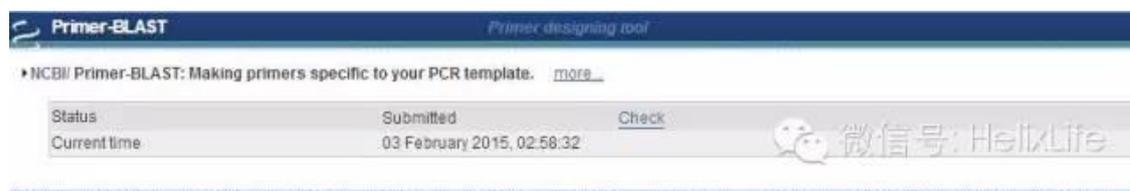
Misprimed product size deviation

Splice variant handling Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

[Get Primers](#) Show results in a new window Use new graphic view

► [Advanced parameters](#) Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

步骤 2: 点击 Get Primers, 跳出以下界面 (界面运行中):

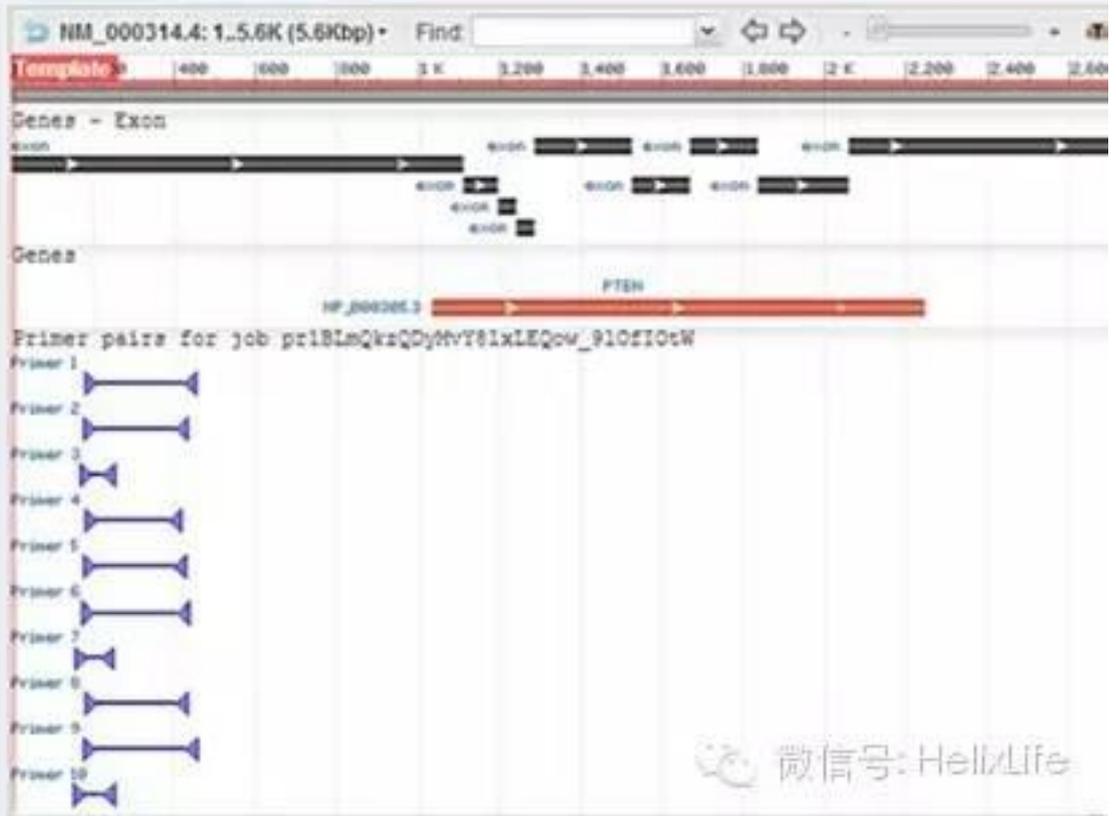


等待一段时间后会出现在以下界面, 有多条引物显示出来, 一般选择 primer pair 1:

• NCBI/Primer-BLAST : results: Job id=pr1BLmQkzQDyMvY8lxLEQow_910f10cW [more...](#)

Input PCR template	NM_000314.4 Homo sapiens phosphatase and tensin homolog (PTEN)
Range	1 - 5572
Specificity of primers	Primer pairs are specific to input template as no other targets were
Other reports	▶ Search Summary

⊖ [Graphical view of primer pairs](#)



Detailed primer reports

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	AGTTCTCTCCTCTCGGAAGC	Plus	20	187	206	58.53	55.00	3.00
Reverse primer	TCCCTTTCAGGAGAAGCCGA	Minus	20	445	426	60.54	55.00	4.00
Product length	259							

Products on intended target

>NM_000314.4 Homo sapiens phosphatase and tensin homolog (PTEN), mRNA

product length = 259
 Forward primer 1 AGTTCTCTCCTCTCGGAAGC 20
 Template 187 206
 Reverse primer 1 TCCCTTTCAGGAGAAGCCGA 20
 Template 445 426

Primer pair 2

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	GCTCAGTTCTCTCCTCTCGGA	Plus	21	183	203	60.68	57.14	3.00
Reverse primer	AAGAGGCTGCACGGTTAGAA	Minus	20	423	404	59.31	50.00	4.00
Product length	241							

Products on intended target

>NM_000314.4 Homo sapiens phosphatase and tensin homolog (PTEN), mRNA

product length = 241
 Forward primer 1 GCTCAGTTCTCTCCTCTCGGA 21
 Template 183 203
 Reverse primer 1 AAGAGGCTGCACGGTTAGAA 20
 Template 423 404

微信号: HelixLife

Primer pair 3

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCGACTGCGCTCAGTTCTCT	Plus	20	175	194	62.81	50.00	0.00	2.00
Reverse primer	CACAGCGGCTCAACTCTCAA	Minus	20	244	225	60.00	55.00	0.00	0.00
Product length	70								

Products on intended target

>NM_000314.4 Homo sapiens phosphatase and tensin homolog (PTEN), mRNA

product length = 70
 Forward primer 1 GCGACTGCGCTCAGTTCTCT 20
 Template 175 194
 Reverse primer 1 CACAGCGGCTCAACTCTCAA 20
 Template 244 225

Primer pair 4

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TCAGTTCTCTCCTCTCGGAAGC	Plus	22	185	206	61.20	54.55	3.00	2.00
Reverse primer	GAAAGAGGAGGAGGAGGCGCA	Minus	21	408	389	60.07	52.38	2.00	0.00
Product length	222								

Products on intended target

>NM_000314.4 Homo sapiens phosphatase and tensin homolog (PTEN), mRNA

product length = 222
 Forward primer 1 TCAGTTCTCTCCTCTCGGAAGC 22
 Template 185 206
 Reverse primer 1 GAAAGAGGAGGAGGAGGCGCA 21
 Template 408 389

微信号: HelixLife

Tips:

1. 在任何时候都要优先使用参考序列的 Gi 号或 Accession 号 (尽量不要 Fasta 格式的序列)。

另外, 确保你的序列是最新版本的 (在填 Accession Number 时后面不加版本号就会自动拿最

新的序列)

2. 就算你对整个序列的某部分感兴趣 (如某条染色体上的某个区域), 你也应该优化使用 Gi 号或 Accession 号。因为用 Gi 号或 Accession 号, NCBI 会自动读取该序列的一些注释数据, 对引物的设计更加有利。

3. 尽量使用没有冗余的数据库 (eg: refseq_rna 或 genome database), nr 数据库包括了太多的冗余的序列, 会干扰引物的设计。

4. 请指定一个或几个 PCR 扩增的目标物种。如果不指定在所有的物种搜索, 将会使程序变得很慢, 引物的结果也会受其它不相关的物种影响。

告别菜鸟——设计 PCR 引物“一招鲜”

作者: 老谈

1、首先花 1 分钟在 NCBI 上找到基因的转录本序列。

如果遇到多转录本, 可先用 DNA STAR 的 MegAlign 来进行比对, 仅选取重合部分, 这样就能扩增出所有转录本了。同时注意, 仅选取 3' 末端序列, 由于 Oligo dT 是从 PolyA 开始反转录的, 所以如果片段较长的话, 反转录酶可能无法把 5' 端序列全部给反转成 cDNA。

NCBI Resources How To

NCBI National Center for Biotechnology Information

- NCBI Home
- Resource List (A-Z)
- All Resources
- Chemicals & Bioassays
- Data & Software
- DNA & RNA
- Domains & Structures
- Genes & Expression
- Genetics & Medicine

Gene

- Recent
- All Databases
- All
- All Databases
- Assembly
- BioProject
- BioSample
- BioSystems
- Books
- ClinVar
- Clone
- Conserved Domains
- dbGaP
- dbVar
- Epigenomics
- EST
- Gene

搜索过程: 1、NCBI 2、Gene选项

mRNA and Protein(s)

[NM_001110556.1](#) → [NP_001104026.1](#) filamin-A isoform 2

[See proteins identical to NP_001104026.1](#)

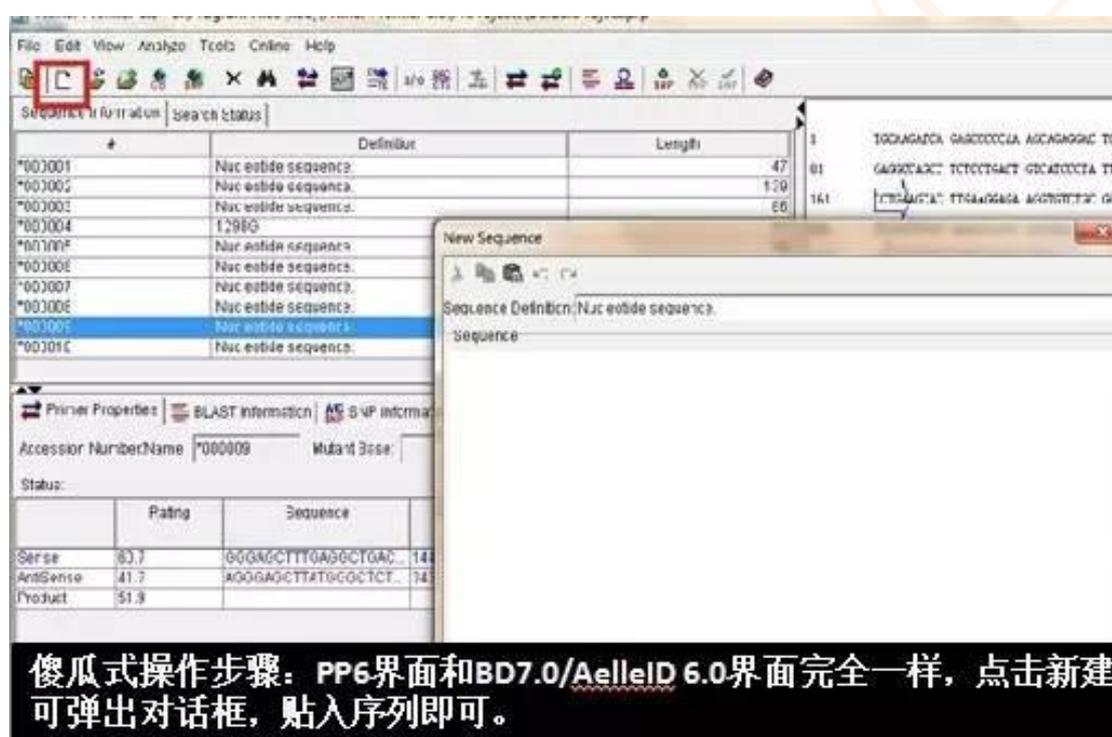
Status: REVIEWED

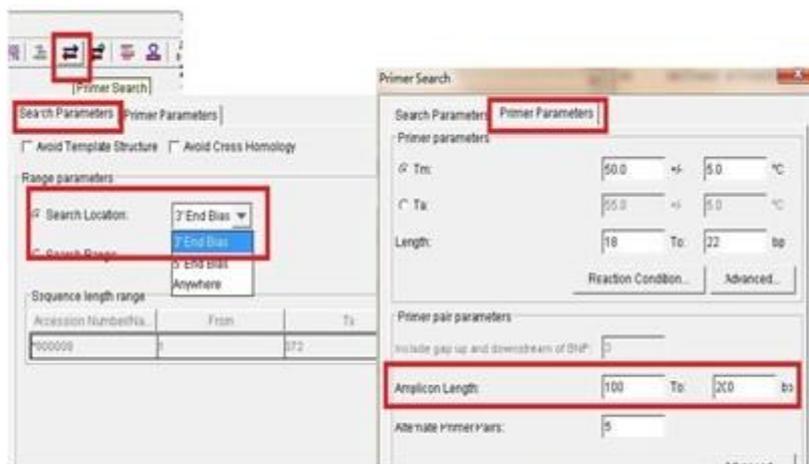
Description	Transcript Variant: This variant (2) includ
Source sequence(s)	AB191260 , BC067111 , EP235228 , X534
Consensus CDS	CCDS48194.1
UniProtKB/Swiss-Prot	F21333
UniProtKB/TrEMBL	Q60FE5
UniProtKB/TrEMBL	Q6NXF2
Related	ENSPC0000358866 , OTTHUMP000000

搜索过程: 3、找到基因 4、找出NM号链接 5、点开序列

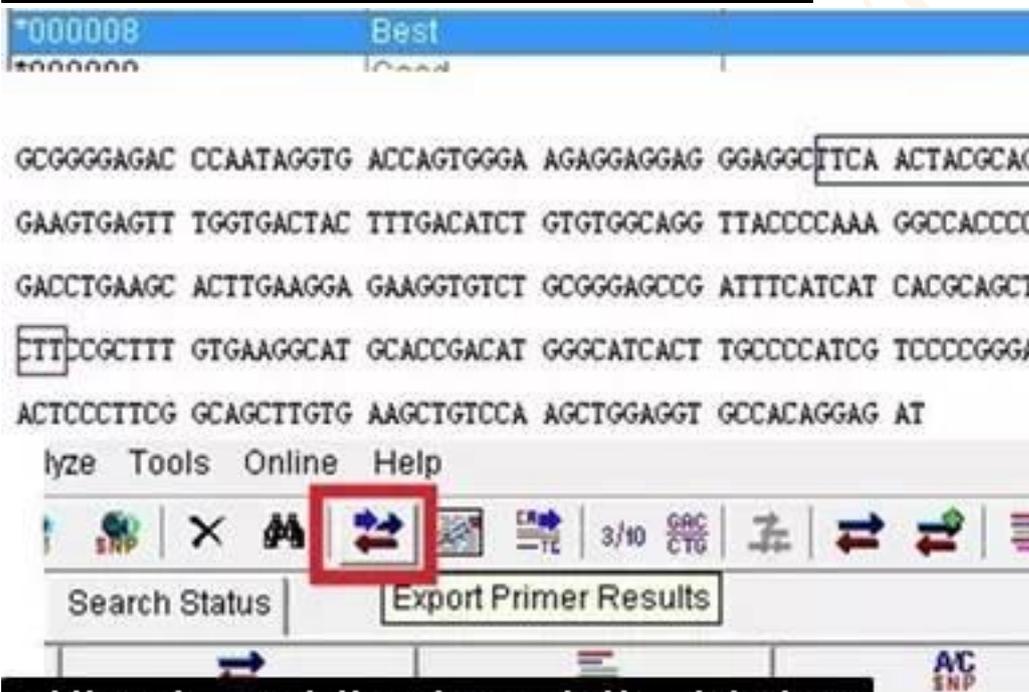
2、PP6 和 AelleID6.0/BD 7.0 引物设计软件

抛弃 PP5 软件这种老古董吧，且 PP5 不能兼容 Win7 的系统。现在推荐两款软件，都是超赞的，PP6 和 AelleID6.0/BD 7.0，基本上是傻瓜贴心型的操作界面。只要会输入序列，就能找到引物了，对引物会有具体的评分，Best、Good、Poor、Not Found，选取 Best 导出即可，如果是 Poor 或者 Not Found，就调整一下参数如 Tm 值或引物长度，一般来说都是没问题的。还有就需要调整一下扩增片段长度，qPCR 的扩增产物尽量不超过 200bp。这三款软件均有破解版，且可以设计 Taqman 探针和分子信标哦！





引物搜索，注意调整产物长度，Tm值及搜索范围。



引物导出，可直接导出Excel文件，方便实用

【实验工具专栏】30分钟搞定高端 qPCR 引物，这个假期不再为难实验狗！

作者：翠花

qPCR 引物与普通 PCR 引物的设计虽然在设计原则和方法上大致相同，但还是有些不一样的

地方，严格的 qPCR 引物设计一般要求其中一条引物要跨外显子，最好在 3'端设计引物，产物的长度在 300bp 以内等。小编今天给大家介绍的这个在线软件 Primer3 Plus 和 Oligo Calc，可以满足大家对 qPCR 引物设计日益增高的要求。

第一步：从数据库 Ensembl: <http://asia.ensembl.org/index.html> 中获得基因的 cDNA 序列。

1. 本文以 ApoE 基因为例，输入目的基因



2. 在左侧栏选择 Transcript



Current selection:
< all Species
Only searching Human

Restrict category to:
Gene 1
Transcript 5
Phenotype 4
Protein Family 1

Only searching Human ApoE
11 results match ApoE when restricted to species: Human

APOE (Human Gene)
ENSG00000130203 19:44905754-44909393:1
Apolipoprotein E [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:613]
APOE (Vega gene) is associated with Gene ENSG00000130203
Variation table • Phenotypes • Location • External Refs. • Regulation • Orthologues • Gene tree

APOE-001 (Human Transcript)
ENST00000252486 19:44905754-44909393:1
Apolipoprotein E [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:613]

3. 选择 APOE-001 中的 Transcript 进入，点击左侧 cDNA

Transcript-based displays

- Summary
- Supporting evidence
- Sequence
 - Exons
 - cDNA**
 - Protein
- External References
 - General identifiers
 - Oligo probes
- Ontology
 - GO graph
 - GO table
- Genetic Variation
 - Variation table
 - Variation image
 - Population comparison
 - Comparison image
- Protein Information
 - Protein summary
 - Domains & features
 - Variations
- External data
 - Personal annotation
- ID History
 - Transcript history
 - Protein history
- Configure this page**

Transcript: APOE-001 ENST00000252486

Description apolipoprotein E [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:613]

Synonyms AD2

Location [Chromosome 19: 44,905,754-44,909,393 forward strand](#)

About this transcript This transcript has [4 exons](#), is annotated with [8 domains and features](#), is associated with [155 va](#)

Gene This transcript is a product of gene [ENSG00000130203](#) [Show transcript table](#)

cDNA sequence ⓘ

[Download sequence](#) [BLAST this sequence](#)

Codons Alternating codons Alternating codons

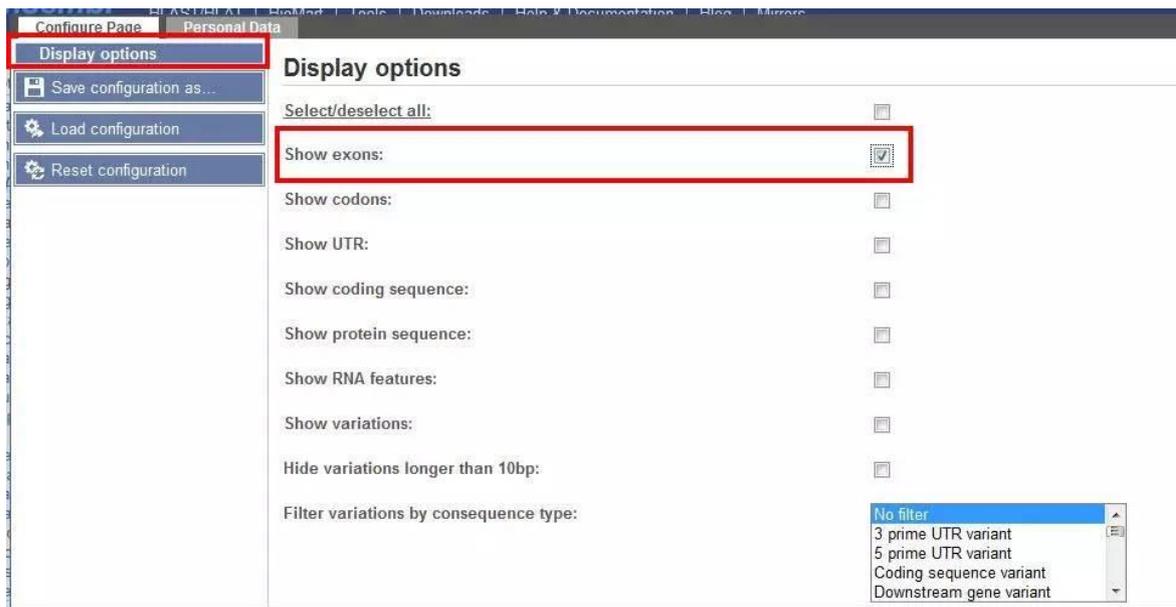
Exons Alternating exons Alternating exons

Variations 3 prime UTR 5 prime UTR Coding sequence Frameshift Inframe deletion Inframe insertion Missense

Stop gained Synonymous

Other UTR

4. 然后点击 CONFIGURE THIS PAGE 进入，设置你要显示的内容，在 SHOW EXONS 这一项打个勾，然后点击“Save configuration as”保存序列



5. 以 RTF 的格式 DOWNLOAD 下来，可以 Word 的方式打开，不同的颜色代表不同外显子的间断

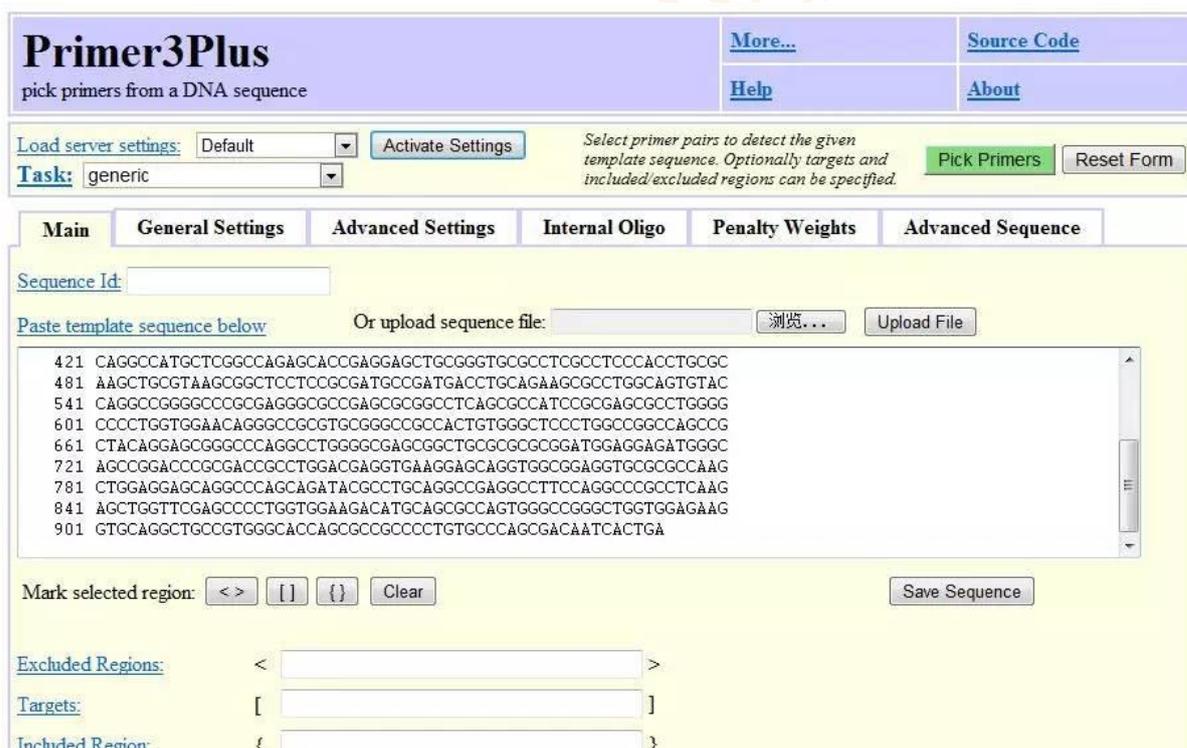
```

1 ATGAAAGGTTCTGTGGGCTGCGTTGCTGGTACATTCCCTGGCAGGATGCCAGGCCAAAGGTG
61 GAGCAAGCGGTGGAGACAGADCCCGAGCCCGAGCTGCCCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGC
121 GGCCAGCCCTGGAACTGGCACTGGGTCCCTTTTGGGATTACCTCCGCTGGGTCCAGACA
181 CTGTCTGAGCAAGGTGCAGGAGGAGCTGCTCAAGCTCCCAAGTCACCCAAGAACTGAGGGCG
241 CTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCACAAAATCCGAACTGGAGGAACAACCTG
301 ACCCCGGTGGCCGAGGAGAGCGCGGCAAGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCC
361 CCGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTCCGCCCCTGGTGCAGTACCOCGCGGAGGTTG
421 CAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCAGGTCGCGCTCCGCTCCACCTGGC
481 AAOCTGCGTAAGCGGCTCCTCCCGATGCCGATGACCTGCAGAAAGCCCTGGCAGTGTAC
541 CAGGCCGCGGCCCGGAGGGCGCCGAGCGCGGCTCAAGCCCATCCCGAGCGCCCTGGG
601 CCCCTGGTGGAAAGCGCCCGTGGCGGCGCCACTGTGGGCTCCCTGGCCGCGCAGCCG
661 CTACAGGAGCGCGCCAGGCGCTGGGCGAGCGGCTGCAGCGCGGATGGAGGAGATGGG
721 AGCCCGACCCCGGACCGCCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAAGTGGCGGAGGTGCGCCCAAG
781 CTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATACCCCTGCAGGCCGAGGCCCTCCAGGCCCGCCCTCAAG
841 AGCTGGTTCGAGCCCTGGTGGAAAGACATGCAAGCCAGTGGGCGGCGCTGGTGGAGAA
901 GTCCAGGCTGCCGTGGGCAAGCGCGCCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCACTGA

```

第二步：利用 Primer3 Plus 获取引物，打开 Primer3 Plus 在线软件：
<http://www.primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cg>

1. 打开 Primer3 Plus，将序列粘贴在指定位置



The screenshot shows the Primer3Plus web interface. At the top, there's a header with the logo "Primer3Plus" and the tagline "pick primers from a DNA sequence". There are links for "More...", "Source Code", "Help", and "About". Below the header, there's a section for "Load server settings" with a dropdown menu set to "Default" and an "Activate Settings" button. A "Task" dropdown is set to "generic". A green "Pick Primers" button and a "Reset Form" button are also visible. The main content area has several tabs: "Main", "General Settings", "Advanced Settings", "Internal Oligo", "Penalty Weights", and "Advanced Sequence". The "Main" tab is active, showing a "Sequence Id:" field and a "Paste template sequence below" section. There's a text area containing a DNA sequence with line numbers 421 to 901. Below the text area, there are buttons for "Mark selected region:" (with left and right arrow buttons, square and curly bracket buttons, and a "Clear" button) and a "Save Sequence" button. At the bottom, there are fields for "Excluded Regions:", "Targets:", and "Included Region:" with corresponding brackets.

2. 在 Load server settings 项目中选择“qPCR”:

因为设计为避免因基因组 DNA 的污染而 P 出以基因组 DNA 为模板的产物，故设计引物时其中一个引物最好能够跨外显子设计，故在 Primer overlap position 中输入左引物或右引物必须重叠的位点，本文在序列 238 位氨基酸是后两个外显子的连接处，故输入 238。或者可以在 Pair OK Region List 中，作相应的设置，该标签的值为多个，值和值之间用“;”隔开，单个值为： $\langle \text{left_start} \rangle, \langle \text{left_length} \rangle, \langle \text{right_start} \rangle, \langle \text{right_length} \rangle$ 。比如：
 SEQUENCE_PRIMER_PAIR_OK_REGION_LIST=100,50,300,50 ;900,60,, ;,930,100

表明有引物设计有三种选择：

左引物在 100~150bp 区间进行设计，右引物在 300~350bp 的区间进行设计；

左引物在 900~960bp 区间进行设计，右引物随意；

右引物在 930~1030bp 区间进行设计，左引物随意。

The screenshot shows a web-based primer design tool interface. At the top, there are buttons for 'Load server settings' (set to 'qPCR'), 'Activate Settings', and 'Pick Primers'. Below this is a 'Task' dropdown set to 'generic'. The main area has tabs for 'Main', 'General Settings', 'Advanced Settings', 'Internal Oligo', 'Penalty Weights', and 'Advanced Sequence'. The 'Main' tab is active, showing a 'Sequence Id' field and a 'Paste template sequence below' area with a large text area containing a DNA sequence. Below the sequence are navigation buttons and a 'Save Sequence' button. At the bottom, there are fields for 'Excluded Regions', 'Targets', 'Included Region', and 'Primer overlap positions' (set to 238). A red circle highlights the 'Primer overlap positions' field, with a callout bubble containing the text: '引物设计时，左引物或右引物必须有一个和指定的位点重叠。'

3. 然后在 General Settings 设置引物长度、引物 Tm 值、GC 含量等参数。

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

More... Source Code
Help About

Load server settings: qPCR Activate Settings
Task: generic
Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified. Pick Primers Reset Form

Main **General Settings** Advanced Settings Internal Oligo Penalty Weights Advanced Sequence

Product Size Ranges 100-250

Primer Size Min: 18 Opt: 20 Max: 27
Primer Tm Min: 57.0 Opt: 60.0 Max: 63.0 Max Tm Difference: 100.0
Primer GC% Min: 40.0 Opt: 55.0 Max: 60.0
Concentration of monovalent cations: 50.0 Annealing Oligo Concentration: 50.0
Concentration of divalent cations: 1.5 Concentration of dNTPs: 0.6
Mispriming/Repeat Library: NONE

Load and Save
To upload or save a settings file from your local computer, choose here:
浏览... Load Settings Save Settings

4. 如果对引物有更多的设计要求：

可以在 Advanced Settings、Internal Oligo、Penalty、Advanced Sequence 中设置相关的参数。如无则可点击绿色按钮“Pick Primers”，获得引物。

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

[More...](#) [Source Code](#)
[Help](#) [About](#)

< Back

Pair 1: Primer

Left Primer 1: CTGCGTTGCTGGTCACATTC
Start: 17 Length: 20 bp Tm: 60.1 C GC: 55.0 % Any: 0.0 End: 0.0 TB: 6.0 HP: 0.0 3' Stab: 2.7 Penalty: 0.110

Right Primer 1: ATCAGCGCCCTCAGTTCCT
Start: 245 Length: 19 bp Tm: 61.0 C GC: 57.9 % Any: 0.0 End: 0.0 TB: 9.0 HP: 0.0 3' Stab: 3.4 Penalty: 1.992

Pair: Product Size: 229 bp Any: 0.0 End: 8.4 TB: 15.0 Penalty: 2.102

[Send to Primer3Manager](#) [Reset Form](#)

1	ATGAAGGTTCTGTGGGCTGC	GTTGCTGGTCA	ACATTCCTGG	CAGGATGCCA
51	GGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCC	GAGCTGCGCC		
101	AGCAGACCGA	GTGGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAACTGGC	ACTGGGTCGC	
151	TTTTGGGATACCTGCGCTGGTGCAGACA	CTGTCTGAGC	AGGTGCAGGA	
201	GGAGCTGCTCAGCTCCAGGTCACCCAGGA	ACTGAGGCG	CTGATGGACG	
251	AGACCATGAA	GGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACTGGA	GGAACAACCTG	
301	ACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGG	CTGTCCAAGG	AGCTGCAGGC	
351	GGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGA	GGACGTGTGC	GGCCGCCTGG	
401	TGCAGTACCGCGCGAGGTGCAGGCCATGC	TCGGCCAGAG	CACCGAGGAG	
451	CTGCGGGTGC	GCCTCGCCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTA	AGCGGCTCCT	
501	CCGCGATGCCGATGACCTGC	AGAAGCGCCTGGCAGTGTAC	CAGGCCGGGG	

第三步：分析引物

1. 打开 Oligo Calc 网页，将正向引物粘贴到指定位置

Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

Enter Oligonucleotide Sequence Below
OD calculations are for single-stranded DNA or RNA

Nucleotide base codes

CTG CGT TGC TGG TCA CAT TC

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:

GAA TGT GAC CAG CAA CGC AG

5' modification (if any) 3' modification (if any) Select molecule

nM Primer Measured Absorbance at 260 nanometers

mM Salt (Na⁺)

2. 点击 Check Self-complmentarity, 检测引物自身是否形成互补二聚体、发夹结构等。

is 5.221 microMolar and contains 31.7 micrograms. 04.0 °C (nearest neighbor)

Thermodynamic Constants Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.

RlnK	33.404 cal/(°K*mol)	deltaH	165.3 Kcal/mol
deltaG	26.8 Kcal/mol	deltaS	430.5 cal/(°K*mol)

Deprecated Hairpin/self dimerization calculations

(Minimum base pairs required for single primer self-dimerization)
 (Minimum base pairs required for a hairpin)

Check Self-Complementarity

3. 结果如下图所示:

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.
Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

Potential hairpin formation :

None !

3' Complementarity:

None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):

None !

4. 重复步骤 1 至 3，粘贴反向引物。

5. 点击 mfold

将包含正反引物之间的序列即产物放到 mfold,查看产物是否折叠形成二级结构。如结果显示产生二级结构，则可重新在 Primer3 plus 改变条件重新获得 qPCR 引物。



The screenshot shows the mfold software interface. At the top, there are three dropdown menus: '5' modification (if any)', '3' modification (if any)', and 'Select molecule' (set to 'ssDNA'). Below these are input fields for '50 nM Primer', '50 mM Salt (Na⁺)', and '1 Measured Absorbance at 260 nanometers'. At the bottom, there are four buttons: 'Calculate', 'Swap Strands', 'BLAST', and 'mfold'. The 'mfold' button is highlighted with a red rectangular box.

6. 最后点击 BLAST，检测引物的特异性。

经过层层筛选，最后得到符合条件的引物实在是凤毛麟角，所谓鱼和熊掌不可兼得，所以可能得将就一下接受各方面都不错但还是有一点不完美的引物，而且引物好不好用，也只有 realtime PCR 以后才能得到验证。所以，请大胆地去 pick primers 吧！

实验技术八卦课堂：如何使用 Oligo 软件 设计引物

作者：猫大

PCR 引物要怎么设计才好呢？对于引物设计，猫大的口号是：

两大要求，一个对策!!!

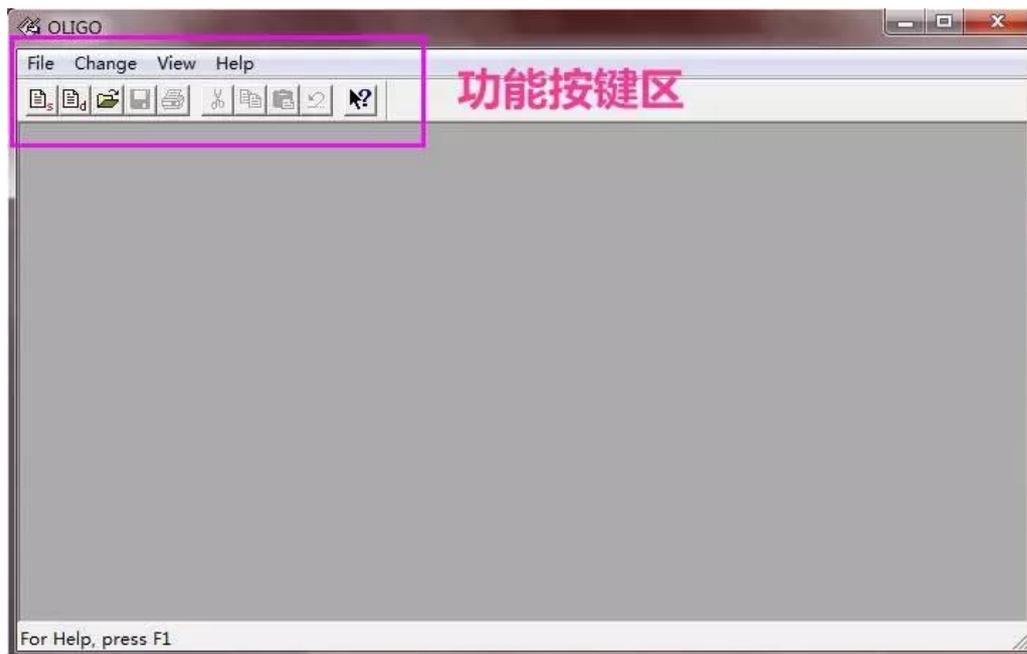
Oligo6

你值得拥有



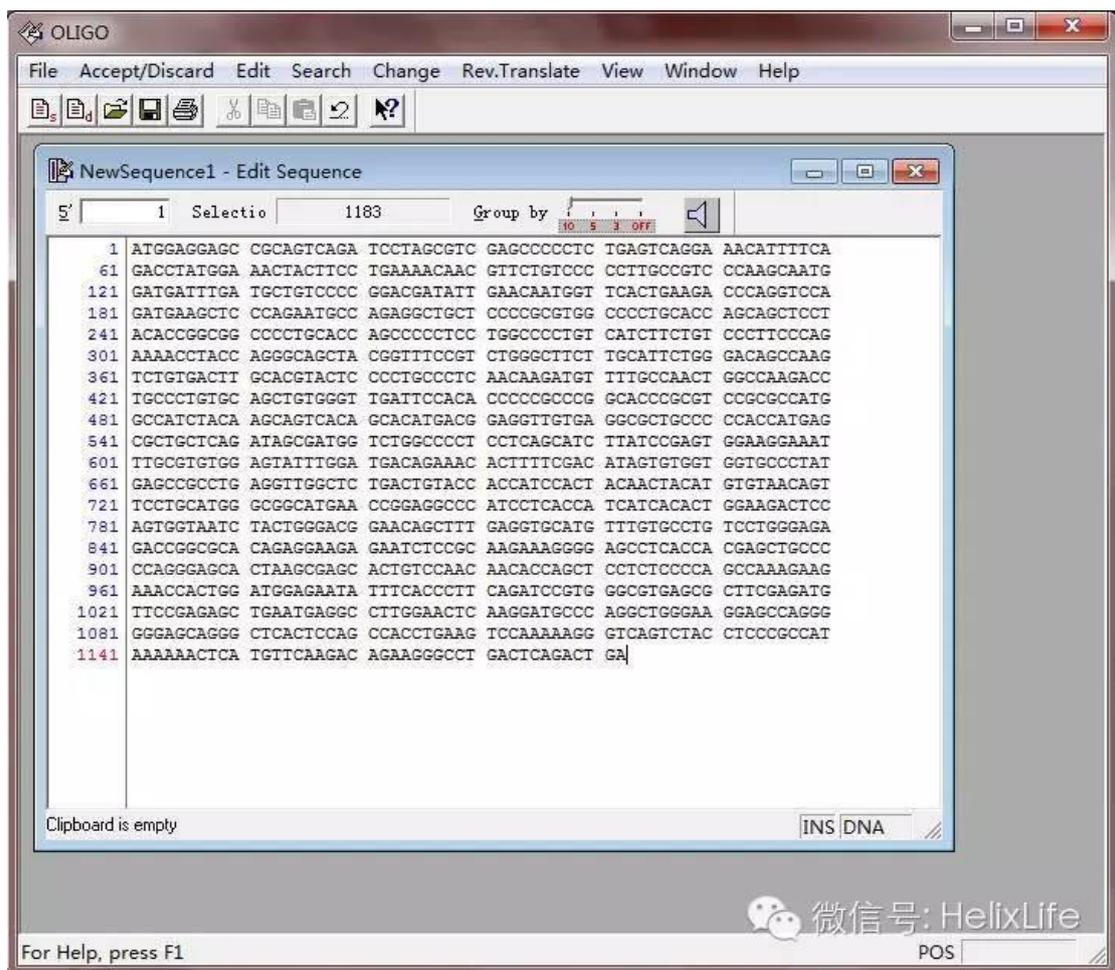
好，废话少说，我们开始。

首先，鼠标点击图标  Oligo 打开 Oligo 6 软件，出现一个标着“select Codon Usage Database”的对话框，不用管它，直接点取消，于是出现如下界面：



软件界面看着非常简单，菜单条只有四个选项，菜单条下面是一些快捷按钮，还有一些按钮是灰色的、按不动的。实际上，随着不同的操作，菜单选项和快捷按钮是会出现变化的。强大的功能就隐藏在这些变化的选项中。

要设计 PCR 引物，我们必须要有目的基因序列。这个序列在哪输进去呢？很简单，[点击按钮](#) ，在打开的空白框里，我们可以把目的基因序列贴上去。比如，我们把人 [TP53 基因 \(AB082923.1\) 的 CDS 区](#) 贴进去，就变成下面这样，同时可以发现菜单条选项忽然就变了变了变了。。。



点击可以把贴进去的序列保存成 seq 文件。这里我们把这段序列命名为 TP53。点击菜单第二个选项“Accept/Discard”，选中“Accept”，出现如下界面，而且菜单选项又变了变了。。。



在这个界面里出现了两个框，一个标着 ΔG ，一个标着 T_m 。标着 T_m 字样的这个框框左下部有两个按钮，分别写着“Upper”和“Lower”。Upper——Upper Primer，Lower——Lower Primer，好像跟引物有那么点关系。。事实是，真的很有关系。。所以设计引物我们只要看标 T_m 的那个框就好了。

PCR 引物的长度为 15-30bp，最常用 23、24bp，我们可以先把需要的引物长度设定好。怎么设定呢？

点击菜单的“Change”选项，选中“Current Oligo Length”，弹出如下对话框：



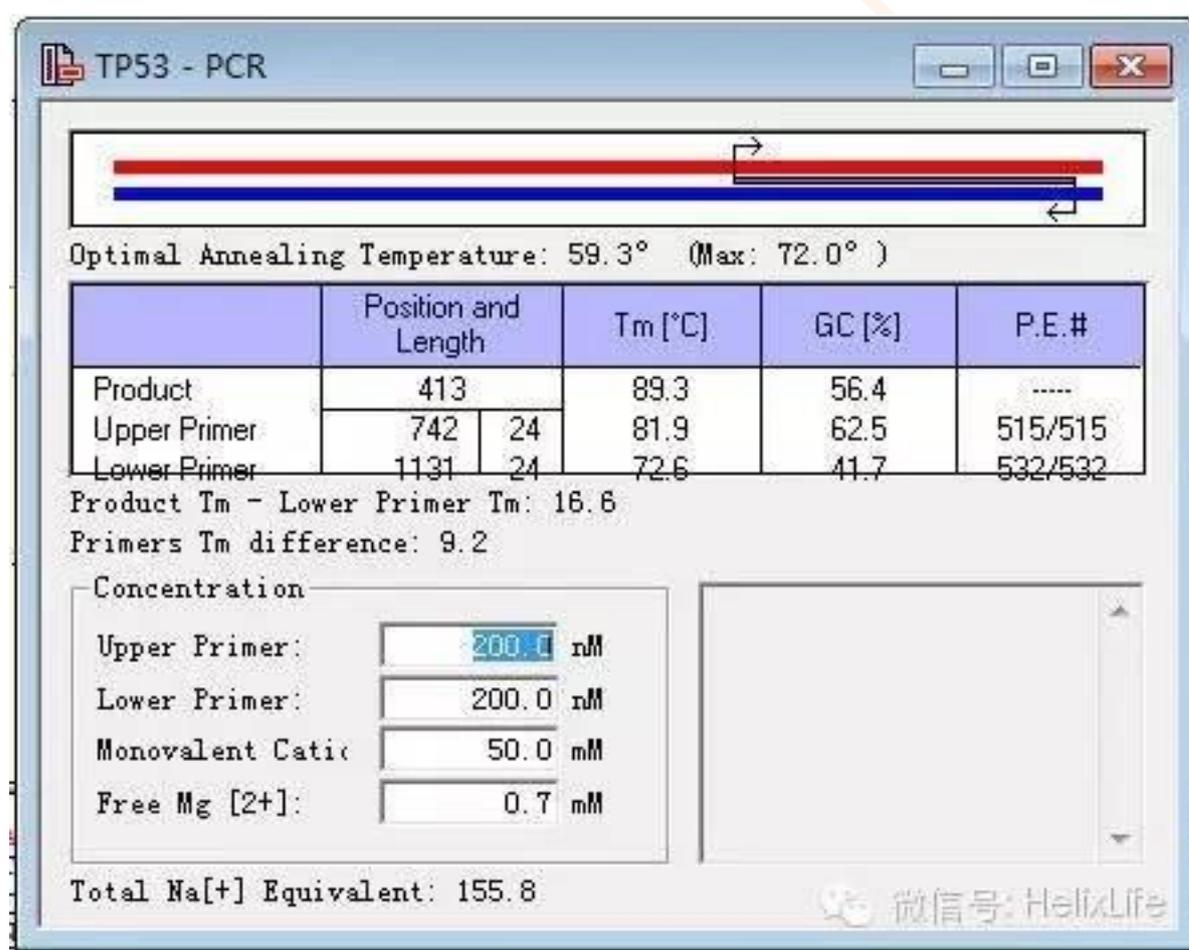
填入数字 **24**，点 **OK**，引物的长度就设定好了。这时候软件默认你接下来选中的引物长度是 24bp。

然后我们就用“肉眼”去搜索引物。

T_m 图上标着 3 条平行的虚线，我们要寻找的是 T_m 值位于第 2 和第 3 条线之间的碱基，就是下图红色框的范围。



鼠标点击 742bp 处，碱基序列上的长方形框就会随着鼠标移动至 742bp 处，然后点击“Upper”按钮，字母颜色就变成红色，此时已经选中 742bp 处的序列为上游引物，同理选中下游引物（如果想更改下游引物长度，可以在选中下游引物前进去 change 选项里改，如果不改的话，那这里的下游引物长度就还是 24bp），点击菜单“Analyze”选项选中“PCR”，即弹出这对引物的各项参数，如下图：



那么怎么知道这对引物好还是不好呢？很简单，只要这张参数表的右下框里**没！有！出！现！任何文字**，那这对引物就是可用的！“Analyze”选项中还有很多其他评价引物的选项，那些都不用看!!!

然后，我们需要把引物序列给**输出**。可以到 file 菜单选 save 去保存引物序列，但是这样保存下来的是 seq 文件，还得再打开了看，有点麻烦。所以猫大是直接进 **edit 菜单把引物序列复制黏贴到 excel 表，而且复制黏贴的序列会自动按 5'-3'的顺序排列。**

最后去 **blast** 一下看是不是会扩增出其他基因，如果扩增不出就可以去合成了。

有时候，选中的引物并不合适，框框里就会出现讨厌的字，比如：

A.

```
3'-end dimer between the
primers.
```

引物间有二聚体，那就随意挑一条引物挪动几个碱基；

B.

```
Two-temperature PCR
recommended:
(68° /94° ).
```

有两个可用的温度，那就还是随意挑一条引物挪动；

C.

```
Terminal stability of
the Lower Primer is too
high.
```

这回是指明了下游引物的一端稳定性太高，那就是说这条引物的碱基对应着的柱子高了，把它往柱子低一点的地方挪；

D. `Terminal stability of
the Upper and Lower
Primers is too high.`

上下游引物的末端稳定性都太高，那就把两条都挪往低一点的地方去吧。

E. etc.

这个方法总结下来就是：

打开序列



设置引物长度



找 Tm 适中的碱基



评价

简单几步，用一个软件就能一次性完成引物设计和引物评价两件事！

而且这么挑出来的引物相当靠谱，基本没有引物二聚体。用熟练了会感觉自己自带 X 光眼，看哪儿点哪儿哪儿就是引物！可以跟同学吹牛皮说：引物不用设计，眼睛看看就行！

嗯，引物设计完毕，

详尽的引物设计心得及具体流程操作（推荐收藏）

作者：张慧慧

1 克隆载体：

表达载体一般需要的是**编码序列**（起始密码子 **ATG** 到终止密码子 **TAA/TGA/TGA** 的序列），也就是 NCBI 的 coding sequence（CDS）。

```

/db_xref="GeneID:2768677"
CDS
  join(75..118,178..501,884..964,1035..1071,1135..1161,
  2959..3268,3333..3579,3642..4036,4096..4118)
  /gene "p53"
  /locus_tag="Dmel_CG33336"
  /gene_synonym="CG10873; CG31944; CG33336; Dm-p53; Dm-p53;
  Dmel\CG33336; dmp53; Dmp53; DmP53; DMP53; dp53; Dp53;"
  prac"
  /note="CG33336 gene product from transcript CG33336-RB;
  CG33336-PB; p53-PB; p53-like regulator of apoptosis and
  cell cycle; Dmp53; protein 53; drosophila p53"
  /codon_start=1
  /product="p53, isoform B"
  /protein_id="NP_996267.1"
  /db_xref="GI:45553461"
  /db_xref="FLYBASE:FBpp0083753"
  /db_xref="FLYBASE:FBgn0039044"

```

编码基因的位置

微信号: HelixLife

一般是全长序列，直接取 **ATG 开始的 20bp** 为上游引物，TAA/ TGA/ TAG 端的 20bp 的反向互补序列反向引物。根据载体的酶切位点、读码框的要求在引物的 5'端碱基即可。

要注意的是：

- ① 选用的酶切位点在编码序列上是否存在，存在就选择其他酶切位点或者选用同尾酶。
- ② 载体的标签实在插入序列的上游还是下游，在上游编码序列的终止密码就要留，在下游编码序列的终止密码就要去掉。
- ③ 读码框是否正确，有些酶切位点会破坏插入序列的读码顺序，这个时候在引物上添加碱基使其正常读码即可。

例如构建 EGFP-C1-P53 质粒。

① P53 序列

```

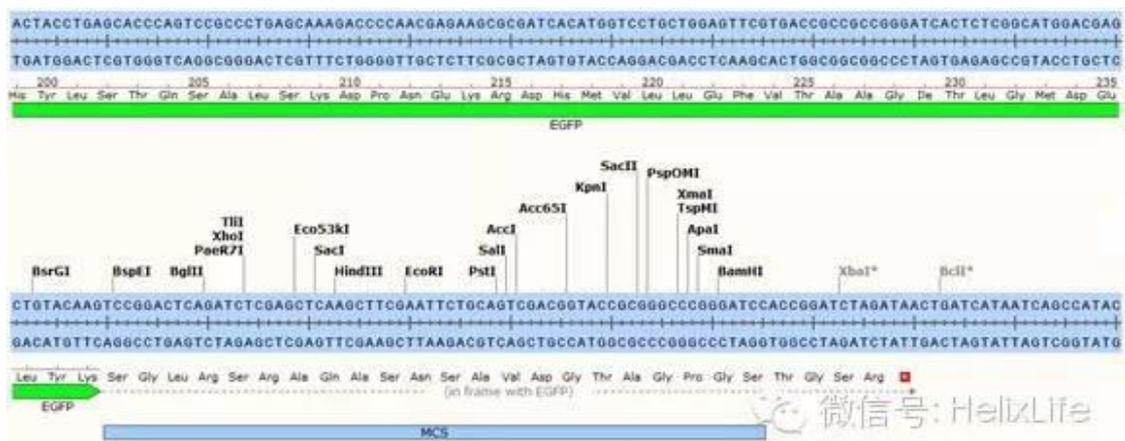
ATGGAGGAGCCGAGTCAGA TCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAA
ACTACTTCCTGAAAACAACGTTCTG TCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTGATGCTGTCCCCGGA
CGATATTGAACAATGGTTCAC TGAAAGACCCAGGTCCAGATGAAAGCTCCCAGAAATGCCAGAGGCTGCTCCCC
CGTGGCCCTGCACCAAGCAGCTCTACACCGGCGGCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCTGTGATCTTC
TGTCCCTTCCAGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGCTCTGGGCTTCTTGCACTTCTGGGACAGCCAA
GTCTGTGACTTGACAGTACTCCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTCCTCAACTGGCCAAAGACCTGCCCTGTGCA
GCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCGCACCCGCGTCCGCGCCATGGCCATCTACAAACAGTCACAGCA
CATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCTCCTCA
GCATCTTATCCGAGTGGAAAGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAAGTGT
GGTGGTGCCTTATGAGCCGCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACACATGTTGTAACAG
TTCTGCAATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCTCACCATCATCACACTGGAAGACTCCAGTGGTAATCT
ACTGGGACGGAAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTTGTGCTGTCTGCGGAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAG
AATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGCTGCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGCCCAACA
ACACCAAGCTCCTCTCCCCAGCCAAAGAAACCCTGGATGGAGAAATATTTCACCCCTTCAGATCCGTTGGC
GTGAGCGCTTCGAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGGAACTCAAGGATGCCAGGCTGGGAAGGAG
CCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCCAAAAAGGC TAGTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
AACTCATGTTCAAGACAG

```

绿色表示选取的引物位置 (EGFP-C1 的 GFP 标签在插入序列的上游, 所以终止密码保留。)

引物序列是: 上游引物 (与绿色标示的序列一致) 5'-ATGGAGGAGCCGAGTCAGA-3'; 下游引物 (与绿色标示的序列反向互补) 5'-TCAGTCTGAGTCAGGCCCTT-3'

②载体多克隆位点 (MCS) 分析



我选择酶的原则是价格便宜，常用的酶，例如 XhoI/BamHI/HindIII 等，这样的酶在很多载体中都会有，有时候可以通用。

分析 p53 的序列中是否有 XhoI/BamHI 两个酶切位点，结果是没有，那就可以放心的用这两个酶了。于是引物可以变成

上游引物

5'-CTCGAGATGGAGGAGCCGCGAGTCAGA-3' (XhoI)

下游引物

5'-GGATCCTCAGTCTGAGTCAGGCCCTT-3' (BamHI)

酶在发挥作用的时候要有个保护碱基，我认为就是给它一个空间让它发挥作用，保护碱基在百度百科可以查到，于是引物就会变成

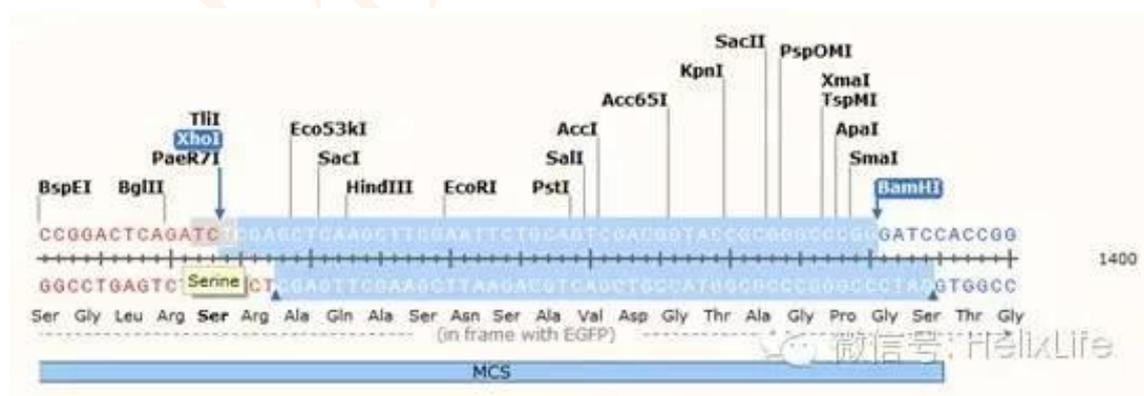
上游引物

5'-ccgCTCGAGATGGAGGAGCCGCAGTCAGA-3'

下游引物

5'-cgGGATCCTCAGTCTGAGTCAGGCCCTT-3'

③读码分析



XhoI 的序列 CTC GAG 与载体的读码框不一致，载体的读码是 TCT CGA GCT，当用 XhoI/BamHI 双酶切载体时，最后的 CT 需要插入序列的 AT 来代替，就会使插入的序列移码，这时候，只要在插入序列 ATG 的前面加 CT 即可，所以引物序列就变成

上游引物

5'-ccgCTCGAG CTATGGAGGAGCCGCAGTCAGA-3'

下游引物

5'-cgGGATCCTCAGTCTGAGTCAGGCCCTT-3'

所以当你给公司发引物序列时就是

上游引物

5'-ccgCTCGAG CTATGGAGGAGCCGCAGTCAGA-3'

下游引物

5'-cgGGATCCTCAGTCTGAGTCAGGCCCTT-3'

因为是全长序列，就表示引物已经定了，没有选择。截短体也是一样的，只要确定了那一段，只要把两端的 20bp 作为引物序列，然后添加酶切位点序列就可以了。

2 qPCR 引物

这里给大家推荐几个网站：

① GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design :

<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer#>

② Pick primers from a DNA sequence

http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi

QPCR 设计的原则是：**跨内含子，长度在 150bp 以内**。现在的试剂盒已经可以不考虑跨内含子，用①中的网站只要粘贴 CDS 的一段序列即可，网页中有跨内含子选项，有些时候跨内含子可能无结果，可以不用选这一项。还是以 p53 序列为例。颜色不同代表不同的外显

子。

```
ATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGAAACATTTTC
AGACCTATGGAAACTACTTCCTGAAAACAACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAAT
GGATGATTTGATGCTGTCCCGGACGATATTGAACAATGGTTCACTGAAGACCCAGGTCC
AGATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCCGTGGCCCTGCACCAGCAGCTC
CTACACCGGCGGCCCTGCACCAGCCCCCTCTGGCCCTGTCATCTTCTGTCCCTTCCC
AGAAAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCAITCTGGGACAGCCA
AGTCTGTGACTTGCACGTACTCCCTGCOCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGA
CCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCGGCACCCGCGTCCGCGCCA
TGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCAT
GAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGA
AATTTGCGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCC
TATGAGCCGCTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACACTACATGIGTAAC
AGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGAC
TCCAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTGTGTGCCTGTCTGGG
AGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCACCACGAGC
TGCCCCCAGGGAGCACTAAGCGAGCACTGCCCAACAACACCAGCTCCTCTCCCCAGCCA
AAGAAGAAACCCTGGATGGAGAATATTTACCCTTCAGATCCGTGGGCGTGAGCGCTTC
GAGATGTTCCGAGAGCTGAATGAGGCCTTGGAACTCAAGGATGCCCAGGCTGGGAAGGA
GCCAGGGGGGAGCAGGGCTCACTCCAGCCACCTGAAGTCCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TCCCGCCATAAAAAAATCATGTTCAAGACAGAAGGGCCTGACTCAGACTGA
```

Primer/Probe Tm (melting temperature) for the primers and probes, as well as the organism. You can also decide how many Primer/Probe sets you want the tool to return to you. We recommend you using the GenBank Accession to input your target sequence. However, you can choose to input the sequences manually in raw format.

Number of Primer/Probe Sets to Return (Limit 20 Sets)

PCR Amplicon Size Range

Primer Tm Minimum Optimum Maximum °C

Probe Tm Minimum Optimum Maximum °C

Organism:

Pick Primer/Probe Crossing Exon Junction

When Pick Primer/Probe Crossing Exon Junction is selected, the exon regions must be defined. If only raw sequence is provided, the sequence will be mapped on the genome (human, mouse or rat at present) sequences to locate the exon boundaries. Besides, there are other two ways to specify exon regions:

The best way is to fill in GenBank Accession with the accession number (e.g. NM_145027, please note the accession number is case-sensitive and should not contain version suffix like '1' or '2'). The sequence will be fetched from NCBI data center, and the exon regions are already defined in sequence annotations. Manually specify the exon junctions with ',' in the input sequence (e.g. 'ACGCGCG:CGTACG')

Target Nucleotide Sequences:

GenBank Accession:

or Paste in the DNA Sequence in raw format:

微信号: HelloLife

序列越长，分析的越慢，所以不需要全部粘贴。

结果如下：

Resources » Bioinformatics Tools » Molecular Biology Tools » Real-Time PCR Primer Design

GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design

Name	Sequence	Strand	Position	T _m °C
Primer Set 1: Amplicon Size = 89				
query_L1	GCGTGTGGAGTATTTGGATG	forward	603	59.00
query_R1	TGGTACAGTCAGAGCCAACC	reverse	672	58.73
query_P1	CGGCTCATAGGGCACCACCA	reverse	647	68.70
Primer Set 2: Amplicon Size = 83				
query_L1	ATCTACTGGGACGGAACAGC	forward	788	59.17
query_R1	GCGGAGATTCTTCTCTCTG	reverse	851	59.12
query_P1	CGGTCTCTCCAGGACAGGCA	reverse	825	69.33
Primer Set 3: Amplicon Size = 136				
query_L1	AGACCCAGGTCCAGATGAAG	forward	168	59.10
query_R1	TTTCTGGGAAGGGACAGAAG	reverse	284	59.26
query_P1	AGCAGCTCCTACACCGTCGG	forward	231	69.14

只需要 L1/R1 即可，你可以在 word 中查找引物序列。

第②个网站，是当时做基因敲除时候用到的，因为涉及到内含子和外显子都要分析，就会有重复序列的位置，这个网站可以用[...]将不需要设计的序列包含在内，所以比较符合要求，(重复序列查找网址 <http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>，重复的序列会用 NNN 标示出来)

P53 基因序列的一段，下划线的部分用[...]包括在内

```
ACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCC  
TGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCGCCCGGCACCCGCGTCCG  
CGCCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAG  
GCGCTGCCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATGGTCTGGCCCCT  
CCTCAGCATCTTATCCGAGTGGGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGG  
ATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCCTATGAGCCGCC  
TGAG]GTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACATCATGTGTAAC  
AGTTCCTGCATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCCTCCTCACCATCATCA  
CACTGGAAGACTCCAGTGGTAATC
```

Primer3: WWW primer tool

pick primers from a DNA sequence

Paste source sequence below (F->>T, string of ACGTN+gaps -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use Maximum Likelihood (more slower). NONE

序列粘贴处

Pick left primer or use left primer below | Pick hybridization probe (internal oligo) at one oligo below | Pick right primer or use right primer below (F->>T on opposite strand)

Pick Primers | Reset Form

Sequence ID: _____ A string to identify your output.
E.g. 50.2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the `source sequence` with [and] e.g. `...ATCT[CCCC]TCAT`. means that primers must flank the central CCCC.

Tm: _____
E.g. 401,7-68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the `source sequence` with < and > e.g. `...ATCT<CCCC>TCAT` forbids primers in the central CCCC.

Excluded Regions: _____
E.g. 401,7-68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the `source sequence` with < and > e.g. `...ATCT<CCCC>TCAT` forbids primers in the central CCCC.

Product Size: Min: 100 Opt: 200 Max: 1000
Number To Return: 5 Max T Stability: 9.0
Max Misassembly: 12.00 Pair Max Misassembly: 24.00

Pick Primers | Reset Form

General Primer Picking Conditions

Pick Primers | Reset Form

Sequence ID: _____ A string to identify your output.
E.g. 50.2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the `source sequence` with [and] e.g. `...ATCT[CCCC]TCAT`. means that primers must flank the central CCCC.

Tm: _____
E.g. 401,7-68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the `source sequence` with < and > e.g. `...ATCT<CCCC>TCAT` forbids primers in the central CCCC.

Excluded Regions: _____
E.g. 401,7-68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the `source sequence` with < and > e.g. `...ATCT<CCCC>TCAT` forbids primers in the central CCCC.

Product Size: Min: 100 Opt: 200 Max: 1000
Number To Return: 5 Max T Stability: 9.0
Max Misassembly: 12.00 Pair Max Misassembly: 24.00

Pick Primers | Reset Form

这里面有筛选条件，你可以任性的

结果如下，除了这些，网页还会给出备选的首引物，你可以随意挑选。

```
Primer3 Output

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO      start  len   tm     gc%   any    3'  seq
LEFT PRIMER    126   20   60.15  55.00  4.00  0.00 CACATGACGGAGGTTGTG
RIGHT PRIMER   321   21   59.59  57.14  4.00  2.00 GGATGGTGGTACAGTCAG
SEQUENCE SIZE: 414
INCLUDED REGION SIZE: 414

PRODUCT SIZE: 196, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 2.00
TARGETS (start, len)*: 146,151

1 ACTCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGTGCAGCTGT

61 GGGTTGATTCCACACCCCCGCCCCGCAACCAGCCTCCGCGCCATGGCCATCTACAAGCAGT

121 CACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGCGCTGCCGCCACCAATGAGCGCTGCTCAGATAGCG
    >>>>>>>>>>>>>>>>>>>*****

181 ATGGTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGGAAAGAAATTTGCGTGTGGAGTATT
    *****

241 TGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGGCCCTATGAGCCGCTGAGGTTG
    *****

301 GCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACCTACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGCGGCCA
    <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<

361 TGAACCGGAGGCCCATCCTCACCATCATCACACTGGGAAAGACTCCAGTGGTAAAC
```

有现成的网页可以用，大家大胆地试试吧，引物设计没有那么神秘。

Primer Premier 6 安装、破解、引物设计 实操攻略

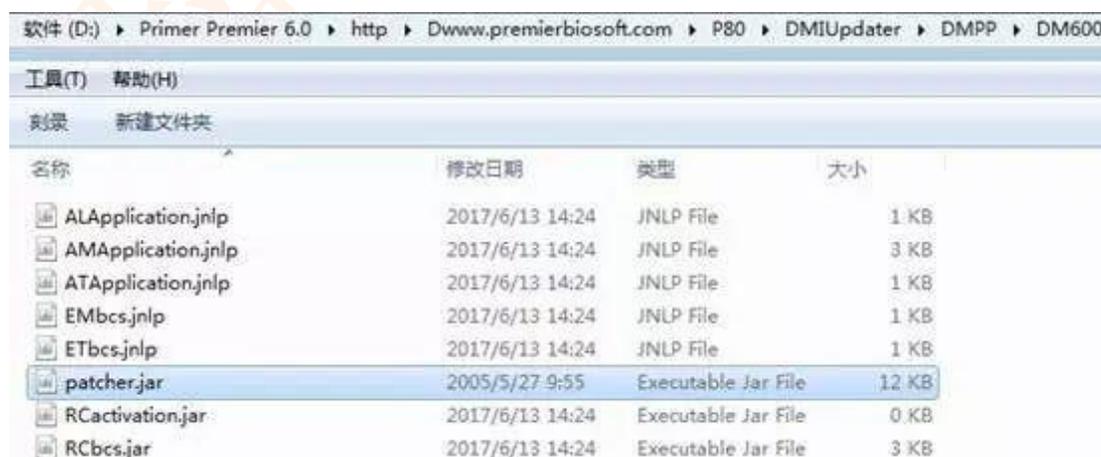
作者：叶子

Primer Premier 是国际知名的引物设计软件，其公司已连续发布了多个版本，到目前为止，最新版本是 Primer Premier6。相比于 Primer Premier 5，Primer Premier 6 在很多方面做了改进与优化，例如引物设计的温度 T_m 值等。但是相比较于 5,6 并没有出现大量的可供使用者激活的注册机，所以用了一种很奇葩的 Java 破解法，来一步步看看怎么做吧。（获取方法点这里）

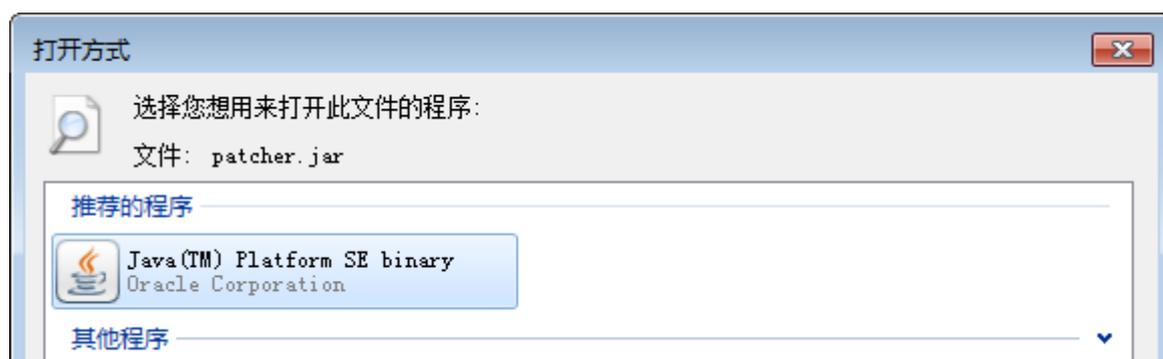
安装破解

首先，说明一点现在最新的 Primer Premier 小版本已经更新到了 6.24，但后面几版把破解漏洞修复了，所以目前只能搞定 6.00。下载完资源包后，根据自己的系统，安装相应的 JAVA 运行环境。

然后，和平时一样安装在 PP6 文件夹里的 PP600Installer，完事后把 patcher.jar 复制进这个地方：安装位置\http\Dwww.premierbiosoft.com\P80\DMIUpdater\DMPP\DM600。



复制完应该是这样的，如果双击无效的话就右键——打开方式——选 JAVA。



如果还是不行就要改注册表了，在开始菜单输入“regedit”进入注册表编辑器中，找到“HKEY_CLASSES_ROOT\Applications\javaw.exe\shell\open\command”，修改参数，保存并退出注册表编辑器。



引物设计

安装完之后，就要开始引物设计了，这就需要知道基因序列。一般用 NCBI 查找，比如要设计 rat 的 CK18 mRNA 检测引物。首先选择 Nucleotide，然后在搜索栏输入 rat CK18，结果如下。

Nucleotide [Create alert](#) [Advanced](#)

Summary [Send](#)

See [KRT18 \(CK18\) keratin 18](#) in the Gene database
[ck18 reference sequences](#) [Genomic \(2\)](#) [Transcript \(2\)](#) [Protein \(2\)](#)

Items: 2

1 Found 1243424 nucleotide sequences. Nucleotide (2) EST (1243422)

- [Rattus norvegicus keratin 18 \(Krt18\) mRNA](#)
 - 1. 1,397 bp linear mRNA
Accession: NM_053976.1 GI: 68534952
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

- [Mastomys natalensis voucher TZ-CK18 cytochrome b \(cytb\) gene, partial cds, mitochondrial](#)
 - 2. 706 bp linear DNA
Accession: KP141160.1 GI: 745750035
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

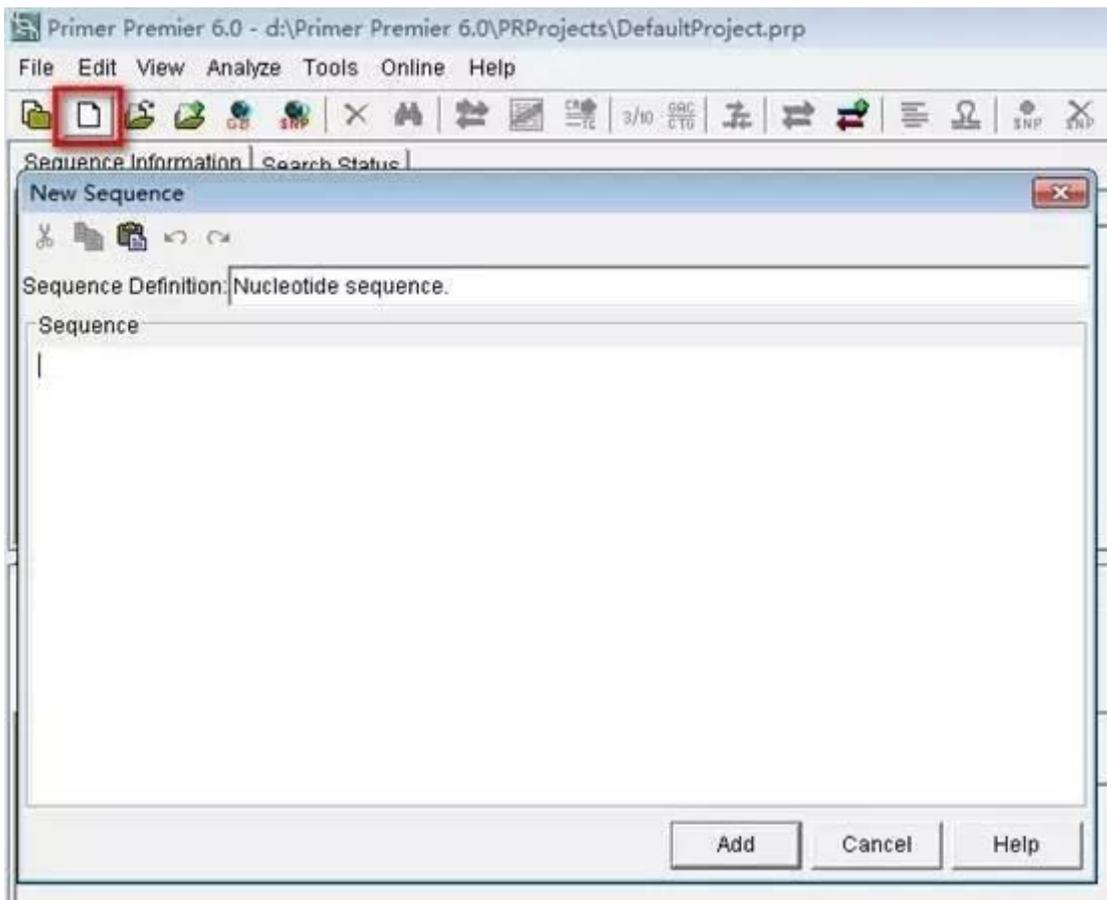
我们要找 mRNA，所以选第一个，点进去后拉到最后的 ORIGIN 就能找到基因序列。

ORIGIN

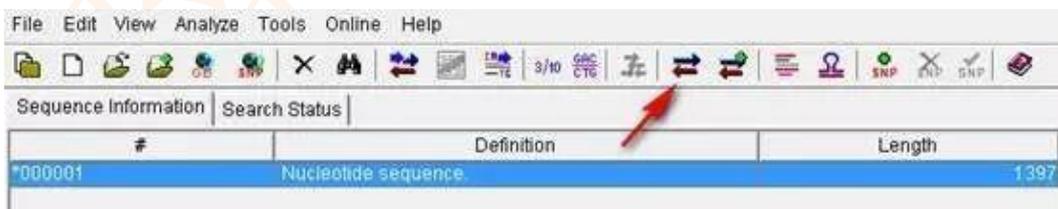
```
1 ccaatcctgg tctctcgctt cgttctcctc tccagacaag atgagcttca ccaccgctc
61 caccaccttc tccaccaact accggtccct gggctctgtg cggactcca gccagcgggt
121 ccggcctgcc agcagcgag ccagcgtcta tgcagtgct ggggctcag ggtcccggat
181 atccgtgtcc cgctctgtct ggggtggctc cgtgggtcc gcaggcctgg cgggaatgg
241 tgggtccag actgagaagg agaccatgca agacctgaa gaccgcctgg ccagctacct
301 agacaagtg aagaacctgg aaaccgagaa caggagacta gagagcaaaa tccgggaata
361 tctggagaaa aggggtcccc agggcgtcag agactggggc cactacttca agaccatcga
421 agatctgagg gctcagatct ttgcgaatc tgtggacaat gccgcctcg tctgcagat
481 cgacaatgcc cgtcttgccg ctgatgactt tagagtcaag tatgagacgg aactggccat
541 gcgccagtct gtggagagtg acattcatgg actccgcaag gtggtggatg acaccaacat
601 caccaggttg cagctggaga cagaaatcga agcgtcaag gaggagctgc tgttcatgaa
661 gaagaatcat gaggaggag tccaaggcct ggaagctcag attgccagtt ctgggtgac
721 tgtggaagtg gatgctcca aatctcagga cctcagcaag atcatggcgg acatccgtgc
781 ccagtatgaa cagctggctc agaagaaccg tgaggaaactg gacaagtact ggtctcagca
841 gattgaagag agtaccacgg tagtcaccac caagtctgcc gaaatcaggg acgtgagac
901 cacactctg gagctgagac gcaccctcca gacctggag attgacctgg actcgatgaa
961 aaaccagaac atcaacttg agaacaacct cggggaagtg gaggccagat acagggtgca
1021 gatggagcaa ctcaatggg tcttctgca tctggaatca gagctggcac aaactcgggc
1081 gaaggacag cgcagaccc agaatcga agcctgttg aacatcaagg tcaagcttga
1141 gccggagatt gccacctacc gcccttgct ggaggatgg gacgatttca gtctcaacga
1201 gcacctggac tccagcaact ccatgcaaac tgtccagagg acaactacc gtaagtcgt
1261 ggatggcaaa gtggtgtccg agaccaatga taccagagtt ctgaggcact aaggctcaga
1321 gaagggaac cccttgggga ctgagggacc aataaaagtt tagaatccaa aaaaaaaaa
1381 aaaaaaaaa aaaaaaa
```

//

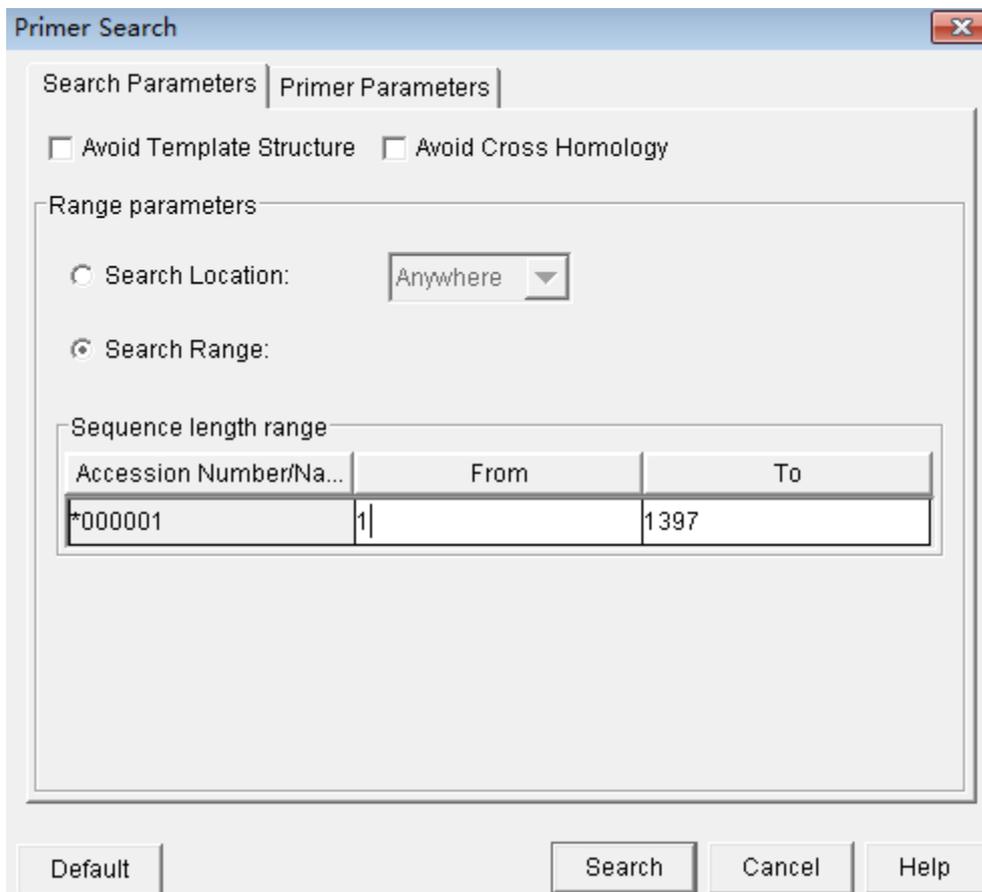
把这段序列复制到 Primer Premier6 进行引物设计。



点这里的新建按钮会出现对话框，将上面那段序列复制进去，点 Add。



然后点这个搜索，出现下面对话框，这里可以选择引物在序列哪些地方设计引物，一般不用更改，也就是引物可以设计在整个序列，当然也可以事先查一下序列有几个区，一般引物会跨两个区。



接下来设置退火温度、引物长度、产物长度等，点旁边的“Primer Parameters”。主要更改的也就是产物长度，100 到 300bp 为宜，产物太大，会影响扩增效率。

Primer Search

Search Parameters | **Primer Parameters**

Primer parameters

Tm: +/- °C

Ta: +/- °C

Length: To: bp

Primer pair parameters

Include gap up and downstream of SNP:

Amplicon Length: To: bp

Alternate Primer Pairs:

点“Search”后，引物序列就出来啦。

Status	Rating	Sequence	Position	Length bp	Tm °C	GC %	Hairpin ΔG kcal/mol	Self-Dimer ΔG kcal/mol	Run Length bp	GC Clamp	TmDet °C	Cross-Dimer ΔG kcal/mol
Reverse	87.8	GTGATCAAGGCGGAGGCTG	368	19	53.3	42.8	0.8	0.5	5	1		
Reverse	86.4	GTTCTCCAACTGATGATTC	365	21	50.6	42.8	0.8	0.7	5	1		
Product	87.8			126	79						83.4	-0.8

验证引物

RESOURCES	POPULAR	FEATURED
Chemicals & Bioassays	PubMed	Genetic Testing Registry
Data & Software	Bookshelf	PubMed Health
DNA & RNA	PubMed Central	GenBank
Domains & Structures	PubMed Health	Reference Sequences
Genes & Expression	BLAST	Gene Expression Omnibus
Genetics & Medicine	Nucleotide	Map Viewer
Genomes & Maps	Genome	Human Genome
Homology	SNP	Mouse Genome
Literature	Gene	Influenza Virus
Proteins	Protein	Primer-BLAST
Sequence Analysis	PubChem	Sequence Read Archive
Taxonomy		
Variation		

光设计出引物还不行，还要进行验证，也是在 NCBI 上进行。在最下方找到“Primer-BLAST”将 Primer Premier6 设计的引物复制进去。

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)	GTAGTCACCACCAAGTCTG 这里放蓝色的前引物 (Sense)			
Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)	GTTCTCCAAGTTGATGTTCTG 这里放红色的后引物 (AntiSense)			
PCR product size	Min	Max		
	70	1000		
# of primers to return	10			
Primer melting temperatures (T _m)	Min	Opt	Max	Max T _m difference
	57.0	60.0	63.0	3

注意，复制前引物用 Copy Sense Primer，复制后引物用 Copy Anti-sense Primer，在引物上点击右键就出来了。在下方“Organism”中选“Rattus (taxid: 10114)”，最后点“Get Primers”，马上验证报告出来了。

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTAGTCACCCACCAAGTCTG	19	54.85	52.63	5.00	1.00
Reverse primer	GTTCTCCAAGTTGATGTTCTG	21	54.80	42.86	5.00	1.00

Products on target templates

>NM_053275.1 Rattus norvegicus keratin 18 (Krt18), mRNA

```

product length = 128
Forward primer 1: GTAGTCACCCACCAAGTCTG 19
Template       850 ..... 879
Reverse primer 1: GTTCTCCAAGTTGATGTTCTG 21
Template       905 ..... 934

```

>XM_00870823.2 PREDICTED: Rattus norvegicus similar to keratin complex 1, acidic, gene 18 (LOC683212), transcript variant X1, mRNA

```

product length = 128
Forward primer 1: GTAGTCACCCACCAAGTCTG 19
Template       850 A ..... 879
Reverse primer 1: GTTCTCCAAGTTGATGTTCTG 21
Template       901 ..... 930

```

>XM_008775094.2 PREDICTED: Rattus norvegicus similar to keratin complex 1, acidic, gene 18 (LOC683212), transcript variant X2, mRNA

```

product length = 128
Forward primer 1: GTAGTCACCCACCAAGTCTG 19
Template       850 A ..... 879
Reverse primer 1: GTTCTCCAAGTTGATGTTCTG 21
Template       901 ..... 930

```

这么长的验证报告要怎么看呢？它的结果顺序是将产物由小到大排列的，而太大的产物，比如 Ahsg 产物 795bp，在 PCR 反应时是扩增不出来的。也就是说，这个引物在扩增的时候只会出 CK18 这个我们要的基因，特异性很好。

我们可以拿这个引物去找公司合成。在需要引物时我们也可以到文献中查找，一般发表在全球著名杂志中的外文文献里的引物都是可以用的，不过要注意的是文献中用的是染料法还是探针法，探针法的引物在染料法中效果不佳。

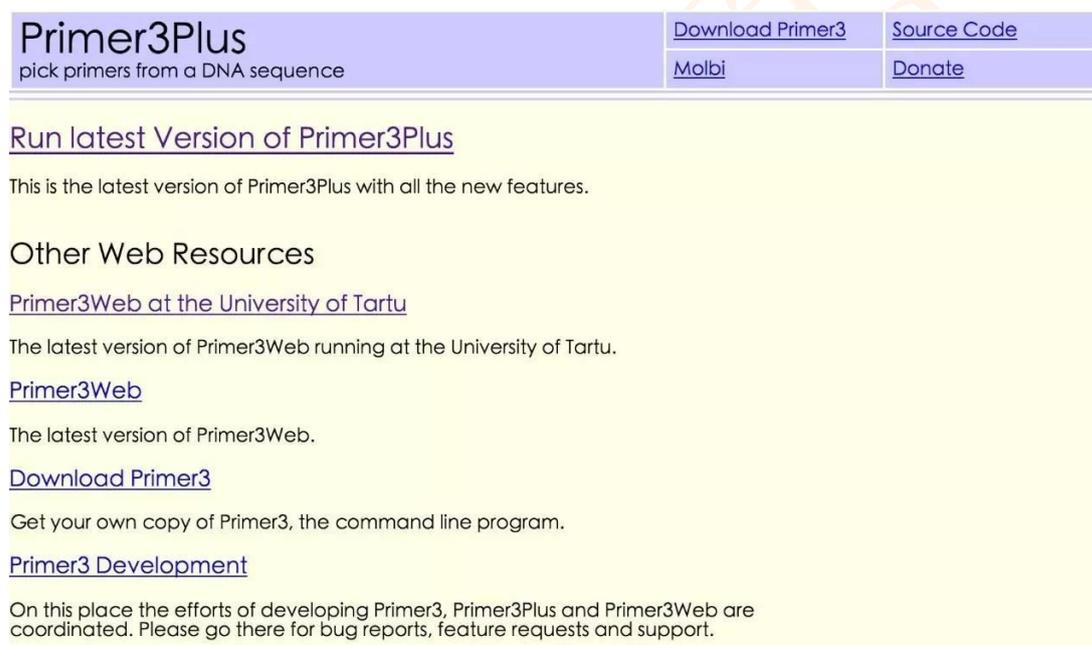
干货 | 引物设计逼格提升，以 Primer3Plus 为例

作者：冬至

小伙伴们，当我们看到国外实验室的英文 paper 中，很少有用 Primer Premier5 设计引物，

但看我们中文的 paper，或是国内实验室发的 SCI，很多人用到了 Primer Premier5 这个软件来设计引物，这是为嘛呢？机智师兄告诉你，Primer Premier5 是个商业软件，在国外是要花钱买的，而且还贵，而国内呢，有一个东西叫做破解版！为了提高我们自己的知识产权意识，这里推荐给大家一个免费的，同样设计引物不错的软件——Primer3Plus，并用 NCBI 进行引物验证。

1. 进入 Primer3Plus 主页 (<http://www.primer3plus.com/>)。Primer3Plus 是一个网站，在这儿可以利用 Primer3Plus 结合设计荧光定量引物的要求来设计并验证引物。



Primer3Plus pick primers from a DNA sequence	Download Primer3	Source Code
	Molbi	Donate

Run latest Version of Primer3Plus

This is the latest version of Primer3Plus with all the new features.

Other Web Resources

[Primer3Web at the University of Tartu](#)
The latest version of Primer3Web running at the University of Tartu.

[Primer3Web](#)
The latest version of Primer3Web.

[Download Primer3](#)
Get your own copy of Primer3, the command line program.

[Primer3 Development](#)
On this place the efforts of developing Primer3, Primer3Plus and Primer3Web are coordinated. Please go there for bug reports, feature requests and support.

2. 选择 Run latest Version of Primer3Plus，就进入了设计引物的主页面，合理的使用<>，[]，{ } 符号使引物设计符合自己的要求，大家可以在具体实战中，深入体会这几个符号带来的方便。

Load server settings: qPCR Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified.

Task: generic

Main | General Settings | Advanced Settings | Internal Oligo | Penalty Weights

Advanced Sequence

Sequence Id:

Paste template sequence below Or upload sequence file: 未选择任何文件

粘贴需要设计引物的序列

Mark selected region: <> [] [] Clear

Excluded Regions: < > 排出的区域

Targets: [] 目的扩增区域

Included Region: () 包含的区域

Paste template sequence below Or upload sequence file: 未选择任何文件

```

TTCCACTGGCATATGGAAATTATAAGCAGGATCTTCCCTCATTAGATGAGAAACCAAGGAATGTTGTGTT
TATCGACATGGGACATTTCTGCTACCGGTCCTGTTTGTGCTTTTAAACAANGGAAAACCTGGAAGTGTG
GCTACTACCTTTGACCCATATTTGGGTGGCAGGAACTTGTATGAGGCTTTAGTAGACTACTTCTGCGATG
AATTC AAGACCAAATAAAGATAAATGTCAAAGAGAACTCGGGGCTTGTGCGACTGTATCAGGAGTG
TGAAAACCTAAGAAGCTGATGAGTCCAACCGTCAGACCTTCCCTTGAACATCGAGTGTTCATGAAT
GACCTTGATGTTTCTAGTAAAGTGAACAGGGCTCAATTTGAGCGATGTGTGCTTCCCTTTAGCCAGGG
TTGAACACCTTTAAATCAGTAATGGATCAAGCTAATTACACCGTGAAGACATAAACACATAGAGAT
TGTGGGAGGGGCCACACGGATTCCTGAGTCAAGGAGCAGGTGACTAGGTTCTTCTGAAGACATCAGT
ACCACCTGAAATGCTGATGAAGCTGTCCCGGAGGATGTGCGTTGCAAGTGTGCGGATTCCTCACCAAGCAT
TTAAGTACGTGAATTTCCATAACTGACCTTGTTCCTTACTCAGTCACATTAAGGTGGAAGACTCTTT
TGAAGAAGGGACTGGGGAATGTGAAGTCTTCTTAAGAACCACCGGCCCATTCCAAAGGTCATAACT
TTCCACAAGRAAGAACATTTGAAGTGAAGCATTTATACTAATTTGCATGAAGTGCCTTATCCGTGATC

```

粘贴需要设计引物的序列

3.避免多个重复碱基出现，避免 4 个或超过 4 个 G 出现在引物序列中。按照荧光定量引物要求设置参数。

产物长度：不应该超过 400bp，最好 100-150bp

GC%：30%-70%，最好 45% - 55%

引物长度：18-25bp，最好 22-24bp

TM 值: 58-60oC, 最好 60 oC

3' 端: 3'端至少 4 个碱基保守, 最好为 T, C, G

点击 General Settings 一般设置, 在 Product Size Ranges 里面按以上要求设置产物大小, 引物长度, TM 值和 GC 含量, 其它默认参数不用更改。点击右上角放绿色按钮



获得引物。



4. 我们获得了 5 对引物, 并按照 5'到 3'的顺序, 包含了引物和产物的一些基本参数。我们可以根据荧光定量引物要求, 尽量选择 G、C 结尾的引物合成, 如下图中红框所示, 还可以在序列图中看到引物的位置。

上游引物
下游引物

Pair 1: Primer	
Left Primer 1:	AACAGCATAGAGATTGTGGAGG
Start:	644
Length:	23 bp
Tm:	60.1 °C
GC %:	47.8
Any:	0.0
End:	0.0
TB:	7.0
HP:	0.0
3' Stab:	4.3
Penalty:	0.118
Right Primer 1:	CTTCATCAGCATTGAGGGTA
Start:	749
Length:	23 bp
Tm:	60.4 °C
GC %:	47.8
Any:	0.0
End:	0.0
TB:	9.0
HP:	36.9
3' Stab:	3.2
Penalty:	0.371
Pair:	Product Size: 106 bp
Any:	0.0
End:	0.0
TB:	15.0
Penalty:	0.489

生成的 5 对引物按照 Penalty 从小到大排序小

5. 设计好引物后,我们要进行NCBI blast 引物验证,进入 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

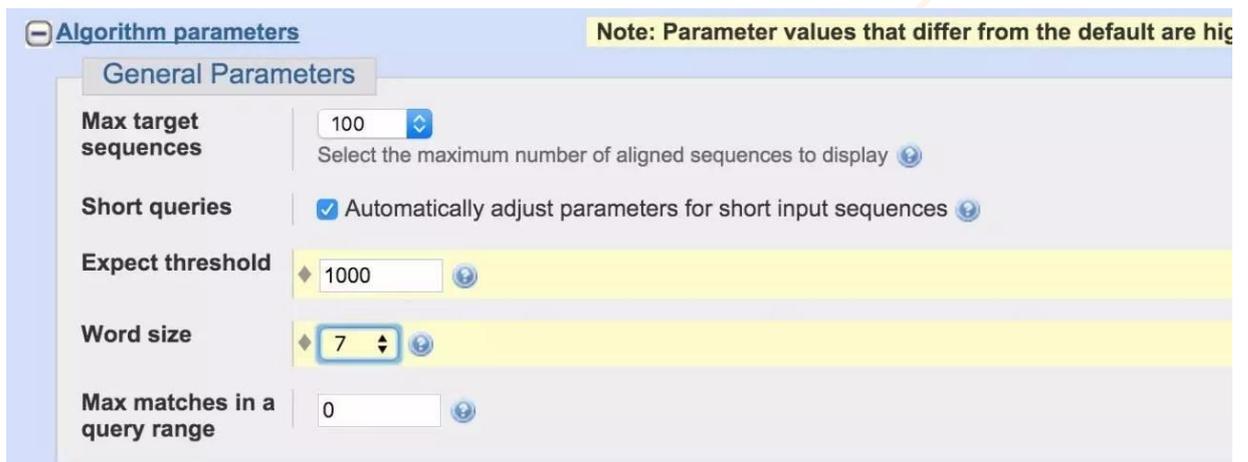
Basic BLAST

Choose a BLAST program to run.

nucleotide blast	Search a nucleotide database using a nucleotide query <i>Algorithms: blastn, megablast, discontinuous megablast</i>
protein blast	Search protein database using a protein query <i>Algorithms: blastp, psi-blast, phi-blast, delta-blast</i>
blastx	Search protein database using a translated nucleotide query
tblastn	Search translated nucleotide database using a protein query
tblastx	Search translated nucleotide database using a translated nucleotide query

6. 点击 Basic BLAST 中的 [nucleotide blast](#) 选项, 在下面框中, 按照 5' - 3' 顺序, 分别输入上游引物和下游引物, 上下游引物之间间隔 20 个以上 n。

9. 点击 Algorithm parameters, 在 Expect threshold 输入 1000, 在 Word Size 输入 7。Word size 不是字体大小的意思, 应该理解为读长, 按照 7 个一组核苷酸序列放到 GeneBank 中进行比对。



10. 点击 BLAST, 开始比对, 出现结果。颜色代表得分, 选择引物的原则是: 列表中大部分是目的基因, 说明引物特异性高; 但是可能物种不同, 说明该基因在不同物种中保守。



用 Primer3Plus+NCBI 设计验证引物是不是很简单, 免费的软件也一样好用, 保护知识产权, 拒绝盗版, 从我做起。

3.2 Realtime PCR

Real-Time PCR 完全手册

作者：麦子

1. Real-Time PCR 基础知识

1.1 用途及原理

用途：



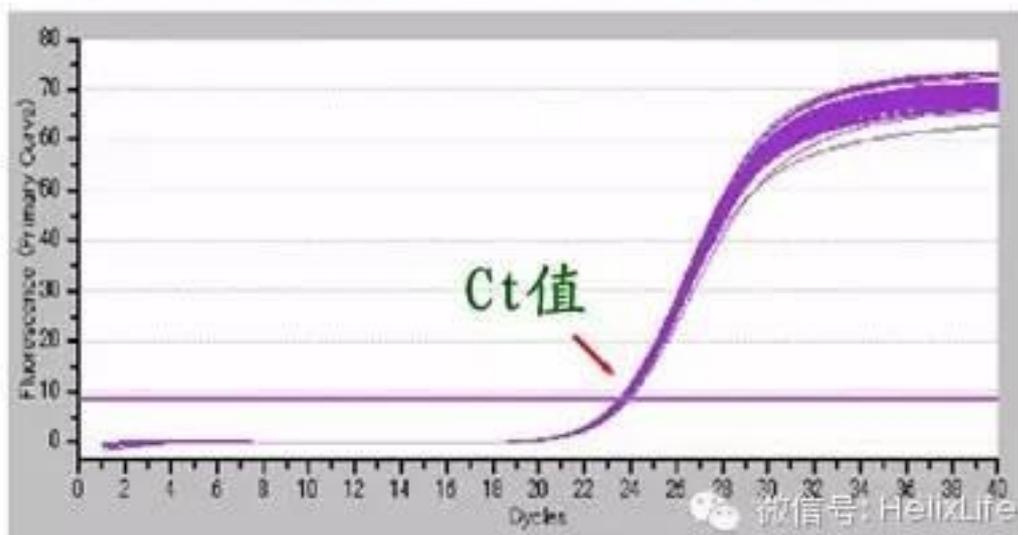
原理：

Real Time PCR

使用Real Time PCR扩增装置实时监测PCR扩增产物并分析方法。



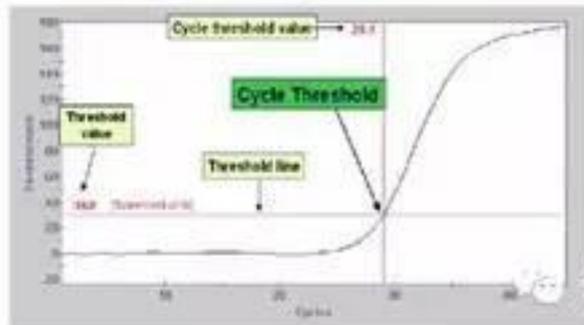
同一个样品重复96次PCR的扩增曲线



阈值：在扩增曲线的指数增长区域内适当位置上设定的荧光检出界限。

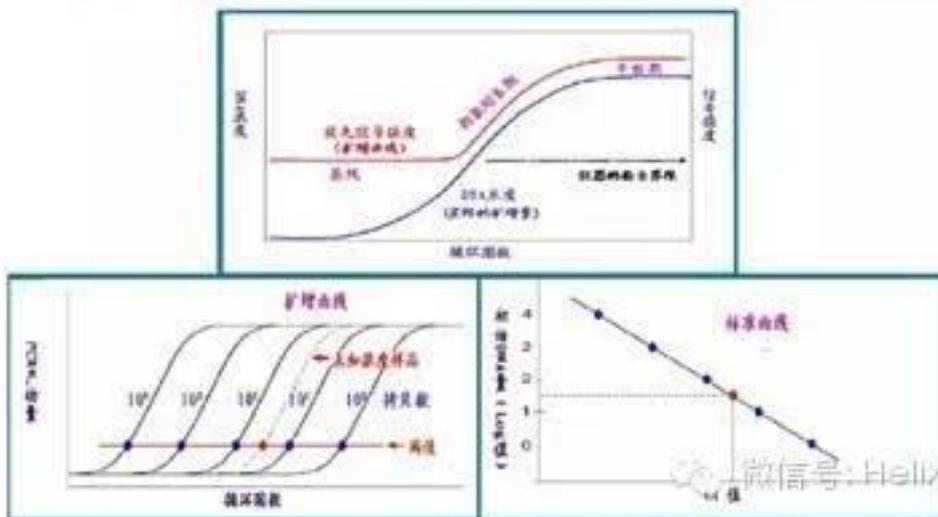
Ct值概念

Real Time PCR扩增过程中，每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。
(C-代表Cycle, t-代表threshold)



微信号: HelixLife

在PCR反应体系中加入荧光物质，并实时监测荧光信号积累的整个PCR进程，最后通过已知浓度的标准品制作的标准曲线对未知浓度的样品进行定量分析。

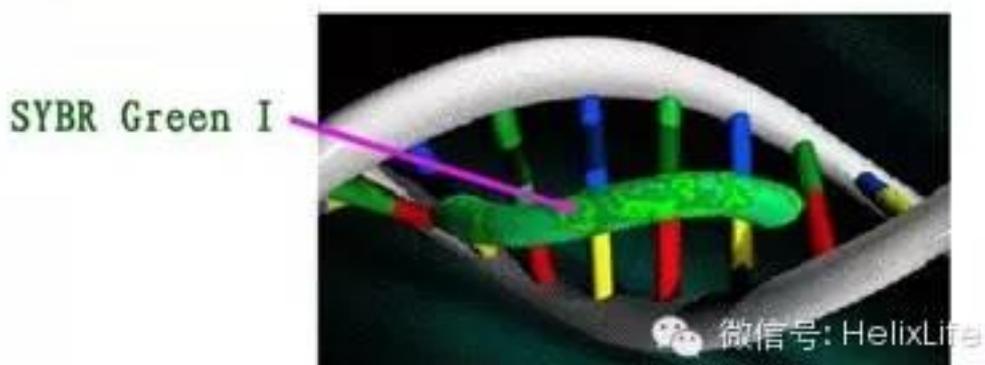


微信号: HelixLife

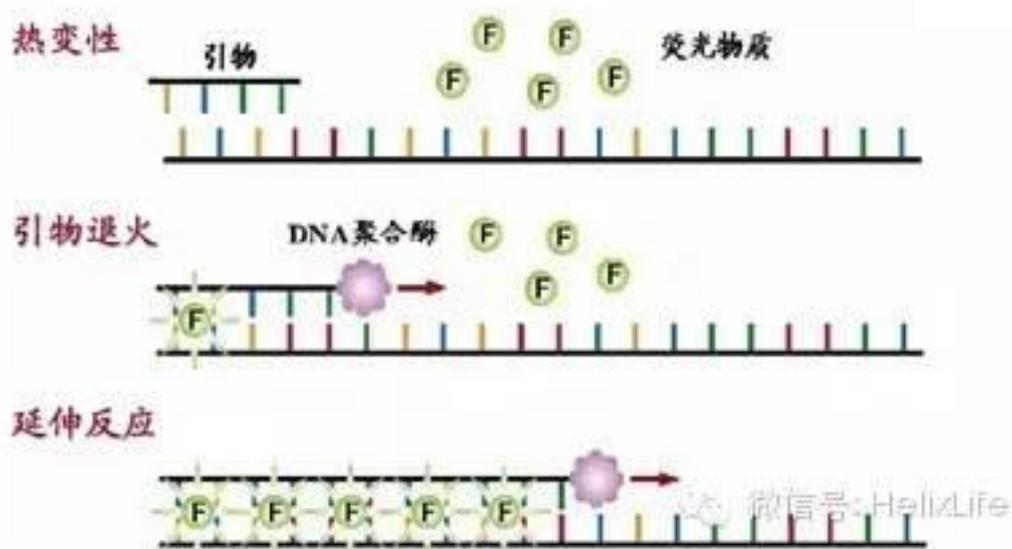
1.2 检测方法

荧光染料嵌合法 (SYBR Green I)

SYBR Green I是一种结合于所有dsDNA双螺旋小沟区域的具有绿色激发波长的染料。



荧光染料嵌合法 (SYBR Green I) 作用机理示意图

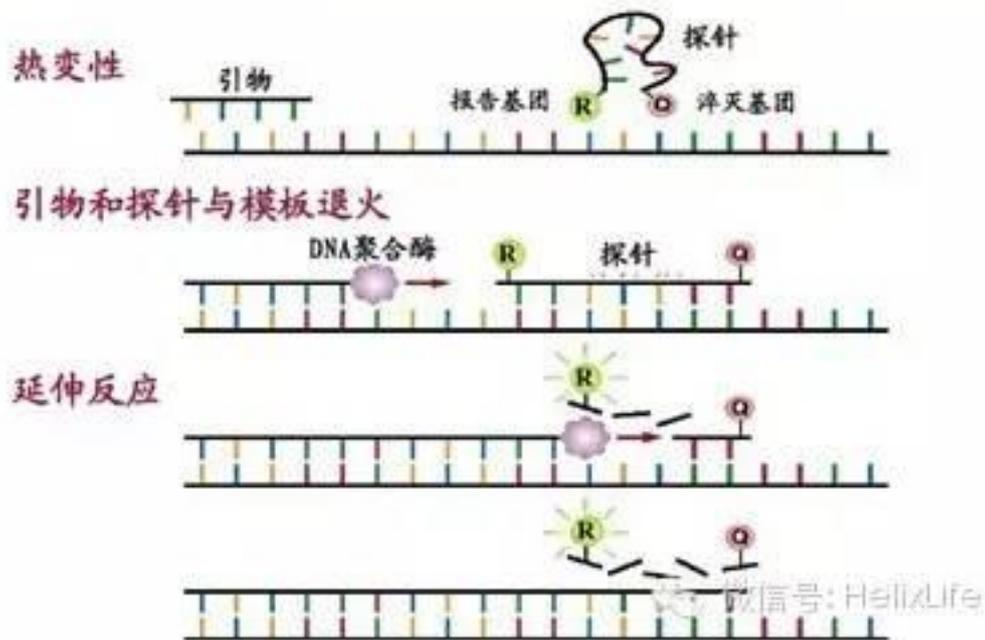


TaqMan Probe法作用机理

TaqMan探针为一寡核苷酸，
5'端标记一个报告基团 (Reporter)，
3'端标记一个淬灭基团 (Quencher)。



TaqMan Probe 法作用机理示意图



Cycling Probe法

Cycling probe为一寡核苷酸，5'端标记一个荧光报告基团(Reporter)，3'端标记一个荧光淬灭基团(Quencher)，寡核苷酸为DNA/RNA杂合体。



Cycling Probe法基本原理

延伸



SYBR Green I法vs Probe法

● SYBR Green I 法

- ◆ 优点：价格便宜、使用方便、无需合成特异性探针。
- ◆ 缺点：引物要求高（要求特异性扩增）、不能进行多重PCR。

● Probe法

- ◆ 优点：特异性强，能进行多重PCR。
- ◆ 缺点：需要设计特异性探针，成本高、有时设计困难。

以前对PCR引物的选择、PCR试剂的优化
经验不足，Probe法较为广用。

但是 . . .

微信号: HelixLife

2. 实验方法

Real Time RT-PCR反应

- 以RNA为起始实验材料时。

Real Time PCR反应

- 以DNA为起始实验材料时。

微信号: HelixLife

科研资源

反转录反应

- One Step RT-PCR和Two Step RT-PCR
- RT Primer的选择。
- Total RNA中genomic DNA混入的对策

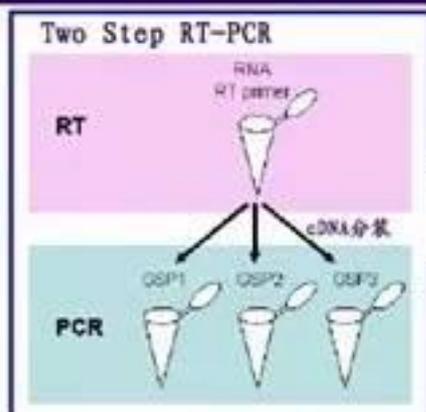
Real Time PCR反应

- Real Time PCR引物及探针的设计。
- 引物反应性确认。
- PCR条件优化顺序。

 微信号

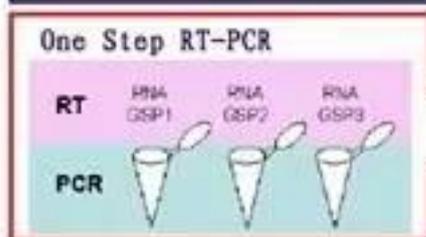
科研网

One Step RT-PCR 和 Two Step RT-PCR的选择



适用于mRNA表达量解析

- Two Step RT-PCR效率高
- 使用Random和Oligo-dT引物可以制备cDNA pool
- cDNA可长期保存



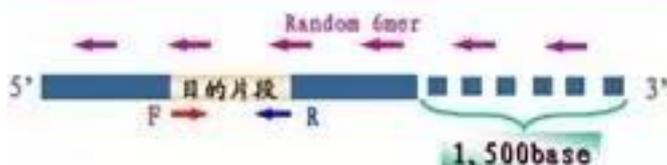
适用于病毒、病原菌检测

- 操作简单
- 污染几率低

微信号: HelixLife

GSP: Gene Specific Primer

RT Primer的选择



目的片段在mRNA任何位置都能使用。通常mRNA表达量分析最适。



目的片段在距Poly(A) Tail 1.5kbp以内适用。

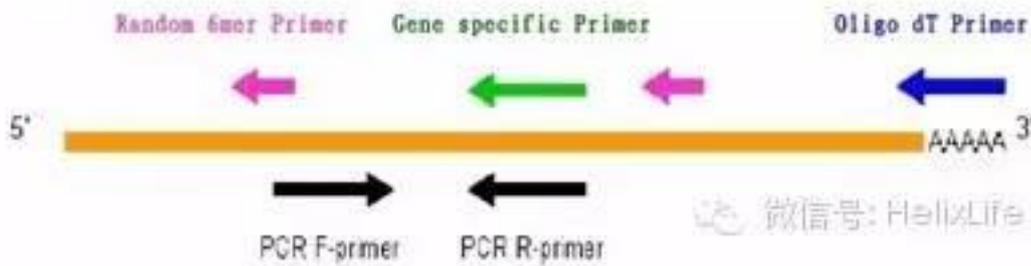


One Step RT-PCR只能使用 Gene specific Primer, 不适用于mRNA表达量分析等复杂基因的检测

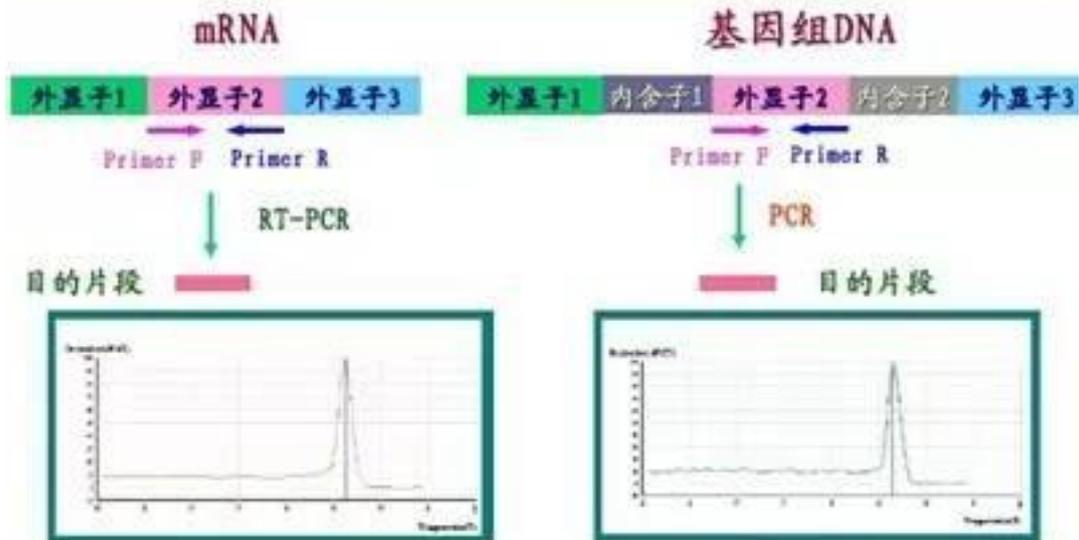
微信号: HelixLife

RT Primer的选择

- ◆ Random 6mer Primer
- ◆ Oligo dT Primer
- ◆ Gene Specific Primer

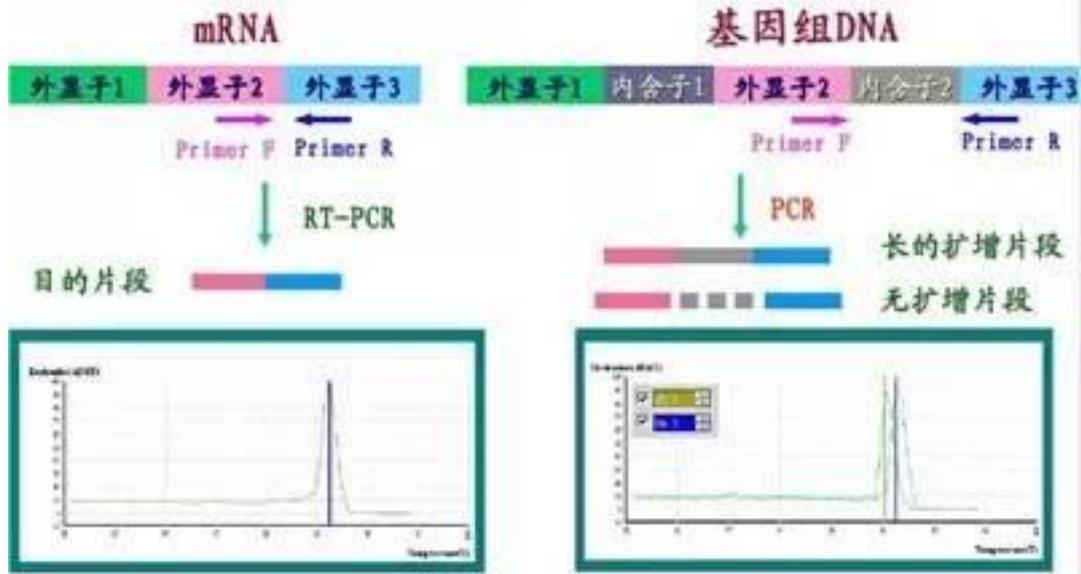


Total RNA中Genomic DNA混入的对策



此种情况必须采用DNase I处理，去除基因组DNA

Total RNA中Genomic DNA混入的对策



引物设计可以避免基因组DNA来源的Template扩增

Real Time PCR引物及探针设计

Real Time PCR用引物与普通PCR引物设计要求不同

普通PCR引物

目的是获得目的基因，对非特异性反应和引物二聚体要求不严格。

Real Time PCR引物

目的是让目的基因按照理论值进行扩增，对非特异性反应和引物二聚体要求严格。

=> 对引物设计要求严格

Real Time PCR用引物设计原则

扩增片段大小	★	80-150bp(尽量限制在300bp以内)
Primer长度	★	17-25base
GC含量	★	40-60%(最好45-55%)
Tm值	★★★	两条引物的Tm值尽量接近, 引用专用软件计算Tm值
序列	★	<ul style="list-style-type: none"> 整体上碱基不能过偏 个别部分避免GC rich或AT rich(特别是3'端) 避免T/C连续, A/G连续
3'末端序列	★	<ul style="list-style-type: none"> 3'末端避免GC rich或AT rich 3'末端碱基最好为G 或C 3'末端碱基尽量避免为T
互补性	★★★	<ul style="list-style-type: none"> 引物内部或两条引物之间避免3base以上的互补序列 引物3'末端避免2base以上的互补序列
特异性	★★★	使用BLAST检索, 确认引物特异性
RT-PCR用引物	★★	尽量在Exon junction上设计引物, 限制基因组DNA扩增

★号表示重要程度, ★号越多, 表示该参数越重要, 设计时要优先考虑

Real Time PCR引物及探针设计

好的引物
需要寻找好的参照序列

↓
RefSeq序列

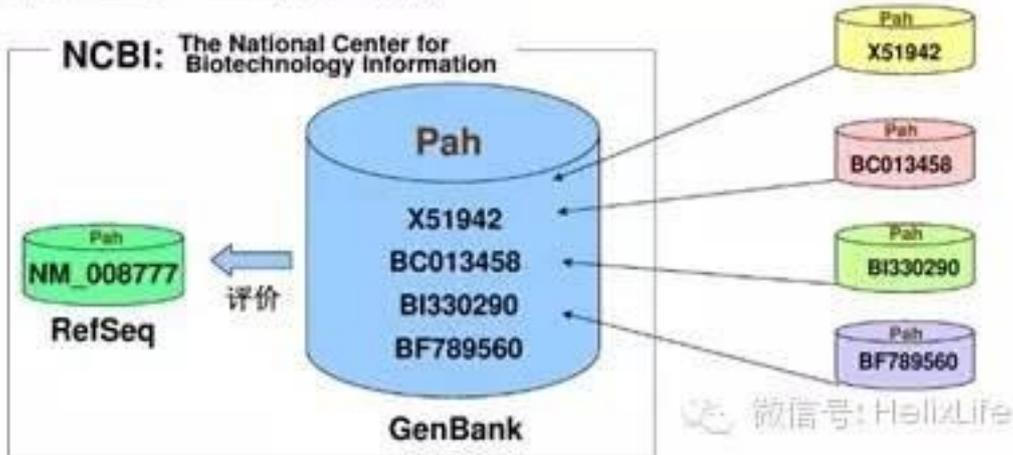


Real Time PCR引物及探针设计



通过NCBI获得参考序列和相关情报，RefSeq数据库提供无重复，准确性，完整性的基因参考序列。
序列可信度高，信息量大

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>)



微信号: HelixLife

Real Time PCR引物及探针设计



NCBI提供目的基因相关信息
(基因名、染色体上的位置、Accession、表现型、文献索引、同源性等其他数据库以及功能、pass way、蛋白质图谱等)

基因词典

微信号: HelixLife

Real Time PCR引物及探针设计

The diagram illustrates four examples of primer and probe design, with annotations indicating errors and a flowchart on the right side.

- Example 1:**
 - Top primer: 5'- CCTGGCCAAGGTCCTCCTG -3' (with a red X over the last 'G')
 - Bottom primer: 5'- TTGGAACCAGGGCACTGTGT -3' (with a red T at the 3' end)
 - Annotation: 3' 末端的T (3' terminal T)
- Example 2:**
 - Top primer: 5'- AAAGCAGTTTGCTGACATTGCCTAC -3'
 - Bottom primer: 5'- TTCAGAGTCCTGAACACCGTTCC -3'
- Example 3:**
 - Top primer: 5'- ACTCTTGGGACATTCGCCTTG -3'
 - Bottom primer: 5'- TTTTCTAGCTCCAGGGCC -3'
 - Annotation: 3bp互补 (3bp complement) with a red arrow pointing to the 3bp overlap between the primers.
 - Annotation: 3' 末端的T (3' terminal T) with a red X over the last 'G' of the top primer.
- Example 4:**
 - Top primer: 5'- AAAGTCATGAACAGAACTGA -3'
 - Bottom primer: 5'- GTCATCTCCACTATGTTAG -3'
 - Annotation: SNP (Single Nucleotide Polymorphism) with a red X over the 'A' in the top primer.

Flowchart on the right:

- 目的基因 (Target Gene)
- 目的基因序列获得 (Target Gene Sequence Acquisition)
- 引物设计 (Primer Design)
- 序列分析 (Sequence Analysis)
- 特异性确认 (Specificity Confirmation)
- 基因组序列确认 (Genome Sequence Confirmation)
- Real Time RT-PCR 引物 (Real Time RT-PCR Primers)

微信号: HelixLife

Real Time PCR引物及探针设计

The screenshot shows the NCBI BLAST search interface with annotations for database selection and word size.

- Database Selection:** The "Choose database" dropdown is set to "refseq_rna", with a yellow box and arrow pointing to it labeled "参考数据库 → RefSeq-rna".
- Species Selection:** The "Taxonomy" dropdown is set to "H", with a yellow box and arrow pointing to it labeled "物种选择".
- Word Size:** The "Word size" field is set to "7", with a yellow box and arrow pointing to it labeled "WordSize → 7".

Flowchart on the right:

- 目的基因 (Target Gene)
- 目的基因序列获得 (Target Gene Sequence Acquisition)
- 引物设计 (Primer Design)
- 序列分析 (Sequence Analysis)
- 特异性确认 (Specificity Confirmation)
- 基因组序列确认 (Genome Sequence Confirmation)
- Real Time RT-PCR 引物 (Real Time RT-PCR Primers)

微信号: HelixLife

Real Time PCR引物及探针设计

5'- AAAGCAGTTTGCTGACATTGCCTAC -3'

5'- TTCAGAGTCCTGAACACCGTTC -3'

UCSC Genome Browser on Mouse May 2004 Assembly

<http://genome.ucsc.edu>

目的基因

目的基因序列获得

引物设计

序列分析

特异性确认

基因组序列确认

Real Time RT-PCR
引物

Real Time PCR用TaqMan探针设计原则

Probe 长度	★★	20-24bp
T _m 值	★★★	探针的T _m 比引物高8-10℃
序列	★	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 目的序列GC含量相对较高的区域设计 ◆ 整体上碱基不能过偏 ◆ 个别部分避免GC rich或AT rich (特别是3'端)避免T/C连续, A/C连续)
5'末端序列	★	探针5'末端的第一个碱基不能是G
互补性	★★★	Probe内部或Probe与两条引物之间避免3base以上的互补序列
特异性	★★★	BLAST检索确认Probe特异性

★号表示重要程度, ★号越多, 表示该参数越重要, 设计时要优先考虑

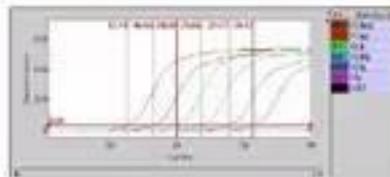
Real Time PCR引物及探针设计

TaqMan探针荧光标记物选择

3'淬灭基团	淬灭基团性质	建议使用的5'报告基团
TAMRA	荧光物质	FAM, HEX, TET, JOE等
Eclipse	非荧光物质	FAM, HEX, TET, JOE, TAMRA, ROX等

微信号: HelixLife

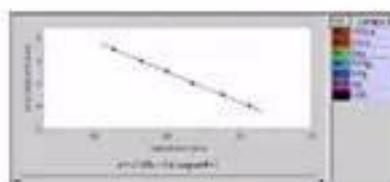
引物反应性确认



线性关系、扩增效率确认

相关系数 (r^2): 大于0.98

PCR扩增效率 (E): 0.8-1.2



检测灵敏度确认

35Cycles内可得到好的定量结果

如果采用SYBR检测方法, 30Cycles内
无非特异性产物扩增



No template control确认

30Cycles内无引物二聚体产生

微信号: HelixLife

PCR条件优化顺序

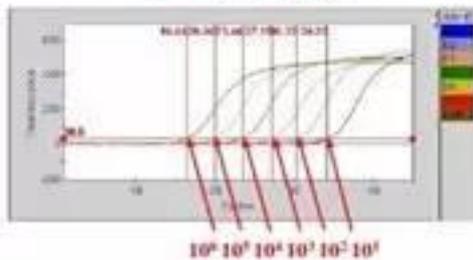
A. 扩增效率低时 <ul style="list-style-type: none">• 延长退火、延伸时间• 提高退火、延伸温度• 改为三步PCR, 降低退火温度• 提高引物浓度	标准Protocol 95℃ 10sec. 60℃ 20sec. (Primer 终浓度200nM)	B. 有非特异性扩增时 <ul style="list-style-type: none">• 提高退火温度• 缩短退火、延伸时间• 降低引物浓度
---	--	--

3. 结果解析

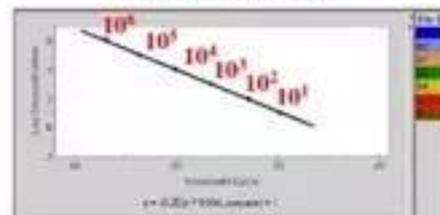
3.1 标准曲线解析

标准曲线制作

扩增曲线



标准曲线



- 标准品梯度的选择: 5~6个梯度
- 标准品稀释倍数的选择: 标准品稀释倍数通常为10

标准品的种类

DNA样品定量标准品

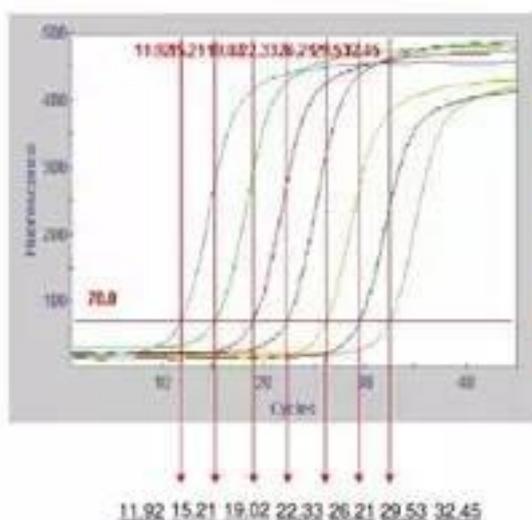
- 基因组DNA
- 质粒
- PCR产物

RNA样品定量标准品

- Total RNA & cDNA
- 体外转录RNA
- PCR产物或质粒

微信号: HelixLife

理想的标准品扩增曲线



- 基线平整
- Negative control为水平线
- 指数区较明显，陡度大
- 平台区汇于一起
- 线性范围宽

微信号: HelixLife

理想的标准曲线

相关系数 (r^2): 大于0.98, 越接近1, 结果可信度越高。

扩增效率 (E): 0.8-1.2, 越接近1, 越理想。

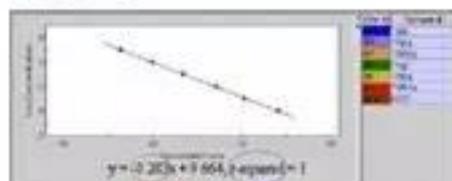
扩增效率 (E) 计算方法

- 标准曲线X轴表示起始模板浓度 (\log_{10}), Y轴表示Ct值时

$$E = 10^{-1/s} - 1$$

- 标准曲线X轴表示Ct值, Y轴表示起始模板浓度 (\log_{10})

$$E = 10^{-s} - 1$$

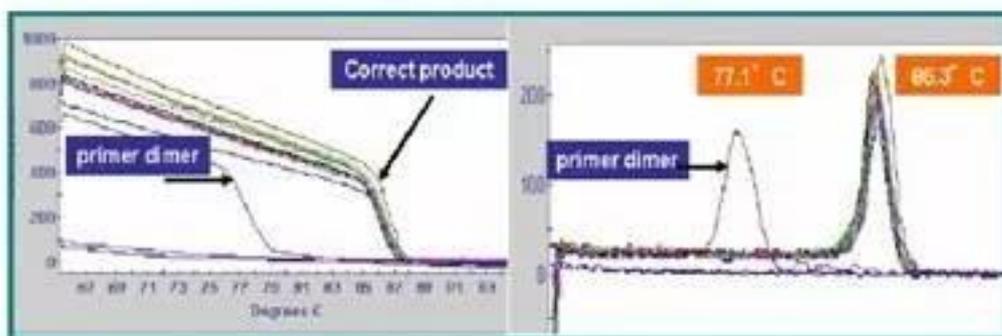


斜率 相关系数

微信号: HelixLife

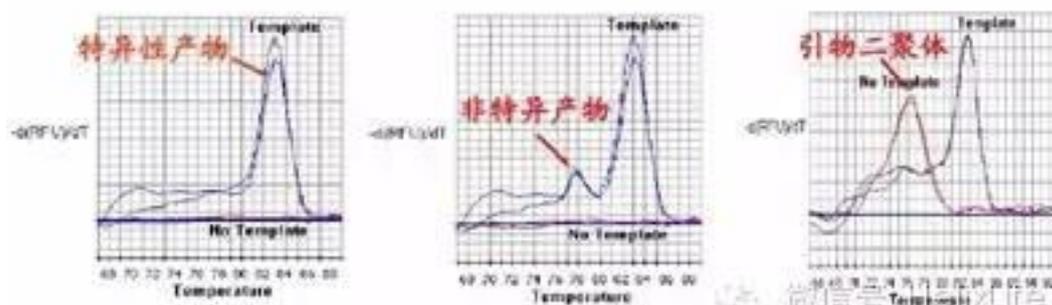
3.2 溶解曲线解析（重点）

SYBR Green I法进行检出时，
要根据融解曲线确认PCR产物的特异性。



T_m 值是指双链DNA分子解链一半时的温度。

对PCR产物特异性进行分析



3.3 绝对定量和相对定量

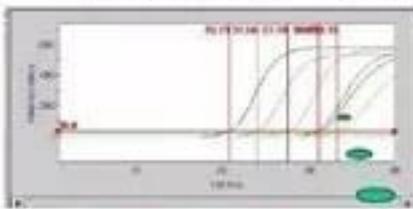
绝对定量解析方法



绝对定量解析方法

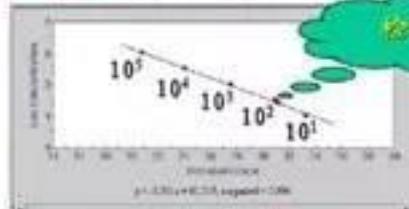
通过制作标准曲线来确定样品的初始模板拷贝数或浓度。通常应用于病毒、细菌、衣原体、支原体的定量检测及转基因食品的检测。

Std ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Status	FAM StdRes	FAM Ct	TxR StdRes	TxR Ct
A1	qara-PCR	10-5	STD	OK	160300.00	20.83	0.00	6.30
A2	qara-PCR	10-4	STD	OK	16030.00	24.06	0.00	6.50
A3	qara-PCR	10-2	STD	OK	1603.00	27.59	0.00	14.37
A4	qara-PCR	10-2	STD	OK	160.00	31.61	0.00	32.26
A5	qara-PCR	10-1	STD	OK	16.00	33.95	0.00	32.34
A6	qara-PCR	H2O	STD	OK	0.00	0.00	ND	32.37
A7	qara-PCR	sample	UNKNOWN	OK	67.603	31.24	ND	33.16



扩增曲线图

检测样品

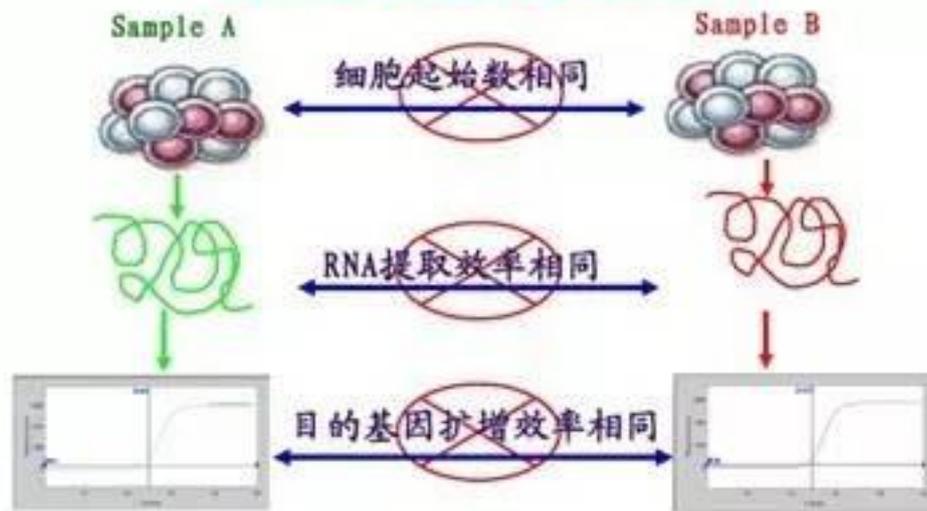


标准曲线图

微信号: HelixLife

实际上目的基因表达量分析

进行相对表达量分析必要性



以上条件不可能同时得到满足，必须用内对照（管家基因）校正，进行相对表达量分析。

管家基因

维持细胞基本代谢活动所必须的基因，

如：GAPDH、Actin、18S rRNA等。

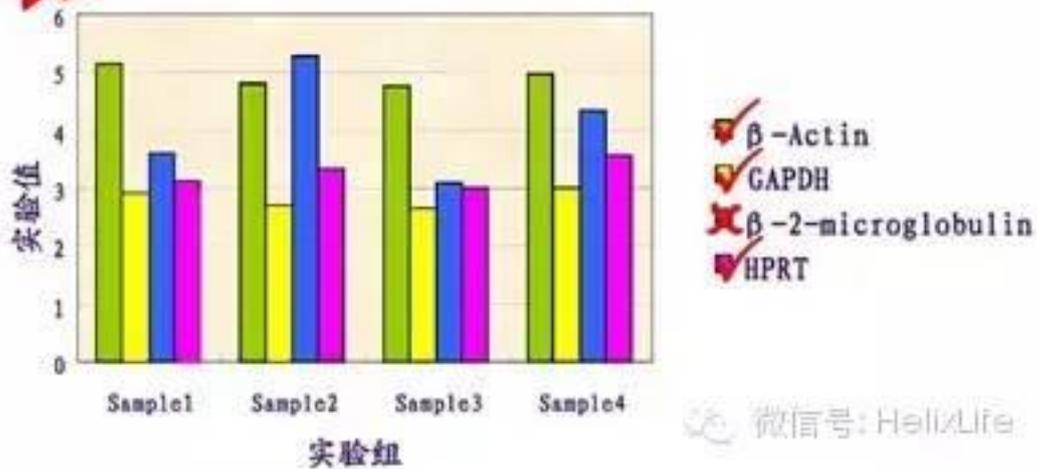
筛选方法

- 根据文献提供
- 通过具体实验筛选



管家基因筛选

实验例



相对定量解析顺序

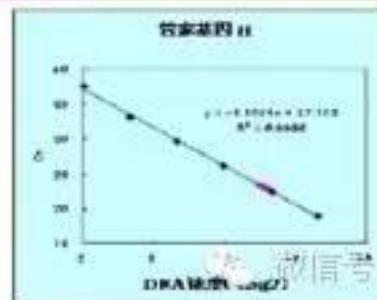
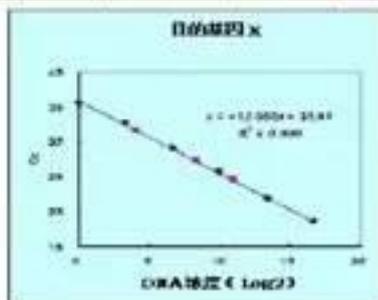
用实验例对相对定量计算进行说明

检测样品	目的基因	管家基因
RNA样品1	X	H
RNA样品2		
RNA样品3		

微信号: HelixLife

相对定量解析顺序

	目的基因 X			管家基因 H		
	已知量	Ct	定量结果	已知量	Ct	定量结果
标准品1	1	35.66		1	37.46	-
标准品2	10	32.77		10	33.86	-
标准品3	100	29.20		100	29.63	-
标准品4	1000	25.75		1000	26.28	-
标准品5	10000	22.86		10000	22.55	-
标准品6	100000	18.42		100000	18.88	-
Sample1	-	27.22	343.3	-	23.57	6391.5
Sample2	-	31.78	17.3	-	22.78	8589.7
Sample3	-	24.62	1946.1	-	22.93	7432.9



微信号: HelixLife

相对定量解析顺序

相对表达量计算

通过标准曲线对对照样品、检测样品的目的基因及管家基因进行定量，然后根据计算公式求得相对值即为相对表达量。

$$\text{校正值} = \frac{\text{目的基因定量结果}}{\text{管家基因定量结果}}$$

$$\text{相对值} = \frac{\text{检测样品的校正值}}{\text{对照样品的校正值}}$$

检测样品	管家基因H	目的基因X		
	定量结果	定量结果	校正值	相对量
RNA样品1	6391.5	343.4	0.0537	1.000
RNA样品2	8589.7	17.3	0.0020	0.037
RNA样品3	7432.9	1946.1	0.2618	4.874



从 qPCR 到二代测序——高大上就一定妥妥的？

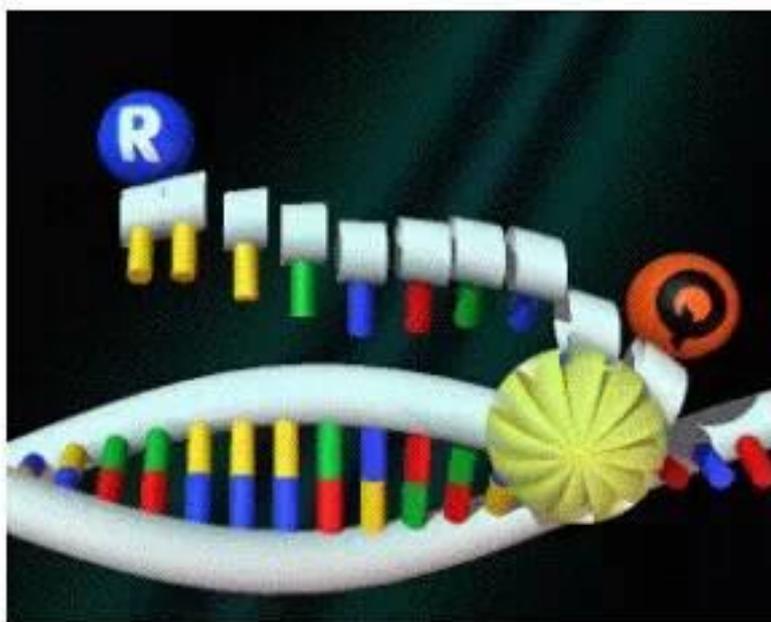
作者：老谈

我最近听到一个故事，说有人想用“高帅富”的二代测序检测乳腺癌 MCF-7 细胞里基因 Pim3 的表达量，有所震惊，“高射炮打蚊子”的节奏？！也不知道是哪位小伙伴老板这么有钱，倘诺老板懂那么点基础实验，定会打烂各位的屁股。

据说这位童鞋得到老板的 5 字箴言——“做个预实验”，老板就是老板，绝不跟你多说一个字的废话，剩下的自己研究。于是这位童鞋首先打算检测乳腺癌 MCF-7 细胞里基因 Pim3 的表达量，这也是小伙伴们在预实验经常面临的。

最初他打算用 qPCR 检测细胞内 mRNA 的表达量，qPCR 有两化学方法——探针法和染料法，这位童鞋选择的是相对便宜的 SYBR green 染料法。

探针法



染料法



但是偏有好事之徒指点江山，“为啥要做 SYBR green 染料法的 qPCR 呢？要做定量 qPCR 的话，不如做 Taqman 探针法的 qPCR 来得精确。有文章介绍过，SYBR green 来做 qPCR 的话，是会有很严重问题的。因为 SYBR green 会抑制 PCR 反应，得出来的结果没有探针来的效果好，其实价钱也没差很多！”

这位临床高手+实验室菜鸟，在他人的建议之下，开始转向研究 Taqman 探针，好不容易摸出点门道，准备将 Taqman 探针发给公司合成。实验室又出现另一个“好事之徒”，建议其直接检测乳腺癌 MCF-7 细胞系 Pim3 蛋白表达量，理由如下：mRNA 表达降低，并不代表蛋白表达会降低呢，因为如果蛋白的泛素化停滞，蛋白就会累积；又或者蛋白的磷酸化不断激活，也会导致蛋白作用的变化。所以用 Taqman 探针还不如用 Western Blot 来得直接，直

接检测蛋白表达、磷酸化、泛素化的变化，以防后患。抗体的价钱也就比 Taqman 探针贵了那么一点而已。

这位童鞋实验本就是七窍通了六窍，觉得也是嘛有道理的，于是忽忽悠悠地就查了各种抗体的供应商，你懂的，对于入门菜鸟，要研究会 Western 也不是容易的事情。你认为这就结束了？

说来话巧，造化弄人，又来一位指点江山的师兄，“你要研究基因表达变化，干嘛不就做一张芯片呢？一下子就出来全部基因组里的表达变化，多好！想要啥就有啥，里面 2w 多个基因随你挑！跟这个基因表达相关的上下游通路，啥都一清二楚，绝对是居家旅行，沉默表达必备的利器啊！价钱么也就比抗体贵一点点，少定几个抗体就都有了，多划算呢！”

此后几周，这位童鞋找了几家芯片公司，好好地恶补什么是 mRNA 芯片、miRNA 芯片、LNCRNA 芯片。最后这位同学找到了华大基因准备做二代测序，究其原因，有人告诉他，芯片这种东西已经过时了，完全跟不上现在时代的套路了，要做就做二代测序。

这个故事固然离奇，但是“高射炮打蚊子”这种事情，干过的小伙伴可以默默地举个手！

老谈闲谈：

这位童鞋有以下几点误区：

1、SYBRGreen 在高浓度情况下会抑制 PCR 反应，但普通的 qPCR 2×Mix 是不会出现这样的情况；

2、蛋白的检测确实可以说明表达的问题，泛素化、磷酸化也能检测蛋白的作用，其实检测 mRNA 也能解决大部分的表达问题，蛋白表达一般是在 mRNA 表达差异不明显的情况下再使用的；

3、芯片是高大上的，但单基因变化，完全用不上基因芯片，而且在做基因芯片之前，也需要在有表达差异的细胞或者组织间进行；

4、二代测序是更高大上的技术，深度测序可以了解低频的突变，转录本的测序可以了解细胞组织的整体的表达情况，要是你只是检测单基因完全没必要搞得那么复杂；

5、当实验室的师兄，特别是表面上很有科研能力的师兄怂恿你用新技术的时候，请千万要三思而行，自己思考一下才会省去很多不必要的麻烦；

6、记得给老板省点钱，不然小伙伴们不好交差，倘若自己是老板的小伙伴，自己的经费更

要省着花才对。

Real-Time PCR：从原理到步骤详解、再到 终极数据分析

作者：猫大

小伙伴们，今天我们来解析一下 Real-Time PCR，从原理到步骤详解再到数据分析，一个都不能少！

在正式开讲之前呢，猫大必须要安利一个网址：<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>。对，这就是著名的哈佛引物库！

MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL

CCIB The Center for Computational and Integrative Biology

HARVARD MEDICAL SCHOOL

PrimerBank

PCR Primers for Gene Expression Detection and Quantification

Home/Search PCR Protocol Primer Statistics Comments Primer Submission Links Citation Policy Help/FAQ

Primer Search

Search for PCR Primers

Search by

Species

For text

You can blast your sequence against the primerbank sequence DB [here](#).

Order Oligos

You can have primers synthesized and PCR reaction products sequenced at:

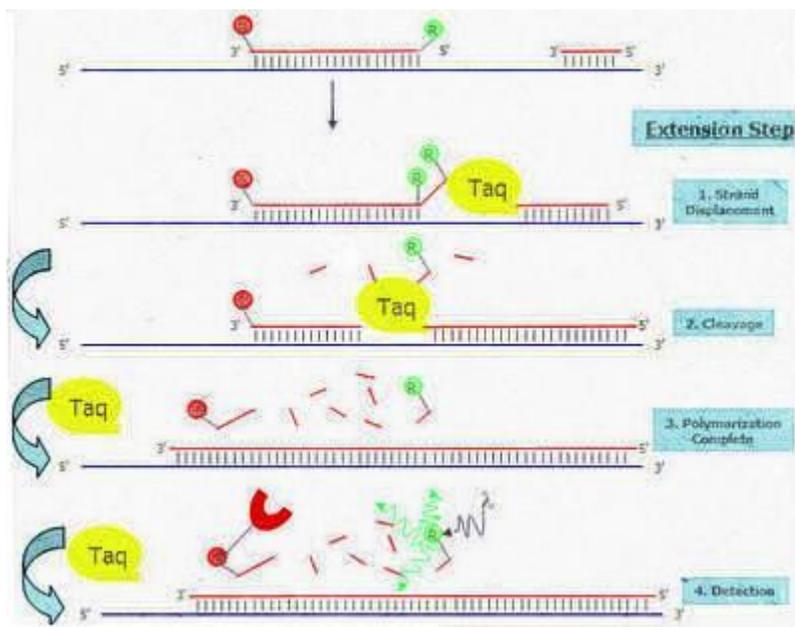
DNA Core Facility
Center for Computational and Integrative Biology

目前 PrimerBank 收录了超过 306,800 对 Real-Time PCR 引物，涵盖了大部分人类和小鼠基因。小伙伴们可以用 [GenBank Accession](#), [NCBI protein Accession](#), [NCBI Gene ID](#), [Gene Symbol](#), [PrimerBank ID](#) 或者关键词去库里搜索引物。而且还整合了 blast 功能，可以拿目的基因序列去 primerbank 的数据库里进行 blast。据说其中收录的 26,855 对小鼠引物经过 Real Time PCR 验证后，其中 22,187 对引物是可用的，成功率有 82.6%!!! 但是猫大建议小伙伴们，在库里搜索到引物之后呢，别忘了用 oligo 6 评价一下引物，多练习一下 oligo 6 的使用也是很好的嘛。

好，下面开讲 Real-Time PCR，我们就从 Real-Time PCR 的发展史说起，包括 [Real-Time PCR 的原理](#), [实验设计](#), [实际操作](#), [数据分析](#), [常见问题解答五个方面](#)，手把手教你从各个方面了解 Real-Time PCR。由于内容比较多，这五个部分会分成 3 讲。首先是 Real-Time PCR 的原理，实验设计和实际操作。

Real-Time PCR 发展史

Real-Time PCR 的技术的发展是伴随着 Real-Time PCR 仪的研制。1995 年，美国 ABI 公司（已经并入 Invitrogen 公司）成功研制了 Taqman 技术，并推出了首台荧光定量 PCR 检测系统 7700，通过检测每个循环的荧光强度对 PCR 进程进行实时检测。由于在 PCR 扩增的指数时期，模板的 Ct 值和该模板的起始拷贝数存在线性关系，所以以 Ct 值可进行表达定量。由于 Real-Time PCR 能克服常规 PCR 的缺点，并且具有操作简便，灵敏度高，重复性好等优点，因此发展非常迅速，从而荧光定量 PCR 获得广泛应用。



Real-Time PCR 实验原理

实时 PCR 就是在 PCR 扩增过程中，荧光信号被收集，转化为成为扩增和熔解曲线，以实现
对 PCR 进程进行实时检测。具体数据就是基线，荧光阈值和 Ct 值。

Ct 值就是荧光值达到阈值时候的 PCR 循环次数。Ct 值跟初始模板的量成反比。第 3-15
个循环的荧光值就是基线 (baseline)，是由于测量的偶然误差引起的。阈值 (threshold) 一
般是基线的标准偏差的 10 倍。

实验设计

对于 Real-Time PCR 而言，首先就是实验材料的处理和准备；然后是引物设计；最后是实验和数据分析（这一部分单独说明）。

1. 实验材料的处理和准备

在第一讲 RNA 抽提中已经讲过一些，还需要注意的是，以最基本的基因表达差异分析为例，实验材料分为对照组（CON）和处理组（TRT）。组内要有复孔，要有生物重复，这样可以统计分析此处理是否有统计学意义。

2. 引物设计

一般 Real-Time PCR 引物的设计遵循下面一些原则：

扩增产物长度在 80-150bp。

引物应用核酸系列保守区内设计并具有特异性。

产物不能形成二级结构。

产物长度一般在 15-30 碱基之间。

G+C 含量在 40%-60%之间。

碱基要随机分布。

引物自身不能有连续 4 个碱基的互补。

引物之间不能有连续 4 个碱基的互补。

引物 5'端可以修饰。

引物 3'端不可修饰。

引物 3'端要避开密码子的第 3 位。

Taqman 探针的设计稍有不同，遵循以下原则：

尽量靠在上游引物；

长度 30-45bp， T_m 比引物高至少 5°C；

5'端不要是 G，G 会有淬灭作用，影响定

操作过程

1. RNA 提取和反转录：操作过程及注意事项见第一讲。

2. Mix 配制：一般 Real-Time PCR MasterMix 都是 2×的浓缩液，只需要加入模板和引物就可以。由于 Real-Time qPCR 灵敏度高，所以每个样品至少要做 3 个平行孔，以防在后面的数据分析中，由于 Ct 相差较多或者 SD 太大，无法进行统计分析。根据所用 MasterMix、模板和引物的不同进行优化，达到一个最佳反应体系。在反应体系配置过程中，有下面几点需要注意：

MasterMix 不要反复冻融，如果经常使用，最好溶解后放在 4 度。

更多的配制 Mix 进行，减少加样误差。最好能在冰上操作。

每管或每孔都要换新枪头！不要连续用同一个枪头加样！

所有成分加完后，离心去除气泡。

每个样品至少 3 个平行孔。

参比或者校正染料（reference dye, passive dye）常用的是 ROX。参比染料的作用是标准化荧光定量反应中的非 PCR 震荡，校正加样误差或者是孔与孔之间的误差，提供一个稳定的基线。现在很多公司已经把 ROX 配制在 MasterMix 或者 Premixture 里。如果反应曲线良好或已经优化好反应体系，也可以不加 ROX 染料校正。

通常来讲，Real-Time qPCR 的反应程序不需要像常规的 PCR 那样，要变性、退火、延伸 3 步。由于其产物长度在 80-150bp 之间，所以只需要变性和退火就可以了。SYBR Green 等染料法，最好在 PCR 扩增程序结束后，加一个溶解程序，来形成溶解曲线，判断 PCR 产物的特异性扩增。而溶解程序，仪器都有默认设置，或稍有不同，但都是在产物进行溶解时候，进行荧光信号的收集。

好啦！样品上机，qPCR 仪已经在努力奔跑了，数据出来后我们进入 Real-Time PCR 的数据分析阶段！

相对于只能半定量的常规 PCR 而言，qPCR 的优点是既可以用于判断序列的有

无，即定性，也可以用于确定 DNA 拷贝数，即定量。而且 qPCR 的结果无需通过电泳，而是通过计算荧光值来评估。由此可见，数据分析在 qPCR 这项实验中的份量。

qPCR 的数据分析可以分成**相对定量**和**绝对定量**两种。比如处理组细胞与对照组细胞相比，X 基因的 mRNA 改变了多少倍，这就是相对定量；在一定数目的细胞中，X 基因的 mRNA 有多少个拷贝，这就是绝对定量。通常我们在实验室用得最多的就是相对定量的方法，本讲将详细解析相对定量的数据处理。

相对定量的分析结果是在相当量的实验组和对照组中一个靶基因的相对比率（倍数差异）。这种分析方法是通过等量样本间比较得到结果，需要进行归一化处理以确保相比较的两组样本具有可比性。通常会选择使用在各个样品中表达保持不变的基因作为参照基因（内参），用内参的表达水平来进行归一化处理。

相对定量 qPCR

何时选用相对定量 qPCR?

如果对 RNA 模板的数量不能精确定量，或者只需要知道目的基因的表达差异时，可以使用相对定量法。

常用的相对定量数据分析方法有：双标曲线法、 ΔCt 法、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法(Livak 法)、用参照基因的 ΔCt 法和 Pfaffl 法。

双标曲线法：每次实验都分别用标准品做内参基因和目的基因的标准曲线，并同时扩增各待测样本中的目的基因和内参基因。然后使用标准曲线来计算待测样本中的目的基因和内参基因的表达量。最后使用如下公式得出目的基因表达差异。

$$F = \frac{\text{实验组目的基因表达量/实验组内参基因表达量}}{\text{对照组目的基因表达量/对照组内参基因表达量}}$$

双标曲线法不受扩增效率差异的干扰。但是对每一个基因，每一轮实验都必需做标准曲线，而且必需有固定的标准品做标准曲线。

ΔCt 法：不用内参基因作为标准，实验设计简单，数据分析处理简单。需要准确量化初始材料（如细胞数目或核酸微克数），扩增效率为 100%。计算公式如下：

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{-(\text{实验组 Ct} - \text{对照组 Ct})}$$

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法：这是最常用的进行相对基因表达分析的方法，得到的结果是实验组中目的基因相对于对照组中目的基因表达的差异倍数。要求目的基因和内参基因的扩增效率都接近 100%，且相对偏差不超过 5%。计算公式如下：

首先用内参基因的 Ct 值对实验组(test)和对照组 (con)的靶基因 Ct 值进行归一化：

$$\Delta Ct_{\text{test}} = \text{实验组目的基因 Ct 值} - \text{实验组内参基因 Ct 值}$$

$$\Delta Ct_{\text{con}} = \text{实验组目的基因 Ct 值} - \text{实验组内参基因 Ct 值}$$

随后用对照组的 Ct 值归一实验组的 ΔCt：

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{test} - \Delta Ct_{con}$$

最后计算表达水平的差异倍数:

$$\text{Change Fold} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

用参照基因的 ΔCt 法: 这个方法的使用前提与 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法相同。计算方法如下:

$$\text{对照组表达} = 2^{-(\text{对照组内参 Ct} - \text{对照组目的基因 Ct})}$$

$$\text{实验组表达} = 2^{-(\text{实验组内参 Ct} - \text{实验组目的基因 Ct})}$$

这种方法得到的对照组表达水平不是 1.0, 但如果将得到的两个表达值都除以对照组表达值, 则得到:

$$\text{对照组 Ratio} = 1$$

$$\text{实验组 Ratio}$$

$$= 2^{-(\text{实验组内参 Ct} - \text{实验组目的基因 Ct})} / 2^{-(\text{对照组内参 Ct} - \text{对照组目的基因 Ct})}$$

$$= 2^{-[(\text{实验组目的基因 Ct} - \text{实验组内参基因 Ct}) - (\text{对照组目的基因 Ct} - \text{对照组内参基因 Ct})]}$$

$$= 2^{-(\Delta Ct_{test} - \Delta Ct_{con})}$$

$$=2^{-\Delta\Delta Ct}$$

得到的比值与 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法是相同的，因此用参照基因的 ΔCt 法是 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的一种变化形式。

Pfaffl 法: 当目的基因扩增效率(E target)和内参基因扩增效率(E ref)不同，但每个基因在实验组和对照组扩增效率相同时，可以按下列计算公式确定表达差异。

首先，与 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法的计算过程一样，先进行归一化校准：

$$\Delta Ct_{target} = \text{对照组目的基因 } Ct - \text{实验组目的基因 } Ct$$

$$\Delta Ct_{ref} = \text{对照组内参基因 } Ct - \text{实验组内参基因 } Ct$$

随后计算表达水平的差异倍数：

$$\text{Change Fold} = (E_{target})^{\Delta Ct_{target}} / (E_{ref})^{\Delta Ct_{ref}}$$

如果 $E_{target} = E_{ref} = 2$ ，那么 Pfaffl 法就可以简化为：

$$\text{Change Fold}$$

$$= 2^{\Delta Ct_{target}} / 2^{\Delta Ct_{ref}}$$

$$=2^{\Delta Ct \text{ target}-\Delta Ct \text{ ref}}$$

$$=2^{(\text{对照组目的基因 Ct}-\text{实验组目的基因 Ct})-(\text{对照组内参基因 Ct}-\text{实验组内参基因 Ct})}$$

$$=2^{-[(\text{实验组目的基因 Ct}-\text{实验组内参基因 Ct})-(\text{对照组目的基因 Ct}-\text{对照组内参基因 Ct})]}$$

$$=2^{-(\Delta Ct \text{ test}-\Delta Ct \text{ con})}$$

$$=2^{-\Delta \Delta Ct}$$

因此，事实上， $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 法是 Pfaffl 法的简单特例。

那么，这些方法我们都必须一一掌握吗？NO！只需要掌握最实用的双标曲线法和 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 法就足够应付所有情况了。

RNA 反转录又失败了？填坑还得看这六大要素！

作者：子非鱼

老话说的好，万事开头难。而这话在 RT-PCR 中则体现的淋漓尽致，其开头的第一步——将 RNA 反转为 cDNA，表面上看似简单，实际上则暗潮汹涌，指不定就在哪里挖个坑，就会让斗志高昂的实验汪们摔的鼻青脸肿，而且还不知道是咋掉坑的。

显然，RNA 的反转录成功，不是想有就能有。大家之所以屡败屡战、屡战屡败，就是因为忽

略了以下这 6 个必备要素，不然此坑早就被填平，又何至于整日里看着悲催的实验结果唉声叹气呢？

RT Primer 的最佳选择

通常 RT primer 可分为三类：oligo dT，随机引物以及基因特异性引物。Oligo dT 引物之所以应用范围更加广泛，是因为可由此获得 mRNA 的全长拷贝。

然而如果 mRNA 长度过长>4kb，或者没有 polyA 尾（原核 mRNA 或 rRNA），就需要考虑使用随机引物进行 RNA 的反转录。随机引物虽能确保长基因的 5'末端的转录，但并不能获得整个基因全长的 cDNAs，且对 RNA 样品质量要求比较高，此时可用 6-8 个核酸聚合体来提高 cDNAs 的合成量。

而对于真核生物的 qPCR，长随机引物和 Oligo-dT 引物的混合物似乎能给出一个漂亮的结果。针对此类优化混合引物，已有两家公司的试剂盒或可助大家一臂之力：Qiagen QuantiTect Rev. Transcription Kit 和 BioRad iScript Kit。

第三个选择就是基因特异性引物，仅扩增需要的 cDNA，适用于目的序列已知的情况。通常在一步 RT-PCR 法中可使用此类引物，因为该引物也可用作为 PCR 中的反向引物。

RNA 的二级结构

若要获取全长 RNA 的反转录，那么 RNA 二级结构的问题就不可忽略，因为反转录酶在遇到此类结构后会终止反应或从模板上脱落下来。

也许你很难判断 RNA 是否具有二级结构，但如果基因中 GC 含量较高，通常意味着 RNA 很难被变性且不可能是单链，此时就需要在 65°C 5min 对其进行充分变性，以避免其对实验结果的影响。

另外，还有一种方法可解决此问题，即使用一种最适温度高于正常标准（37°C-42°C）的反转录酶。比如来自 Life Technologies 的 ThermoScript 酶就常用于具有复杂结构 RNA 的反转录。当然也存在一些即使在常规逆转录温度（37°C-42°C）的条件下，也能跨过 RNA 二级结构的高效率逆转录酶，即使是针对富集 GC 序列的 RNA 也能得到很好的结果，如 Qiagen 公司的逆转录酶 Omniscript 和 Sensiscript，以及 Takara Bio 公司的 PrimeScript RT enzyme。

去除 gDNA

RNA 中存在的基因组 DNA（gDNA）污染可能是最终 PCR 反应中假阳性结果出现的原因，目前已存在很多方法去除 gDNA，比如通过 DNAase 对提取的 RNA 进行预处理。

以上方法无可避免会造成 RNA 的蛋白污染，因而这里介绍一种可绕开酶处理的方法，即针对 RNA 设计一种包含内含子或内含子-外显子边界的引物，如此 DNA 就不会产生扩增抑或即便扩增了其条带大小也与 cDNA 不同。

但值得注意的是，使用该方法时基因中要没有假基因存在，假基因（pseudogene）是插入到基因组中剪切 mRNA 的 DNA 拷贝，否则也会产生假阳性结果。

而对于没有内含子的原核 RNA，gDNA 的去则更是基因表达准确测量的一个至关重要的因素。使用 DNAase 处理 RNA 是唯一的方法，Quantitect Rev.Transcription Kit 中所包含的 gDNA 清除缓冲液就可在无需加热或 EDTA 失活的条件下降解 DNA。此外，具有 gDNA Eraser (Takara Bio) 的 PrimeScript RT 试剂盒也可去除 gDNA，且能在不到 20 分钟之内快速完成 RNA 的 cDNA 合成。

检测 RNA 分子的完整性

毫无疑问，RNA 质量对 cDNA 合成结果会产生重要的影响，而不同批次间 RNA 质量差异也导致 RT-PCR 产生不同的结果。所以在进行 RT-PCR 前，应该检查 RNA 条带的质量，可通过琼脂糖凝胶电泳进行检测。通常完整的真核 RNA 应包括 28S 和 18S RNA 条带，且较大的条带的强度应是较小条带的两倍左右，另外两个条带强度大致相同也是可以的。

而另一种准确测量 RNA 质量的方法是使用 Agilent BioAnalyzer 仪器，它可将 RNA 分子可视化并能在分析 RNA 完整数值 (RNA Integrity Number, RIN) 后给出一个质量的量化标准。RIN 为 8-10，则表示 RNA 质量非常好；当 RIN 值低于 7，则说明 RNA 可能有降解，可能会导致一些罕见信息的丢失等问题。

RNA 定量

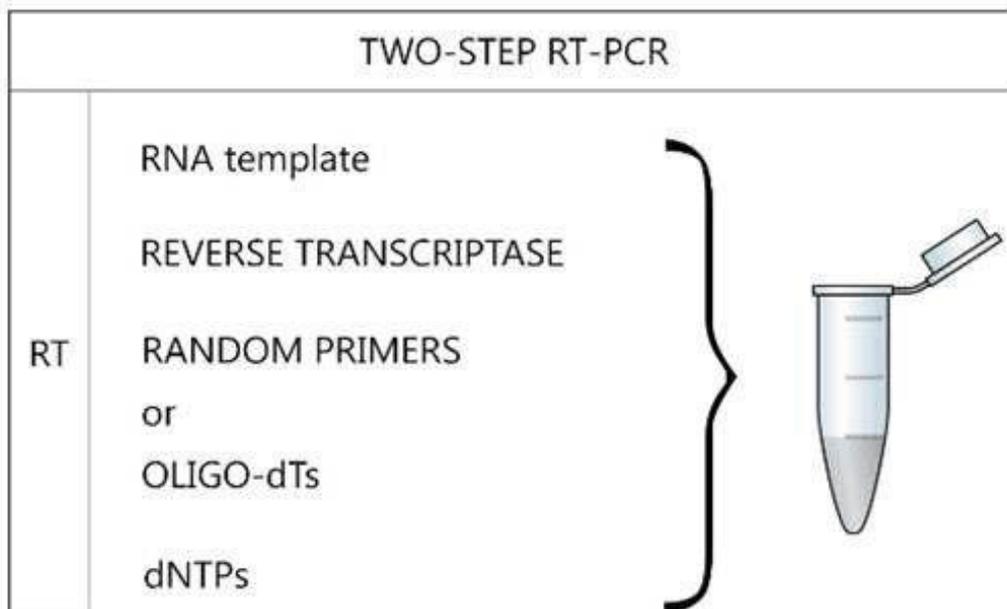
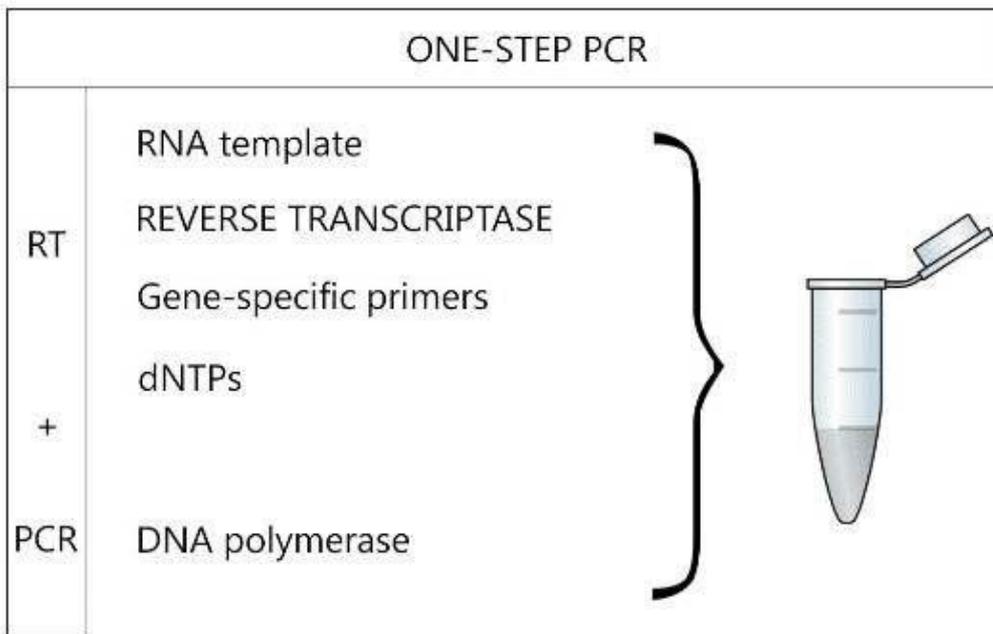
除了掌握 RNA 的完整性之外，准确评估产量也很重要。产量的准确性会受到以下因素的影响：测量仪器的准确性、DNA 的污染、盐的污染以及降解程度。而为了准确测量产量，小编更喜欢使用 Nanodrop 进行 UV 定量。

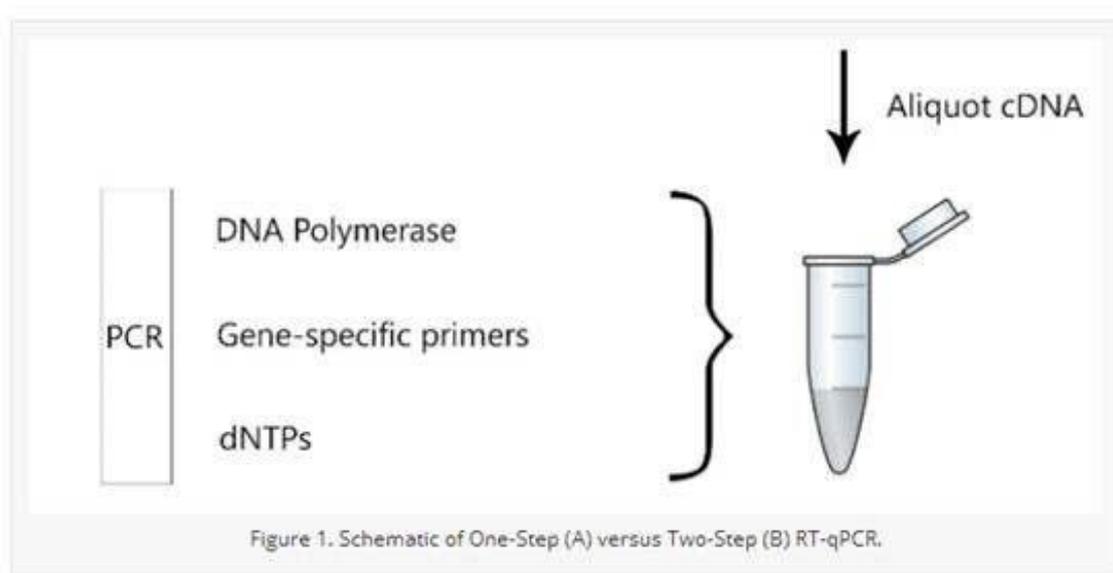
该仪器不需要稀释样品，并且具有非常宽的测量 RNA 的范围。以小编的经验，它可以准确读取到 10ng / ul。而传统的紫外分光光度法应避免使用大容量的比色皿，因为这需要耗费大量的样品。此法的缺点是也可在样品中测量基因组 DNA，如果从 RNA 提取过程残留盐或酚，则会增加吸光度，使得 RNA 的 OD 值变得更高。

而解决此问题一个方法是使用荧光染料，Ribogreen 是一种 RNA 特异性染料，可通过荧光来测量 RNA 产量。现在，Nanodrop 已经具备检测 Ribogreen 所发出荧光的功能。

两步法或一步法 RT-PCR

RT-PCR 也分两种类型：一步法（One-step PCR）和两步法（Two-steps PCR），具体操作见下图。前者，RT 反应和 PCR 扩增是在同一个反应管中进行的；而后者，RT 反应与 PCR 扩增反应单独进行。





尽管这两种方法都能得到最终的结果，但是每种方法都有优缺点。选择哪种方法取决于各种因素。如下总结它们的优缺点。

一步 RT-PCR 消除了样品转移步骤，不仅消除了控制物污染的潜在来源，而且需要较少的准备和操作时间。又因一步 RT-PCR 中所使用的引物是基因特异性的，灵敏度高，常用于分析低表达水平基因。而其不足在于同一样本中只有有限数量的目的基因被扩增，且需要在转录和扩增间寻找一个平衡。

所以当时间对实验很重要时，一般采用一步法，如检测 RNA 病毒，也适用于高通量分析。由于该法的检测结果准确率高，因而在需要测量表达水平上的细微差异时，也可采用此方法。

而两步 RT-PCR 可将大批量的 RNA 转化为 cDNA，然后储存 cDNA 用于后续实验，可检测大量基因；在分别优化 RT 和 PCR 步骤后，可更好地控制实验过程；又因只有少量的转录本被用于 PCR，则任何可能从 RNA 分离到 RT 反应的抑制剂（如乙醇、酚及胍盐等）都被稀释了。

但是两步 RT-PCR 更耗费时间,且带来污染的可能性更高;RT 过程应以相同效率反转录 RNA,否则会影响 qPCR 的启动效率,进而带来不同的实验结果,因此对于每个 RT 反应应使用相同的条件。

如果你需要对同一样本的多个目标进行分析时,可选择两步 RT-PCR。另外,当 RNA 的存储是个问题时,最好是进行两步 RT-PCR,因为 cDNA 在-20℃是稳定的。

参考文献:

1.Six Important Factors for Successful Reverse Transcription

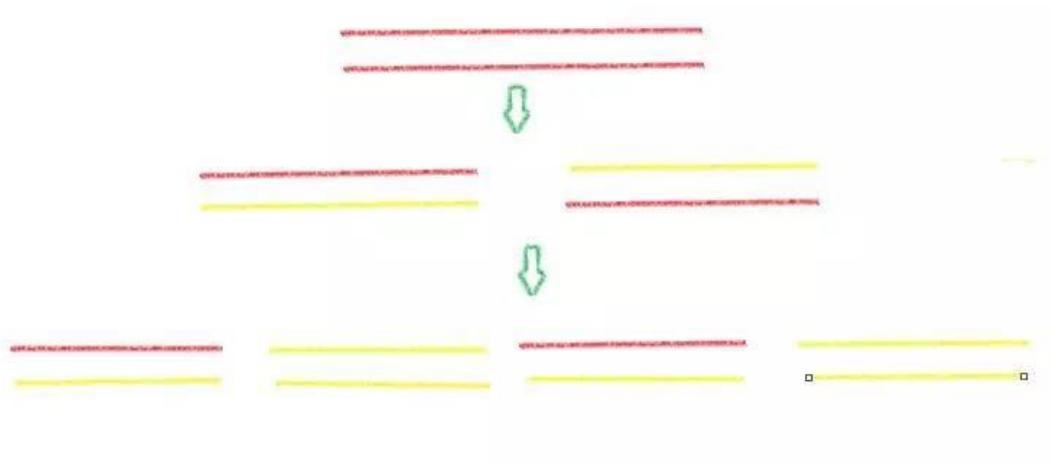
2.How to Choose the Correct Reverse Transcription Method

读图 | qPCR 那些奇奇怪怪的曲线都代表啥?

作者:子非鱼

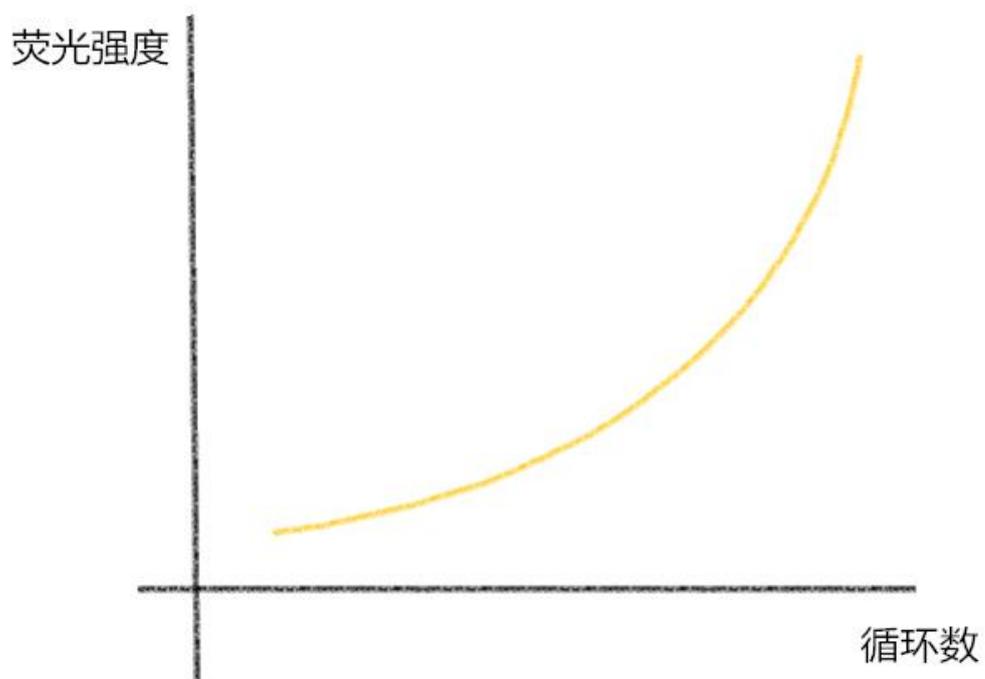
在 qPCR 中会与各式各样的曲线打交道,每种曲线都有其不同的意义,甚至能够通过看曲线来发现实验中的一些问题。

我们知道 PCR 的本质其实就是一变二、二变四、四变十六……产物呈指数增长的数字游戏。



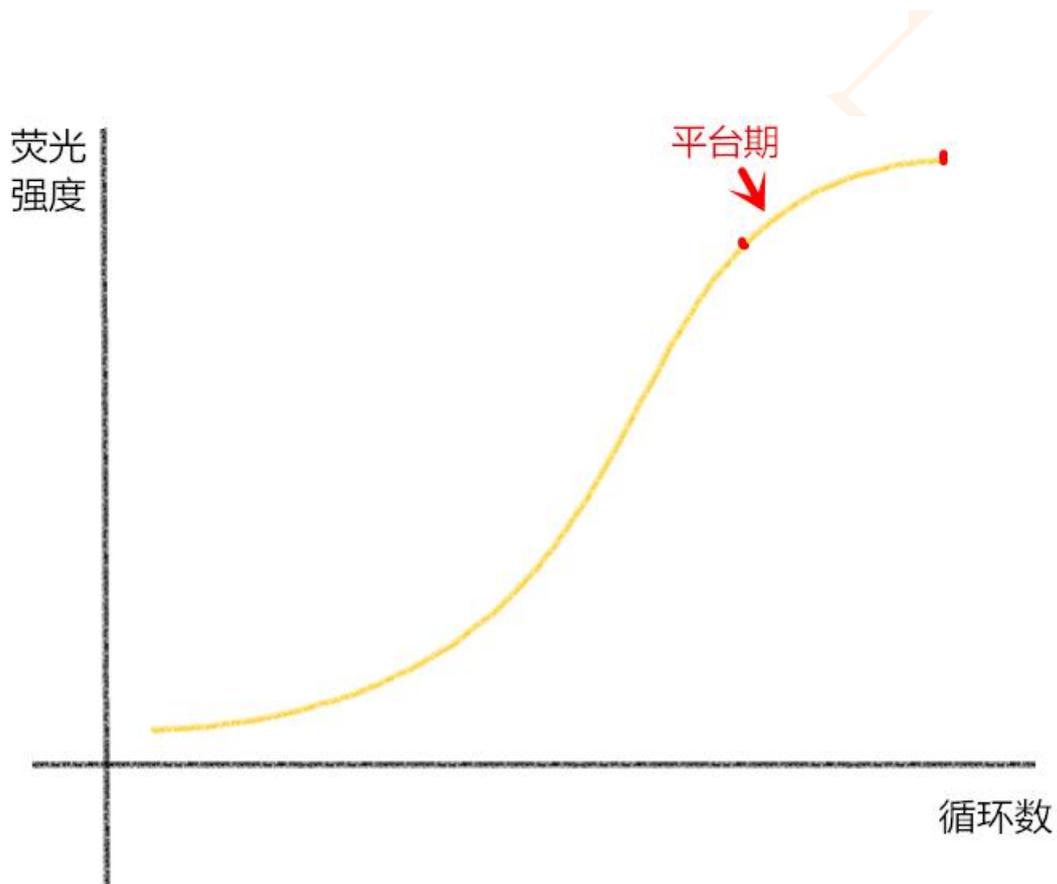
PCR 原理

因此，在引物、模板、缓冲液、酶等都充足的理想状态下，荧光定量 PCR 的扩增曲线应该是这样的：



理想状态下的扩增曲线

然而，理想很疯狂，现实却很“性感”，看下面的“S 型”曲线就知道，相对于理想状态下的扩增曲线，在 dNTP 和酶都有限的情况下，扩增曲线如下图所示，有一个平台期，酶逐渐失活，dNTP 消耗殆尽，产物增加量逐渐减少；直至没有任何产物生成，数目保持恒定。

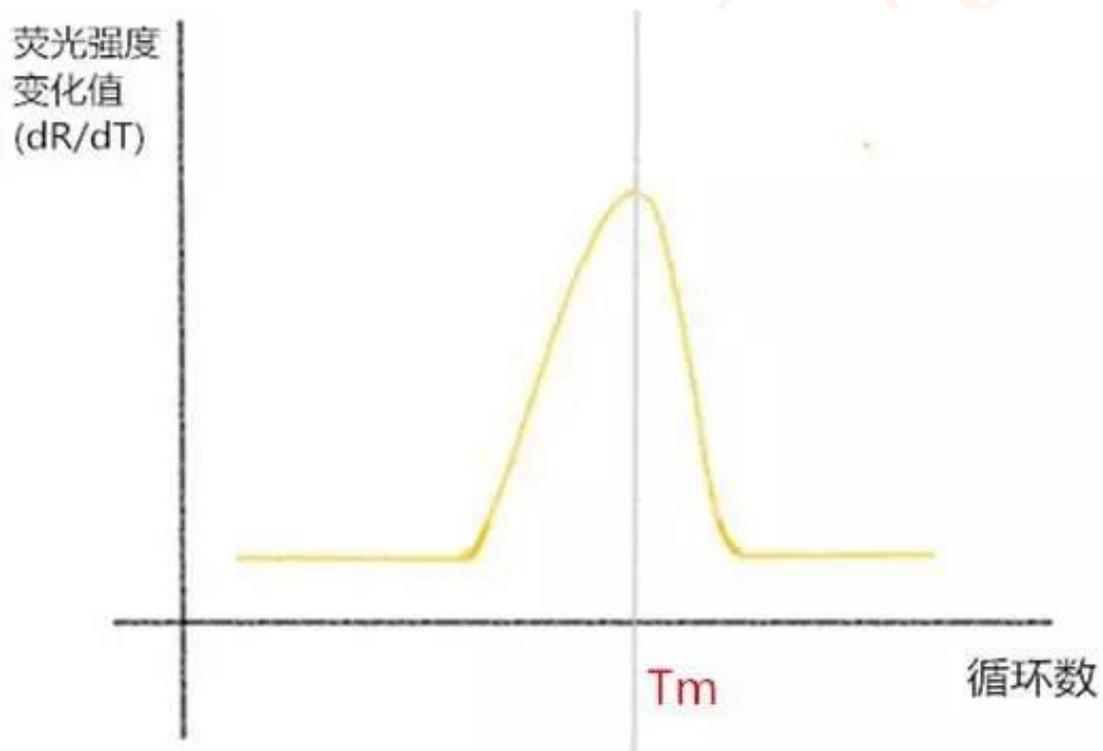


实际情况的扩增曲线

熔解曲线(Dissociation curve)，就是随温度升高 DNA 的双螺旋结构降解程度的曲线。扩增反应完成后，通过逐渐增加温度同时监测每一步的荧光信号来产生熔解曲线。熔解温度上有一特征峰 (T_m ，DNA 双链解链 50% 的温度)，用这个特征峰就可以将特异产物与其它产物如引物二聚体区分开，因为它们在不同的温度熔解度不一样。用荧光信号改变的负的一次导数 ($-dR/dT$) 与温度作图，得出熔解曲线。

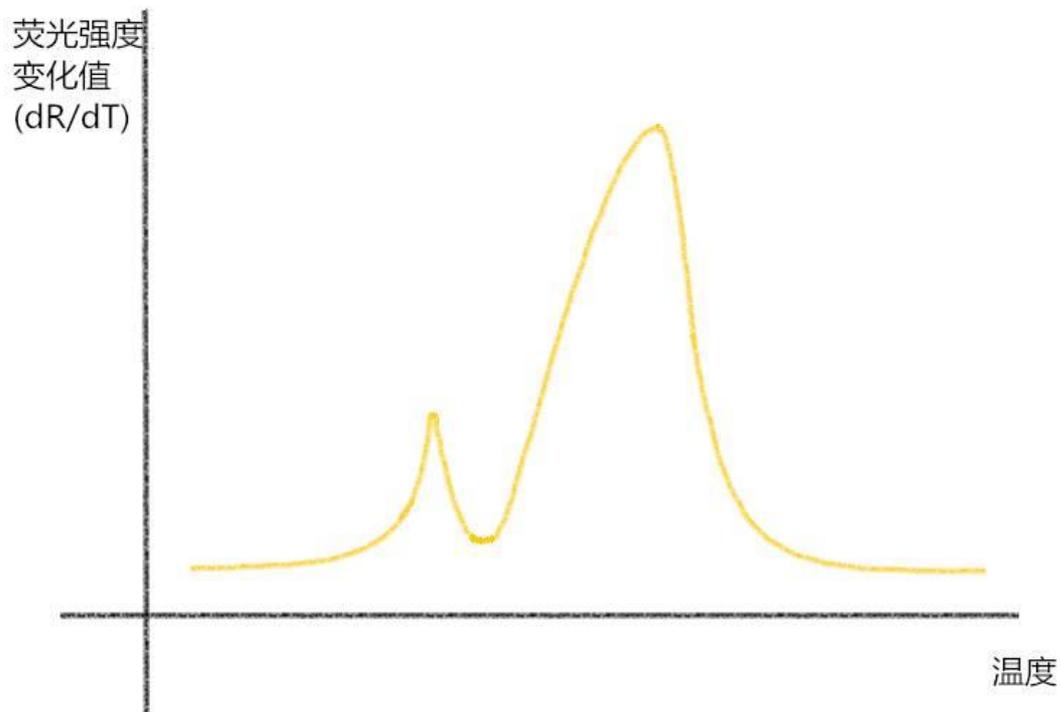
dR/dT 越大，表明荧光值变化最快。随着温度上升，达到 T_m 点时，大部分产物双链 DNA 解开，荧光值下降非常快。如果 qPCR 产物非常特异，熔解曲线在 80-90 之间会形成一个单峰 (温度和 qPCR 产物长度以及 GC 含量相关)。

正常情况下，荧光定量 PCR 的产物是特异的，这时的熔解曲线应该是这样的：



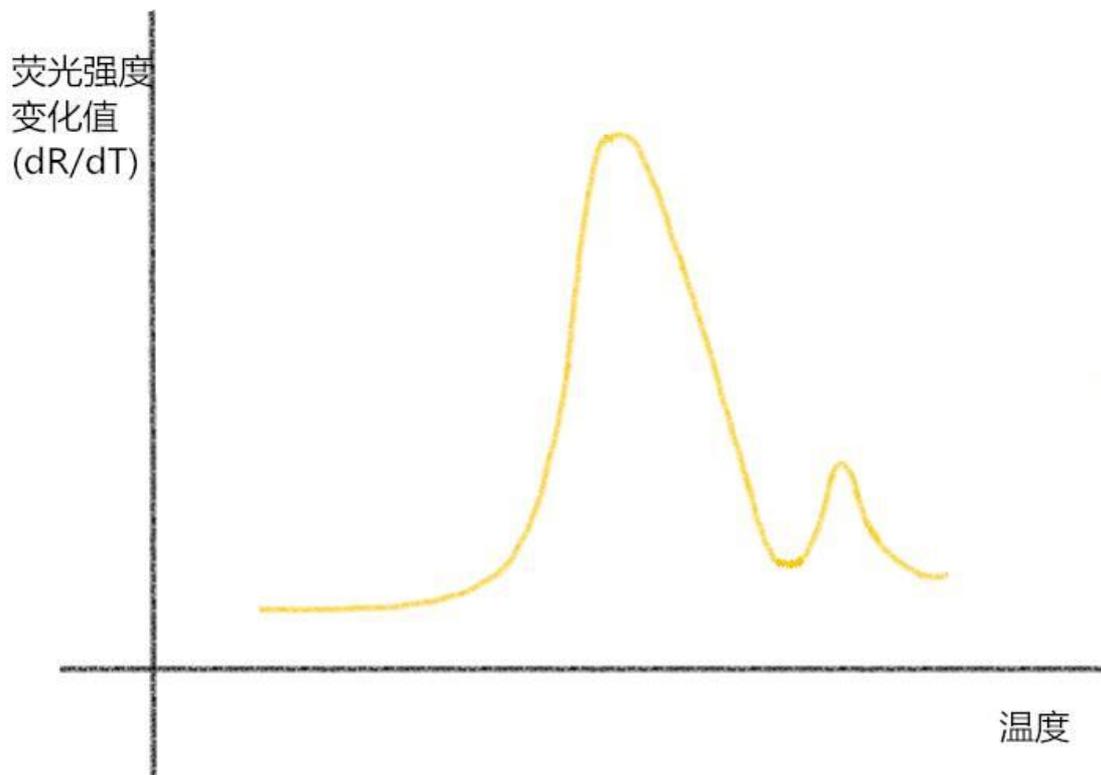
正常情况下的熔解曲线

当然，也会有不正常的时候，熔解曲线前置杂峰，在主峰前有一个前锋，敢在主峰面前“撒野”的是比目的片段短些的非特异性片段，在温度低一些的时候就能解开双链，也可能是引物二聚体。



熔解曲线前置杂峰

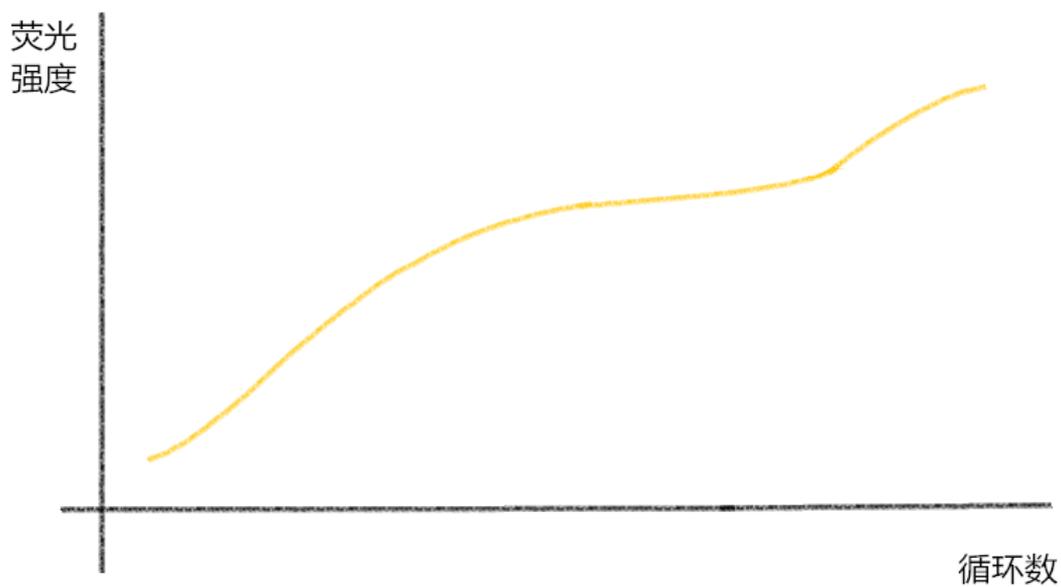
不正常的情况下，还可能出现熔解曲线后置杂峰，躲在主峰后面的是比目的片段长些的非特异性片段，在温度高一些的时候才能解开双链。



熔解曲线后置杂峰

再来欣赏一下那些形状特异的扩增曲线：

没有对数增长期，可能是模板浓度高，这样所看见的扩增曲线，就不是在一个对数期。



没有对数增长期的扩增曲线

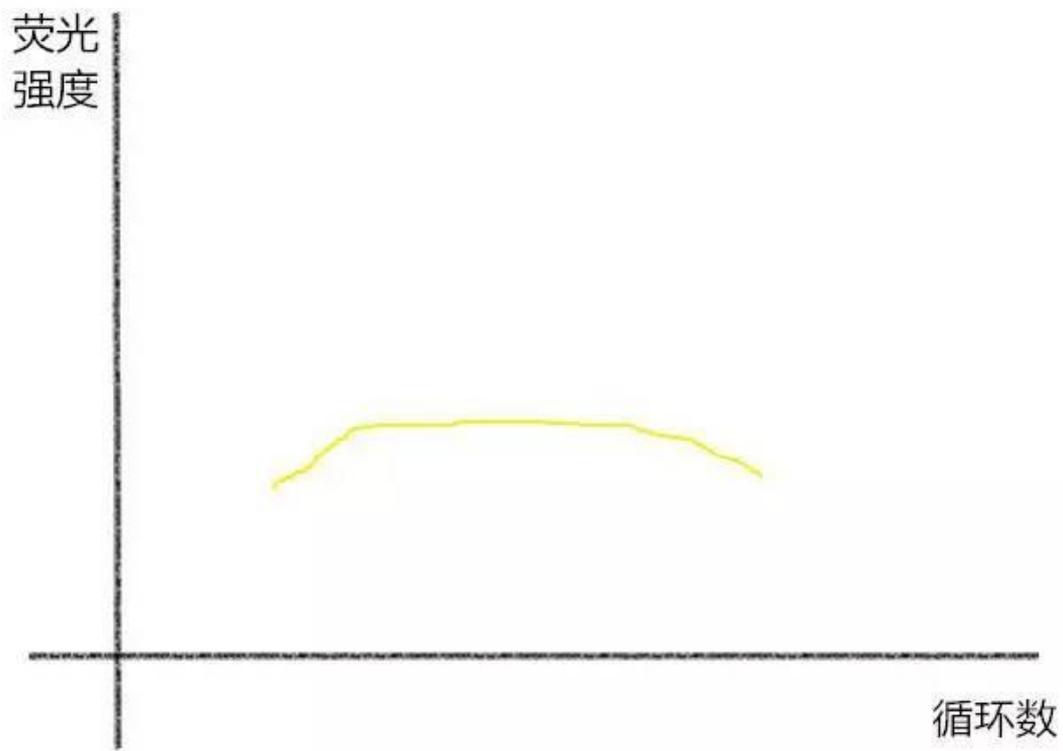
无 CT 值，可能原因及对策：

检测荧光信号的步骤有误：一般 SG 法采用 72°C 延伸时采集，Taqman 法则一般在退火结束时或延伸结束采集信号。

引物或探针降解：可通过 PAGE 电泳检测其完整性。

模板量不足：对未知浓度的样品应从系列稀释样本的最高浓度做起。

模板降解：避免样品制备中杂质的引入及反复冻融的情况。



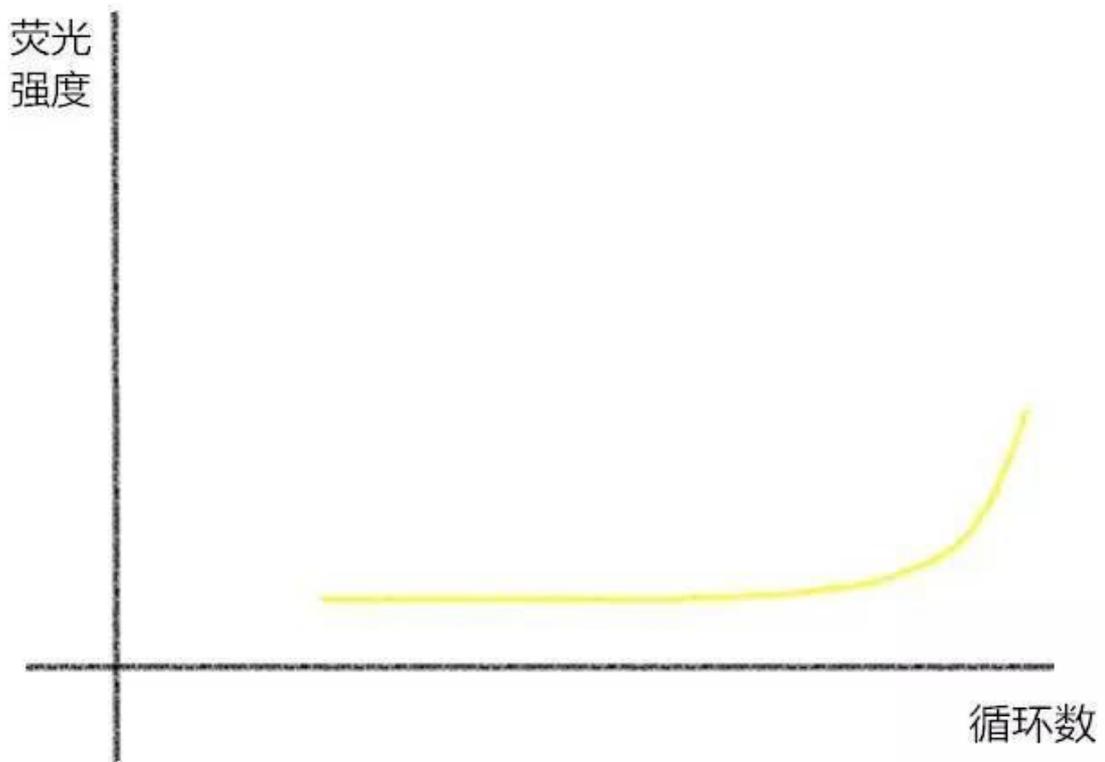
无 CT 值的扩增曲线

Ct 值出现过晚 ($Ct > 38$)，可能原因及对策：

扩增效率低：反应条件不够优化。设计更好的引物或探针，改用三步法进行反应。适当降低退火温度，增加镁离子浓度等。

PCR 各种反应成分的降解或加样量的不足。

PCR 产物太长： 一般采用 80-150 bp 的产物长度。



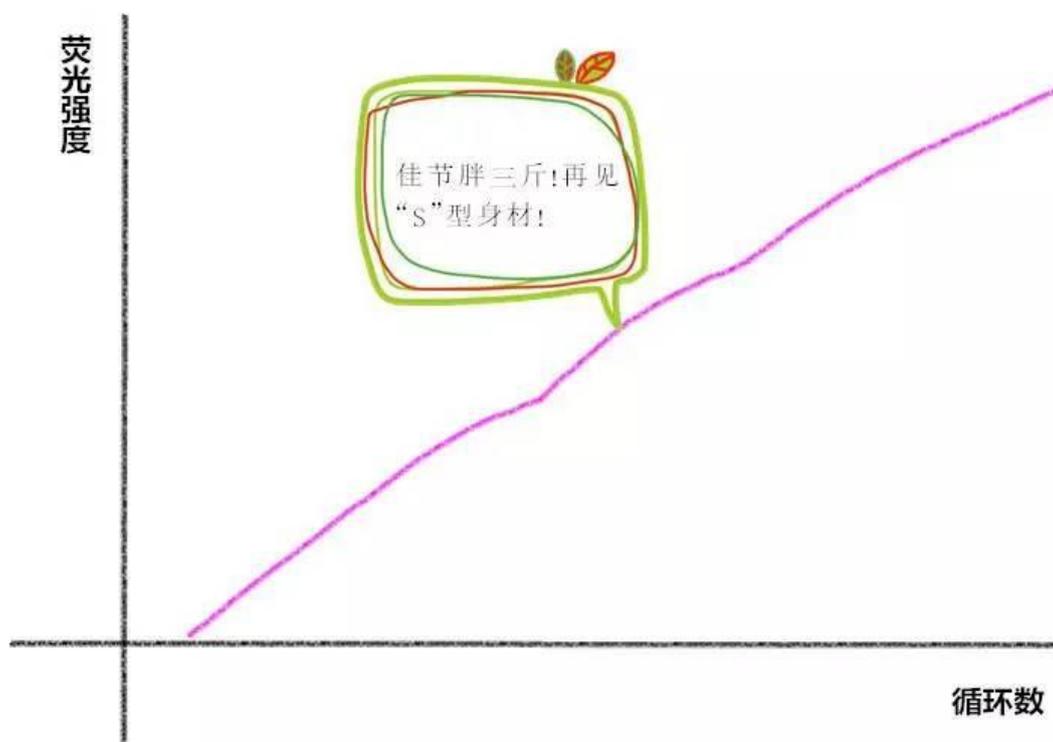
Ct 值出现过晚的扩增曲线

经验 | qPCR 那些奇奇怪怪的曲线都代表啥 (二)

作者：子非鱼

那些奇奇怪怪的曲线，除了之前跟大家介绍过的，扩增曲线中还有更多的“奇葩”，只要你稍不小心，就会遇上他们呢，下面给大家介绍一下，好好辨识，下次见到他们就可以迅速绕路走。

直线型的扩增曲线

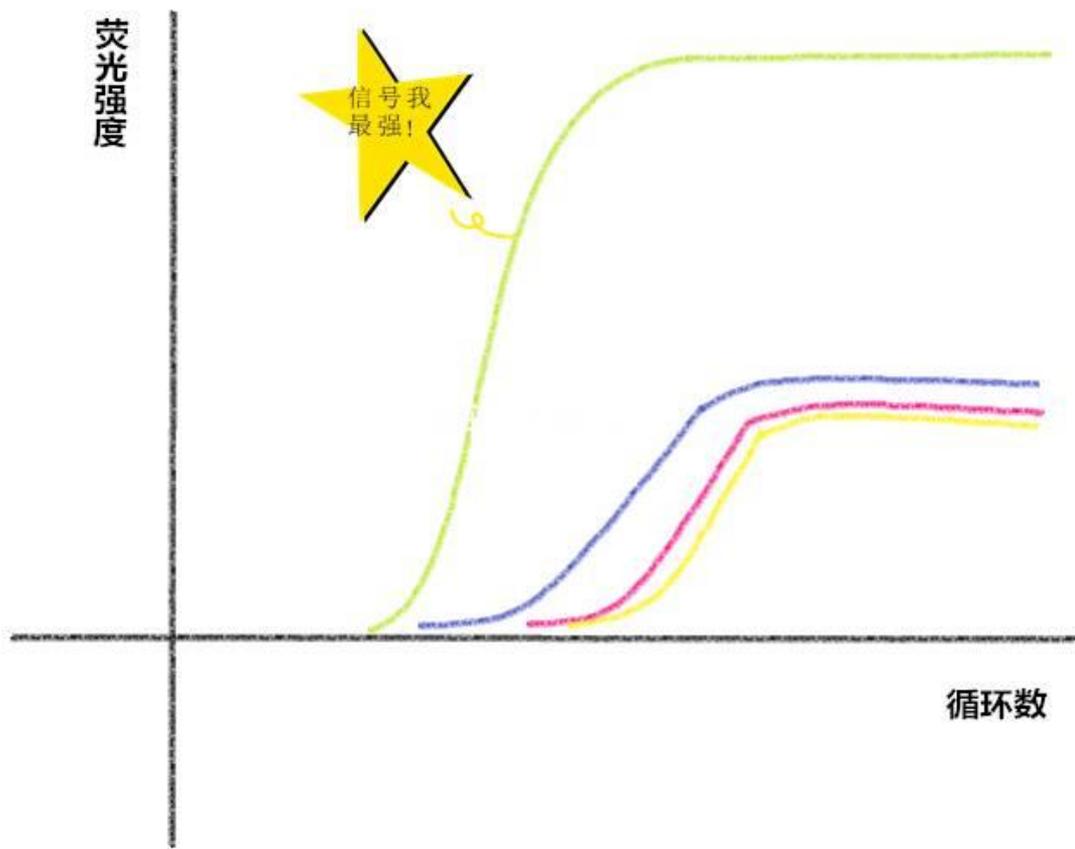


扩增曲线呈直线型，这是肿么了？

Tips:

- 1、因为反复冻融或者在光线下暴露太久导致探针部分降解；
- 2、也可能反应液中有 PCR 抑制物。

某一孔“鹤立鸡群”，荧光信号特别强

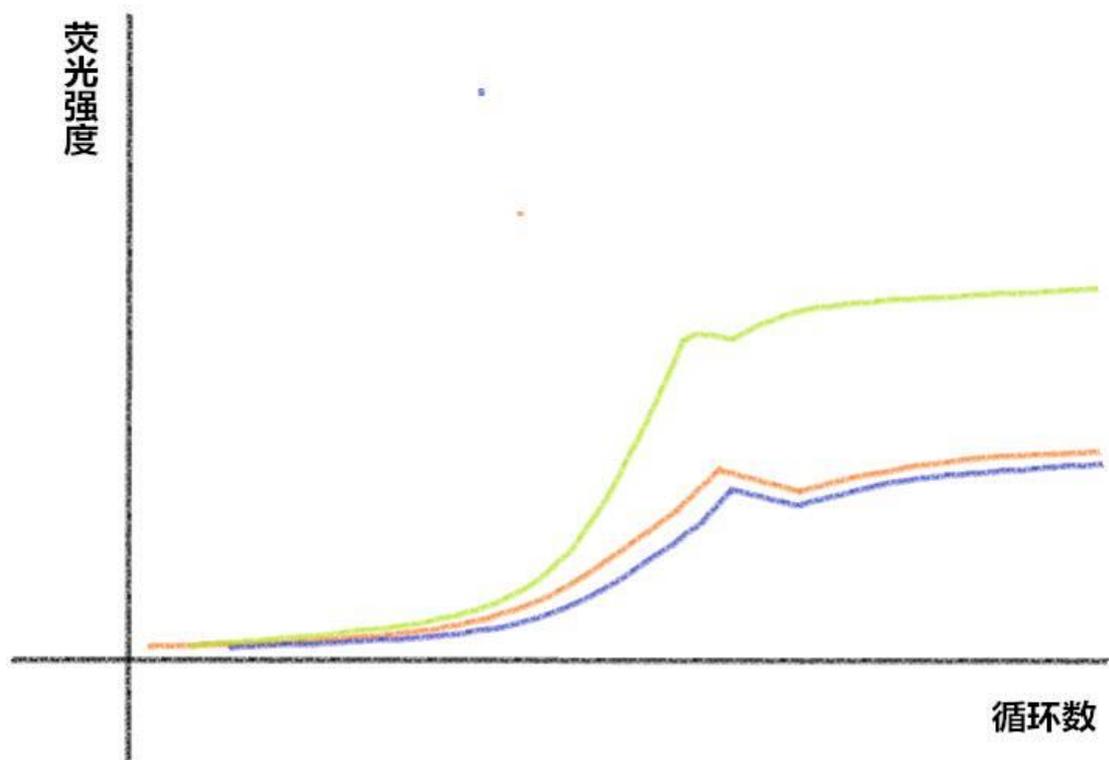


明明同一批样品，为什么就一孔搞特殊，荧光信号特别强？

Tips:

- 1、试剂配制时太着急啦，反应液还没完全融化又或者没混匀反应液，导致探针量在某一管特别多；
- 2、或者 PCR 仪热槽被荧光物质污染，所以实验前最好用酒精清洁一下热槽。

突然“棱角分明”，扩增曲线有尖峰

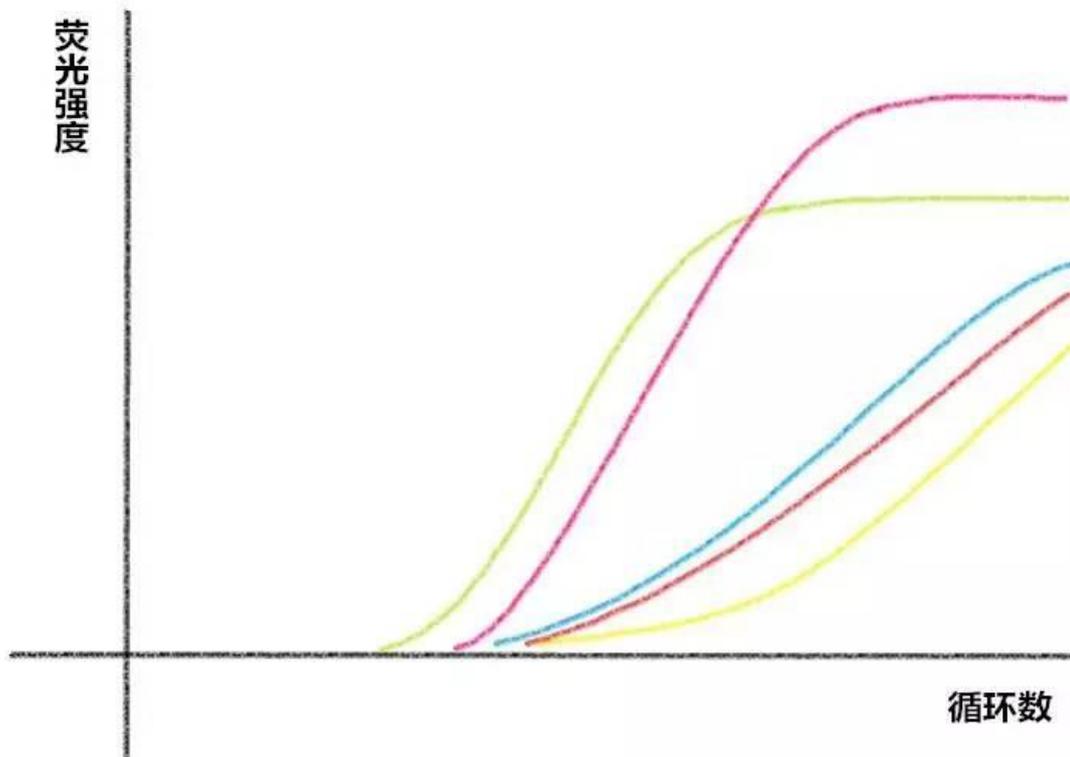


为什么不是漂亮的S形?居然有向上或者向下的尖峰。

Tips:

- 1、可能是在尖峰形成那个循环时仪器突然“偷懒”停了，又或者不小心开了盖，使光线突然增强；
- 2、电压不稳定；
- 3、如果是尖峰向下，可能是卤素灯老化所致，不要省钱，赶紧换！

有些样本“拖后腿”——扩增曲线效率过低

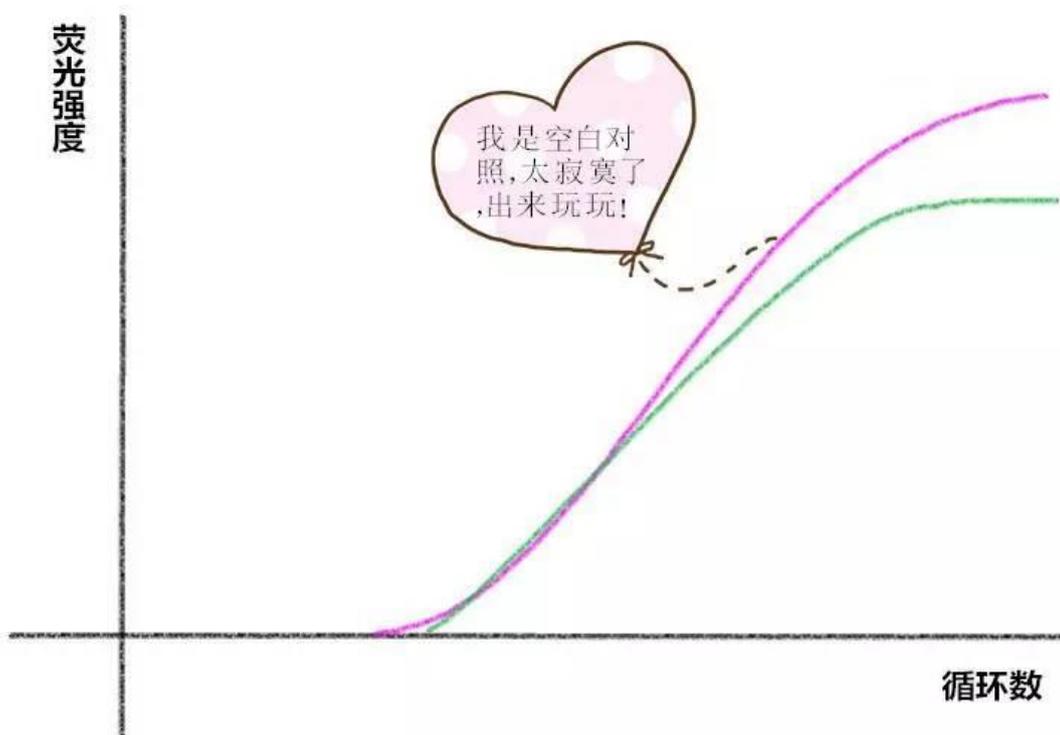


为什么扩增曲线效率过低？

Tips:

- 1、反应液取量不准确或者没混匀反应液；
- 2、提取 RNA 时残留的试剂可能抑制了 PCR 反应。

空白对照，阴性对照出来“调皮”

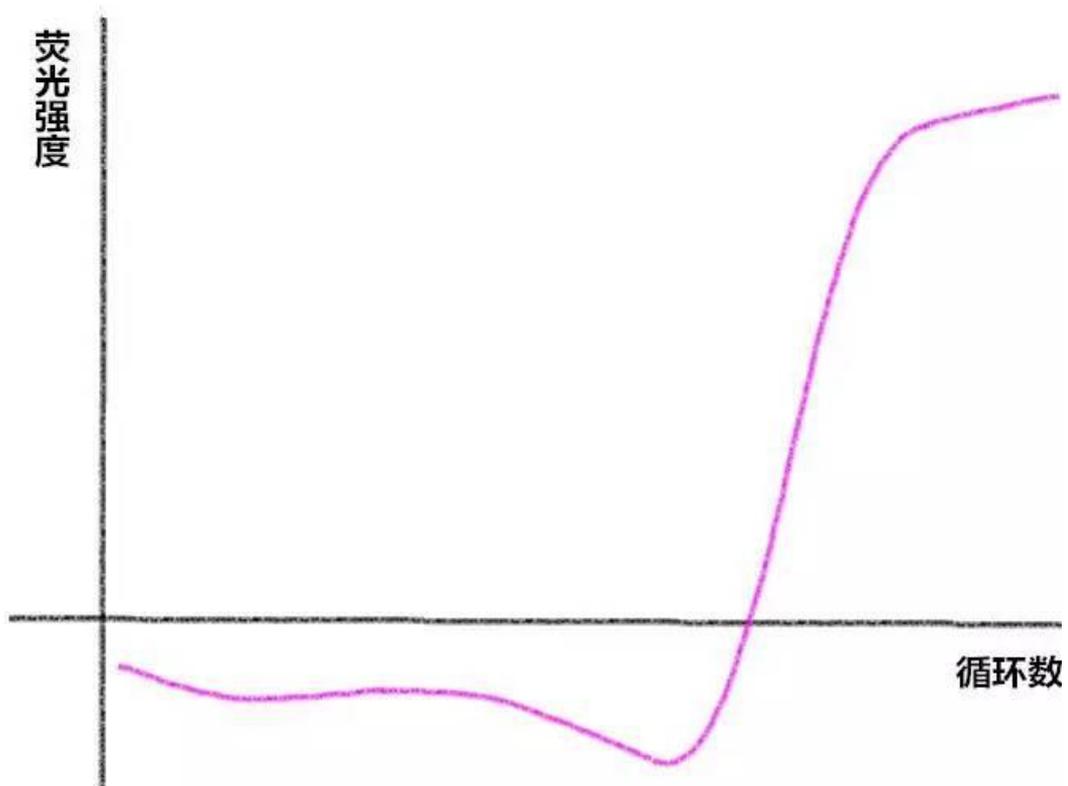


空白对照，阴性对照是不被希望出现在我们眼前的，然而他们却翘尾了。

Tips:

- 1、模板被污染；
- 2、配液过程有污染

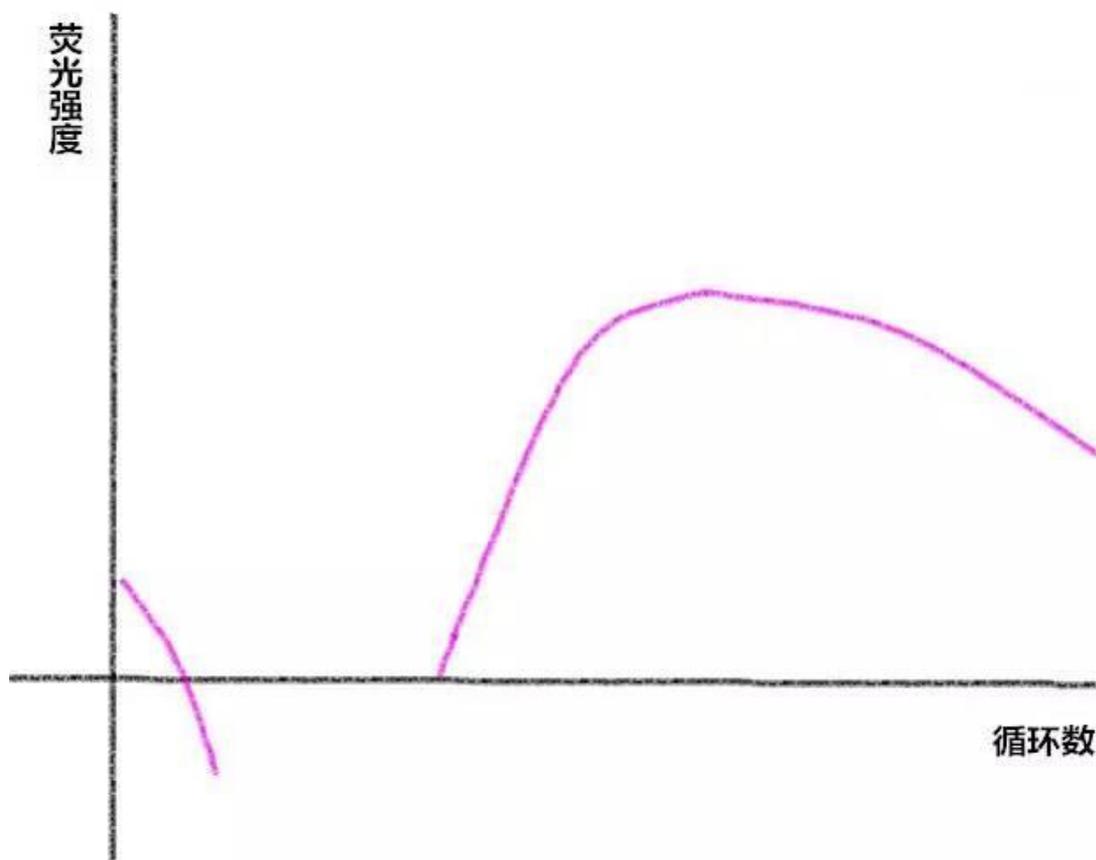
基线下滑



扩增曲线有一个下滑阶段？

Tips: 这个简单，基线范围选取不对，将基线范围更改就好。

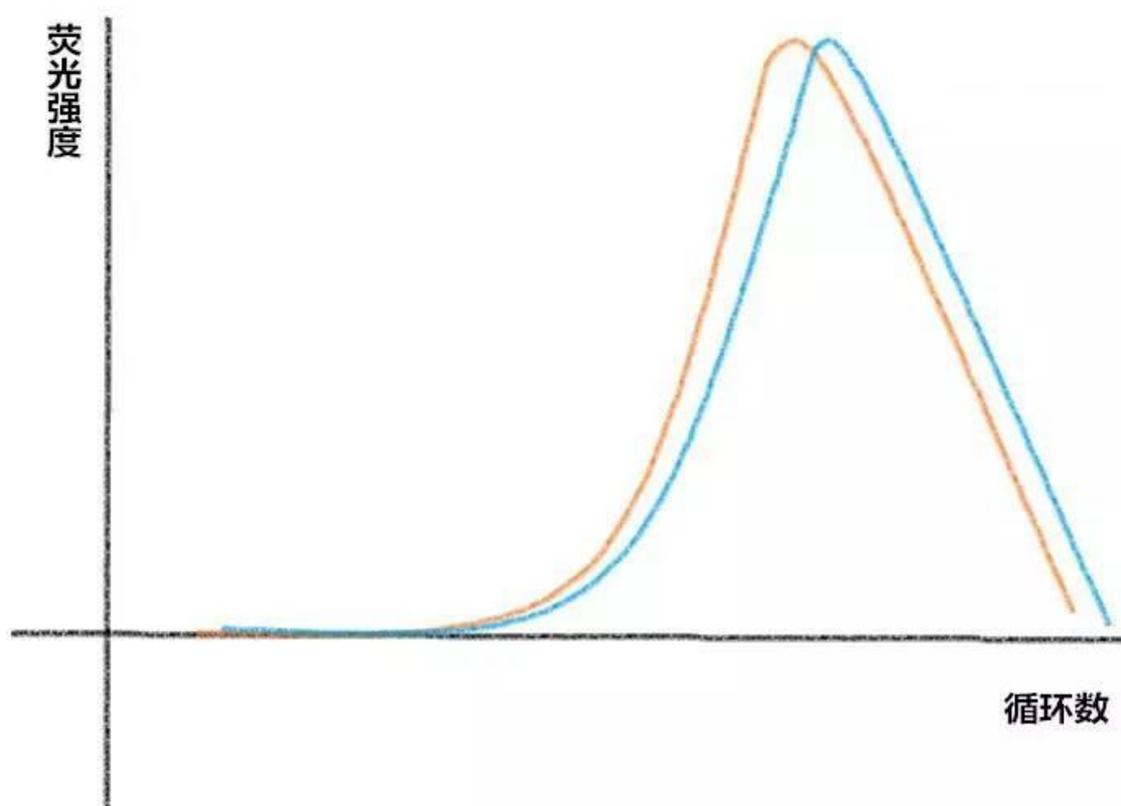
扩增曲线断裂



还真是什么情况都有，看到这扩增曲线断裂，就像看到电视连续剧最精彩的部分戛然而止时那般无奈和好奇吧！

Tips: 基线选取范围不对，通常由于模板 DNA 浓度范围过高所致，将基线范围更改。

山坡型形曲线



Tips:反应管封口不严，反应液蒸发了！

荧光定量 PCR 的私家秘方

作者：happy

荧光定量 PCR 技术已经很普遍，但对于首次接触它的人来说，总会遇到一些这样那样大大小小的问题，这些荧光定量 PCR 实验中（染料法）的一些小技巧，相信你能用得上，助在 PCR 的路上一帆风顺，少走弯路。

模板制作,小便宜别去占

所谓的目标模板也就是我们常说的阳性对照，你可去购买现成的，当然实验经费不充足一般都要我们自己制备。在这里提醒广大宝宝们不要为了省那点钱而去买便宜的载体，最好购买师兄师姐或者有类似经验的人推荐的载体。

测定模板浓度时最好选用微量核酸测定仪，每次仅需要 1-2ul 的样品，既不会污染你的样品也不用像紫外分光光度计那样需要稀释，简单、精确、灵敏。**实验中对模板进行稀释时，尽管每次使用的量很少，推荐一次性吸取 10 ul 倍比稀释，因为量越多误差也就越小。**

引物印证这一步，别小觑

当拿到公司合成好的引物时，**先通过普通的 PCR 来初步印证一下，扩增条带是否单一，条带大小是否在预计的范围。**若不符合这些，直接不用进行荧光定量 PCR，重新设计引物。若符合条件，接下来就进行荧光定量 PCR 实验，观察扩增曲线，以及熔解曲线是否单一。满足条件后可开始正式的荧光定量 PCR 实验，一般每稀释一个梯度，CT 值差 3 左右。

我为什么选用 96 孔板？

进行荧光定量 PCR 体系的配制时最好在冰上进行，操作环境不用非得在超净台中进行，环境安静整洁都可以。因为每一个梯度要做三个重复，因此先在 1ml 的无菌离心管中配制好后再分装入 96 孔板中。

实验中我使用过荧光定量八联管和 96 孔板，个人推荐 96 孔板。因为八联管你需要盖上盖子，而且盖子比较的难按下去，稍不慎就把八联管弄断或者液体撒出来。有的时候一下忘记

了是从哪边开始的。96 孔板比较方便，加完样品后只需附上一层膜，用它自带的板子抚平即可。上机器前最好离心一下，让贴在管壁上的液体流下来同时也消掉气泡。

程序设置，听说明书，还是机器设定？

实验开始前，我也看了很多文献啊各种机器的介绍啊，大部分是要求按照机器自带的程序或已经设定好的程序进行就可以了。但我比较了我的荧光染料说明书的要求的程序与机器设定好的程序，相差太大。说明书中说预变性温度不要超过 30s，会影响染料的活性，可是机器设定的是预变性 5min，这个时候你一定要按照说明书的来哦。

3.3 其他 PCR

PCR 十大常用网站，必收藏之！

作者：子非鱼

PCR 作为老生常谈的一种实验技术，对实验新手而言却仍是一个不小的挑战，比如引物的设计、预测脱靶效率、PCR 中的疑难杂症等等，其中任何一个问题都会让他们头疼一阵了。而本文推荐的十个常用网站基本囊括了 PCR 全方位攻略，你想知道的都可以在这里找到答案。

1.Primer3

网址：<http://primer3.sourceforge.net/webif.php>



Primer3 是一个非常简单却高效的引物设计在线软件。你只需在目标序列中粘贴 DNA 序列后点击搜索即可。其中，可通过多种方式来对结果进行筛选，包括 PCR 产物的大小、引物大小、 T_m 范围和其他参数。同样，还可使用 Primer3 来设计用于 PCR-ELISA 的杂交探针和其他基于探针的 PCR 引物设计。

2.NCBI

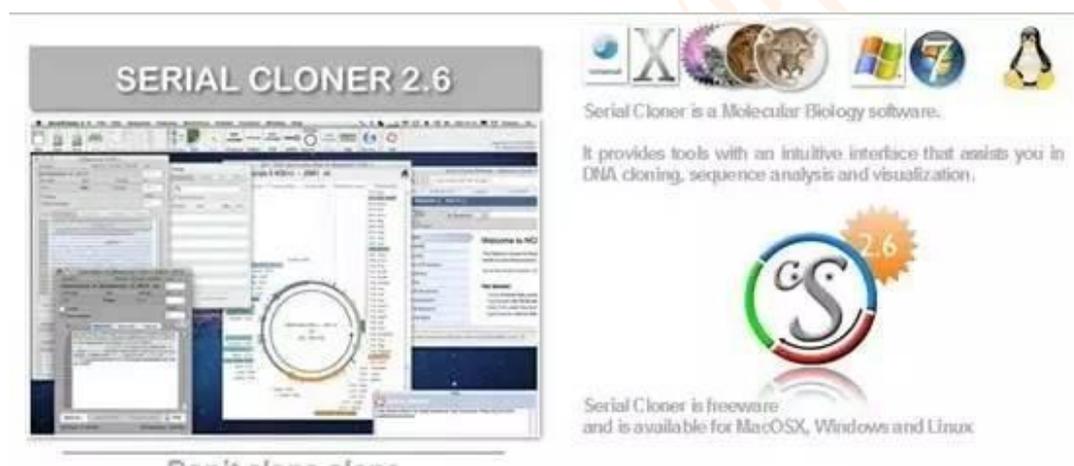
网址：<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>



NCBI 网站的用途远不止于搜索文献和 BLAST。在 Primer Blast 中，可搜索到合适的引物对（该功能类似于 Primer3）或者在输入特异性引物序列后，利用 Primer Blast 来检测其特异性，进而减少非靶向扩增。在全基因组 DNA 中，如果你想扩增多基因家族中的一个基因，那么对靶基因的引物进行 blast 会提高 PCR 反应的特异性。且该方法也可扩增质粒上的靶标，并降低产生非特异性 PCR 产物的风险。

3.Serial Cloner

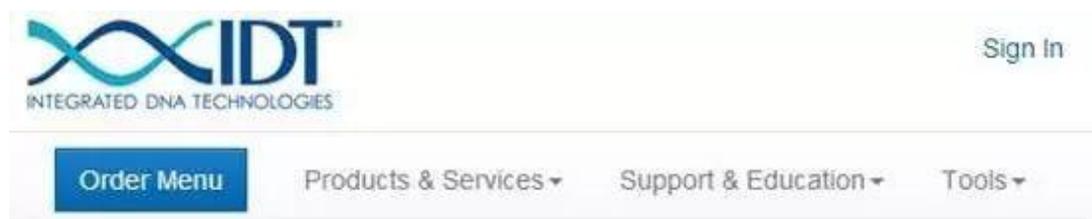
网址：http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html



如果你需要定期进行 PCR 和克隆，那么这个软件绝对值得拥有，可下载适用 Mac 和 Windows 操作系统的免费软件。一旦你安装了程序并保存了你的 DNA 和引物序列，就可以运行虚拟 PCR，查看限制性位点，进行酶切测试（甚至可以添加你的分子量标记来了解你的琼脂糖凝胶应该如何看待！），执行序列比对等等。Serial Cloner 还可用来制作能放在 PPT 甚至文章中的克隆质粒图谱。

4. Integrated DNA technologies

网址：<https://sg.idtdna.com/country.aspx>



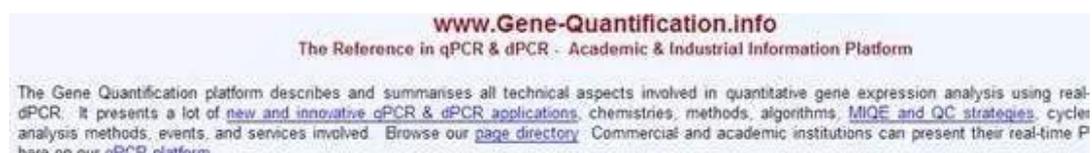
Welcome to IDT!

Please select your location. If your country is not shown, click [here](#).

尽管这不是一个只针对 PCR 的网站，但是可以在其中找到很多非常有用的工具来帮你操作 PCR 反应和实时 PCR 实验。比如，计算引物和扩增子的一般性质或者依据具体需求来设计特异性的寡核苷酸等。值得一提的是，该网站还会提供一些稀释底物方法，以解决实验中琐碎的稀释计算方法。

5. Gene Quantification Page

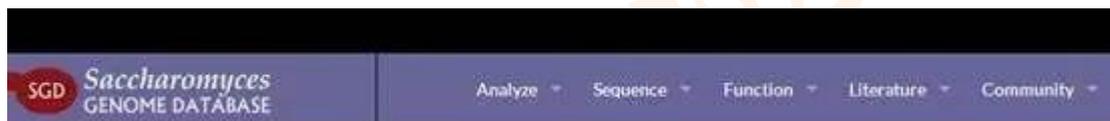
网址：<http://gene-quantification.info/>



这个网站是由创建 qPCR 相对定量 Pfaffl 法的 Michael P.Pfaffl 编辑的，对于 qPCR 实验新人来说，可能是一个很好的资源。在这里，可以找到有关 qPCR 的所有知识，包括 qPCR 新的应用方法、定量算法、循环参数、试剂盒、染料等等。除此之外，许多商业和学术机构都在 qPCR 平台上对他们的产品以及实验方法做了非常详细的概述。

6.Saccharomyces genome database

网址：<http://www.yeastgenome.org/>



该网站对酵母的相关研究方法进行了优化，在 Analyze 这一栏中，点击 Design Primers 即可针对酵母基因设计 PCR 引物。同样点击该栏目下的 Restriction Mapper 可简单快速地分析酵母基因组的酶切位点，为后续构建基因表达载体打下基础。另外，Webcutter 也是一个常用于分析基因酶切位点的在线软件。

7.Rest 2009 Real-Time Quantification software

网址：<http://rest.gene-quantification.info/>



该软件是由 Michael P.Pfaffl 和 Qiagen 共同研发的，是实时 PCR（Realtime PCR）原始数据量化的重要资源。要访问该软件，首先需要在 Qiagen 网站上（<https://www.qiagen.com/cn/loginscreen.aspx?ReturnUrl=%2fcn%2ffeedbackform%2fsurveyform%2frest%2f%3fakamai-feo%3doff>）创建一个登陆名并选择使用的 PCR 仪器，该软件会应用数学模型，来预测靶基因和内参基因的 PCR 效率。

8.LinRegPCR

网 址：
<http://www.hartfaalcentrum.nl/index.php?main=files&fileName=LinRegPCR.zip&description=LinRegPCR:%20qPCR%20data%20analysis&sub=LinRegPCR>



login

[Click here to download: LinRegPCR](#)

If you wish to receive mails regarding important updates/bugs, please enter your email address below and press submit. The address will not be used for any other purpose

subscribe

LinRegPCR is a program for the analysis of quantitative RT-PCR (qPCR) data resulting from monitoring the PCR reaction with SYBR green or similar fluorescent dyes. The program determines a baseline fluorescence and does a baseline subtraction. Then a Window-of-Linearity is set and PCR efficiencies per sample are calculated. With the mean PCR efficiency per amplicon, the C_q value per sample and the fluorescence threshold set to determine the C_q, the starting concentration per sample, expressed in arbitrary fluorescence units, is calculated. See: Ramakers et al., NeuroSci Lett 2003; Ruijter et al., Nucleic Acids Research 2009.

[Go to the FAQ](#)

[Go to the references](#)

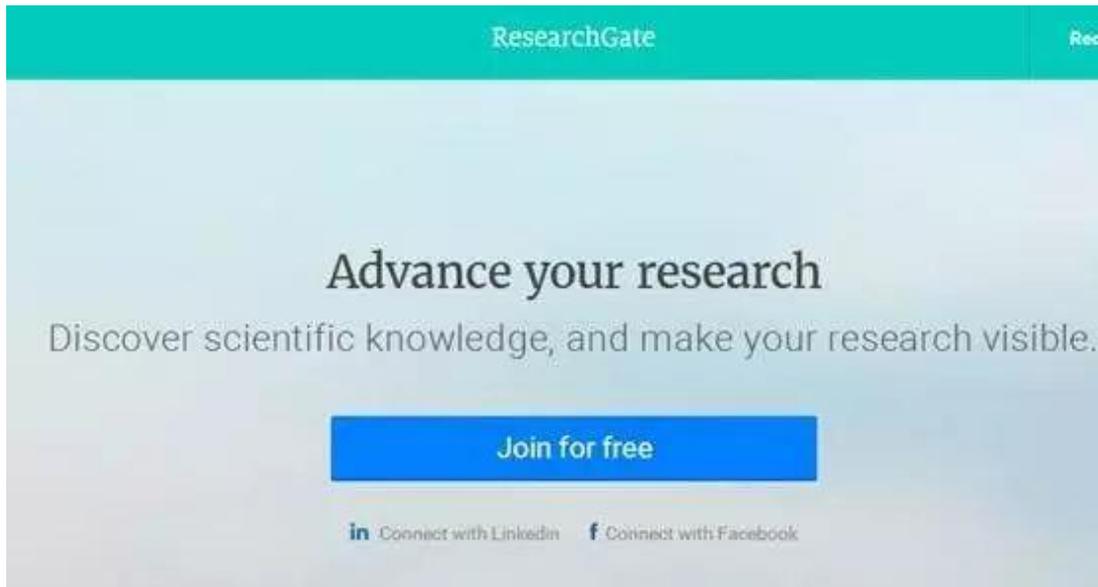
[Go to the version history](#)

[FAQs](#)

在从荷兰的学术医疗中心（AMC）免费下载适用于 Windows 操作系统的版本后，可从扩增曲线的斜率来估算 PCR 效率。该软件适用于使用 SYBR 标记或其他荧光探针的 qPCR 反应，并且能与所有 qPCR 仪器的数据兼容。对 PCR 效率进行可靠的估算可避免多次优化标准曲线，节省 qPCR 实验操作的大量时间。

9. ResearchGate

网址：<https://www.researchgate.net/>



该网站有些像研究者们专属的 Facebook，方便研究者联系和跟踪同事，上传发表论文同时也可积极参与研究相关主题的讨论。在该网站注册登录后，查看 PCR 板块就可以询问到与 PCR 相关的任何问题，最重要的是此网站中对问题的答复都非常迅速，即便你是个完完全全的 PCR 新手，也能从中获取很多有关 PCR 操作的建议和讨论。

10.Protocol Online

网址：<http://www.protocol-online.org/>

Protocol Categories

Animal Techniques

[Surgery](#), [Xenograft Tumor Models](#)

Biochemistry

[Amino Acids & Protein](#), [Lipid...](#)

Bioinformatics & Biostatistics

[Database Search](#), [Sequence Analysis...](#)

Cell Biology

[Apoptosis](#), [Cell Culture](#), [Stem Cells](#), [Signal Transduction...](#)

Developmental Biology

[Embryology](#), [Fertilization...](#)

Essential Data

[MW Markers](#), [Restriction Enzymes...](#)

General Lab Techniques

[Centrifugation](#), [Quantitation...](#)

Genetics & Genomics

[Cytogenetics](#), [Epigenetics](#), [Microarray...](#)

Histology

[Fixation](#), [Staining](#), [Microdissection](#), [Tissue Microarrays...](#)

Imaging Techniques

[Microscopy](#), [Radiologic Imaging](#)

Immunology

[Antibody](#), [Antigen](#), [ELISA...](#)

Media & Solutions

Microbiology

[Bacteria](#), [Fungi](#), [Virus](#)

Model Organisms

[Arabidopsis](#), [C. Elegans](#), [Yeast...](#)

Molecular Biology

[DNA](#), [Cloning](#), [miRNA](#), [PCR](#), [RNA](#), [RNAi](#), [Protein...](#)

Neuroscience

[Neuroanatomy](#), [Neurophysiology...](#)

Physiology

[Hematology...](#)

Plant Biology

[Photosynthesis](#), [Tissue Culture...](#)

Research Tools

[Online Tools](#), [Software](#)

这个网址类似于 Research gate 的 Q&A 部分，尽管该网站界面看起来有些简单粗糙，但确实是一个 protocol 集中营，可帮助实验菜鸟解决疑难杂症。其中很多内容均是基于用户体验的，且囊括了很多有关实验方面的问题及答案，因而解决问题时应择善从之，符合或最接近自身实验条件的才是最好的实验 protocol。

参考文章：Top Ten websites to help you with your PCR experiments

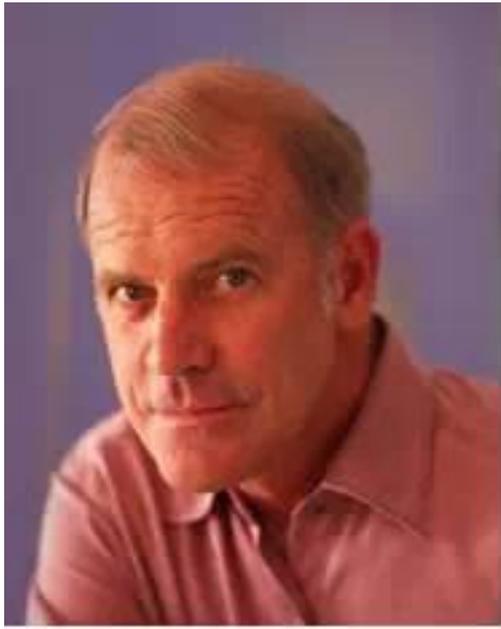
实验技术八卦课堂：PCR 技术的历史和精髓

作者：猫大

那些也许你不知道的 PCR 诞生史：

早在 1971 年, Kjell Kleppe 等就在名为 “Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases” 的研究论文里描述过一个由聚合酶合成双链 DNA 的过程。作者提出了一些推测, 比如, DNA 双链可以变性成单链, 引物结合到模板上的过程需要克服单链 DNA 模板形成的二级结构, 随后 DNA 聚合酶完成反应, 而当模板双链复性, 这个过程可以重新启动。只可惜这些推测缺乏足够的实验证据。

17 年后, Kary Mullis 和 Fred Faloona 实验验证了 PCR 的基本过程。因为 Kary Mullis 在 PCR 技术上的突出贡献, 1993 年, 他与 Michael Smith 共享了诺贝尔化学奖。



Dr.Kary Banks Mullis



Michael Smith

但这时候的 PCR 酶不耐热，一轮反应后酶就不工作了，因此每一轮反应都必须重新添加酶，非常麻烦。就这样，生物狗们一麻烦就麻烦了 5 年（向任劳任怨的生物狗致敬！）。终于在 1988 年，Henry Erlich 等人从栖热菌中找到了耐热的 DNA 聚合酶，这一关键的改进使 PCR 过程进化成只需要加一次酶即可完成反应，而且热稳定性的酶使 PCR 反应的特异性和灵敏度都大大提升，从而使长时间的反应成为可能。自此，我们所熟悉的 PCR 技术才算真正诞生。

在 PCR 技术诞生的过程中还有个有趣的小插曲：在 Kary Mullis 的文章发表的两年前，Norman Arnheim 等人已提出 PCR 技术在临床诊断上的广阔应用前景，比如鉴定地中海贫血患者的 β -globin 基因突变。我们的先辈真是敢做敢想更敢说的典范啊!!! 永远都保持超前的节奏!!! 比如在 PCR 技术发明前，远在 1972 年，先驱型生物狗就已经很 HIGH 地在玩基因克隆了。。。

PCR 技术的本质:

PCR 反应是以少量的 DNA 做模板进行扩增从而得到大量 DNA 的过程，其本质就是在体外进行的 DNA 复制。清楚这一点，有助于我们理解进行 PCR 反应所需的一些必要元素。既然 PCR 的过程就是 DNA 复制的过程，那么 DNA 复制所需要的元素就是 PCR 反应所需要的。

DNA 复制需要哪些元素呢？

1) 需要脱氧核苷三磷酸:

进行 DNA 合成必须具备的 2 个关键底物之一，即 4 种脱氧核苷三磷酸——dGTP、dCTP、dATP、dTTP。

通常商品化 PCR 酶会提供这 4 种脱氧核苷三磷酸的混合物 dNTP。

2) 需要引物-模板接头:

DNA 合成的第二个重要底物是一具有特定序列的双链 DNA，称为引物-模板接头，即指导互补脱氧核苷酸添加的单链 DNA 模板和与模板互补但比模板短的一小段序列。

较长的 DNA 链有一个与引物退火的区域和一个毗邻的单链 DNA 区，此区作为 DNA 合成的模板；较短的引物与较长的 DNA 链完全退火，且必须有与模板单链 DNA 区毗邻的游离的 3'-OH，当新核苷酸加入时引物的 3'-OH 端得以延伸。一般而言，引物-模板接头的引物部分才是 DNA 合成的底物，而模板仅提供选择哪种核苷酸进行添加的必要信息。

因此我们在设置 PCR 反应程序时第一步是高温变性（一般会设置成 95°C 变性），就是为了把双链的模板变性成单链，第二步是降低温度，是为了让引物能互补匹配到单链模板上。

3) 需要 DNA 聚合酶：

DNA 聚合酶的三维结构类似于一只右手。手掌域是催化活性位点，可以催化任意 4 种脱氧核苷三磷酸的添加，这一区域结合 2 个二价金属离子（通常是 Mg^{2+} 或 Zn^{2+} ）。其中一个金属离子降低 3'-OH 对其氢的亲合力，这会产生一个准备对引入 dNTP 上的 α -磷酸进行亲核攻击的 3'O⁻。第二个金属离子与 dNTP 的 β -和 γ -磷酸负电荷协同作用，稳定由引物和引入核苷酸连接在一起时所产生的焦磷酸。

所以我们在 PCR 时，反应体系里加入适量的 Mg^{2+} 是十分重要的，添加的量少导致 PCR 酶无法发挥最大活性，添加太多则降低酶反应的特异性。

DNA 聚合酶是一种延伸酶，其催化是快速的。DNA 合成的速度主要取决于 DNA 聚合酶的延伸能力。在实际应用中，一般的 Taq 酶的延伸速度大致是扩增产物在 2kb 以内是 1kb/min。扩增产物超过 2kb 的部分可以以 500bp/min 来计算。比如扩增 2kb，延伸时间就设置成 2min，而扩增 3kb，就可以把延伸时间设置成 4min。也有延伸能力更强的酶，那么延伸时间就按产品说明书描述的来设置。

OK! 我们以 Takara Ex Taq 这款酶为例来看一下 PCR 的实地操作：

PCR 反应液组成 (共 50 μ l)

TaKaRa Ex Taq (5 U/ μ l)	0.25 μ l
10 \times Ex Taq Buffer	5 μ l
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4 μ l
Template	<500 ng
引物 1	0.2 -1.0 μ M (final conc.)
引物 2	0.2 -1.0 μ M (final conc.)
灭菌蒸馏水	up to c. 50 μ l

Look! 在这个反应体系里，DNA 复制的三大要素都有了，酶、引物-模板、dNTP 一个都

不少。10×Buffer 给酶提供一个合适的离子环境，而且这个 buffer 里是含有 Mg^{2+} 的。最后用水把各组分稀释到适当的终浓度。

需要注意的是，这个表格里注明了模板 $< 500ng$ 。在 PCR 的时候，常常会出现模板加太多而导致反应抑制出不了条带。控制模板的量也决定着 PCR 成功与否。

PCR 反应条件的设置，猫大给大家一个三步法的万能模板，请看：

Step1: 95°C 5min

Step2: 95°C 30s

Step3: X °C 40s

Step4: 72°C ymin

Go to step 2, 30-35 cycles

Step 5: 72°C 5-10min

Step1 是进行预变性，这一步是为了将双链 DNA 充分变性成单链，一般 95°C 2-5min 足够。有的酶说明书会对这一步的条件有具体要求，请注意阅读说明。

Step2-3-4 即 PCR 反应的“变性-退火-延伸”循环。

其中 Step2 设置为 95°C 30s, 30s 足以使各种靶 DNA 序列完全变性, 可能的情况下可缩短该步骤时间, 变性时间过长损害酶活性, 过短靶序列变性不彻底, 易造成扩增失败。

Step3 中的温度 X 是需要根据实验调整的。这个 X 设置为多少才合适呢? 最简单的就是设置成 55-60°C。有些特别难进行的 PCR 反应, 还可以把温度降低, 我曾经就遇到过把温度降到 50°C 才能出来条带。还有种选择方式是, 如果你的引物是生工合成的, 那生工的引物单会给一个引物 T_m 值, X 就设置成 T_m 直接降 5°C 就好了, 当然 T_m 减完 5°C 的值最好要在 50°C-60°C 之间。

Step4 的延伸时间 Y 也是需要根据实验调整的, 调整方法就按上文说的, 根据酶的延伸速度来。

然后是循环数的设置。循环数一般控制在 30-35 cycles。循环数太少, 可能跑电泳就看不到产物条带, 循环数太多则 PCR 反应进入平台期比较不出各组的差别。

最后一步 Step5, 反应在 72°C 维持 5-10 分钟, 使引物延伸完全。长的产物相应的时间就设置长一点, 短的产物就设置短一点的时间。

怎么样? 有没有一种把 PCR 从头到尾八光光后很爽的感觉?

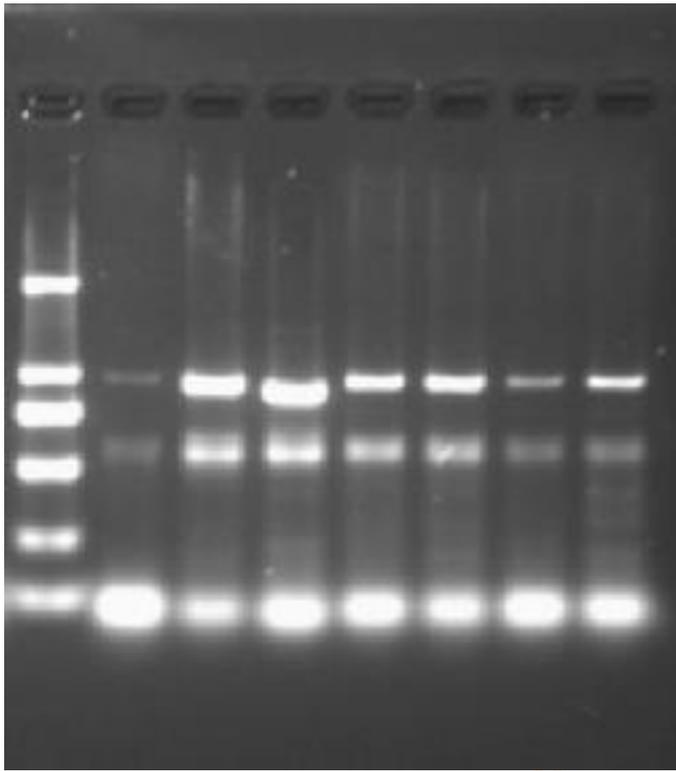
搞清楚每一个步骤代表的意义, 就能很轻松的设置最佳实验条件了!!! PCR 不再难!!!

消灭 PCR 非特异性扩增的黄金方法

作者: 老谈

PCR 技术作为实验室的入门级技术, 却经常困扰各位实验大神们。虽然度过了初学者们少加漏加 PCR 体系的阶段, 但很多奋战在实验室一线的小伙伴正遭遇着 PCR 非特异性扩增的尴尬事件。为了解决这个问题, 有多少人曾经把退火温度从 50°C 试到 70°C、重新合成过引物、换过模板、换过全新的电泳缓冲液, 或者还带着满腔的愤怒捏碎过电泳胶? 今天老谈来教教大家如何对非特异性扩增嗤之以鼻!

——by 老谈



给各位小伙伴脑补一下非特异性扩增，即进行 PCR 所扩增出来的条带不是所要的，引物与模板在非目的条带处有错配，导致延伸产物不是目的条带。例如引物二聚体，即引物在退火过程中产生了 hairpin 结构或其他二级结构，或者引物在模板的某些位置非特异性地结合，也同样会产生非特异性扩增。

我们都知道，PCR 产物都是通过引物延伸产生的。当引物产生了二聚体或者非特异性扩增产物之后，引物本身就无法再延伸形成 PCR 产物了，这样的情况下，非特异性扩增产物越多，那目的产物就越少。如果在 qPCR 过程中，就会在熔解曲线中形成双峰。

小伙伴们遇到这样的问题，首先想到的可能是加入 DMSO 来阻止引物二聚体形成，或者 EDTA 来调节体系的离子浓度。但是具体问题具体分析，我们不能病急乱投医，这里老谈给小伙伴们整理了解决方法，希望可以帮助大家快速、准确的搞定这个“小问题”。

- 1、引物设计的过程中要用 Primer premier 5.0 来验证一下二聚体；
- 2、引物合成后，先做一次梯度 PCR，检测最合适的退火温度，一般高退火温度可以提高引物对模板的特异性从而降低引物二聚体；
- 3、降低 Mg^{2+} 浓度，镁离子浓度高，会导致大量的非特异性扩增，但是没有镁离子的话，也会导致 Taq 酶的失活；
- 4、降低 dNTP 浓度，dNTP 也是非特异性扩增的一个罪魁祸首，降低它的浓度，也能有效降低二聚体及其他非特异性扩增；
- 5、降低引物浓度，一般的 PCR 引物都是过量的，降低了引物浓度自然也能降低引物之间形成二级结构的可能性；

6、提高退火温度，这个道理很简单，引物的退火温度提高，引物间的二级结构形成可能性就会降低；

7、延长退火时间，这个也可以减弱引物间结合的可能性；

8、DMSO 及甜菜碱，这些 PCR 促进剂，主要是用于 CG 含量高的模板上，降低 DNA 的二级结构的产生，但根据经验，加入 DMSO 之后需要同时提高一点退火温度来补平（qPCR 不太适用）；

9、热启动法，通过 95°C 的高温热启动，高温解链，使得引物间的二级结构破坏，以此降低二聚体产生。

3.4 PCR 疑难杂症

技术 | 雾里看花，RT-PCR 出问题的十种可能

作者：毛博

RT-PCR 作为一种常用的分子生物学手段，正在科研和临床上得到越来越广泛的应用。但是，和其他的分子生物学实验一样，其实 RT-PCR 的坑也挺多的。而且，最坑爹的是，导致 RT-PCR 出问题的原因可能很多很多。有时候，实验失败了，还不知道问题出在哪里。下面，毛博重点分析一下 RT-PCR 出问题可能的林林总总的原因。

无扩增产物

可能原因 1：引物问题（包括：引物设计较差，引物合成较差，引物浓度太低）。

解决方法：设计引物的时候，避免在引物 3'端含有互补序列；避免可以形成内部发卡结构的序列；设计 T_m 类似的引物。针对引物合成的问题，用普通电泳法，看引物的设计和合成质量，是否有目的条带出现。最佳引物浓度介于 $0.1\mu\text{M}$ 到 $0.5\mu\text{M}$ 之间。

可能原因 2：探针问题。

解决办法：就要用到我们前面提到的序列分析了。用 **blast** 对探针序列进行比对，设计符合要求的探针。

可能原因 3：模板问题（包括：模板质量不好，模板浓度太低）。

解决方法：提高模板质量。如果怀疑模板被 **DMSO** 等抑制剂污染了，坚决采用乙醇沉淀；使用 **104copy** 的靶序列，然后在 **25** 到 **30** 个循环中获得信号。

可能原因 4: 不明物干扰。

解决办法: 做 RT-PCR 必须非常小心翼翼。对 RT-PCR 的任何实验样品或试剂，均应采用“三无”离心管（即无菌无酶无热源）进行试剂的分装和使用。



可能原因 5: 扩增酶问题。

解决办法: 不要省钱。买好的扩增酶。分子生物学永远是一分价钱一分货。毛博推荐：选择

hot start Taq 酶进行扩增，可提高灵敏度，增加产量，降低干扰因素

非特异信号

可能原因 1: 引物问题（包括：引物二聚体太多）。

解决方法: 检查引物设计环节和合成环节，必要时重新设计和合成引物。

可能原因 2: 扩增酶问题。

解决办法: 选择 hot start Taq 酶进行扩增，可提高灵敏度，增加特异性。



Please...just send the *Taq*. No more little tubes of magnesium!

可能原因 3: 检测温度太低。

解决办法: 在更高的温度下检测荧光信号。这个时候，引物二聚体已经解链。

灵敏度低

可能原因 1: RNA 问题（包括：RNA 被损害和降解；初始模板 RNA 不充分）。

解决方法: 如果完全损害或者降解的话，更换 RNA；增加模板 RNA 的浓度；使用 10ng-1 μ g 的总 RNA。

可能原因 2: 仪器故障。这个是最坑爹的。

解决方法: 检查扩增仪的温度；检查荧光仪器温度和信号。如果发现故障，就赶紧找厂家来修吧。

可能原因 3: PCR 扩增无效。

解决方法: 反转录的抑制剂很多很多，包括 SDS、EDTA、胍盐、甲酰胺、磷酸钠和亚精胺等等。一定要注意，不要被这些抑制剂污染了。

大家也看到了，RT-PCR 的坑其实不多。但是，一旦掉坑里，你都不知道为什么。因为可能的原因太多了。毛博最后想说的是，一旦出问题了，不要着急，就一个一个排除吧。这种时候，排除法是最管用的。

PCR&qPCR 常见 33 问，哪里不会点哪里 (含实例教程下载)

作者：子非鱼

做过 PCR 的童鞋们都知道要想完全 hold 该实验、成为真正的 PCR 达人，并非易事。就 qPCR 而言，似乎其中的每一环节都可以让整个实验挂掉，也因此成为了资深科研狗们心中的痛。有时，各种假阳性、非特异性带等问题就是挥之不去、不请自来，这个时候该如何是好呢？实践出真知，小鱼就将各位前辈用经验换来的真理分享给大家。

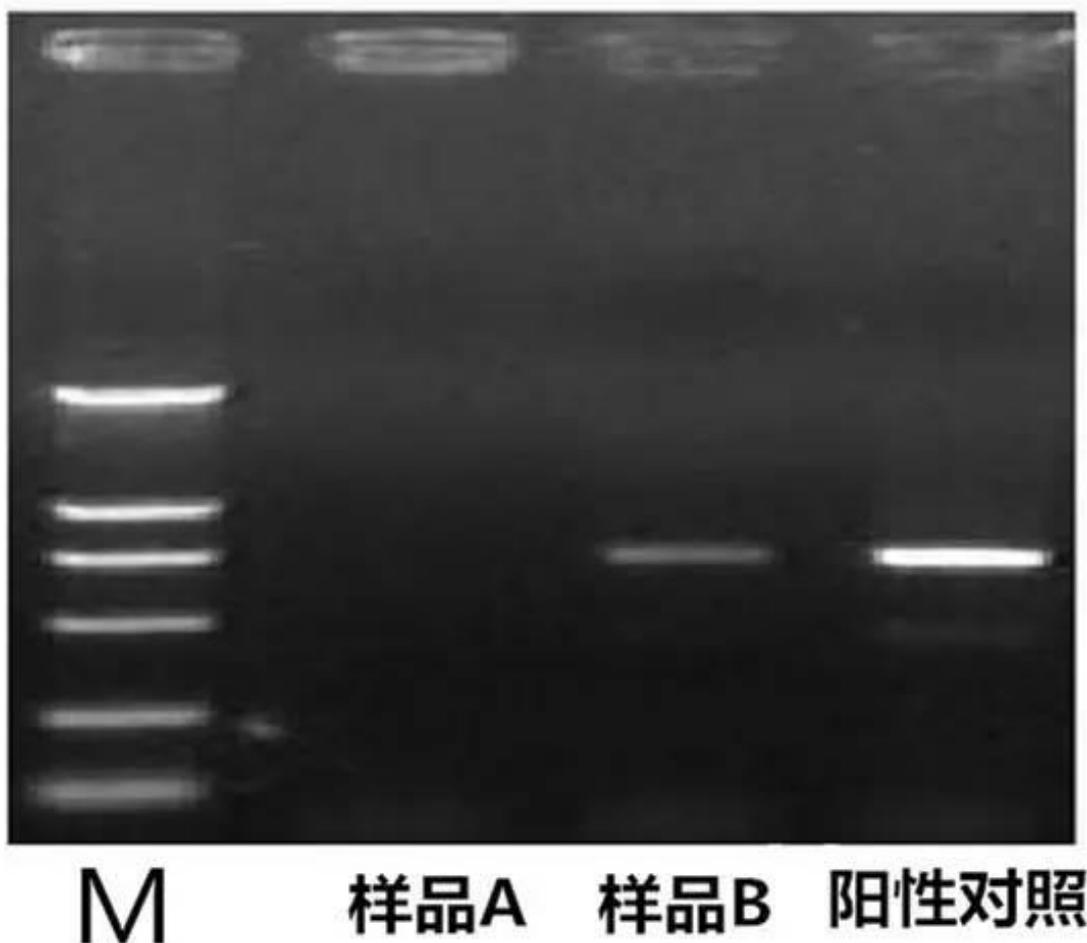
普通 PCR 常见问题

Q1: PCR 产物出现假阳性（即空白对照出现目的扩增产物）

Answer:

- 1.引物设计不合适:扩增序列与非目的扩增序列有同源性,PCR 也可扩增出非靶序列的序列;靶序列太短或引物太短,可导致假阳性。此时需重新设计引物。
- 2.为了避免靶序列受到整个基因组或大片段的交叉污染,操作时应小心轻柔,防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外;除了酶及不能耐高温的物质外,所有试剂及器材应高温灭菌,所有离心管及加样枪头等均应一次性使用;必要时,加样前反应管和试剂均用紫外线照射,以破坏存在的核酸;
- 3.为了避免靶基因受到空气中小片段核酸(与靶序列具有一定同源性)污染,可用巢式 PCR 方法减轻或消除。

Q2: PCR 产物中出现假阴性或无扩增产物（即阳性对照中有条带,而样品则无条带）



Answer:

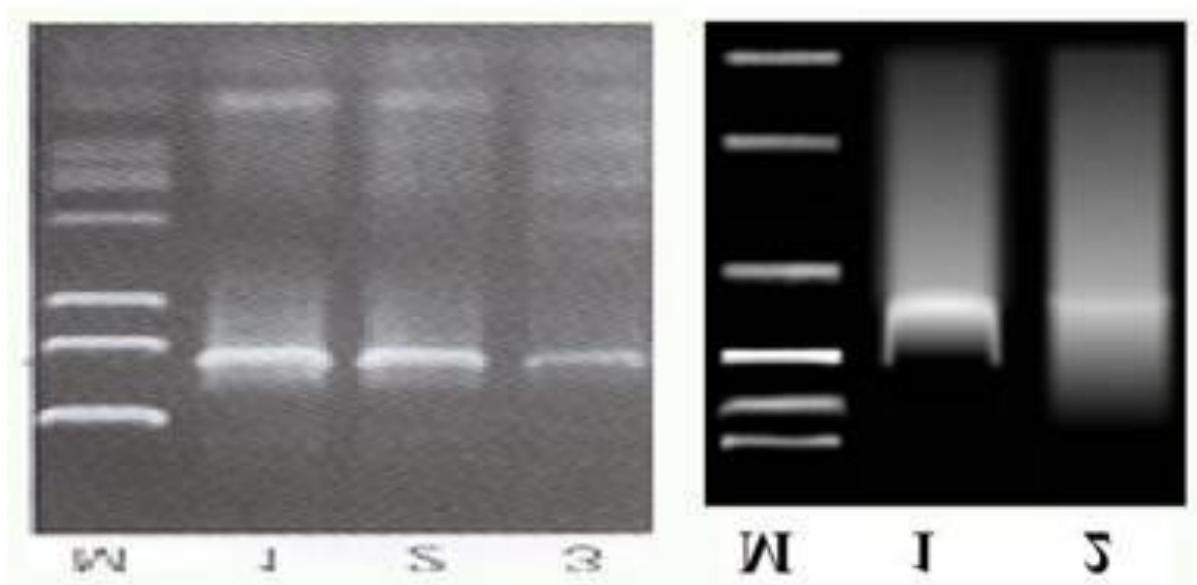
- 1.条带放置时间过久,核酸被降解,最好在 48h 内进行电泳检测。
- 2.DNA 模板纯度低,如含有杂蛋白质或 Taq 酶抑制剂,可对 DNA 进行再次纯化或重新用优质试剂盒提取 DNA;DNA 浓度太低时,可以加大模板量;对具有二级结构 DNA 使用较好的聚合酶;提取 DNA 时,避免吸入酚类试剂。
- 3.对设计不合理的引物进行重新设计合成;引物应高浓度小量分装保存,防止多次冻融而降解失效;检测引物 OD 值并进行电泳检测以确保两条引物浓度一致。
- 4.酶失活时,更换新酶,或新旧两种酶同时使用,以分析是否因酶的活性丧失或不够而导致假阴性。

5. PCR 反应条件：提高变性/退火温度；适当增加循环次数。

6. Mg^{2+} 浓度过低可影响 PCR 扩增产量甚至使 PCR 扩增失败，而 Mg^{2+} 浓度过高会降低 PCR 的特异性，因而可适当提高 Mg^{2+} 浓度。

7. 如果靶序列发生突变或缺失时，也会影响引物和模板的特异性结合，产生假阴性结果。

Q3: 非特异性条带扩增或者条带出现拖尾现象



Answer:

1. 当引物特异性差或引物形成二聚体时，可重新设计引物或者使用巢式 PCR
2. 若模板或引物浓度过高，可适当降低模板或引物浓度
3. 酶量过多，则适当减少酶量
4. Mg^{2+} 浓度偏高，则降低镁离子浓度

5.退火温度偏低,适当提高退火温度或使用二阶段温度法(94℃变性,65℃左右退火与延伸)

6.循环次数过多,不仅会降低扩增效率,且会使错误掺入率增加,因此需要减少循环次数。

Q4: 提高 PCR 特异性的策略有哪些?

Answer:

四种策略:

1.巢式 PCR (Nest-PCR)可增加稀有靶序列的灵敏度;降低了扩增多个靶位点的可能性;提高 PCR 特异性



2. 递减 PCR (Touch Down PCR): 前几个循环使用严谨的退火条件提高特异性; 循环设在比估算的 T_m 高大约 5℃ 的退火温度下开始, 然后每个循环降低 1-2℃, 直到退火温度低于 T_m 5℃。适合用于 AFLP、DNA 指纹分析等。

3. 热启动 PCR: 抑制一种基本成分延迟 DNA 合成, 直到 PCR 仪到达变性温度。如在冰上配制 PCR 反应液以抑制 Taq 酶活性, 后将其置于预热的 PCR 仪中。

4. 使用 PCR 增强剂: 甲酰胺, DMSO, 甘油, 甜菜碱等可以降低熔解温度, 有助于引物退火, 辅助 DNA 聚合酶延伸通过二级结构区。但是增强剂的浓度要适当。

Q5: PCR 引物设计的一般原则是什么?

Answer:

- 1.引物长度: 15-30bp,一般为 20bp 左右。
- 2.引物碱基: G+C 含量以 40-60%为宜, G+C 太少扩增效果不佳, G+C 过多易出现非特异条带。上下游引物的 GC 含量不能相差太大。A/T/C/G 最好随机分布, 避免 5 个以上的嘌呤或嘧啶核苷酸的成串排列。
- 3.引物结构: 避免引物 3'端出现互补序列及二级结构, 3'端的碱基特别是最末及倒数第二个碱基, 应严格要求配对。
- 4.引物中酶切位点一般加在 5'端, 合适的酶切位点便于后续实验中的酶切分析或分子克隆。
- 5.引物浓度: 每条引物浓度 0.1-1 μ mol 或 10-100pmol, 以最低引物量产生所需要的结果为好, 引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增, 且可增加引物间二聚体的形成机会。

Q6: 克隆 PCR 产物的最优条件是什么?

Answer:

目的片段与载体的最佳比例需依照实验来确定, 一般 1:1 为最佳比, 摩尔数比为 1:8 或 8:1 也行。连接用 5 μ l 2X 连接液, 50ng 质粒 DNA, 1 Weiss 单位的 T4 连接酶及目的片段共 10 μ l。室温保温 1 小时, 或 4 $^{\circ}$ C 过夜 (可提高链接效率)。在这 2 种温度下, 缺 T-凸出端的载体会自连, 产生蓝斑。

Q7: PCR 产物是否需要凝胶纯化?

Answer:

如凝胶分析扩增产物中只有一条带，则无需凝胶纯化。若是有大量的引物二聚体，则需在克隆前进行凝胶纯化。

Q8: 没有回收到目的片段，需要做什么对照实验？

Answer:

- 1.涂布未转化的感受态细胞，如有菌落，表明氨苄霉素失效，或有氨苄抗性的杂菌污染。
- 2.转化完整质粒，计算菌落生长数，测定转化效率。转化率=产生菌落的总数/铺板 DNA 总量，铺板 DNA 总量是转化反应所用的量除以稀释倍数。例如将 1ul 的质粒（1ug/ul）用于 100ul 感受态细胞转化。再将 1ul 转化后的感受态细胞稀释至 1000ul 后（含有 10ng DNA），用 100ul 铺板（含有 1ng DNA）。过夜培养后得到了 1000 个菌落。转化率=1000 菌落数×10³ng/铺板 1ng DNA=10⁶ cfu/ug。低于 10⁸cfu/ug，转化效率低，应重新进行细胞转化。
- 3.如用 pGEM-T 作为阳性对照，产生了超过 20-40 个蓝斑，表明载体失去 T。可能是连接酶污染了核酸酶，需更换核酸酶。

Q9: 对照实验结果好，却没有回收到目的片段，实验出了什么问题？

Answer:

- 1.目的片段不适合连接。因用凝胶纯化的目的片段在受到 UV 过度照射时会产生嘧啶二聚体，不利于连接，DNA 必须重新纯化。
- 2.如 PCR 反应体系的 DNA 聚合酶若带有修复功能，则扩增产物末端无碱基 A（该碱基是 pGEM-T 载体克隆所需的）。可将酶更换为 Taq DNA 聚合酶。

3.高度重复序列可能会不稳定，在 PCR 扩增中产生缺失和重排。如若目的片段高频率的产生缺失和重排，需用重组缺陷大肠杆菌菌株，如 SURE 细胞。

qPCR 的疑难杂问

Q10: 如何提高 RT-PCR 反应的灵敏度与特异性?

Answer:

- 1.首先确定模板 RNA 完整性好，无 DNA 污染。
- 2.RNA 模板中不应含有扩增反应抑制剂
- 3.为了防止模板降解，在反应体系中加入 RNase 抑制剂 RNasin。
- 4.使用适量的模板 RNA，模板量太多会降低特异性，太少会导致扩增不出条带或条带太弱。
- 5.若模板中有二级结构，可通过提高逆转录反应温度来提高扩增效果。
- 6.设计引物时，避免在引物 3'端含有互补序列，避免形成内部发卡结构。

Q11: 避免 RNA 降解的方法有哪些?

Answer:

- 1.在用来验证完整性之前先在变性胶上分析 RNA

2. 使用良好无污染技术分离 RNA

3. 将组织从动物体取出后立刻提取 RNA，并将提取好的 RNA 反转录为 cDNA 进行低温保存。

Q12: RNA 中含有逆转录抑制剂时，怎么处理？

Answer:

逆转录抑制剂包括：SDS、EDTA、甘油、焦磷酸钠、亚精胺和胍盐，可将对照 RNA 同样品混合，同对照 RNA 反应比较产量以检测 RNA 抑制剂；若对照 RNA 与样品混合后产量降低，则说明样品中存在逆转录抑制剂，可用 70% (v/v) 乙醇对 RNA 沉淀进行清洗，以除去抑制剂。

Q13: 如何解决合成 cDNA 第一链合成的引物退火不充分？

Answer:

确定退火温度适合实验中所用的引物。如随机六聚体，建议在反应温度保温之前先在 25°C 保温 10min。

Q14: 如何减少 RNA 模板中的二级结构？

Answer:

1. 将 RNA 和引物在不含盐及缓冲液条件下变性、退火；提高逆转录反应温度。

2. 温度超过 60°C 时，不能使用 oligo (dT) 引物，选择一个在反应温度可以退火的 GSP

3. RT-PCR 产物的长度超过 1kb 时，反应温度需保持在 65°C。

Q15: RNA 中有 DNA 污染的处理方式

Answer:

1. 若是基因组 DNA 的污染，可使用 DNaseI 处理 RNA；同时设置没有逆转录的对照组反应检测 DNA 污染。

2. 若是受到外源 DNA 的污染，可使用抗气雾剂和 UDG 酶。

Q16: qPCR 探针设计的一般原则有哪些？

Answer:

1. 扩增片段的长度不应太大，一般小于 300bp。

2. 探针不能和任一引物互补，且其长度在保证特异性的前提下尽可能的短，长度不要超过 30bp。

3. 探针的 T_m 值至少比引物的 T_m 值高 5 度

4. 探针如用于检测多态位点，多态位点应尽可能靠近探针中部

5. 探针 5'端不能是碱基 G，G 对荧光基团有猝灭作用。

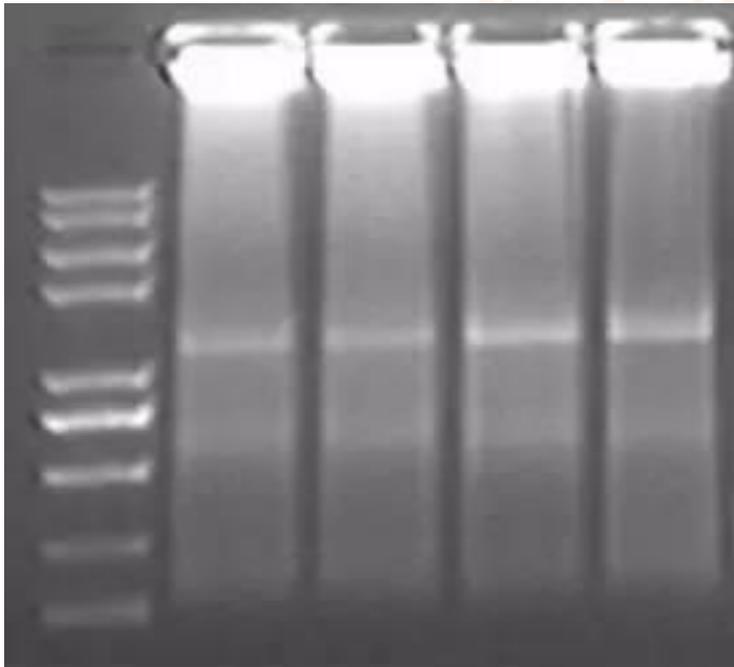
Q17: 在无反转录酶的情况下，对照 RNA 仍获得扩增结果

Answer:

1.体外转录时不可能将所有 DNA 模板消除，因而对照组会含有痕量的 DNA。建议可将第一链 cDNA 稀释 1:10、1:100、1:1000 倍以消除 DNA 污染造成的影响。

2.可能是引物二聚体的条带。

Q18: 扩增产物滞留在加样孔中



Answer:

1.可能是由于模板量过高而导致 PCR 结果产生了高分子量的 DNA 胶状物。建议将第一链 cDNA 浓度稀释至 100 倍再进行二次扩增。

2.在二次 PCR 时，使用的退火温度如果比引物的 T_m 值低 5°C ，可将退火温度适当增高或进行热启动以提高特异性。

Q19: 无 Ct 信号出现

Answer:

1.反应循环参数不够，一般要在 35 个循环以上，但是过多的循环次数可增加背景值。

2.检测荧光信号的步骤有误。SYBRgreen 法（SG 法）采用的是 72°C 延伸时采集荧光信号，taqman 法则是在退火结束或延伸结束时进行信号采集。

3.引物或探针降解，可用 PAGE 电泳检测其完整性，若是电泳条带呈弥散状，可考虑重新合成引物或探针。

4.模板不足或降解，则可以重新提取核酸模板。

Q20: Ct 值出现过晚 (Ct>38)

Answer:

1.扩增效率低，反应条件不够优化，降低退火温度，增加镁离子浓度。

2.反应成分降解或加样量不足

3.PCR 产物过长，一般采用 80-150bp.

Q21: 标准曲线线性关系不佳

Answer:

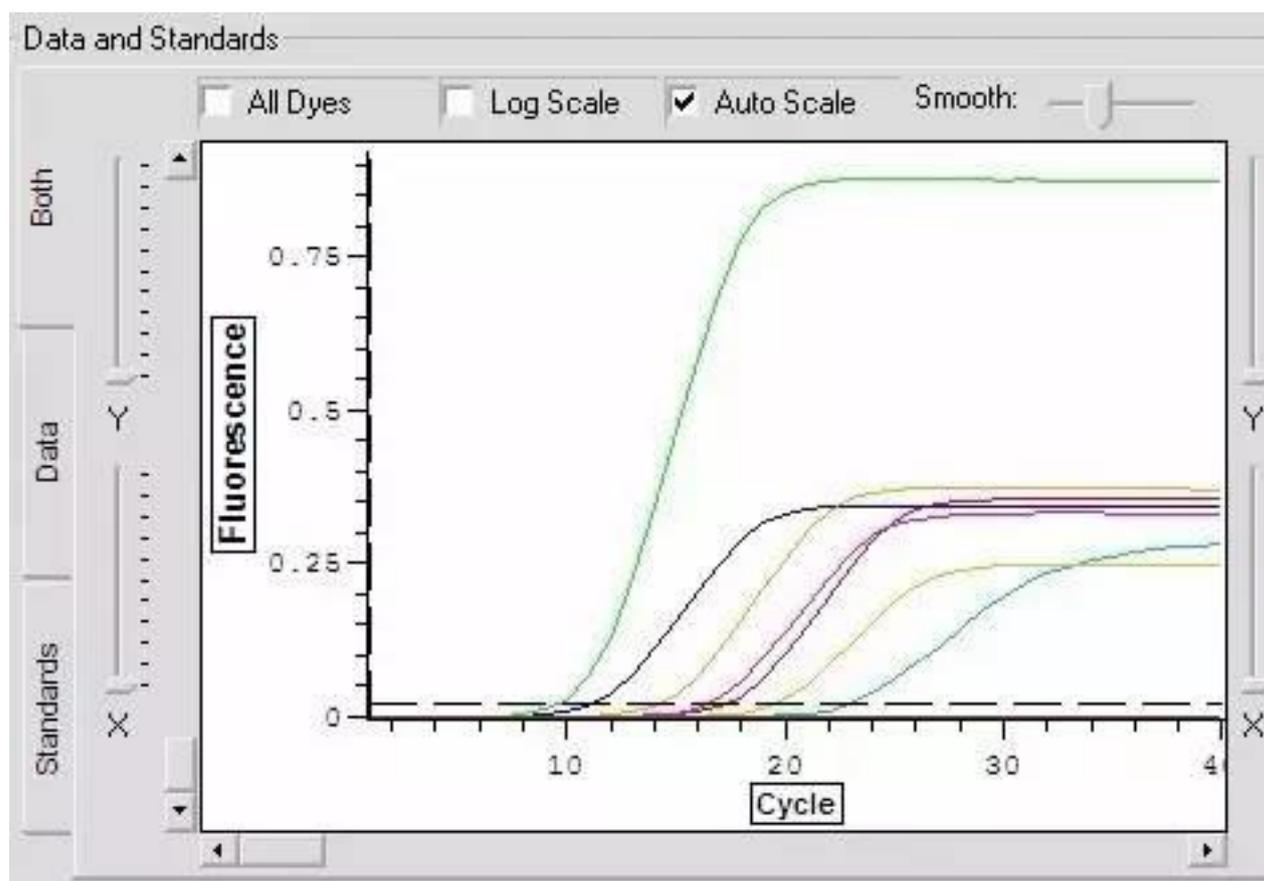
1. 加样存在误差，是样品浓度不成梯度。
2. 标准品出现降解，避免反复冻融。
3. 引物或者探针设计不佳。
4. 模板中存在抑制物或模板浓度过高。

Q22: 溶解曲线存在多个主峰

Answer:

1. 引物设计不够优化。
2. 引物浓度不佳，上下游引物浓度比例不一致。
3. 镁离子浓度过高。
4. 模板基因组的污染。

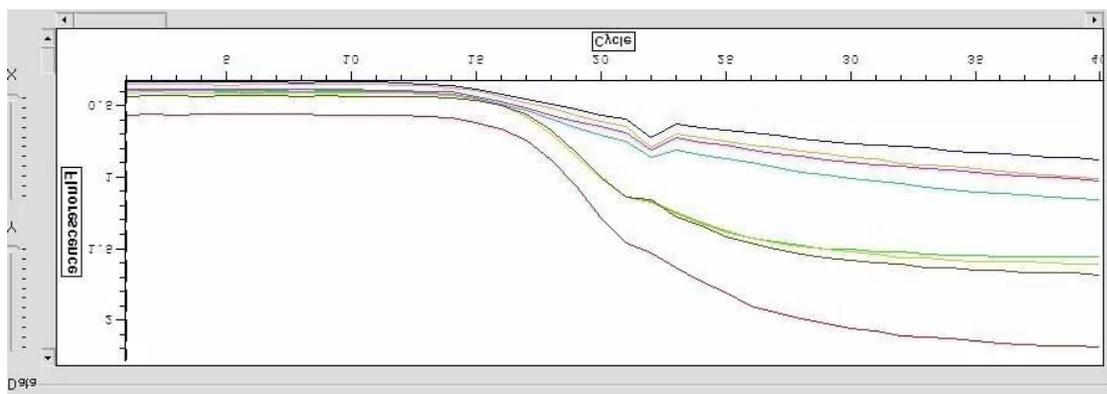
Q23: 同一样品中，其中某一个荧光信号特别强。



Answer:

1. 试剂配制时反应液没有完全溶化，导致探针量在一管增多。
2. 试剂配制时没有充分混匀致各管中各成分的量不同。
3. PCR 仪热槽被荧光物质污染，需要清除热槽中的污染。

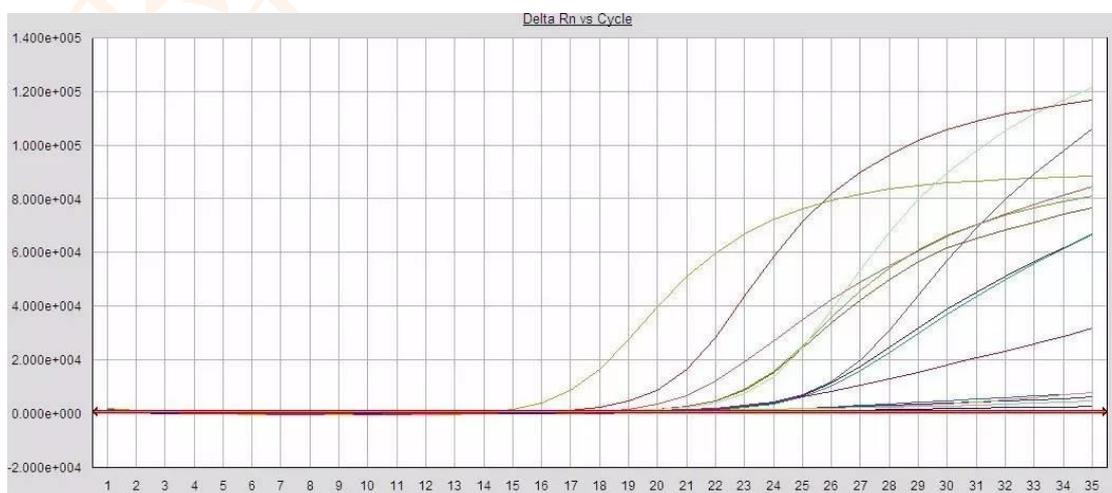
Q24: 扩增曲线有一向上或向下的尖峰？



Answer:

- 1.反应过程中电压不稳定
- 2.可能在 20 个循环左右时，仪器有停下或仪器有开盖，使光线突然增强
- 3.如果尖峰向下，可能是由卤素灯老化所致，这时应更换。

Q25: 部分样本扩增效率过低?



Answer:

1. 提取液残留，一定程度抑制了 PCR 反应
2. 反应液未严格取量混匀或分装不均匀
3. 试剂失效

Q26: 阴性对照或空白对照翘尾



Answer:

1. 模板提取环境或操作过程有污染
2. 配液过程存在污染

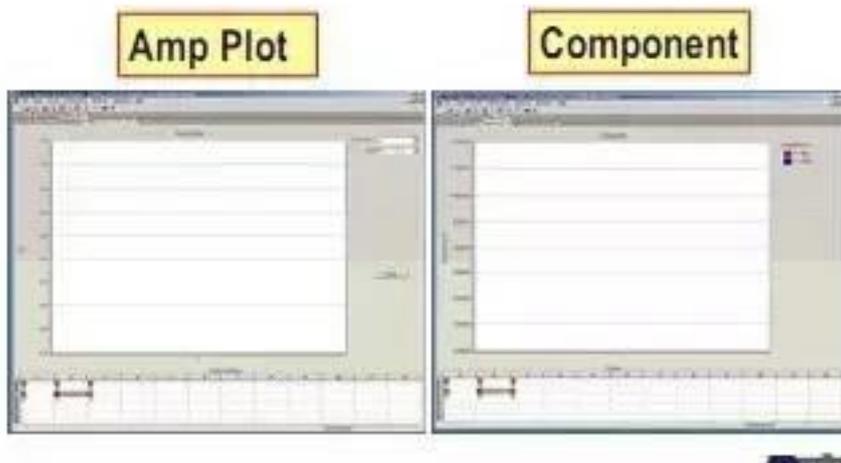
Q27: 直线型扩增曲线



Answer:

1. 探针部分降解：一般稀释的探针可在 4°C 保存至少 3 个月，探针的反复冻融或导致降解；或者探针在光线下暴露时间太长了。
2. 反应液中有 PCR 抑制物。

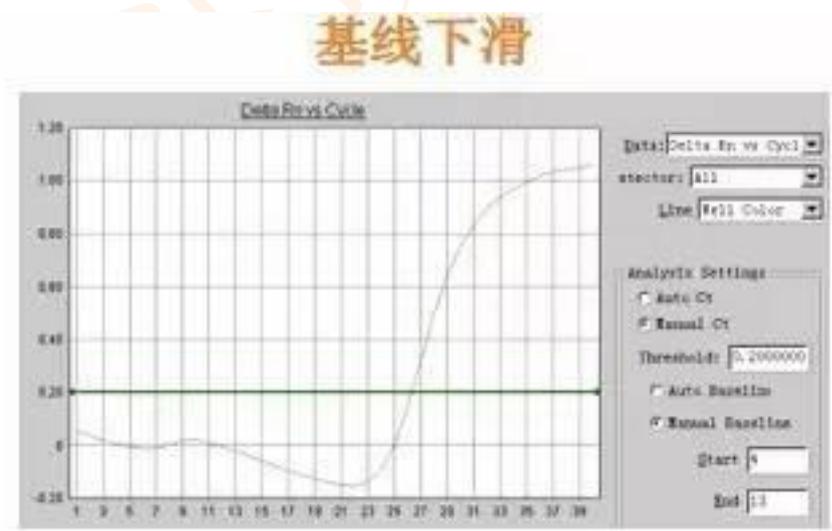
Q28: 没有扩增曲线



Answer:

1. PCR 参数设置错误，在设计循环参数时将荧光信号读取时间设在反应的第一步，即 stage1 阶段
2. 电脑设定了自动休眠

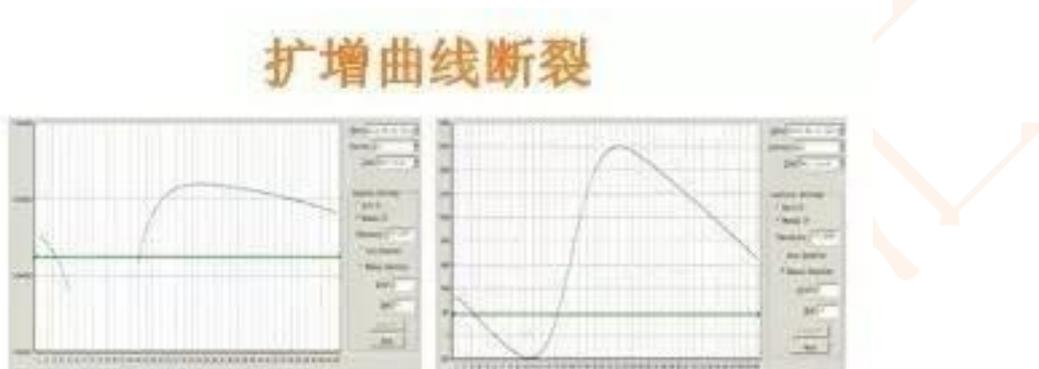
Q29: 基线下滑



Answer:

基线选取范围不对，可试着将基线范围改大一些，这一问题常因试剂质量所致。

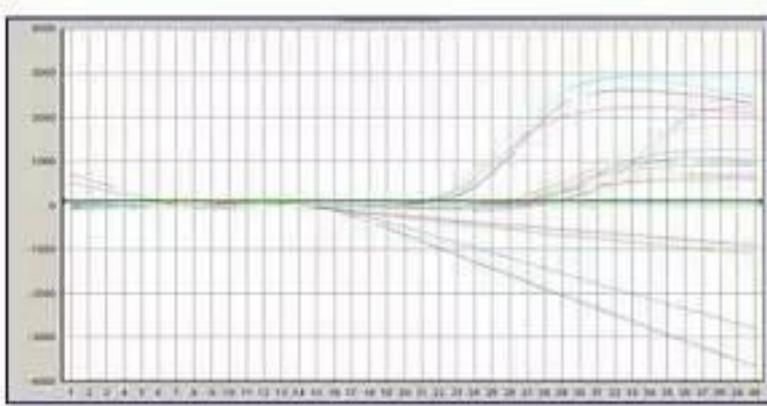
Q30: 扩增曲线断裂



Answer:

基线选取范围不对，基线终点大于 Ct 值，这通常是由于模板 DNA 浓度过高所致，因 Ct 值 <15，而基线范围仍取 3-15，其中包含部分扩增信号，导致标准差偏大，阈值过高，解决办法：减少基线终点至 Ct 前 4 个循环，重新分析数据。

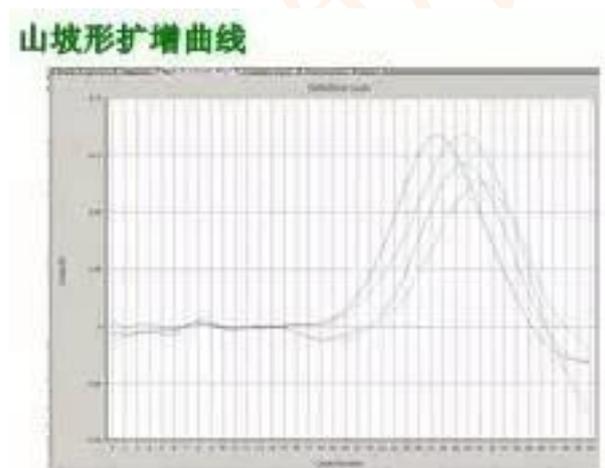
Q31: 样品浓度跨度过大



Answer:

样品浓度过高，导致阳性样品扩增曲线在后面循环中呈一向下的直线，其解决方法同“扩增曲线断裂”。

Q32: 山坡形曲线



Answer:

常因反应管封口不严，至反应液蒸发所致。

干货 | 突破 7 个难点，你也是 RT-PCR 达人

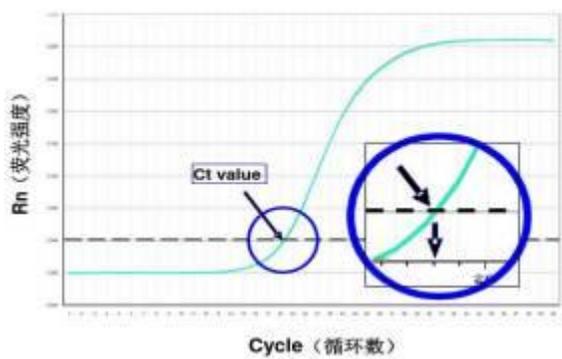
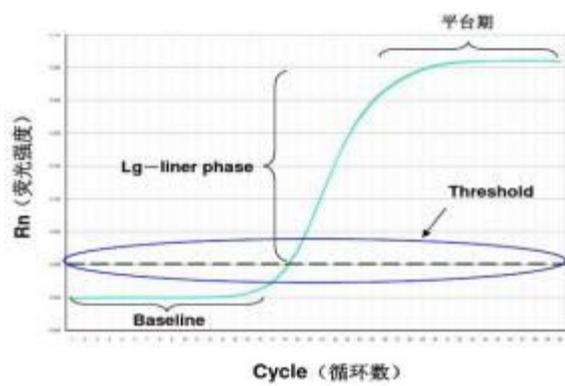
作者：子非鱼

小鱼在初遇 Real time PCR 时，就听说这是个实验黑洞，大部分实验菜鸟都会深陷其中，无法自拔。小鱼也曾在 Real time PCR 这个坑里跌爬滚打了很长时候，同时也积累不少经验。现在就跟大家分享下我做 Real time PCR 的一些心得吧。

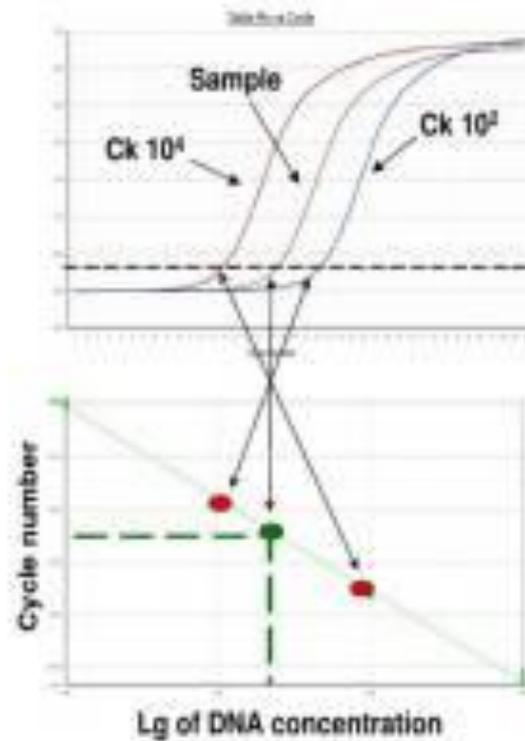
正所谓知彼知己，方能百战百胜。首先我们要先了解下 Real time PCR 的基础知识。

Real time PCR 做为常规 PCR 的衍生反应，主要是通过荧光信号的变化实时监测 PCR 扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化，通过 ct 值和标准曲线的关系对起始模板进行定量分析。

RT-PCR 的**具体数据**就是基线（baseline），荧光阈值（threshold）和 Ct 值。第 3-15 个循环的荧光值就是基线（baseline），是由于测量的偶然误差引起的。阈值（threshold）是指在扩增曲线的指数增长区域内的适当位置上设定的荧光检出界限，一般是基线的标准偏差的 10 倍。Ct 值就是每个反应管里的荧光值达到阈值时的 PCR 循环次数。Ct 值跟初始模板的量成反比。



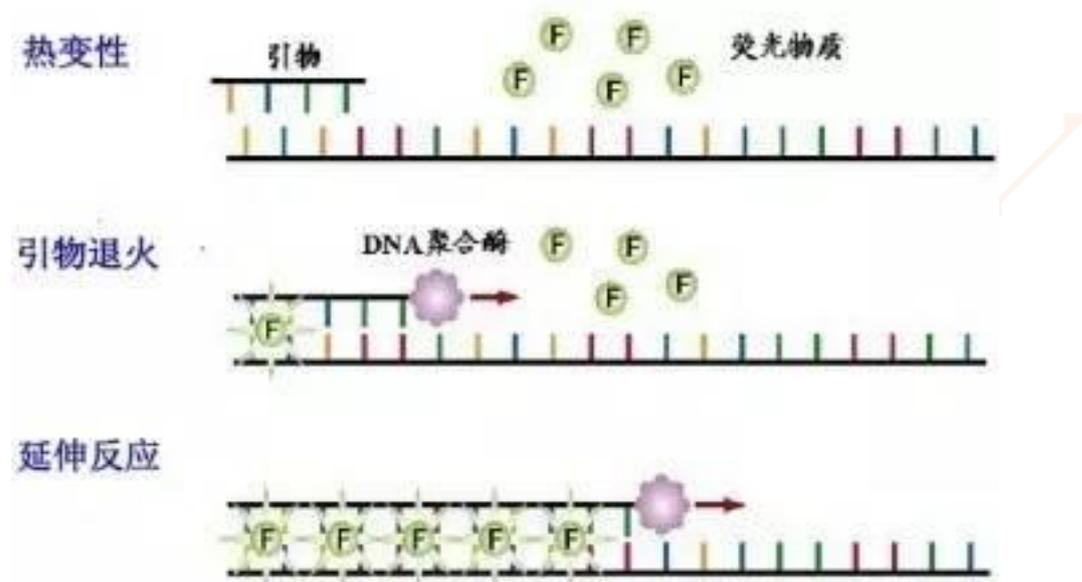
- ▶ 模板DNA量越多，荧光达到阈值的循环数越少，即Ct值越小。
- ▶ Log模板起始浓度与Ct值呈线性关系。



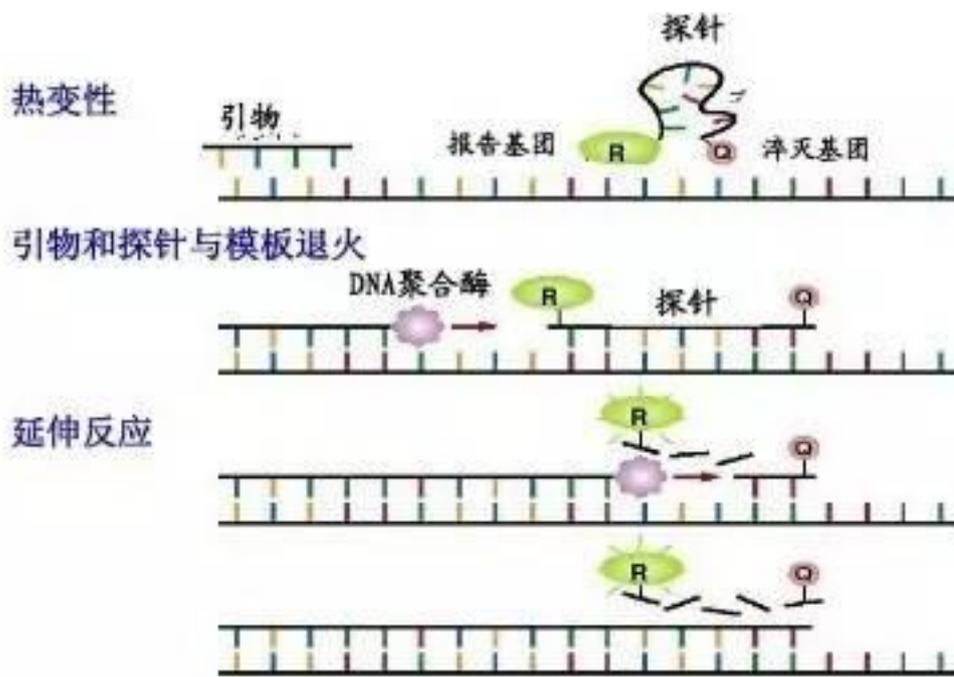
Real time PCR 的标记方法一般包括以下几类：荧光染料嵌合法（SYBR Green I）和荧光探针

法(Taqman 探针) 和分子信标法。

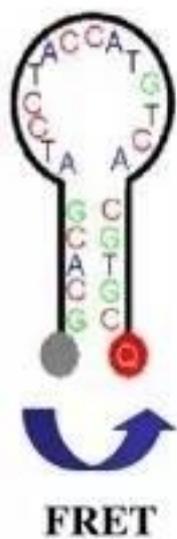
SYBR Green I 法



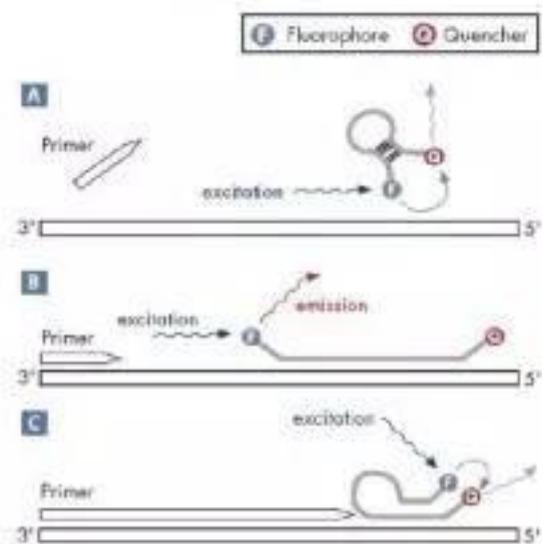
Taqman 探针法



分子信标法



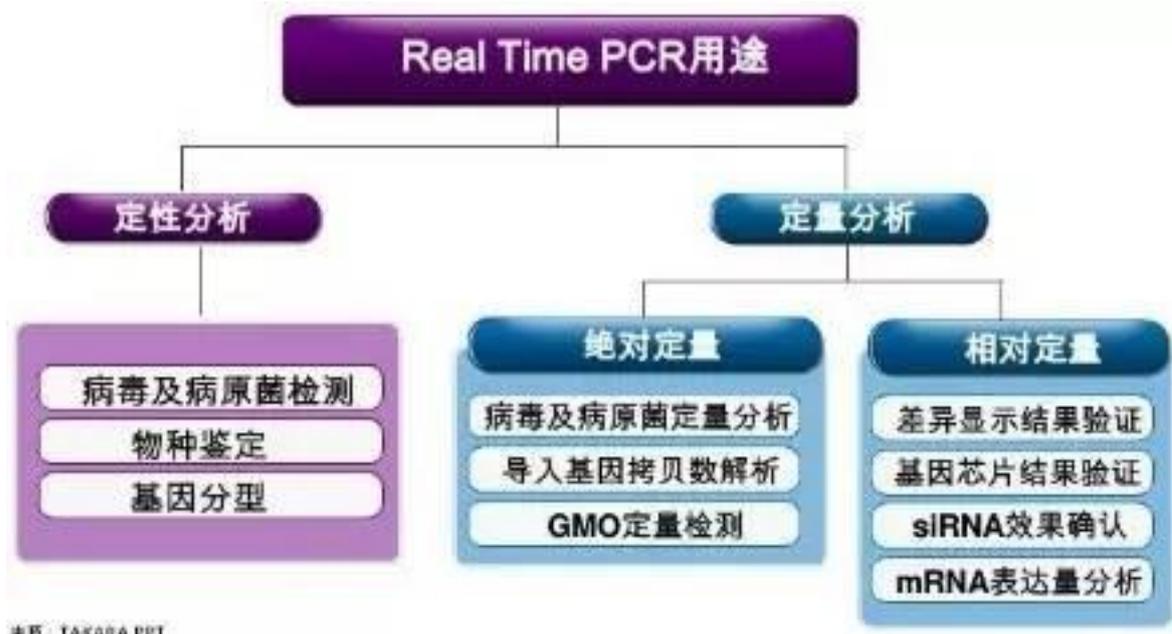
Molecular Beacon Principle



三种荧光定量 PCR 方法的应用比较

方法	优点	缺点	适用范围
SYBR Green I	适用性广 灵敏 方便 便宜	引物要求高 易出现非特异性带	适合科研中对各种目的基因定量分析, 基因表达量的研究, 转基因重组动植物的研究
TaqMan	特异性高 重复性好	价格高 只适合特定目标	病原体检测, 疾病耐药基因研究, 药物疗效考核 遗传疾病的诊断
分子信标	高特异性 荧光 背景低	只适合特定目标 设计困难 价格高	特定基因分析 SNP分析

荧光定量 PCR 的主要应用



原理清楚了，接下来就是实验操作及数据分析了。就在这一步，RT-PCR 准备了很多大坑静待我们跳进去。难怪之前的学长要告诉小鱼，这个实验做多了，很有可能会成为思想家。果不其然，小鱼在这个实验上失败了 N 多次且寻觅原因无果后，便开启了哲学模式，一开口就是些人生感悟，满满的沧桑感。

那么 RT-PCR 究竟难在哪里呢？又该怎么处理呢？

优质 RNA 的获取

防止RNA酶的污染	使用RNA酶抑制剂
所有的玻璃器皿均应在使用前于180°C的高温下干烤6hr或更长时间。	焦磷酸二乙酯(DEPC) 它通过和RNA酶的活性基团组氨酸的咪唑环结合使蛋白质变性,从而抑制酶的活性。
塑料器皿可用0.1% DEPC水浸泡或用氯仿冲洗(注意:有机玻璃器具因可被氯仿腐蚀,故不能使用)。	异硫氰酸胍 它既可破坏细胞结构使核酸从核蛋白中解离出来,又对RNA酶有强烈的变性作用。
配制的溶液应尽可能的用0.1% DEPC,在37°C处理12hr以上,然后用高压灭菌除去残留的DEPC。	氰肌核糖核苷复合物 由氧化钒离子和核苷形成的复合物,它和RNA酶结合形成过混态类物质抑制RNA酶的活性。
不能高压灭菌的试剂,应当用DEPC处理过的无菌双蒸水配制,然后经0.22μm滤膜过滤除菌。	RNA酶的蛋白抑制剂(RNasin) 从大鼠肝或人胎盘中提取得来的酸性糖蛋白。它是RNA酶的一种非竞争性抑制剂,可以和多种RNA酶结合,使其失活。
操作人员戴一次性口罩、帽子、手套,实验过程中手套要勤换。	SDS、尿素、硅藻土等对RNA酶也有一定抑制作用。

特异性引物设计

扩增片段大小	★	80-150 bp(尽量限制在300 bp以内)
Primer长度	★	17-25 base
GC含量	★	40-60%(最好45-55%)
Tm值	★★★	两条引物的Tm值尽量接近,应用专用软件计算Tm值
序列	★	△ 整体上碱基不能过偏 △ 个别部分避免GC rich或AT rich(特别是3'端) △ 避免T/C连续, A/G连续
3'末端序列	★	△ 3'末端避免GC rich或AT rich △ 3'末端碱基最好为G或C △ 3'末端碱基尽量避免为T
互补性	★★★	△ 引物内部或两条引物之间避免3 base以上的互补序列 △ 引物3'末端避免2 base以上的互补序列
特异性	★★★	使用BLAST检索,确认引物特异性
RT-PCR用引物	★★★	尽量在Exon junction上设计引物,限制基因组DNA扩增

TaqMan 探针的设计和荧光标记物选择

Real Time PCR用TaqMan探针设计原则

Probe长度	★★	20-24 bp
Tm值	★★★★	探针的Tm比引物高8-10°C
序列	★	△ 目的序列GC含量相对较高的区域设计 △ 整体上碱基不能过偏 △ 个别部分避免GC rich或AT rich (特别是3' 端) ; 避免T/C连接, A/C连接
5' 末端序列	★	探针5' 末端的第一个碱基不能是G
互补性	★★★★	Probe内部或Probe与两条引物之间避免3 base以上的互补序列
特异性	★★★★	BLAST检索确认Probe特异性

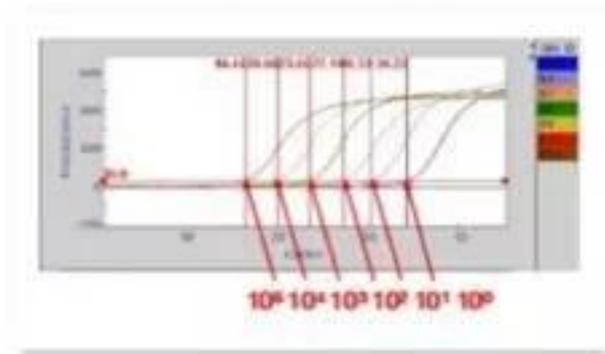
TaqMan探针荧光标记物选择

3'淬灭基团	淬灭基团性质	建议使用的5'报告基团
TAMRA	荧光物质	FAM, HEX, TET, JOE等
Eclipse	非荧光物质	FAM, HEX, TET, JOE, TAMRA, ROX等

标准曲线分析

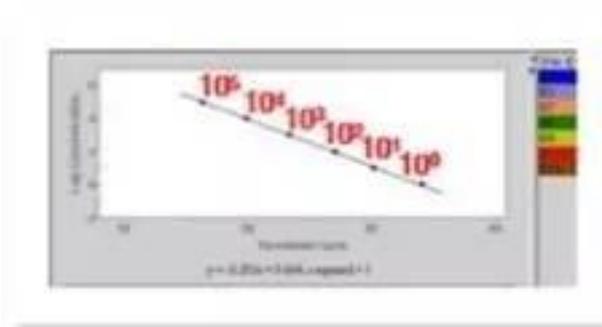
一般，DNA 样品的定量标准品为基因组 DNA&质粒，RNA 样品的定量标准品为 Total RNA&cDNA&体外转录 RNA。绘制标准曲线的标准品梯度的选择一般为 5~6 个梯度，标准品的稀释倍数通常为 10。

理想的标准品扩增曲线



- 1、基线平整
- 2、negative control为水平线
- 3、指数区较明显，陡度大
- 4、平台区汇于一起
- 5、线性范围宽

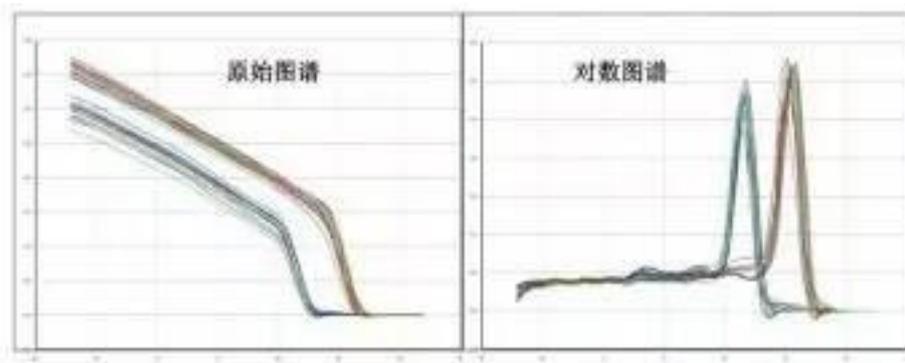
理想的标准曲线



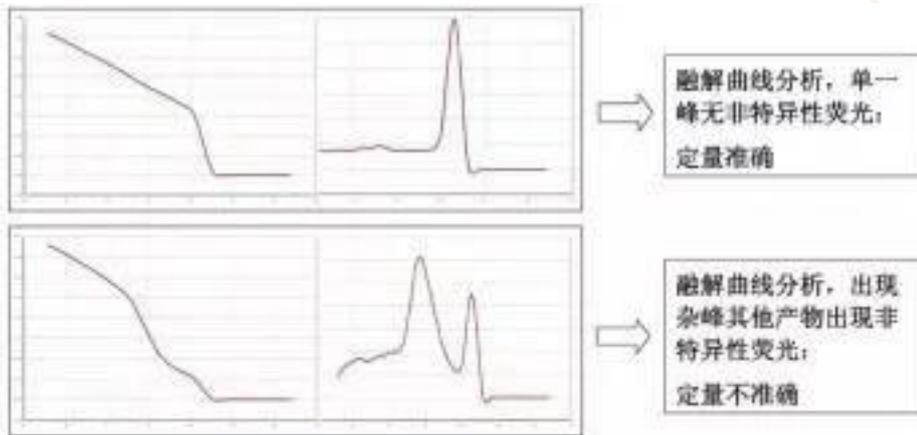
- 相关系数 (r²) : 大于0.98 ,
越接近1 , 结果越好
- 扩增效率 (E): 0.8-1.2 ,
越接近1 , 越理想

熔解曲线分析

SYBR Green I 法进行检测时，可根据熔解曲线确认 PCR 产物的特异性。曲线横坐标是温度，纵坐标是荧光强度的变化值（不是强度本身）。其原理是依据温度从 60 度升至 90 度时，荧光强度的变化值。当温度达到 PCR 产物的 T_m（双链 DNA 分子解链一半时的温度）时，荧光强度变化最大（峰值）。

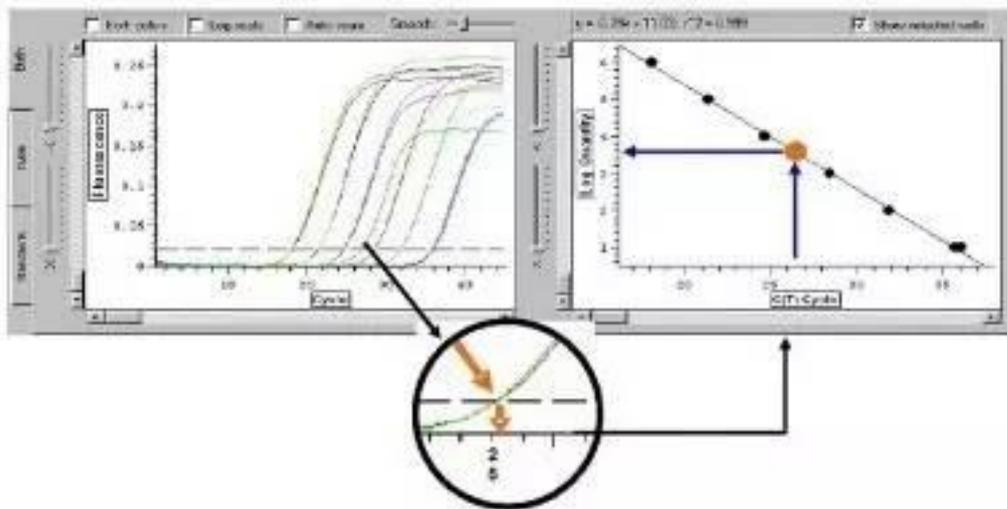


将温度与荧光强度的变化求导 (-dI/dT)



绝对定量分析方法

绝对定量中，LOG（起始浓度）与循环数呈线性关系，通过已知起始拷贝数的标准品可制作出标准曲线，即得到该扩增反应存在的线性关系。然后根据样品的 Ct 值，来确定未知样品的初始模板拷贝数或浓度。通常用于病毒、细菌、衣原体、支原体的定量检测及转基因食品的检测。



其中，标准品的稀释方法与拷贝数计算如下图所示：

倍比梯度稀释方法：

- 1v原液(标准品i) +9v稀释缓冲液，得标准品ii
- 1v标准品ii+9v稀释缓冲液，得标准品iii
- 1v标准品iii +9v稀释缓冲液，得标准品iv
- 1v标准品iv +9v稀释缓冲液，得标准品v

拷贝数的计算：

- 待测样本浓度 (ng/ul) = $OD_{260} \times 40 \times \text{稀释倍数}$
- 样本分子量 = 碱基数 $\times 324$
- 待测样本拷贝数 (copies/ul) = 待测样本浓度 / 样本分子量 $\times 6 \times 10^{14}$

相对定量分析方法

相对定量用于测定单个样品基因的差异表达分析或者比较两个或两个以上样品中某个基因

表达量的变化，则其结果必须用内对照基因（管家基因）校正。管家基因通常指维持细胞基本代谢活动所必须的基因，如 GAPDH/Actin/18s rRNA 等，实际操作中可依据文献或具体实验进行筛选。相对定量的分析方法主要有两种：双标准曲线法和 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。

双标准曲线法：

每次实验都要分别用标准品做内参基因和目的基因的标准曲线，并同时扩增各待测样本中的目的基因和内参基因。然后使用标准曲线来计算待测样本中的目的基因和内参基因的表达量。最后通过公式就可以计算出目的基因的表达差异了。

公式：

$$F = \frac{\text{实验组目的基因表达量} / \text{实验组内参基因表达量}}{\text{对照组目的基因表达量} / \text{对照组内参基因表达量}}$$

优点：分析简单，实验优化相对简单

缺点：对每一个基因，每一轮实验都必需做标准曲线

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法

这是最常用的进行相对基因表达分析的方法，得到的结果是实验组中目的基因相对于对照组中目的基因表达的差异倍数。要求目的基因和内参基因的扩增效率相同，且相对偏差不超过 5%。

公式：

$$F = 2^{-\left[\frac{\text{待测组目的基因平均Ct值} - \text{待测组内参基因平均Ct值}}{\text{对照组目的基因平均Ct值} - \text{对照组内参基因平均Ct值}} \right]}$$

优点：无需作标准曲线

缺点：假定扩增效率为 100 %；

假定标准曲线及每次扩增之际间的效率都保持一致；

实验条件优化较为复杂。

若是目的基因和内参基因的扩增效率不一样时，可以套用以下公式来计算基因表达的差异。

$$R = (1 + E1)^{\Delta Ct1(\text{Control-Sample})} / (1 + E2)^{\Delta Ct2(\text{Control-Sample})}$$

其中，E1：目的基因引物扩增效率；E2：内参基因引物扩增效率； $\Delta Ct1$ ：实验组目的基因 Ct 值差； $\Delta Ct2$ ：对照组目的基因 Ct 值差。（E1=E2=1 时，该公式=2^{- $\Delta\Delta Ct$} ）

如此下来，小伙伴是否觉得 Real-time PCR 并没有想象中那么难呢？那就快快行动起来，一举把该实验拿下吧！

4 蛋白质技术

4.1 蛋白表达及含量测定

5 步搞定基因表达的蛋白质分子量

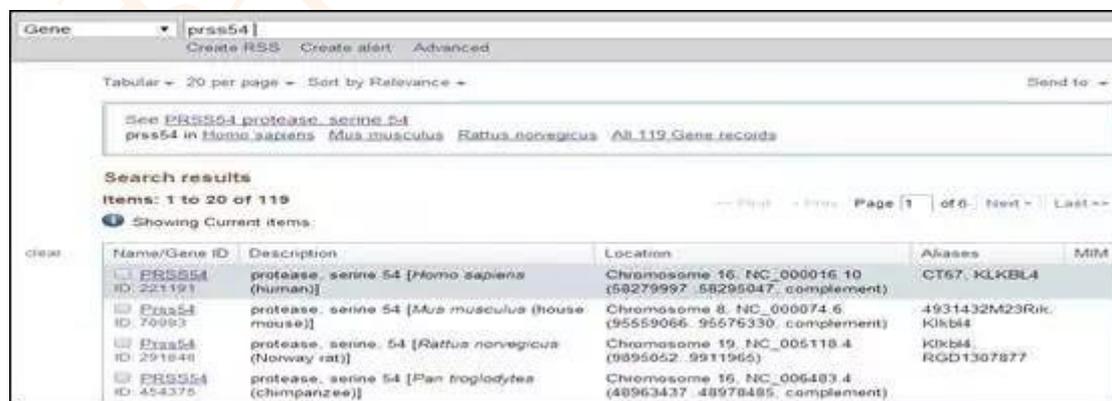
作者：阳光

在实验室，我们经常会做到蛋白质的 SDS—PAGE。跑蛋白电泳，我们都知道最主要的就是需要知道蛋白的分子量的大小，这样跑完电泳后通过与 Marker 的比对，我们才可以知道目的条带的位置，通过考马斯亮蓝染色来分析蛋白样品中是否有目的蛋白，从而为我们进一步的实验提供依据。

对实验新手来说，他们对于蛋白质的分子量的表示以及怎样计算都一头雾水，首先我们谈一下蛋白质分子量的表示。蛋白质分子量的单位为 kDa（简称为 kD），人们为了纪念道尔顿，以他的名字作为原子质量单位。在生物化学、分子生物学和蛋白组学中经常用 D 或 KD，定义为碳 12 原子质量的 1/12， $1D=1/N \text{ g}$ ，N 为阿伏加德罗常数。

接下来我们就来说说如何计算某基因表达的蛋白质的分子量：

1.打开 PubMed: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>,选择 Gene, 输入 prss54, 点击 search, 结果如下图, 点击第一个



Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
PRSS54 ID: 221191	protease, serine 54 [Homo sapiens (human)]	Chromosome 16, NC_000016.10 (58279997-58295047, complement)	CT67, KLKBL4	
Prss54 ID: 70993	protease, serine 54 [Mus musculus (house mouse)]	Chromosome 8, NC_000074.6 (95559066-95575330, complement)	4931432M23Rik, Kikb4	
Prss54 ID: 291848	protease, serine 54 [Rattus norvegicus (Norway rat)]	Chromosome 19, NC_005118.4 (9895052-9911965)	Kikb4, RGD1367877	
PRSS54 ID: 454376	protease, serine 54 [Pan troglodytes (chimpanzee)]	Chromosome 16, NC_006483.4 (48963437-48978485, complement)		

2. 下拉到下图位置，点击 Consensus CDS 后的 CCDS32463.1

The screenshot shows a database entry for an mRNA and protein. The entry is titled "1. NM_001080492.1 - NP_001073961.1 inactive serine protease 54 isoform 1 precursor". Below the title, there is a link to "See identical proteins and their annotated locations for NP_001073961.1". The status is "REVIEWED". The description is "Transcript variant: This variant (1) represents the longest transcript. Both variants 1 and 2 encode the same protein (isoform 1)". The source sequence is "AC009107". The consensus CDS is "CCDS32463.1". The UniProtKB/Swiss-Prot ID is "Q6PE00". The UniProtKB/TrEMBL ID is "A0A140V8C2". The related entry is "ENSP00000219301, ENST00000219301". The conserved domains section shows two domains: "smart00020" (Location: 52 - 264) and "c000190" (Location: 52 - 264). The description for the smart00020 domain is "Tryp_SPc: Trypsin-like serine protease". The description for the c000190 domain is "Tryp_SPc: Trypsin-like serine protease; Many of these are synthesized as inactive precursor zymogens that are cleaved during limited proteolysis to generate their active forms. Alignment contains also inactive enzymes that have substitutions of the catalytic triad..."

Conserved Domains (2) summary	smart00020	c000190
Location: 52 - 264	Location: 52 - 264	Location: 52 - 264
	Tryp_SPc: Trypsin-like serine protease	Tryp_SPc: Trypsin-like serine protease; Many of these are synthesized as inactive precursor zymogens that are cleaved during limited proteolysis to generate their active forms. Alignment contains also inactive enzymes that have substitutions of the catalytic triad...

3. 点进去后下拉到下图位置

CCDS Sequence Data

Blue highlighting indicates alternating exons.

Red highlighting indicates amino acids encoded across a splice junction.

Mouse over the nucleotide or protein sequence below and click on the highlighted codon or residue to select the pair.

Nucleotide Sequence (1188 nt):

```
ATGGTGTCGGCGGGGTCCTCTGTTGGGATGGCAAGATGCGAGGGG TGCTCCTGGTGCTGCTCGGCCTTC
TCTATTCTTCCACCAGTTG TGGCGTCCAGAAAAGCTTCCGTTTTCTACGGTCCCTGACCCCAAGGAGGGCTT
GGTCAGCAGCATGGAGTTCCCGTGGGTGGTGTCGCTGCAGGACTCCAGTACACACACCTGGCTTTCCGGC
TGCATCCTGAGCGAGTTCTGGGTCCTCAGCATCGCATCCGCCATTCCAGAACAGGAAGGACATTGTCGTTA
TAGTGGGTATAAGTAACATGGATCCTAGCAAGATTGCTCACACAGAGTATCCAGTCAATACCATCATCAT
CCATGAGGACTTTGATAACAACCTCCATGAGCAACAACATAGCCCTCCTGAAGACAGACACAGCGATGCAT
TTTGGCAACCTGGTCCAGTCCATCTGCTTCCCTCGGCAGAAATGCTGCATACACCACCAGTCTTGCAGAACT
GCTGGGTGTCAGGATGGAATCCACATCTGCAACAGGAAAATCACATGACGATGAGTGTCTGTAGGAAAAAT
CTTCGTGAAAAGATCTTGACATGTGTCCCTATACAAAATCCAGAAGACAGAATGCGGCAGCCACACGAAA
GAGGAAACCAAGACTGCCTGCTTGGGGGACCCAGGAAGCCCAATGATGTGCCAGCTACAGCAGTTCGATC
TGTGGGTTCTGAGAGGAGTCCGAACTTCGGTGGTGAGACGTGCCCTGGCTGTTCTGTACACCAAGGT
GGAAGACTACAGCAAATGGATCACATCCAAAGGCTGAGAGGGCCGGCCCTCCCTGTCTTCACTCCACCAC
TGGGAAAAGTTGATTTCTTTCTCCACCATGGACCAAATGCCACCATGACACAGAAGACATATTCTGATT
CTGAACTGGGCCATGTTGGATCATACTTGCAGGGACAAAGAAGGACCATCACGCATTCACGACTAGGAAA
CAGCTCTAGAGATAGTCTAGATGTTAGGGAGAAGGATGTAAGGAATCAGGCAGGTCTCCTGAGGCGTCT
GTACAACCCTTATACTATGACTATTACGGTGGGGAGGTGGGGGAAGGTAGGATTTTTCAGGTCAGAACA
GGTTGTATCAGCCCGAAGAAAATCATCTTGGTTTCTTCGTGCTTGTCTTTCTTTTGCAGCAGTATCTAG
```

Translation (395 aa):

```
MVSAAGLSGDGKMRGVLLVLLGLLYSSTSCGVQKASVIFYGPDPEGLVSSMEFPWVWSLQDSQYTHLAFG
CILSEFWVLSIASAIQNRKDIVVIVGISNMDPSKIAHTEYPVNTIIIHEDFDNNSMSNNIALKTDAMH
FGNLVQSICFLGRMLHTPPVLQNCWVSGWNPTSATGNHMTMSVLRKIFVKDLDMCPLYKLQKTECGSHTK
EETKTAQLGDPGSPMNCQLQQFDLWVLRGVNFGGETCPGLFLYTKVEDYSKWIITSKAERAGPPLSSLHH
WEKLI SF SHHPNATMTQKTYSDSELGHVGSYLQQRRTIHSRLGNSSRDSLDVREKDVKESGRSPEAS
VQPLYDYDYGGEVGEGRIFAGQNRLYQPEEIIILVSVFLVFFCSSI
```

Translation 即为该基因表达的蛋白质的氨基酸序列

4.打开 ProtParam : <http://web.expasy.org/protparam/>, 然后将上图中的氨基酸序列复制粘贴到框中


ProtParam

ProtParam tool

ProtParam (References / Documentation) is a tool which allows the computation of various physical and chemical parameters for an entered protein sequence. The computed parameters include the molecular weight, theoretical pI, amino acid composition, instability index, aliphatic index and grand average of hydropathicity (GRAVY) (Disclaimer).

Please note that you may only fill out **one** of the following fields at a time.

Enter a Swiss-Prot/TrEMBL accession number (AC) (for example **P05130**) or a sequence identifier (ID)

Or you can paste your own amino acid sequence (in one-letter code) in the box below:

MVSAAGLSGDGKMRGVLLVLLGLLYSSTSCGVQKASVFGPDPKEGLVSSMEFPWVVSLSQ
 DSQYTHLAFG
 CILSEFWVLSIASAIQNRKDIVVIVGISNMDPSKIAHTEYPVNTIIIHEDFDNNSMSNNI
 ALLKTDIAMI
 FGNLVQSICFLGRMLHTPPVLQNCWVSGWNPSTATGNHMTMSVLRKIFVKDLDMCPLYKL
 QKTECGSHTK
 EETKTACLGDPGSPMMQCQLQFDLWVLRGVLFNGGETCPGLFLYTKVEDYSKWITKAER
 AGPPLSSLHH

5. 点击 compute parameters 即可得到蛋白的分子量

User-provided sequence:

```

10      20      30      40      50      60
MVSAAGLSGD GKM RGVLLVL LGLLYSSTSC GVQKASVFG PDPKEGLVSS MEFPWVVSLSQ
70      80      90      100     110     120
DSQYTHLAFG CILSEFWVLS IASAIQNRKD IVVIVGISNM DPSKIAHTEY PVNTIIIHED
130     140     150     160     170     180
FDNNSMSNNI ALLKTDIAMI FGNLVQSICF LGRMLHTPPV LQNCWVSGWN PTSATGNHMT
190     200     210     220     230     240
MSVLRKIFVK DLDMCPLYKL QKTECGSHTK EETKTACLGD PGSPMMQCQLQ QFDLWVLRGV
250     260     270     280     290     300
LNFNGGETCPG LFLYTKVEDY SKWITKAER AGPPLSSLHH WEKLISFSHH GPNATMTQKT
310     320     330     340     350     360
YSDSELGHVG SYLQGQRRTI THSRLGNSSR DSLDVREKDV KESGRSPEAS VQPLYDYDYG
370     380     390
GEVGEGRIFA GQNRLYQPEE IILVSVLVLF FCSSI

```

References and documentation are available.

Number of amino acids: 395
Molecular weight: 43832.09
Theoretical pI: 6.22

4.2 蛋白分离纯化

技术 | 提升蛋白质样品质量，三招就足够

作者：燕子

在制备中丢失的蛋白质是永远不可能在后面的实验中弥补回来的。蛋白质样品制备是许多实验重要的第一步。为什么要进行样品的制备？电泳的目的不就是分离吗？刚刚接触时燕子也有这样的疑问。然并卵，由于双向电泳一般只能分辨到 1000-3000 个蛋白质点，而样品蛋白质的种类可是高达 10 万种以上，因此样品的预分离制备是必须的。下面来讲讲分离制备蛋白样品时，你必须知道的那三件事。



1. 选对酶抑制剂，避免蛋白质降解

牢记最小限度的减少蛋白水解和其它形式的蛋白降解是制备样品的第一步，这一步看似简单，但是操作中一旦方法不当，就有可能丢失样品中的蛋白和导致蛋白被修饰。

大家可能都知道在提取蛋白质时要添加蛋白酶抑制剂抑制蛋白酶降解。但是有人可能会说，我明明加了 PMSF，怎么曝光出来的条带和内参效果几乎一样啊，然而 PMSF 并不是万能的，你的目的蛋白是磷酸化的还是非磷酸化的呢？如果是磷酸化的蛋白，那么你就得换一个酶抑制剂了，燕子用过罗氏的 Cooktail，对磷酸化的目标蛋白效果不错；为了减少温度对蛋白质的影响，一定不能忘记低温操作！

2. 富集蛋白有妙招

只要你的实验室有一台转速可以超过 12000r/min 的离心机，那么就可以选用最简单最绿色的蛋白质富集方法：超速离心法。一般它能满足你 WB 所需蛋白的要求。最常用的蛋白质富集和纯化方法是用丙酮、TCA、乙醇、异丙醇、氯仿/甲醇、硫酸铵、聚乙烯乙二醇(PEG)或亲和层析试剂盒。然而当你需要 HPLC-MS 的蛋白样品时，2D-PAGE 电泳能够将不同分子量和等电点的蛋白质分离，那么你的质谱图就再也不会只是一坨黑了！



3. 去除杂质步骤不可少

为什么我的质谱图杂带比主带还多，主峰去哪儿了，找不到！曝光出来的条带像一张过敏脸，乱七八糟的！实验中处理用的缓冲液、盐、清洁剂等都会影响蛋白质分离，显色等步骤，还会干扰质谱分析，影响条带灰度值的计算，所以去除缓冲液、盐和清洁剂类杂质显得尤为重要。

去除盐类经常是通过透析、超滤、胶过滤、TCA 沉淀或者有机溶剂和固相萃取等；样品中广谱的清洁剂，离子交换层析可有效地去除非离子和两性清洁剂；类似于盐类，脂质广泛存在于生物的体液中。许多蛋白质会结合脂质，从而降低溶解性，甚至影响等电点和分子量。丙酮沉淀或结合 TCA/丙酮可以有效去除脂质；多聚糖和核酸可能和两性电解质反应，造成双向电泳胶上纹理的出现、使胶的背景产生拖尾和堵塞聚丙烯酰胺胶上的小孔。用 TCA、丙酮苯或酚/醋酸铵沉淀后离心从样品中除去多聚糖是还是很有效的。



4.3 SDS-PAGE

Get 到这几招，方可轻松搞定 SDS-PAGE 电泳实验！

作者：子非鱼

SDS-PAGE 作为一个老生常谈的实验，早已广为科研者所知。然而该实验虽然基础，但是细节繁琐，耗时长久，光是配制试剂就要花费 2 个小时左右。而这还只是 Western blot (WB) 的第一步，也使得完成 WB 实验将会耗费 2 天左右的时间。

这也难怪科研者们常说，一入 WB 深似海，从此休闲是路人。不过，实践出真知，长期在该实验里跌爬滚打的实验狗们也总结出了若干小技巧，可使大家轻松快捷的完成该实验。

1 未雨绸缪，做好万全准备

常言道，不打无准备之仗，方能立于不败之地。实验中种种试剂、抗体等等均是完成实验这座大厦的基石，如果基石打不牢，实验很有可能会半途夭折。而实验中最痛苦的莫过于与实验结果就差那么一步之遥。

以 Western blot (WB) 为例，这眼瞅着就要到条带现身的奇迹时刻，却愣是让曝光试剂的匮乏给硬生生的截断了见证过程，又怎会不让人懊恼上火呢？

其实，上述窘境皆是科研者在实验前准备不足所致，若是能提前发现试剂的不足，或对试剂重新订购，又或者重新配制溶液，均能再次推进实验进程。然而就这订购或配制试剂的过程无疑会消耗我们的时间以及精力。

那么为了避免原材料浪费以及节省更多的时间，SDS-PAGE 电泳过程中的一些试剂还是早早的配制并妥善保存起来为好，如此方可以备不时之需。

缓冲液 (buffer) :

关于这一点，你可能早已知晓，但再次重复一遍也不是坏事。实验中可将所有的凝胶缓冲液进行一次大量配制，如此可方便后续实验中对它的任意使用。至于配制的浓度，10x 浓度是实验室配制母液常用的浓度。

有些实验室会多次重复利用这些凝胶电泳缓冲液，在这种情况下，建议每次使用 buffer 时均要在缓冲瓶上贴一个标签，已记录使用的次数，超过一定期限后就要对缓冲液进行重新配制，以免对实验结果造成影响。

过硫酸铵 (APS):

小编在接触 SDS-PAGE 电泳之初，每次配胶时均会制备新鲜的 APS，可后来发现溶解后的 APS 在分装后，可在-20°C冰箱中得以长期储存。

另外，如果你需要经常使用 SDS-PAGE 凝胶，那么可取出一只分装后的 APS 溶液，将其置于 4°C 冰箱里，可保证其一个月不会过期。

凝胶 (gel):

凝胶是现用现配的好，已成为了各位实验狗心中的常识，那么是不是就意味着凝胶不能提前制备么？其实不然，提前准备好的凝胶在 4°C 冰箱中大致可以保持两周左右。

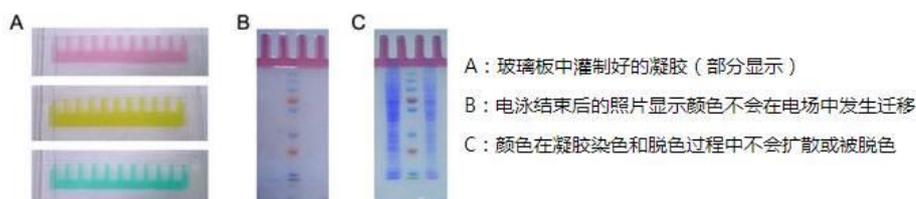
但需要谨记的是在储存凝胶时，保持凝胶湿润是非常重要的。可以将凝胶板、梳子甚至整个固

定装置都装入一个充满蒸馏水的塑料盒中，而后再将其放在 4°C 冰箱中进行保存。

在此，小编向大家推荐一款试剂盒——EpiZyme PAGE 凝胶快速制备试剂盒，其中准备妥妥的预混配方，可以帮大家快速简单的配制分离胶和浓缩胶，即无需计算溶液量，也无需稀释，只需按等比例混合即可，因而可在很短时间内灌制多块凝胶，进行蛋白变性/非变性的电泳分析。



该试剂盒比较酷炫的一点就是，其配制的浓缩胶是彩色的，这就为区分点样孔提供了极大的帮助，从此加样再也不是一件需要费眼力的活儿了。此外，凝胶配制时无需添加 TEMED（有恶臭气味的有毒试剂）即可凝固，各位小伙伴们再也不用担心实验中毒的问题了。



样品 (sample):

大家都知道，制备好的蛋白样品要放在-20°C冰箱中进行存储，有时一些稀少珍贵的样品甚至还要放在-80°C冰箱里保存。

在此，小编建议在储存近期就要进行 PAGE 电泳的蛋白样品时，可将该蛋白样品与 loading buffer 混合在一起，加热变性之后再行储存。如此就可以在上样前，将蛋白样品解冻并离心即可。小编曾用该法储存样品长达一年的时间，且实验结果依然没有被破坏。

2 改变分离胶的覆盖液体

通常多数人在制备好分离胶后，会用蒸馏水覆盖其上，以避免分离胶的高低不平。但是实际上，此时用异丙醇代替水的效果会更好，因为异丙醇可以更好保护凝胶，并使凝胶更快地发生聚合，进而节省制胶的时间。

3 缓冲液不够用？准备些弹珠吧

有时，实验过程中，你会忽然发现没有足够的电泳缓冲液，此时一个节省时间的方法就是在现有电泳缓冲液添加一些弹珠（是的，就是我们小时候曾经玩过的），以提高缓冲液的高度水平来保证缓冲液能没过上样孔。

但是要确保这些弹珠是洁净的，否则一旦其对上样的蛋白样品造成了污染，就不要妄想此次实验会得到一张漂亮的实验结果图片了。

4 传输缓冲区

每个做 SDS-PAGE 电泳的童鞋，只怕都担心过内腔中的电泳缓冲液会有所泄露，毕竟当缓冲液水平降低过多，以至于不能达到覆盖加样孔时，就会导致孔内变得干燥，进而使得凝胶电泳变得无法正常运行。

也许，有人会建议你，当你发现缓冲液下降的太过厉害，则需要暂停电泳，打开电泳槽，重新给内腔添加电泳液，而后再次开启电泳过程。可能电泳期间你会多次重复该过程直至实验完成为止。

显然，该方法需要大家时刻关注电泳槽内腔类电泳液的高低水平变化，其实也是蛮费时费力的。而小编的做法则比较简单粗暴，即一次性在内腔外部也添加同水平的电泳液，如此便可以一劳永逸的解决内腔电泳液泄露问题。

参考文献：SDS-PAGE Tips and Tricks to Save You Time

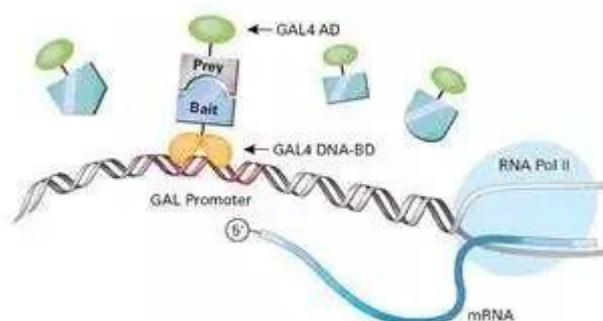
4.4 酵母杂交技术

酵母杂交实验——从一无所知到略知一二

作者：子非鱼

众所周知，低分文章要想逆袭，实现向高分文章的跳跃，就一定少不了要将细胞豪门中分子间错综复杂的关系屡屡清楚。为了找寻能让自家目的蛋白荣登科研“头条榜”的“花边新闻”，一众科研者可谓是操碎了心。庆幸的是，酵母双杂交（Yeast Two-Hybrid, Y2H）和酵母单杂交（Yeast One-Hybrid, Y1H）实验让蛋白质与其好基友（蛋白质、DNA、RNA）的关系在科研者面前变得无所遁形。

蛋白钓鱼术——酵母双杂交（Yeast Two-Hybrid, Y2H）

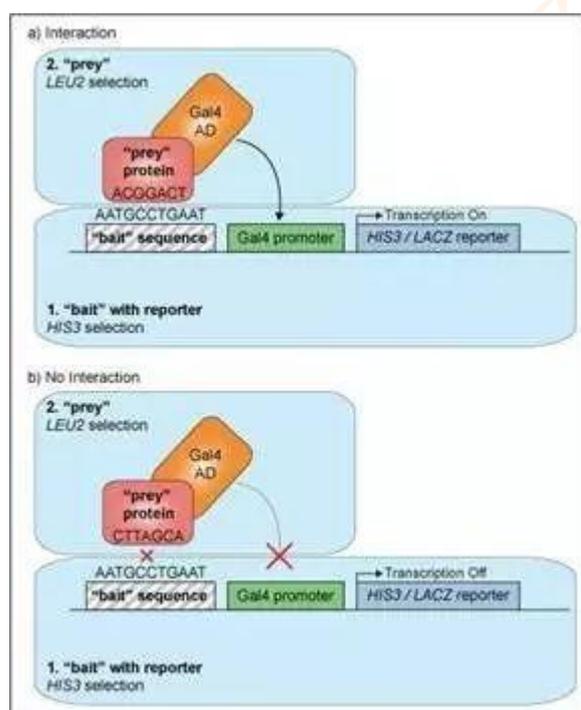


通常一个蛋白在本性上可以同时喜欢很多其他的蛋白，但最终还是会有个最喜欢的，而在Y2H中就能发现他的喜好。换言之，Y2H就是研究一群男女间的自由恋爱问题，而它为两个蛋白牵线拉桥的方法，简单概括起来就一句话：广撒网，钓大鱼。

首先，把目的基因构建成 DNA 结合质粒（BD 质粒）转入 a 型酵母中形成钓饵（Bait）；其次将全 cDNA 片段构建的转录激活质粒（AD 质粒）转化到 b 型酵母中，每个 b 型酵母含有一个随机的 AD 质粒，就形成了酵母库；最后利用酵母接合生殖的特征使得 AD 和 BD 两个质粒同时进入到一个酵母中，当目的蛋白和酵母库中 AD 质粒所表达的蛋白相“合拍”时，质粒上的氨基酸合成基因就会被启动激活，使得酵母可以在营养缺陷型的培养基上生长了，这样就弄清楚谁才是目的蛋白的“命中真爱”了。

然而在 Y2H 中，由于酵母库的构建是通过 cDNA 片段链接到质粒上的，经常会产生 2/3 移码突变的假阳性。因而，在研究蛋白质互作过程中，在用 Y2H 来筛选出相关蛋白后，还需用 Co-IP 和 GST pulldown 进行验证，看看目的蛋白对“真爱”是否做到了“没有你不行”又或者可能“脚踏两只船”还拥有其他的新伙伴。总之，只有依靠缜密的阴性、阳性对照才能真正在蛋白实验中披沙拣金、去伪存真。

DNA 识别者——酵母单杂交（Yeast One-Hybrid, Y1H）



而一提及蛋白质与 DNA 之间千丝万缕的关系，各位小伙伴立刻会向 ChIP-qPCR, ChIP-RNaseq 或荧光素酶报告实验等“神助攻”来寻求帮助。

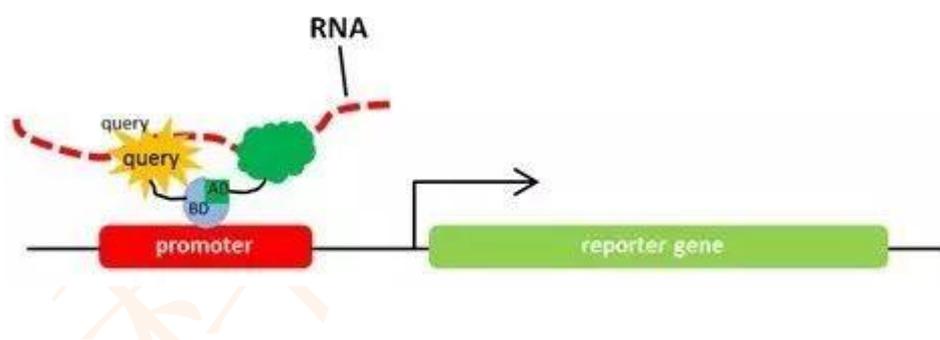
可是你造么？通过酵母单杂交（Y1H），可快速鉴定与感兴趣的特定调节 DNA 序列（bait 序

列)相互作用的蛋白质,除了“明星蛋白”异源转录因子,还可找到一些其他“幕后英雄”,如 DNA 复制蛋白、修复蛋白及抑制蛋白。更重要的是, Y1H 还有着得天独厚的优势:可检测蛋白异构体(isoform)与 DNA 特异性相互作用,而这正是依赖于敏感和特异性抗体绑定到特定靶蛋白的 ChIP 很难做到的。

举个栗子,当通过各类芯片筛选出了一个在肿瘤组织中异常高表达的差异基因 A,可通过 Y1H 实验为其组织一场相亲大会:即将构建含有报告基因(基因 A 作为 Bait 序列)的酵母单细胞株,与后续导入该菌株的表达特定蛋白的表达质粒库“见面”,如果某蛋白能与上游的 Bait 序列“情投意合”,可使融合激活结构域(AD)与报告基因的启动子元件紧密接近,从而激活报告基因的下游转录,使得酵母可以在营养缺陷型的培养基上生长。接下来就可对该蛋白调控基因 A 的机制进行深入研究。

然而,任何筛选都存在假阳性, Y1H 也不例外;且 Y1H 不提供关于 DNA-蛋白质相互作用的功能性后果的任何信息。可见在生物实验中,单一的证据都是薄弱的,无论它貌似多么正确,也要通过对照和多方取证才能确定真正的事实。

升级版——酵母三交技术 (Yeast Three-hybrid, Y3H)



目前,从基本科学和临床角度上,通过 Y3H 来理解与 RNA 病毒相关的疾病过程是很重要的。而在具体的实践过程中, Y3H 可以用于筛选 RNA 文库以及 cDNA 文库。由于 Y3H 在现阶段还是一种新技术,所以迄今为止对其的相关报道还是比较少的。

参考文献:

- 1) An Overview of Yeast Two-Hybrid (Y2H) Screening
- 2) An overview of the Yeast one-hybrid assay
- 3) Two Hybrid Services

4.5 其他蛋白技术

蛋白标签 TAG 是什么高大上的东西？

作者：麦子

麦子刚进实验室的时候，经常听不懂师兄们在交流神马，比如：“你的 flag 砸（杂）出来了么？”



“头大啊~没有呢，我打算换个 tag 试试。”哎，跟这群人真是没法好好的玩耍了！

本来麦子在每次都装听得懂的高冷日子里可以继续好好逍遥，突然有一天，麦子因为研究一个比较新的蛋白没有找到与之相关的抗体，只能望着很多五颜六色的抗体公司传单兴叹，无奈丧着一张大饼脸去找师兄……

“干嘛？”

“没抗体”

“买”

“没抗体”

“几个意思”

“没！抗！体！卖！”

师兄把我拎起来打了两个回合锻炼了其自身体魄后，开始一本正经的跟我讲述如何用蛋白标签解决这种小问题！

首先，蛋白标签（proteintag）是什么？

蛋白标签（proteintag）是指利用 DNA 体外重组技术，与目的蛋白一起融合表达的一种多肽或者蛋白，以便于目的蛋白的表达、检测、示踪和纯化等。

蛋白标签大体可分为三大类：**遗传标签**、**in vivo 标签**和 **in vitro 标签**。大家最熟悉的莫过于遗传标签，即 c-Myc、FLAG 等：将目的基因克隆到含有标签的载体上，以便下游通过抗体或荧光检测。同时，标签的存在也方便了蛋白纯化。

下面麦子就介绍几款常用的 tag 给大家扫扫盲：

名声在外的 Flag-tag:

Flag 标签蛋白为编码 8 个氨基酸的亲水性多肽（DYKDDDDK），同时载体中构建的 Kozak 序列使得带有 FLAG 的融合蛋白在真核表达系统中表达效率更高。

优点：

FLAG 作为融合表达标签，其通常不会与目的蛋白相互作用并且通常不会影响目的蛋白的功能、性质；

融合 FLAG 的目的蛋白，可以直接通过 FLAG 进行亲和层析，此层析为非变性纯化，可以纯化有活性的融合蛋白，并且纯化效率高；

FLAG 作为标签蛋白，其可以被抗 FLAG 的抗体识别，这样就方便通过 Western Blot、ELISA 等方法对含有 FLAG 的融合蛋白进行检测、鉴定。

融合在 N 端的 FLAG, 其可以被肠激酶切除 (DDDK), 从而得到特异的目的蛋白。因此现 FLAG 标签已广泛的应用于蛋白表达、纯化、鉴定、功能研究及其蛋白相互作用等相关领域。

平易近人的 His6-tag:

His6 是指六个组氨酸残基组成的融合标签, 可插入在目的蛋白的 C 末端或 N 末端。当某一个标签的使用, 一是能构成表位利于纯化和检测; 二是构成独特的结构特征(结合配体)利于纯化。组氨酸残基侧链与固态的镍有强烈的吸引力, 可用于固定化金属螯合层析(IMAC), 对重组蛋白进行分离纯化。

优点:

标签的分子量小, 只有~0.84KD, 一般不影响目标蛋白的功能;

His 标签融合蛋白可以在非离子型表面活性剂存在的条件下或变性条件下纯化;

His 标签融合蛋白也被用于蛋白质-蛋白质、蛋白质-DNA 相互作用研究;

His 标签免疫原性相对较低, 可将纯化的蛋白直接注射动物进行免疫制备抗体;

可应用于多种表达系统, 纯化的条件温和; 可以和其它的亲亲和标签一起构建双亲和标签。

高大上的 GST-tag:

GST(谷胱甘肽巯基转移酶) 标签蛋白本身是一个在解毒过程中起到重要作用的转移酶, 它的天然大小为 26KD。将它应用在原核表达的原因大致有两个:

一个是因为它是一个高度可溶的蛋白, 希望可以利用它增加外源蛋白的可溶性;

另一个是它可以在大肠杆菌中大量表达, 起到提高表达量的作用。

GST 融合表达系统广泛应用于各种融合蛋白的表达, 可以在大肠杆菌和酵母菌等宿主细胞中表达。结合的融合蛋白在非变性条件下用 10mM 还原型谷胱甘肽洗脱。在大多数情况

下，融合蛋白在水溶液中是可溶的，并形成二体。GST 标签可用酶学分析或免疫分析很方便的检测。标签有助于保护重组蛋白免受胞外蛋白酶的降解并提高其稳定性。在大多数情况下 GST 融合蛋白是完全或部分可溶的。

纯化：该表达系统表达的 GST 标签蛋白可直接从细菌裂解液中利用含有还原型谷胱甘肽琼脂糖凝胶(Glutathionesepharose)亲和树脂进行纯化。GST 标签蛋白可在温和、非变性条件下洗脱，因此保留了蛋白的抗原性和生物活性。GST 在变性条件下会失去对谷胱甘肽树脂的结合能力，因此不能在纯化缓冲液中加入强变性剂如：盐酸胍或尿素等。

如果要去除 GST 融合部分，可用位点特异性蛋白酶切除。

检测：可用 GST 抗体或表达的目的蛋白特异性抗体检测

常规化的 c-Myc-tag

C-Myc 标签蛋白，是一个含 11 个氨基酸的小标签，标签序列 **Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu**，这 11 个氨基酸作为抗原表位表达在不同的蛋白质框架中仍可识别其相应抗体。C-Myc tag 已成功应用在 Western-blot 杂交技术、免疫沉淀和流式细胞计量术中，可用于检测重组蛋白质在靶细胞中的表达。

蛋白标签 TAG 是什么高大上的东西？

作者：老谈

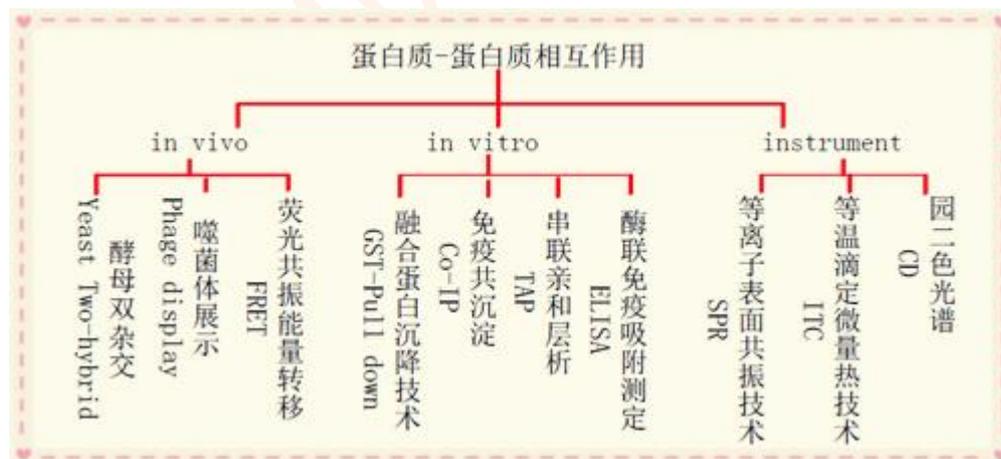
作为功能行使者的蛋白质，他们之间的蛋白质-蛋白质相互作用（PPI）以及通过相互作用而形成的蛋白复合物是细胞各种基本功能的主要完成者。几乎所有的重要生命活动，包括 DNA 的复制与转录、蛋白质的合成与分泌、信号转导与代谢等等，都离不开蛋白质之间的相

互作用。

大体上，蛋白质相互作用存在于以下几类情况中：

- ① DNA polymerase——DNA 聚合酶
- ② Nucleosome——核小体
- ③ Spliceosome——剪接体
- ④ Proteasome——蛋白酶体
- ⑤ ATPase——ATP 酶
- ⑥ Signal transduction——信号传导

蛋白质-蛋白质相互作用研究也可归纳如下



蛋白质-蛋白质相互作用软件预测

软件预测的原理

- ① 基于基因组的方法
- ② 基于进化关系
- ③ 基于蛋白结构（3-D 结构）
- ④ 基于蛋白结构域
- ⑤ 基于一级蛋白质结构（即氨基酸序列）

上述方法注释及相关软件：

①：基于基因组预测蛋白质相互作用的方法不适用于真核细胞，且对于位于远方的基因无法预测，而对于距离近的基因不足以说明其有相互作用。

②：通过蛋白质的进化关系进行分析得知存在相似特征的蛋白质可能在功能上相关。

③、④：通常用的比较多的预测方法是一下两种：基于蛋白质 3-D 结构和基于蛋白质结构域。

由于具有近距离同源性的蛋白质在生理上以相同或相似的方式相互作用，并且 3-D 蛋白相互作用面的氨基酸残基区域结构保守；基于这两点，目前开发出的软件有 InterPreTs、MULTIPROPECTOR 和 PRISM。

基于进化上保守的结构域开发的预测软件有 PreSPI 和 PID。PreSPI 是基于保守的 domain-domain 相互作用而开发的，可以预测多个蛋白，乃至整个蛋白相互作用网络；其具有较高的预测敏感性（77%）和特异性（75%）。PID 则利用各种信息，包括序列、相互作用区域、相互作用蛋白节结构域；其具有 50%的敏感性和 98%的特异性。

⑤：基于蛋白质一级结构的预测软件除了可以预测蛋白质相互作用以外，还可以预测

出相互作用的两个蛋白分别是那一段氨基酸序列负责 PPI。基于该方法开发出来的预测软件目前较为成熟的是 PIPE (protein-protein interaction prediction engine)。该软件具备 75% 的准确率及 61% 的敏感性。

老谈杂谈：

和采用实验方法筛选蛋白质相互作用的方法相比，采用生物信息学方法进行分析可以为您节省不少的时间与金钱成本。通过生物信息学方法分析，可为研究人员缩小筛选范围，并评估研究方向。但是，小伙伴们需要注意的是，生物信息学软件的开发是基于目前已经验证的 PPI 数据库训练而成的，其性能还有待进一步提升，如果对于某一个软件的结果没有那么信任，老谈推荐你不妨交叉使用多个软件！

中心法则虐我千万遍~

作者：酸菜

By: 酸菜

From: HelixLife



其实在很久很久以前（1957 年），中心法则明明是这样的：

DNA → RNA → 蛋白质

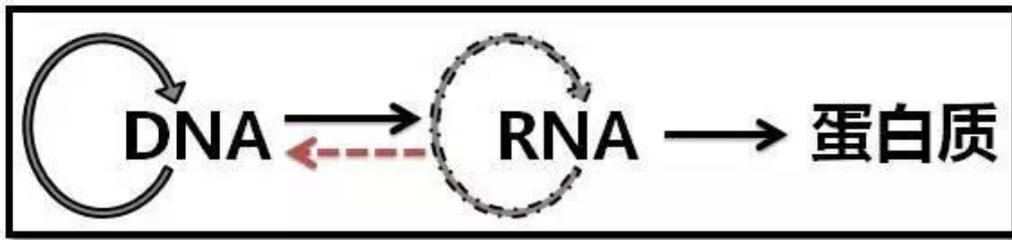
多么质朴和简单！后来过了十几年，H.M.特明和 D.巴尔的摩在一些 RNA 致癌病毒中发现它们在宿主细胞中的复制过程是先以病毒的 RNA 分子为模板合成一个 DNA 分子，再以 DNA 分子为模板合成新的病毒 RNA。这个发现当时发表在 Nature 上面。

- 2. [Central dogma reversed](#)
[No authors listed]
Nature. 1970 Jun 27;226(5252):1198-9. No abstract available.
PMID: 5422595 [PubMed - indexed for MEDLINE]
[Related citations](#)

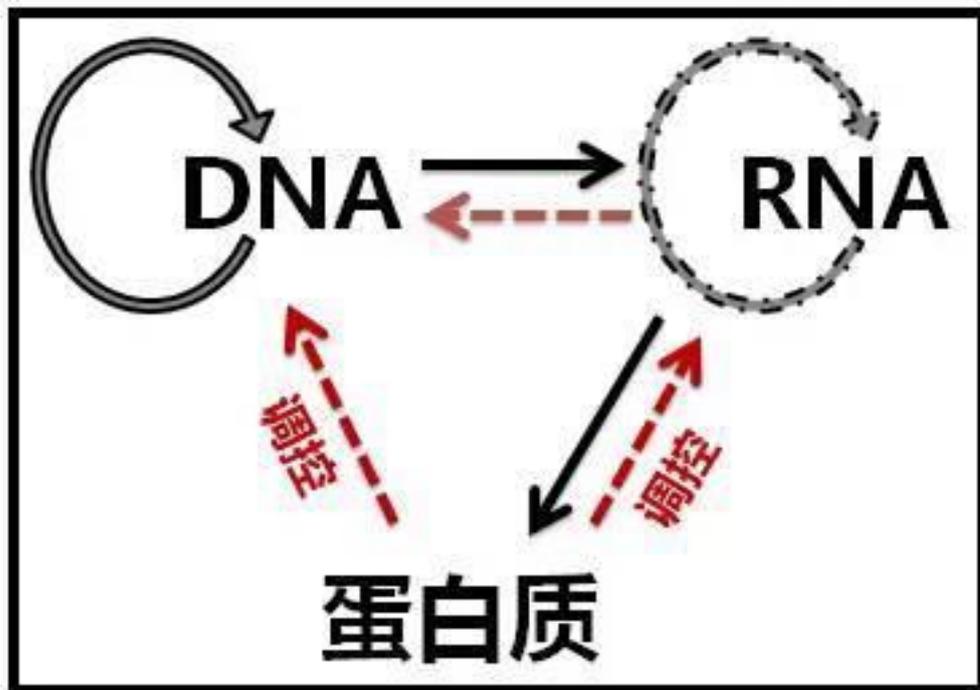
所以它变成了这样：

DNA $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ RNA $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ 蛋白质

加上一些自我复制的功能，中心法则进一步的优化：

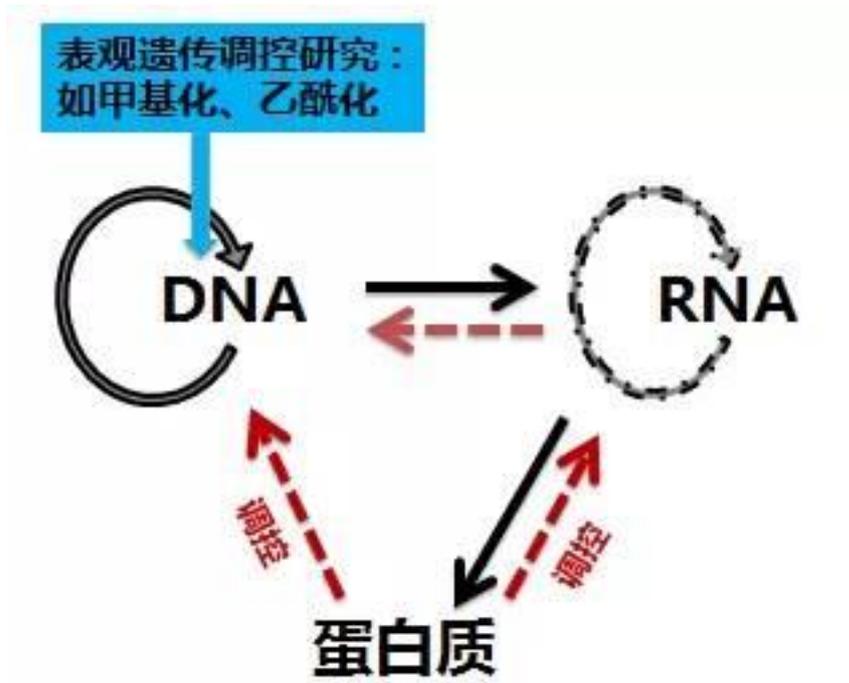


可是蛋白质并不是那么好欺负的!

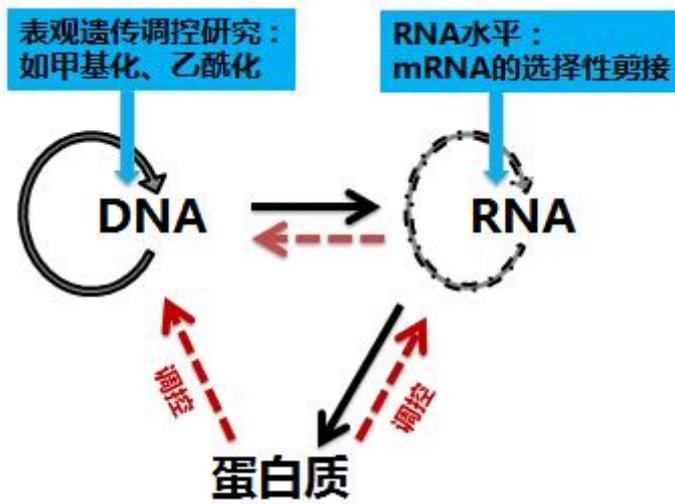


.....这一切只是开始.....

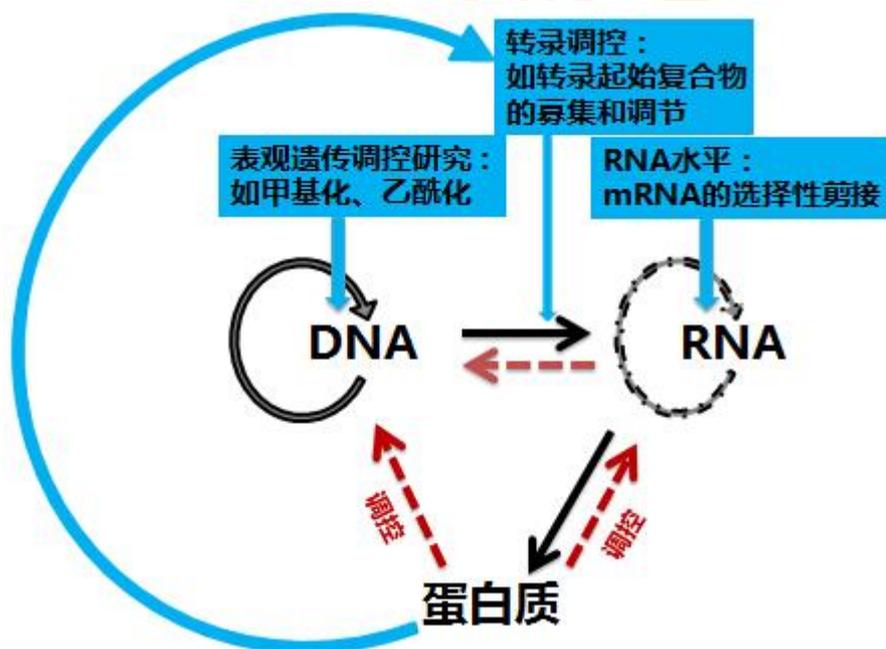
小伙伴们不是要做基础研究么？DNA 水平有表观遗传调控：



RNA 水平有 mRNA 的选择性剪接等



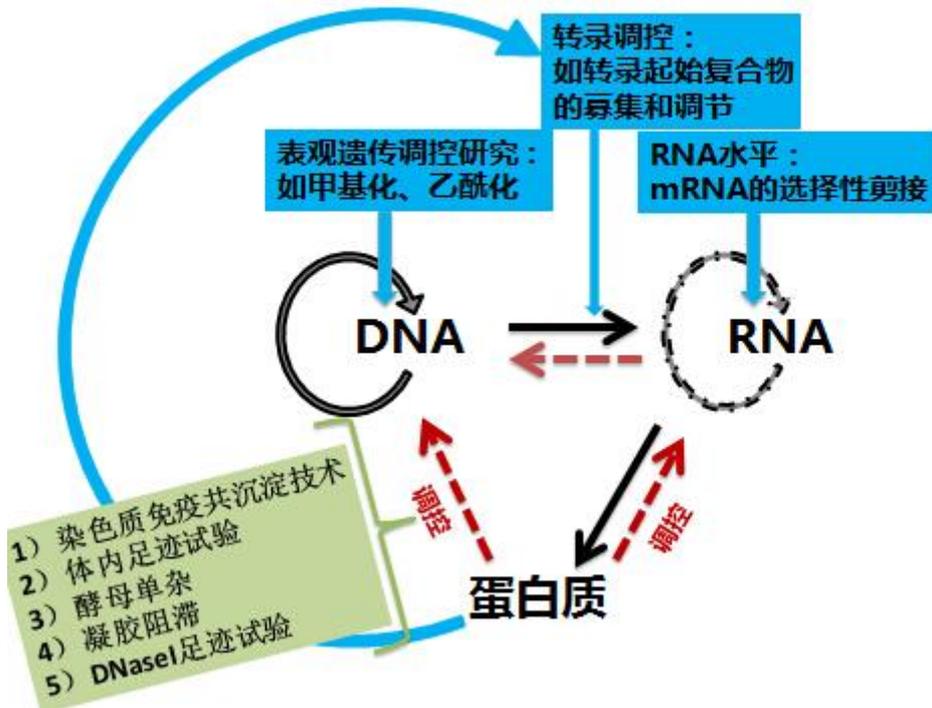
转录水平还有各种转录因子的调控，最近 lncRNA 有时还来插两脚：



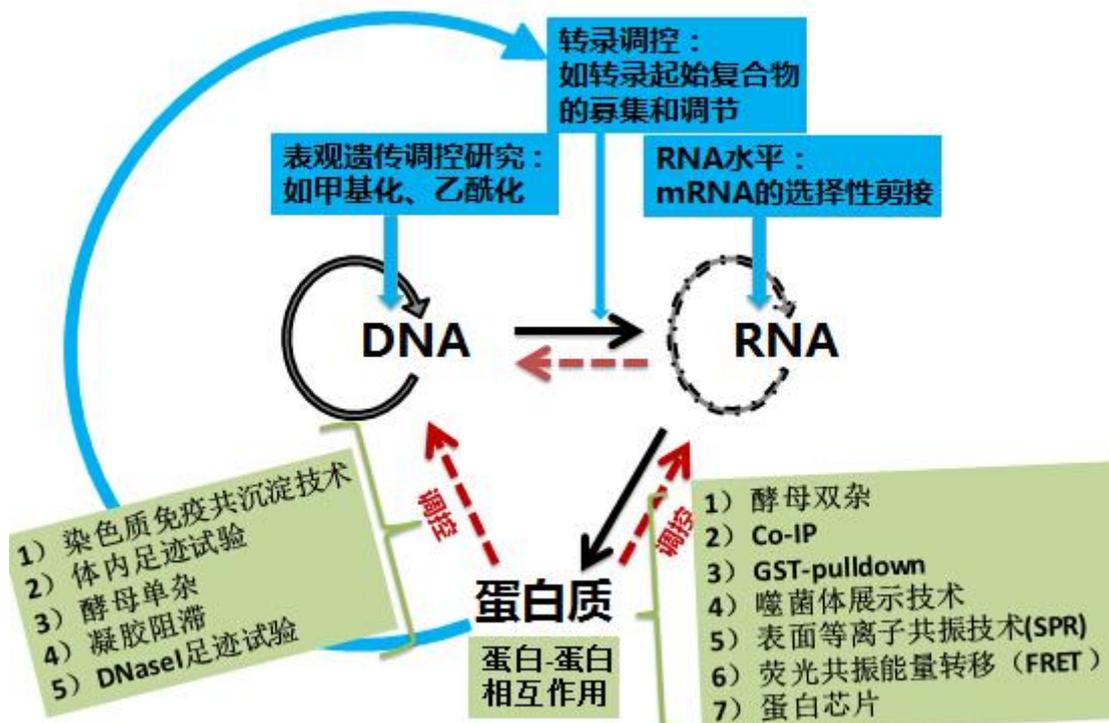
转录后水平的调控也有很多，如 microRNA~

……这一切还没有结束……

我咋研究呢？DNA-蛋白相互作用：



蛋白和蛋白相互作用：



调控方式太多，可用方法太多！为什么你不能安静的做个美美的中心法则呢？！

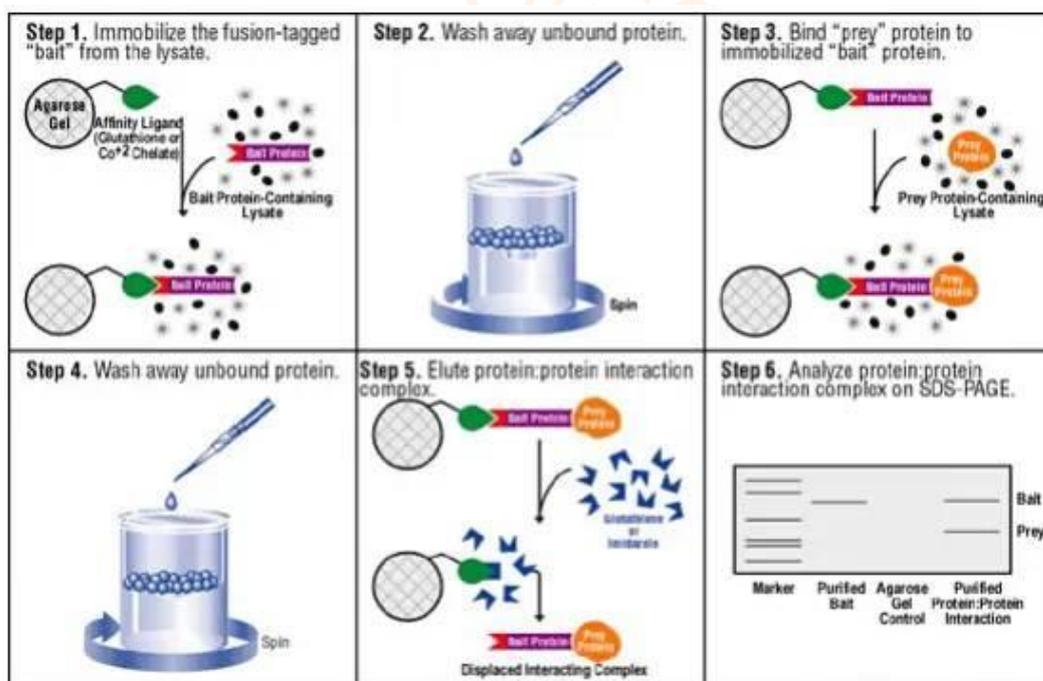


GST pulldown 实验——从一窍不通到略知

一二

作者：老谈

GST pulldown 实验是一个行之有效的验证酵母双杂交系统的体外试验技术，其基本原理是将靶蛋白-GST 融合蛋白亲和和固化在谷胱甘肽亲和和树脂上，作为与目的蛋白亲和的支撑物，充当一种“诱饵蛋白”，目的蛋白溶液过柱，可从中捕获与之相互作用的“捕获蛋白”(目的蛋白)，洗脱结合物后通过 SDS-PAGE 电泳分析，从而证实两种蛋白间的相互作用或筛选相应的目的蛋白。此方法简单易行，操作方便。



上面的这段话比较书面，很多小伙伴表示很迷茫。

啥叫 GST pulldown? 首先我们要明白，GST pulldown 实验是研究蛋白质相互作用的一种方法。简单通俗的打个比方，GST pulldown 就像把一男一女放在孤岛上，除非蜂马牛不相及，同类男女之间该发生的一般都会发生。这种关系是直接的，西方的奔放的思维。

Co-IP 也是研究蛋白质相互作用的一种方法，他与 GST pulldown 实验又有什么区别呢？Co-IP 实验是以抗体和抗原之间的专一性作用为基础的，用于研究蛋白质功能的实验方法。其基本原理是，在细胞裂解液中加入抗 X 蛋白的抗体，孵育后再加入与抗体 FC 片段特异结合的 Protein A/G-琼脂糖微珠，若细胞中有与 Y 结合的 X 蛋白，就可以形成这样一种复合物：Y—X—抗 X 抗体—Protein A 或 G，经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，复合物又被分开。然后经免疫印迹或质谱检测目的蛋白。这种方法得到的目的蛋白是在细胞内与兴趣蛋白天然结合的，符合体内实际情况，得到的结果可信度高。

上面的这段话更加书面，很多小伙伴更加迷茫。

啥叫 Co-IP? 首先我们要明白，Co-IP 实验也是研究蛋白质相互作用的一种方法。简单通俗的打个比方，Co-IP 是研究一群男女间的自由恋爱问题。一个蛋白在本性上可以同时喜欢很多其他的蛋白，但是最终还是会有个最喜欢的，而在 Co-IP 中就能发现他的喜好。这种关系可能是直接的，也可能是间接的，是更接近于东方的。

两个蛋白可能在生物体内素昧平生，一个在头上，一个在脚上。也许两者之间或许很合拍，生来却天各一方。在 GST pulldown 的环境中，他们可能相遇，吸引在一起。但在现实生活中，这样的浪漫关系可能是不现实的。脚上的蛋白若是跑到头上与情人幽会，人就要出大问题。还有的情况是，两个蛋白即使独处在一起，也可能不会互相吸引，但是到了生物系统的大环境中，在其他蛋白，各种因素适当的辅助下，却有可能形成稳定的搭档关系。

所以即使体外生化实验都达成了，还要通过多方取证来确定两个蛋白之间确定的生理关系。若是没有生理意义，那还空谈什么关系。

在蛋白实验里，假阴性、假阳性泛滥。以为是真的东西，实际是假的；以为是真的东西，实际上却是真的。如何披沙捡金，去伪存真？就得靠缜密的阴性、阳性对照组来帮助我们辨别。

要把蛋白和已知不相干的蛋白放在一起，和已知相干的放在一起，以此来检验实验手段是否能够区分这两种情况，这样才知道他是不是对你“用情专一，矢志不渝”。要通过移除一个蛋白，来看另一个蛋白的生理表现，看他是不是“没有你不行”，还是可能有其他的新伙伴。不做对照，一厢情愿的希望，并相信蛋白间的关系是幼稚的。生物实验中，单一的证据都是薄弱的，无论他貌似多么正确，要通过对照和多方取证才能确定真实的事实。

【组学专栏】蛋白质组学研究技术大全 (科普篇)

作者：APT

下面对蛋白质组学技术及其优缺点予以具体介绍。

1. 蛋白质组学分离技术

在整个蛋白质组学的研究中，分离技术是最基础的部分。如何实现对复杂的蛋白质样品

或者其酶解产物进行有效的分离，是对样品做后续鉴定的先决条件。

目前蛋白质组学常用的分离技术主要有两种类型：一是**凝胶技术**，主要包括双向凝胶电泳（Two-dimensional electrophoresis, 2-DE）技术以及后来出现的双向荧光差异凝胶电泳技术（Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis, 2D-DIGE）；二是**非凝胶技术**，主要是色谱(Liquid Chromatography, LC)技术，尤其是高效液相色谱（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）和多维液相色谱（Multi-Dimensional Liquid Chromatography, MDLC）。

双向凝胶电泳

传统的双向凝胶电泳（Two-dimensional electrophoresis, 2-DE）技术由 O'Farrell 和 Klose 等人于 1975 年建立。第一向为**等电聚焦（Isoelectrofocusing, IEF）**：使蛋白质根据等电点不同进行分离，第二向为**SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）**：将等电聚焦后的胶条放在 SDS-PAGE 上再根据蛋白质分子量不同进行电泳分离。由于具有高分辨率的特点，双向凝胶电泳在蛋白质组学的研究当中始终占据着重要的地位。

现在的双向凝胶电泳技术第一向利用**固相 pH 梯度（Immobilized pH Gradient, IPG）等电聚焦技术**，具有上样量大、分辨率高、重复性好等优点，并且可以提供蛋白质的**等电点(pI)**和**分子量(MW)**数值信息，有助于**蛋白质的鉴定**，而且双向凝胶电泳胶上常见的 isoform 多是**蛋白质翻译后修饰**的结果，对于这些蛋白质点的分析有助于了解对蛋白质功能影响重大的翻译后修饰。

但是双向凝胶电泳技术本身也存在一些难以克服的缺陷，主要表现在两个方面：第一，双向凝胶电泳对蛋白质的分离受到蛋白质丰度、等电点、分子量和疏水性等的限制。对于低丰度蛋白质，由于上样量的限制不能达到足够质谱鉴定需要的量；对于极大蛋白质(相对分子质量>200 kDa)、极小蛋白质(相对分子质量<8 kDa)、极碱性蛋白质和疏水性蛋白质(膜结合

蛋白质和跨膜蛋白质), 都难以进行有效分离分析。第二, 双向凝胶电泳操作费时费力, 难以实现和质谱的直接联用, 不易自动化。

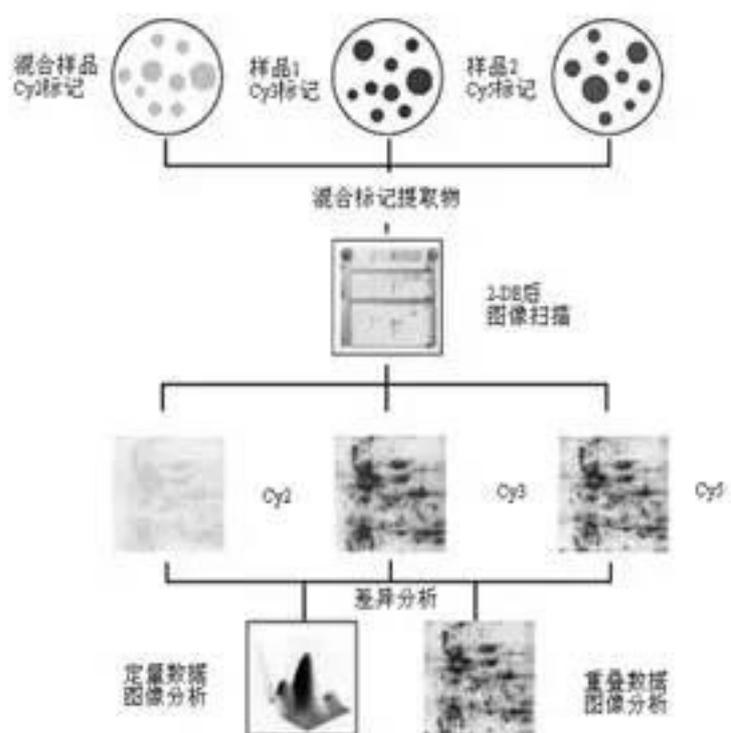


图 1. 双向荧光差异凝胶电泳

目前在传统双向电泳技术的基础上发展出的双向荧光差异凝胶电泳(Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis, 2D-DIGE) (图 1), 采用专用的荧光染料与多重样本和图象分析的方法,在同一块胶上可同时分离多个由不同荧光标记的样品, 并以荧光标记的样品混合物为内标, 对每个蛋白质点和每个差异都可以进行统计学可信度分析, 从而具有良好的重复性和较高的准确率。另外, 由于荧光染料的使用, 使得双向荧光差异凝胶电泳具有**高灵敏度**的特性, 能够满足高通量差异蛋白质组学研究分析的要求。

双向凝胶电泳作为蛋白质组学最经典的技术手段, 随着本身的不断发展, 染色技术的

突破，样品制备方案的改进，还将在蛋白质组学研究中继续发挥作用。

色谱和多位液相色谱

色谱技术是目前蛋白质组学最常用的分离技术，尤其是色谱技术可以实现与质谱的自动化联用，对于蛋白质组学研究有重大意义。除了自动化后节省大量的工作外，其意义之一就是对于实验样品蛋白质量很少时的，可以直接进行 shotgun 分析，而不再依赖于双向凝胶电泳。

对于蛋白质组学有重大意义的色谱分离技术是多维液相色谱技术，这种分离方法与串联质谱联用的 2D-LC-MS/MS 可以检测动态范围 10000:1 内的低丰度肽段，是目前蛋白质组学研究最主要的技术路线，已发展成自动化系统，可快速、高通量鉴定复杂蛋白质混合物。在蛋白质组学的多维液相色谱技术中，最常用的是离子交换色谱-反相液相色谱的联用。离子交换色谱是通过溶质在离子交换色谱固定相上具有不同的保留能力而实现样品分离的色谱技术，而反相液相色谱是基于溶质疏水性的差异而实现分离的色谱技术。通过这两种色谱模式的联用，可以实现对复杂生物样品的二维分离。

1999 年，Yates 研究组提出并建立了多维蛋白质鉴定技术(Multidimensional protein identification technology, MudPIT) (图 2)，这种技术是将不同分离模式的色谱柱以串联方式合并于同一根色谱柱中进行。Yates 等在同一根色谱柱的前半部分装填强阳离子色谱填料，后部分装填反相液相色谱填料。该方法可对样品量较少的蛋白质进行快速分析，适用并且已经成功应用于蛋白质组学中大规模蛋白质的分离鉴定。在对蛋白质组进行定性分析的同时，MudPIT 技术也被 Washburn 等成功应用于定量蛋白质组学研究。然而在强阳离子交换柱上一般使用盐梯度进行肽段复合物的分级，由于过多的盐类与质谱是不兼容的，因而常常需要 offline 的除盐过程或需要在上样后经过多个柱体积的洗涤以保证质谱分析。2005 年，我们实验室发明了一种新型的 2D-LC 技术，液相分离仍然使用强阳离子交换柱和反相柱，但在强阳离子交换柱上采用 9 个不同的 pH 梯度(pH 3、 pH 3.5、 pH 4、 pH 4.5、 pH 5、 pH 5.5、 pH6、 pH 7、 pH8)代替盐梯度分级肽段混合物，再进行反相的分离。这一方法避免了在 HPLC

系统中引入过多盐类，从而实现了多维液相色谱与串联质谱的直接连接。应用这一强大的新型 2D-LC 肽段分离手段结合串联质谱技术，在一次实验中就有 2000 种以上的小鼠肝组织蛋白质得到鉴定。

2. 蛋白质组学鉴定技术

在蛋白质组学研究流程中，蛋白质鉴定技术是最关键的部分。在蛋白质组分离技术方面还有凝胶电泳技术和色谱技术的选择，而蛋白质鉴定技术方面却只是生物质谱技术（Bio-Mass Spectrometry）一枝独秀。质谱技术在二十世纪初就已出现，但一直仅应用于有机小分子领域，直到八十年代才渐渐应用到生物大分子领域。经过二十多年来的应用和发展，质谱技术已是蛋白质组研究中必不可少的工具，并成为蛋白质组研究中的主要支撑技术。

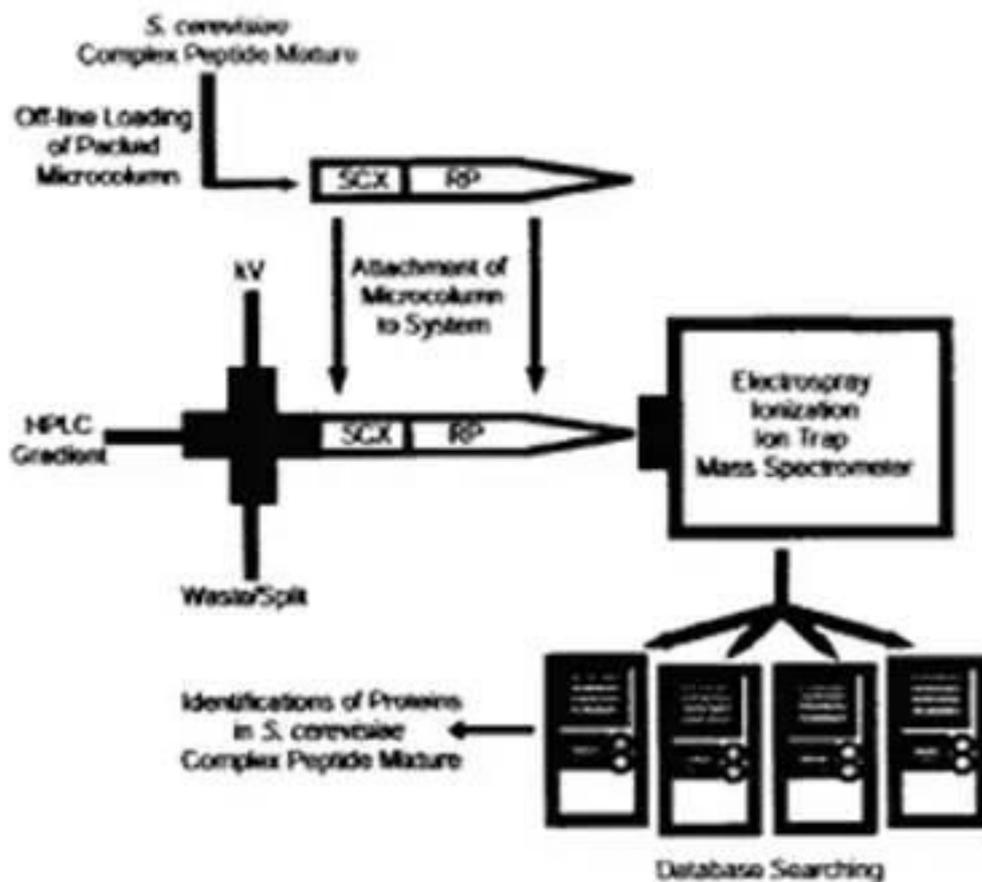


图 2. 多维蛋白质鉴定技术

质谱技术的基本原理是使样品分子离子化后，根据不同离子间的质荷比 (m/z) 的差异来分离并确定相对分子质量。一台质谱仪一般有进样装置、离子化源、质量分析器、离子检测器和数据分析系统组成。在这几部分中，离子化源和质量分析器是两个核心部件，也是发展得最快的两个方面。根据离子化源的不同，质谱主要可以分为电喷雾电离质谱 (Electrospray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS) 和基质辅助激光解析电离质谱 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry, MALDI-MS) 两大类。

电喷雾电离质谱

所谓电喷雾电离质谱就是以电喷雾离子化 (ElectroSpray Ionization, ESI) 为电离方式的质谱。电喷雾离子化是一种“软电离”方式，它是在“离子蒸发”原理上发展起来的一种离子化方法。离子蒸发是指离子从液相发射到气相的过程。待测分子溶解在溶剂中，以液相方式通过毛细管到达喷口。在喷口高电压作用下形成带电荷的微滴，随着微滴中的挥发性溶剂蒸发，微滴表面的电场随半径减少而增加，到达某一临界点时，样品将以离子方式从液滴表面蒸发，进入气相。这一过程即实现了样品的离子化，没有直接的外界能量作用于分子，因此对分子结构破坏较少，是一种典型的“软电离”方式。

电喷雾质谱的另一大特点是可形成多电荷离子，因此在较小的 m/z 范围内可以检测到 大分子质量的分子。采用电喷雾质谱目前可测定分子质量 100 kDa 以下的蛋白质，最高可达 150 kDa。由于离子蒸发使电喷雾质谱采用液相方式进样，因此可与蛋白质化学中常用的液相色谱联用，即液相色谱-电喷雾质谱(LC-ESI MS)，蛋白质或多肽经过高效液相色谱分离后，直接进入质谱进行分子质量测定。

在常规电喷雾质谱中，喷雾的过程易形成较大液滴，液滴中的样品分子在离子源就不能完全离子化，从而降低了样品的利用率和灵敏度。近年发展的纳升电喷雾技术 (nanospray-ESI, nano-ESI)有效的解决了这一问题，使样品被充分利用，并有效离子化。

基质辅助激光解析电离质谱

基质辅助激光解析电离质谱 (MALDI-MS) 是利用固体基质分子均匀的包埋样品分子，在激光的照射下，基质分子吸收激光能量而蒸发，携带样品分子进入气相，进一步将能量传递给样品分子，从而实现样品分子离子化。由于样品的电离过程是由基质介导的，因此基质的选择对分子离子化有很大的影响，继而影响到分析的灵敏度、分辨率和精确度。合适的基质应该是保证待测物的离子化，而且基质本身的离子造成的背景较弱。蛋白质和多肽样品较为通用的基质有芥子酸(Sinapinic Acid, SA)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic

acid, CHCA) 和 2, 5-二羟基苯甲酸(2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB)。MALDI 最大的特点是离子电荷通常为 1-2 个，而不象 ESI 中为多电荷离子，对分子质量较大的样品而言，不会形成复杂的多电荷图谱，因而对图谱的解析比较清楚。

串联质谱

串联质谱在解析蛋白质或者肽段序列信息以及蛋白质磷酸化位点等方面具有无法替代的作用，这里专门予以介绍。

串联质谱 (tandem MS, MS/MS) 是指多个质量分析器相连，分离母离子，进行碰撞解离，并检测子离子。MS/MS 较早在四极杆质谱中实现：将三个四极杆串联，第一个四极杆进行母离子分析，选择感兴趣的离子进入第二个四极杆，与惰性气体碰撞成碎片后，进入第三个四极杆进行子离子分析 (图 3)。

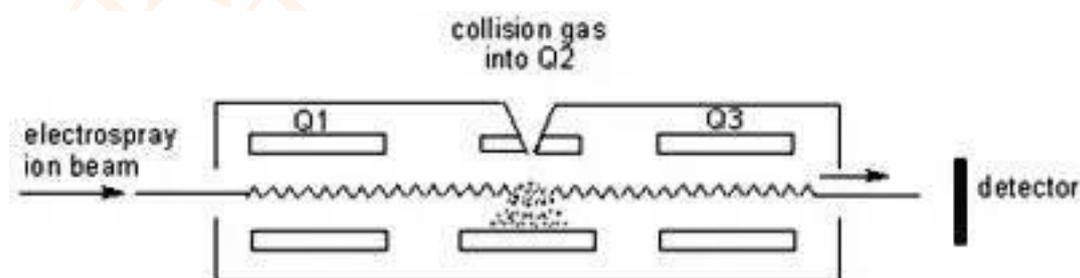


图 3. 串联质谱(MS/MS)示意图

与串联质谱平行的一个概念是碰撞诱导解离（Collision Induced Dissociation, CID）。在串联质谱诞生以前，为获得分子结构信息，需要在离子源内（in-source）对离子进行碰撞，使其碎裂。源内 CID 灵敏度高，但没有选择性，因此碎片的专一性不强。串联质谱出现后，逐渐取代了源内 CID。严格地说，CID 仅指离子解离成碎片的过程，串联质谱则包括了母离子选择、CID 和子离子分析三个过程。

质谱技术新进展

最新发展应当是 2005 年由热电公司推出的静电场轨道阱（Orbitrap）质谱，是 20 年来离子阱质谱技术的重大突破。Orbitrap 是一种离子阱，但是它不同于传统的离子阱，它既没有射频电场也没有磁体产生的磁场来捕获离子。进入 Orbitrap 的离子是由里面的静电场来捕获的。该质谱仪的质量分辨率可以和离子回旋共振质谱相媲美，为小分子研究、药物开发、蛋白质组学、代谢物鉴定等提供了更出众的性能，而且体积较小，价格相对便宜。

3. 蛋白质组学定量技术

蛋白质组学的研究目的是以大规模的尺度研究细胞内蛋白质的功能。这种研究要走向成熟必然要脱离对蛋白质的简单鉴定，实现对蛋白质的表达水平及其变化的检测。因此，定量技术应该说是整个蛋白质组学的精华部分。而这种定量通常不必是检测蛋白质在细胞内的绝对含量，而只需对其相对含量进行定量即可。

目前，蛋白质组研究中应用的比较成熟和可信的定量策略和方法主要有两种：一种是基于传统双向凝胶电泳及染色基础上的定量，另外一种是基于质谱检测技术的定量。

基于双向凝胶电泳及其染色的蛋白质组学定量技术

建立在传统的双向凝胶电泳和染色基础上的定量方法，通过比较不同胶上蛋白质点的染色强度来进行相对定量。现有的染色方法包括银染、考马斯亮蓝染色，还有最新的荧光燃料。染色在显示蛋白质的存在的同时，还提供了其表达水平的信息。

这类定量方法面临三个方面的问题：

第一、用这类方法准确定量和实现高通量的关键是找到灵敏度高、检测动态线性范围大的染料。传统的考马斯蓝染色和银染已经不能满足准确定量的需求，现在发展了不少新的荧光染料染色技术。例如 SYPRO Ruby 等发光金属螯合荧光染料和双向荧光差异凝胶电泳技术采用的 Cy2、Cy3 和 Cy5 荧光燃料都具有灵敏度高，检测动态范围大的优势；

第二、由于双向凝胶电泳本身的限制，这类定量方法不能有效检测出具有极端等电点的、分子质量太大和太小的蛋白质以及低丰度的蛋白质和膜蛋白；

第三、双向凝胶电泳不能对蛋白质实现绝对分离，许多单一的蛋白质点包含了一个以上的蛋白质，对这样的蛋白质点的定量也就比较牵强。

但是基于凝胶的定量特别是 DIGE 技术，采用了完善的统计学分析手段，使定量结果准确性有很大保证。

基于质谱的蛋白质组学定量技术

基于质谱的蛋白质组学定量技术的基础在于肽段丰度可以用质谱峰的信号强度来表现，

它可以分为两大类：第一类为标记定量技术（Labeling quantitation），第二类则为非标记定量技术（Label-free quantitation），而前者则可更细分为体内标记（in vivo labeling）定量技术和体外标记（in vitro labeling）定量技术。

4. 蛋白质组学生物信息学

蛋白质组学本身是一门大科学，其产生的数据量是十分庞大。

如何将大量的蛋白质组学数据进行储存和加工，使之转变成可以理解的具有生物学意义的结果比如蛋白质名称，多肽序列，蛋白质结构，蛋白质差异等；

如何使蛋白质组学的研究流程尽可能的符合高通量、自动化的要求；

如何深入的挖掘蛋白质组学数据内隐藏的生物学规律，比如蛋白质的亚细胞定位、蛋白质的翻译后修饰序列和位点信息、跨膜序列分析和信号肽序列分析等已经成为蛋白质组学面临的重要问题。



而这些问题的解决必须要依赖于生物信息学分析手段。生物信息学（Bioinformatics）是在生命科学、计算机科学和数学分析的基础上逐步发展而形成的一门新兴交叉学科，是运用

数学与计算机科学手段进行生物数据等信息的收集、加工、存储、分析与解析的科学。随着蛋白质组学的不断发展，也对生物信息学提出了更多的挑战，两者不断的相互作用形成了蛋白质组生物信息学这一活跃的研究分支。

另外蛋白质组学与其他学科的交叉也日益显著和重要，这种交叉是新技术新方法的活水之源，尤其是蛋白质组学与其他大规模生物科学如基因组学、转录组学、代谢组学等领域的交叉所呈现出的系统生物学(Systems Biology)研究模式将成为未来生命科学最令人激动的新前沿，这一领域的研究就更需要蛋白质组生物信息学的辅助。

【组学专栏】如何应用蛋白质组学技术进行肿瘤研究思路设计

作者：APT

基于质谱的**蛋白质组学 (proteomics)** 是近年来研究蛋白质的表达模式与功能模式的一门新兴学科，它能够在大规模的水平上进行蛋白质的**表达变化、翻译后修饰**以及**蛋白质与蛋白质的相互作用**等研究。相比于其他的蛋白质研究技术与方法，基于质谱技术的蛋白质组学具有的特点及优势包括：

① 对于通常研究的模式动物，基于质谱技术的蛋白质组学的一次实验往往能够输出**上千级别**的数据量，并且能同时提供**定性、定量和翻译后修饰**等信息，从而能够从更加全面、整体和网络的角度阐明蛋白质的功能与作用机制；

② 质谱技术的分析方法是基于**蛋白质的化学组成**对蛋白进行解析，因此能够更好的区分蛋白质的亚型及修饰变化；

③ 由于此类技术**不受抗体的限制**，在蛋白质新功能的发现与研究方面具有独特优势，进而更好地服务于高水平的创新研究。通过**结合其他的分子、细胞**以及**药理学技术**，蛋白质

组能够为**阐释复杂生物过程**提供有效基础与思路，被称为强大的“hypothesis-generating engine”。

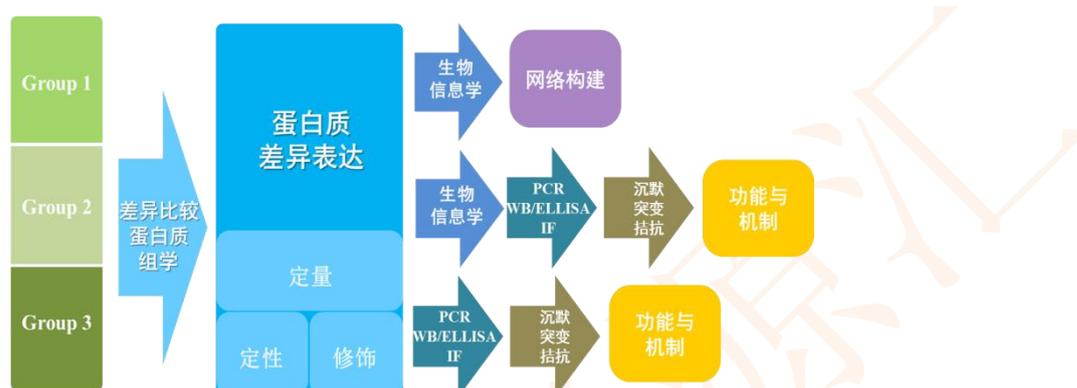


概括地说，在**肿瘤学研究**中，基于质谱技术的蛋白质组学主要应用于以下**三个方向的研究和探索**：

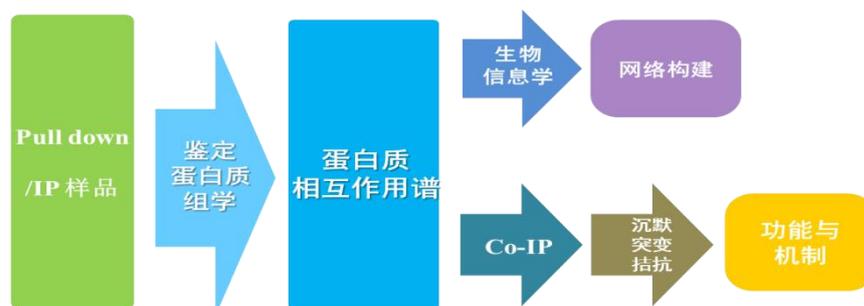
- ① 比较不同正常样品与肿瘤样品或不同处理条件下样品中大量蛋白质的表达量差异变化；
- ② 大规模分析蛋白质的翻译后修饰位点以及不同条件下的蛋白质修饰水平变化；
- ③ 解析蛋白质复合物组成或者蛋白质相互作用关系与网络。鉴于基于质谱技术的蛋白质组学强大的蛋白质定性、定量能力，随着相关技术的发展与成熟，蛋白质组学的研究方法与模式已成为肿瘤学科研中的主流蛋白质研究方案。

目前，基于质谱技术的蛋白质组学研究的主要思路和模式有两种——**差异比较蛋白质组学**和**鉴定蛋白质组学**。

I **差异比较蛋白质组**：通过蛋白质组学的技术与方法，同时解析出不同组样品间大量的差异表达蛋白质，在此基础上进一步选取候选蛋白质，进行后续的表达验证及功能研究，进而阐明在**特定生理或病理过程**中相关蛋白质的作用。



II **鉴定蛋白质组学**：通常以**目标蛋白质**为研究的出发点，寻找与其相关的其他蛋白质，进而阐明蛋白功能复合物、信号转导通路的组成与功能，以及蛋白质与蛋白质之间的相互作用。



基于质谱技术的蛋白质组学研究是近年来肿瘤生物学的最前沿领域和热点。肿瘤的发生、发展是多因素、多通路共同参与的复杂过程，蛋白质组学技术可以更为全面地阐明肿瘤发生发展过程中相关蛋白功能、变化以及信号通路的组成。目前，蛋白质组学研究思路和相关技术已被广泛应用在**肿瘤的发生、转移、肿瘤干细胞、肿瘤微环境、肿瘤免疫**等诸多研究领域，为揭开肿瘤病理机制、发现抗肿瘤治疗靶点，提供了强大的工具。

SCI 中蛋白质组学技术研究肿瘤

应用举例

在肿瘤相关蛋白定量研究中的应用

利用**非标记 (2D, Label free)** 及**标记 (DIGE、SILAC、iTRAQ)** 定量的蛋白组技术与方法，可以实现对不同样品中的大量蛋白进行大规模的相对定量研究，进而为相关具体机制的深入阐明提供基础和思路。

癌症发生机制研究方面，Kikuchi 等人利用非标记的 **Label free** 方法分析了临床非小细胞肺癌组织与正常肺组织的蛋白质组差异，共鉴定到了 **3621** 个蛋白质，并发现其中 **758** 个蛋白质在两组样本中存在显著地表达差异。利用生物信息对差异数据进行进一步的分析 and 筛选，作者选取了其中一些差异表达蛋白进行了进一步地表达验证和功能研究，并证实 **p21-activated kinase 2** 的差异表达在**非小细胞肺癌的增殖与转移过程中具有重要作用**，可能成为非小细胞肺癌治疗的新靶点。相关成果发表在 2012 年《**Molecular & Cellular Proteomics**》上。基于该蛋白质组学实验发掘的大量蛋白质差异表达数据，该研究团队在后续的研究中选取了

其中另外一个差异表达蛋白——**SLC1A5** (solute-linked carrier family A1 member 5)进行了进一步地功能研究，并于 2013 年在《**Clinic cancer research**》上发表了关于 **SLC1A5 通过介导谷氨酸转运影响非小细胞肺癌生长和存活的论文**。

肿瘤转移研究方面，为了阐明 **epidermal growth factor receptor (EGFRvIII)突变**导致多形性胶质母细胞瘤表现出高浸润表型的分子机制，Mukherjee 等人发表于 2009 年《**Cancer Research**》的研究，利用 iTRAQ 的方法分别标记了**野生型 (wtEGFR)**和**突变型(EGFRvIII)**肿瘤组织样本，并检测了两类样本中蛋白质组的表达变化，发现了 **18 个蛋白质在两类样本中存在 >1.5 倍的表达差异**。在此基础上，作者从差异表达蛋白质中选取了细胞侵袭相关蛋白 CRMP1 进行了进一步的表达和功能验证，并最终证实 CRMP1 缺失对 EGFRvIII 突变多形性胶质母细胞瘤的高浸润表型具有重要贡献。Schliekelman 等 2011 年发表在《**Cancer research**》的研究利用 SILAC 的方法对 **miR-200 缺失**诱导上皮细胞间质转化 (EMT) 的高转移肺腺癌细胞与非高转移腺癌细胞进行了标记，并检测两组细胞的全细胞裂解液、细胞表面蛋白质及条件培养基中的蛋白质表达差异：发现了大量新的与肺腺癌转移相关的蛋白质，尤其是肿瘤转移中发生的大范围的微环境的改变，并构建了 TGF- β 作用分子信号网络。通过比较 microRNA-200 缺失后肿瘤细胞蛋白质组的差异表达，作者证实了 **microRNA-200 限制 EMT 发生和转移的作用是通过直接调节细胞外基质蛋白和肽酶实现的**。

肿瘤干细胞研究方面，为了发现新的**肿瘤干细胞生物标志物**，Ching-Huai Ko 等利用 iTRAQ 的方法，通过比较肝癌细胞与肝癌干细胞的蛋白质组差异，发现了一些新的可用于鉴定肝癌干细胞的生物标志物，并对相关差异表达蛋白质的功能进行了验证。在肿瘤干细胞功能研究方面，利用 DIGE-MS 的方法，Thirant 等发表于 2012 年《**Stem cell**》的研究比较了神经胶质瘤干细胞样细胞与神经干细胞的蛋白质组表达差异，发现肝癌衍生生长因子 (HDGF) 在神经胶质瘤干细胞中显著地高表达，进而进一步证实 HDGF 是一个新的神经胶质瘤干细胞相关的血管新生因子。

肿瘤微环境研究方面，Zeng 等利用 SLIAC 的方法研究了肿瘤细胞与正常上皮细胞共培养条件下细胞分泌蛋白组的变化，鉴定到了**共培养体系细胞上清中 45 个表达增加超过 2 倍的蛋白质**，这些蛋白均与**肿瘤相关的生物过程**有关。此研究为后期研究肿瘤细胞与微环境细胞间的相互作用提供了基础。

除了相对定量，利用基于**选择性/多反应监视（SRM/MRM）**质谱技术的**蛋白质组学**，可以实现对复杂样品中的目的蛋白进行绝对定量。2011年发表在《PNAS》的研究利用SRM的蛋白质组学方法检测了不同肿瘤细胞系中Ras突变蛋白的表达。SRM实验发现平均每个SW480结直肠癌细胞中有大约 1.3×10^6 个野生型Ras蛋白，突变Ras与野生型Ras的比例为5.6。

同样的方法也被用于进行正常结直肠组织、结直肠癌肿瘤组织和胰腺囊肿液等临床样本中Ras突变蛋白的绝对定量。

在肿瘤相关蛋白定性研究中的应用

利用**shotgun的蛋白质组技术**，可以实现对复杂样品中大量蛋白质的定性分析，进而为阐明肿瘤相关蛋白质的相互作用、信号通路组成及蛋白质亚细胞定位提供依据。

Dawson等人发表于2011年《Nature》上的研究，利用蛋白质组学的方法鉴定了肿瘤发生过程中参与染色质修饰失调的bromodomain and extra terminal (BET) 家族复合物的组成。

作者首先**分离出细胞核成分**，再分别以**BET抑制剂、Histone tails及BET抗体为基质**，通过**免疫沉淀或pull down的方法**分离出BET各蛋白亚型及其他蛋白复合物。利用shotgun的方法对分离的蛋白质进行鉴定，作者发现混合系白血病融合蛋白的分子伴侣SEC和PAFc是BET复合物的主要成员，并利用鉴定到的蛋白质构建了BET复合物蛋白相互作用网络。在此

基础上,作者进一步证实 BET 复合物的功能与混合系白血病有直接关系, BET 是混合系白血病的有效治疗靶点。

肿瘤相关蛋白翻译后修饰研究中的应用

肿瘤发生与发展过程中,除了表达差异,很多蛋白质的功能受到翻译后修饰的调控。利用蛋白质组学的方法,可对肿瘤相关蛋白质的修饰进行的定量及定性分析,为激酶信号通路、组蛋白修饰等研究提供基础。

Kim 等在 2013 年发表于《PNAS》上的研究,利用磷酸化蛋白质组学的方法研究了 TANK-binding kinase 1 (TBK1)促进肺癌细胞存活过程中的磷酸化信号转导通路。作者共鉴定到了 A549 细胞裂解液中的 2080 个磷酸化蛋白质中的 4,621 个磷酸化肽段,其中 385 个蛋白质(477 个肽段)的磷酸化水平在 TBK1 敲除后发生了至少 1.5 倍变化,由此作者构建了 TBK1 的磷酸信号转导网络。作者进一步发现 Polo-like kinase 1 (PLK1)在该网络中处于核心位置,进一步的实验证实 TBK1 可在体外直接诱导 PLK1 发生磷酸化。另一方面,蛋白质组学数据表明 TBK1 敲除后, metadherin 在 Ser-568 位点上的磷酸化显著减少,进一步的功能研究证实 metadherin 与 TBK1 敏感的肺癌细胞的存活和增殖及肿瘤预后密切相关。

展望

综上所述, 基于质谱技术的蛋白质组学方法具有的强大**蛋白质定性、定量**和**蛋白翻译后修饰分析能力**, 其研究模式与方法已成为蛋白质层面上研究肿瘤学研究的主流方案, 并已取得了大量的研究成果。

利用**差异比较蛋白质组学**的方法对不同组别样品中大量差异表达蛋白进行解析, 进而从中选取候选蛋白进行进一步的表达验证和功能研究, 可为深入阐明相关蛋白在特定生理或病理过程中的作用提供研究基础与思路;

借助于**大量发掘的蛋白质差异表达数据**, 还可对信号通路的组成进行系统地描绘与功能研究;

利用**鉴定蛋白质组学对 pull down 或免疫沉淀等方法分离纯化的蛋白复合物**进行解析, 则可为蛋白与蛋白的相互作用、抗原-抗体识别、酶-底物反应等研究提供强大的工具。

鉴于其独特的技术优势与研究特点, 基于质谱技术的蛋白质组学在基础医学科研领域必将具有更为广阔的应用前景。

【组学专栏】蛋白质组学定性技术详解,

只能帮你到这里！

作者：APT

蛋白质定性分析是什么？其实就是指利用**质谱法**进行**蛋白质鉴定和序列分析**。质谱技术具有较好的**灵敏度、分辨率、准确度**，随着质谱技术的不断发展和成熟，利用质谱法进行蛋白质定性分析**愈来愈广泛**！



完整的全长蛋白如何定性？电泳条带中的蛋白又如何呢？相应的，蛋白质定性分析可以被分为两种策略：

(1) top-down 分析策略：完整的全长蛋白质经过**离子化**后进入**质量分析器**，通过测定**蛋白质离子质量**和**串联质谱分析**鉴定蛋白质序列。

(2) bottom-up 分析策略：存在于**溶液或者凝胶电泳条带中的蛋白质**经过**蛋白酶（如胰蛋白酶）酶解消化**成较小肽段片段，这些肽段再进入质量分析器。最后通过**肽指纹图谱**或者**串联质谱法**进行肽段鉴定，该方法是通过**对肽段序列的鉴定推断蛋白质序列**。

目前，**bottom-up** 分析策略被更广泛的应用于蛋白质定性分析工作。

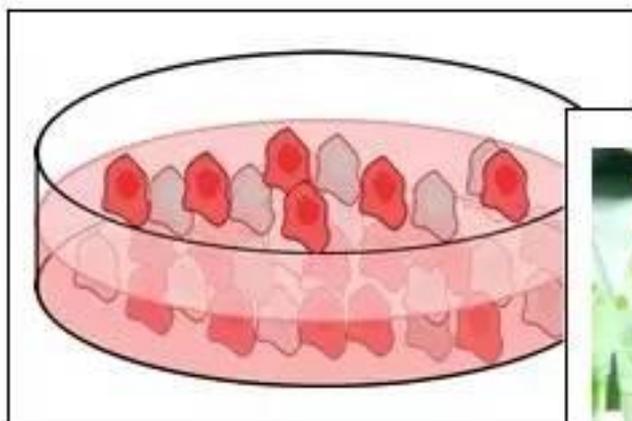
蛋白质组学 定性技术	按仪器类型分	按样本类型分
	LC-ESI-MS/MS 鉴定	蛋白质全谱分析 (即 shotgun 分析)
		蛋白质胶条/混合液分析
	MALDI-TOF/TOF 鉴定	蛋白质胶点分析

蛋白质全谱分析

蛋白质**全谱分析**指的是组分分析，研究对象是**完整的组织、体液或其提取物**，其目的在于鉴定出尽可能多的**肽和蛋白质分子**。

技术原理

将溶液内蛋白质分子或 SDS-PAGE 条带的复杂混合物酶解成肽段混合物，通过**液相色谱分离**，如 2D-LC (阳离子柱 SCX 和 C18 反相柱串联) 或 1D-LC 的 C18 反相柱。串联质谱测试，最后用相应的数据库进行检索匹配，可同时鉴定成百上千种蛋白质。



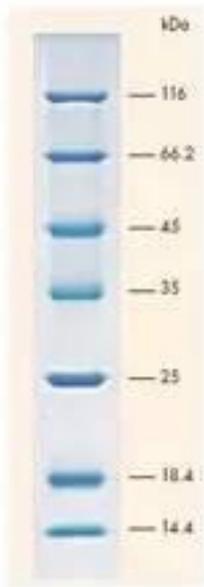
▶ 细胞样本

▶ 植物组织样本

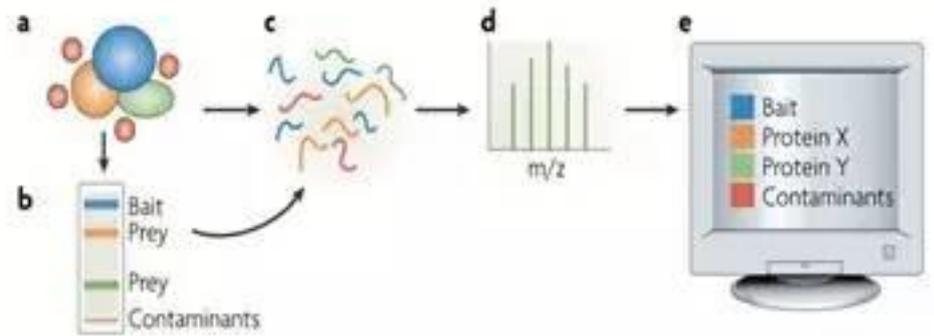


蛋白质胶条/混合液分析

利用 **LC-ESI-MS/MS 蛋白鉴定技术** 对胶条样本（即 SDS-PAGE 样本）、IP、co-IP、Pull-down 等纯化溶液等中等复杂样本进行蛋白鉴定。



SDS-PAGE 样本

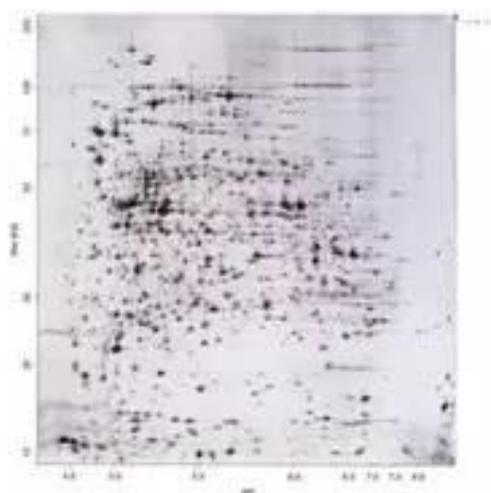


Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Co-IP 实验质谱检测

蛋白质胶点分析

利用 **MALDI-TOF/TOF 蛋白鉴定技术** 对考/银染的 2D 或 DIGE 胶点样本或者较纯的蛋白样本进行蛋白鉴定。



2D 胶点图片

技术路线



生物信息分析

技术类型	蛋白数目	建议生信分析内容
全谱分析	可以鉴定到成百上千蛋白	GO 功能注释 KEGG 通路注释
胶条/混合液分析	十几到几十个蛋白	不建议
胶点分析	一个到几个蛋白	不建议

样本要求

技术类型	样本要求	
全谱分析	蛋白质总量>5 μ g, 浓度>0.1 μ g/ μ l; 缓冲液不含去污剂 NP40、Triton X-100 等	
胶条/混合液分析	SDS-PAGE 条带	考染、银染 (质谱兼容) 条带清晰可见
	蛋白质溶液	蛋白质总量>5 μ g, 浓度>0.1 μ g/ μ l; 缓冲液不含去污剂 NP40、Triton X-100 等
胶点分析	双向凝胶电泳点	考染、银染 (质谱兼容) 点清晰可见
	SDS-PAGE 条带	单一蛋白质, 纯度>90% 考染、银染 (质谱兼容) 条带清晰可见
	蛋白质溶液	单一蛋白质, 纯度>90% 蛋白质总量>5 μ g, 浓度>0.1 μ g/ μ l

质谱仪器

技术类型	质谱型号	质谱类型
全谱分析	Q Exactive (Thermo Scientific) 高精度	LC-MS/MS
胶条/混合液分析	LTQ-Velos (Thermo Scientific) 低精度	
胶点分析	ABI 4800 (AB Sciex)	MALDI-TOF/TOF

5 免疫学技术

5.1 免疫组化

发高分 SCI，不会免疫组化（IHC）怎么行？

作者：花花是个学术张

花花相信大家对 IHC 一定不陌生，世界那么大，实验方法层出不穷，但是**免疫组化却是经典中的经典**，想看看别的高大上的技术？不急，我们先来复习复习免疫组化。

免疫组化，免疫组织化学技术（immunohistochemistry），是一项利用抗原抗体反应，通过使标记抗体的显色剂显色来确定组织细胞内抗原，对蛋白定位，定性的实验技术。

免疫组化主要用的是**组织标本和细胞标本**两大类，组织标本包括石蜡切片（病理切片和组织芯片）和冰冻切片。石蜡切片，对组织形态保存好，保存时间也长，虽然对组织抗原暴露有影响，但可以抗原修复，所以**石蜡切片仍然是首选的标本制作方法**。

好了，重点来了，下面是花花多年来总结的免疫组化步骤和经验，各位看官不要错过哦！

① 在 60°烤箱烤片 30~60min，这一步是为了使蜡片水分蒸发和石蜡融化，好让组织切片牢

固贴在玻片上。做切片是免疫组化的前提切片子最好是找专业培训过的人员切片，片子的厚薄均匀，切片的完整，无褶无刀痕。考研刀工的时候。

② 脱蜡水化，依次放入二甲苯 I、II、III 各 10min，乙醇梯度（高至低）各 2min，水。然后用自来水洗一下，但不要直接对着切片冲洗。

③ 抗原修复，小编用的是高压热修复，pH6.0 的柠檬酸盐缓冲液，一定要全部浸泡切片，等高压锅冒气后 5min 结束，自然冷却，温度骤降可能引起脱片哦。3% H_2O_2 避光浸泡 15min（当然有的朋友用 EDTA 修复或者说使用微波修复等方法也是可以的，但是每一种抗体对不同的抗原修复方法的反应是不一样的，得具体对待。）

④ 这一步有神器，用“组传”的免疫组化油笔围绕组织画圈，接下来就能看见它的功效了。PBS 洗 5min x 3 次。PBS 会被锁在画的圈中，不会流干，保证不干片。

⑤ 滴加 5%BSA（BSA 用 PBS 溶）稀释的一抗，每个组织约 20ul，用 200ul 的枪头尖端抹平，4°过夜或者 37°1~2h，小编用的是第二种方法。（每种组织大小不一样，面积大概 1 乘 1 的可以 20ul 就够了，对于类似 NPC 的组织就没必要这么大了，关于一抗的问题，个人建议 4°过夜的方法，当然 37°1~2hour 也是可以的，两种方法没法说谁好谁不好，不同的抗体对方法的敏感性是不一样的）再次 PBS 洗 5min x 3 次。

⑥ 滴加二抗，一滴每个，用 200ul 的枪头尖端抹平，室温静置 30min。（本人用的是 xx 公司（此处坚决不植入广告）货号 GK500705 的二抗检测试剂盒，很好用，极力推荐。）

⑦ 再次 PBS 洗 5min x 3 次

⑧ DAB- H₂O₂ 显色 10min。(B: C=1:50, 25ul 每个, 现配现用), 在这时要观察, 如果染色明显, 不到 10 分钟即可蒸馏水洗终止显色, 但是一般超过 20min 都不会有什么好结果。

⑨ Mayer 苏木素染色 30s, 水洗, 盐酸酒精分化 3s, 流水浸 15min

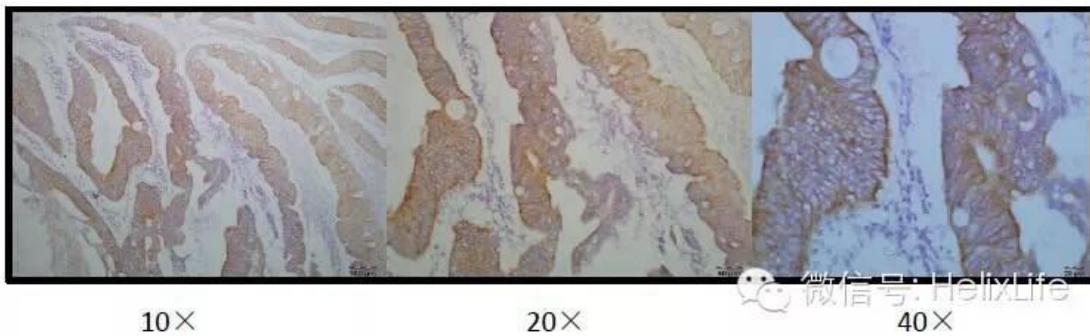
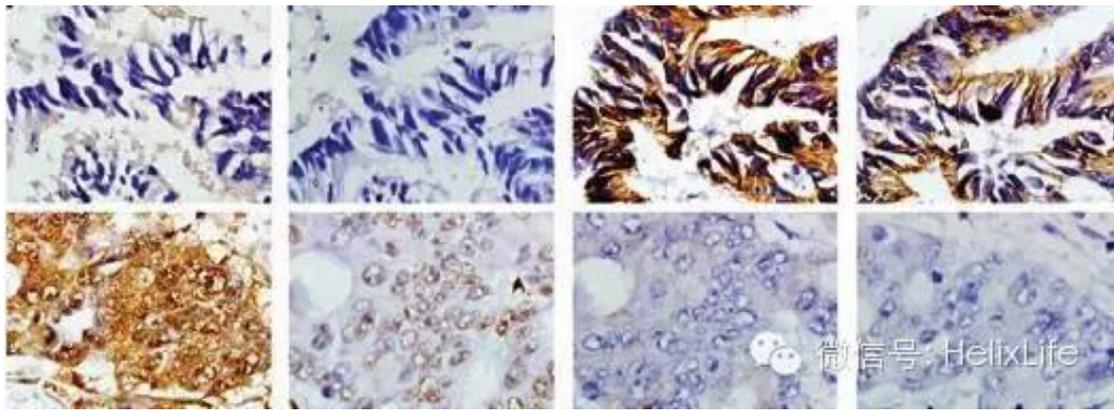
⑩ 脱水, 乙酸 2min, 乙醇梯度 (低至高) 各 2min, 二甲苯 5min

⑪ 中性树胶封片。

结果分析:

镜下细胞核呈蓝色, 阳性结果呈深浅不一的棕色

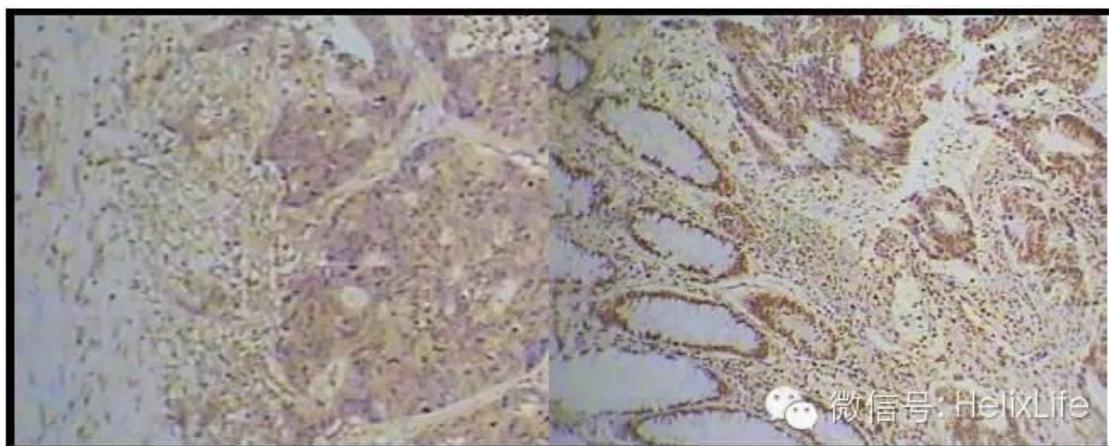
比如这样:



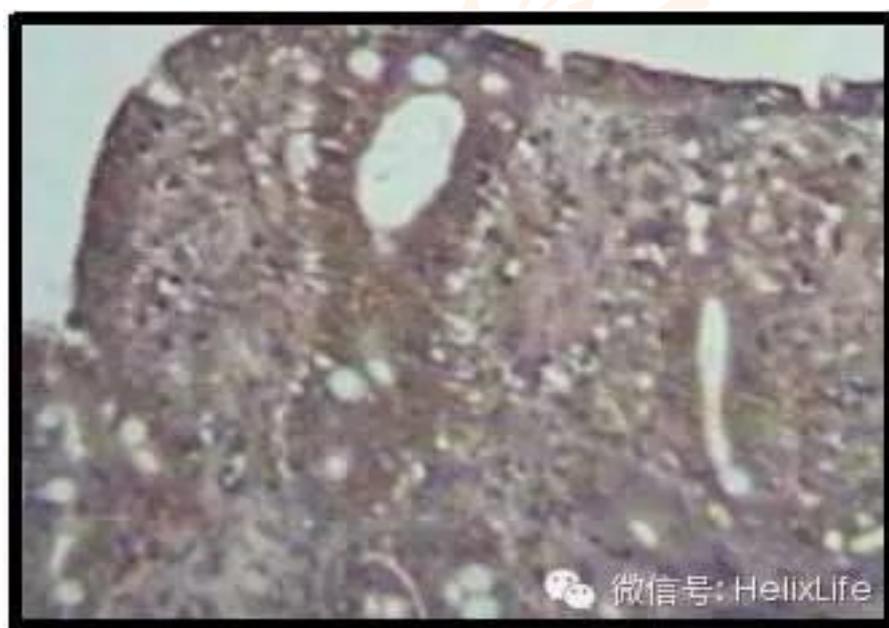
结果分析主要有两种方法，阳性着色细胞计数法和评分法。前者是在 40*光镜下，随机 10 个视野下计数阳性着色细胞；后者则是在光学显微镜下按染色程度（0 分阴性着色，1 分淡黄色，2 分浅褐色，3 分深褐色）和阳性范围（1 分 0-25%，2 分 26-50%，3 分 51-75%，4 分 76-100%）评分，最终分数相加。

再来看下反面教材

最常见的非特异性着色：



还有背景过深的:



要避免成为上述的两种典型，做出一张可以见老板的结果，每步都要且做且思考。花花再啰

嗦几句：

1 脱蜡和脱水的步骤呢，每个实验室都有自己独到的方法，用的乙醇的梯度不完全相同，大家按照自己的习惯那套来就好。但要注意，**脱蜡和水化不全引起局灶性反应，会导致非特异性着色。**

2 **一定要防止干片！**干片也很容易引起非特异性着色。

3 在用枪头抹平抗体时，要尽量将枪头放平，用斜面而不要用尖头接触组织，这一步要**轻柔小心**，可能你只是轻轻刮到几下，但镜下组织就变得乱七八糟的了（别问我是怎么知道的）

4 PBS 在洗的时候，不要对着组织冲洗，会脱片。小编的方法是将**冲洗着力点放在玻片的边缘，让液体自然流向组织。**

5 一抗浓度至关重要，这直接影响了最终的结果，摸条件时设置一抗浓度梯度。建议同时**设置一个阳性对照**，可以排除一抗之外的操作问题。

6 背景染色过深的话，就要考虑**一抗浓度过高或者一抗时间过长，显色时间过长**这些问题了。

7 降低组织非特异性染色，可以缩短一抗，二抗的时间，稀释抗体，也可以增加几次 PBS 冲洗。或者直接用单抗。

免疫组化往往作为检测某蛋白在组织的表达情况出现在预实验中，免疫组化的结果可能将直接影响课题的后续设计和进展。如果说我们的科研课题是一个大世界的话，免疫组化是我们看向这个世界的敲门砖。

做好免疫组化

我们一起去更大的世界看看



干货 | 免疫组化染出来都是全国江山一片红，咋整？

作者：毛博

全国江山一片红，这可不是阅兵日的朋友圈，而是在做免疫组化啊！好好的一张片子染得脏脏的。一下子整个人都不好了。这里，毛博根据自己做免疫组织化学近 10 年的经验和体会（被师弟师妹称为免疫组化王子，哈），总结出了导致非特异性染色的八个大坑，以及避免掉坑里的一些做法。皆是独门绝技，不要眨眼咯！

1. 抗体问题，真的是一分钱一分货啊！

一抗用多克隆抗体容易出现非特异性染色，建议用高纯度，高效价的针对更具特异性抗原决定簇的单克隆抗体来解决。单克隆抗体很贵，不过结果真的很好。尤其是背景非特异性染色不会太深。真是一分价钱一分货。一抗过期也会造成杯具，所以要注意抗体的有效期。

2. 抗体浓度过高/孵育时间过长

一抗浓度太高也是出现非特异性染色的常见原因。解决的办法就是预实验。每次使用新抗体前应该多做预实验，摸索出最理想的工作浓度，不能简单地按照说明书来用。另一个常见原因就是孵育时间过长。解决的办法就是定时器。加上抗体后，立刻调好定时器，提醒自己及时终止反应，就会避免这个问题。

3. DAB 染色时间太长/变质

DAB 的孵育时间过长，会造成背景非特异性染色。DAB 的显色时间不是一成不变的，主要靠自己在显微镜下盯着，一旦出现浅浅的棕色的时候，就要马上冲洗。出现棕色的时间过短，

表明抗体浓度过高；出现棕色的时间过长，表明抗体浓度过低。DAB 要保存于避光干燥的地方，现用现配，临用前才加入 H₂O₂。图 1 就冲洗的有些晚了；图 2 就是刚刚好，染色效果棒棒哒！

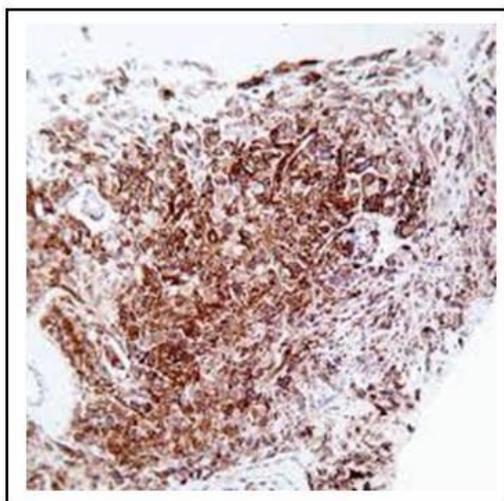


图 1

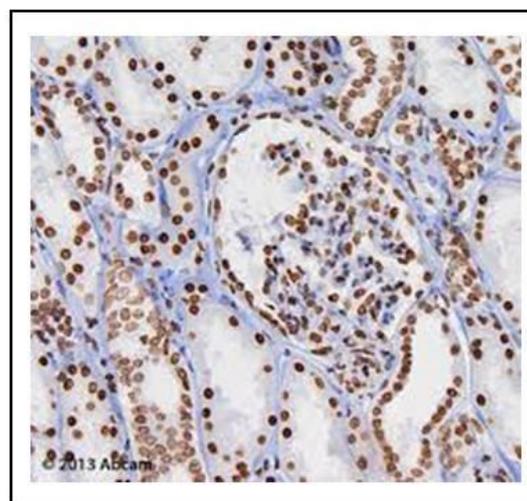


图 2

4. 内源性酶和生物素

内源性酶和生物素也会造成非特异性染色，特别是一些内源性酶生物素含量丰富的组织，如肝脏，肾脏，脾脏等。处理的办法为：灭活碱性磷酸酶：最常用的方法是将左旋咪唑（24 mg/mL）加入底物液中，并保持 PH 值在 7.6-8.2，即能除去大部分内源性碱性磷酸酶；对于酸性磷酸酶，可以用 50 mmol/L 的酒石酸抑制；对于内源性过氧化物酶，可以用 0.9% 的双氧水来灭活。对于内源性生物素，染色前将切片浸于 25 μg/mL 亲和素溶液中 15 分钟，PBS 清洗 15 分钟后即可染色。也可以 24 mg/mL 的卵白素封片 15 分钟。

5. 组织变干

一下子染太多片子的时候，容易出现这种情况。解决的办法就是不要贪多嚼不烂。一次少染几张。还有就是试剂充分覆盖组织，超出组织边缘 2 mm。然后用 PAP 笔在组织周围画一个圈圈，把修复液圈在里面。避免修复液流走。圈圈应该距离组织边缘 3-4 mm。



6. 浸泡时间过长

切片在缓冲液或修复液里面浸泡过夜，也会引起杯具。这都是偷懒的做法。但是有时候也是可以偷一下懒的。毛博的独门秘技就是 4°C 冰箱。只要把容器放在 4°C 冰箱里，过夜完全没

有问题。

7. 清洗不充分

清洗一定要充分。PBS 液一定要双蒸水新配，用之前再次测 PH 值。缓冲液用 0.05 mol/L 的 Tris-HCL，0.15 mol/L 的 NaCl 即可。如果加一点去垢剂 Tween-20 就更好了。

8. 封闭血清问题

是否选择了正确的封闭血清。原则是选择二抗动物的非免疫血清，例如二抗是羊抗兔，就要选择非免疫羊血清。用 PBS 稀释为 3-10% 的溶液孵育切片，37°C 10-30 分钟。这里不用洗，直接甩掉即可。毛博再贡献一个独门绝招，直接用奶粉也可以。用 5% 的脱脂奶粉就可以了。而且效果还不错。怎么样？简单吧。

免疫组织化学是个苦活脏活。步骤多，时间长，还要接触有毒有害的物质。要是好好的一张片子染出来都是全国江山一片红，那才叫亏大发了。以上，毛博介绍了自己的一些心得体会，希望对大家有所帮助。

干货 | 免疫组化结果分析之独门绝招

作者：毛博

很多时候，我们千辛万苦地染出了一张张漂亮的免疫组化片子。但是却不知道如何正确地分析，得出理想的结果。这实在是一件憾事。

其实，免疫组化结果分析的 protocol 教科书和实验手册上面都有。今天主要谈谈应该注意的一些事项和技巧，并且有独门绝招献上，都是干货哟。

对照染色

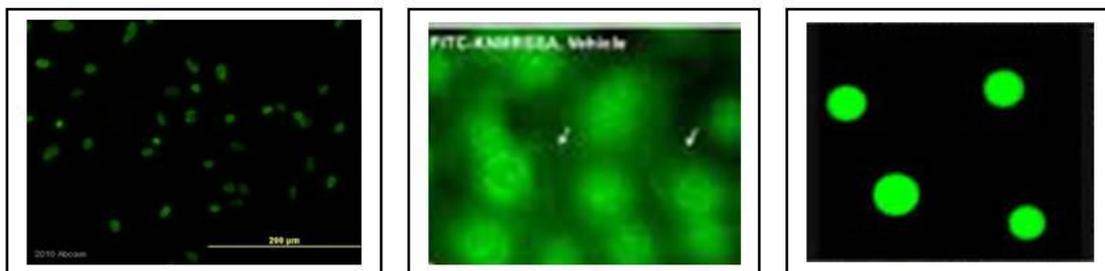
和做实验的时候必须设立对照组一样，免疫组化也必须设立对照染色。没有对照染色的免疫组化结果是不可信的。对照一般有阳性组织对照，阴性组织对照，阴性试剂对照，自身对照。一般来说，有一个阳性组织对照和一个阴性组织对照就足够了。

定位

抗原表达必须在特定部位。如 LCA 应定位在细胞膜上；CK 应定位在细胞浆内；PCNA 及 p53 蛋白应定位在细胞核内等等。不在抗原所在部位的阳性着色，不能视为确切的阳性结果。有可能是非特异性染色或者假阳性。不能确定怎么办？这就要用到上一段提到的对照染色了。

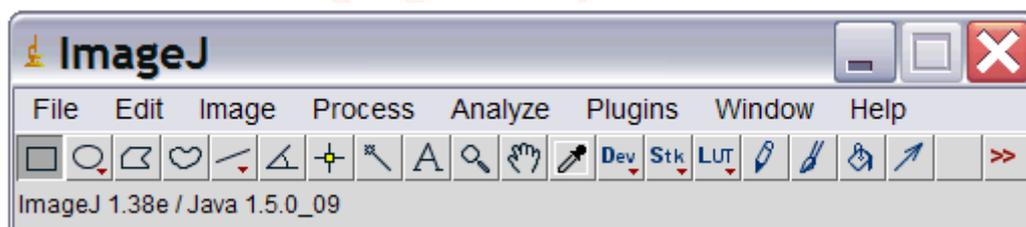
半定位

现在一般用图像分析系统进行定量。如果你的实验室不幸没有那么高大上的话，就只好赶鸭子上架，用肉眼定一下量了。因为人为主观性比较强，所以只能称作半定量。免疫组化的半定量一般就分为三级：弱 (+)，中 (++)，强 (+++)。以绿色免疫荧光为例，则表现为浅绿色荧光、明显绿色荧光和亮绿色耀眼荧光。弱 (+) =1，中 (++) =2，强 (+++) =3。至少随机观察 5-10 个 HPF。然后根据 $(+) \% \times 1 + (++) \% \times 2 + (+++) \% \times 3$ 计算出数值；总数值 <1.0 者为 (+)，1.0-1.5 者为(++)， >1.5 者为(+++)。

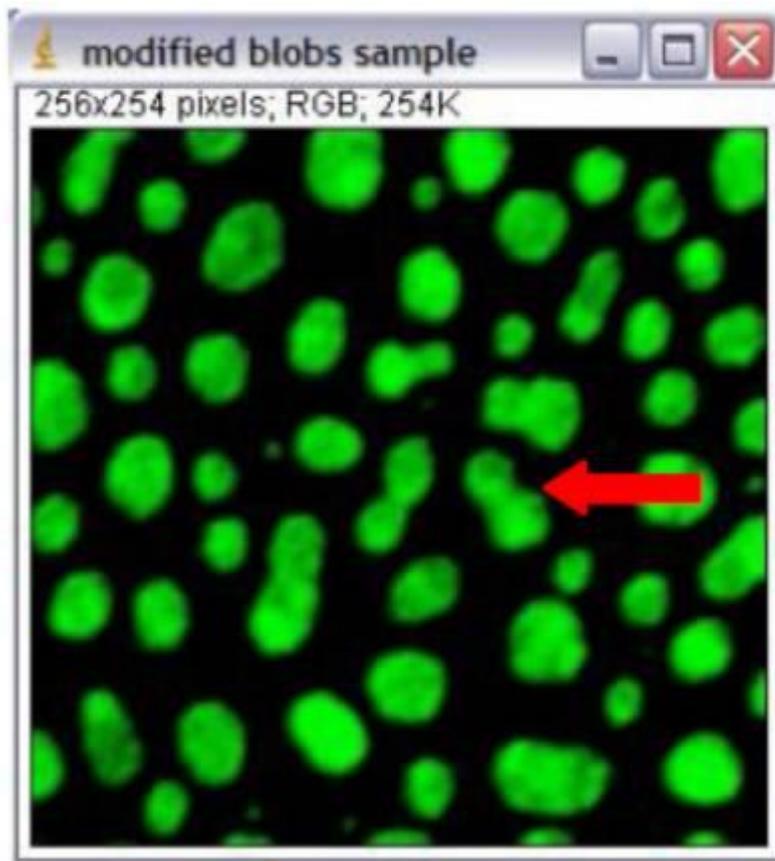


图像分析仪

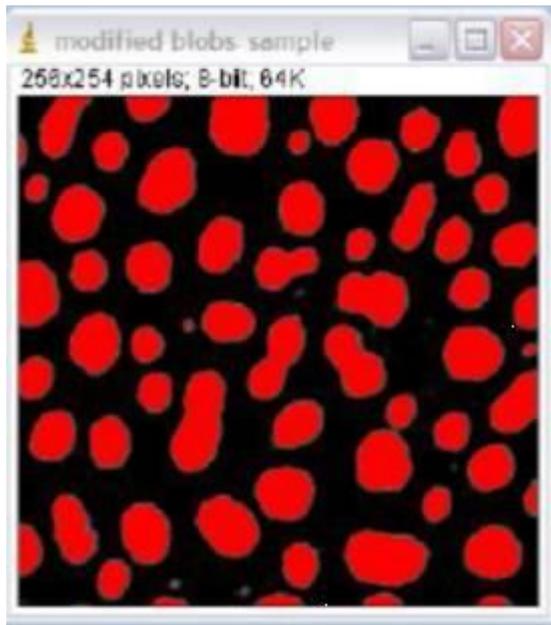
如果要进行精确量的话，就要用到图像分析仪。图像分析仪类型很多。这里就不一一介绍了。其实毛博最想隆重推荐的是一款图像分析软件：**ImageJ**。毛博当年在美国做博士猴的时候，就是用的这款软件。这是 NIH 开发的免费软件。一般的免疫组化结果分析用它就绰绰有余了。现在已经开发到了 1.50 版。网上可以免费下载。其界面非常简洁，如下图所示。



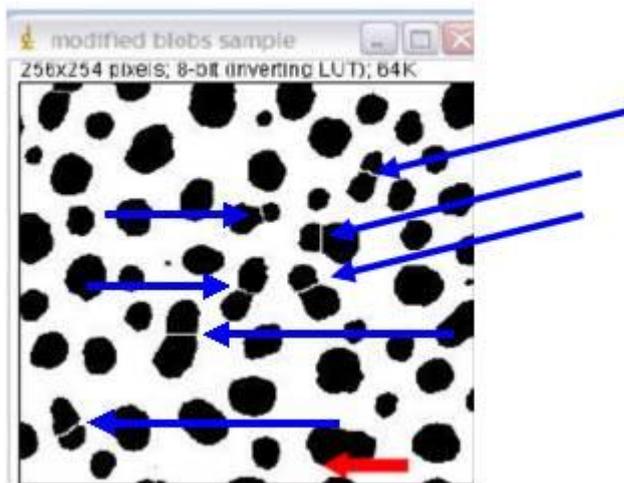
现在，根据一个实例来看看如何用 Image J 来进行图像分析。如下图所示，我们有一张细胞的免疫荧光染色的照片。那么，如何用 Image J 来计数细胞的个数呢？



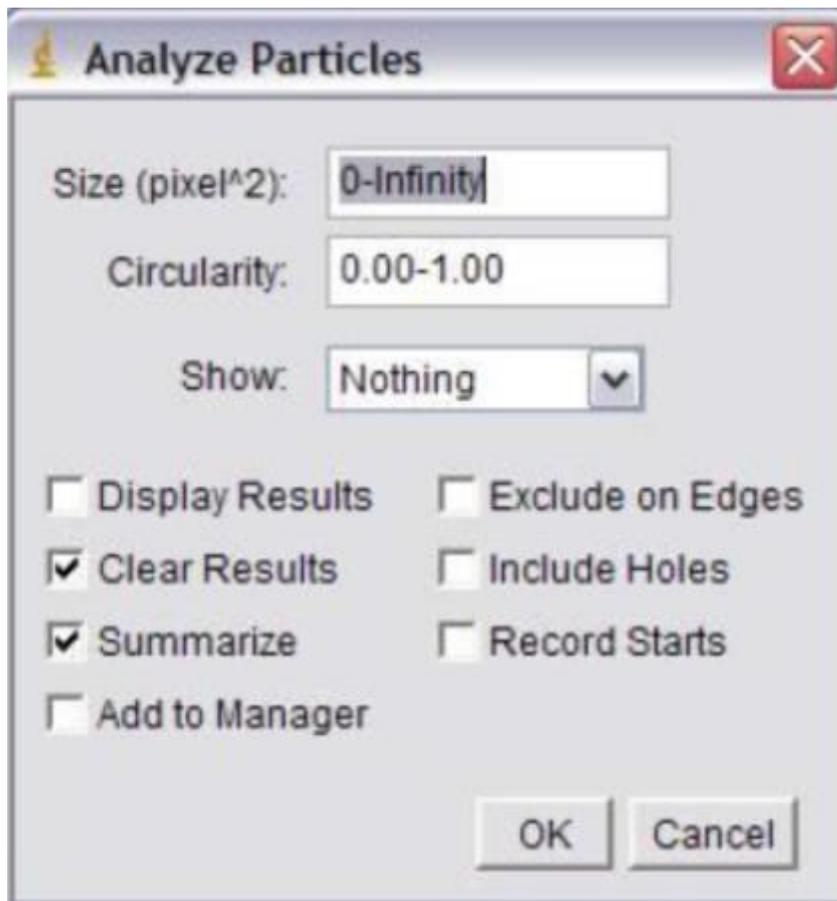
首先，要把彩色的图像转换成黑白图像。步骤如下：Image→Type→16-bit。转换成黑白图像后，将要计数的部分用高亮标示出来。步骤如下：Image→Adjust→Threshold。然后拖动鼠标，直到所有的细胞被标示出来。



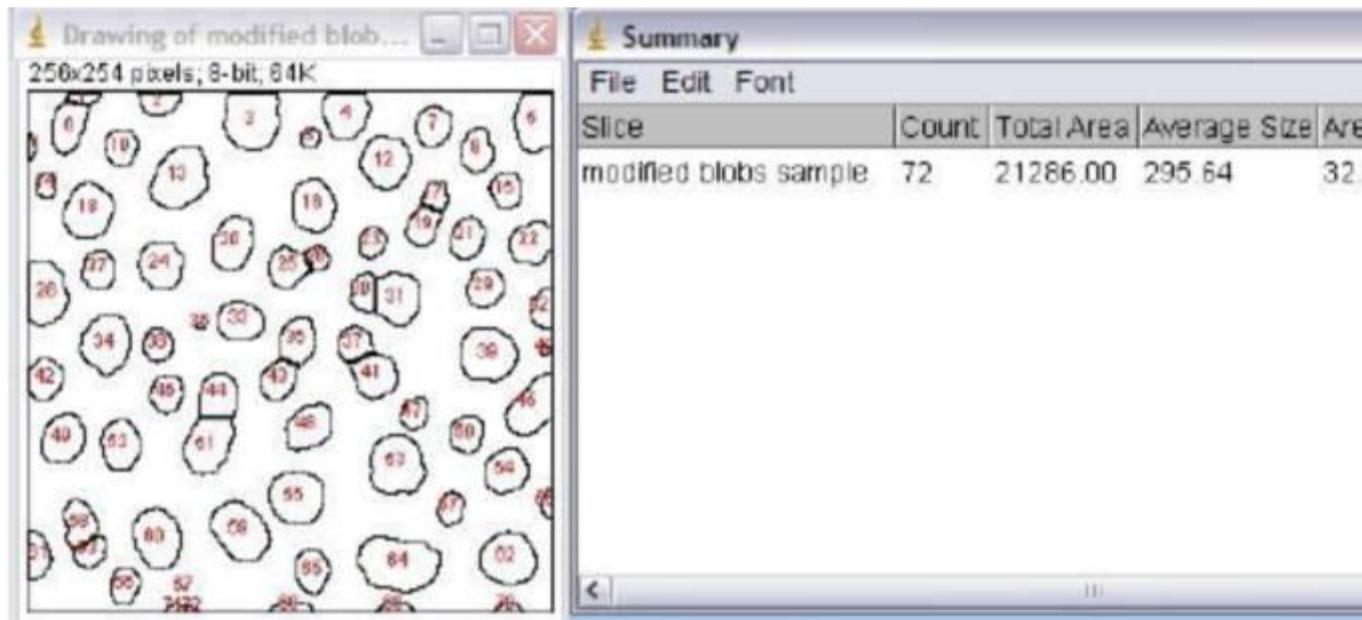
有时候 2 个细胞靠得比较紧密，会被计数为 1 个细胞。这个时候可以采用 Image J 的水洗功能。步骤如下：Image→Binary→Watershed。如下图的蓝色箭头所示，这些是本来计数成一个的细胞，经过水洗之后，更加精确地被计数成了 2 个细胞。



然后，就可以正式开始分析了。步骤如下：**Analyze**→**Analyze Particles**。在得出最后的结果之前，还有一些选项需要选择。如果想要计数全部的细胞，那么 **Size** 项里面选择“0-infinity”。**Circularity** 的默认值为“0.00-1.00”。一般就取默认值。



最后的结果如下图所示。软件自动测量了每个细胞的大小。这里因为是二维图像，所以就是每个细胞的面积。然后计数了一共有 72 个细胞，总面积为 21286.00，平均大小为 295.64。

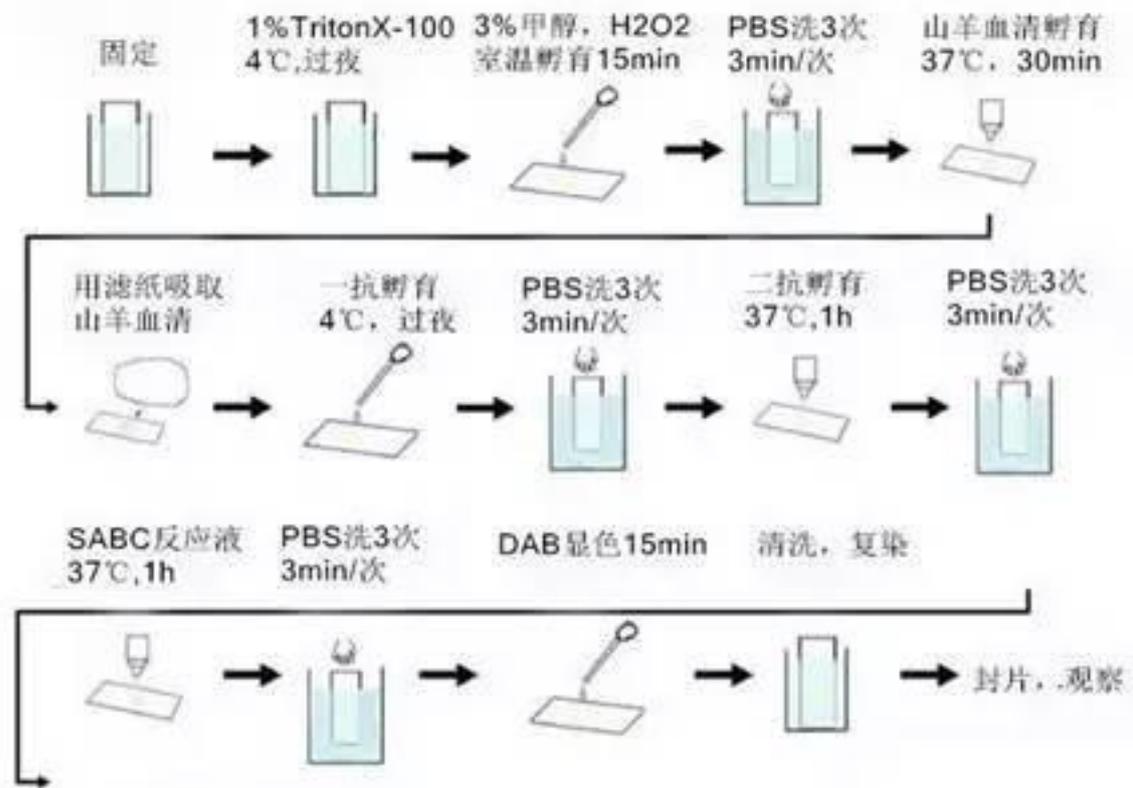


免疫组化是个苦活，时间长，步骤多，还要经常接触有毒致癌物质。大家辛辛苦苦染出了漂亮的片子，最后都希望得出自己想要的结果。以上介绍了一些自己的心得体会。希望广大的实验狗们都能做出自己想要的结果，早点发文章。

免疫组化之 8 大疑难解答及 10 大实战经验 (附临床上常用免疫组化指标)

作者：子非鱼

免疫组化 (IHC)，此种高端大气上档次的实验自然深得科研者的宠爱。然而做过该实验的人都知道，IHC 看似容易，但其花样百出的问题总是让实验汪们的精神备受摧残，苦不堪言。本文就对免疫组化进行抽丝剥茧的剖析，还其一片净土。



IHC 反应实验流程

IHC 常见的 8 大疑问

Q1: 冰冻切片和石蜡切片如何取材?

Answer: 冰冻切片取材可分为两种情况:

1) 动物灌流固定：如小鼠心脏灌流，首先采用预冷的 1×PBS 灌流冲洗直至血液全部放出，随后灌注 4%PFA 直至小鼠僵直，而后解剖获取组织，于 4℃、4%PFA 中固定 1h 左右，1×PBS 洗 5 次（30min/次），25%蔗糖溶液脱水 12h 左右包埋即可。

2) 直接取材：直接选择新鲜组织进行冰冻切片，此时不需要进行抗原修复。缺点：切出的片子含水量会比较多，形成冰晶影响结果，而且后期的丙酮固定也会改变细胞的形态。

石蜡切片：动物组织取材（灌流与否都可以，并不影响后续的操作）后，置于 10%福尔马林溶液中固定 3-4 天后，脱水，包埋，即可进行石蜡切片操作。

Q2:石蜡切片和冰冻切片的区别比较

Answer: 1) 石蜡切片制备过程较复杂，抗原活性差，但切片薄（3-5 μm ），便于观察细胞的细微结构，且常温保存即可，非常方便。2) 冰冻切片较厚（8-12 μm ），操作简单，抗原活性好，但是保存时间短，且一定放在-80℃的低温冰箱中。

Q3: 一抗的选择要点是什么？

Answer: 1) 一般单克隆抗体特异性强，但亲和力相对小，检测抗原灵敏度相对低；而多克隆抗体特异性弱，但抗体的亲和力强，灵敏度高，但易出现非特异性染色（可通过封闭来避免）。2) 抗体的比例可依据抗体说明书或 western blot 的抗体比例来做即可。3) 对于组织样本，一般要在 37℃ 孵育 1-2h 或 4℃ 冰箱孵育过夜（效果最佳，且拿出后需 37℃ 复温 45min），并保持湿盒里的湿度来防止抗体蒸发。对于难以着色的，在第二天还需将湿盒置于室温孵育。

Q4: 如何选择封闭血清?

Answer: 封闭血清一般是和二抗同一来源,可封闭非特异性结合位点,降低背景噪音。也可使用小牛血清、BSA、羊血清等,但不能与一抗的来源一致。

Q5: DAB 显色时间如何把握?

Answer: 可选择一张阳性的片子,用计时器精确计时在显微镜下判断出具体时间后,再对所有片子进行显色,采用相同的时间来界定。一般如果抗体浓度适宜,操作无误,10分钟内肯定能够显色,如果超过该时间,说明一抗比例不够或者封闭太久等等原因。显色时间越短,则说明抗体浓度高或抗体孵育时间过长,需下调抗体浓度或缩短抗体孵育时间。

Q6: IHC 复染时间的选择?

Answer: 苏木素复染时间一般为5min左右,可调整,染色时间太浅,可延长时间,反之缩短时间;随后进行盐酸酒精分化,数秒即可,自来水洗,最后置于氨水中返蓝。

Q7: 免疫组化的结果如何分析?

Answer: 1) 必设对照组。如阴性、阳性及自身对照。

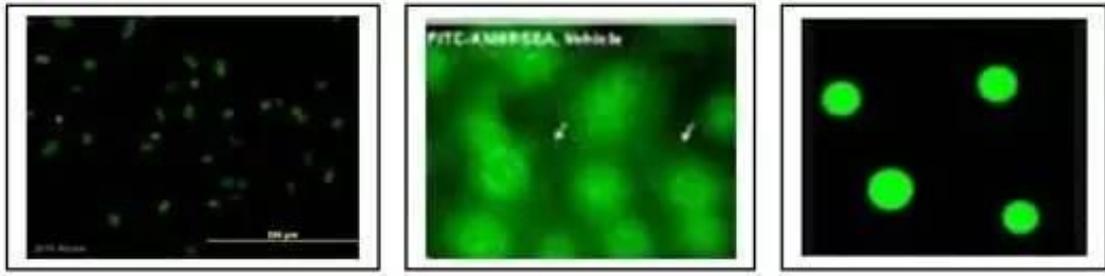
	阳性对照	阴性对照	替代对照	实验组	结论
1	-	-	-	-	操作错误
2	+	+	+	+	非特异性反应
3	+	+	-	-	阴性对照含定位Ag
4	-	-	-	+	阴性对照不含定位Ag
5	+	-	+	+	受检组织非特异性染色
6	+	-	-	-	受检组织不含定位Ag
7	+	-	-	+	受检组织含定位Ag

由表中可知，只有 6、7 实验结果有意义。1-5 均因对照组的结果已否定抗体的特异性或因 ICH 技术操作存在错误等而使实验结果失去意义，则必须重复实验或换用抗体。

2) 阳性着色细胞计数法。在 40 倍光镜下，随机选择不重叠的 10 个视野，人工或机器计数阳性着色细胞，每组 3-6 张不同动物组织切片，然后进行组间比较即可。

3) 灰密度分析法。通过在不同组别和不同动物组织切片上选择相同区域、相同条件下用 image j 进行灰密度分析，然后进行统计分析即可。

4) 分级法。免疫组化的半定量一般分为三级：弱 (+)，中 (++)，强 (+++)。以绿色免疫荧光为例，则表现为浅绿色荧光、明显绿色荧光和亮绿色耀眼荧光。弱 (+) =1，中 (++) =2，强 (+++) =3。至少随机观察 5-10 个 HPF。然后根据 (+) % x 1 + (++) % x 2 + (+++) % x 3 计算出数值：总数值 < 1.0 者为 (+)，1.0-1.5 者为 (++)，> 1.5 者为 (+++)。



Q8: IHC 常见的疑难杂症有哪些?

Answer:

科研资源网

1. 显色过深

- 一抗浓度过高或孵育时间过长，建议降低一抗浓度或减少孵育时间。
- 孵育温度过高，建议室温或4℃孵育。
- HRP标记二抗孵育时间过长，建议缩短时间。

2. 非特异性显色

- 石蜡切片脱蜡不彻底，建议延长脱蜡时间。
- 操作过程中冲洗不充分，建议增加冲洗的次数与冲洗时间。
- 组织富含内源性的生物素与过氧化物酶，建议使用相关试剂进行封闭。
- 发生抗原异位。
- 蛋白封闭不充分，建议增加蛋白封闭时间。

3. 显色强度弱

- 一抗浓度过低或孵育时间过短，建议增加一抗浓度或延长孵育时间。
- 试剂超过保质期，建议实验前确认试剂的保质期。
- 操作过程冲洗过度，建议适度冲洗。

4. 无染色

- 组织中无目的抗原的表达。
- 一抗种属来源与二抗不匹配，建议实验前确认一抗的种属来源。
- 显色物质与HRP系统不匹配，建议实验前确认显色体系。

免疫组化（IHC）的十大实战经验

1. 把要做的切片先分好，做几个抗体可分几盒，不正常组织与正常组织要分开。其余做预实验用。

2. 选择实验要做的抗体时，要结合他们的正常组织和癌组织的分别表达率。

3.试剂盒的选择可结合生物素强弱的情况。如：肝组织生物素含量高，S-P 试剂盒生物素含量也高，故不能配合使用。

4.每次开始做时，都必须先清点实验的必需品是否齐全。想好可能发生的意外，并先想好补救措施。当抗体不够用的情况下，原先买的抗体最好不要用完，留做可能需要的验证试验。新的抗体要尽量同公司，同批号。

5.烤片（单一或综合）程度要适情况而定，可中途拿出甩一甩，尽可能先放在烤箱里烤 3 小时以上。切勿把片烤得太久了。程度刚好，脱蜡效果才会好。注意做好不同条件的切片标记。注意温度稳定，再烤片。

6.二甲苯脱蜡。温度过低时，可先把二甲苯整罐放进烤箱加热，或者可把片放在二甲苯里一起加热脱蜡，这样效果会更好；若温度适宜，那还是在室温下脱蜡，要不可能会适得其反。时间也是适情况而定。

7.高压修复时，要注意稀释比例，修复液的种类（EDTA 不可以重新进行利用，可能发生交叉作用），PH 值等。高压锅内压力未降至正常时不可打开，压力正常后可多放会儿，能更好的利用余压，把握程度。若是多次修复，每次都需先把锅内热水倒掉，换冷水，保证条件的可重复性。

8.抗体反复冻融可使效价降低。抗体要防止污染。不可用塑料保存，塑料可吸附抗体。抗体稀释：应遵循“现用现配”的原则，对于 PBS（其他稀释液，注意 PH 值，PBS 为偏中碱性）稀释的抗体最好要当天使用。稀释比例恰好为佳，注意前带和后带效应。

9.吹干封片时不能有泡泡。若是没封好，可进行二甲苯、酒精脱树胶，吹干再次封片，但镜下效果会明显变差。因而，若没必要，最好不要再次脱胶。DAB 显色需用中性树胶封片，AEC（易溶于有机溶剂）需用水性胶封片。

10.刚封完的载玻片会移动，故切片还没干时，尽量不要碰到盖玻片，可避免树胶溢出，片的整体效果不好。

附录：临床上常用免疫组化指标

通常恶性肿瘤，免疫组化耐药预后标记（共 4 个 marker）为：P-gp, GST π , TOPOII, Ki-67。而乳腺癌免疫组化耐药预后标记（共 7 个 marker）为：P-gp, GST π , TOPO II, Ki-67, ER, PR, C-erbB-2。

标记物	临床意义
P-糖蛋白 (P-gp)	阳性率越高，对下列药物耐药性越强： 阿霉素、柔红霉素、表阿霉素、米托蒽醌、长春花碱、长春新碱、紫杉醇、泰素帝
谷胱甘肽S转移酶 (GST π)	阳性率越高，对下列药物耐药性越强：阿霉素、顺铂、氮芥、环磷酰胺、瘤可宁
拓扑异构酶II (TOPOII)	阳性率越高，对下列药物越有效：蒽环类抗生素和鬼臼毒素类，如VP-16、替尼泊苷、玫瑰树碱、新霉素、柔红霉素、表阿霉素、阿霉素、VM26。阳性率高者对VP-16尤其有效
雌激素受体 (ER)	阳性率越高，肿瘤对内分泌治疗越有效，预后越好
孕激素受体 (PR)	阳性率越高，肿瘤对内分泌治疗越有效，预后越好
HER2基因 (C-erbB-2)	阳性率越高，肿瘤恶性程度越高。ER、PR 阳性而C-erbB-2 也阳性者，用三苯氧胺治疗效果不好
Ki-67	阳性率越高，肿瘤增殖越快，恶性程度越高
PCNA	阳性率越高，肿瘤增殖越快，恶性程度越高
CEA	多数腺癌表达CEA

标记物	临床意义
Rb (视网膜母细胞瘤)基因	肿瘤抑制基因, 调节细胞周期
P53 (癌胚抗原)	在免疫组化中均为突变型, 阳性率越高, 预后约差。野生型半衰期很短。
Nm23基因 (转移抑制基因)	其阳性表达和肿瘤转移呈负相关; nm23 蛋白高表达患者淋巴结转移率相对较低, 存活期相对较长
E-Ca (E 钙粘附蛋白)	介导细胞间粘连作用的跨膜糖蛋白, 其功能丧失引起细胞之间连接的破坏, 主要用于肿瘤侵袭和转移方面的研究
PS2 (雌激素调节蛋白)	其表达和 ER 表达有关, 可作为内分泌治疗和预后判断的指标之一
CK7 (细胞角蛋白)	卵巢、肺和乳腺上皮常阳性, 结肠、前列腺、胃肠道上皮阴性
CK18 (低分子量角蛋白)	主要标记各种单层上皮包括腺上皮, 而复层鳞状上皮常阴性, 主要用于腺癌诊断。
CK19 (细胞骨架蛋白)	分布于单层上皮和间皮, 常用于腺癌诊断, 肝细胞不表达, 而胆管为阳性反应
CK20 (重组人细胞角蛋白)	用于胃肠道腺癌、卵巢黏液性肿瘤、皮肤 Merkel 细胞癌诊断。鳞癌、乳腺癌、肺癌、子宫内膜和卵巢非黏液性肿瘤常阴性

标记物	临床意义
Hep par 1 (肝细胞抗原)	正常肝细胞和高分化肝细胞癌阳性, 低分化肝细胞癌多弱阳性或阴性。
Villin (绒毛蛋白)	在胃肠道癌、胰腺癌、胆囊癌和胆管癌组织中高表达
MRP1 (多药耐药相关蛋白 1)	影响化疗敏感性, 和预后相关
MDR	影响化疗敏感性, 和预后相关
TS (胸苷合成酶)	5-FU 重要作用靶点, 如果其高表达, 阳性反应++ 以上, 提示肿瘤细胞对 5-FU 耐药
Syn (突触素)	神经组织标志
S-100	神经组织标志, 存在于神经组织, 垂体、颈动脉体, 肾上腺髓质、唾液腺、少数间叶组织, 常用于神经鞘瘤、恶黑、脂肪肉瘤、软骨肿瘤诊断
NSE (神经元特异性烯醇化酶)	主要用于神经内分泌肿瘤诊断
Chr (嗜铬素)	肾上腺髓质含量很高, 鉴别肾上腺髓质和皮质, 用于神经内分泌肿瘤诊断

标记物	临床意义
CKH (高分子角蛋白)	主要标记鳞状细胞肿瘤
CKL (低分子角蛋白)	主要标记单层上皮、腺上皮
EMA (上皮膜抗原)	糖蛋白, 广泛分布各种上皮及其肿瘤
Vim (波形蛋白)	间叶组织标志
P504 (甲酰基辅酶 A)	检测诊断前列腺癌的敏感性为 97%, 特异性为 100%
AMACR (癌症特异性靶标)	只存在于癌症组织, 结肠直肠癌、卵巢癌、乳腺癌、膀胱癌、肺癌、淋巴瘤和黑素瘤都过度表达 AMACR, 以结肠直肠癌和前列腺癌表达最高
CD117 (酪氨酸激酶受体)	诊断胃肠间质瘤。
CD10 (共同急性淋巴母细胞型白血病抗原)	主要表达于未成熟淋巴细胞, 在 Burkitt 淋巴瘤, 慢性髓性白血病等造血系统疾病的诊断中具有应用价值。

标记物	临床意义
CD15 (细胞粘附分子)	对霍奇金淋巴瘤 (HD) 中的 R-S 细胞具有良好的标记作用, 被认为是 HD 的重要标志物。因 CD15 表达随癌细胞分化程度下降、淋巴结转移和临床分期增高而明显增高, 可是判断肿瘤的发展、预测淋巴结转移和预后的良好指标。
SMA (平滑肌肌动蛋白)	标记平滑肌
CD56 (神经细胞黏附分子)	主要分布于大多数神经外胚层来源细胞, 常用于星型细胞瘤、神经母细胞瘤、神经内分泌肿瘤诊断, 也是 NK 细胞瘤的重要标志, 也标记小细胞肺癌
Des (结蛋白)	广泛分布于平滑肌、心肌、骨骼肌细胞和肌上皮细胞, 高分化高表达、低分化低表达
MSA (肌特异性肌动蛋白)	广泛分布于几乎所有肌型细胞中
CD68	存在于骨髓和各神经组织的巨噬细胞, 用于粒细胞白血病、各种单核细胞来源肿瘤、包括恶性纤维组织细胞瘤诊断 (首选)
CD34	表达于早期淋巴造血干细胞、祖细胞、内皮细胞、胚胎纤维母细胞和某些神经组织细胞, 多用于标记血管内皮细胞, 血管源性肿瘤的诊断, GIST 80-90%
CD31	标记血管内皮。
CD44 (跨膜糖蛋白分子)	分 CD44s 和 CD44v 两大类。CD44s 主要作为透明质酸受体, 结合透明质酸后影响肿瘤的生长和转移。而 CD44v 则主要表达于转移的肿瘤细胞。

标记物	临床意义
NESTIN	神经干细胞中极为丰富
Ost (成骨素)	为骨化细胞分泌
AAT (抗胰蛋白酶)	纤维组织细胞来源肿瘤
ACT	
GFAP (胶质纤维酸性蛋白)	神经组织标志, 多用于星形胶质瘤诊断
Tg (甲状腺球蛋白)	甲状腺癌 Tg 阳性
CT (降钙素)	甲状腺髓样癌阳性
PH (甲状旁腺素)	甲状旁腺肿瘤阳性
N-myc	表达增强的小细胞肺癌和神经母细胞瘤对化疗缺乏反应并进展快速
bcl-2	耐药机理为抗凋亡作用, 高表达者对多数抗癌药物/放射治疗耐受

标记物	临床意义
TGA72 (肿瘤相关抗原 72)	多种恶性上皮性肿瘤表达 TGA72, 尤其是乳腺癌、卵巢癌和结肠癌。正常上皮细胞、肉瘤、淋巴造血系统肿瘤通常 TGA72 阴性。TGA72 抗体用于乳腺癌的研究较多, 其高表达通常与肿瘤体积大、淋巴结转移瘤细胞分化差及高增殖活性有关
TGA733 (肿瘤相关抗原 733)	是一种上皮细胞黏附分子 (EP-CAM), 对上皮细胞的生长与分化起着重要作用。多种肿瘤可有 GA733 表达, 尤其是乳腺癌、结肠癌及肺癌等
TTF-1 (甲状腺转录因子-1)	表达于甲状腺腺上皮和肺的上皮细胞中, 可用来鉴别肺腺癌与鳞癌, 以及肺转移性腺癌的鉴别。不能鉴别肺腺癌和肺神经内分泌肿瘤 (NETs)
Napsin A (天冬氨酸蛋白酶 A)	肺腺癌最常用的免疫标志物之一, 其敏感度和特异度均优于 TTF-1。TTF-1 + Napsin A 是目前诊断肺腺癌最优秀的抗体组合之一。

5.2 ELISA

一句话知晓实验方法怎么选? **WB、SPR、**

ELISA...

作者：麦子

在分子生物学实验室里的玩法，无非就是用某种特定的刺激物（如细胞活素）去刺激一些细胞或组织，让它们 high 起来，然后分析细胞对这些外源刺激物的反应，检测细胞内哪条信号通路被激活或失活，或者什么蛋白被分泌出来。这里面就有很多种方法，哪种最合适，关键看你要检测这个反应的哪个方面的特性。

WB

建立蛋白质的个人档案

一个典型的免疫印迹实验（Western Blot, WB）可检测信号通路中某种蛋白质的特性、表达和分布，分析容量大、敏感度高、特异性强。

但至于蛋白-蛋白相互作用则要用另一种更复杂的方法，即免疫共沉淀法（Co-immunoprecipitation, Co-IP），它接近细胞内的生理情况，是以成为经典方法。



WB 影视，实验做累了可以用

SPR

想知道 T_a 和 T_d 能有多亲密？

表面等离子共振（Surface Plasmon Resonance，SPR）除了研究蛋白-蛋白相互作用（例如受体-配体相互作用），还可研究小分子-蛋白或细胞-蛋白的相互作用。这种方法不需要标记蛋白（荧光标记或同位素标记），还可以实时定量分析这些相互作用的亲和力、热力学、动力学特性。SPR 是分析动力学和亲和力的金标准。



SPR 咖啡，熬夜读文献的时候用

EMSA

蛋白瞄着核酸，我们又瞄着那些蛋白

电泳迁移率实验（Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA）最初用于检测 DNA 结合蛋白与相应的 DNA 序列结合的情况，可做定性和定量分析，包括细胞核中的转录因子（如 NF- κ B）的活性等等，现在也常用于研究 RNA 结合蛋白和相应的 RNA 序列相互作用。

这些分析用酶联免疫吸附实验（EnzymeLinked ImmunosorbentAssay，ELISA）也可以做，原理差不多。



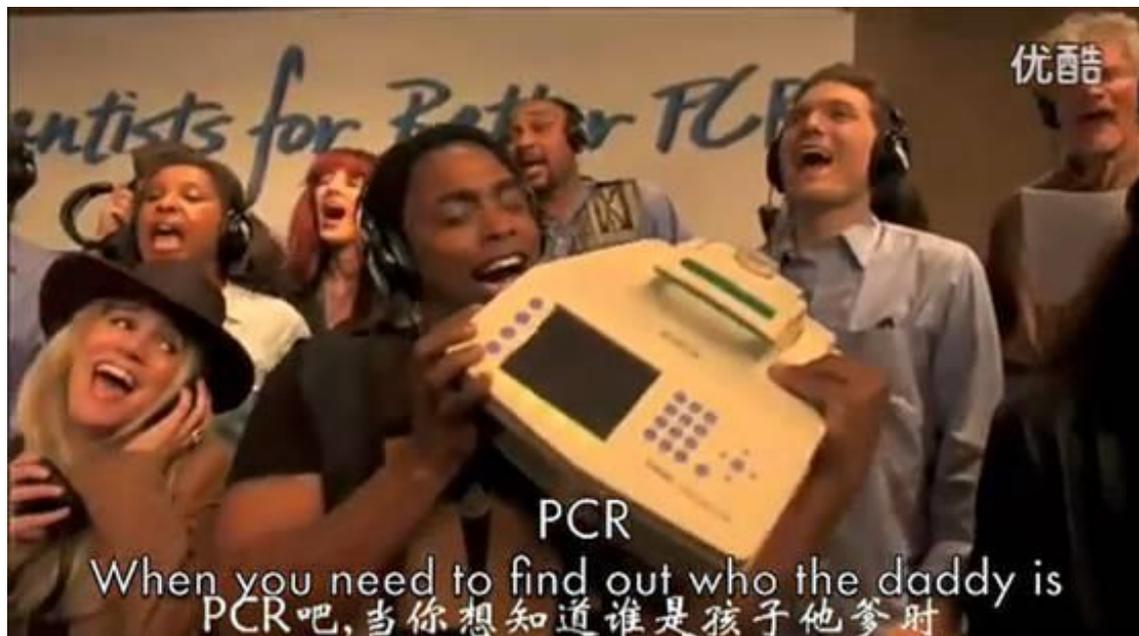
EMSA，德国家居品牌，休息区的椅子可以吗？

PCR

把小树养大才能更好地招风

转录因子激活并和靶基因结合之后，该基因就被激活。PCR（Polymerase Chain Reaction）或

Real Time PCR 可以把特定的 DNA 序列大幅扩增，便于检测活性基因的表达情况。



PCR，用途很广啊

ELISA

追踪到天涯海角！

如果要看看细胞外如何，比如细胞培养上清液或体液中的某种蛋白质分泌情况，则通常选用 ELISA，从而获知相应基因的活性。



艺人 ELISA，在实验室放放她的歌吧.....

参考资料：

<http://bitesizebio.com/19759/western-blot-elisa-or-pcr-which-technique-should-i-use/>

技术 | 美丽的 ELISA，你的考验我懂

作者：毛博

酶联免疫吸附实验，简称为 ELISA。正好是一个美丽的女孩的名字。日本有位女歌手野田绘理纱，英文名字就叫 Elisa。



ELISA 实验是一种非常经典的免疫学实验。虽然历史非常悠久了，但是还是不断地在临床和基础研究中得到应用。其主要用于：免疫酶染色各种细胞内成份的定位；研究抗酶抗体的合成；显现微量的免疫沉淀反应；定量检测液体中抗原或者抗体成份。毛博做过一段时间的 ELISA，总结了一些经验教训。毛博还是采用一贯的套路：问题，可能的原因，解决方法。供大家参考。

问题 1： 阳性与阴性不能达到 2.1 的比值，阴性颜色太深。

可能的原因：

阴性对照（也就是阳性对照的除目标抗原外的其它成分）中有某种成分与一抗作用。

解决的方法： 纯化抗原除去干扰成分。

问题 2: 阳性与阴性不能达到 2.1 的比值，阳性颜色太浅。

可能的原因有 3 个：

- 1) 一抗效价不好。
- 2) 抗原太稀。
- 3) 封闭时间过长。

解决的方法：

- 1) 换用一抗或增加一抗用量。
- 2) 增加抗原浓度。
- 3) 缩短封闭时间，封闭时间一般 37 摄氏度 3 个小时，或者 4 摄氏度过夜。不能比这个更长了。

问题 3: 增加抗原浓度，一抗浓度不变，显色反应没有表现出应有的梯度。

可能的问题：一抗与抗原的比例已经饱和。

解决的方法：增加一抗用量；或在一抗用量不变的情况下减少抗原浓度做梯度。

问题 4: 增加一抗浓度，显色反应没有表现出应有的梯度。

可能的原因：一抗与抗原的比例已经饱和。

解决的方法：增加抗原用量；或在抗原用量不变的情况下减少一抗浓度做梯度。

问题 5: 加完 TMB 显色后颜色梯度很明显，但加了硫酸终止反应后颜色梯度没有那么明显了。

可能的原因: 硫酸可能把其它成分都炭化了。

解决的办法: 加少一点硫酸，参考值：50 μ l TMB+35 μ l 硫酸；或者采用 1M 的 HCL 作为终止液，50 μ l TMB+50 μ l 1M HCL。

毛博认为：这些步骤里面，一抗和封闭是两个关键。如果 ELISA 做不出满意的结果，首先应该从这两个方面改进。Elisa 实验看似简单，其实不然。别小瞧了这个美丽的女孩子哟。光是一个加样就有很多讲究。

ELISA 中加样须注意如下问题:

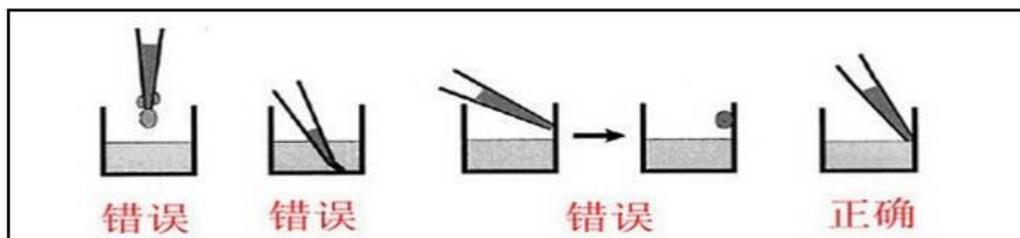
吸取样品时，加样枪吸头不应黏附多余的液体；加样时不可 90 度向孔中滴加液体，这样会导致液体残留在吸头上，加样不准确！

不要将吸头伸入孔中，一方面若接触孔底可能压弯吸头，另一方面可能会将孔中的液体吹起来，加样不准确！

正确的加样方法应为 45 度，吸头贴着孔壁加入，应注意：

角度太小，会使液体残留在孔壁上，导致加样不准确！

吸头应当贴着管壁和液面的交界处！



综上所述，Elisa 实验看似简单，其实还是有很多细节需要我们注意的。以上毛博介绍了 Elisa 实验的一些经验教训，希望对大家有所帮助。

ELISA 实验操作中值得关注的细节大盘点

作者：子非鱼

酶联免疫吸附测定（ELISA）因其具有敏感性高、特异性强等优点，被广泛应用于临床检测中的各种抗原和抗体的测定。尽管 ELISA 操作简单，但是小实验里也蕴含着大文章，ELISA 操作各个环节对实验的检测效果影响较大，稍不注意就会产生假阳性或假阴性的结果。现在小鱼就跟大家 818 应用 ELISA 应该了解的一些常识。

ELISA 分类及具体过程

一般，ELISA 可分为以下四大类：直接 ELISA、间接 ELISA、夹心 ELISA、竞争抑制 ELISA。其他的 ELISA 都隶属于这四类 ELISA 或由这四类 ELISA 组合衍生。

ELISA 的具体操作的视频链接:

下面分析 ELISA 实验操作中可能影响结果的原因, 并给出相应的解决方法。

样品收集和保存

用于 ELISA 测定最常用的临床标本是血清(浆)。要注意避免严重溶血, 因为血红蛋白中含有具有类似过氧化物活性的血红素基团, 在孵育时很容易吸附于固相, 与 HRP 底物反应产生假阳性。

样品采集及血清分离中要注意避免细菌污染, 一方面细菌分泌的酶可能对抗原抗体等蛋白产生分解作用, 另一方面, 细菌的内源性酶如大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶会对相应酶作标记的测定方法产生非特异性干扰。

样品应该要避免反复冻融。因反复冻融所产生的机械剪切力对标本中的蛋白等分子产生破坏作用, 从而引起假阴性结果。另外, 样品混匀时, 不要剧烈振荡, 反复颠倒混匀即可。

一般而言, 如果在收集样品的当天进行检测, 可将样品及时储存在 4℃ 备用; 而对隔天再检测的样本, 应及时分装后冻存在 -20℃ 备用, 若要长期保存样品, 最好将其置于 -70℃ 冻存。

常见液体类标本	处理方法
血清	血液置于37℃恒温箱中1-2h,2000-3000rpm,离心20min,收集上清。
血浆	应根据标本的要求选择EDTA、柠檬酸钠或肝素作为抗凝剂,混合10-20min,2000-3000rpm,离心20min,收集上清。
尿液	用无菌管收集,2000-3000rpm,离心20min,收集上清。胸腹水、脑脊液参照此实行。
细胞培养上清	检测分泌性的成分时,用无菌管收集,2000-3000rpm,离心20min,收集上清。
培养细胞	检测细胞内的成分时,用PBS (pH7.4) 稀释细胞悬液,使细胞浓度达到100万/ml左右。 通过反复冻融或加入组织蛋白萃取试剂,以使细胞破坏并放出细胞内成分。2000-3000rpm,离心20min,收集上清。
组织标本	切割标本后,称取重量。加入适量的PBS pH7.4,用液氮迅速冷冻保存备用。 标本融化后仍需保持2-8℃,加入PBS pH7.4或组织蛋白萃取试剂,用手工或匀浆器将标本匀浆化。2000-3000rpm,离心20min,收集上清。 分装后一份待检测,其余冷冻备用。

试剂准备

在实验开始前,需将试剂盒从冰箱中拿出来在室温放置 20min,再进行测定,以使试剂盒在使用前与室温平衡,也可使温育时反应孔内的温度能较快的达到所要求的高度,以满足测定要求。

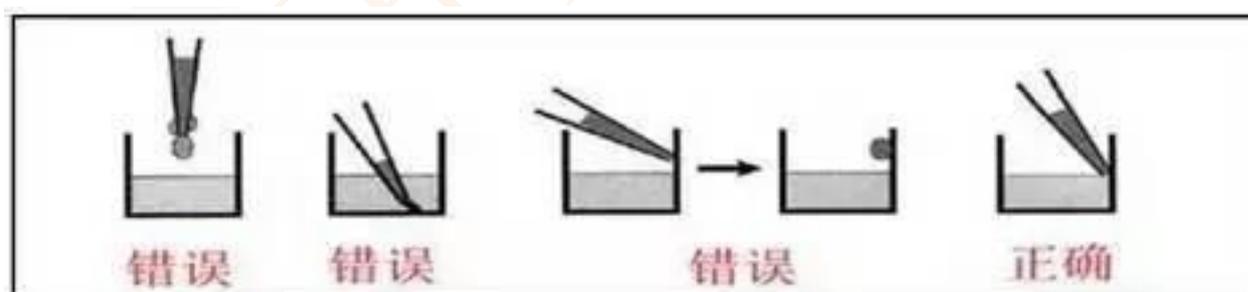
其次,目前商品中 ELISA 试剂盒中的洗板液均需在实验过程中对其所提供的浓缩液进行稀释配制,因此稀释时所用的蒸馏水或去离子水应该保证质量。此外,底物反应液应该反应显色前进行现配现用。同时,为了保证实验的均一性,实验中所有试剂在加样前必须摇匀。

加样

因 ELISA 的灵敏度较高，则应该按规定将血清稀释至适当的倍数，以降低非特异性反应，使特异性的抗原抗体反应充分体现出来。

加样品时，单孔用量要求： $\geq 20\text{ul}$ /指标，如需要做 2 个复孔则血量 $\geq 60\text{ul}$ /指标。如果用量充足，最好提供 50ul /孔/指标。具体用量也需根据试剂盒的要求而定。

吸取样品时，加样枪头不应粘附多余的液体；加样时不可 90° 向孔中滴加液体，否则会导致液体残留在吸头上，加样不准确。正确加样方法应为 45° 度，吸头贴着孔壁和液面的交界处加入。



加样时速度不可过快，否则无法保证微量加样的准确性和均一性；要避免样品加在孔壁上部而产生非特异性吸附。不可将样品溅出以避免对邻近孔产生污染。

孵育

一般, 孵育时间与温度成反比, 即温度越高, 所需时间相对较短。最常用的孵育温度为 37℃, 孵育 1-2h。

孵育时应贴封片或加盖, 避免样品或稀释液蒸发, 吸附于孔壁, 难于清洗。孵育时, 反应板不宜叠放, 以保证各板的温度都能迅速平衡。同时, 应严格控制孵育时间, 避免因时间过长导致紧附于反应孔周围的非特异性结合。

孵育时, 要尽量排除“边缘效应”, 即 96 孔板的外周孔显色较中心孔深。究其原因, 是因为 96 孔板周孔与中心孔的表面或热力学特征不同。因此, 可采用水浴或在将反应溶液加入至板孔中时, 将板和溶液均加热至孵育温度 (37℃)。

洗板

为了确保 ELISA 测定的特异性, 洗板可清除非特异性结合物质, 减少背景信号, 增加分析的信噪比。

手工洗板时, 拍板要垂直, 避免交叉污染, 用力不能过猛, 防止抗原抗体复合物脱离。使用半自动洗板时, 应经常检查冲洗头是否通畅, 若被杂物堵塞时可用注射器针头挑出。为了达到较好的洗涤效果, 实验室可采用机器与人工洗涤相结合的方法, 即在机器洗涤后再进行人工洗板 1-2 次。

以 HRP 作为标记酶的 ELISA 试剂盒中使用的洗板液一般为含 0.05% Tween20 的中性 PBS，其中，吐温 20 的浓度可在 0.05%-0.2%之间，高于 0.2%时，可使包被在固相上的抗原或抗体解吸附而减低实验的灵敏度。

显色

目前以 HRP 作为标记酶的商品 ELISA 试剂盒中，如以 TMB 为底物，则提供的底物为 A 和 B 两瓶应用液；如以 OPD 为底物，则试剂盒提供 OPD 片剂或粉剂，临用前配制。显色剂配制后放置时间过长（肉眼可见浅蓝色的 TMB 时）要弃之不用。

在加入底物开始显色反应前，最好是先检查一下底物溶液的有效性，即可将 A 和 B 两种液各加一滴于清洁的空板孔或 eppendorf 管中，观察是否有显色出现，如有，则说明底物已变质。

显色反应条件一般为 37°C或室温反应 15-30 分钟。加终止液时，要避免气泡产生而引起的假阳性。

读板

读板时要保证酶标板清洁，同时也要注意酶标仪的波长是否已调至合适或所用滤光片是否正确。

通常，单波长读板的测定值一般是指以对显色具有最大吸收的波长如 450nm 或 492nm 进行

比色测定；而双波长读板的测定值一般是敏感波长如 450nm 的吸光值与非敏感波长下如 630nm 的吸光值之差，可排除板内脏物的影响。

同时，由于 ELISA 测定中单个空白孔的非特异吸收上有一定程度的不确定性，也就是说每次测定或同次测定空白孔位置的不同均有可能得到不同吸光度测定值，故而在 ELISA 测定比色时，最好是使用双波长比色。

数据结果分析

ELISA 的测定结果可分为两种：定性测定和定量测定。前者只需确定阴性或阳性即可；后者则需要给具体的数值。在定量测定中，经常要将标准品所获得的吸光值进行标准曲线的绘制。

下面则简单介绍用 excel 绘制标准曲线的方法

1) 输入相应数据

试管号	浓度C (mg/ml)	吸光度OD
1	0.1	0.12
2	0.2	0.21
3	0.3	0.317
4	0.4	0.429
5	0.5	0.511

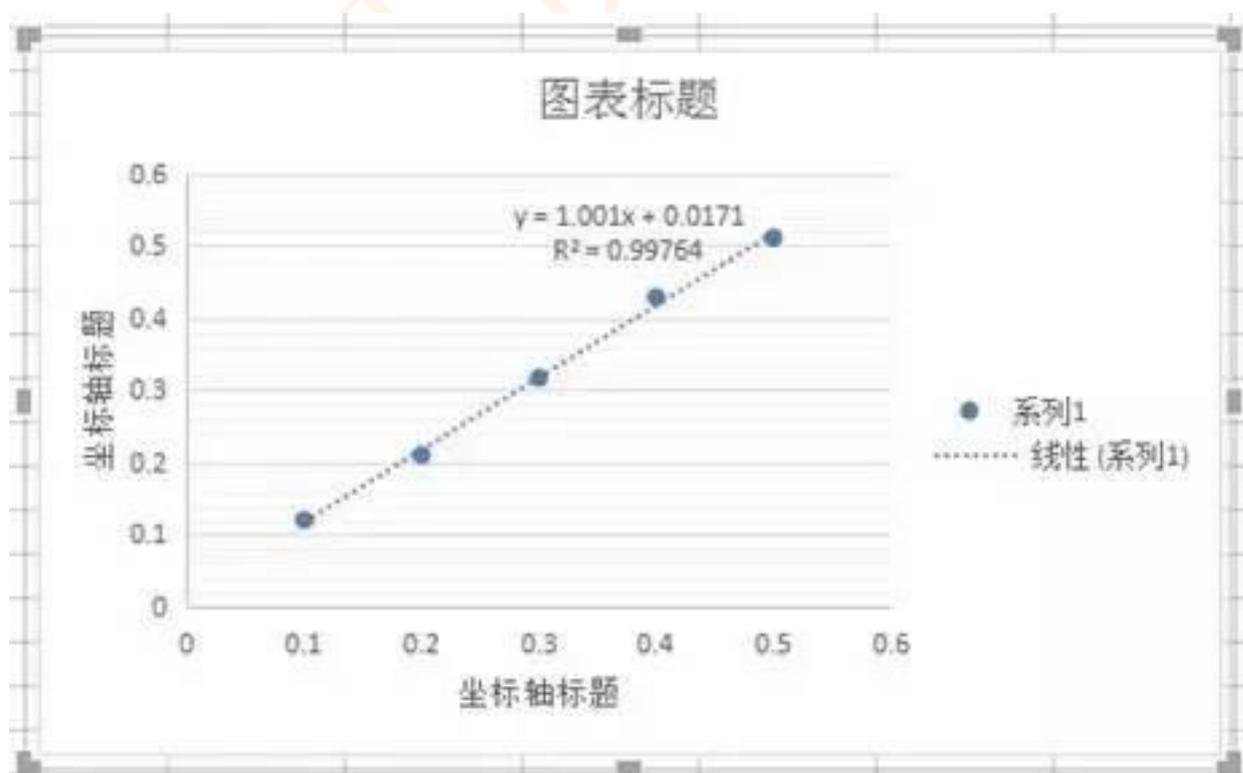
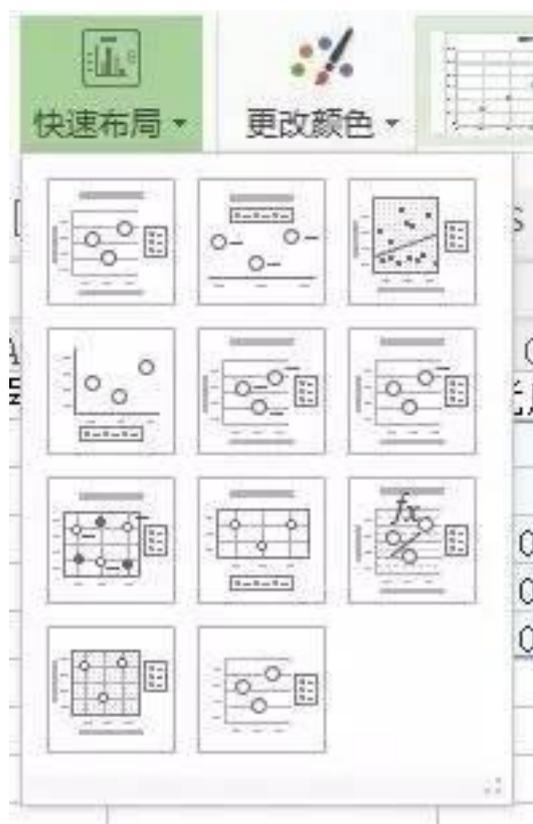
2) 选中相应数据

	0.1	0.12
	0.2	0.21
	0.3	0.317
	0.4	0.429
	0.5	0.511

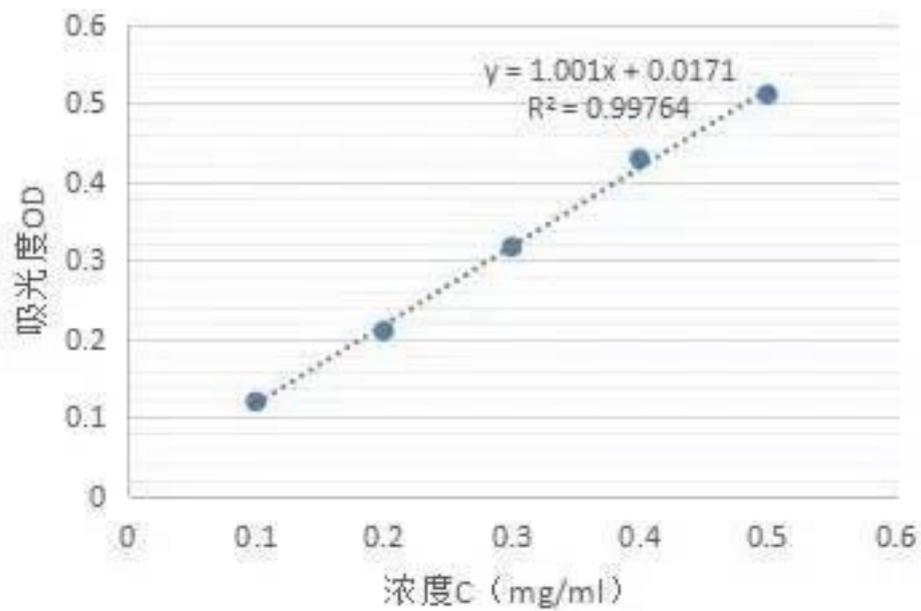
3) 选择表格中，菜单栏中的插入|散点图中第一个类型



4) 选中“图表工具”中的“快速布局”中 fx 图标，即可得到以下图表。Excel 版本较低的可以直接跳到第 6) 步。



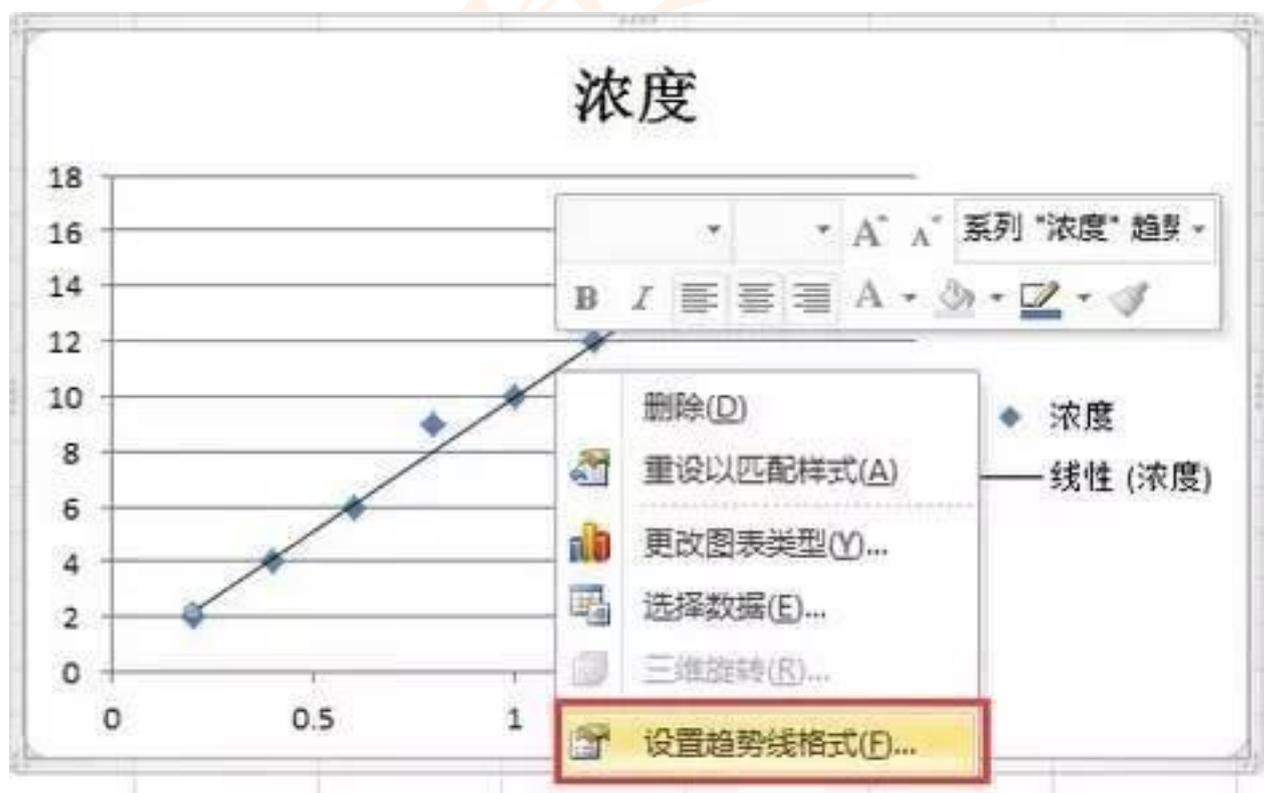
5) 点中坐标轴标题, 可做修改。修改后可获得以下标准曲线。



6) 或者在较低版本的 excel 中, 在“图表工具”选项中, 选择趋势线|线性趋势线。



7) 选中图表中的趋势线，右键，选择“设置趋势线格式”，在弹出的对话框中，将“显示公式”勾选上，点击关闭，也获得标准曲线。



8) 可将试验管中所测的吸光度值代入图表中的公式 $Y=1.001x+0.0171$ 后可得到所求成分的含量，即 X 的值。

ELISA 的疑难杂症

1) 显色浅，灵敏度低

序号	原因	解决方法
1	试剂盒运输时间过长，受高温天气影响，酶的活性降低。	试剂运输过程加放足够冰袋并尽可能缩短运输时间。
2	试剂盒（包括未用完的板条及其他组分）保藏条件不正确。	试剂盒内所有组分都应当在4℃冷藏，未使用完的板条要密封保存。
3	试剂盒使用时已超出有效期。	过期试剂盒不可以使用。
4	温育时间不够。	严格按照说明书操作。
5	恒温箱温度达不到37℃。	1) 经常注意水箱中合适的水位。 2) 在保证水不没过酶标板的前提下，使水位尽量高，以保证反应温度。 3) 注意控制恒温箱温度，尽可能让其稳定在 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。尽量避免频繁开关恒温箱门。

6	加样量不足；移液时抽吸排放过快，有气泡、或吸头内残留液体过多。	经常校正移液器。注意吸头要与移液器吻合。移液不宜过快，排放要完全。
7	显色剂加量不足，或加入顺序颠倒。	按照说明书要求，先加入A液、后加入B液，并保证加入量。
8	样品用NaN ₃ 防腐，影响了酶的活性。	不可以使用NaN ₃ 防腐。
9	试剂、样品使用前未平衡至室温。	试剂、样品从低温保藏条件中拿出来后，要先平衡至室温方可以使用。
10	试剂开启时间过长，污染。	试剂开启后应该在尽可能短的时间内用完，在保证正确贮存的前提最长不要超过。
12	不同批号试剂中混用	不同批号试剂不能混用

2) 假阳性多，本底高甚至花板

序号	原因	解决方法
1	试剂过期	过期试剂不能使用
2	加样时污染	注意更换吸头。尽可能避免污染。
3	加酶时污染	对先加样后加酶的操作，加酶时要注意吸头不要接触标本，造成污染。当可能造成污染时，一定要更换吸头，切忌侥幸心理。
4	恒温箱温度过高	注意控制恒温箱温度，尽可能让其稳定在37±0.5℃。
5	整个操作时间过长、造成反应时间不同（第一孔与最后一孔反应时间相差很悬殊）。气温高时更明显。	在尽可能短的时间内完成操作。 尽量不要堆积多块板子操作（尤其手工操作时）。

6	洗液稀释倍数过高	按照要求倍数稀释洗液
7	洗板次数不够	按试剂要求，不可任意减少洗板次数
8	洗板时浸泡时间不够	按要求操作，并适当延长浸泡时间。
9	手工洗板方式不正确	洗板时，垂直加入洗液，保证一定的冲击力；洗液要注满板孔，并保证30-60秒的浸泡时间。
10	洗板机调试不正确或者有故障 (可通过手工洗板判定)	手工洗板，并联系仪器厂家维修。
11	酶被污染	防止组分的污染。如使用容器，注意容器的清洁。
12	显色液B液被污染	
13	显色完后没有终止反应。	显色完立即终止反应。

3) 重复性不好

序号	原因	解决方法
1	加样量多少不一，操作时间长短不一。	重复同一样品时，加样量与加样时间相同；同时注意移液器的校准。加样后应该将酶标板放置在微量振荡器上，充分混合；标本保证一致、无污染；尽可能由同一名操作人员操作。 尽可能模拟相同的反应条件。
2	加入标本后没有混匀。	
3	重复实验的操作人员不同，操作习惯不同。	
4	反应时间、温度等不相同。	
5	标本不同（被混淆或者处理不同）	
6	精密度测定方法不标准	

4) 白板

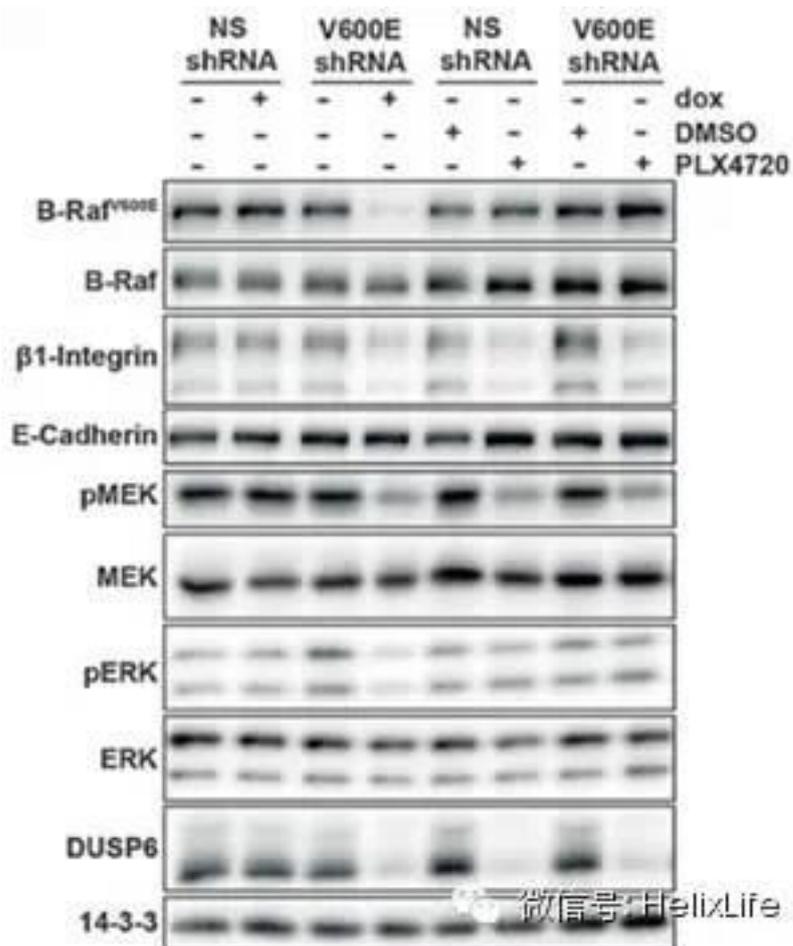
序号	原因	解决方法
1	忘记加酶	严格按照说明书操作。
2	忘记加显色液	
3	酶或A、B液被污染失效	防止组分被污染，注意保存。
4	把终止液当A液	注意液体组分加样顺序。

干货 | 又被抗体给坑了？选好抗体来几招！

作者：刀王

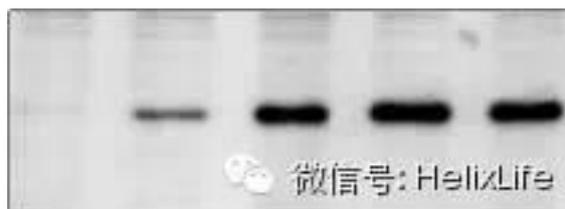
想要搞好科研，发 SCI 高分文章，寻找信号通路，研究错综复杂的分子机制必不可少！根据文献报道不难发现，Western Blot 是目前研究分子机制最简单且最权威的实验方法之一，但想要做出一张漂亮的 Western Blot 图可不简单，整个操作流程的各个环节都决定着结果是否能入导师的法眼。

如果你能憋出这么一张图，应该整个人生都能升华了…



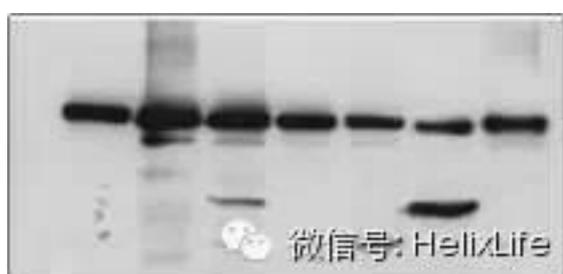
先不要着急，我们慢慢来。人家这也是长时间累积的结果。

首先你做完一次 western blot 实验，如果结果是这样的：

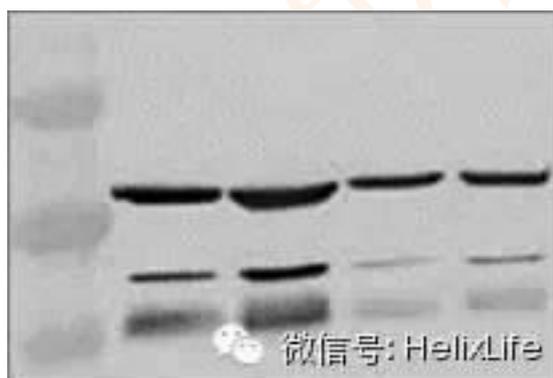


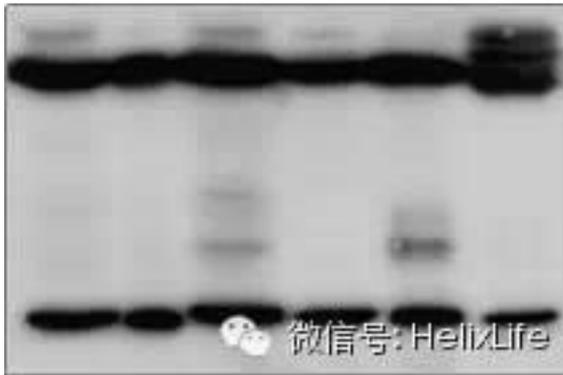
恭喜你，你的人品太好了！

如果是这样，也还是不错的，值得拥有：

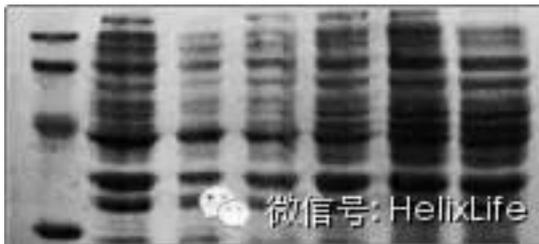


如果是这样，还是有救的，请重复一次，把杂带切掉：





如果是这样，请拨打投诉电话，这简直不忍直视啊，刀王看了都要哭了：



想要做好 WB，选择一个好用的抗体是非常关键的，如果不懂得如何选择抗体

那还怎么愉快的搞科研了.....

今天刀王就和大家分享下如何选择抗体，主要有以下三个办法，各有讲究：

1、 直接参考文献中使用的抗体

这个是最安全可靠的办法，但需要特别注意 3 点：一是文章的可靠性，要参考影响因子高于 5 分的文章；二是实验必须是同一类实验，别人做 IHC 的抗体用做 WB 是没有意义的；三是检测的是内源蛋白还是外源蛋白，一般只有内源蛋白的 Western blot 才有参考意义，但如果同时做了过表达和敲减，也是可以的。

2、 抗体搜索网站查询

这个方法必须对常见的抗体资源网站有所了解，这里就向大家推荐几个小编常用的：Biocompare、Antibodyresource、Labome、Antibodypedia，当然大家还可以问问 google。无论是用哪一个网站搜索都需要注意抗体名称，不要把其它无关的抗体当成了自己需要的，因为这些网站都有模糊搜索功能；二是很多抗体名称不是唯一的，搜索出来的抗体名称可能不一定是你输入的名称，但确实是你需要的抗体，因为大部分基因都是有别名的，需要看仔细了。

3、 直接上知名公司网站查询

这个方法对于初接触抗体的人来说是一件相当复杂的事情，抗体种类繁多，品牌众多，价格和质量又相差甚大。但无论什么品牌，进口还是国产，都会有用得不错的产品，也会有做不

出来的产品。需要谨记，最贵的不一定就是最好的，最适合你实验的才是最好的。

在这里，根据小编多年的使用心得和大家分享一些可靠而且口碑好的抗体公司，希望对大家有所帮助（以下蓝色标记的是刀王最常用的）。

优先推荐的是生产商且拥有国际品牌的中外合资跨国公司，主要优势有：

国内订货到货周期短（国外公司一般 3-4 周，国内公司最多 1 周）；

售前售后服务方便到位（这一点非常重要，国外抗体咨询投诉周期一般都非常长，国内公司一般 1 周就可以解决，还可以免费索取一些抗体小样）；

性价比高，价格是国外的 1/3 左右，而且有小包装规格，近年来这些品牌也被国内外学术界认可，所以你懂的。

Proteintec Group：总部在美国，有 10000 多种多抗和 400 多种单抗，90%以上的抗体是用重组蛋白作为抗原生产，产品数据齐全，甚至还公开了抗原序列，其品牌被国内外学术界广泛认可。

Epitomics: 以兔单抗为主, 是全球最早生产兔单抗的公司, 产品质量过硬, 数据齐全, 品牌口碑很好, 现已被 Abcam 收购。

Abgent: 有 10000 多种多抗, 几乎所有抗体都用多肽为抗原制备, 品牌也还不错, 现已被药明康德收购。

Abnova: 一家台湾公司, 抗体种类很多, 涵盖物种也广, 单抗种类多。

还有一些其他不错的国内公司 Bioworld、SAB、Genetex 等。

接着推荐一些国外知名公司, 主要有 2 类, 一类是销售型公司, 自己不生产产品或者只生产一小部份产品, 大部份产品来自于其他公司, 如 Abcam、Sigma Aldrich、Thermo Fisher、ACRIS、Merck Millipore、Novus Biologicals 等, 另一类是生产型公司, 下面简单介绍些:

Cell Signaling Technology (CST) 的抗体在信号通路相关的领域具有很大的优势, 其抗体几乎包涵了所有的信号通路, 被文献引用频率高, 深受用户好评。

BioLegend 抗体主要是面向免疫系统相关的分子以及细胞因子等，而且几乎所有抗体都可以用于流式分析。

eBioscience 抗体主要面向于免疫系统和癌症相关的分子，类似 BioLegend，大部份抗体都可以用于流式分析，而且也有多种不同类型的标记的抗体。

Dako 抗体产品种类较少，但每一个都是精华，尤其是在病理诊断市场上，更是行业的金标准，免疫组化首选。

Bethyl Laboratories 是一个相当古老的公司，抗体种类不是很多，其特色在于大部份抗体都有 IP 实验结果，质量相当不错。

R&D Systems 成立比较早，其产品尤其在细胞因子相关分子上占有极大的优势，同时拥有配套的高质量 ELISA kit，为需要进行定量研究的用户提供了极为有力的工具。

BD Biosciences 公司抗体在 CD 分子上做得极为全面，而且几乎所有的抗体都不同种类的标

记,大部份抗体都可以用于流式分析,质量相当好。

Santa Cruz Biotechnology 抗体种类则非常多,而且针对同一个蛋白有多个抗体与其对应(主要是免疫原区段不一样),几乎所有抗体都用多肽做抗原。Santa Cruz 的品牌相当悠久,业界比较认可。

刀王资料提供

文章中涉及到的抗体搜索网站的使用方法:

Biocompare: <http://www.biocompare.com/> 打开网页后在 Search Product 下的文本框内输入你需要的抗体的抗原名称, in 后面的下拉菜单中选择"Antibodies", 再 search 就行了。如果出来很多结果,可以用 application 进行限定过滤,如果出来的结果不是很多,那就可以一一查看,推荐直接访问每一条的 Supplier Page, 即可访问供货商的产品页面获得更多信息。

Antibodyresource: <http://www.antibodyresource.com> 打开网页后直接在顶端的 search box 里

输入你需要的抗体的抗原名称，回车后即可返回搜索结果，也可以用 application 以及其它选项对结果进行过滤。如果配有实验结果数据的，会出现相关的图标(但此处图标不是缩略图)。

Labome: <http://www.labome.com> 打开网页后直接在顶端的 search box 里输入你需要的抗体的抗原名称，回车后返回系统生成的一系列关键词，选有 antibody 的那一个关键词即可返回抗体搜索结果。

Antibodypeida: <http://www.antibodypedia.com> 打开网页后直接在顶端的 search box 里输入你需要的抗体的抗原名称，回车后下方即返回搜索结果，界面清晰明了，但是收录的抗体公司相对较少。

常用的抗体公司网站:

国内:

Proteintech: <http://www.NaNgLab.com/>

Abgent: <http://www.abgent.com.cn/>

Bioworld: <http://www.bioworlde.com/>

SAB: <http://www.sabbiotech.com/>

国外:

Abcam: <http://www.abcam.com/>

Sigma: <http://www.sigmaaldrich.com/>

Cell Signaling: <http://www.cellsignal.com/>

Santa Cruz: <http://www.scbt.com/>

5.3 Co-IP 和 CHIP

就是这么拽——染色质免疫共沉淀!

作者: 老谈

老谈导读

人类已经无法阻止DNA与蛋白不停的秀恩爱了，它们缠绵悱恻的状况给大家的研究带来了不少苦头。目前，不断发展的DNA和蛋白质相互作用的方法和技术已经成为研究DNA复制、重组、修复和转录的核心。今天老谈跟大家分享的是花样百出、拽酷炫的染色质免疫共沉淀方法！

染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, CHIP)原理

值得注意的是，它是目前唯一研究体内DNA与蛋白质相互作用的方法。在生理状态下，把细胞内的DNA与蛋白质交联在一起，通过超声或酶处理将染色质切为小片段后，利用抗原抗体的特异性识别反应，将与目的蛋白相结合的DNA片段沉淀下来，以富集存在组蛋白修饰或者转录调控的DNA片段，再通过多种下游检测技术（定量PCR、基因芯片、测序等）来检测此富集片段的DNA序列。

染色质免疫共沉淀技术包括3个独立的步骤，即固定、沉淀和检测。

第1步为固定，即在体内用甲醛固定DNA和蛋白质复合物，然后用化学（微球菌酶）或者机械（超声波）的手段将其随机切成一定长度的染色质小片段（200~1000bp）。

第 2 步为免疫沉淀，即利用目的蛋白质或者目的蛋白质上标签的特异性抗体，通过抗原和抗体反应形成 DNA-蛋白质-抗体复合体，然后沉淀此复合体，特异性地富集目的蛋白结合的 DNA 片段。

第 3 步为目的片段的纯化与检测，即经过热处理解交联，释放共沉淀的 DNA；再将 DNA 片段纯化后，对沉淀的 DNA 样品进行检测。

目前检测方法主要有 3 种：

染色质免疫共沉淀-qRT(ChIP-qRT)

第 1 种是比较沉淀的模版与阴性和阳性对照信号强度的相对精确的定量 PCR 方法。有关这个方法，跟其他两种相比，老谈只想送给爱学习爱动手的小伙伴四个字：**成本较低！**

染色质免疫共沉淀芯片杂交(ChIP-chip)

ChIP 和 DNA 微阵列芯片技术的结合是一种高通量分析 DNA 和蛋白质结合或者翻译后染色质/组蛋白修饰的方法。具体方法是：将经过染色质免疫共沉淀的 DNA 样品纯化后进行 PCR 扩增，然后用荧光素标记（如 Cy3）。对没有经过免疫沉淀反应富集的 Input DNA 样品也进行扩增，并且用另一种荧光素标记（如 Cy5），作为结合背景的参照。之后将这两种 DNA 杂交于包括基因组序列的微阵列芯片上，转录因子结合的靶序列用每个点相应的荧光强度来确定。

染色质免疫共沉淀测序法(ChIP-seq)

在测序深度和范围足够的情况下, ChIP-seq 可以检测到所有的组蛋白修饰所对应的 DNA 结合位点。ChIP-seq 首先通过染色质免疫共沉淀技术特异地富集目的蛋白结合的 DNA 片段, 并对其进行纯化与文库构建, 然后以 **NGS 技术** 对富集到的 DNA 片段进行高通量测序。

【NGS 技术主要是利用 DNA 新模板的合成或连接过程, 用高效平行的方式同时对 DNA 模板进行测序, 从而获得大量的测序数据, 即所谓的大规模平行测序。**】**

老谈杂谈:

尽管染色质免疫共沉淀看上去似乎很高大上, 但真正掌握其原理和方法之后其实也不难。何况它的后续检测并不都是 chip 和 seq 这些高消费的方法, 也可以采用接地气的 qRT-PCR, 小伙伴们可根据自己的情况作出选择。

吃薯片的 15 个正确姿势：染色质免疫共沉淀

作者：毛博

染色质免疫共沉淀, 又叫 Chip (Chromatin Immunoprecipitation)。Chip 又正好是英语里面薯

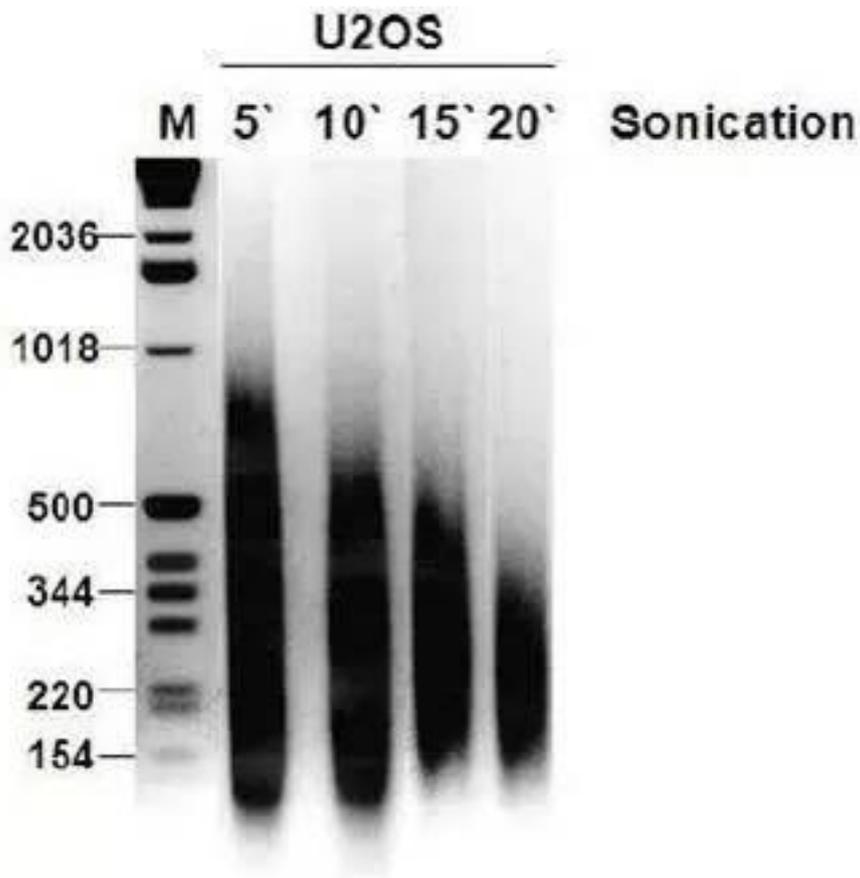
片的意思。为了有趣，就叫薯片实验吧。毛博做薯片做了几个月，时间不长，但深刻体会到了魔鬼都在细节中和细节决定成败。现在把自己认为值得注意的 15 个细节总结如下：

1、cell counting: 尽量做到准确准确再准确，否则会影响 input 结果。

2、cross link: 甲醛的终浓度是 1%，这个基本所有的 protocol 上都会强调。

3、resuspend cells with SDS:一定要选用小的 tip 头，在液面下吹打，否则很容易产生气泡，后面的 sonication 就麻烦了。

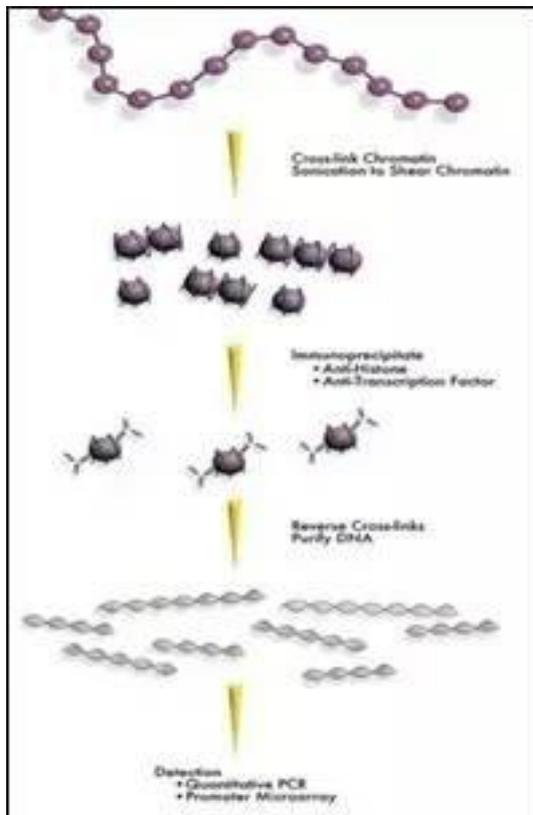
4、sonication: Chip 实验中最重要的一部分，合适的条件要自己摸索，可以一次尝试不同次数的 sonication，然后建议采用 EZ-ChIP 上推荐的方法看看 sonication 的效果如何。



5、加入 salmon sperm DNA/Protein A or G 之前要先混匀，因为 salmon sperm DNA 是很粘稠的物质，若不混匀，后面你会发现 beads 的量不一样，自然也会影响实验的结果。

6、wash 的时候前面几个步骤可以不用洗的太干净，但最后一个要尽量吸干净，必要时可用 gel loading tips 吸。

7、含 beads 的 samples 离心时，有的 protocol 上推荐是 1000rpm，45 秒，但可以根据情况调整，但要注意转速不能太快防止 beads 破碎。（当然如果采用的是 magnetic 的 beads 就不存在这个问题）



8、reverse crosslink 可以是 65°C 4 个小时，也可以 overnight。

9、reverse crosslink 后的在进行下面步骤之前建议先离心，把蒸发到离心管盖子上的部分分离下来。

10、每次行 real time PCR 之前都要把 sample 离心保证取样的准确。

11、1~10ul 的枪取 3ul 以上才比较准确，所以考虑好自己 PCR 反应体系的配置。

12、一个 Chip 实验一般需要 3~4 天的时间。但是，其中有几个步骤是可以中途停下来的。毕竟，谁也没有办法不眠不休地连续 3, 4 天一口气做完。下面是几个可以停下来喘口气的地方：

(1) 细胞收集：用含蛋白酶抑制剂的 PBS 洗涤离心，去上清的细胞收集液可置-80°C 冻存；

(2) 用 SDS 重悬细胞后可置-80°C 冻存；

(3) sonication 结束，离心后的上清置新的离心管后可-80°C 冻存；

(4) reverse cross-link 后的标本可-80°C 冻存。

冻存后就可以该干啥干啥去了。想接着做的时候，拿出来解冻就可以啦。

13、agarose beads 的 wash 过程中以及后面的 DNA 提取过程中乙醇的 wash，可以用细胞室的那种吸引器，接上 200ul 的 tip 头吸，这样会节省很多时间(每个实验室情况可能不一样)。

14、DNA 提取后建议用水溶解 DNA，因为 TE buffer 里的 EDTA 可能会影响 PCR 反应体系中的 Mg²⁺。

15、溶解 DNA 的水量可以根据 PCR 反应体系的要求适当调整。

综上所述，毛博探讨了做 Chip 实验需要注意的 15 个小细节。细节虽小，但是却很重要。需知魔鬼都是在细节中！

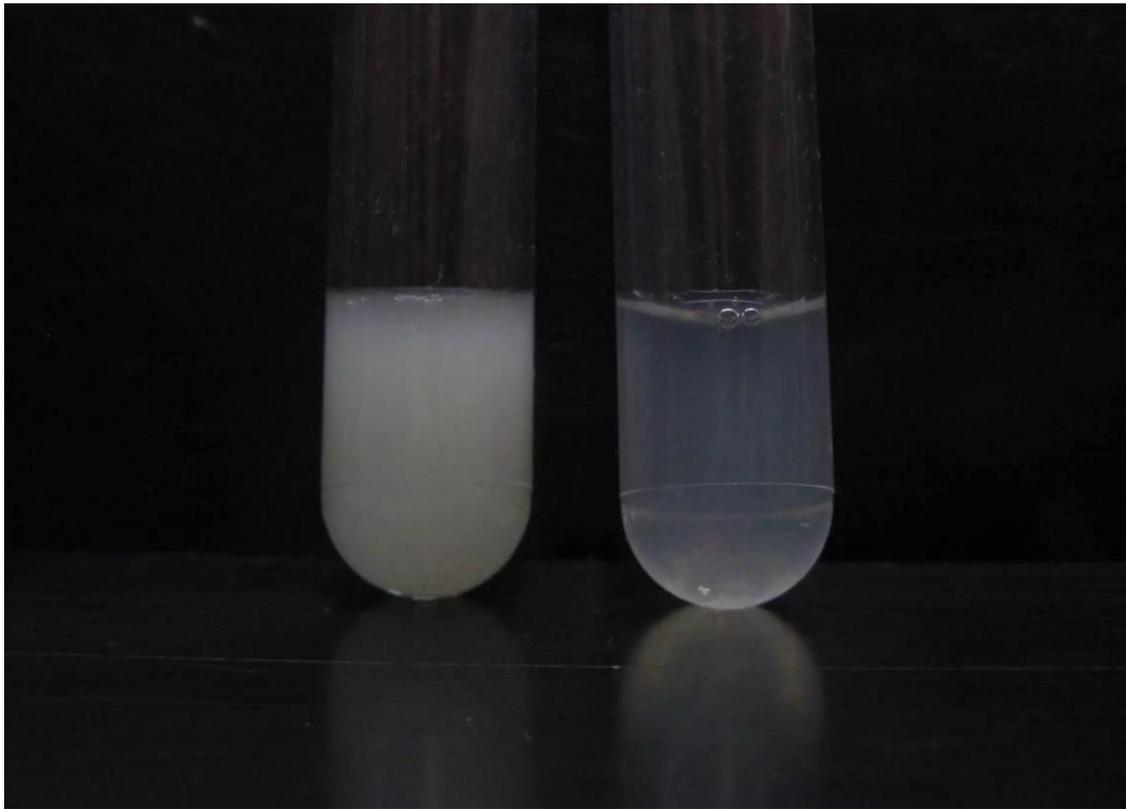
经验 | 我的 CO-IP 条带去哪儿了？

作者：毛博

可以让我们八卦到郑爽胡彦斌热恋，谢霆锋与王菲复合的消息，这都是娱记的功劳。CO-IP 很好玩，小伙伴们可以将它想象成娱乐记者，专门“揪出”有关系的蛋白。但是，就像娱记那样夜以继日地蹲点守候在那些低调的明星家里，等待高潮发生那般艰难，CO-IP 并不容易做，尤其是两个蛋白丰度低，相互作用力较弱的时候。做 CO-IP 经常会遇到没有条带的问题。那个时候，再呼天抢地，叫天叫地叫师姐，也并没有什么卵用了。这里，毛博根据自己做 CO-IP 将近 5 年的实战经验，谈谈 CO-IP 没有条带的常见原因和解决的办法，更有独家配方献上。

蛋白浓度过稀

绝大多数情况下，CO-IP 没有条带是由于蛋白浓度过稀。裂解产物的蛋白浓度越高越好。但是，有些实验室喜欢稀释裂解样品的蛋白浓度再做 CO-IP。其实，在大多数情况下要尽可能避免稀释你的细胞裂解液。尽量使细胞裂解产物的蛋白浓度可达 7-8 mg/ml 左右。这才会避免发生没有条带的情况。



没有裂解开

很多时候，由于裂解液不够强烈，蛋白质复合物没有分开，也会造成没有条带的问题。解决办法是：加温和加少量的 SDS 增加变性能力。这里再介绍一个小窍门：最初几遍的漂洗 buffer 要和 IP 时的盐浓度相同。纯化蛋白的时候，如果用低盐裂解细胞，高盐漂洗去杂质，蛋白丢失较多。毛博再奉献一个自己在米国时候用的独门配方：20 mM Tris/HCl, pH7.6, 100 mM NaCl, 20 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5% NP-40 and protease inhibitors (0.5M PMSF)。包用包好。

量不合适

很多时候，CO-IP 没有条带，是由于蛋白量，珠子，抗体的量需要调整。根据毛博自己的经验，一般 100ug 蛋白，3ug 抗体，30ug 珠子。如果不行，250ug 蛋白，5ug 抗体，或者 500ug 蛋白，7ug 抗体。

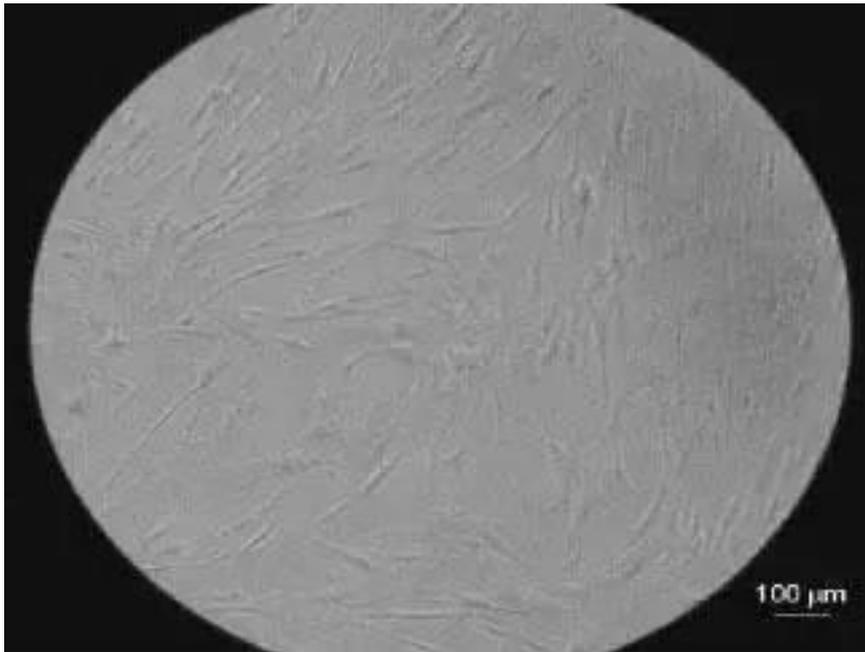
抗体太坑爹

抗体是 CO-IP 成败的致命因素之一！必须是 IP 级别的抗体。说句不好听的话，不要用国产抗体和 Santa Cruz 的抗体。这些抗体在做 CO-IP 的实验室里面已经臭名远扬了。坑人无数。大家就不要再重蹈覆辙了。

单抗与多抗的选择也需要仔细考虑。两种抗体各有利弊。单抗特异性强，背景低。但是单抗有一个致命的弱点，就是识别位点单一，而在 CO-IP 过程中，该位点很有可能与其它蛋白或核酸结合而被封闭，导致单抗不能识别靶蛋白而没有条带。所以，如果没有十足把握，单抗的识别位点远离靶蛋白与核酸结合的区域，还是选择多抗比较稳妥一些。至少不会出现没有条带的问题。

细胞数量太少

很多时候，CO-IP 没有信号是由于细胞数量太少。以毛博自己的经验，一般是 145 mm 的培养皿，至少要长到 50%以上。如果低于这个数目，CO-IP 就很有可能没有信号。除非药品和试剂非常非常昂贵，否则就不要节约这点细胞了。一旦 CO-IP 实验失败，浪费的时间可是更宝贵的。



综上所述，CO-IP 是比较难做的一个实验。很多时候，能否成功取决于抗体和两个蛋白的结合常数，和 protocol 和实验操作本身的关系不大。以上，毛博介绍了一些自己的经验体会和小技巧小窍门，希望对大家有所帮助。

“狼牙棒” ChIP 的那些酷炫新玩法

作者：子非鱼

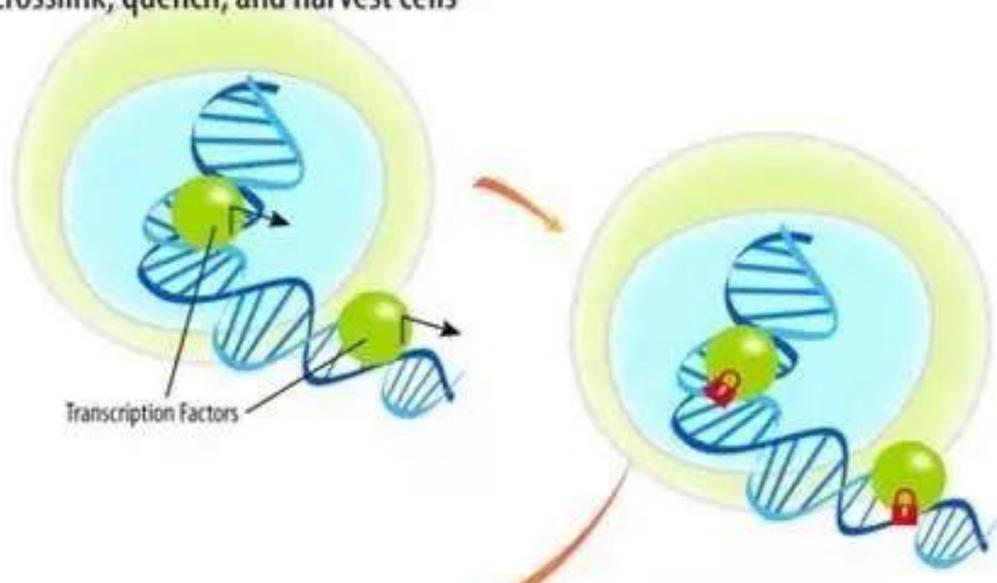
DNA 与蛋白质（尤其是转录因子 TF）这对情侣在细胞核内总是腻腻歪歪，并时刻不停的秀恩爱，让人们猝不及防被塞了一把冷冷的狗粮。自然，其缠绵悱恻的状态也成功地引起科研屌丝中黄金单身狗的注意。俗话说，秀恩爱，死得快，半死不活用脚踹。因而，科研狗们以退为进，放出大招——染色质免疫共沉淀（ChIP）活活拆散了这对 CP。

你成功引起我的注意

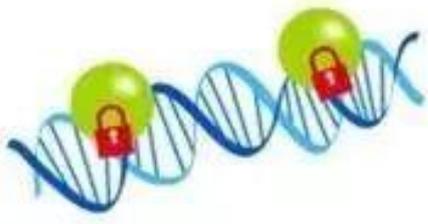


至于这棒打鸳鸯的狼牙大棒是如何锻造的,简单说来就是一部用“美人计”拆CP的“潜伏史”:先通过固定剂(甲醛/EGS/)将这对情侣套牢,再趁其麻痹大意之际破碎细胞,将其彻底曝光。谁成想超声波的花式吊打不仅没有拆散这对情侣(DNA碎成小片段),反倒显得他们情比金坚。最后只能使出杀手锏:让特定抗体以及偶联蛋白A/G的琼脂糖施展迷人的魅力诱惑其蛋白,来捕获“痴心不改”的DNA。随着蛋白质的潇洒离去(加热或酶解),“心如死灰”的DNA看破红尘后,洗心革面地投身到PCR、DNA芯片或测序等革命建设事业之中。

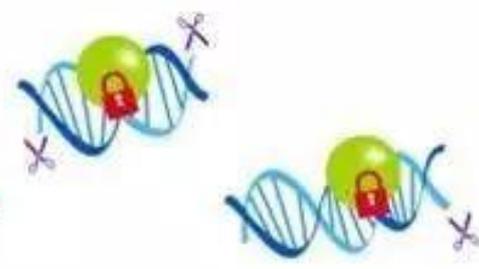
1
Crosslink, quench, and harvest cells



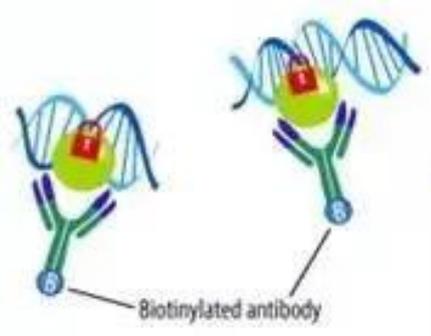
2
Lyse cells: isolate chromatin



3
Sonicate: shear chromatin



4
Immunoprecipitate target protein/DNA complexes



5
Capture immunocomplexes with streptavidin-conjugated magnetic or agarose beads



即便如此，科研单身狗们的心中仍不解恨，怀着一颗势必要拆散天下所有蛋白质-DNA 情侣的心，玩命得对 ChIP 技术进行更新换代。因而，时至今日“狼牙棒”ChIP 倒也具备了一些“酷炫拽”的新技能。

1: 处理低量细胞的 ChIP 崭露头角

传统的 ChIP 往往需要使用大量的细胞（一百万甚至更多），但实际研究中的样本大多比较特殊，如肿瘤、组织活检样本、FFPE 细胞（甲醛固定石蜡包埋）等，而在这种情况下想获得百万以上的细胞并不容易。

因而，研究者们不断优化自己的试剂盒，以便处理更小的样品量，并获得更好的结果。他们采取的策略大多是优化缓冲液，或者用磁珠取代多孔的琼脂糖。比如 Active Motif 公司的 ChIP-IT® High Sensitivity kit 可以处理低量细胞（1000 个细胞）或低丰度蛋白（50,000 个细胞），尤其是一些稀有转录因子。同时 Kapa Biosystems 公司的 KAPA Hyper Prep Kit 能利用 ChIP 生成的低量 DNA（100 pg）构建测序文库。而 EMD Millipore 的 Magna ChIP™ HiSens 高灵敏度试剂盒，研究转录因子只需要十万细胞，研究组蛋白修饰只需要一万细胞

2: 减少样本损失，用固态 CHIP

传统 ChIP 通过偶联蛋白 A/G 的琼脂糖或磁性微珠来沉淀抗体-染色质复合物。Porvair Sciences 公司的 Chromatrap® 采用蛋白 A/G 偶联的 BioVyon 过滤装置，对抗体复合物进行捕获，整个过程无需磁珠。这种固态 ChIP 需要较少的起始样本，且因省去了传统液体处理过程可显著减少洗脱和移液步骤中的样本损失；同时也会大大缩短了 ChIP 所需的时间（从开始到结束

只需要五个小时)。另外，固态 ChIP 不仅使产量提高 25 倍还可以兼容自动化工作流程。

3: 鉴定目标蛋白，用反向 CHIP

ChIP 可以用来鉴定与指定蛋白相互作用的基因组区域。但是如果我们想要知道某个基因组片段的相关蛋白该怎么办呢？2013 年大阪大学的 Hodaka Fujii 研发了一种新方法，并将其命名为 enChIP (engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation)。

enChIP 使用催化失活的 CRISPR/Cas9 系统和自定义的引导 RNA，来特异性捕获指定基因组片段上的大分子 (包括蛋白、RNA 或 DNA)。enChIP 抗体靶标的不是特定蛋白，而是 Cas9 附带的多肽标签，因而可鉴定出与靶向 DNA 相关的任何蛋白、RNA 或其他 DNA。

传统 ChIP 是靶标特定蛋白，鉴定它所在的基因组位点，但 enChIP 则反其道而行之，靶标基因组区域然后鉴定谁结合在那里，以此方法研发的试剂盒可以检测染色质成环或者在 CRISPR/Cas9 研究中分析引导 RNA 的脱靶情况。

4: 验证 CHIP 抗体有据可依了

在 CHIP 实验中，高质量的抗体是实验成功的关键所在。而使用已经验证的抗体无疑是一个不错的选择，比如 Rockland 公司提供的表观遗传学产品 Epi-Plus™ 就是一系列已验证的抗体。另外，供应商一般会标明抗体是否做过 CHIP 验证，如 Abcam 公司提供有大约六百种 CHIP 验证抗体，Novus Biologicals 公司拥有大约四百种，而 Chromatrap 公司最近也发布了自己的第一批抗体（九种）。

尽管很多公司都在不遗余力地测试自己的抗体，但是自己亲自验证一下抗体是比较明智的。因为 ENCODE 和 modENCODE 项目在验证检测转录因子和组蛋白修饰抗体时，发现抗体中只有“四分之一或五分之一”适用于 CHIP，因而该项目负责人建议新抗体买来之后应该用供应商推荐的步骤和对照进行测试。

参考文献：1. Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR [PMID:23942116]

2. CHIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia [PMID: 22955991]

干货|三天征服高冷女神 Chip 记

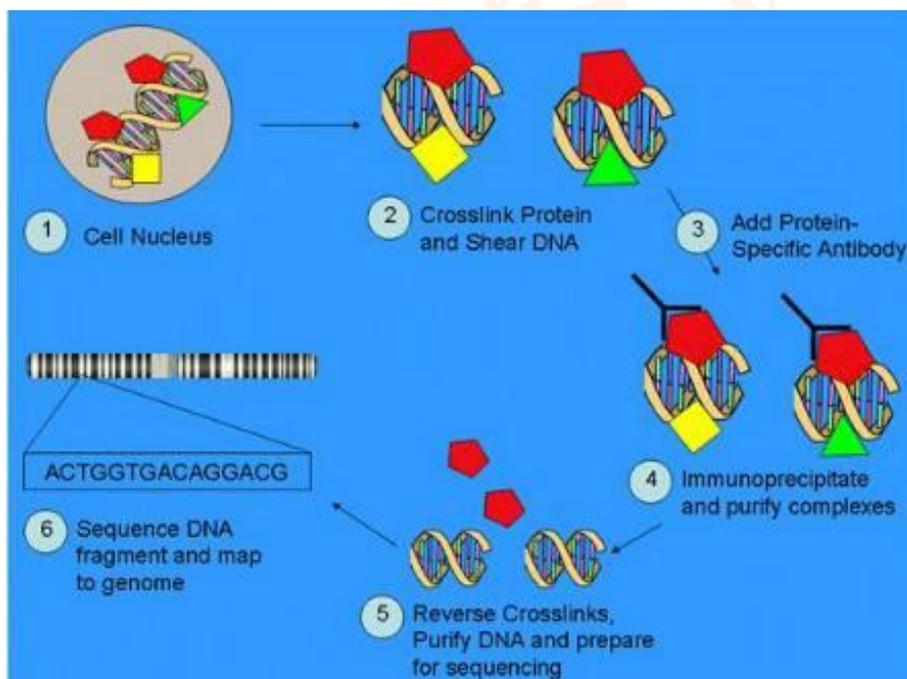
作者：子非鱼

在科研界，CHIP 无疑是高冷的女神，实验汪们在追逐的过程总是分分钟被虐的体无完肤，糟心的实验结果更是让实验汪们分分钟想去“狗带”。征服 CHIP 的路上，有多虐心就有多少要注意的地方。庆幸的是，曾得到女神青睐的前辈们积累了不少经验。好的经验要分享，小鱼

特地总结了各位高手们做 CHIP 的经验，在此奉上，希望能助大家一臂之力。

染色质免疫共沉淀（chromatin immunoprecipitation, CHIP）是目前研究体内 DNA 与蛋白质相互作用的唯一方法，能够比较真实的反应细胞内转录因子 TF 与启动子 Promoter 的结合情况。

其基本原理：在活细胞状态下，把胞内 DNA 与蛋白质交联成复合物，通过超声或酶处理将染色质随机切断为一定长度范围内的小片段，然后利用抗原抗体特异性识别反应，将与目的蛋白结合的 DNA 沉淀下来，特异性富集目的蛋白结合 DNA 片段，进而对目的片断进行纯化与检测（如 qPCR、基因芯片、测序等），从而获得蛋白质与 DNA 相互作用的信息。



CHIP 主要分为两种：交联染色质免疫沉淀（Cross-linkedChip, XChip）和自然染色质免疫沉淀（Native Chromatin Immunoprecipitation, NChip）。两者的区别在于 XCHIP 需要甲醛固定，适

合于结合力较弱的 DNA-蛋白质相互作用的研究；而 NCHIP 则不需要甲醛固定，不需要交联反应，主要用于组蛋白修饰（如组蛋白 H3 和 H4，它们本身与 DNA 结合非常紧密）、核小体定位的研究。在 NCHIP 中，DNA 结合蛋白与 DNA 之间保持一种自然状态，需要采用微球菌核酸酶对染色质进行消化。

一般而言，我们所提的染色质免疫共沉淀指的是 XCHIP。那么长话短说，小鱼就将 XCHIP 三天实验中的常见流程及注意事项分享给大家。

第一天

细胞的甲醛交联

- 1) 收集细胞，加入甲醛(终浓度为 1%)，37°C 孵育 10min 后，加入甘氨酸(终浓度为 0.125M)，混匀后在室温下放置 5min 即可。
- 2) 离心弃上清，收细胞于 15ml 离心管中，用 3ml 预冷的 1×PBS 洗两次后，预冷后 2000rpm 5min 收集细胞。
- 3) 弃上清，按照细胞量，加入 SDS Lysis Buffer，使细胞浓度为 1×10^6 个/100 ul。再加入蛋白酶抑制剂复合物。

Tip:

- 1、细胞生长状态要好，因其生长状态直接影响细胞内部的基因表达调控网络，可能会影响你所研究的 TF 与 Promoter 的结合。因而，一般细胞长到 75%-80% 比较好。（回复“[细胞](#)”，可查看细胞培养的文章）

2、交联程度会影响到超声破碎的效果，交联程度越高，超声破碎就越不易把基因组打碎成小片段，背景色加深；交联不充分，则只有一部分靶蛋白与 Promoter 结合，富集得到的 Promoter 的量不高，产生实验假阴性。建议样品交联的时间为 2-30min。

3、用 SDS 重悬细胞时，要选用小的 tip 头，在液面下吹打，否则很容易产生气泡，会对后续超声破碎带来不便。

超声破碎

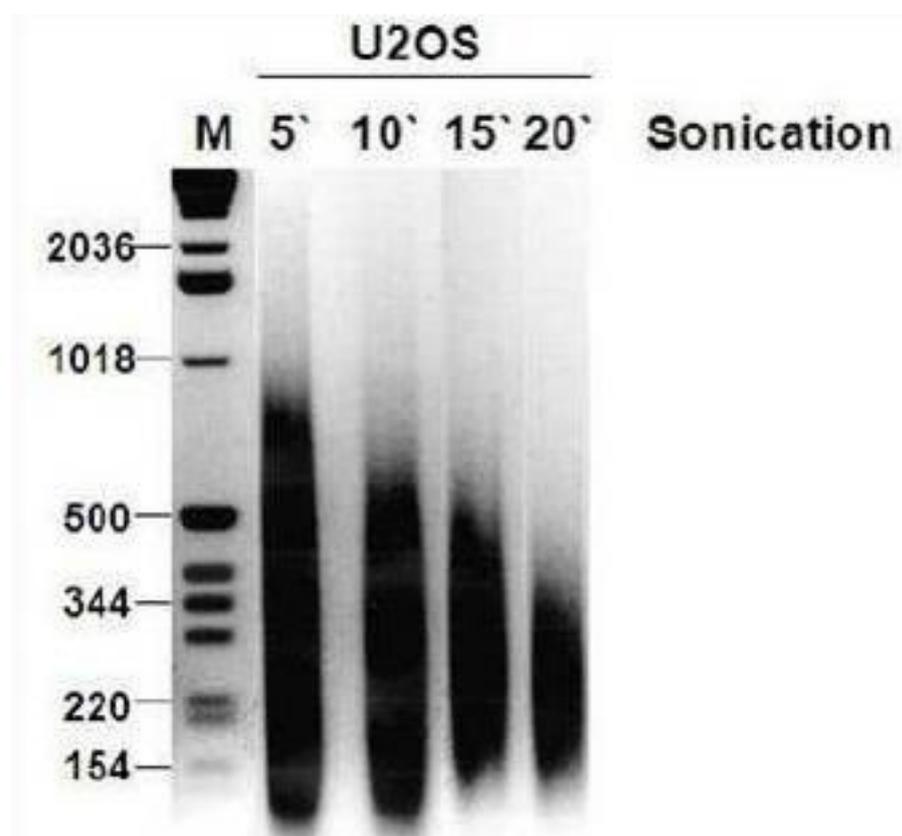
1) 冰上孵育 10min 后，利用超声波或微球菌酶将染色质随机切为 200~1000bp 的小片段。14000rpm 离心 10min (4°C)，转移上清于 1.5ml EP 管中。

2) 取出 100ul 超声破碎产物，加入 4ul 5M NaCl (终浓度为 0.2M)，65°C处理 4h 进行解交联，电泳检测超声破碎的效果。

3) 另取出 100ul 超声破碎产物，加入 900ul CHIP Dilution Buffer 和 20 ul 的 50× PIC，再加入 60ul Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA，去除非特异性。4°C颠转混匀 1h 后，1000rpm 离心 3min，收集上清。

Tip:

1、不同细胞系需不同的超声时间才能达到最优效果，则可通过时间梯度的超声来选择最优超声条件，如下图所示：



2、每份超声样品取 50ul，标记为 input，用于定量 DNA 浓度（稀释 200 倍，测 OD260）和作为 PCR 空白对照。同时超声后样品应立刻存于-70°C中，避免多次反复冻融。

3、加入 Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA 之前一定要混匀，因为 Salmon sperm DNA 是很粘稠的物质，若不混匀，后面 beads 量不一样，对实验结果产生影响。

第二天

免疫共沉淀

- 1) 一管加入 1ul 抗体, 另一管中则不加抗体作为对照。4°C 颠转过夜。
- 2) 孵育过夜后, 每管加入 60ul Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA, 沉淀抗体/抗原复合物, 4°C 颠转 1h。1000rpm 4°C 3min 收集沉淀, 弃上清。

Tip:

- 1、每个样品都采用 25ug 的 DNA 量, 同时抗体的量为 1-10ug 的抗体/25ulDNA。
- 2、单抗与多抗的选择也需慎重考虑。单抗特异性强, 背景低, 但是识别位点单一, 在 CHIP 甲醛交联过程中, 很有可能该位点被其他蛋白或核酸结合而被封闭, 导致单抗不能识别靶蛋白。多抗虽然没有此问题, 但是特异性差, 背景可能会偏高。一般建议选择多抗; 选择单抗时要注意其识别位点需远离靶蛋白与核酸结合的区域。
- 3、下图显示了蛋白 A 和蛋白 G 珠子对于不同免疫球蛋白同型的亲和力

Species	Immunoglobulin Isotype	Protein A	Protein G
Human	IgG1	+++	+++
	IgG2	+++	+++
	IgG3	-	+++
	IgG4	+++	+++
	IgM	Use anti Human IgM	
	IgE	-	+
	IgA	-	+
Mouse	IgG1	+	+++
	IgG2a	+++	+++
	IgG2b	++	++
	IgG3	+	+
	IgM	Use anti Mouse IgM	
Rat	IgG1	-	+
	IgG2a	-	+++
	IgG2b	-	++
	IgG2c	+	++
Chicken	All isotypes	-	++
Cow	All isotypes	++	+++
Goat	All isotypes	-	++
Guinea Pig	All isotypes	+++	++
Hamster	All isotypes	+	++
Horse	All isotypes	++	+++
Pig	All isotypes	+	++
Rabbit	All isotypes	+++	++
Sheep	All isotypes	-	++

纯化 DNA 片段

1) 依次用下列溶液清洗沉淀复合物。清洗过程：加入溶液 1ml，在 4°C 旋转 5min，1000rpm 3min，去除上清。

洗涤液：

低盐免疫复合物洗脱液，洗一次

高盐免疫复合物洗脱液，洗一次

氯化锂免疫复合物洗脱液，洗一次

TE Buffer，洗两次。

2) 清洗完毕后，进行洗脱。每管加入 250ul 洗脱液，室温下颠转 15min，1000rpm 3min，收集上清液。最终的洗脱液为每管 500ul。

洗脱液：

100ul 10% SDS，100ul 1M NaHCO₃，800ul ddH₂O，共 1ml。

3) 解交联：每管加入 20ul 5M NaCl（终浓度为 0.2M），混匀后，65℃解交联过夜。

Tip:

1、洗涤时，前几个步骤可以不用洗的太干净，但最后一个要尽量吸取干净，必要时可用 gel loading tips 吸取上清液。

2、含 beads 的样品离心时，转速不能太快，防止 beads 破碎，但如果采用的是磁性的 beads 就不存在这个问题。

3、解交联时，建议在离心前，先把蒸发到离心管盖子上的部分分离下来。

第三天

DNA 样品的回收

- 1) 每管加入 1ul RNaseA (MBI), 37°C 孵育 1h。
- 2) 每管加入 10ul 0.5M EDTA, 20ul 1M Tris.HCl (pH 6.5), 2ul 10mg/ml 蛋白酶 K。45°C 处理 2h。
- 3) DNA 片段回收—OMEGA 胶回收试剂盒, 最终的样品溶于 100ul ddH₂O

Tip:

1、样品中 SDS 含量较高时, 普通 PCR 回收试剂盒进行 DNA 片段回收时, 在过柱前, 可在样品中加入一定量的异丙醇, 这样可有效消除 SDS 沉淀。

2、一个 CHIP 一般需要 3~4 天时间, 其中有几个步骤是可以停下来的:

(1) 细胞收集: 用含蛋白酶抑制剂的 PBS 洗涤离心, 去上清的细胞收集液可置-80°C 冻存;

(2) 用 SDS 重悬细胞后可置-80°C 冻存;

(3) 超声破碎结束时, 离心后的上清置新的离心管后可置-80°C 冻存;

(4) 解交联后的标本可置-80℃冻存

DNA 样品分析

如果目的蛋白的靶序列已知，或怀疑某一序列是目的蛋白靶序列，可选用定量或者半定量 PCR 方法。

如果目的蛋白的靶序列未知或要研究目的蛋白基因组分布情况，找出转录因子结合位点，则可采用 CHIP 克隆测序 (CHIP-seq)、CHIP-chip 等方法。

PCR 分析

目前检测方法主要有 3 种：

CHIP-qPCR：用于比较沉淀的模板与阴性和阳性对照信号强度的相对精确的定量 PCR 方法。

成本较低。此外，还有一些由 CHIP 衍生出来的方法，如 RIP（即用 CHIP 的方法研究细胞内蛋白与 RNA 相互结合，具体方法和 CHIP 差不多，只是实验过程中要注意防止 RNase，最后分析时需先将 RNA 逆转录为 cDNA）。（回复“qPCR”，可查阅 qPCR 相关文章）

Tip :

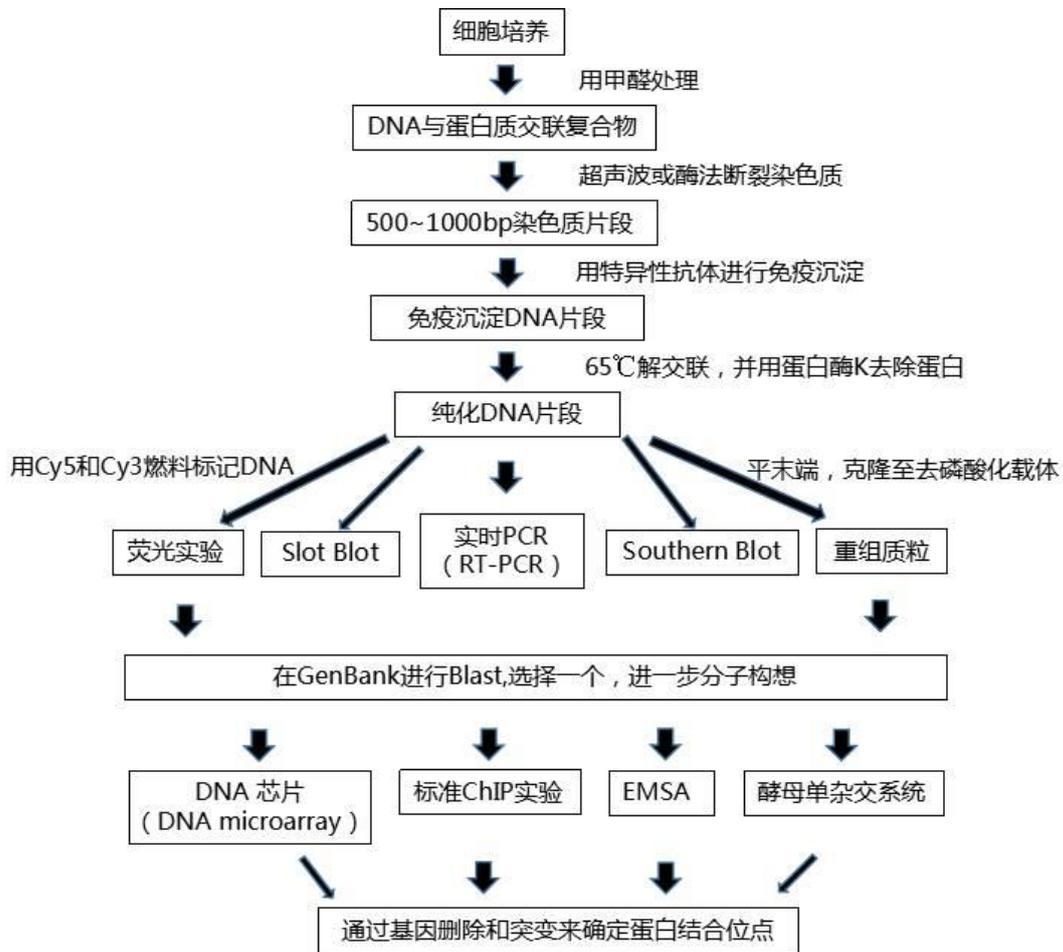
- 1、1~10ul 的移液枪取 3ul 以上才比较准确，要考虑好自己 PCR 反应体系的配置。
- 2、每次 qPCR 之前都要把 sample 离心保证取样的准确。

CHIP-chip: Chip 和 DNA 微阵列芯片技术结合是种高通量分析 DNA 和蛋白质结合或翻译后染色质和组蛋白修饰的方法。即将经过染色质免疫共沉淀的 DNA 样品纯化后进行 PCR 扩增, 然后用荧光素标记 (如 Cy3)。对没有经过免疫沉淀反应富集的 Input DNA 样品也进行扩增, 并且用另一种荧光素标记 (如 Cy5), 作为结合背景的参照。之后将这两种 DNA 杂交于包括基因组序列的微阵列芯片上, 转录因子结合的靶序列用每个点相应的荧光强度来确定。

CHIP-seq: 在测序深度和范围足够的情况下,CHIP-seq 可以检测到所有的组蛋白修饰所对应的 DNA 结合位点。ChIP-seq 首先通过染色质免疫共沉淀技术特异地富集目的蛋白结合的 DNA 片段,并对其进行纯化与文库构建,然后以 NGS 技术对富集到的 DNA 片段进行高通量测序。

(NGS 技术主要是利用 DNA 新模板的合成或连接过程, 用高效平行的方式同时对 DNA 模板进行测序, 从而获得大量的测序数据, 即所谓的大规模平行测序。)

综上, 小鱼用一张图简要列出 CHIP 大致流程。



图说 | 染色质免疫共沉淀 (ChIP), 生物界也有琅琊情

作者：子非鱼

《琅琊榜》中，有天真活泼的飞流，情深义重的蒙挚，那帮忠肝义胆的兄弟卫铮聂铎，但最

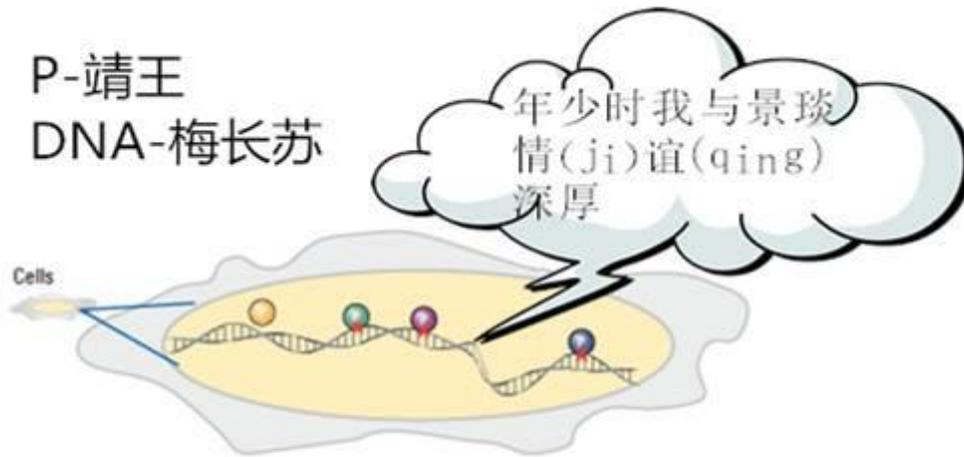
让小鱼动容的是耿直重情重义的靖王和除了病重其他方面堪称完美的梅长苏两人之间的兄弟情谊。“水牛”景琰，十几年如一日心心念念并且信任着被定罪叛逆的挚友，他以低沉的声音吐出一句“我想小殊了”实在让你动容。而强弩之末依旧咬牙支撑的梅长苏，眉宇之间皆是隐忍，却在昏迷时喊出：“景琰，别怕”，很难想象如果两人的兄弟情秀在朋友圈会多虐狗。

但小鱼理想中的琅琊榜，应该是像染色质免疫共沉淀那样的：



年少时他们情同手足，情深谊厚（DNA 在细胞内就与蛋白结合）：

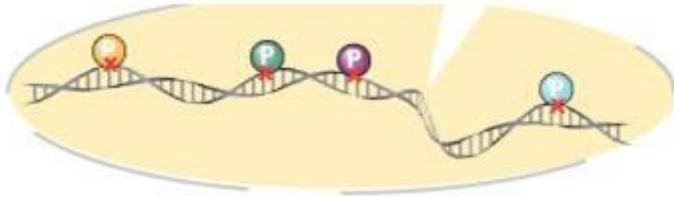
P-靖王
DNA-梅长苏



Step1: 交联，即在体内用甲醛固定本身就在细胞内结合的DNA和蛋白质复合物。

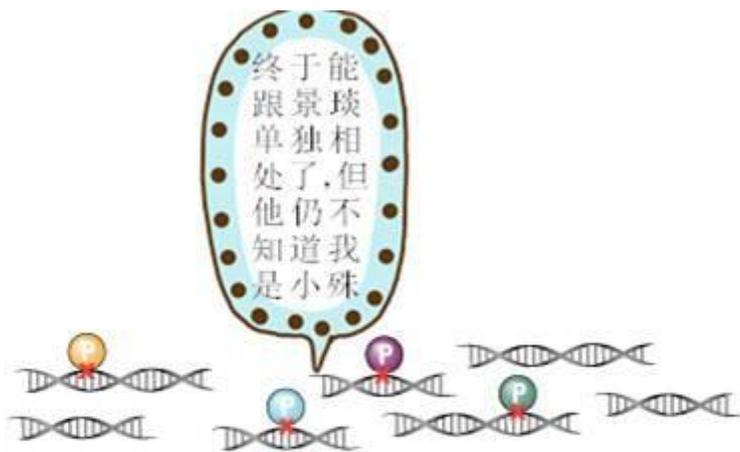
因官宦玩弄政权，血流成河，劫后余生，再见故人，剖心明志（细胞裂解，结合的DNA和蛋白质进入溶液，所处的环境变了）：

劫后余生,又见小景琰,他不认得我,但我要扶持小景琰上位!



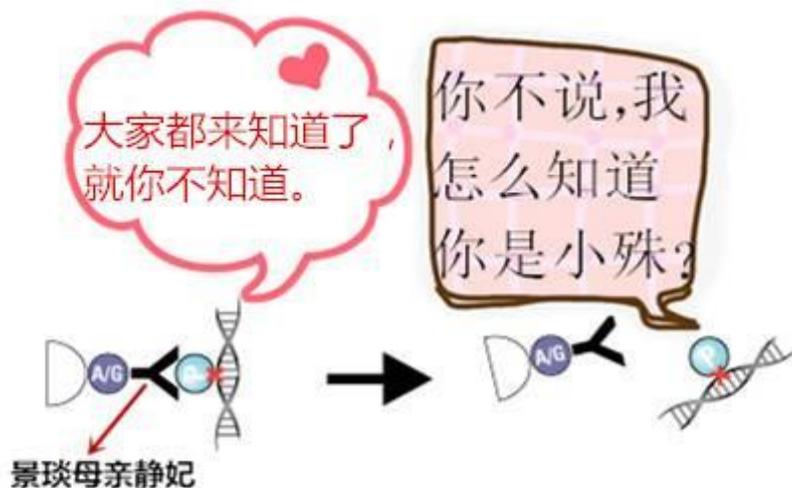
Step2:细胞裂解,从细胞中提取出交联的蛋白-DNA,让它们进入溶液。

任世事变迁、沧海桑田,你我独处秘密通道,共商大计(染色质剪切,DNA和蛋白质还是紧密结合):



Step3:染色质制备 (剪切/消化), 基因组需被酶解消化成更小的片段

世界上最遥远的距离，不是生与死，而是我在你面前，你却不知道我是林殊（免疫共沉淀，Beads 和抗体拉蛋白“送助攻”）：



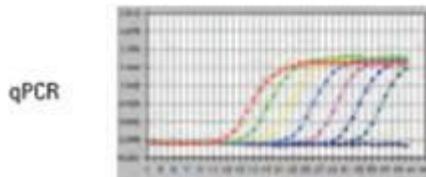
Step4:使用抗体来进行免疫沉淀, 选择性富集蛋白-DNA复合物, 并去除其他无关的细胞组分

江湖至尊地位的梅长苏，却是一个病弱青年、弱不禁风，还没来得及告诉靖王，就走了…（解交联，DNA与蛋白质复合物解离）：



靖王确定梅长苏身份，但小殊已…（DNA定量）：

P:我知道你是小殊了，咦，人呢？



Step6:DNA定量

你想做的 **chip** 启动子是怎么找到的？

作者：凌风

你知道启动子在哪里么？

LncRNA 的研究炙手可热哇，表观遗传学机制方面你不得懂一点？

不管是高大上的 **chip** 还是荧光素酶报告基因，都少不了启动子的序列，那么问题来了，启动子区的序列你会查么？



图文解析来啦，这是小编最常用的方法啦，接地气，用神器----ucsc!

1.打开 ucsc，小编一般都用 hg19 版本，在下图中搜索明星分子 BCL-2（why? 因为它出名哇!!）。

UCSC Genome Browser Gateway

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Help About Us

Browse/Select Species

POPULAR SPECIES: Human, Mouse, Rat, Fruitfly, Worm, Yeast

REPRESENTED SPECIES: Human, Chimp, Bonobo, Gorilla, Orangutan, Gibbon, Green monkey, Crab-eating macaque, Rhesus, Baboon (anubis), Baboon (hamadryas), Proboscis monkey

Find Position

Human Assembly
Feb. 2009 (GRCh37/hg19)

BCL2
Current position: chr18:60,790,579-60,986,613

Human Genome Browser - hg19 assembly

The February 2009 human reference sequence (GRCh37) was produced by the Genome Reference Consortium. For more information about this assembly, see GRCh37 in the NCBI Assembly database.

Sample position queries

A genome position can be specified by the accession number of a sequenced genomic clone, an mRNA or EST or STS marker, a chromosomal coordinate range, or keywords from the GenBank description of an mRNA. The following list shows examples of valid position queries for the human genome. See the User's Guide for more information.

Request: Genome Browser Response:

2. 接下来你就看到这一堆堆线条，不对啊，bcl-2 这个基因怎么显示的这么勉强，那就 zoom out 吧！zoom out 是缩小，这怎么记住呢？你想啊，你站的远看到的就多了，是不是就能看到它的全貌了？是不是就把眼前的缩小了呢？

UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly

move <<< << < > >> >>> zoom in 1.5x 3x 10x basic zoom out 1.5x 3x 10x 100x

chr18:60,790,579-60,986,613 196,035 bp. enter position, gene symbol

Scale: 50 kb hg19

UCSC Genes (RefSeq, GenBank, CDS, RFAs, tRNAs & Comparative Genomics)

RefSeq Genes

Basic Gene Annotation Set from GENCODE Version 19

Ensembl Genes

Human mRNAs from GenBank

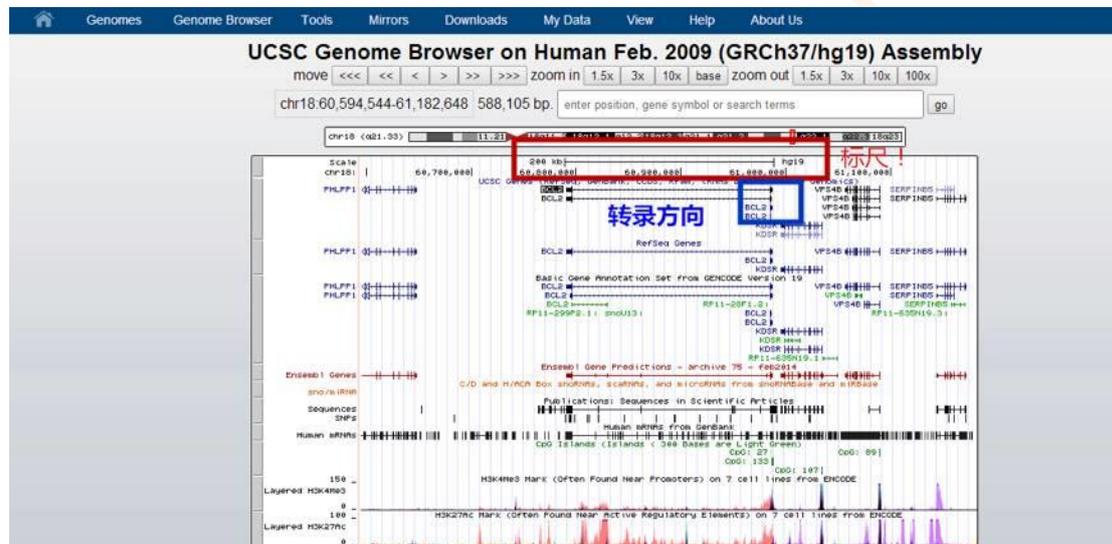
CpG Islands (Islands < 300 Bases are Light Green)

Layered H3K4Me3

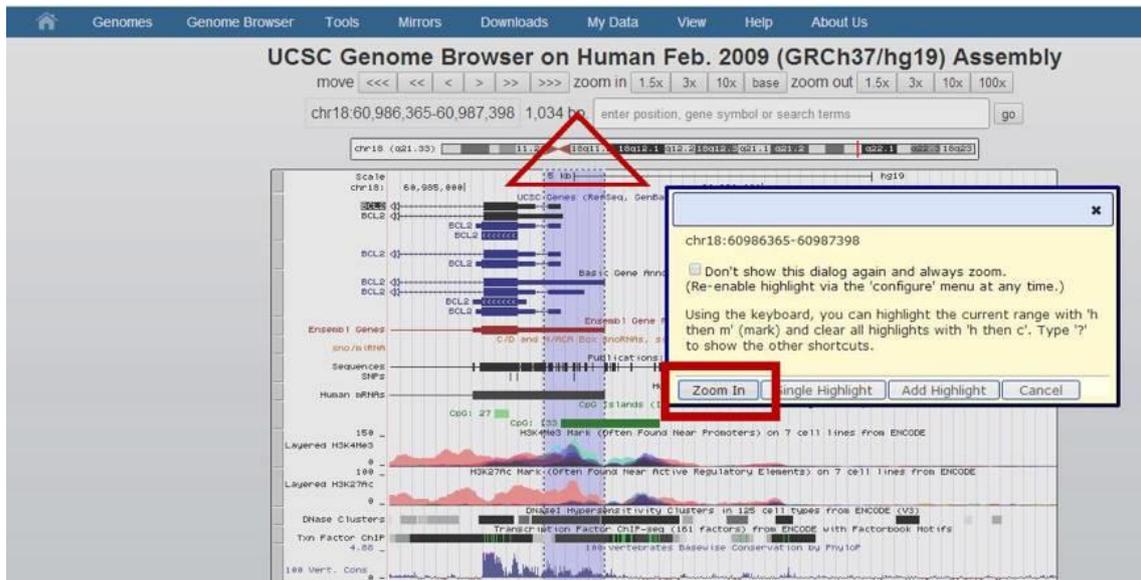
Layered H3K27Ac

DNaseI Hypersensitivity Clusters in 126 cell types from ENCODE (V3)

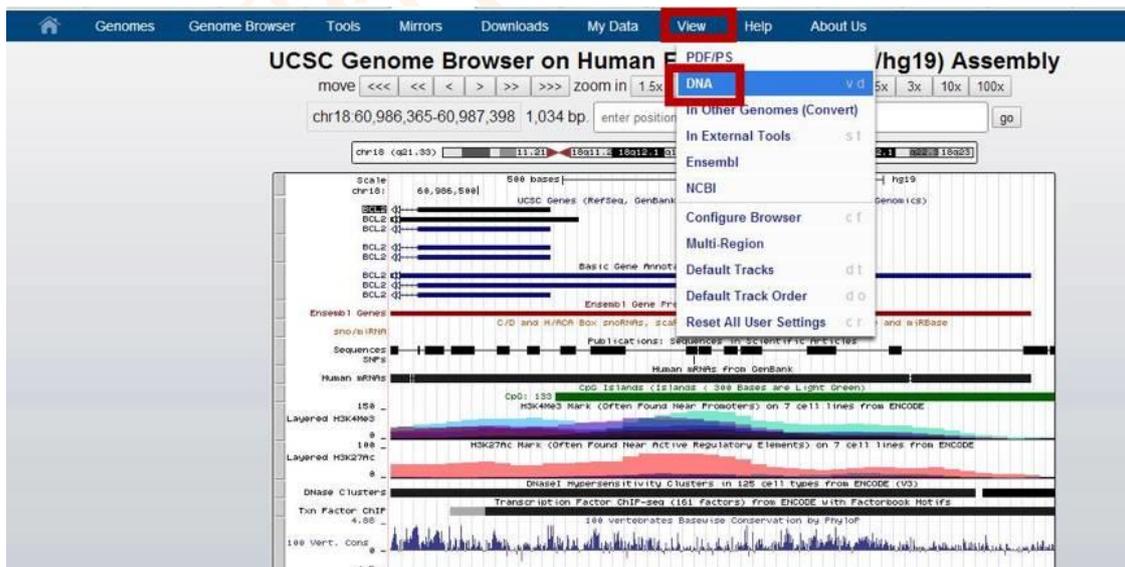
3.站得远，看的清了，你就可以看到这个基因的全貌了，一般我们认为启动子很有可能是在 TSS 前 2kb，或者 TSS 后 1kb 位置，所以我们就先看一下基因的转录方向，从起始不为前后各拉一段（敲黑板，划重点！）。拉多长，你可看到那个标尺？根据标尺大小适当的拉~



诺，就是像这样，大致拖个范围出来，就会弹出下面的框框，点 zoom in 放大。



5.大致看一下，这个范围拉的还算合理，那我们就要取序列了，点“view”，再点“dna”，翻页再点“getDNA”就可以得到了！



Get DNA in Window (hg19/Human)

Get DNA for

Position

Note: This page retrieves genomic DNA for a single region. If you would prefer to get DNA for many items in a particular track, or for a set of coordinates (introns, exons, UTRs, etc.), try using the [Table Browser](#) with the "sequence" output format.

Sequence Retrieval Region Options:

Add extra bases upstream (5') and extra downstream (3')

Note: if a feature is close to the beginning or end of a chromosome and upstream/downstream bases are added, they may be truncated.

Sequence Formatting Options:

- All upper case.
- All lower case.
- Mask repeats: to lower case to N
- Reverse complement (get '-' strand sequence)

get DNA extended case/color options

Note: The "Mask repeats" option applies only to "get DNA", not to "extended case/color options".

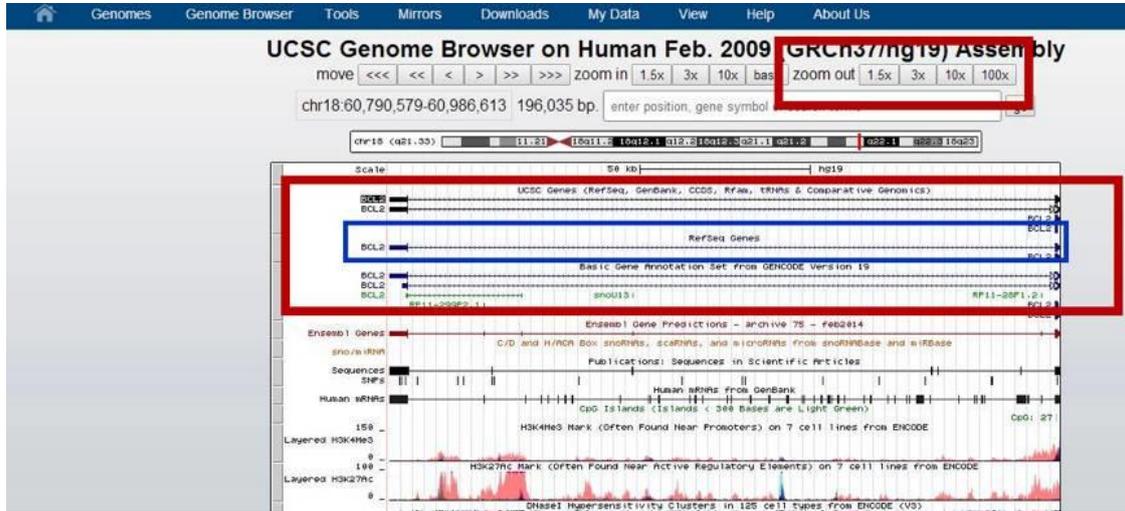
```

>hg19_dna range=chr18:60984819-61001610 5'pad=0 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=
GGAGTCTATTCTTCTAATCGGGTTGTTCTCCAATTTTAGTGTACAACGGG
CTTGTTTCAGGGGAGCTTGTTTGGGATGCAGACTGTCAAGACCCAACCTG
GTATCTGGTTCATAAGCAGTCCCTGAAAACCTCCCTCCGGTTCCAACAAGC
TGCTCAAGCCAGGAAACGGTGGTCTCGGGACTCCTGGACCTTCAGCTTG
AGAAACACTGAAGGGGTACCATTTACCACCACATCCTACTGGATTACAAA
CGCTAGATCTTTGGATCTCCACGACTAGCAAGCAAGTTAAAGACTTTTAG
ATGGCAGGCGTTATCGGTCAGGTTGGGAGTGAACGCTTTGTCCAGAGGAG
GAGGTAGGGACGCCGGGAAGCAACAACACTCTGATTTTATTCGCCGGCTCC
ACAGCCTCCCATGCCCCAGGAGCCACCCGCACTCCAACCCCCGCATCT
CGGACCTGTGGCCTCAGCCAGACTCACATCACCAAGTGCACCTACCCAG
CTCCGTTATCTGGATCCAGGTGTGCAGGTGCCGGTTCAGGTACTCAGT
CATCCACAGGGCGATGTTGTCCACCAGGGGACATCTCCCGTTGACGC
TCTCCACACACATGACCCACCGAACTCAAAGAAAGGCCAATCTCCCC
CAGTTCACCCCGTCCCTGAAGAGTCTCTCCACCACCGTGGCAAAGCGTCC
CCGCGCGGTGAAGGGCGTCAGGTGCAGCTGGCTGGACATCTCGGGGAAGT
CGCGGCGGTAGCGGGGAGAAAGTCGTCCCGGCTGGCGGAGGTCAGG
TGGACCACAGGTGGCACCGGGCTGAGCGCAGGCCCGCGGCGCGCGGG
GGCAGCCGGGCTGTGCAGCGGCGAGGTCTTGGCGACCGGGTCCCGGATG
CGCTGGATGGGGCGTGTGCCCGGCTGGGAGGAGAAGATGCCCGGTGCG
GGGGCGCCCCCGGGGGCGCGGCCACATCTCCCGCATCCCACTCGTA
GCCCTCTGCGACAGCTTATAATGGATGTACTTCATCACTATCTCCCGT
TATCGTACCTGTTCCTCCAGCGTGCGCCATCTTCCCAGAGGAAAAGCA
ACGGGGGCCAACGGCACCTCTCGCCCCAGTCCCACCCACGGCCCCCAG
AGAAAGAAGAGGAGTTATAATCCAGCTATTTTATTGGATGTGCTTTGCAT
TCTTGGACGAGGGGGTGTCTTCAATCACGCGGAACACTTGATTCTGGTGT
TTCCCCCTTGGCATGAGATGCAGGAAATTTTATTCCAATTCCTTTTCGGA
TCTTTATTTTCATGAGGCACGTTATTATTAGTAAGTATTGTTAATATCAGT
CTACTTCCTCTGTGATGCTGAAAAGTTAAAGAAAAAACAACTAATAAGT
AAAAAATCAGGTGCGTTTCCCTGTACACACTGAGTGAAGCAGGGCATAAC
ACACTACAAGTAACACGGCTAAAAAGAAATGATTAAGCTGCCTGGAAAT
AAATTTACTCGAATGCATTTAAGTAAAAAATCTCAAAGGTTTCCATTGA
AAGTTACATTAACCAATTTCCCTGTGCAGAGAACTTACTTGTATTTTTTA
AGTACAGCATGATCCTCTGTCAAGTTTCCTTTTTGTAAAAACAAAACAAA
TGCATAAGGCAACGATCCCATCAATCTTCAGCACTCTCCAGTTATAGCTG
ATTTGAAACTTCCCAATGAATCAGGAGTCGCGGGGAGAGGGAGTAAAAAT
TAGGAGGATTTCCAGATCGATTCCCAGACTTCTGCTTCACAGAAATGTCA
ATCCGCAGGAATCCCAACCGGAGATCTCAAGAGCTCGAGAAAAAAAAG

```

6.有了序列，再把外显子部分序列标注出来，你就可以随心所欲的来挑选设计启动子区引物了~如果你不会查外显子序列，那你就再往下看：

你不是搜索了 BCL-2 了么，在第 2 个图上面，你看到 Refseq Gene 了么？点它下面那条线，蓝色框框里面的：



再点框框里的

Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Help About Us

RefSeq Gene

RefSeq Gene BCL2

RefSeq: [NM_000633.2](#) Status: Reviewed
 Description: Homo sapiens BCL2, apoptosis regulator (BCL2), transcript variant alpha, mRNA.
 CCDS: [CCDS11981.1](#)
 CDS: 3' complete
 OMIM: [151430](#)
 Entrez Gene: [596](#)
 PubMed on Gene: [BCL2](#)
 PubMed on Product: [apoptosis regulator Bcl-2 alpha isoform](#)
 GeneCards: [BCL2](#)
 AceView: [BCL2](#)

Summary of BCL2

This gene encodes an integral outer mitochondrial membrane protein that blocks the apoptotic death of some cells such as lymphocytes. Constitutive expression of BCL2, such as of translocation of BCL2 to Ig heavy chain locus, is thought to be the cause of follicular lymphoma. Alternative splicing results in multiple transcript variants. [provided by RefSeq, Feb 2009]

mRNA/Genomic Alignments

BROWSER	SIZE	IDENTITY	CHROMOSOME	STRAND	START	END	QUERY	START	END	TOTAL
browser	6492	100.0%	18	-	60780579	60986613	NM_000633	1	6492	6492

就看到它有几个外显子，序列是什么，中间隔着啥，都看到了：

Alignment of
NM_000633

[NM_000633](#)
[Human chr18](#)
[block1](#)
[block2](#)
[block3](#)
[together](#)

Alignment of NM_000633 and chr18:60790579-60986613

Click on links in the frame to the left to navigate through the alignment. Matching bases in coding colored blue and capitalized. Matching bases in UTR regions of cDNA and genomic sequences are color or orange (UTR) bases mark the boundaries of gaps in either sequence (often splice sites).

cDNA NM_000633

TTCTGTGAA	GCAGAAGTCT	GGGAATCGAT	CTGGAAATCC	TCCTAATTTT	50
TACTOCCCTCT	CCCCCGGACT	CCTGATTCAT	TGGGAAGTTT	CAAAATCAGCT	100
ATAACTGGAG	AGTGCCTGAAG	ATTGATGGGA	TCGTTGCCIT	ATGCATTTGT	150
TTTGGTTTTA	CAAAAAGGAA	ACTTGACAGA	GGATCATGCT	GTACTTAAAA	200
AATACAAAT	CACAGAGGAA	GTAGACTGAT	ATTAACAATA	CTTACTAATA	250
ATAACGTGCC	TCATGAAATA	AAGATCCGAA	AGGAATTGGA	ATAAAAAATT	300
CCTGCTCTC	ATCCCAAGG	GATCCACCA	GATCCAGTG	TCCCGCTGC	350
TTGAAGACAC	CCCCCTGTC	AAGAATGCAA	AGCACATCCA	ATAAAATAGC	400
TGGATTATTA	CTCTCTTCT	TTCTGTGGG	GCGTGGGGT	GCGAGCTGG	450
GGGAGAGGTG	CGGTGGGCC	CGTGTCTTT	TCCTCTGGGA	AGGATGGCGC	500
ACGCTGGGAG	AACAGGGTAC	GATAACCGG	AGATAGTAT	CAAGTACATC	550
CATTATAAGC	TGTCCAGAG	GGGCIACGG	TGGGATGGG	GAGATGTGGG	600
CGCGCGCC	CGGGGGCCG	CCCCCGCAC	GGGACTTTC	TCCTCCAGC	650
CGGGCACAC	GCCCCATCA	GCGCATCC	GGGACCGGT	CGCCAGGAC	700
TGGCGCTGC	AGACCCCGG	TCCCGCGG	GCGCGCGG	GGCTGGGCT	750
CAGCCCGGTG	CCACCTTGG	TCCACTGAC	CCTCCGCGG	GCGCGGACG	800
ACTTCTCCCG	CCCTCACCG	CGGACTTGC	CCGAGATGTC	CAGCCAGCTG	850
CACTTGAAGC	CCTTACCGC	CGGGGACGC	TTTGCACGG	TGGTGGAGGA	900
GCTCTCAGG	GACGGGGTGA	ACTGGGGAG	GATTGCGGC	TTCTTTGAGT	950
TCGGTGGGGT	CATGTGTGTG	GAGAGGTCA	ACCGGGAGAT	GTCCCGCTG	1000
GTGGACAACA	TGCCCTGTG	GATCACTGAG	TACCTGAACC	GGCACTGCA	1050
CACTTGGATC	CAGGATAACG	GAGGCTGGGA	TGCCTTTGTG	GAACTGTACG	1100
GCCCCAGCAT	GCGCCCTGTG	TTTGAATTC	CCTGGCTGTC	TCTGAAGACT	1150
CTGCTCAGTT	TGGCCCTGGT	GGGAGCTTGC	ATCACCCGTTG	GTCCCTATCT	1200
TGGCGGAGG	TGAAGTGAAG	TGGCGGCGG	GATGCTGTT	TGGCAAGGT	1250
TCACTAAAGC	AGTAGAATA	ATATGCATTG	TCAGTGAATG	ACCATGAAC	1300
GAGCTGCGC	GCTCTTAAAG	AAAAATTAAC	ACAGTATGA	ACATCCACA	1350

5 'UTR或内含子

外显子

你懂了么？这个是小编最常用的，倾情奉献，当然也有很多其他方法，见仁见智啦！



5.4 Western Blot

4 把芭蕉扇，助过“火焰山”

作者：子非鱼

做科研一如去西天取经，需历经九九八十一难才能取得真经（文章、基金等）。显然，WB 对科研苦行僧而言，绝对是一座座山路崎岖却又不得不翻越的大山，尤其是 WB 定量简直堪称火焰山，让不少研究者望而却步。所以，欲过此山，这四把能帮你一灭 WB 定量的嚣张气焰的芭蕉扇你必得随身携带。只有如此，在翻过此山之后，你才会发觉 WB 定量其实没有想象中那么难。

过火焰山之四大芭蕉扇

1.寻找图片的线性范围

作为一个称职的且非常会拍照的科研狗，首先要先确保你的“照相机”（WB 条带检测器）会以足够敏感的方式去捕获 WB 条带最美的一面，以便后续检测蛋白含量变化，而这个敏感性就即所谓的“线性范围”。

如果你的探测器已达到饱和的检测极限，且再也不能吸收光子，那么很有可能本该让你惊鸿一瞥的美景就这么与你擦肩而过（数据被丢失了），自然而然，你与高分顶尖文章也只能是失之交臂。

幸运的是，现阶段很多图形捕获系统配有软件，旨在检测饱和度，并自动纠正曝光，从而确保 WB 数据分析是可以被定量的。因而，花费一定的时间检测相关软件的是否能正确运行是很有必要的。

另外，为了防止膜上的饱和，你必须凭经验确定你的线性范围，即将一系列连续稀释已知量的蛋白裂解液进行 WB 的预实验，并将其条带的定量密度与所上样的量进行相关联，即可得到一个线性方程，如此便可为后续目的蛋白定量提供一条标准曲线。而且也可通过上样时减少总蛋白含量，以及尝试新的抗体或减少胶片曝光长度对标准曲线进行优化。

2.减去背景

在 WB 的世界中曾流传过这么一句话——最让人心塞的是，不是雾霾天你拍不清我的脸，而是明明天气和条带一样的美丽，却被你拍出了霾的效果。谁能告诉我，以下图片背景拍成这样，到底是什么鬼？！



显然，这些模糊一团的 WB 图片会因相貌过于丑陋，不仅会被喜以外貌定一切的审稿者而拒之门外，而且也将实验结果的分析造成不小的影响。

若起因源于图片捕捉检测器，需对仪器所携带的拍摄软件进行熟练化练习，以便后续拍摄图片时能凸显自己所感兴趣的条带，并弱化背景。若这是因为一抗浓度高或洗膜时间和次数不够造成的，则需要我们注意操作规范，在降低一抗浓度的同时不要偷工减料，洗膜要按照 Protocol 上做。

3.WB 定量的校正者——内参君

正所谓，没有对比就没有伤害。你自以为棒棒哒的目的条带，就真的是无人可比的么？大错特错！此时，只需要看看别人家的孩子（内参君），自家条带是好是坏就立见分晓。而这位内参君到底有什么与众不同之处，可作为衡量自家条带的“标杆”呢？说到底，是因为其性格沉稳，且不易受外界因素影响（胞内表达相对恒定）。

通常，这些内参君来自于胞内的“持家基因”的产物，例如肌动蛋白， β -微管蛋白或类似 Hsp70 的伴侣蛋白，不仅可校正实验误差，而且可保证实验结果的准确性。

另外，以下四个步骤可作为 WB 条带的校正标准：1、确定目的蛋白质（PI）和标准化对照（NC）的背景扣除密度。2、识别具有最高密度值的 NC。3、将所有 NC 值除以最高的 NC 密度值，得到相对的 NC 值。如果你这样做正确的最高密度值将是 1，其他的一部分（例如，0.97）。4、将所有 PI 值除以相应通道中的相对 NC 值。

4.WB 重复性实验

通常对于定量实验，应对每一个实验条件进行一式三次地 WB（优选在相同的印迹膜上）。当每个重复实验确定出了每个孔的校正值，即可得出其平均值、p 值。而后需在三个独立时间内进行整个实验，以确保实验结果的重复性，而并非是一种偶然。

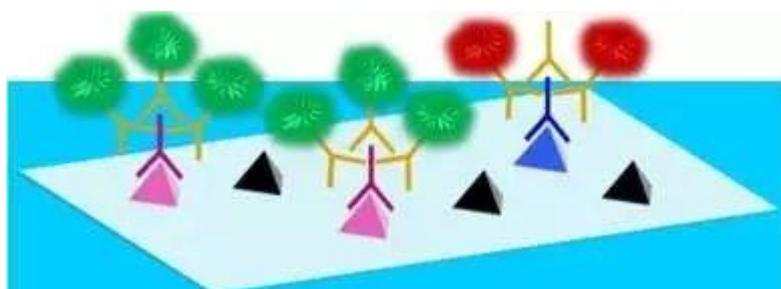
参考文献：The 4 Important Steps for Western Blot Quantification

你造么？WB 定量软件除了 imageJ，还有它！

说起 WB 条带的半定量，Quantity ONE&Image J 无疑撑起了半天。在此，本文将给大家安利一种 WB 精确定量的神器——美国 LI-COR 公司的 Odyssey 双红外激光成像系统。

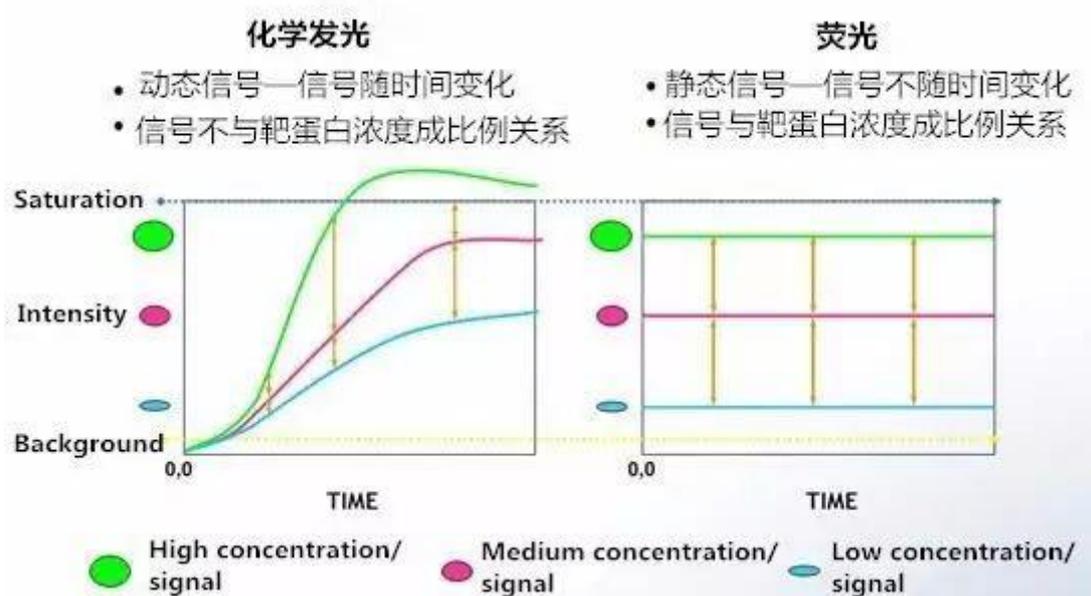
而之所以说 Odyssey 系统会成为照亮蛋白质研究的阿拉丁神灯，是因为该系统可在利用红外荧光染料标记的二抗孵育完后，可直接进行扫描成像，其重复性和定量准确性远优于现阶段 WB 成像的常用方法——ECL 化学发光法，即依赖与二抗标记的辣根过氧化物酶 HRP 催化底物

发光，而其信号可被 CCD 成像系统进行记录。

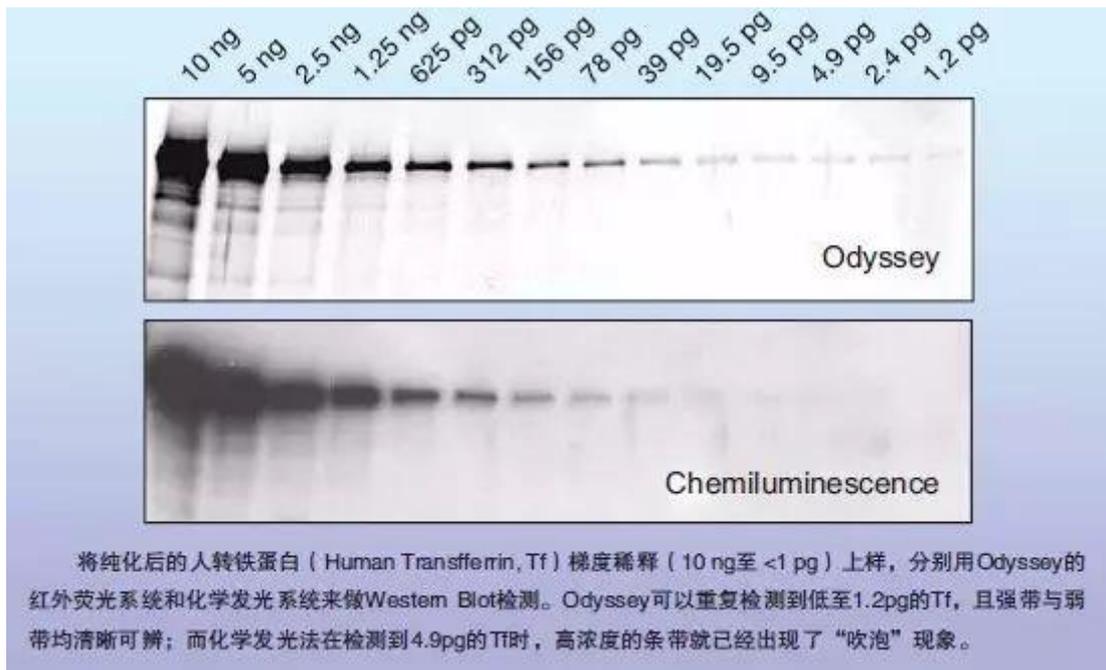


Odyssey 系统检测原理示意图

举个例子，Odyssey 系统检测的荧光信号强度和结合的二抗数量具有线性关系，保证定量的准确性；但在 ECL 法中，酶催化反应的制约条件很多（如温度、酶活性、pH 值、曝光时间等），常会导致即使是同一个样品、同一张膜，其先后取得的图片其差异性很大。



另外，Odyssey 系统可直接检测实验结果，且具有极宽的线性范围。因为在红外荧光区域，背景荧光信号将大大低于可见荧光区域，因而即便是 WB 中较弱的信号都可以清晰成像（灵敏度高），进而提高了实验重复性和定量精确性；但 ECL 酶促发光是一个非线性放大的过程，对低丰度蛋白会线性失真，对高丰度蛋白又会出现信号饱和，无论是动态范围，还是线性范围，都只能说差强人意。这一点，早于 2007 年被 PNAS 的一篇文章证实了。



因而, 到目前为止, Odyssey 双色红外激光成像系统也已经遍及了国内外蛋白质研究实验室, NCBI Pubmed 于 2015 年五月底最新检索文献已超过 10000 篇, 来自中国的文献达到 1628 篇。可以说, 对于蛋白质研究的实验室, Odyssey 真正是不折不扣的 WB 定量神器。

参考文献: Quantitative analyses reveal the importance of regulated Hdmx degradation for p53 activation

分分钟成为 WB 达人

作者: 史蛟龙

一、蛋白样品的制备与定量 (好的蛋白是成功的一半)

(1) 提细胞蛋白

① 消化或刮下细胞至 1.5 的 EP 管中, 标记, 10000r 离心 2min, PBS 洗 3 遍

② 吸去 EP 管中 PBS，最好用滤纸吸干里面的水分，加适量 RIPA 裂解液（RIPA 裂解液：蛋白酶抑制剂=250:1），如果你想做信号通路指标还得再加上磷酸酶抑制剂（磷酸酶抑制剂：RIPA 裂解液=1:1000）

③ 冰上裂解 30min~1h，开 4°离心机

④ 4°离心 11000r，20min

⑤ 测蛋白浓度，取上清，加蛋白上清的四分之一体积 5x 上样 loading buffer，煮沸，分装（蛋白质变性）

（2）提组织蛋白

① 研钵中倒入液氮，加入组织块，研磨，加液氮，药匙刮

② 刮下后放入 1.5ml 的 EP 管，加适量裂解液，吹打

③ 冰上放置 1h，期间，每隔 10~15min 吹打一次，开 4°离心机

④ 4°离心 10000r，1h

⑤ 测蛋白浓度，取上清，加 1/4 体积 5x loading buffer，煮沸，分装

（3）测蛋白浓度（BCA 法）

① 八个标准孔，按说明书先加超纯水，再加标准蛋白液

② 目的孔，每孔加 18ul 超纯水+2ul 目的蛋白

③ 按说明书配 BCA 工作液，每孔加 200ul

④ 37°放置半小时后测浓度

（4）计算上样量，设计上样顺序

上样体积：上样量/浓度 x 5/4

上样顺序：无处理，对照，处理；体积最好不要相差太大

经验总结：

如何提高蛋白浓度：首先当然是多种点细胞啦，其次可以少加点裂解液，尽量裂解充分。

如何处理蛋白浓度低的问题：实验过程中发现蛋白的浓度太低，如果上样的话，体积太大，甚至电泳孔都装不下，举例：假设我需要上样 40ul 才能达到 20ug，那么显然按照常规的方法，10 孔的梳子只能加 25ul 左右，我们此时可以取 40ul 蛋白入 EP 管中，放置于 PCR 仪器，变性温度浓缩蛋白体积，这样不断浓缩之后促使 EP 管中蛋白的水分降低，蛋白量依旧是 20ug。

如何保证对照组和实验组蛋白浓度大概是一致的：种植细胞的时候尽量保持铺下去的细胞数接近，收细胞之后观察细胞的多少适当加入几倍体积的裂解液。

二、电泳

- ① 清洗玻璃板，去离子水冲，风干或烤干（一定要以处女座的精神去严格要求自己把板子洗干净，相当重要）
- ② 按说明书配胶。先配下胶（分离胶），一般两块板配 10ml 的 10% 的胶（20~80kDa 通用）胶的浓度根据你所需要跑的蛋白的分子量大小决定，混匀后灌胶，立即用正丁醇或无水乙醇封，待凝固后倒出正丁醇，用去离子水冲洗，滤纸吸干；
- ③ 配上胶（积层胶），参考说明书，一般两块板配 4ml 的 5% 的胶，混匀后灌胶，插板，待凝固。（可 4° 过夜）
- ④ 配电泳液（tris 3.03g，甘氨酸 14.4g，SDS 1g，定容至 1L）
- ⑤ 将玻璃板装好放入电泳槽中，加电泳液，轻轻拔梳。
- ⑥ 上样（这是每个 WB 达人最能装逼的一个环节，高手会告诉你凭感觉加样连孔都不用看）
- ⑦ 连接电源，一定要注意红对红，黑对黑，定电压和时间，上胶（90v，约 40min，maker 分出条带），换压，下胶（120v，2h）。（不要让溴酚蓝跑出去）

经验总结：

想要条带跑的好看点，最好把上胶稍微配高一点。

换电压主要是看溴酚蓝有没有跑到下胶，没有确定的时间点

胶最好现配现用，如果需要保存最好用湿润的保鲜膜包好

三、转膜（整个 WB 过程中最重要的环节）

- ① 跑到溴酚蓝距离最下缘 25px 时配电转液（tris3.03g，甘氨酸 14.4g，甲醇 100ml，定容至 1L）
- ② 在电转液中剥胶，裁胶，剪膜，膜活化（甲醇 1min，去离子水 1min，电解液 15min）
- ③ “三明治”黑板~海绵~三层滤纸~胶~膜（正面朝下，分清左右，与胶对应）~3 层滤纸~海绵~白板，夹紧后放入电转槽中。（海绵，滤纸，膜需浸润透，过程中不能干，赶赶气泡）
- ④ 连接电源，一定要注意红对红，黑对黑，定电流和时间（150mA，1h，若分子量大于 90，再加 200mA，2h）具体情况具体分析

经验总结：

溴酚蓝跑到最终的距离是根据你所需要切的分子量决定的，假如你就只需要切一条 ACTIN(43Kda)这样的，你完全只需要跑到下胶，看到差不多 marker 分开了就可以切胶了。假如你要从最上到最下切好多条出来，你则需要把溴酚蓝尽量跑到最下面，这样 marker 容易被跑开，有利于切胶。

滤纸和 PVDF 膜的裁剪必须要整齐，干净，标记清晰。

PVDF 膜型号的选择要正确。如正常的 30~170kDa 的分子一般需要孔径 0.45mm 的膜就足够了。太小的则需要选择孔径为 0.22mm 的膜。

关于转膜是否要加 SDS 的问题。SDS 带负电，加 SDS 一般是针对那些分子量大的 WB，加入 SDS 可以增加分子导电性，这样更利于转膜。

关于转膜电流，分子是否能够转过去和转膜时间没有必要关系，而更在于转膜电流的大小。举个例子，200kDa 的分子量，你用 90mA 就算转一年都转不过去。

四，免疫印迹

- ①膜处理（甲醇 1min，风干（放滤纸上），甲醇 1min，水 1min）
- ② 封闭（用 TBST 配 5%牛奶）1h 配摇床
- ③ 加一抗，牛奶稀释,所需浓度参考抗体说明书，看膜的大小配多少一抗，4°过夜。
- ④ 室温孵育 20min
- ⑤ 0.1%TBST 洗 10min x 3 次配摇床（0.1%TBST: tris12.1g, NaCl87.66g, HCl 至 PH7.6 后定容至 1L 后，加入 1ml 的 TWEEN20）
- ⑥ 加二抗，牛奶稀释，一般 1:10000，1h 配摇床
- ⑦ 0.1%TBST 洗 10min x 3 次配摇床
- ⑧ 发光（A 液 B 液等体积混合，孵膜 1min，正面朝上放入仪器内发光）

经验总结：

封闭液的选取具体得看抗体说明书，有的抗体是明确要求只能用 BSA，而且封闭液浓度的选择也是具体得看抗体的要求，但是一般情况 5%BSA 的效果会比 5%牛奶要好。

信号通路一般都是用 5%BSA 封闭。

信号通路在洗膜的时候用快速摇床 5min/次 3 次就可以了。

如果你想省时间，一抗可以放在 37°C1~2hour，但是一定要封好，以免温度太高而导致抗体干了出现假阳性。二抗可以 37°C半个小时。

发光液的选取，如果是一般的抗体，建议用一般的发光液效果会好一点，如 keygen 的，背景会比较干净。但是一些难发出来的一般建议用灵敏度更高的发光液如 FD 的或者是 MILLIPORE 之类的发光液。

五，结果分析

①微笑条带



解析：由于凝胶的中间部分凝固不均匀所致，多出现于较厚的凝胶

处理办法：配胶时一定要充分混匀，待其充分凝固后再做后续试验

②带出现纹理现象

解析：样品不溶性颗粒

处理办法：加样前最好是离心一下样品

③电泳条带粗



（这是个内参 β -actin）

解析：蛋白样品没有浓缩，量太大

④条带出现好多洞洞



解析：转膜的时候没有把三明治里的气泡干掉

**干货 | 量化 WB 条带，就靠 Quantity
ONE&Image J!**

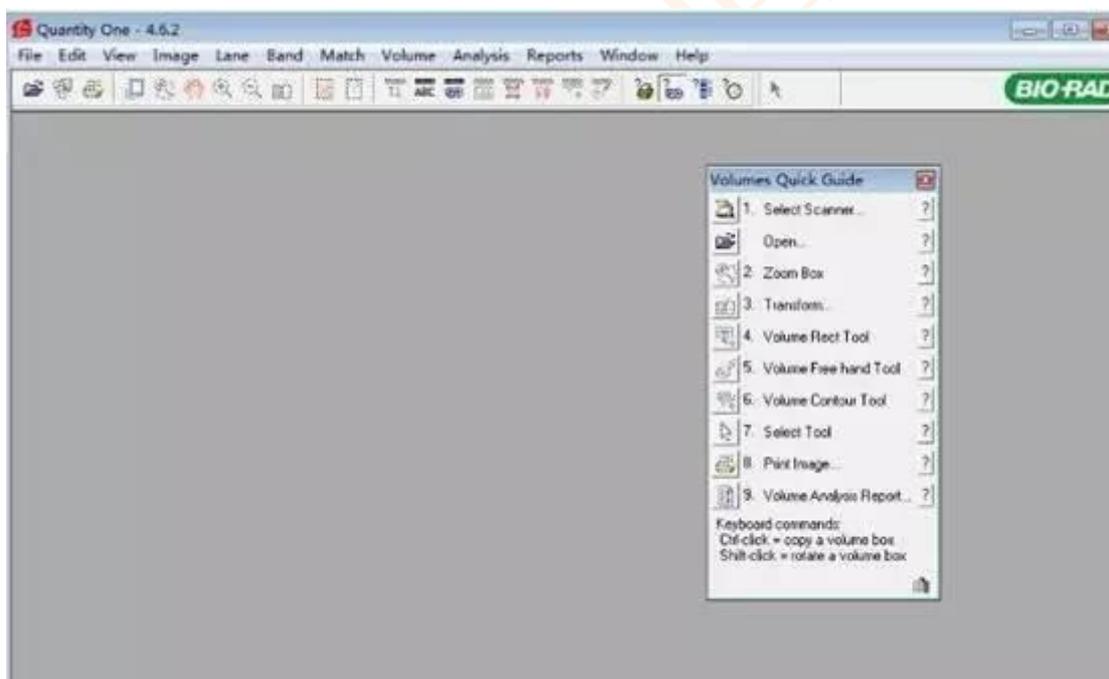
作者：子非鱼

曾经在科研界流传过这么一句话，做 WB 不易，且做且珍惜。有时，实验狗们废寝忘食、历尽种种艰辛，好不容易获得的一张漂亮的 Western blot 图，却不知该如何计算其灰度值。不过犯难的小伙伴们不要太发愁，小鱼今天就手把手教你用 Quantity One 以及 Image J 软件搞定 WB 条带的量化，让你们以后再也不用担心 western 结果图不会处理了。

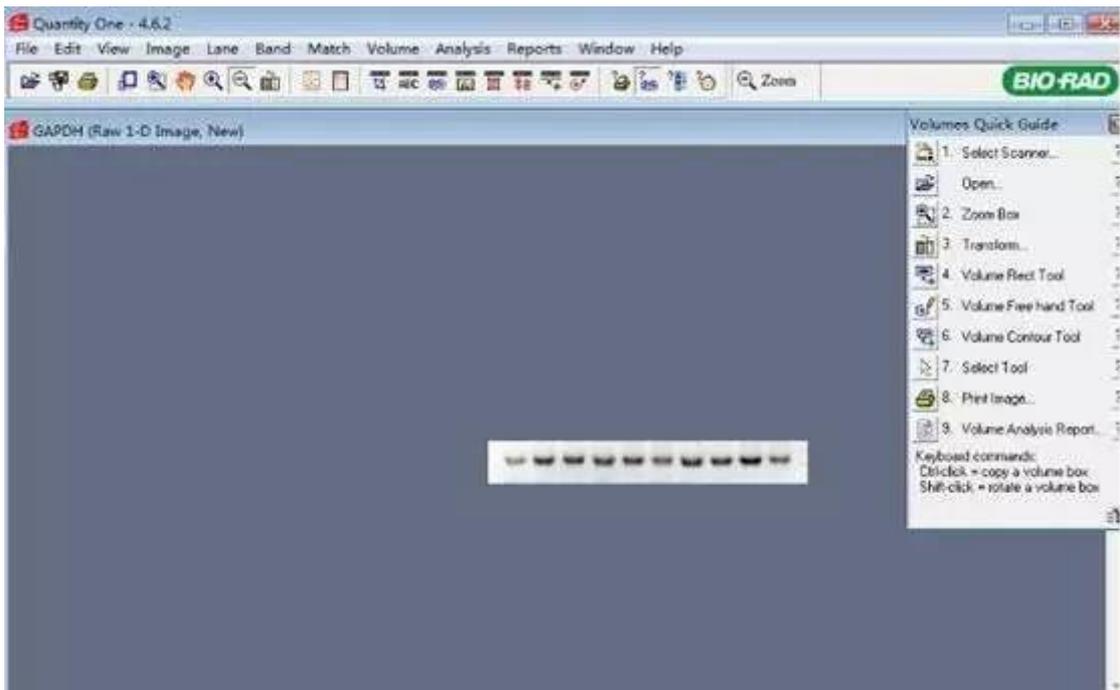
Quantity One 软件

提及 WB 结果的定量分析，目前最备受推崇的应该是 Biorad 公司的 Quantity One 软件。各位小伙伴还不快快搬着小板凳学习以下软件教程。

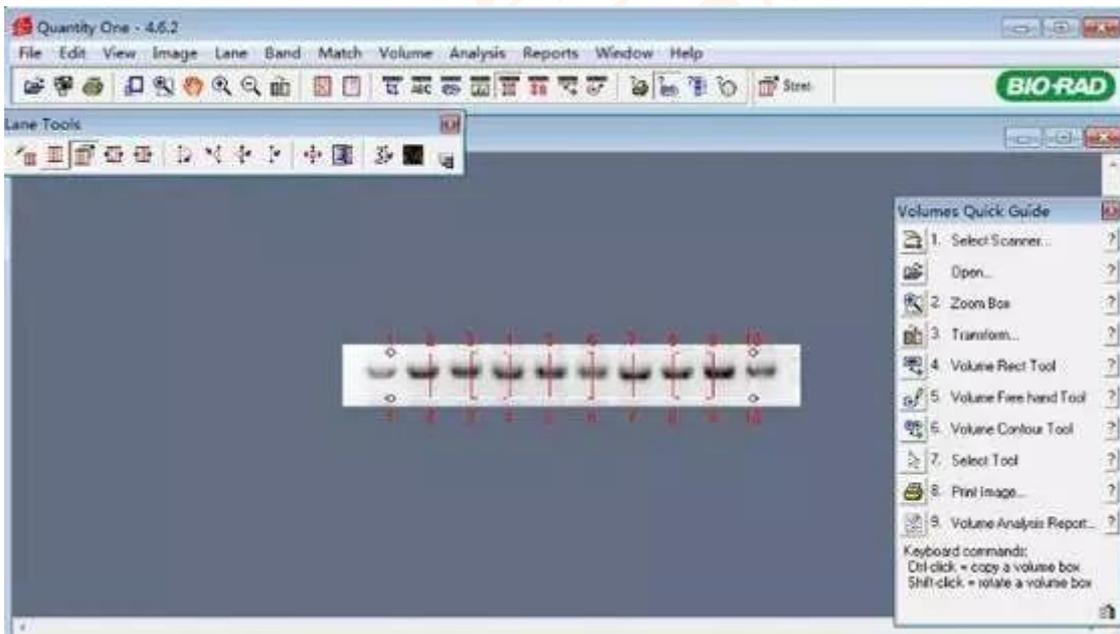
1.打开 Quantity One 软件。会有以下界面。



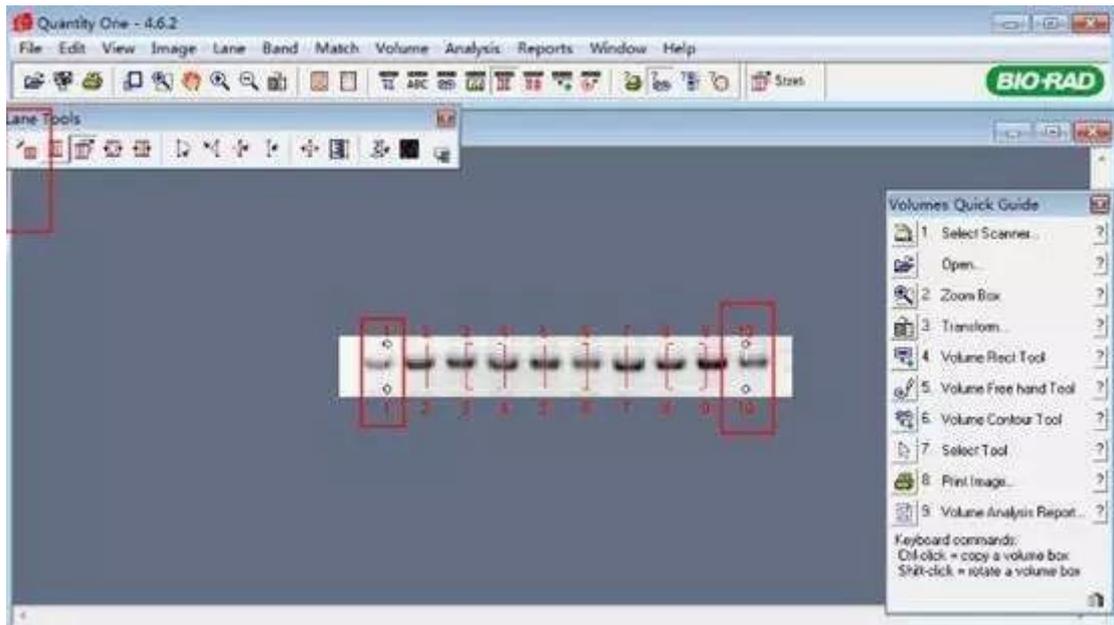
2.双击文件打开一个 all.tiff 的图片(如果不是.tiff 可用 Photo Shop 转换格式)。以内参 GAPDH 的条带图为例。



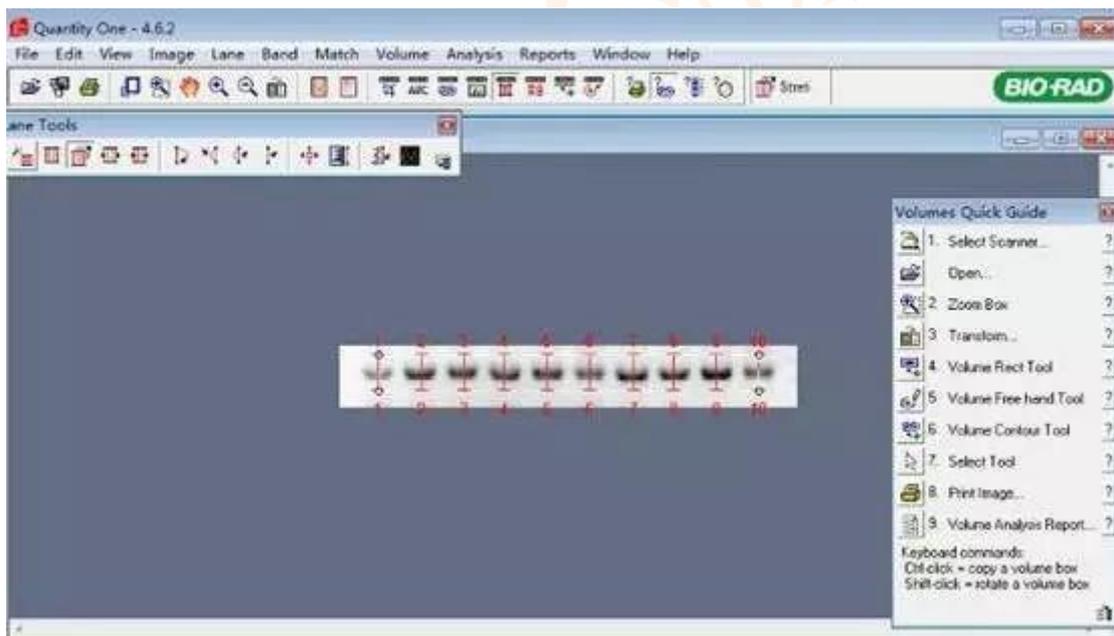
3.选中菜单栏或工具栏中 Lane,设定基础泳道数。



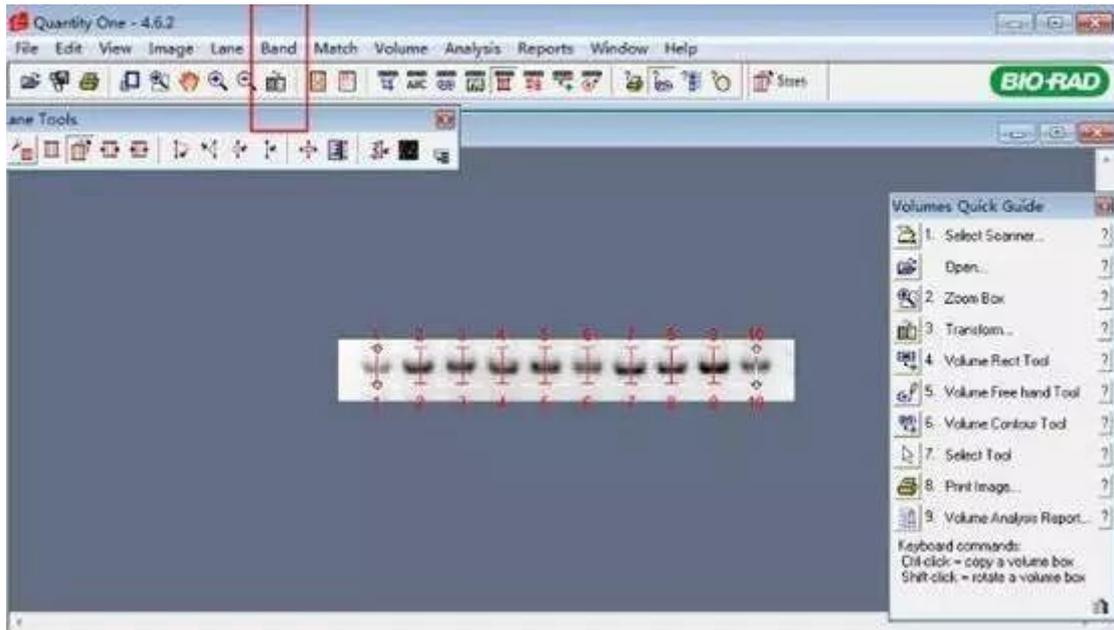
4.Lane 工具可以调节红线穿过泳道的位置，最大范围内保证所有的红线从条带的中间穿过。



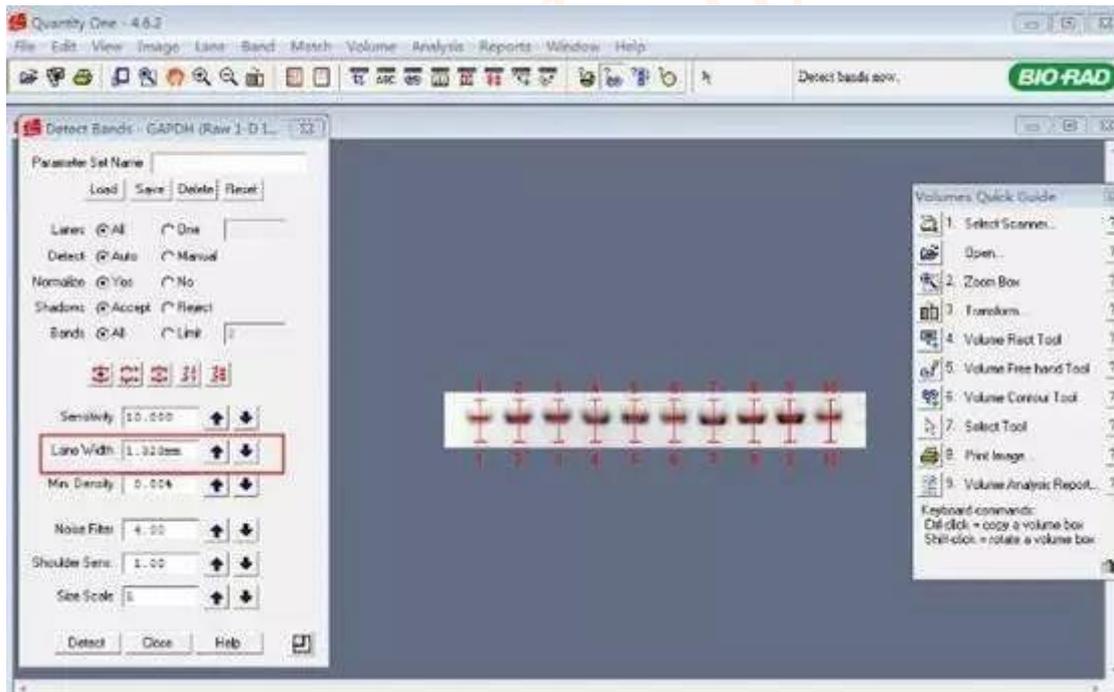
5. 调节左右两边后，红线位置正好从条带中间穿过。



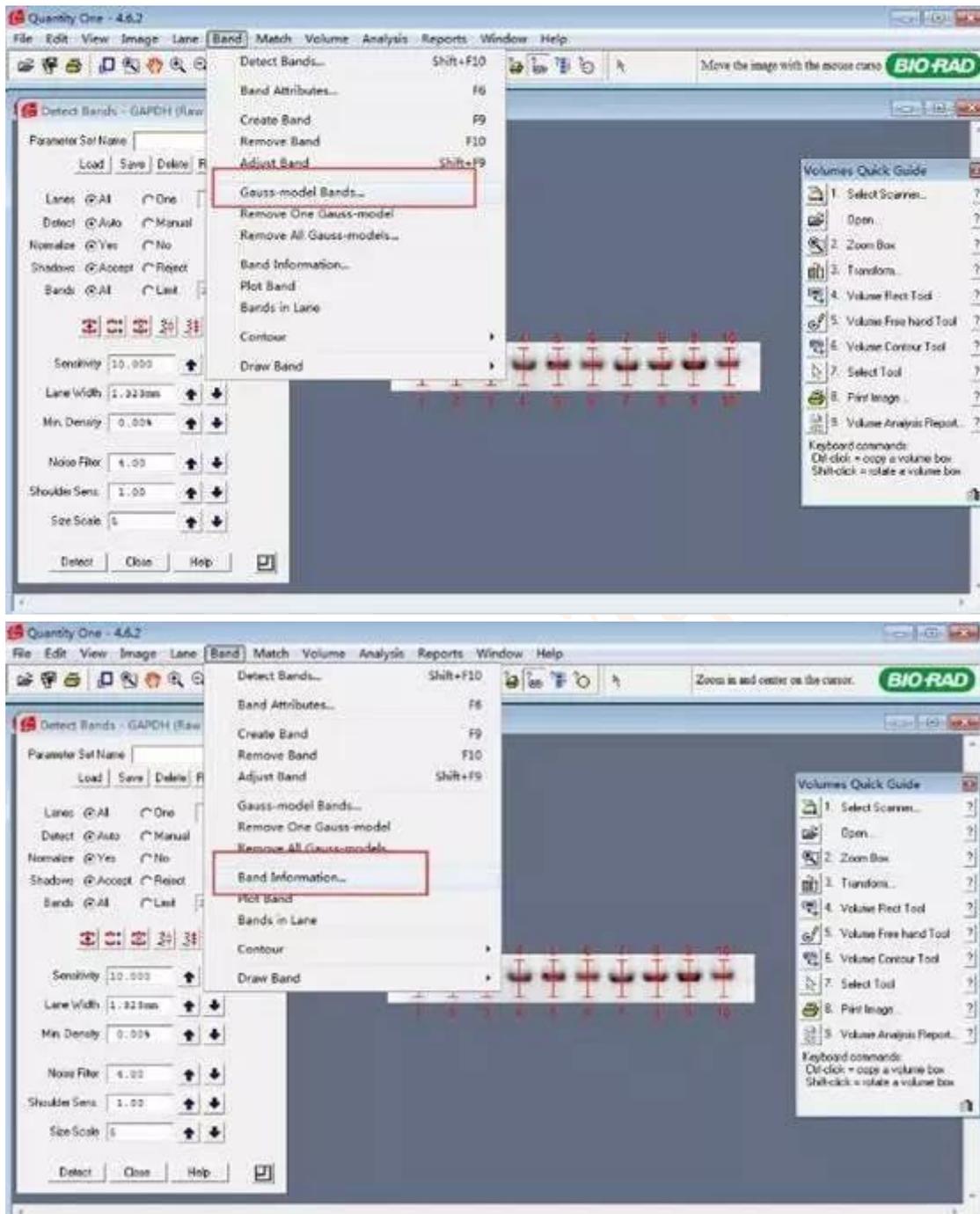
6. 点击 Band, 设置条带参数。



7.设置 Band 工具栏。调节 Land width,使条带红线约充满条带不超出条带（约占 3/4）。



8.使用高斯建模；高斯模型，后点击条带信息。



9.这时候会有一个蓝色的标圈，将蓝色标圈移至条带的位置，你要的灰度值就粗来了。泳道2条带的灰度值为：46.3。这个时候你可以根据内参 GAPDH 各个灰度值调节上样量了！尽量调平！

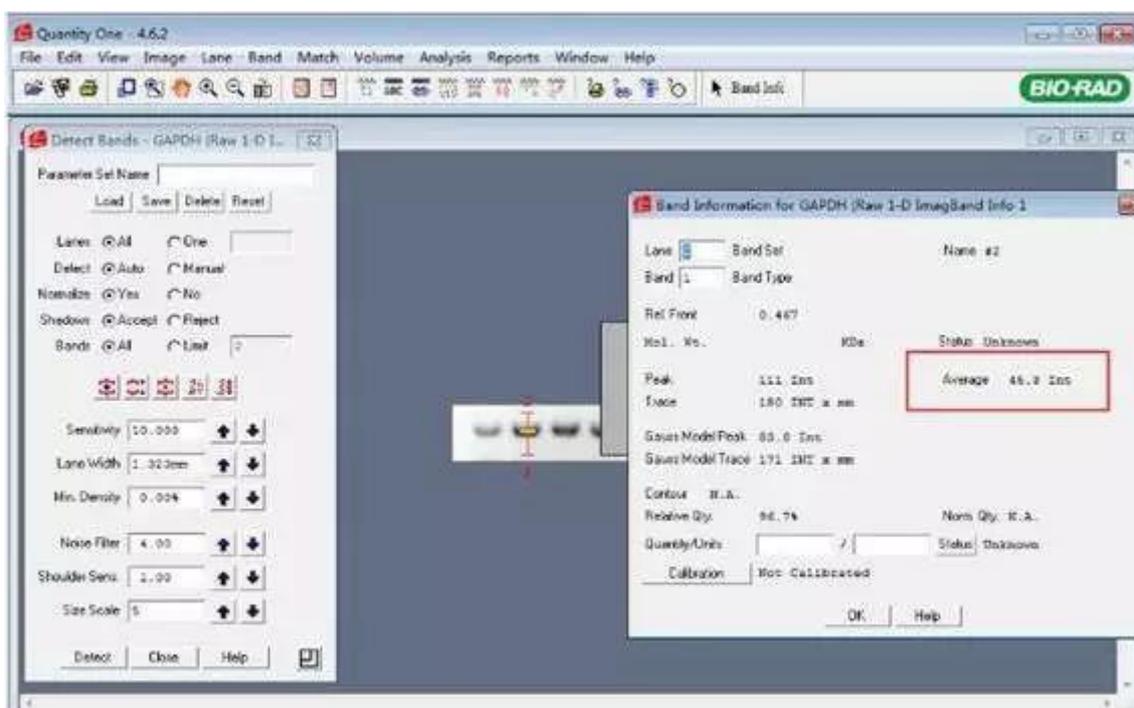
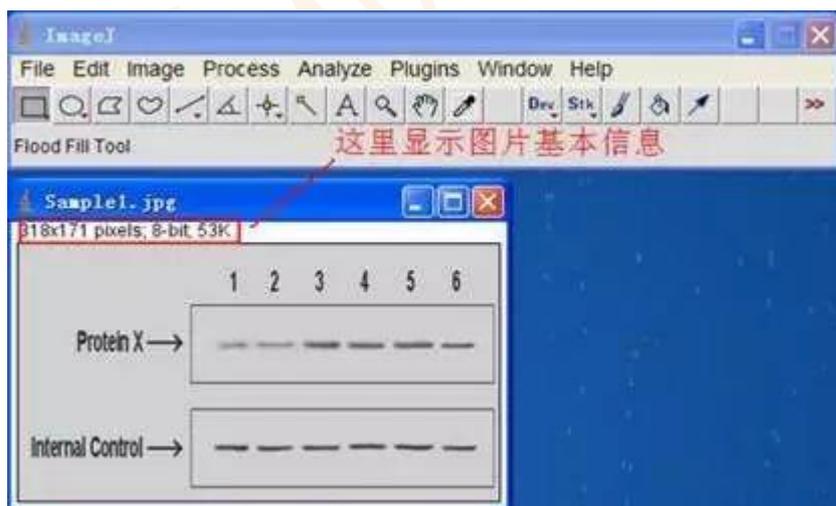


Image J 软件

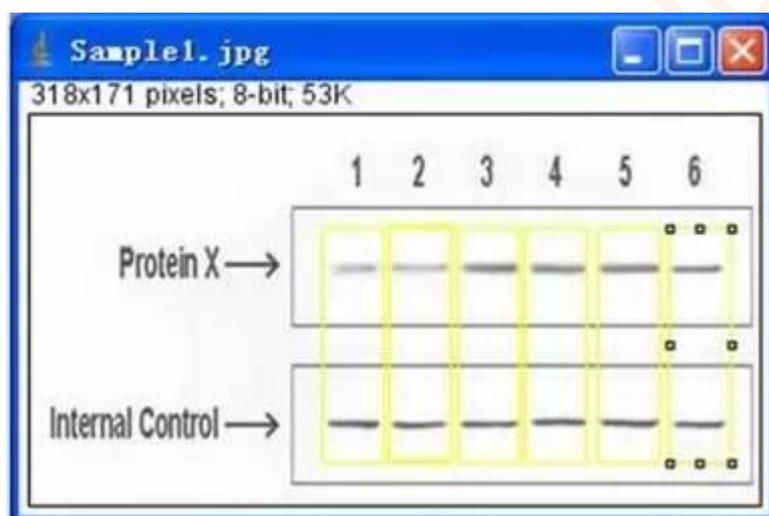
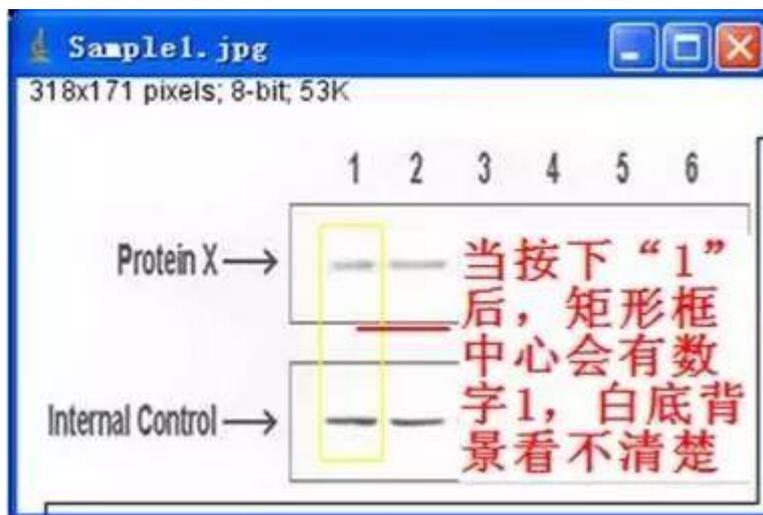
Image J 是 NIH 推出的分子生物分析软件，简单易学，更是分析 wb 条带的最常用软件。

1. 打开 Image J 软件，在 File 里打开图片，并且转化为 8-bit 灰度图(Image→Type→8bit)。同时，去除图片背景（Process→Subtract Background→Light background）。

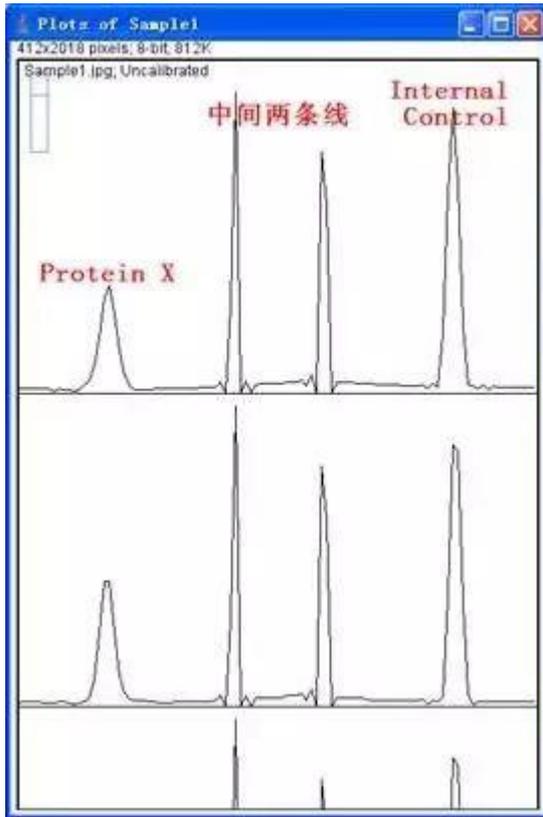


2. 方框工具选择并画出条带，然后选择 Analyze→Gels→Select First Lane。拖动“1”的矩形框，

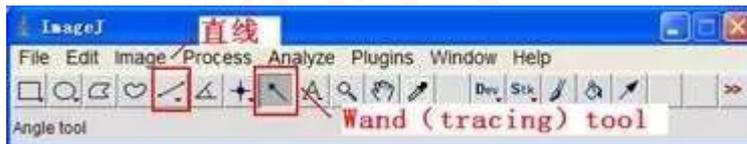
将 2 至 6 之间的泳道全部覆盖上。

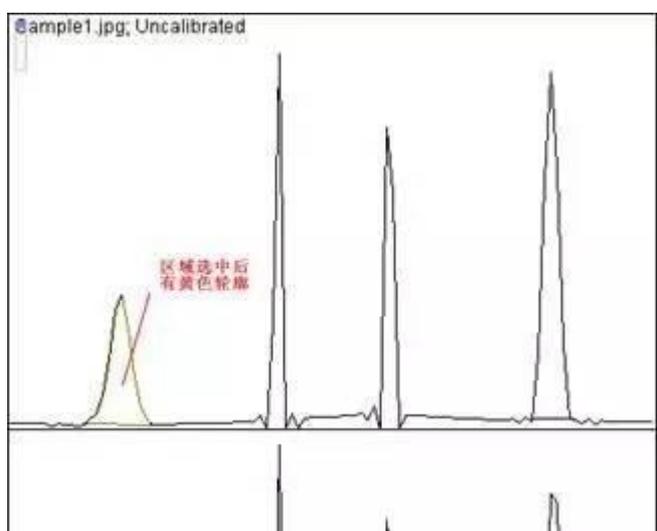
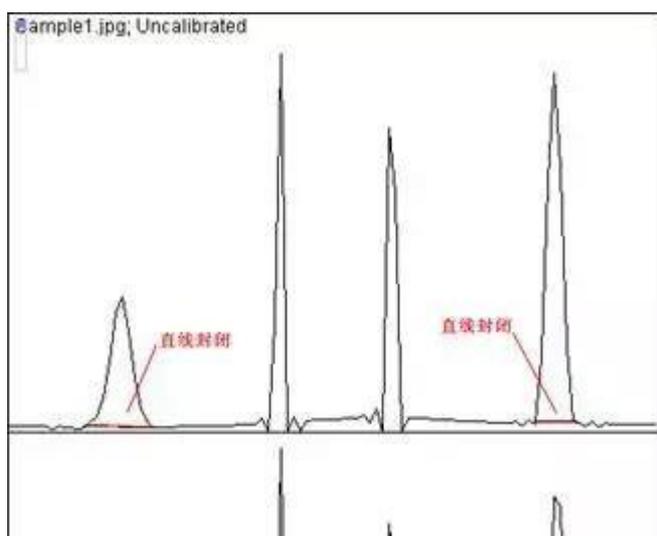


3.所有泳道选择后，按 Analyze→Gels→plot Lanes，就会出现山峰样图。



4. 可用直线功能把峰封闭，而后点击"魔棒" (Wand tool)。分别点击每个峰下方的区域，在 "Results" 里就会出现面积，表示相应条带的灰度值。





Results	
File 泳道1 ProteinX峰值	
Area	
1	1319.991

干货 | 磷酸化抗体使用必杀技

作者：子非鱼

Western Blot 是生物学上一种非常常用的实验方法，与之相似的还有 Southern Blot 和 Northern Blot。但 WB 失败的情况也很多，这里小鱼有一些小技巧来尽量减少失败的概率。

“我的 WB 又没有杂出来，太桑心了”

“哇靠你的 WB 又没有杂出来，用掉多少抗体了，还买进口的！”

“哇靠你的 WB 又没有杂出来，却一直一轮又一轮的占用着蛋白电泳仪，我等到黄花都谢了！”

麦子说，这些声音贯穿了她整个研究生生涯，WB，虐了她无数遍，然而凤凰涅槃然后浴火重生，她从 WB 中参悟到了正确应对失败的人生道理。而在正确应对失败的同时，我们也要学会如何避免失败。小鱼今天给大家分享一下在用磷酸化抗体做 WB 时，应该注意些什么。

1. 警惕内部敌人



一定要在 lysis buffer 中加入蛋白酶抑制剂，还要加入一定量的磷酸酶抑制剂，因为组织或细胞裂解时会释放出大量磷酸化蛋白的死对头——内源性蛋白磷酸酶，催化磷酸化蛋白(R-p)的去磷酸化，导致不同于正常生理状态的差异。因此，外源性加入蛋白磷酸酶抑制剂，抑制磷酸化蛋白的去磷酸化，维护蛋白质的磷酸化状态，否则即使 band 压出来也会很浅，结果也

不可信。

2.低温能让他们紧紧地拥抱对方



加一抗后最好 4 度过夜，低温能让抗体和目的蛋白紧紧地拥抱对方。为什么？因为蛋白抗原在膜上靠的是物理吸附，高温下容易脱落。膜上的抗原脱落了，结合效率会低。4 度也可使一抗重复使用多次。毕竟磷酸化的抗体都挺贵的。（土豪随意）磷酸化的蛋白只占总的蛋白量的极少部分，就像联谊舞会上让来宾多相处一会产生 couple 的概率会大很多那样，过夜可以保证抗体和蛋白有充分的结合时间。二抗则室温 1 小时即可。

3.磷酸化抗体哪家强？



当然是 Cell signaling 公司。他家做的磷酸化抗体不错，尤其是 MAPKs 磷酸化抗体。最好根

据厂商的 protocol 来操作实验，这是实验成功的保证。

4. 他们不宜“喝奶”



建议用含 5%BSA 的 TBST 稀释 phospho-p38 等抗体，效果不错，而不是用常见的含 5%non-fat milk 的 TBST。因为脱脂奶含磷酸化蛋白丰富，是奶中磷元素的来源之一。

5. 如何避免磷化蛋白君和总蛋白君在膜上“打架”？



研究完某一蛋白的磷酸化情况后一般也要研究一下该蛋白总的表达量。但两者的条带位置一样，怎么做？可以这样：压完磷酸化抗体后，把相同的 membrane 做 strip 后再压总蛋白抗体，然后再 strip 一次，再压内标 actin。

6.听 marker 的，没错



做磷酸化蛋白 WB 时,除了目标蛋白的 band 以外,往往会出现非特异性的 band。磷酸化抗体不好的话,甚至会压出非特异性的 band,而没有你想要的 band,所以压片以后,一定要根据 markers 比对一下,你压出的 band 分子量是否正确。

7.洗涤也大有学问



洗涤对最后的背景影响也较大, millipore 最近的说明书推荐用双蒸水洗涤,效果很明显,具体可以这样: 1st and 2nd 抗体之间, DDW 5min X3 次, 2nd 抗体后, DDW 5min X3 次, TBST 5min X1 次, DDW rinse 3-4 次。对比 TBST 洗涤的 membrane, 效果有一定差距,背景有效降低,即使压片 30min,背景仍然是可以忽略的。



搞定内参君，驾驭 Western blot 已成功一半

作者：子非鱼

western blot 对绝大多数实验新人而言，绝对是心中痛，一碰就要抓狂。没办法，谁让导师发话了，WB 做不好，延毕就是分分钟的事儿。这还真是让小伙伴们感叹道，WB 想说爱你不容易。那么为了彻底驯服 WB，获得漂亮且理想的实验结果，一个好的参照体系就绝对是不可或缺的存在。

一般而言，良好的参照体系包括：

*体重计（分子量 marker）：可确定蛋白条带对应的分子量大小

*光杆司令（空白对照）：不加一抗和二抗，用于检测膜的性质的封闭效果

*好榜样（阳性对照）：已知量标准产物的正对照，可检测抗体的工作效率

*打酱油的（阴性对照）：不表达靶蛋白的组织或样品，检测抗体的特异性

*单飞者（二抗对照）：不加一抗，检测二抗的特异性。

*校正者（内参对照）：检测标本系统和抗体系统，减少蛋白定量、上样过程中的误差



无论你检测还是不检测
我的体重（表达量）都在这里
不增不减！！！！

内参君的初次登场

在此，小鱼就带领大家一起来认识认知这位“有名”的内参君吧。内参（Internal Control），简而言之，一般指的是由管家基因编码表达的蛋白（Housekeeping Proteins），因其表达恒定被用于检测蛋白表达水平变化时的参照物，可确保实验结果的准确性。



内参选择原则

样本种属来源	目的蛋白分子量	目的蛋白的表达部位
<ul style="list-style-type: none"> 1、哺乳动物细胞样本 β-actin、β-tubulin、GAPDH、Lamin B等 2、植物细胞样本 植物Actin、Rubisco 5、其他 依据参考文献，选择合适的内参	<ul style="list-style-type: none"> 通常保证目的蛋白与内参蛋白的分子量相差5KD以上。 如目的蛋白是45KD，此时应选择GAPDH或β-tubulin 	<ul style="list-style-type: none"> 一般蛋白 β-actin、GAPDH等 核蛋白 Lamin A/B、Histone H3、PCNA等 膜蛋白 Na,KATPase 线粒体蛋白 VDAC1、COX IV

Tips:

1) 在一些文献报道中，Erk2、TATA bindingprotein(TBP)以及 c-Jun、c-Fos 等也可被用于核蛋白的内参。

2) 内参的选择需要考虑实际的实验环境。

eg: 在细胞增殖相关试验中,c-Jun 由于自身表达变化就不适合做内参;而在凋亡实验时,TBP、

Lamin 等也不适合作为内参。因此设计实验方案的时候应该考虑这些因素并查询相应文献，在实验过程中也应该注意如果内参表达出现异常，应考虑这方面因素。

亚细胞定位	内参	分子量MW(kDa)	注意事项
胞浆/全细胞	α -tubulin	55	Tubulin的表达会受到抗癌和抗真菌药物的影响
	β -actin	43	
	GAPDH	37	组织细胞缺氧或糖尿病时会会上GAPDH的表达，不适合做与氧有关的研究
	Cyclophilin B	21	
细胞膜	Na/K-ATPase	113	
线粒体	HSP60	60	
	Cox IV	17	
	VDCA1/孔蛋白 (porin)	31	
细胞核	Lamin B1	66	不适合于胚胎干细胞
	HDAC	60	
	PCNA	29	不适合作为非增值细胞的内参
	Histone H3	17	
	ATA结合蛋白(TBP)	38	
血清	Transferrin	77	Transferrin水平受某些疾病状态和视黄酸的影响。

锋芒毕露的内参君

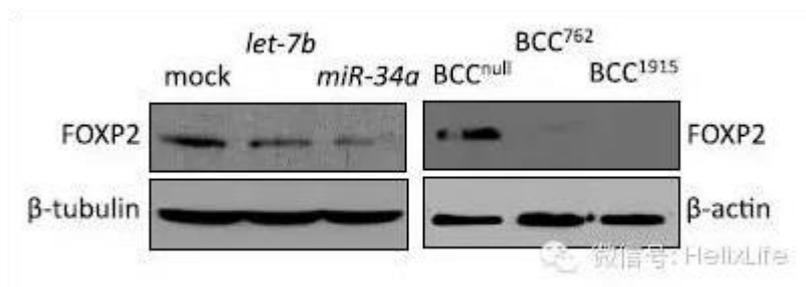
正所谓，养兵千日，用在一时。可是很多实验菜鸟在选好内参之后，对下一步如何发挥内参君的本领感到一筹莫展。那么以下三个妙招可一解大家的燃眉之急。

1、超级简便的标记内参使用法：只要在二抗孵育时加入 HRP 标记内参抗体，按照正常操作即可。

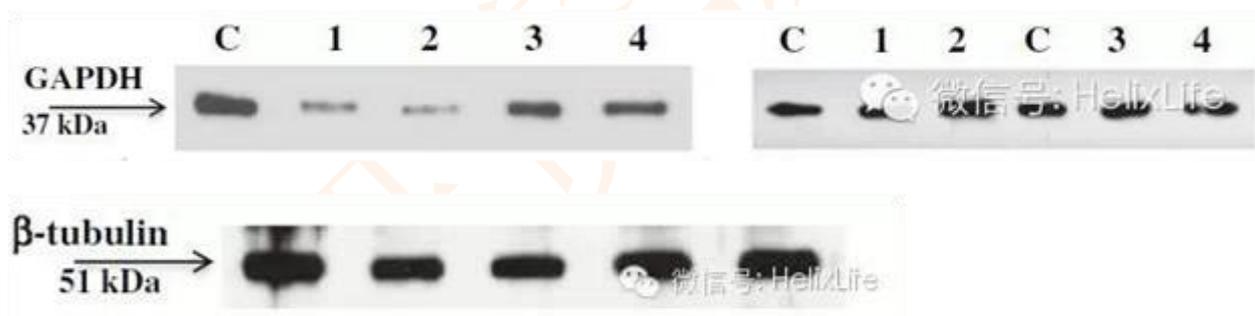
2 普通内参：当目的蛋白的分子量大小与选用的内参蛋白分子量相差不大时，可以先进行目的蛋白的抗体温育显色和检测。然后使用膜再生液（P1650）洗掉膜上的抗体，重新进行内参蛋白的抗体温育、显色检测。

3 当目的蛋白的分子量大小与选用的内参蛋白分子量大小相差比较明显情况下，可以在转膜后预染，根据蛋白质 Marker 的大小将膜剪为大分子量和小分子量两部分，使内参蛋白与目的蛋白分开。然后两块膜分别与内参蛋白抗体以及目的蛋白抗体进行温育，二抗温育以及显色。

如此下来，各位小伙伴就可以坐等锋芒毕露的内参君为我们擒获如下图所示的漂亮且理想的内参图片。



Benjamin G. Cuiffo. et al. MSC-Regulated MicroRNAs Converge on the Transcription Factor FOXP2 and Promote Breast Cancer Metastasis. *Cell Stem Cell* 15, 762–774.



Migliaccio et al. B-cell receptor-guided delivery of peptide-siRNA complex for B-cell lymphoma therapy. *Cancer Cell International* (2015) 15:50

还在为确定磷酸化位点而烦恼？一键查询
要不要？

作者：静夜谧思

蛋白质磷酸化是指在蛋白质激酶催化作用下把 ATP 或者 GTP 的磷酸基转移到底物蛋白质氨基酸残基（丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸）上的过程。

磷酸化作为转录后修饰中最重要的一种方式，在细胞信号转导的过程中起重要作用，因此磷酸化调控机体生命活化研究是近些年的热点和难点。

在研究的过程中虽然有一些套路，但是，我们往往觉得不轻松，特别是在寻找磷酸化位点的时候，繁重的工作量会让大家身心疲惫，因此快速的查找到激酶的磷酸化位点会我们节省大量的人力物力财力。

今天我就为大家介绍一种非常好用并且行之有效的方法。在这里，我以重要的激酶 AKT 磷酸化 FAF1 蛋白为例，给大家讲述如何一键查询磷酸化位点。

首先，进入 CST 网站，https://www.cst-c.com.cn/?utm_source=baidu&utm_medium=cpc&utm_term=cst&utm_content=cell+signaling+-+general&utm_campaign=ch+-+brand



搜索后，找到 AKT substrate motif 为 RXRXXS*/T*，这里给大家做下解释，这个基序的意思，R 代表精氨酸，X 代表任意氨基酸，*表示此氨基酸发生磷酸化，/表示两个氨基酸中任意一个。

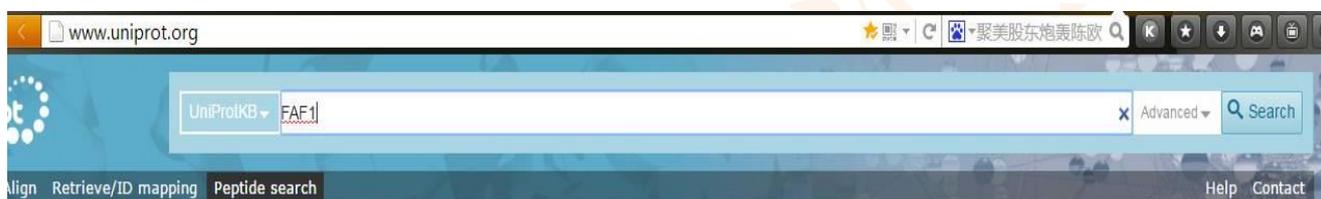
产品 (27)	内容 (15)		
主页 > 关键词: akt+substrate			
排序方式: 相关性			
编号	产品名称	应用	反应性
10001	Phospho-Akt Substrate (RXRXXS*/T*) (23C8D2) Rabbit mAb	WB IP IHC IF F ChIP	All
9614	Phospho-Akt Substrate (RXXS*/T*) (110B7E) Rabbit mAb	WB IP IHC IF F ChIP	H, M, Dm, All

知道激酶作用的基序后，要进入位点预测网站，选择 Option 3
<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>

This form allows you to scan proteins for matches against the [PROSITE collection of motifs](#) as well as against your own patterns.

- Option 1 - Submit PROTEIN sequences to scan them against the PROSITE collection of motifs.
- Option 2 - Submit MOTIFS to scan them against a PROTEIN sequence database.
- Option 3 - Submit PROTEIN sequences and MOTIFS to scan them against each other.

下面分三步：第一步是需要被磷酸化蛋白的序列，我们可以计入 Uniprot 数据库查找 FAF1 的蛋白序列。<http://www.uniprot.org/>



搜索后

Entry	Entry name	Protein names
<input type="checkbox"/> Q9UNN5	FAF1_HUMAN	FAS-associated factor 1
<input type="checkbox"/> P40546	FAF1_YEAST	Protein FAF1
<input type="checkbox"/> P54731	FAF1_MOUSE	FAS-associated factor 1

进入其简介面

- Function
- Names & Taxonomy
- Subcellular location
- Pathology & Biotech
- PTM / Processing
- Expression
- Interaction
- Structure
- Family & Domains
- Sequences (2)
- Similar proteins
- Cross-references
- Entry information

Function

Potentiates but cannot initiate FAS-induced apoptosis.

GO - Molecular function¹

- heat shock protein binding Source: UniProtKB
- NF-kappaB binding Source: UniProtKB
- protein domain specific binding Source: Ensembl
- protein kinase binding Source: UniProtKB
- protein kinase regulator activity Source: UniProtKB
- ubiquitin binding Source: BHF-UCL
- ubiquitin protein ligase binding Source: BHF-UCL

Complete GO annotation...

GO - Biological process¹

- apoptotic process Source: UniProtKB-KW
- cell death Source: UniProtKB
- cytoplasmic sequestering of NF-kappaB Source: UniProtKB
- positive regulation of apoptotic process Source: UniProtKB
- positive regulation of cell death Source: CACAO
- positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain rece

选择 sequence

Isoform Long (identifier: **Q9UNN5-1**) [UniParc] [FASTA](#) [Add to basket](#)

This isoform has been chosen as the 'canonical' sequence. All positional information in this entry refers also to the sequence that appears in the downloadable versions of the entry.

« Hide

```

      10      20      30      40      50
MASNMDREMI LADFQACTGI ENIDEAITLL EQNNWDLVAA INGVIPQENG
      60      70      80      90     100
ILQSEYGGET IPGPAFNPAS HPASAPTSSS SSAFRPWMP'S RQIVERQPRM
     110     120     130     140     150
LDFRVEYRDR NWDVVLEDTC TVGEIKQILE NELQIPVSKM LLKGWKTGDV
     160     170     180     190     200
EDSTVLKSLH LPKNNSLYVL TPDLPPSSS SHAGALQESL NQNFMLIITH
     210     220     230     240     250
REVQREYNLM FSGSSTIQEW KRNVYDLTSI PVRHQLWEGW PTSATDDSMC
     260     270     280     290     300

```

导出其 FASTA 格式文件，获取其序列。将其序列导入上一个数据库网站中，同时将 motif 改为 scanprosite 网站可识别的基序：将 RXXXS*/T* 改为 R-X-R-X(2)-[ST]

STEP 1 - Submit PROTEIN sequences [help]

- Submit PROTEIN sequences (max. 1'000) [Examples](#)
- Submit a PROTEIN database (max. 16MB) for repeated scans (The data will be stored on our server for 1 month).

```
MASNDREMILADFQACTG IENIDEAITLLEQNNVDLVAATINGVIPQENGILQSEYGGGET  
IPGPAFNPASHPASAP TSSSSAFRPMVPSRQI VERQPRMLDFRVEYRDRNVDVVLDT  
TWGEIKQILENELQIPVSKMLLKGWKGDVEDSTVLKSLHLPKNNSLVLTPLDPPSSS  
SHAGALQESLQNFMLIITHREWQREYNLNFSGSSTIQEVKRNVDLTSIPVRHQLWEGW  
PTSAIDD SMCLAESGLSYPCHRLTVGRSSPAQTREQSEEQITDWHMVS DSDGDDFEDAT  
EFGVDDGEVFGMASSALRKSPMMPENAEENGDALLQF TAEFSSRYGDCHPVFFIGSLEAA  
FQEAFFYVKARDRKLAIYLDHDES VLTNVFC SQMLCAESIVSYLSQNFITWAWDLTKDSN  
RARFLTMCRHFGSVAQIRTQKTDQFPLFLIIMKES SNEVLNVIQNTTVDLMMRL  
MAAMEIFTAQQQEDIKDEDEAREARENKREQDEAYRLSLEADRAKREAHREMAEQFRLE  
QIRKBQEEEREAIRLSLEQALPPEPKEENAEPVSKLRIRTPSGEFLERRFLASNKLIWF
```

Supported input:

- UniProtKB accessions e.g. [P98073](#) or identifiers e.g. [ENTK_HUMAN](#)
- PDB identifiers e.g. [4DGJ](#)
- Sequences in FASTA format

STEP 2 - Enter a MOTIF or a combination of MOTIFS [Examples](#) [help]

Supported input:

直接点击 **START THE SCAN**

USERPAT1:

Pattern: **R-X-R-X(2)-[ST]**

Approximate number of expected random matches [Ref: [PMID 11535175](#)] in ~ 100'000 sequences (50'000'000 residues): 15568

421 - 426: RaRfIT

577 - 582: RiRtpS

可以看到，有两个位点 **T426** 或者 **S582** 是符合我们预期的 motif 位点，因此只需要对这两个位点进行验证就行，节省了大量时间。

通过文献，查找，我们发现近期的一篇文章指出了这个位点

ARTICLE

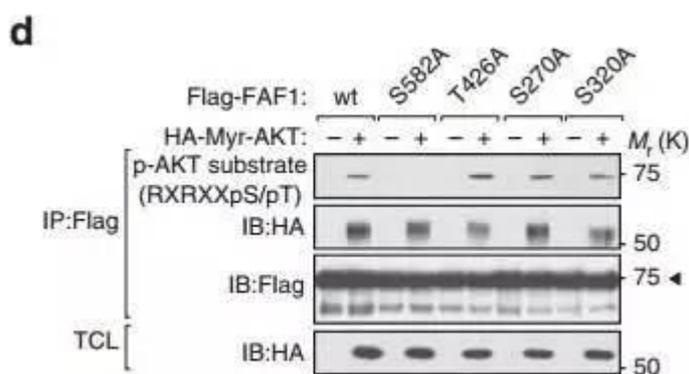
Received 24 Sep 2016 | Accepted 21 Feb 2017 | Published 26 Apr 2017

DOI: 10.1038/ncomms15021

OPEN

FAF1 phosphorylation by AKT accumulates TGF- β type II receptor and drives breast cancer metastasis

Feng Xie^{1*}, Ke Jin^{1*}, Li Shao^{2*}, Yao Fan¹, Yifei Tu¹, Yihao Li³, Bin Yang⁴, Hans van Dam³, Peter ten Dijke³, Honglei Weng⁵, Steven Dooley⁵, Shuai Wang⁶, Junling Jia¹, Jin Jin¹, Fangfang Zhou⁶ & Long Zhang¹



本文作者是通过通过质谱的方法来找到这个位点，费时费力，如果适当的运用生物信息学来预测，会得到意想不到的结果。

技术 | 磷酸化蛋白 Western 跑不出来好捉急，我来给你支招

作者：大肚腩

话说我做硕士课题的时候需要跑磷酸化的 AMPK (p-AMPK)，当时同组四五个孩子一起跑，效果都很不理想，要么是条带过淡，要么是根本不出来。那几个月的时间我们疯狂的到处请教师兄师姐，在各种实验论坛上寻找改进方法，最终出来效果不错，文章也发了，在此总结

几个 Western 跑磷酸化蛋白的要点，希望各位科研民工们少走弯路。

抗体

工欲善其事必先利其器，抗体很关键。这里我们要说的并不是最贵的就是最好的，如果条件允许，建议同时购买不同厂家的抗体，一起来试一试，因为有时候即使是最好的品牌，不同批次稳定性也不一样。抗体从订购到到货有一定的时间，所以到货后请尽快分装好，准备做实验，我们当时因为实验进度问题，抗体到了 3 个多月才开始正式实验，这样拖了时间找厂家售后申诉也是很被动的。

我们那时候用 CST 的一抗，感觉效果不稳定，也可能跟抗体放久了有关。最后买了另一家代理的抗体算是有了比较稳定的结果。当然，还是选择购买口碑较好的公司的产品为佳，这样即使出了问题售后也会跟进。如果经费有限，可以买小包装的产品先试试，不少抗体公司还有 5ul 的抗体试用装免费申请。

再者，孵育一抗的时候，建议用新鲜抗体，什么意思呢？很多同学因为想图省事，很多时候配好孵育液，每次孵育好之后再次放进冰箱等待下次重复利用，一些比较好跑的蛋白到时没啥问题，但是磷酸化的蛋白建议每次都用新鲜的抗体原液，将条带剪下来后用杂交袋塑封好，按 1: 1000 的比例加入抗体原液孵育，再这种情况下，100ul 的抗体也是能用很久的，所以尽量每次都用新的抗体。

蛋白上样

普遍反映磷酸化的条带很淡，有时候达不到制图标准，这点可以加大上样量来解决，另外，磷酸化蛋白一般与非磷酸化的蛋白一起跑一起制图，它本来就是要比非磷酸化的要淡一些，不要过分担心。

电泳

不同 kb 的蛋白电泳时间有所差别，参数啥的要用脑子更改，不能一成不变，避免发生那种蛋白跑不见了的惨剧。

封闭

这个步骤非常重要，强推 BSA 封闭，不要用脱脂奶粉封闭，BSA 封闭对磷酸化的抗体效果非常好，而且也不贵，具体怎么配百度之。另外，BSA 封闭液倒是可以反复使用不至于向奶粉一样臭掉，用来孵育一般非磷酸化的抗体，效果同样棒棒哒！

再者，封闭时间可以延长，一般封闭 2-3 小时的情况下，可以封闭延时到 4 小时，所以按照从早到晚做实验的时间，用 BSA 配好封闭液开始封闭的时候，您就可以慢慢的约个火锅唱首歌再回来了，实验本来就很辛苦，不要再依赖百度外卖大叔了。

洗膜

严格遵守洗膜时间，不得减少次数，每个步骤洗 3 次，每次可以洗长一点，比如（11-12 分钟）。

如何优雅地获得漂亮小分子蛋白条带

作者：阿甘

做过 Western-Blot 的童鞋知道，分子量小于 30KDa 的蛋白分子不容易做。做为一只电泳狗，我被小分子蛋白折磨的是遍体鳞伤。小分子蛋白虐我千百遍，我待小分子蛋白如初恋。抱怨是没用的，想方设法解决问题才是王道。

一次又一次的调整方案，一次又一次的徒劳无功。正当我感到绝望之时，正当老板对我叹息失望之时，我的小分子蛋白结果出来了。从此以后，我的小分子蛋白之路顺利许多。在此，我总结了的小分子蛋白之路经验，供有需求的童鞋参考。

1

提蛋白的过程在 30 分钟之内完成，提完蛋白立即加入上样缓冲液煮沸（煮沸的时间长一点，一般 20 分钟），准备好蛋白样品后立即电泳。（小分子蛋白容易形成多聚体，这样可以大大减少多聚体的形成）。

2

电泳时，电泳的时间要足够长。我的习惯是先用 60-80V 电压跑完浓缩胶，再以 100-120V 电压跑分离胶，溴酚蓝电泳至玻璃板底部。伯乐系列的电泳槽一般电泳 2 个小时左右，GE 以及百晶系列的电泳槽要电泳 4 到 5 个小时。电泳时要在冰水浴中进行。最好用 1mm 和 1.5mm 厚的胶（若用 0.75mm 厚的胶时要适当缩短转膜时间）。

3

转膜时，尽量用湿转法（半干转也可以，但是容易转过）。转膜缓冲液中，甲醇浓度要达到 20%。PVDF 膜，财大气粗的土豪可以用 0.22 微米的膜。对于我们大多数穷人来说，0.45 微米的膜也是可以的。以下是我摸索出来的转膜时间（湿转法，0.45 微米的膜），供大家参考。

凝胶厚度	转膜电流	转膜时间
0.75mm	250mA	25min
	300mA	20min
1.00mm	250mA	40min
	300mA	30min
1.50mm	250mA	48min
	300mA	35min

4

一抗孵育 因为多数小分子蛋白的表达量较少，所以我一般孵育至少 48 个小时，甚至孵育 72 个小时。

以上方法适用于分子量在 20-30KDa 的蛋白。若蛋白分子量小于 15KDa，则不用 SDS-PAGE 凝胶电泳（蛋白与 SDS 共迁移，影响分离度，得不到很好的分离效果），应该采用 Tris-Tricine 缓冲系统与 Tricine 分离胶。具体操作步骤见《精编分子生物学实验室指南》338-340 页（这本书每个实验室必备，若没有，可以在孔夫子旧书市场上买一本）。

需要注意的是，Tricine 电泳时，蛋白样品用 Tricine 样品缓冲液处理，加样前在 37-40°C 沙浴中处理一个小时（不要煮沸！不要煮沸！不要煮沸！重要的事情说三遍）。内槽中加满阴极缓冲液，外槽中加满阳极缓冲液（千万不要加反了。否则蛋白全部进入缓冲液！）。

最后，祝做小分子蛋白的童鞋实验之路顺利，早日做出满意的结果。

身经百战，我终于找到在 WB 中顺利获取大分子蛋白芳心的诀窍

作者：阿甘

分子量大于 150Ka 的蛋白，经常折磨我等实验狗。想当初，我辛辛苦苦忙到深夜，结果发现显影空空如也。连续几个月如此，我的内心是何等抓狂。当大分子条带第一次出来的时候，我的心里特别开心，就像见到了初恋情人一样。看到周围有同仁受困于大分子蛋白，想一想自己当初所面对的困境。

在此,阿甘想分享一下大分子蛋白的心得，希望这些经验对那些与大分子蛋白奋战的童鞋提供帮助。

提蛋白时应加入 RIPA 强效裂解液，在 4°C 环境下静置的时间延长十分钟到二十分钟。这样可以充分裂解大分子蛋白（裂解不充分，大分子蛋白的电泳速度会很慢）。电泳时，电泳的时间要足够长。

电泳全程采用 120-150V 的高电压，使 Marker 拉开足够大的距离。电泳时要在冰水浴中进行。

转膜时，湿转法与半干转法均可以（湿转法获得条带漂亮。半干转转膜效率高），转膜时，要保留分离胶（好多分子量超过 250KDa 的蛋白就残留在浓缩胶中！这是血的教训！当初好几次傻傻的把浓缩胶扔了，结果神马条带都没有！）。

先说湿转法,转膜缓冲液中甲醇浓度最高 10%,加入 SDS,使 SDS 终浓度达到 5%(大于 300KDa 的蛋白,转膜液中 SDS 的终浓度可以到 10%)。以下是我摸索出来湿转法的转膜时间(我曾经试验过 30mA 小电流转膜过夜的方法, PVDF 膜上神马都没有。建议大家不要尝试!)

蛋白分子	转膜电流	转膜时间
150-180KDa	300mA	3h-3h30min
180-250KDa	300mA	4h-5h
>250KDa	300mA	5h30min-6h

用半干转时转膜效率高。恒压模式设置为 40V 电压,转膜 60-90min。一般小于 400KDa 的蛋白都能转到 PVDF 膜上。

或者用恒流法转,电流大小设置为 PVDF 膜的面积,转一个小时左右就可以出来。若怕转膜过头,可以将两张 PVDF 膜重叠起来(总会有一张膜上有条带)。

因为多数大分子蛋白是膜蛋白,表达较少,建议延长一抗孵育时间。我有一次甚至孵育了四天才出结果。大分子蛋白与 PVDF 膜的结合不是很牢固,容易脱落,因此在洗膜时要操作轻柔,不要过于粗暴,否则抗原抗体复合物容易脱落。

这些经验是我从几百次失败的实验中总结出来的,希望对大家有所帮助。实验失败不可怕,重要的是要勇于面对,仔细思考,敢于改进。最后,祝大家实验顺利,早出漂亮结果!

师兄给师妹的私相传授：清晰的条带是这样跑出来的

作者：提拉米苏

新来的 90 后师妹很得大师兄喜欢，白白净净的江南女孩，活泼嘴甜，是实验室的开心果，最近两天却总是眉头紧锁，一声不吭。

大师兄哪看得过去？一会儿朝她瞅两眼，再瞅两眼，终于还是忍不住发问了：“你这是怎么了，像别人欠了你几万块似的？”

师妹翘着嘴巴说：“我是不是个大笨蛋啊，怎么每次跑出来的条带都不对劲呢？这都重复做了多少遍了，还是这死样！”

大师兄：“原来是因为这个跟自己较上劲了，长嘴是干什么的？要大师兄是干什么的。”

于是实验室里就听到他们俩啾啾细语、如此这般起来，现在知道什么叫进水楼台先得月了吧？为什么有点姿色的师妹总是被捷足先登了呢？

郁闷的我只有在旁边干瞪眼的份，不过灵机一动，何不把大师兄的 western blot 八大秘诀给“偷”了来，下次岂不是我的“撩妹”资本了？只不过我这人是个急性子，哪里藏得住东西，这不就跟大家分享来了？



1.制胶: 先制分离胶, 再制浓缩胶, 严格按照制胶说明书来就可以了。需要注意的一点是制胶一定要混匀! 混匀! 混匀! 个人经验是每加一种试剂, 就混匀一下, 直到最后一种试剂加完。

对于初学者, 还要区分制胶的玻璃板是 1.0cm 还是 1.5cm 的, 两者需要的制胶液体量是不一样的。另外, 玻璃板一定要洗干净, 本人平时都是用洗洁精洗干净然后用水冲洗最后用纯水冲洗, 再放在烤箱里烤干并晾至室温。

2.点样: 点样的过程很简单, 表手抖就 OK 了。再者, 点样的过程一定迅速, 不然前面的样容易弥散, 虽说不至于太影响结果, 但对于有强迫症的同学来说还是比较致命的伤害。

3.跑胶: 注意, 跑胶时也会出现各种乌龙, 如果跑了好大一会儿还不见条带下移, 请看一下你的玻璃板是否放反; 如果跑胶时发现温度过高, 可检查一下正负极是否连接反了。(呵呵, 这些乌龙我都出现过) 跑胶建议恒压, 80V 30min, 120V 60min (这个得具体看目的条带的位置, 时间可相应增减)

4.转膜: 请牢记转膜顺序 (黑色面-滤纸-海绵-胶-膜-海绵-滤纸-白色面), 如若搞不清楚, 可想象一下, 蛋白质是带负电荷的, 应该是往正极方面跑, 所以膜应该放在正极面。转膜时要恒流, 285mA—300mA 60min。特别注意的是跑胶时恒压, 转膜时恒流这个条件。

5.封闭特异性抗原: 封闭和孵育抗体也是非常关键的步骤, 封闭建议大家用 5%的脱脂奶粉, 2 个小时 (或者过夜), 不建议用 BSA。

6.一抗孵育: 封闭完以后不用洗直接孵育一抗, 一抗配置溶液是 3% BSA 的 TBST (注意封闭和抗体孵育用的蛋白, 封闭用牛奶, 抗体孵育用 BSA, 这个条件是决定条带是否齐整及有无杂带的关键), 过夜 (或 2 个小时)。时间上与封闭错开, 如若封闭过夜, 则一抗只需要两个小时。

7.二抗孵育: 洗三遍后孵育二抗 1 小时, 洗的时间很重要, 我的习惯是洗三遍, 第一二三次分别是 5min、10min、15min。还要特别强调的是, 孵育和洗膜用的转速是不一样的。孵育是低速, 使膜和抗体有充分的接触时间; 洗膜时要用高速, 以使膜洗得干净。还有, 一抗孵育时正面朝下, 封闭和二抗孵育时都是朝上。(表问我为什么, 我也不知道, 经验之谈)

8.曝光: 当满足了所有以上的实验条件之后, 你就可以自信满满地去曝光了。相信我, 不管是磷酸化的还是普通的蛋白, 都会出现平整光滑的条带。

最后说一下配置实验所需的各种溶液：TBST 可以买，也可以自己配置；同时 TBST 可以用 PBST 代替，即 PBS 加吐温就可以了。封闭和抗体孵育时所用的 5%的脱脂奶粉和 3%的 BSA 都是用 TBST 配置。洗膜时用 TBST 和 PBST，这个就不用说了吧。

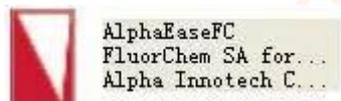
在座的师妹们，接受了我的礼物后，你们被我撩到了没？

Western Blot 结果处理五分钟就能搞定！

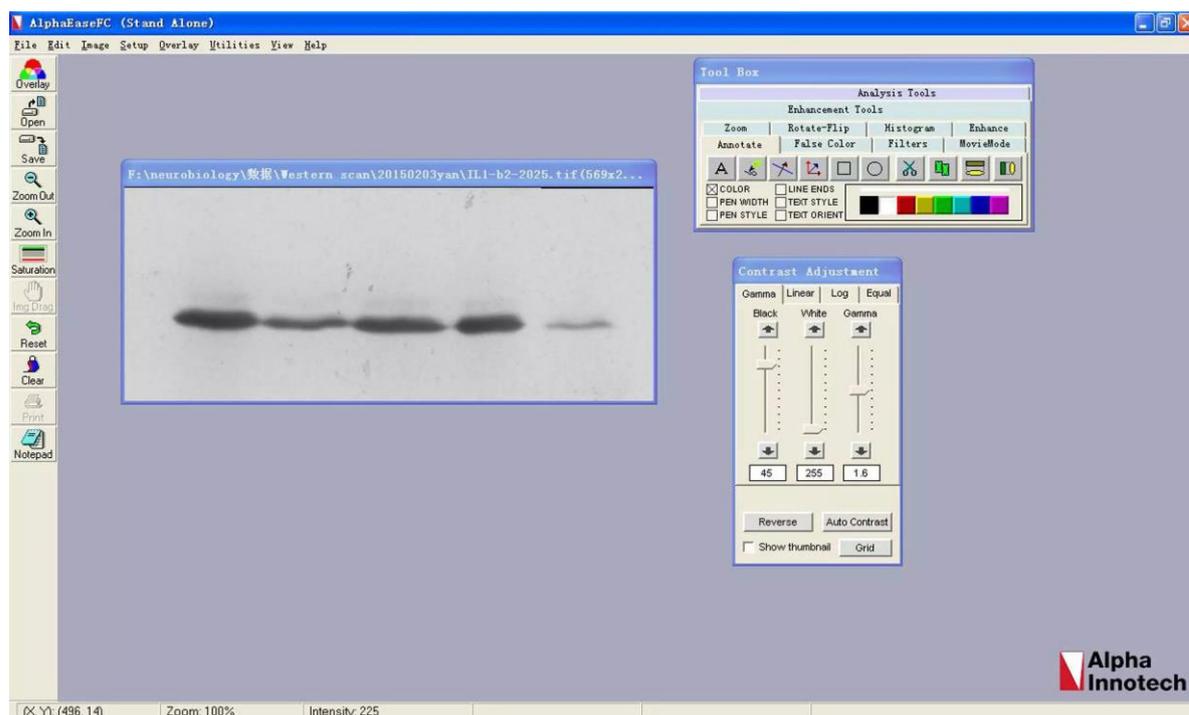
作者：翠花

废寝忘餐、呕心沥血、历尽艰辛，终于拿到一张漂亮的 Western Blot 图，这时却发现不知道如何计算灰度值，肿么办？Don't worry!翠花今天就跟大家谈谈如何使用 AlphaEaseFC 软件来处理 Western Blot 电泳图吧。

首先，鼠标点击图标：

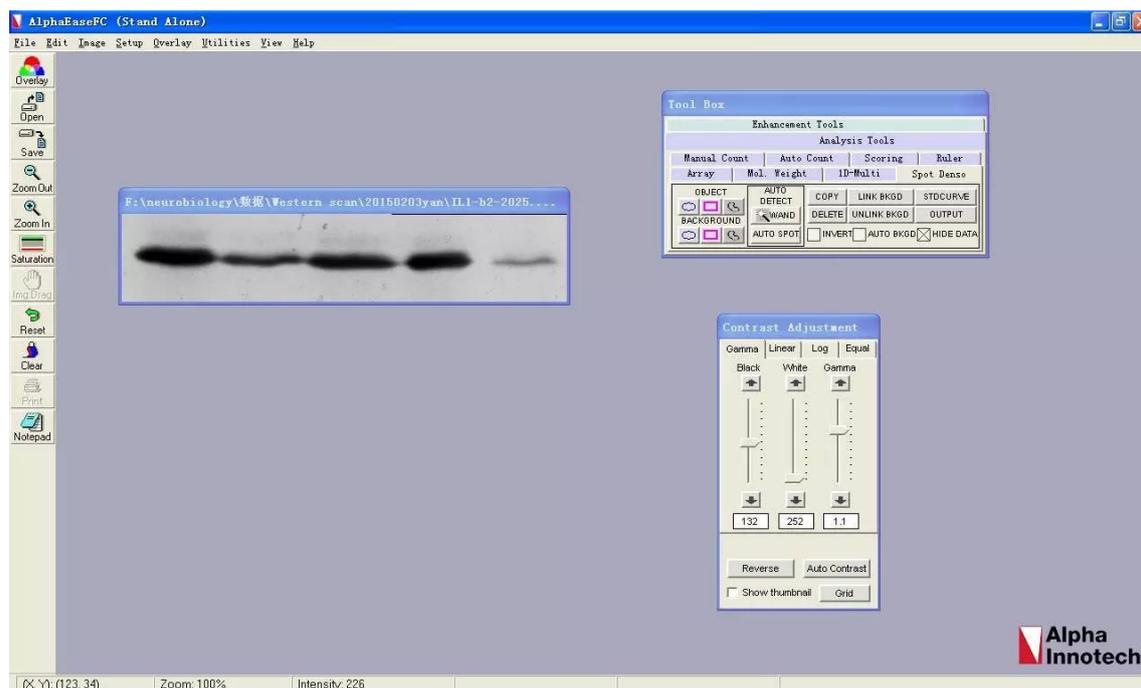


打开 AlphaEaseFC 软件，然后在“File”中点击“open”，打开一张 western blot 的结果图，于是出现以下界面：



界面分为五个部分，横竖两个菜单条，三个窗口：图片、Tool Box 和 Contrast Adjustment。打开图片后，若需要裁剪图片的话点击“Edit”，选中“Edit Activation”，在图片中选取裁剪区域，鼠标点到白色正方形可以调整裁剪区域大小，再点击“Edit”，选中“Crop”，若想重新保存裁剪后的图片可以点击“File”，选中“Save modified”，若要覆盖原图片可以选“Save”。左边的菜条有一些快捷按钮：图片叠加、打开、保存、放大、缩小、饱和度调节等。

然后利用“Contrast Adjustant”中如灰度系数 Gamma、线性 Linear、使色彩均化 Equal 等选项来调整条带与背景的最适合的灰度。以下是裁剪和灰度调整后的 western 图。

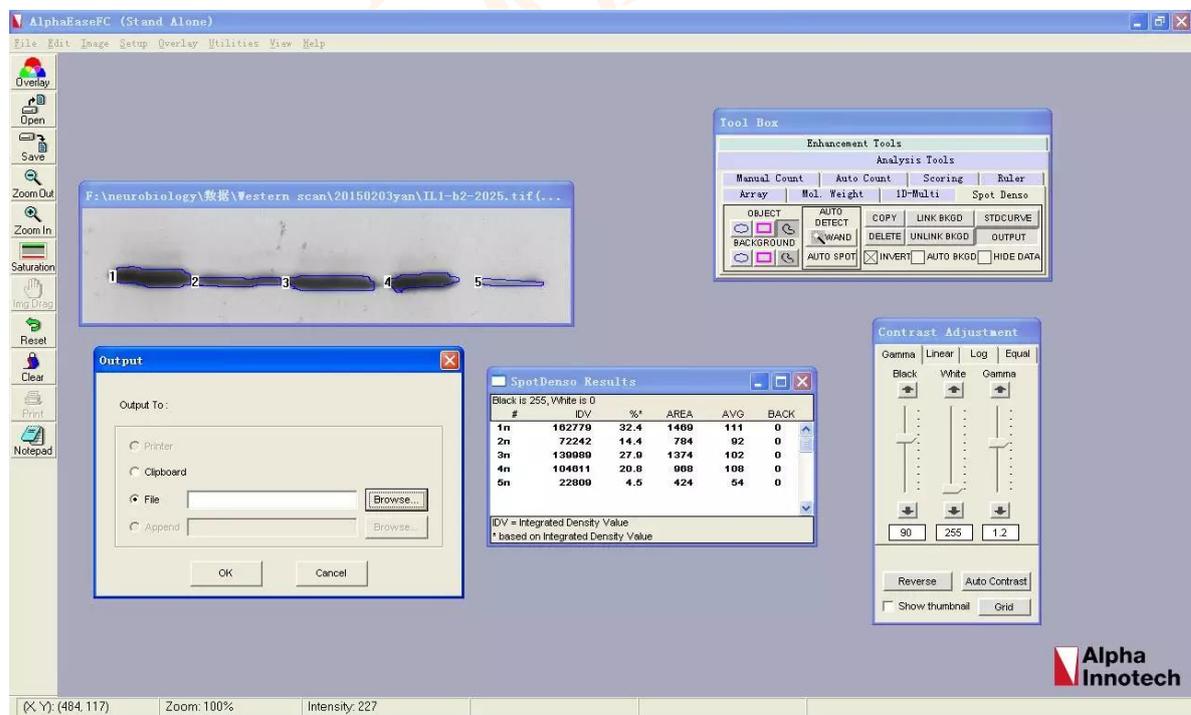


如果图片本身不够完美，比如有噪点或者轮廓模糊，不用怕，我们可以帮它“化个妆”，点击“Enhancement Tools”，点击“Filters”，再选中“sharpen”和“Filter”就可以去噪点和使条带锐化，条带瞬间变得美美哒。

接下来在“Tool Box”中选中“Analysis Tools”，选中“Spot Denso”，界面会弹出“Spot Denso Results”窗口，Spot Denso Results 中 IDV 一栏所示是目标条带的灰度值，注意“Black is 255, while is 0”，若显示为“Black is 0, while is 255”时则要在 Tool Box 中选中“invert”逆转过来。在这里的“Object”有三种方式供选择来圈住条带，表示用椭圆形来圈条带，表示用长方形来圈条带，而表示按照鼠标移动的轨迹来圈住条带，三种方式各有利弊，手抖的童鞋慎用第三种。本文以第三种方式演示怎样圈条带获得灰度值。点击，在目标条带中沿着条带轮廓将条带圈起，鼠标点到白色正方形处可以调整所圈住的区域大小，接着在所圈的条带以外点击鼠标，目标条带左上方出现“1”，表示第一条条带，在“Spot Denso Results”中 IDV 一栏出现的数值就是该条带的灰度值。然后再点击，重复上述操作圈住第二条、第三条、第四条……条带。

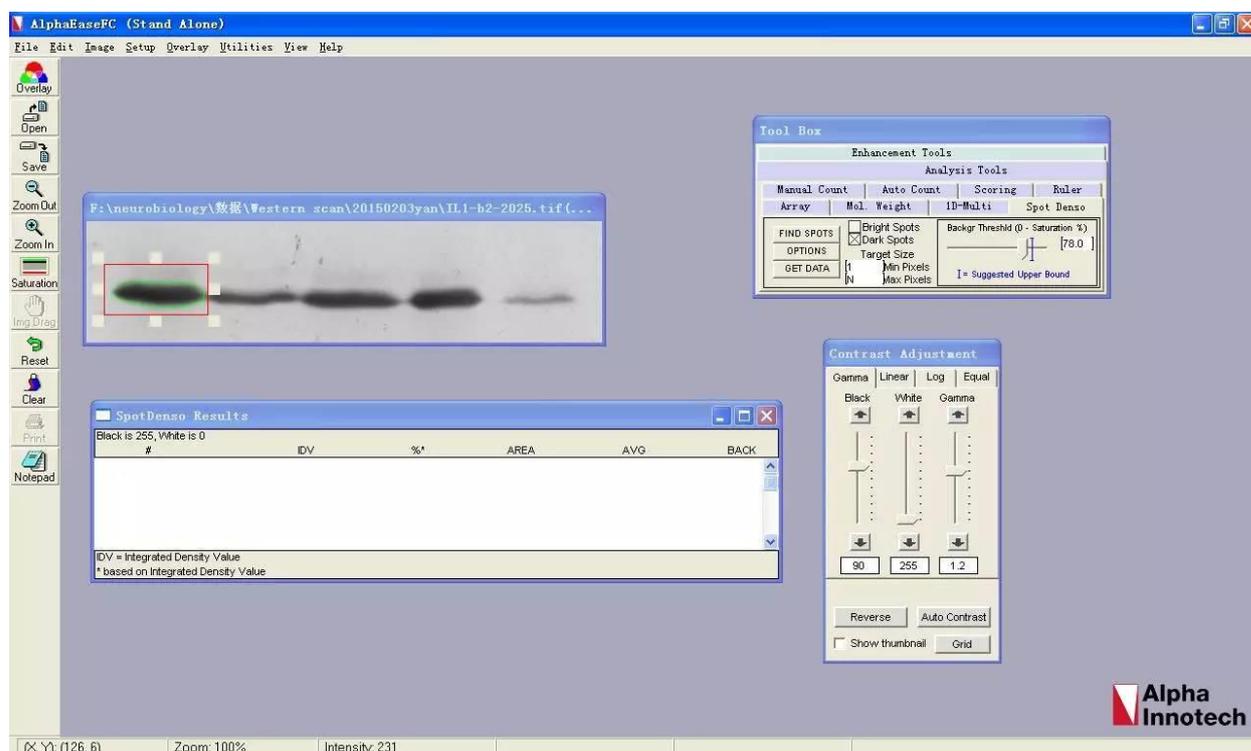


待所有的目的条带都被我们圈起来以后，点击“OUTPUT”，选择保存的地方，则可将灰度值导出，以 TXT 的格式保存起来。



还有一种圈条带的方法，是针对轮廓比较清晰，与背景的对比度强烈的条带而使用的一

种较为智能的方法：在“AUTO DETECT”中选择“AUTO SPOT”，在 western 图中选中要圈住的条带区域，然后回到“Tool Box”中点击“Find spot”，弹出一个对话框以后，很快便自动寻找到目标条带，如下图为绿色线条圈住的条带，接着点击“get data”，获得 IDV 值，点击“OUTPUT”，选择保存的地方，则可将灰度值导出。



最后将 Txt 里的灰度值转移到 EXCEL 中,求得各组中目的条带与内参条带的灰度值比值,再以对照组为分母,实验组为分子,获得实验组与对照组的灰度值比。

简单来说,用 AlphaeaseFc 计算 Western Blot 电泳图灰度值分三步走:调灰度美化图片——圈条带获 IDV 值——EXCEL 计算灰度值比值。

自从学会了 AlphaEaseFC,导师再也不用担心我的 western 结果图不会处理了!!

一步一步教你做 WB 图,超简单!

作者：无天

做文献中的 wb 图的话，用 photoshop 简单一点，如果要用 AI 也可以，但是 AI 跟 photoshop 差不多，都是 Adobe 公司出来的产品。

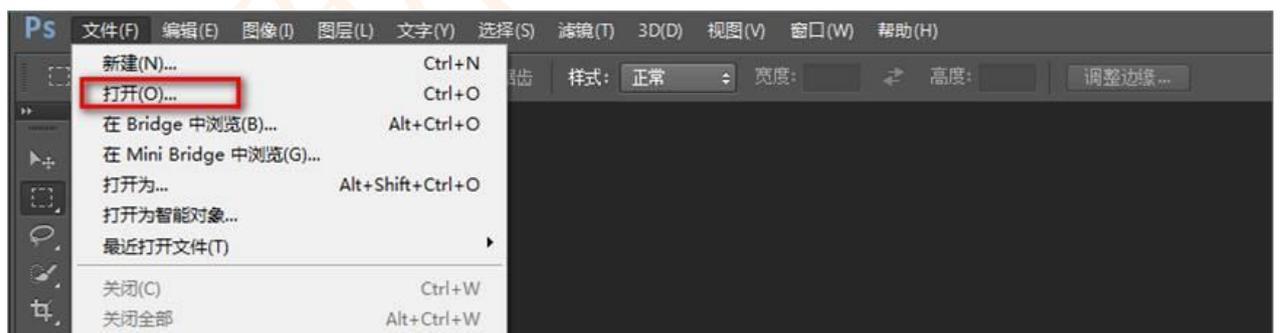
然后 AI 更高级一点的，功能更强大一点。嗯，我个人的建议就是，我们文献作图的话就用 photoshop 就可以了，如果你以后想做更高级更漂亮的图片的话(比如牛逼公司的宣传图片，文案图片)，可以用 AI。AI 的一些操作跟 photoshop 是一样的，差不多的。这里我就教大家怎么用 photoshop 做 wb 图吧。(回复关键词“WB”下载同步视频)

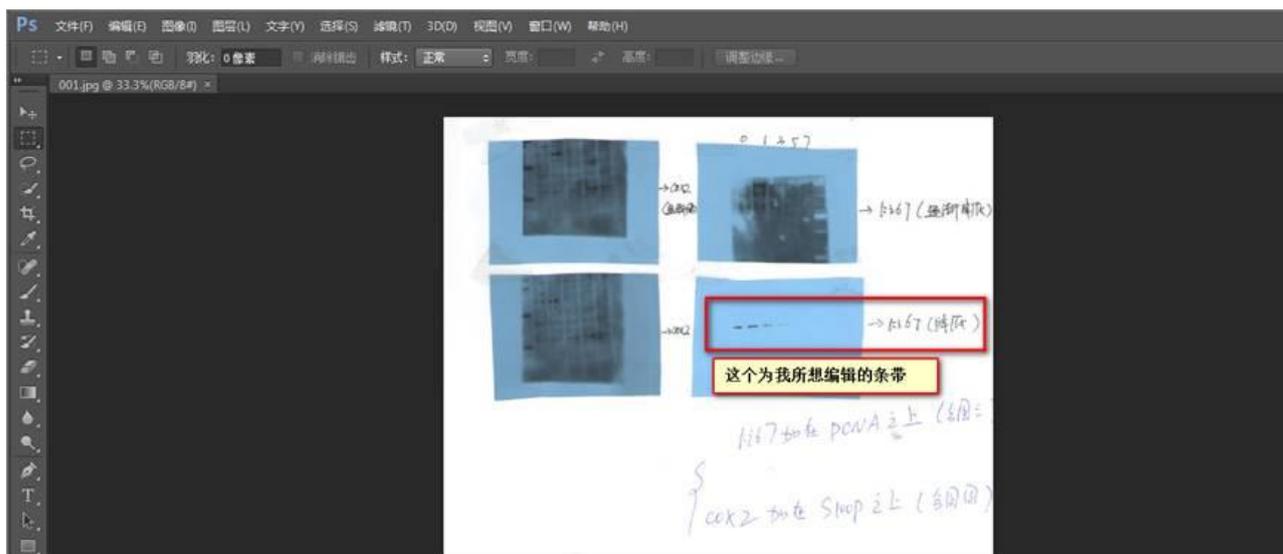
我先说一下用 photoshop 做 wb 图的大概步骤：剪切原图片→去色→调整大小，对齐→调整亮度和对比度→标注文字→然后就完成了。下面我就具体的详细的教大家怎么做：

>>>剪切原图片<<<

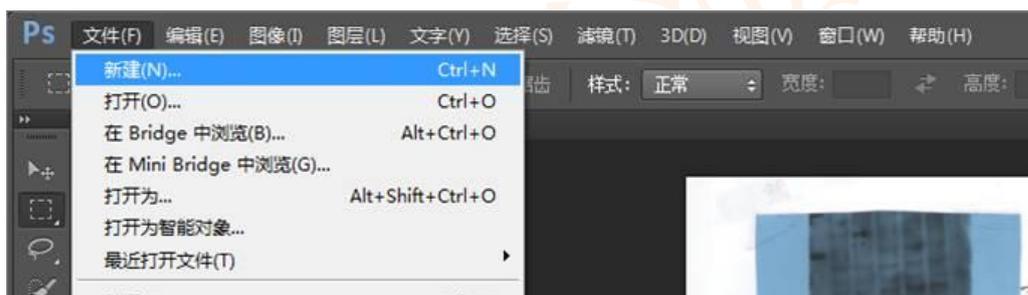
1.首先你要安装 photoshop。这是我的 photoshop 安装包的百度云连接（这里还有分享了大家意想不到的干货哦），（回复关键词 PS 获取 PS 破解版安装包、回复关键词素材获取 AI 和 PS 素材干货）

2.然后就，打开 photoshop。打开你所需要编辑的图片。

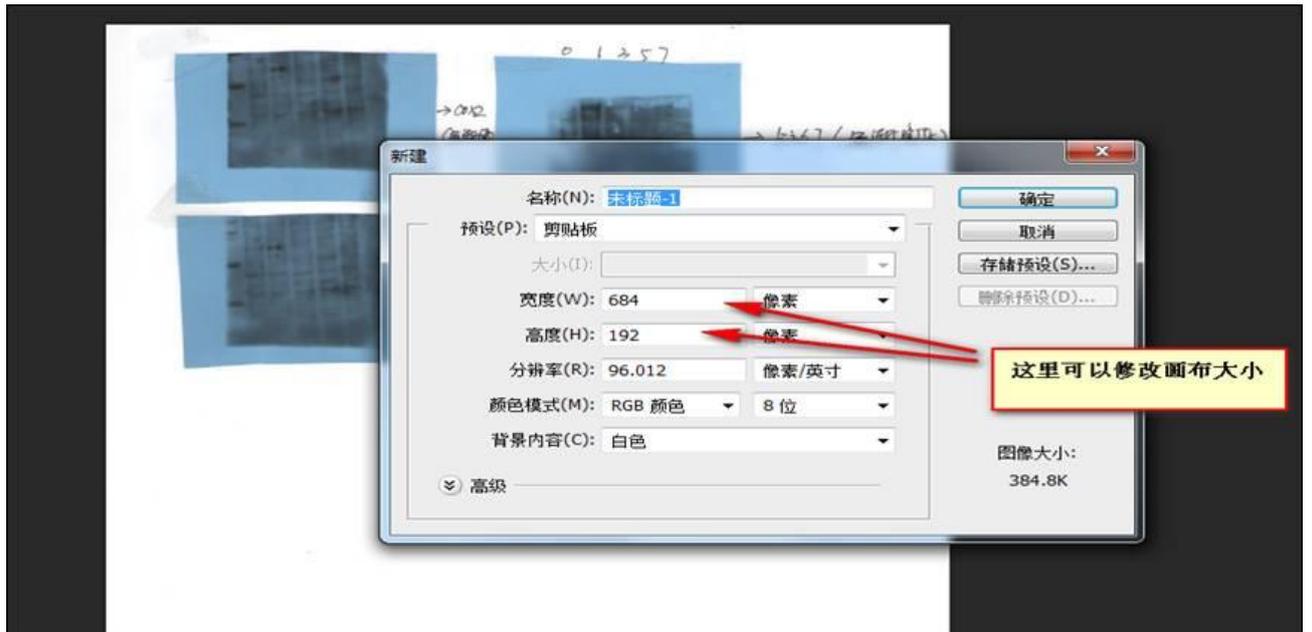




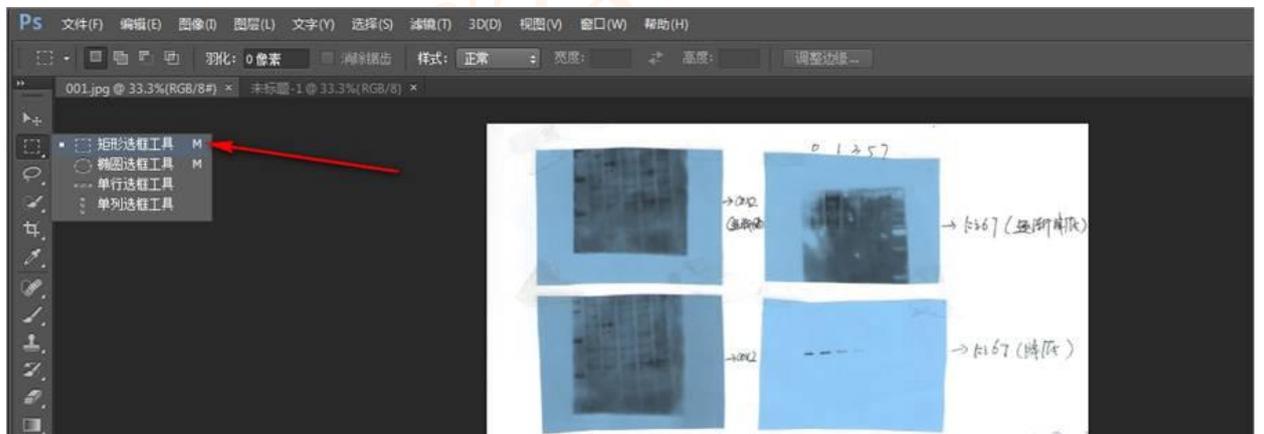
3.然后新建新建一个画布。大小就无所谓了，然后一般会默认之前前一张那个图片的大小。建大一点无所谓，就不能建小了，建小了，你后面不好操作，建大一点的后面还可以剪切。



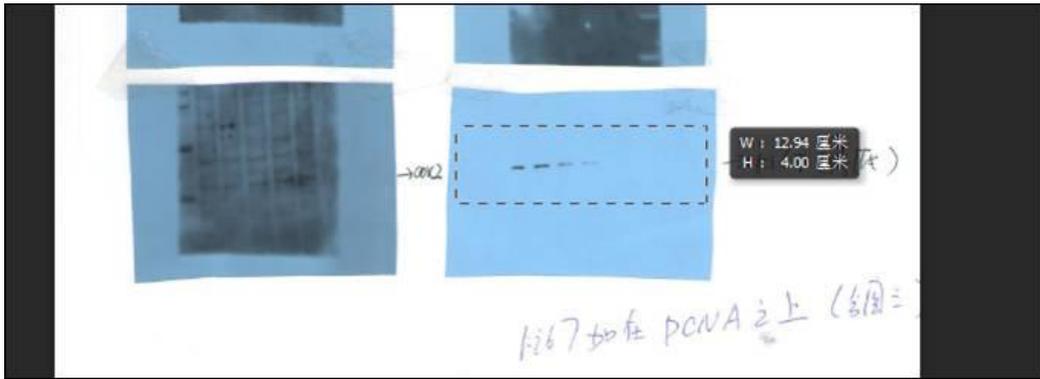
4.宽度和高度看自己需要调整，填自己想要的大小。尽量调大一点，后面还可以剪切。我写的是宽度 2000 像素（像素，你可以理解为相片的大小），高度也是 2000 像素。然后点击左侧的这个工具栏的矩形虚线框，这个叫矩形选择工具。这个是选择矩形的图案用的。



5.选择自己所需要的图像。这个大小暂时不用管它，后面我们还可以慢慢的去调整它。然后快捷键 Ctrl+C，也就是复制你想编辑的条带。

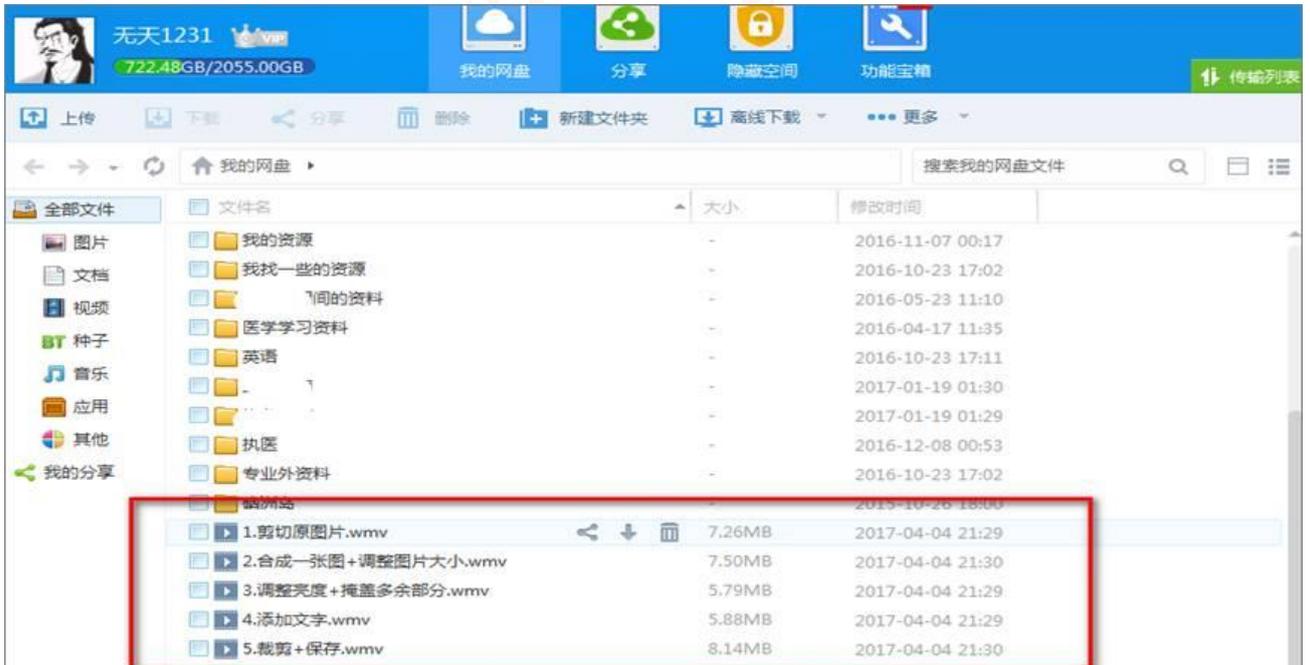


6.然后 Ctrl+v，粘贴到你刚才建的那个画布。Ctrl+t 调整图片大小。Ctrl++ 可以放大整张图片方便操作。图片太小，看都看不清。



当我们鼠标在这个图片的四个角落的时候，他会有一个转弯的剪头，这一个箭头是可以调整我们图片的方向的，条带不在一条线的时候，可以调整一下方向把他调成一条线，会好看一点。

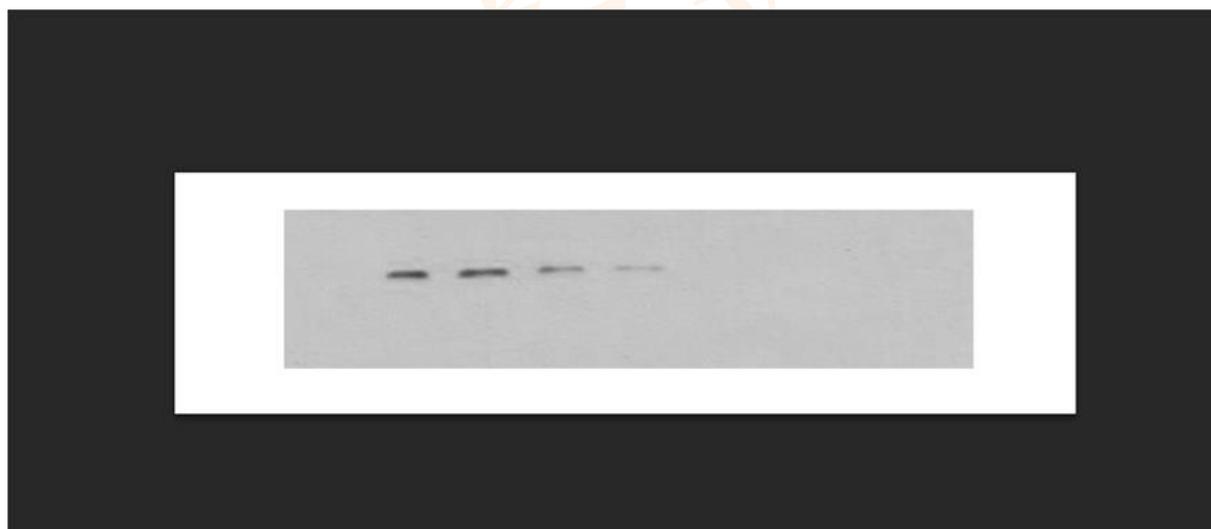
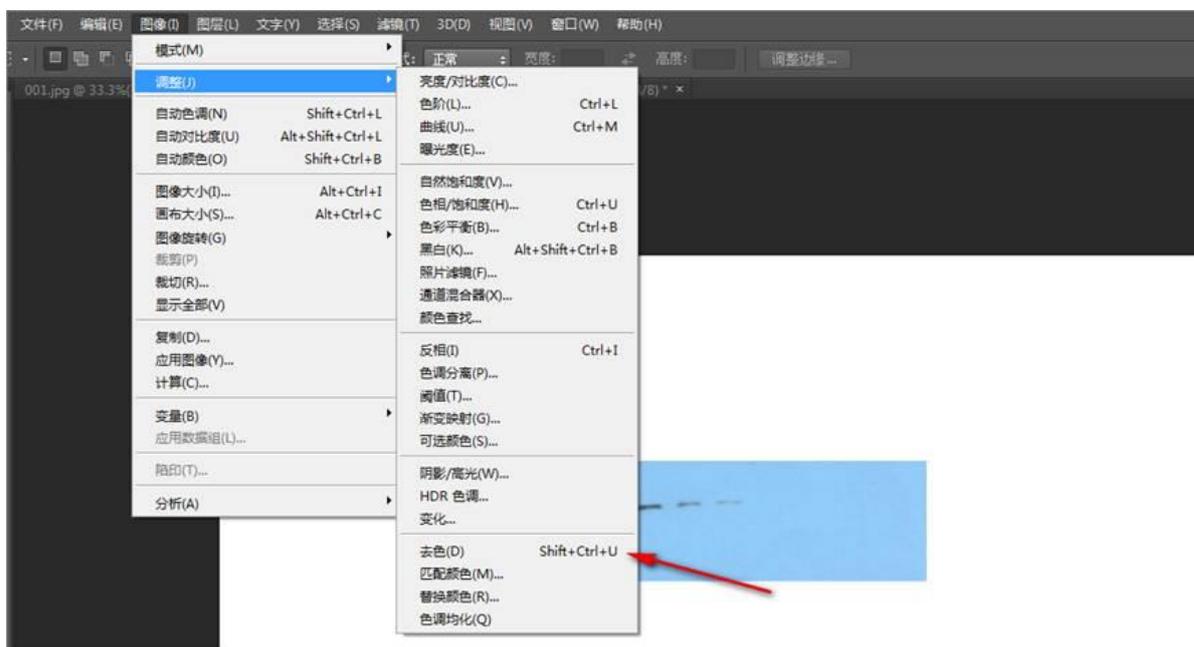
这里那个弯形剪头无法截图，大家可以去我的百度云连接：
<http://pan.baidu.com/s/1o8fmqPO>，看我的视频操作。调整好之后呢，我们就接下来就去色。



>>>去色<<<

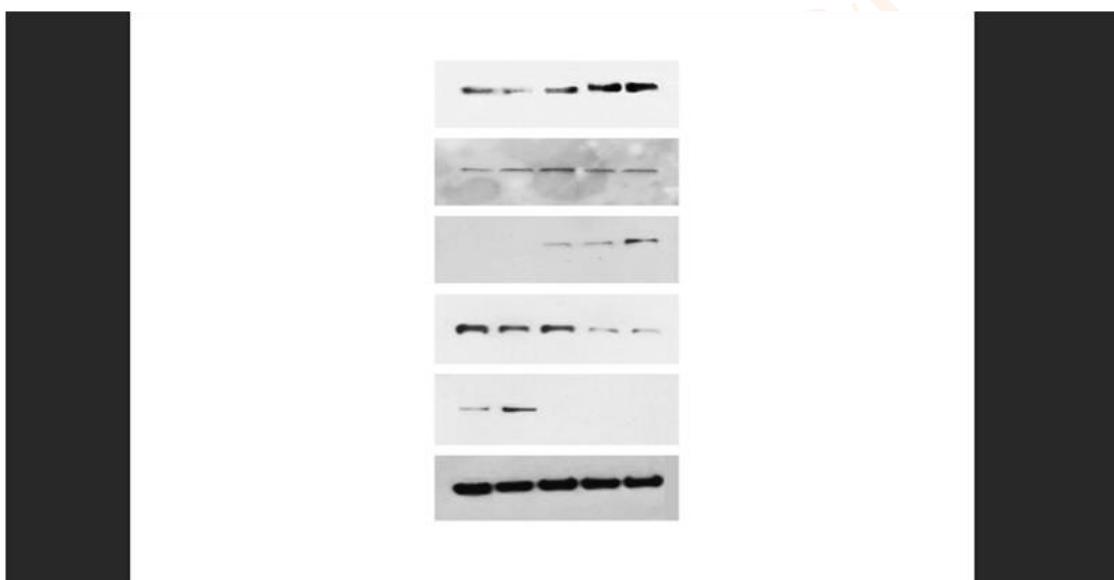
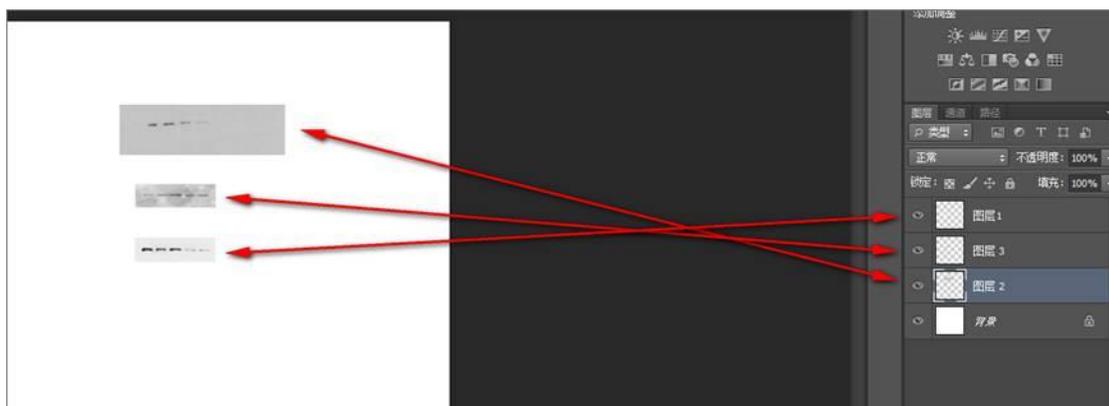
1.点击菜单栏的那个图像→调整→去色。这样我们就可以看到这个原始的那种蓝色图片变成

了黑白照片。然后就是按照同样的方法，建画布然后去色。最后再建一个大一点的画布，把所有我们刚才调整去色的图片，Ctrl+c，Ctrl+v 复制粘贴到一张画布。



>>调整大小、对齐<<

然后，你可以看到，因为我们刚才之前选择了图片的大小都是不等的，所以你现在复制粘贴，到同一张画布上条带也是大小不等的。不用担心，我们刚才不是介绍了一个一个工具吗？就是 Ctrl+t，它就是可以调整图片的大小的。

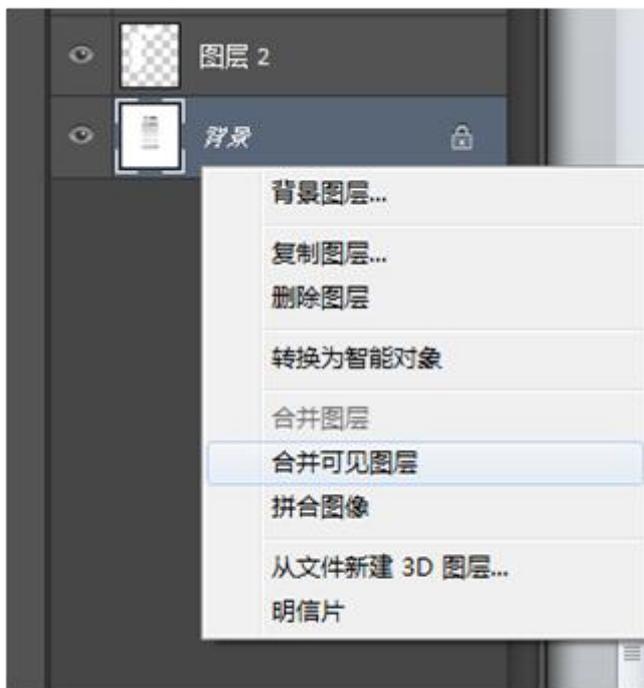


每个图层对应你刚才复制每个照片，你现在一张画布上看到的这个照片是几张图层（照片重叠在一起的）。所以，你想调整哪一张图片，你就在右边的这个图层这里选择哪一个图层，然后再 Ctrl+t，调整条带的大小。

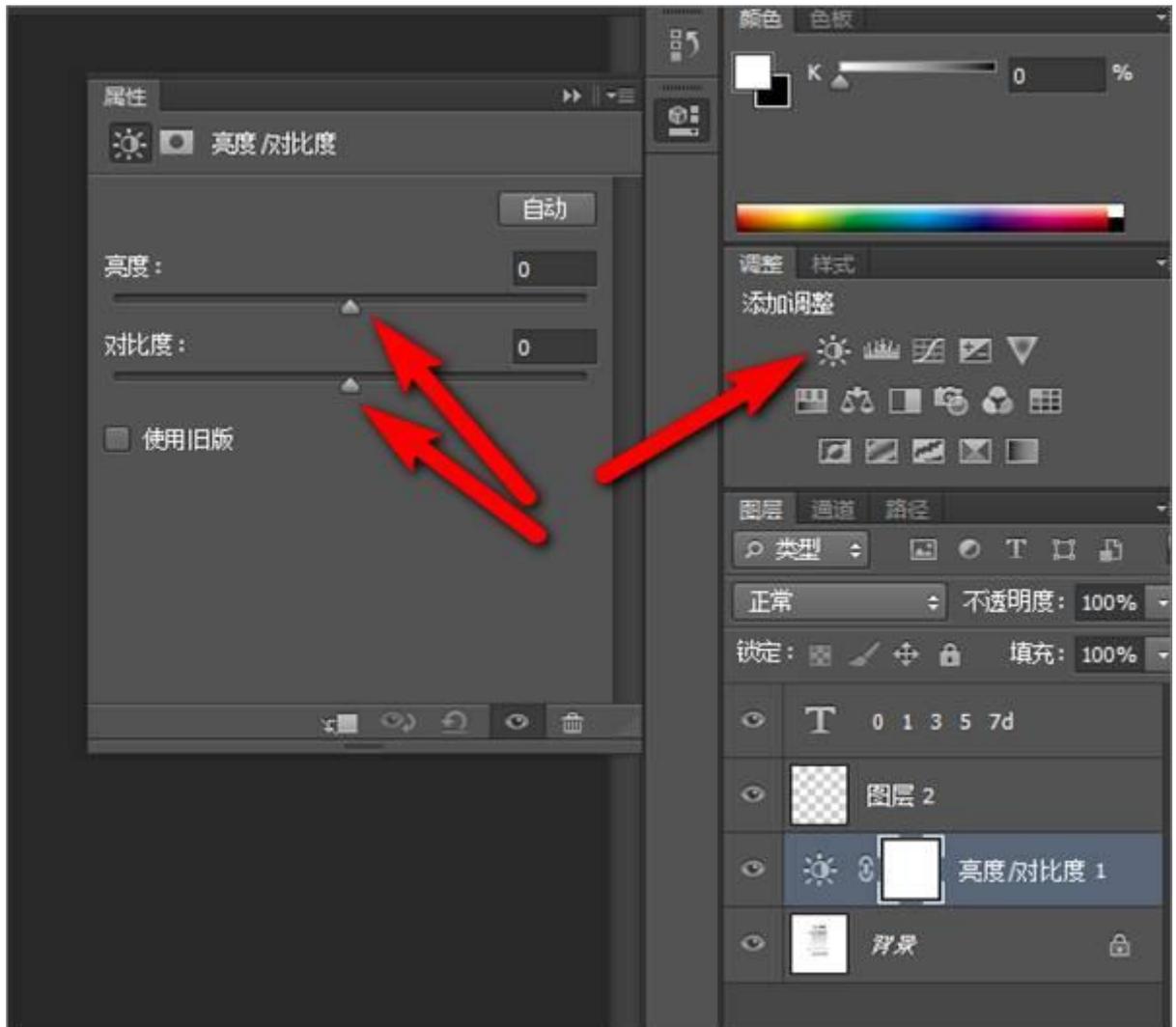
>>调整亮度对比度<<

这个时候，你可以看到那个图片的灰度啊，背景啊都是不一样的，然后我们把亮度和对比度调整下。

1.先点击右键合并图层，把所有图片合并成一张图片。然后调整亮度和对比度。

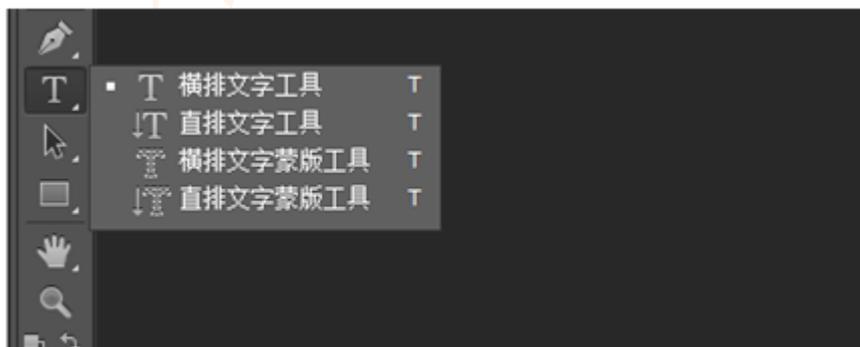


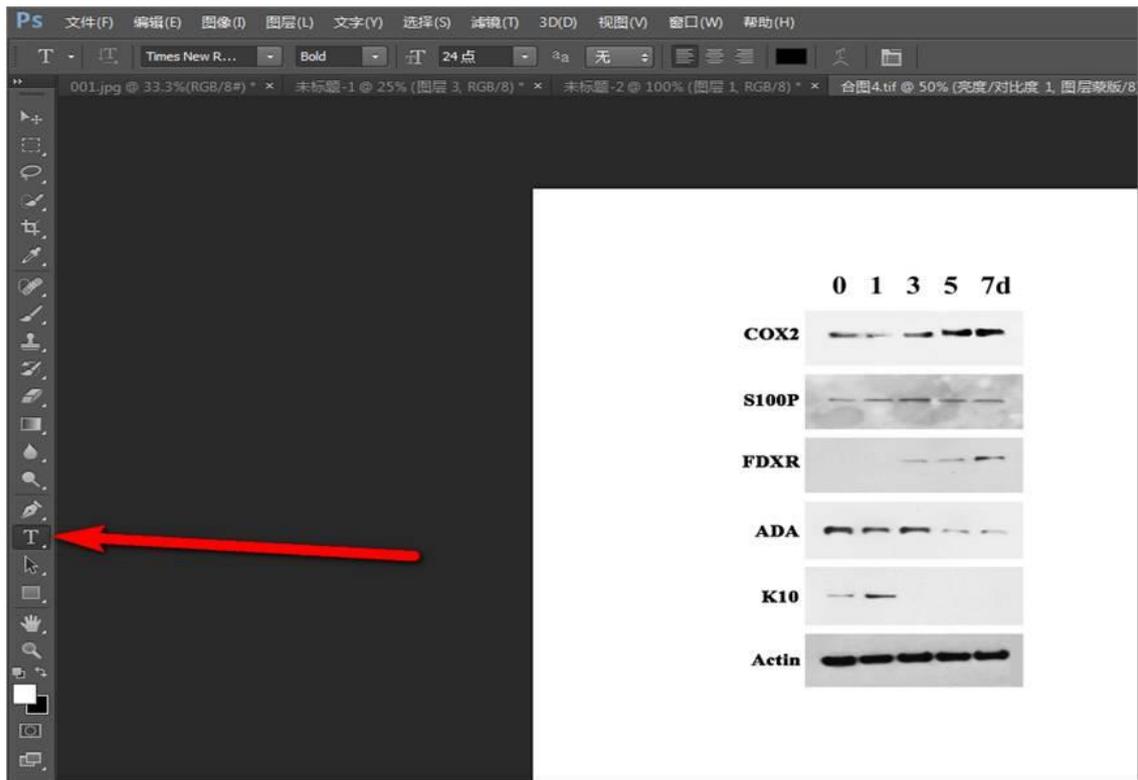
2. 根据自己需要调整的亮度和对比度，把他调到好看的就行了。



>>>标注文字<<<

在左侧工具栏找到文字工具，一般横排文字工具，具体看大家需求。

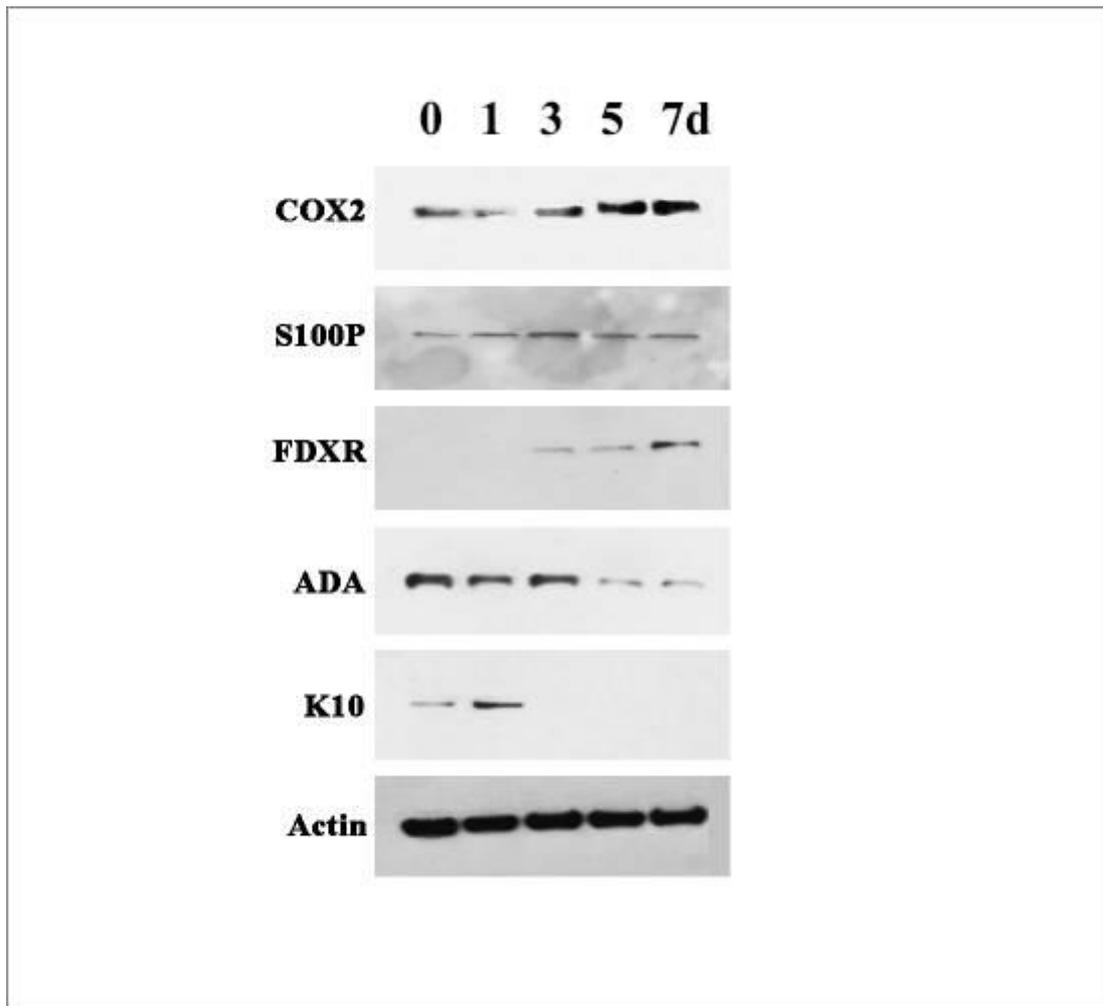




在上方菜单栏可以调整文字大小，形态，字体和颜色。

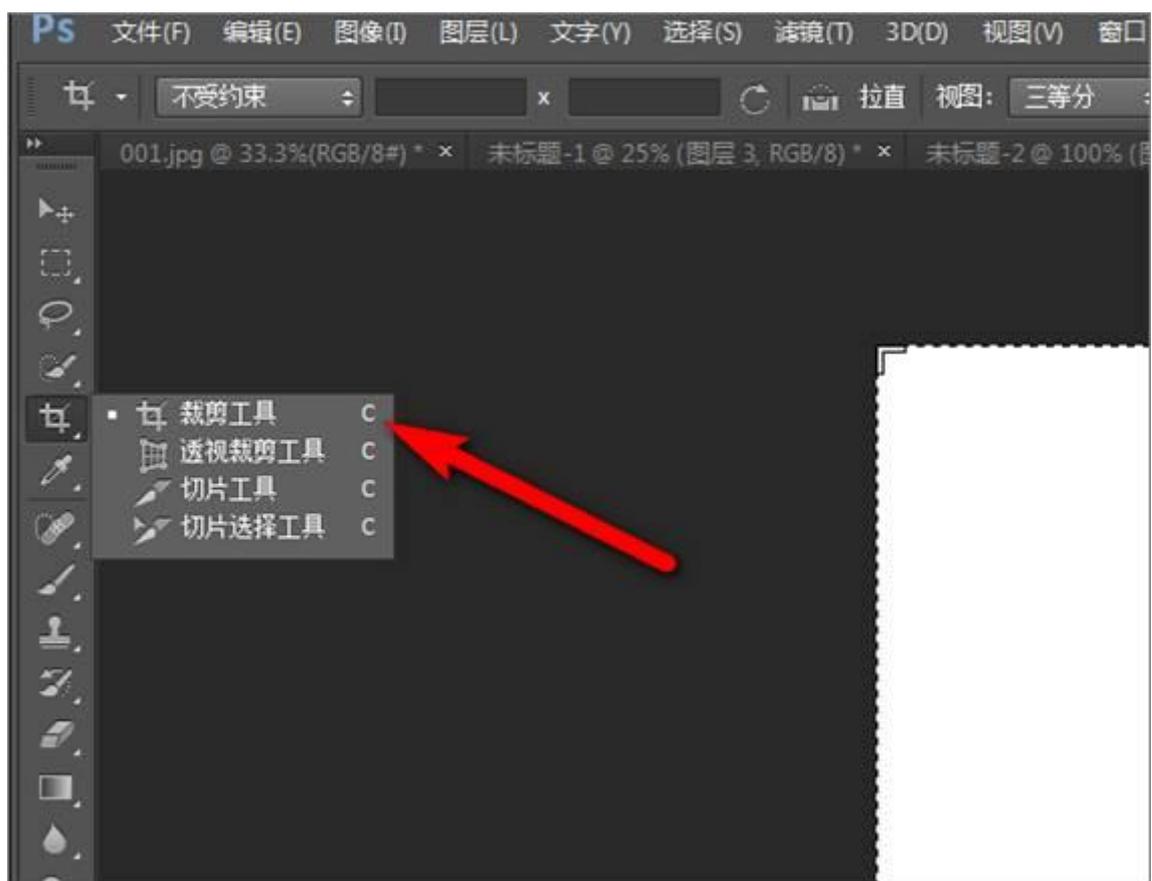


然后文字就标注好了，我们的一张完美 WB 图就完成了。

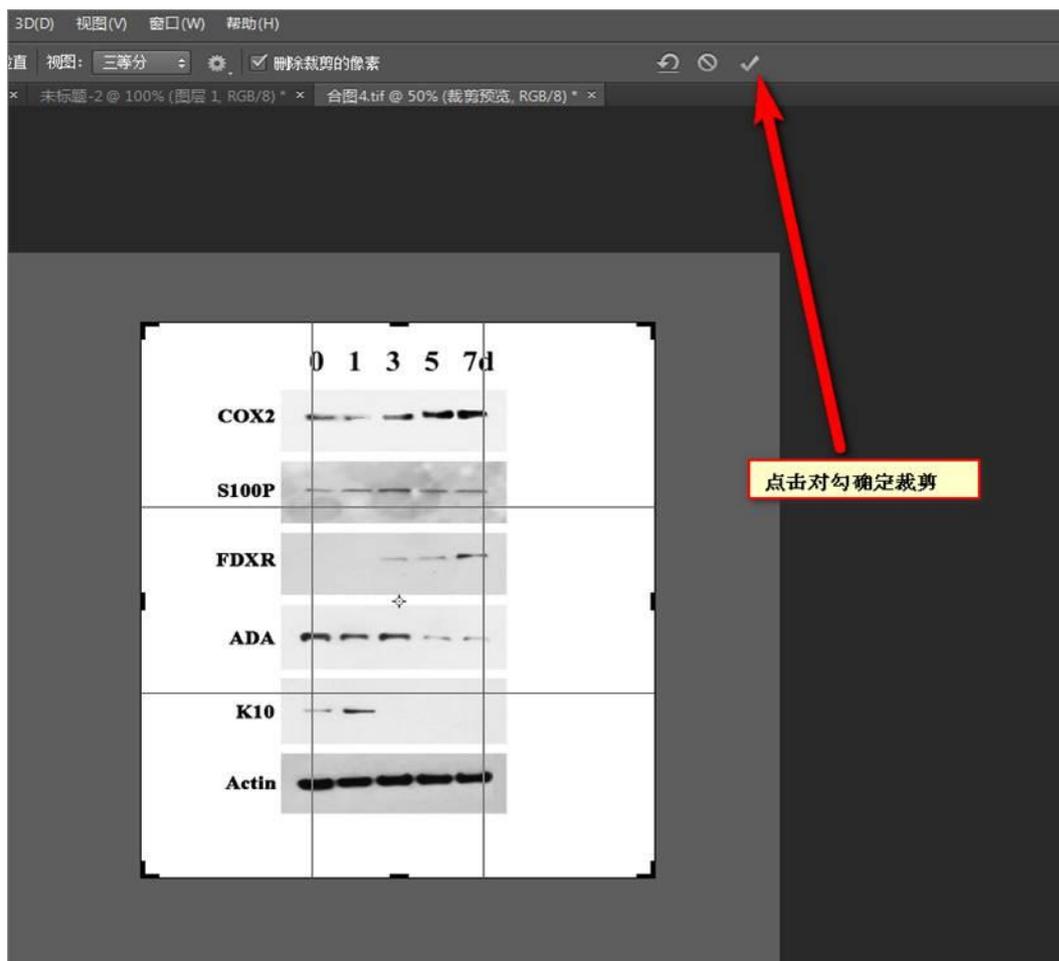


有用的温馨提示:

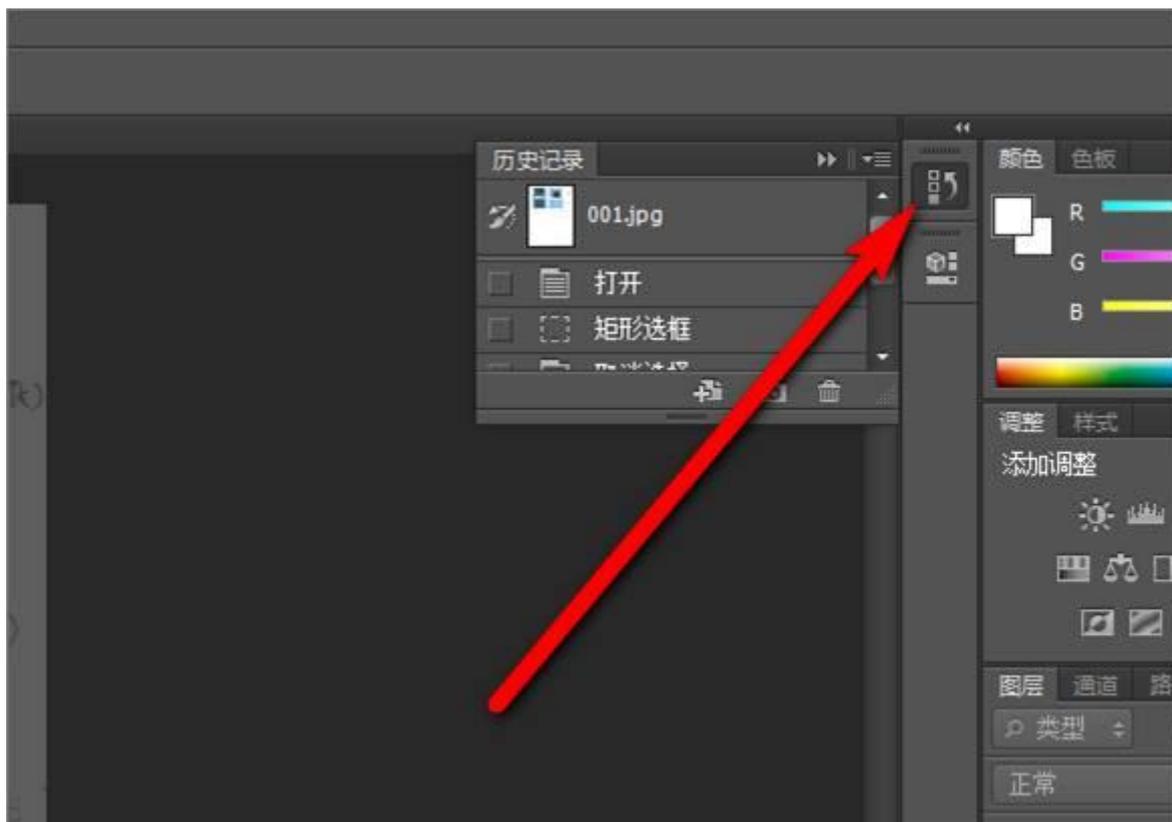
裁剪工具，裁剪我们需要的图片大小。



科研网



历史记录工具，可以返回之前的任一操作，这样你就不怕误操作了，可以随便整。



作者心得：PS 很强大，每个人的 P 图手法不一样。只要能把图片整成自己想要的就行了。笔者也是一步一步自己摸索的。不必拘泥于手法。但对于初学者先掌握一种手法是比较好的。等自己对 PS 有一定的领悟和了解，就可以进一步发掘 PS 更强大的功能了，以及可以找到适合自己的和更快捷以及更牛逼的 P 图手法。

Western blot 经验大盘点，有这一篇就够了

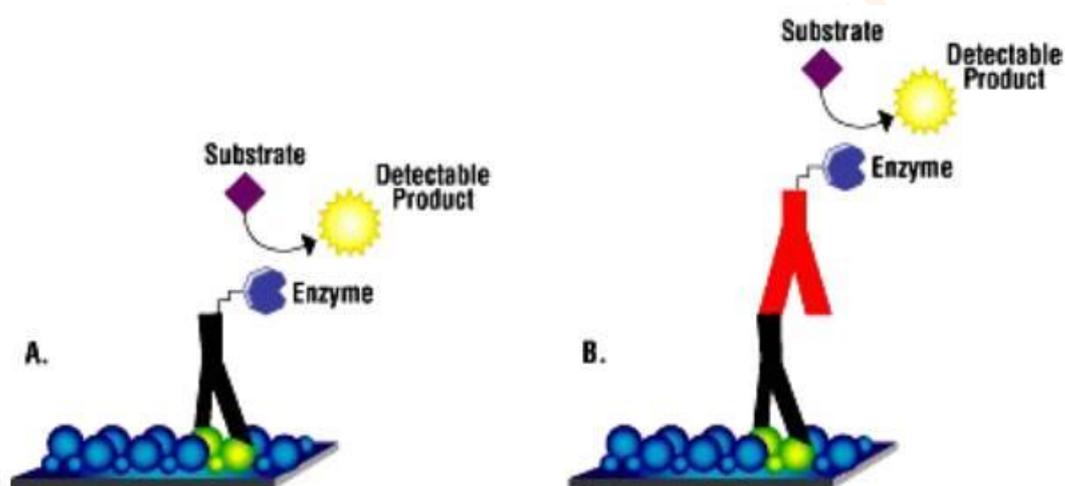
作者：子非鱼

Western blot(蛋白印迹)作为科研研究中最平常的实验，却蕴含了很多知识，可谓是小实验

里却有大文章。尽管绝大多数研究僧在接触该实验时都会被虐的体无完肤，却也在和 WB 斗志斗勇的过程中积累了不少经验。正所谓前人种树，后人乘凉，现在小鱼就把各位前辈做 WB 的各种经验总结起来，希望对大家能有所帮助。

WB 的基本原理

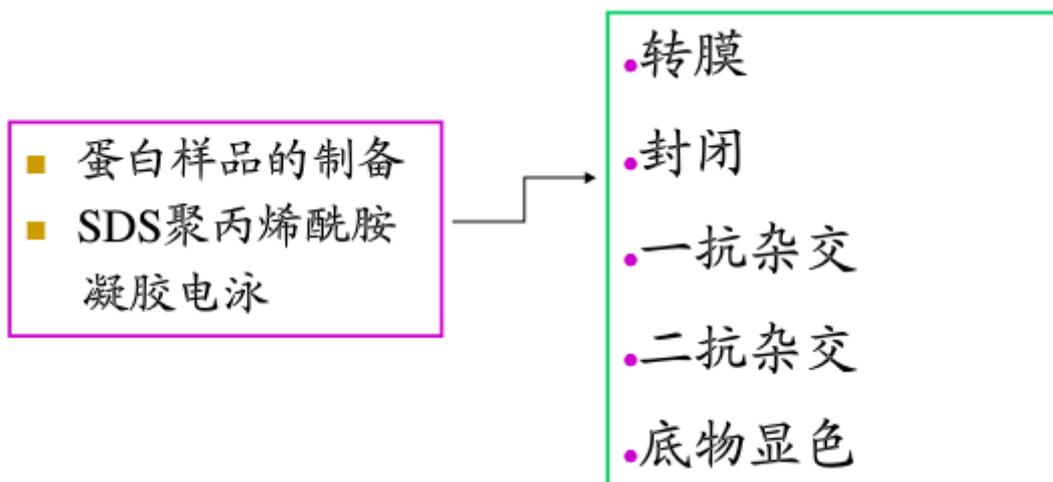
在电场的作用下将电泳分离的多肽从聚丙烯酰胺凝胶转移至一种固相支持体，然后用这种多肽的特异抗体来检测，经常用于目的蛋白的表达特性分析、组织定位、表达量分析及与其他蛋白的互作。依其原理，可分为两种方法：A、直接法和 B、间接法。



两种的方法的优缺点比较：

	直接法	间接法
优点	<ol style="list-style-type: none"> 1、快速（只需要敷一种抗体） 2、没有二抗交叉反应引起的非特异性条带 	<ol style="list-style-type: none"> 1、免疫特异性不受标记影响 2、信号放大灵敏度高（多个二抗结合位点） 3、多种标记的二抗可供选择 4可选择不同的Marker
缺点	<ol style="list-style-type: none"> 1、免疫反应性降低 2、无信号二级放大 3、抗体标记费时昂贵，使用不便 	<ol style="list-style-type: none"> 1、交叉反应引起的非特异性条带 2、额外的二抗孵育及条件优化

WB 的一般流程：



1 蛋白的提取

好的蛋白是 WB 成功的一半



经验总结：

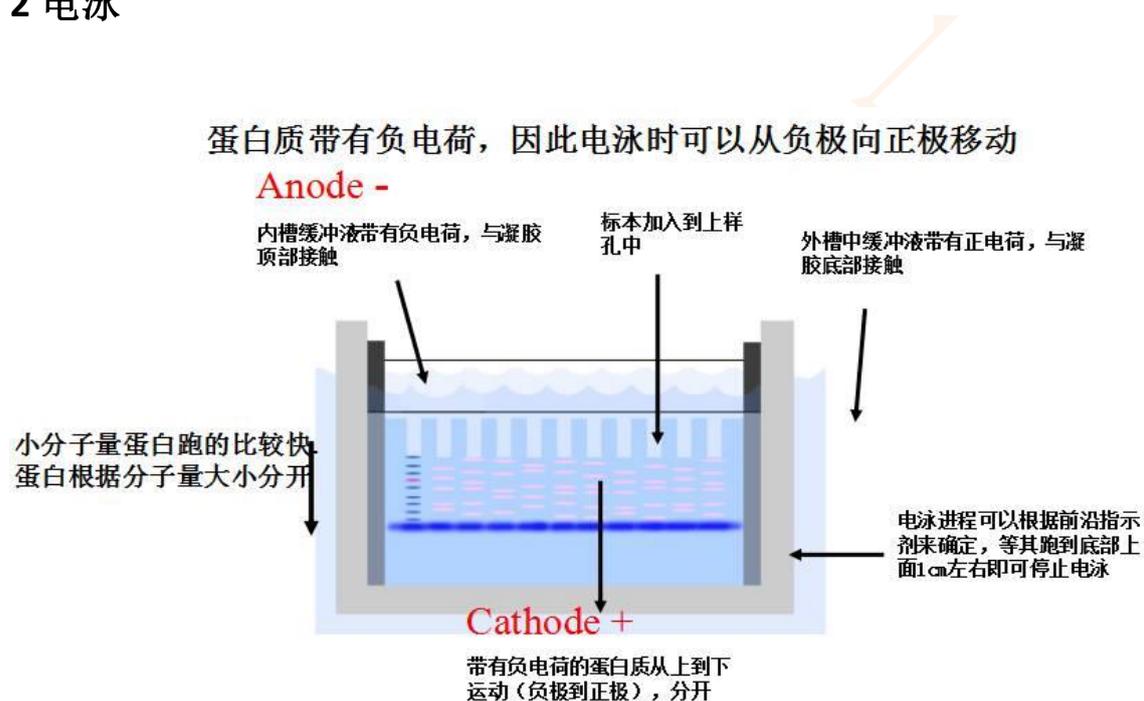
- 1: 合适的盐浓度下，保持蛋白质的最大溶解性和可重复性。
- 2: 尽量除去核酸，多糖，脂类等干扰分子
- 3: 提取蛋白质过程中，应在低温环境下进行，以抑制蛋白酶的水解作用（可加入适合的蛋

白酶抑制剂)。

4: 蛋白样品建议分装后冷冻干燥或直接以液体态置-80°C中保存，不要反复冻融。

5: 蛋白浓度低时，可使用超滤膜浓缩或者用真空冻干机将蛋白冻干。

2 电泳



凝胶浓度与蛋白分离范围

凝胶浓度 (%)	线性分离范围 (KD)
15	12-43
10	16-68
7.5	36-94
5.0	57-212

经验总结:

- 1: 上样时: 根据蛋白表达丰度调整蛋白上样量, 尽量保证每孔上样量保持一致。
- 2: 胶最好现配现用, 如果需要保存, 最好用湿润的保鲜膜包好并置于 4°C 冰箱中。
- 3: 为了检测整个实验系统或校准实验结果, 需要设置内参 (一般指由管家基因编码表达的蛋白)。

内参选择原则

样本种属来源	目的蛋白分子量	目的蛋白的表达部位
<ul style="list-style-type: none">1、哺乳动物细胞样本 <p>β-actin、β-tubulin、GAPDH、Lamin B等</p> <ul style="list-style-type: none">2、植物细胞样本 <p>植物Actin、Rubisco</p> <ul style="list-style-type: none">5、其他 <p>依据参考文献，选择合适的内参</p>	<ul style="list-style-type: none">通常保证目的蛋白与内参蛋白的分子量相差5KD以上。如目的蛋白是45KD，此时应选择GAPDH或β-tubulin	<ul style="list-style-type: none">一般蛋白 <p>β-actin、GAPDH等</p> <ul style="list-style-type: none">核蛋白 <p>Lamin A/B、Histone H3、PCNA等</p> <ul style="list-style-type: none">膜蛋白 <p>Na,KATPase</p> <ul style="list-style-type: none">线粒体蛋白 <p>VDAC1、COX IV</p>

4: 为了确保 western blot 结果的准确性和特异性，设置合适正确的对照是必不可少，一般需要设置的对照如下——

阳性对照：明确表达检测蛋白的组织或细胞，用于检测抗体的工作效率；

阴性对照：明确不表达检测蛋白组织或细胞，用于检测抗体的特异性；

二抗对照：不加一抗，用于检测二抗的特异性；

内参对照：检测标本的质量和二抗系统

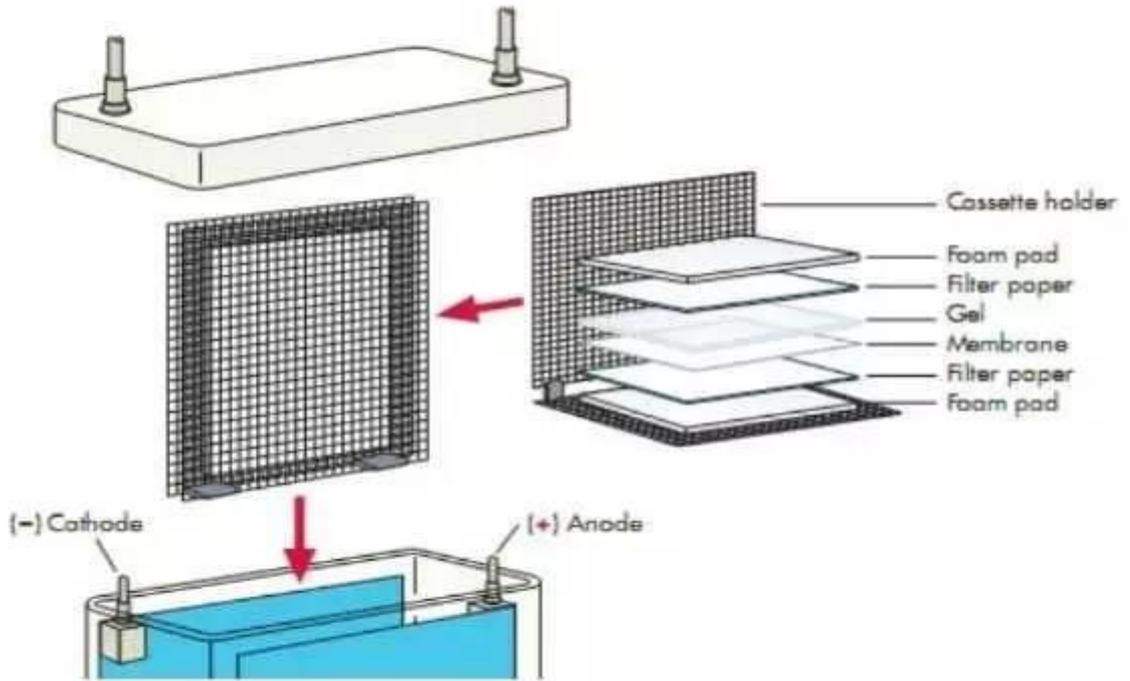
空白对照：不加一抗和二抗；用于检测膜的性质和封闭的效果。

3 转膜（western blot 成败的关键）

用于 western blot 的杂交膜主要有两种：NC 膜和 PVDF 膜，可依据目的蛋白与膜的结合能力及膜的孔径来挑选不同的转移膜。

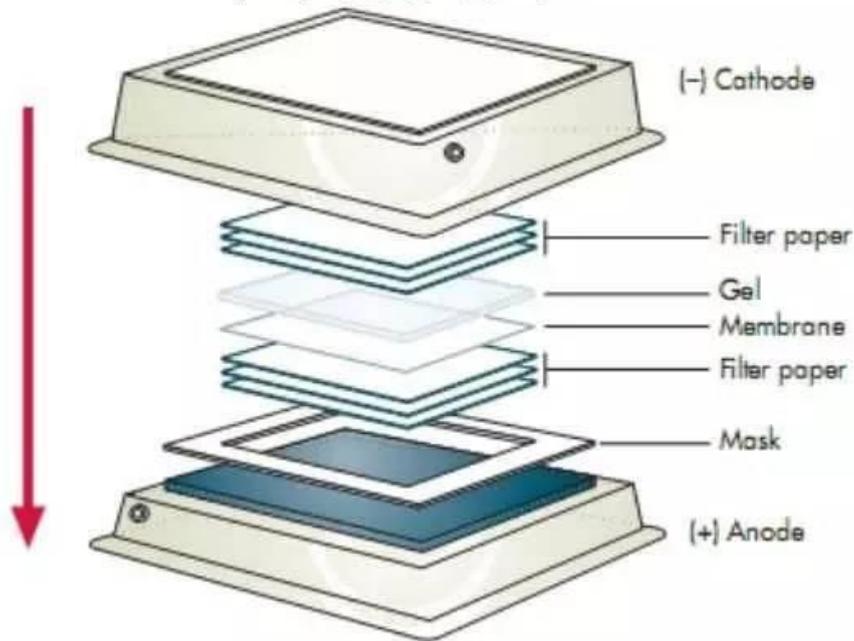
两个膜之间的比较：

湿转系统



将凝胶和固相基质夹在滤纸中间，浸泡在转移装置的缓冲液中，电转45min或过夜

半干转移系统



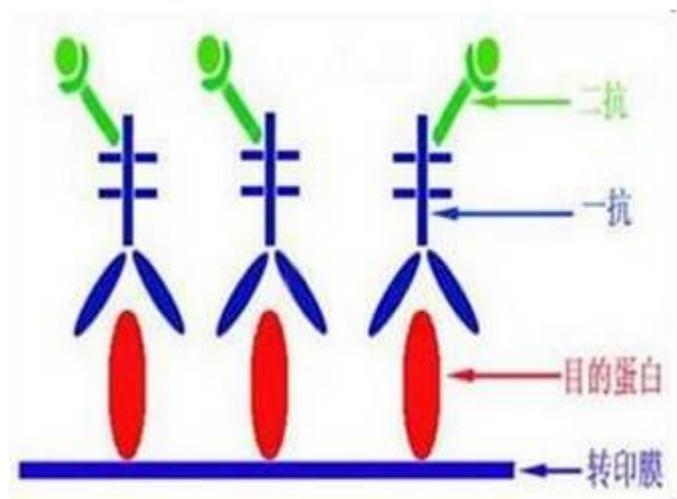
将凝胶和固相基质夹加在用缓冲液湿润的滤纸之间，电转10-30min

转膜方法：分为两种湿转法和半干法

经验总结：

- 1: 胶在负极，膜靠近正极；滤纸不要大过膜，防止短路；
- 2: 夹好膜和凝胶后，确定在凝胶、膜和滤纸之间没有气泡存在，否则会导致转膜不完全。
- 3: 注意一定要戴手套或塑料镊子接触膜，避免手上的蛋白和油脂降低转膜效率。
- 4: 转膜过程中，尤其是高电流快速转膜时，通常会有非常严重的发热现象，最好把转膜槽放置在冰浴中进行转膜。
- 5: 对于湿转法：一般转膜的电流在 200mA-400mA 之间，转膜时间为 30-60 分钟。也可以在 15-20mA 转膜过夜。大片段的>50KD 的可以选用 350mA,小片段的可以用 250mA。具体的转膜时间要根据目的蛋白的大小而定，目的蛋白的分子量越大，需要的转膜时间越长，目的蛋白的分子量越小，需要的转膜时间越短。

4 免疫印迹



经验总结:

1: 常见的封闭液有 5%脱脂奶粉、BSA 和 Western Blot 膜封闭液（生物试剂公司提供）。但是封闭液的选取具体得看抗体说明书，有的抗体是明确要求只能用 BSA，而封闭液浓度的选择也是具体得看抗体的要求，但是一般情况 5%BSA 会比 5%牛奶的效果好。

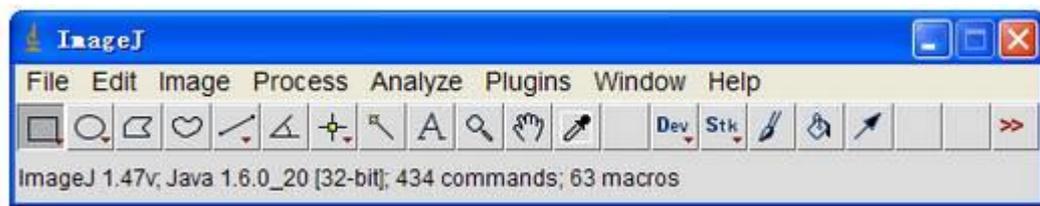
2: 选择抗体时，一方面需要考虑所选抗体是否能识别凝胶电泳后转印至膜上的变性蛋白，另一方面需要考虑所选抗体是否会引入交叉反应条带。

	多克隆抗体	单克隆抗体	混合的单克隆抗体
信号强度	较好	视不同抗体而异	最佳
特异性	良好，但有一定的背景	最佳，但有交叉反应	最佳
优点	多数能识别变性抗原	特异性好，抗体来源不受限制	信号强，特异性好，抗体来源不受限制
缺点	不易重复，有时背景较深	多数不能识别变性抗原	容易获得

5WB 结果定量分析

WB 做完后，有时需要对结果进行定量。然而最备受推崇的定量分析软件 Quantiy One 软件因其高昂的售价令很多人望而却步，但除了该软件外还有一个比较简单的图像处理软件 ImageJ 可以很方便的进行灰度和密度分析。

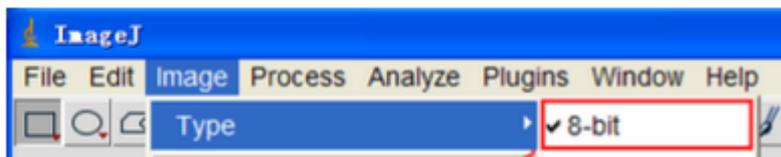
ImageJ 的软件界面



1. ImageJ 对 WB 条带进行灰度分析

1) File|Open 打开 WB 结果图片

2) 图片类型设置: Image|Type|8bit

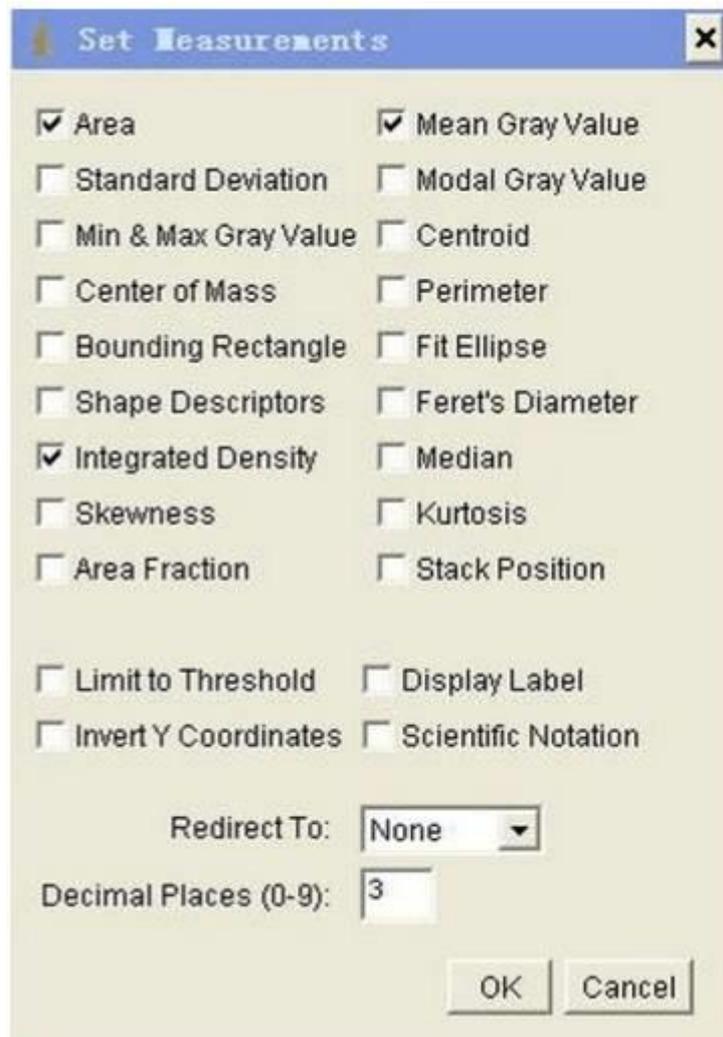


3) 去除图片背景: Process|Subtract Background

在 Subtract Background 窗口按照以下条件进行设置:



4) 设置定量参数: Analyze | SetMeasurements, 点击 Area, Mean Gray Value 及 Integrated Density

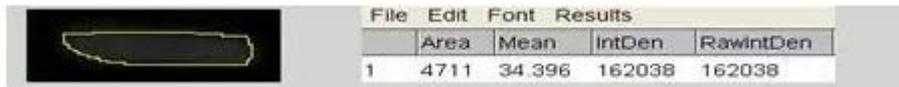


5) 设置单位: Analyze | SetScale, 在“unit of length”的方框里输入“pixels”

6) 将图片转换成亮带, Edit | Invert



7) 选择 Freehand Selection, 尽量把条带圈起来, 点击键盘 m, 出来 IntDen 灰度值



Results				
	Area	Mean	IntDen	RawIntDen
1	4711	34.396	162038	162038

8) 复制数据 IntDen 进行分析

2. Image J 对 WB 条带进行密度分析

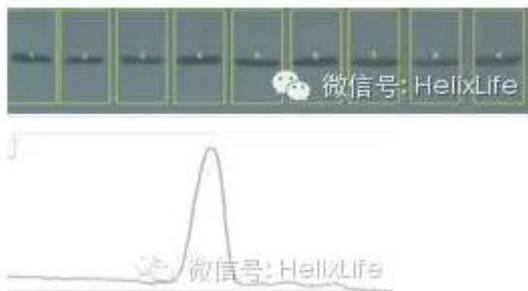
1) 步骤同前，File|Open 打开 WB 结果图片

2) 如果条带不正，需修正



Image transform rotate 调节 angle 值，直到条带水平为止

3) 选中矩形选项，圈中第一个条带，AnalyzeGels Select Firstlane (快捷键 Ctrl+1)，然后移动第一个条带上的矩形到第二个条带上，Analyze Gels Select Second Lane (快捷键 Ctrl+2)，最后 Analyze GelPlotlanes



选中直线工具，将开口的波峰关闭



选中魔棒工具，点击波峰可以显示波峰下面积，即条带的密度值

	Area
1	14575.903
2	11341.632

以第一个数值为基数，其他数值与第一个数值的比值即为相对密度。

6WB 疑难杂症

SDS-PAGE电泳

◆ 胶不平?

◆ 凝胶漏液?

- 胶板洗刷干净
- 加入AP和TEMED的量要合适
- 加入试剂后摇匀，使其充分混合，防止部分胶块聚合不均匀
- 温度合适，受热不均匀导致胶聚合不均匀
- 两块玻璃板底部要对齐

◆ 条带比正常的窄?

◆ “微笑”或“倒微笑”条带?

- 凝胶聚合不均匀，灌胶时候尽量混合均匀，动作轻缓
- 拔梳子要迅速，清洗加样孔要小心，以免把上样带扭曲
- 样品盐浓度过高会挤压其他条带导致宽窄不一，纯化样品，调整盐浓度
- 胶板底部有气泡会影响电泳效果，应赶走气泡。同时注意电泳槽装置是否合适

转膜及抗体检测

- ◆ 凝胶肿胀或卷曲?
- ◆ 条带歪斜或漂移?
- ◆ 单个或多个白点?
- ◆ 转膜缓冲液过热?

- 可将凝胶在转膜之前放到转膜缓冲液中浸泡5-10min
- 电转仪长期使用导致海绵变薄,“三明治”结构不紧凑导致。可在两块海绵之间垫上少许普通的草纸
- 确保膜和胶块之间没有气泡
- 缓冲液中离子浓度太低,电流或电压太高。转膜过程注意降温

转移到膜上的蛋白很少

原因

1. 蛋白分子量 $< 10\text{KD}$
2. 蛋白的等电点 < 9
3. SDS浓度不合适
4. 凝胶太厚

对策

1. 蛋白分子量 $< 10\text{KD}$ 时,减少转膜时间;使用小孔径的膜
2. 更换高pH值Buffer
3. 在阴极buffer中加入0.005 - 0.01% SDS 可提高转膜效率
4. 延长转膜时间

背景太高

原因

1. 膜没有均匀浸湿
2. 膜或者缓冲液污染
3. 封闭不充分
4. 抗体与封闭剂出现交叉反应
5. 抗体浓度过高

对策

1. 转膜前用100%甲醇将膜完全浸湿
2. 拿取膜与吸水纸时要戴手套,更换新鲜转膜缓冲液
3. 检测一抗、二抗与封闭剂是否有交叉反应
4. 杂交前检测一抗、二抗的工作浓度

杂交信号很弱

原因

1. 抗体保存不当
2. 抗原不充足
3. 膜的漂洗过度

对策

1. 抗体长期保存应在 -70°C ，使用前做效价检测
2. 增加蛋白上样量，做已知标准量蛋白的对照
3. 减少漂洗的时间和次数

出现非特异带

原因

1. 一抗不是唯一特异的
2. 二抗出现非特异结合

对策

1. 制备单克隆抗体或者重新选取合成抗原多肽的位点
2. 设立不加一抗，只加二抗的平行对照来检测二抗是否有非特异结合

Western Blot 实验中那些炫彩表象下的本质

作者：毛博

Western blot 实验是很常用的一种实验，常用于定量或者定性确定组织或者细胞中蛋白质的表达情况。这里和大家分享一下毛博做 Western 的心得体会，更有经典的 protocol 献上。除了心得体会，还有 Western 常见问题，以及可能原因分析。都是满满的干货哟。

参考文献选一抗

做 Western blot 实验，一抗非常非常重要。如果一抗选择的不好，神仙也做不出来 Western。进口的抗体太贵；国产的抗体不好用。进口抗体一般不会出现质量问题。市场上知名的几家公司，包括 ABCAM, Sigma, CST, Santa Cruz 等公司，质量都不错。进口抗体国内分装和国产抗体，质量实在不敢恭维。让人已经无力吐槽。

抗体的选择，毛博有个百试不爽的窍门。那就是——文献大法。找一些你的专业方向的经典文献。然后，看文献里面是不是和你的实验用的是同样的组织同样的细胞，看文献里面的 Western blot 的条带清不清楚，边缘锐利不锐利，最后看文献里面用的是哪个公司的抗体。直接购买即可。

Western Blot 实验试剂选择

毛博我是按 ABCAM 公司的经典 protocol 做的。这里给大家提供一个网址，以供下载 (<http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf>)。

抗体的说明书大家要仔细看。不同的抗体公司推荐的配置的方法是不一样的，比如 CST 的 gamma-H2AX 抗体需要用脱脂奶粉配置，而有些公司却要求用 BSA 配置。

封闭用的奶粉看似简单，其实很重要。如果要凑合，可以到超市买光明牌脱脂奶粉。但是不建议这么做。因为封闭要在室温下过夜的，如果是夏天的话，第二天过来都变成酸奶了。还怎么接着往下做实验呀。其实现在，一般实验用专门封闭的奶粉也不贵。一大罐可以用很久了。



内参抗体的选择

在 Western blot 实验中,用的最多的是内参抗体。作为重要的参照系,只要一开始做 Western,不管什么蛋白质,肯定要用内参抗体。这里,毛博强烈推荐 GAPDH。国外大牌杂志上发表的牛论文一般都是用的 GAPDH。大牛实验室都用的,肯定错不了。毛博推荐 Minipore 公司的。因为确实好用。

以上和大家分享了毛博做 Western 的三点经验体会。下面再谈谈新手在做 Western 的时候,会遇到的常见问题和可能的原因。

空空如也, 转完膜没条带怎么办

新手在做 Western 的时候,有时候转完膜后,膜上面没有任何条带,白茫茫一片大地真干净! 这又是什么原因呢?

这个时候,最大的可能就要考虑是不是膜装反了。不要笑哈。这其实是新手最容易犯的错误。膜反了,直接就没有转上去。如下图所示,要把夹子的黑面对着转移槽的黑面;夹子的白面对着转移槽的红面。



暗夜流星，片子熠熠生辉是好事吗？

新手在做 Western 的时候，有时候会走向另外一个极端，整张片子都熠熠生辉。像划过暗夜的流星，茫茫大海的灯塔一样。但是，这不是指引你走向成功和胜利哈。而是指引你走向失败和延期毕业。



这种情况，一般是二抗的浓度太高了。导致和一抗结合的二抗太多了，或者加了二抗孵育之后，洗得时间不够长，洗不干净，导致整个膜上面都结合上了二抗。解决办法就是稀释二抗，好好洗白白。二抗稀释多少倍才合适呢？这个要靠摸条件，1: 1000，1: 2000，1: 4000，几个梯度都试一试。

别以为“有背景”都是福！

在中国这个社会，做人有背景有资源有靠山，是一件好事；做 Western 有背景，可是一件坏事哈。看看下面这个图，黑乎乎的，难看死了。曾经发生过老板将这种膜直接扔下楼，然后让研究生下去捡上来的惨剧。



发生这个情况，一般都是封闭没有封闭完全，或者漂洗没有漂洗干净的问题。封闭的话，5% 脱脂牛奶或者 BSA 4°C 过夜。漂洗的话，室温下至少 1 小时，用脱色摇床多震荡。

毛博最后再唠叨一句，Western 实验是一个需要耐心和细致的实验。每一个步骤都要小心翼翼，注意细节。

Western-Blot 之我的磷酸化蛋白之路

作者：阿甘

我们实验室有句话口口相传：做上 WB，走上不归路。WB 难，磷酸化蛋白的 WB 就更难了。

我一共做了两百多次磷酸化的蛋白，但是出结果的只有六十几次，与理论预期相一致的只有四十多次，之前的几十次更是连磷酸化蛋白的影子都没见到。做了这么多失败的磷酸化蛋白 WB，宝宝的心里苦呀！但宝宝不哭！

于是乎，我总结了一下我的操作经验，供大家在做磷酸化蛋白的时候参考，使大家的磷酸化蛋白之路顺利（其中最重要的东西已用蓝色标出）。

1.做磷酸化蛋白，磷酸酶抑制剂必不可少，若没有磷酸酶抑制剂，磷酸化蛋白很容易发生去磷酸化，轻者导致条带不明显，重者没有条带，从而导致实验重复性变差。下图就是加入磷酸酶抑制剂和不加磷酸酶抑制剂的区别（有图有真相，图1）。

A 不加磷酸酶抑制剂



B 加入磷酸酶抑制剂



图 1. 加入磷酸酶抑制剂和不加入磷酸酶抑制剂的条带区别

2. 提蛋白一定全程要在 4°C 环境，尽量不要用超声波细胞破碎仪来粉碎细胞，低温高速离心机的转速不要超过 14000rpm，时间不要超过 10 分钟，以 5 到 8 分钟为宜。得到的上清样品立即煮沸（最好用 PCR 仪煮沸）。所提取的蛋白样品一定要在两到三个星期之内全部做完。

3. 凝胶电泳时，配置凝胶的试剂必须是两周之内新配制的，电泳缓冲液和转膜缓冲液必须现配现用，电泳时间不能超过 2 个小时。转膜完成后要用 TBST 缓冲液漂洗 PVDF 膜。

4. 封闭液和抗体稀释液，最好选用 3% 或者 5% 的 BSA 溶液（具体浓度看抗体说明书）。不可以用牛奶去配制上述液体，因为牛奶里还有酪蛋白，可以促进蛋白质的去磷酸化，使磷酸化蛋白的条带变浅，甚至消失（用图说话，图 2）。抗体尽量选用品牌抗体（Abcam, CST），一分钱一分货。

A. 用5%的脱脂奶粉封闭



B. 用5%的BSA封闭



图 2. BSA 和脱脂奶粉封闭后的条带差别

想想当初，我的第一个磷酸化蛋白 p-AKT 做了好几十次都没出来，工作汇报时，分分钟被老板嫌弃的节奏，以至于我有点怀疑人生。后来随着操作细节的改进，我的磷酸化蛋白的 WB 成功率越来越高，老板对我的 WB 结果也越来越满意。苍天不负有心人，只要肯下功夫，多观察多思考，小白也会成为达人。最后，祝大家实验顺利，早日成为实验达人！

Western Blot 之组织蛋白裂解及测定操作步骤

作者：螺丝钉 Fiona

大家在做动物实验的时候经常会需要利用大鼠组织进行 Western Blot 检测目的蛋白或者相关蛋白表达量差异情况，今天我就以脑组织为例说说这组织蛋白裂解及测定的具体操作步骤，都是师兄师姐的吐血总结，大家可以参考一下！

一、取材：

1、所用物品：剪刀、骨钳、弯镊、托盘、滤纸、冻存管、液氮罐、-80℃冰箱、冰盒、marker 笔

2、所需试剂：10%水合氯醛

3、步骤：

① 10%水合氯醛腹腔麻醉致死，断头取脑，将大鼠脑子剥离后放入托盘内（托盘内铺上一张滤纸），然后将大鼠脑子表面的血管丝剥离干净。

②取目标脑组织分装在冻存管中。[注]第①、②步必须在冰盒内操作，防止蛋白降解。

③ 将冻存管用 marker 笔编好号后迅速冻到液氮中，使其迅速冷冻，然后再冻到-80℃冰箱备用。[注]为了以防温度骤降，冻存管炸开，从液氮中取出标本时，要缓慢拿出，一般 1min/cm，在出瓶口时再缓几分钟，拿出后迅速放入装有碎冰的盒内，再放到-80℃冰箱。

二、蛋白测定

1、所用物品：天平、-80℃冰箱、冰盒、镊子、小剪刀、超声波细胞粉碎机、滤纸、天平、5ml 离心管、1.5ml 离心管、冰盒、小烧杯、加样器、Tip 头、离心机、比色杯、分光光度计、水浴锅。

2、所需试剂：组织蛋白裂解液（ddH₂O、SDS、EDTA、Tris 碱、Triton×100、Leupeptin、异丙醇、PMSF、浓盐酸、甘油、DTT、吐温 20）、ddH₂O、BSA、工作液的 A 液和 B 液、SDS、EDTA、Tris 碱、Triton×100、Leupeptin、异丙醇、PMSF、浓盐酸、甘油、DTT、吐温 20。

3、步骤：

（1）称重：从-80℃冰箱内取出标本，在冰浴内融化，然后称重。先称 5ml 离心管，然后再将样品从冻存管中取出放入离心管中，称出总重量。算出样品重量（样品重量=[（离心管+样品）-离心管重]），分别标好号后记录在纸上。

(2) 蛋白提取：冰浴内进行

① 向标本中加入冰冷的组织蛋白裂解液，按样品重量：组织蛋白裂解液=1：4（g=ml）或按样品重量：组织蛋白裂解液=1：5（如蛋白浓度较高时，可 1：5 稀释，通常蛋白浓度，按 1：4 稀释）。

② 将样品用小剪刀剪碎[注：每剪完一个样品，需用 ddH₂O 冲洗一下剪刀并用滤纸吸干净。

③ 用超声波细胞粉碎机匀浆：

插上电源→将测温探头放入盛有冰水混合物的小烧杯内→打开电源按钮→按“Enter”键设置时间，总时间 2min，超声开 9.9S，间歇 30S，温度 2~4℃→然后再用 ddH₂O 冲洗探头，用滤纸吸干，将探头插入装有样品的 5ml 离心管中，（将 5ml 离心管放入盛有冰水混合物的小烧杯内）→按开始键进行超声破碎。

[注]：

a) 每超声完一个样品，都需用 ddH₂O 将探头冲洗干净，滤纸吸干后再行下一个样品；

b) 为了防止按下开始键后由于惯性匀浆液溅出，可以先按开始键后再将探头缓慢插入离心管中。

④ 将超声完的组织放在冰浴内，静止裂解 30min，（刚超声完的样品上边的沫子静止后可以减少同时增加蛋白的溶出）。

⑤ 预冷离心机使其温度达到 4℃（要预先打开 30min）。

⑥ 将超声静止后的标本用枪将裂解液移至 1.5ml 的离心管中，然后在天平称重，配平后 4℃，13500rpm/min，离心 10min。

⑦ 离心完后取上清，入新的 1.5ml EP 管中。

⑧ 将剩下的沉淀再加入 1 倍体积的裂解液混匀，4℃，13500r/min，离心 10min，取上清

入第 5 步的管内，第 5 和第 6 步的上清为脑组织总蛋白提取液。

⑨ 将脑组织总蛋白提取液按 BCA-kit 说明检测蛋白含量。然后根据蛋白含量分装成一次 western blot 所需量 (μl /每管)，备用。

[注] 如当天或一周内要做，可以先变性（加 loading buffer）后，放在 4°C 保存；如果短期内不做，则要冻在 -80°C 冰箱。

另：离心后剩下的沉淀也要再加匀浆液，再次匀浆，这样可以节省样品。

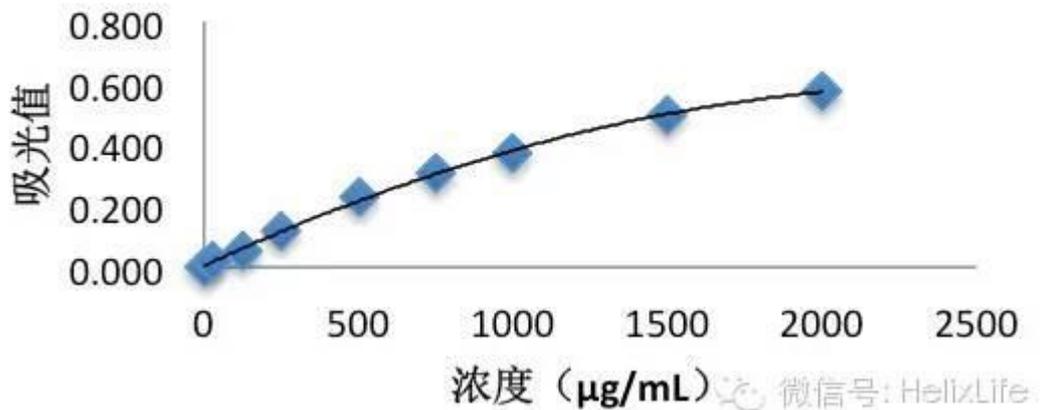
(3) 蛋白测定（BCA 法测蛋白）

① 标准蛋白的配置（工作范围 $20\text{-}2000\mu\text{g/ml}$ ）

	稀释液体积 (ddH ₂ O) / μl	BSA 体积/ μl	BSA 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
A	0	300	2000
B	125	375	1500
C	325	325	1000
D	175	175 μl 的 B 液	750
E	325	325 μl 的 C 液	500
F	325	325 μl 的 E 液	250
G	325	325 μl 的 F 液	125
H	400	100 μl 的 G 液	25
I	400	0	0

（一般用 ddH₂O 来调 0，一般范围做到 $2000\mu\text{g/ml}$ ）

Bradford标准曲线



② 工作液=A液: B液=50: 1

工作液总量= (m 个样品+n 个标准品) * 200μl

工作液: 样品=20: 1 (一般每个样品工作液需加 200μl)

③ 开 37°C水浴锅, 预温 30min。

④ 每管加入工作液 200μl, 标准品 10μl;

取 2ul 样品, 18ul DDH₂O, 混匀后再从其中取 10ul 加入到 200ul 的工作液中。

⑤ 开分光光度计, 预温 30min。

⑥ 将标准品和样品放在水浴锅中 37°C加热 30min, 冷却至室温后用分光光度计比色。

⑦ 将分光光度计波长选在 562nm 处进行比色。比色时先比标准品(先调 0, 从低向高比), 注意每比完一个样品后用 DDH₂O 洗净滤纸吸干后, 再比下一个。。

⑧ 得出标准曲线以及标准蛋白的吸光度、浓度以及样品的吸光度、蛋白浓度, 然后用 excel 表格处理。

A	B	C	D	E	F
标准品吸光度	标准品浓度(μg/ml)	样品吸光度	样品浓度(μg/ml)	稀释10倍前样品真正浓度(D*10)	100μl 的样品需加匀浆液量

把 A、B 值输进去后选中 A、B 组→点统计图表→选 xy 点图→下一步→下一步→完成→在图中激活各点按右键→添加趋势线→选项→选公式+R 值平方→确定→得出公式 $y=mx+n$, $R^2=$ →再将 C 值代入 x 得出 y 值即是 D 值→E 值=D 值*10→F 值= (E/最小蛋白浓度-1) *100μl

$G(\mu l) = \text{样品总体积} = F + 100\mu l$

$H = \text{需加变性液 (loadingbuffer) 量} = G/3$

$I = \text{取 } 15\mu l \text{ 样品, 所含的蛋白量} = \text{最小蛋白浓度}(\mu g/ml/1000) = [(\text{最小蛋白浓度 } \mu g/\mu l) * 100] / [(G+H) * 15\mu l]$

一般 20μl 左右蛋白应在 50-60μg。

5.5 组织切片

如何在石蜡切片中获取免疫组化的芳心

作者：阿甘

有时候，实验看似容易，其实处处存在陷阱。稍微一不留意，就会掉入坑中而无法自拔。免疫组化，病理学实验的常用技术，看似容易，其实，做出一张漂亮的染色切片实属不易。

刚开始做免疫组化，我一味按照说明书及实验室的 protocol 来操作，做出来的切片不甚理想，经常获得不了预期的实验结果。以致于老板怀疑我的能力，我怀疑自己的人生。于是，我向各路大神请教，上网查各种帖子，甚至还专门查阅了免疫组化的发展简史，并结合自己的实践操作，不断改善自己的操作细节。

终于,我的组化技术有了很大的进步,做出了老板满意的切片,我也感到了从所未有的自信。趁工作空闲之时,我总结了一下我的经验,供各位与免疫组化奋战的童鞋借鉴参考。

1

千里之行始于足下,取材和标本处理是第一步,也是最为关键的一步。取材一定要按照相应规范取材,避开坏死组织(坏死组织易脱片)。固定液一般常用 10%的中性甲醛和 4%的多聚甲醛(当然也有其它类型的固定液),固定液的体积一般为 10 倍的组织体积(容器密封,多数固定液成分易挥发,否则固定效果不好,影响后续的实验)。

若为实质组织及含脂肪较多的组织,一定要切开固定并且延长固定时间(肝脏、肾脏、脾脏、淋巴结及乳腺等),才能取得较好的固定效果。切片之前,一定要选择锋利刀片(切片之前可以将刀片在磨刀石上磨一磨),这样才能切出质量上乘的石蜡切片。

2

烤片一般问题不多,一般 60℃烤两个半至三个小时就可以(若对于一些不稳定的分子,则需要适当缩短烤片时间,甚至可以用冰冻切片去做)。脱蜡需小心,脱蜡太过可导致组织脱片,脱蜡不足则可导致染色不佳。若是新的二甲苯,只需脱蜡 2-3min,若为旧的二甲苯,则需脱蜡 7-10min。

过氧化氢灭活至关重要,一般常用的浓度为 0.3%-3%(用甲醇配置的过氧化氢效果好于双蒸水和 PBS 溶液配置的过氧化氢),浓度低(0.3%-1%)可灭活 20min 左右,浓度高(>1%)灭活 10min 左右。

过氧化氢要滴加于组织之上,不要浸泡,否则容易导致脱片。若遇见肝脏、肾脏、乳腺及甲状腺组织,适当延长灭活时间(这些组织中内源性过氧化氢酶含量较高)。修复液目前有 EDTA、枸橼酸盐和胰蛋白酶溶液(可结合文献与说明书去选择),修复方法有煮沸、微波及高压修复,个人感觉,微波修复和高压修复效果较好。

3

高压修复时,一定在高压 3min 后冷却足够时间(一般 30min 左右),不要趁热捞出切片,否则 EDTA、枸橼酸盐结晶析出粘在切片上,导致染色效果不佳。修复时将切片放入修复液时

应操作柔和，否则容易脱片。

（一般用 EDTA 修复时容易发生脱片，癌组织、乳腺、甲状腺及脑组织容易发生脱片，这些情况下操作一定要轻柔！个人的悲惨教训，修复完毕，组织不翼而飞！遇到这些组织，一定操作轻柔，同时选用多聚赖氨酸包被的载玻片）

每一步用 PBS 冲洗时也要操作轻柔，否则容易把组织冲走！

4

封闭一般选择血清（一般牛血清、羊血清常见），用 BSA 也可以。抗体孵育时一抗 4℃ 过夜或者 37℃ 2 小时（个人认为，4℃ 过夜的效果较好，切片从 4℃ 环境中取出应先复温 30min，否则容易出现脱片！），二抗 37℃ 孵育 10-20min。在孵育及染色的全过程中，切片一定要保持湿润，不要出现干片，否则会出现非特异染色。

DAB 染色为关键之步，必须要在显微镜下观察显色情况，稍微发黄便终止染色。苏木素染色的前一天要用滤纸过滤苏木素除去渣滓，保证切片背景的干净。苏木素染色结束后，最好在镜下观察染色深浅，苏木素的颜色程度不能超过 DAB 的颜色程度（若苏木素染色合适，则无需过盐酸分化液；若颜色过重可以在盐酸分化液中浸润几秒）。

返蓝液有 0.1% 氨水和 50℃ 温水返蓝（个人认为，氨水返蓝效率高）。酒精梯度脱水液要时常更换（一般一个月换一次，否则脱水效果不好，会影响后续切片的观察与图像的采集），二甲苯透明一般只需几秒即可。

最后，祝大家实验顺利，早发文章！

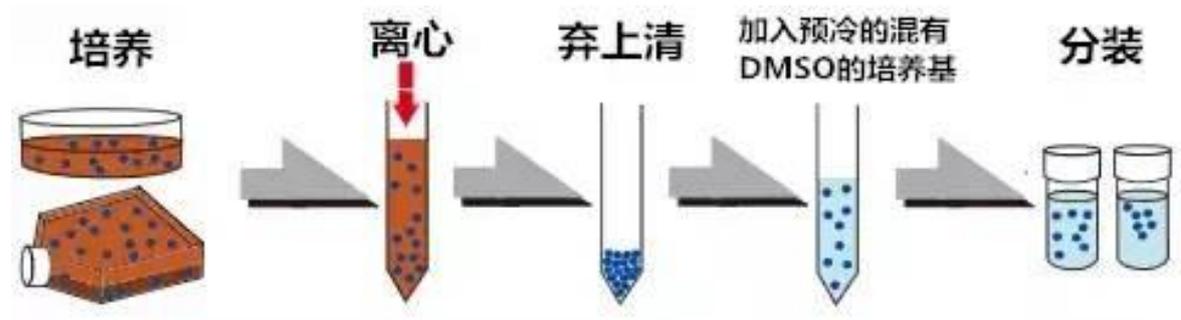
6 细胞实验技术

6.1 细胞培养与冻存复苏

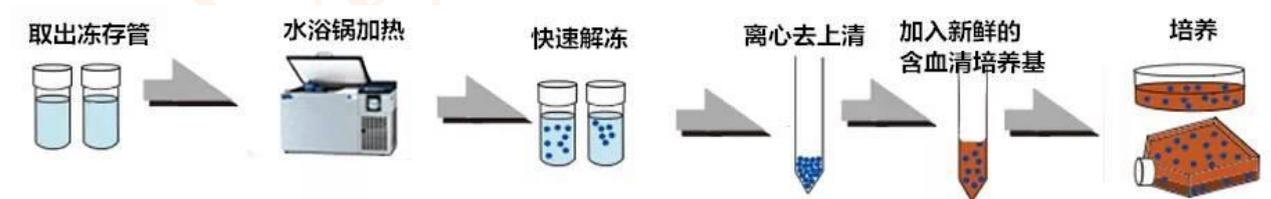
细胞冻存与复苏的前世今生

作者：老谈

细胞冻存步骤：



细胞复苏步骤：



常见注意事项：

有关 DMSO 的一些注意事项：

DMSO 能够快速穿透细胞膜进入细胞中，降低冰点、延缓冻存过程，同时提高细胞内的离子浓度、减少细胞内冰晶的形成，从而减少细胞损伤程度。

DMSO 在溶解过程中会放热，应先与培养基混匀后再加血清，同时冻存液最好提前配置，DMSO 现配对细胞的毒性可能更大；

复苏时，要离心去除 DMSO，并用新鲜的培养基洗涤 1-2 次，注意离心的时候速度不要太快；

2. 血清需要比正常养细胞时多加，一般为 10%-20%。

3. 解冻时，要尽快将冻存管整体温度上升至 37 摄氏度，由于冻存管具有一定的厚度，故而可以将水浴锅的温度调至 40 摄氏度左右，可以缩短解冻时间。

4. 梯度冻存，即可以按照 $-4^{\circ}\text{C} \rightarrow 20^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C} \rightarrow 80^{\circ}\text{C} \rightarrow$ 液氮的顺序程序性降温。

知识点思维扩散：

1972 年，冷冻损伤的两因素假说：冰晶损伤和溶液损伤假说被 Mazur 等人首先提出，他们是根据中国仓鼠组织培养细胞的低温保存实验数据分析得到的。

冰晶损伤假说认为随着温度的下降，细胞内外的水分结冰，所形成的冰晶会造成细胞膜和细胞器的破坏并引起细胞死亡。这种因细胞内部结冰而致的细胞损伤即就是**冰晶损伤 (Intracellular ice damage)**。冰晶损伤是由冷却速度过快造成，冷却速度越快，冰晶损伤越大。

溶液损伤解说认为随着温度的下降，细胞外部的水分会先结冰，从而使得未结冰的溶液中电解质浓度升高，细胞膜上的脂质会因长时间暴露在高溶质的溶液中而受到损坏，细胞发生渗漏，导致在复温时大量水分渗入细胞内造成细胞死亡。这种因保存溶液溶质浓度增高而致的细胞损伤被称为**溶液损伤 (Solution damage)**。溶液损伤是由冷却速度过慢，使细胞在高浓度的溶液中暴露的时间过长而造成，冷却速度越慢，此损伤越严重。

技术 | 还在 2D 细胞培养？Out 了，3D 培养玩起来！

作者：燕子

你的细胞是养在哪儿呀？.....不就是塑料的细胞培养皿中吗？圆的，方的，长的随你选俺都有！

那你的组织实验和细胞实验结果都能一致吗？嗯嗯，大部分还是能的，那另一部分呢？我也不知道嘞！做了好多遍的！

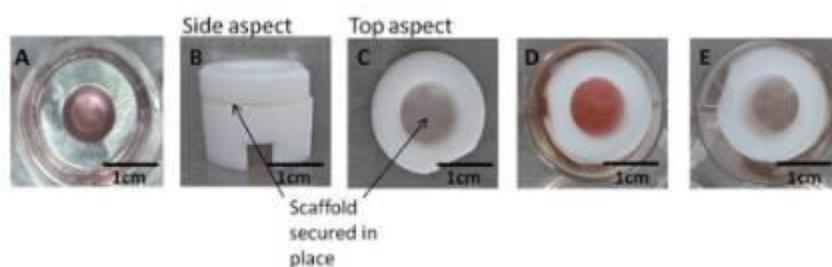
其实呢，我们在细胞水平的研究大部分呢还是在 2D 水平的，然而细胞在体内生活的环境远远复杂的多。3D 细胞培养相比 2D,优势就很明显，更接近细胞的体内状态，能够提高细胞因子、抗体和其他分子的产量，测试剂盒已经到了 μg 级细胞因子测不到心酸再也不会有了！在 3D 体系内干细胞能够有效的分化，基因表达、细胞活动与体内过程更接近。

建立 3D 细胞体系，听上去很复杂的样子；现在就用模拟肺环境为例，介绍一下肺部 3D 体系建立。

Immunocompetent 3D Model of Human Upper Airway for Disease Modeling and In Vitro Drug Evaluation

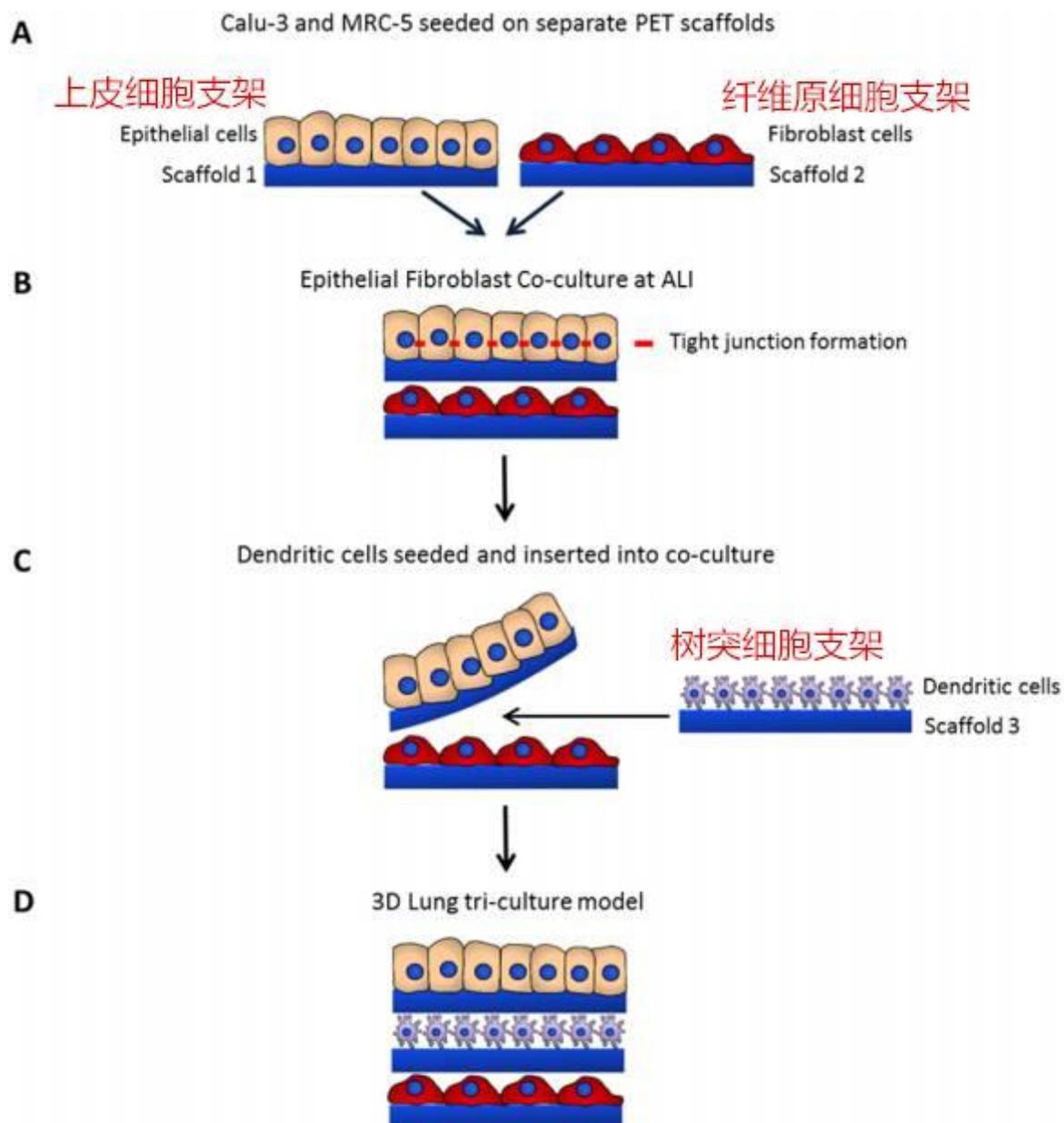
建立上皮细胞&纤维原细胞共培养体系

ES 支架切割成 2cm^2 每小块，放置距离紫外光源 8cm 处灭菌 15min,每一面都需要这样操作灭菌哦。切割好的支架移入 12 孔板中（无菌操作），将一个钢圈放置在支架上,加抗生素再进一步灭菌，放入恒温孵箱过夜。吸去抗生素，用 PBS 清洗，后加细胞培养液浸没支架。在支架支撑物里上皮细胞支架放在纤维原单层细胞支架上形成 2D 共培养模型。



图：钢圈圈定细胞接种的面积；支架支撑物放在 2D 气-液界面（白色圆柱）里，支架在类似肺组织在适当的条件（ECM）下培养（上皮细胞在上层和成纤维细胞浸没），模仿体外肺组织环境。以防在培养过程中下拨分离或移动，支架固定在特有的支撑物上。细胞在培养基（目标细胞所用培养基）中孵育。

建立上皮&树突&纤维原细胞 3D 共培养



上皮细胞&纤维原细胞共培养体系在孵箱中孵育 14 天后插入树突细胞支架，培养基仍为混合培养基。上皮&树突&纤维细胞 3D 体系培养 14 天，使其形成更似生理环境的细胞间联系。

接下来你想研究肺部哪个病，哪个药，哪种细胞就放进去相互作用吧！

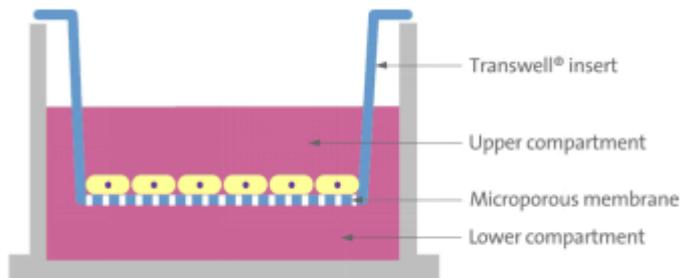
干货 | Transwell 总失败,是哪个环节出了问题?

作者：毛博

Transwell 技术在细胞共培养、细胞趋化、细胞迁移、细胞侵袭中经常被应用到，相对来说，它的操作还是较简单，重复性也比较好，可还是有小伙伴叫苦不迭：为啥我总是失败呢？毛博今天就来帮你对症下药，一一梳理，看看是哪出了问题。

“杯子”孔径用对了吗？

Transwell 技术的名称来自于就是一个叫 Transwell 的小杯子，可以放在细胞培养板里面。有不同形状，不同大小，不同选择。但无论如何，它的关键部分都是一样的，那就是杯子底层的那张膜。这张膜一般是聚碳酸酯膜，带有微孔，孔径大小有 0.1—12.0 μm 。根据不同的实验需要，需要选用不同的孔径，共培养、细胞趋化、细胞迁移、细胞侵袭等多种方面的研究，应用的孔径是有区别的。



(1).细胞共培养:

将细胞 A 种于上室，细胞 B 种于下室，可以研究细胞 B 分泌或代谢产生的物质对细胞 A 的影响。应选择 $< 3.0 \mu\text{m}$ 孔径。因为 $< 3.0 \mu\text{m}$ 孔径，细胞不会迁徙通过。

(2).细胞趋化:

①细胞 B 对细胞 A 的趋化作用：将细胞 A 种于上室，细胞 B 种于下室，可以研究细胞 B 分泌或代谢产生的物质对细胞 A 的趋化作用。

②趋化因子对细胞的趋化作用：将细胞种于上室，下室加入某种趋化因子，可研究该趋化因子对细胞的趋化作用。

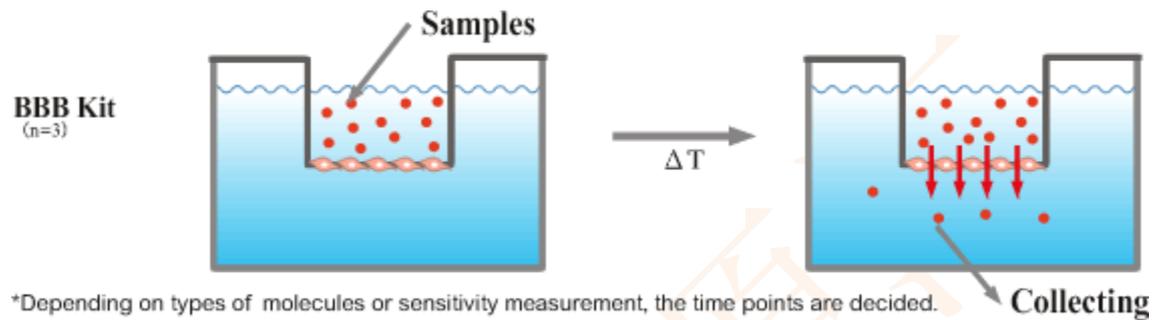
应选择 5.0 、 8.0 、 $12.0 \mu\text{m}$ 孔径，上室细胞可穿过膜进入下室，计数进入下室的细胞量可反映下室成分对上室细胞的趋化能力。

(3).细胞迁移:

上室种细胞，一般是具备迁移能力的肿瘤细胞，下室加入 FBS 或某些特定的趋化因子，肿瘤细胞会向营养成分高的下室跑。应选择 8.0 、 $12.0 \mu\text{m}$ 孔径，计数进入下室的细胞量可反映细胞的迁移能力。

(4).细胞侵袭:

常用 8.0、12.0 μm 孔径，原理和方法与细胞迁移实验类似。



检查过程细节小纰漏

① 重复使用的问题:

Transwell 小室按照要求，都是一次性使用的。不过因为价格昂贵，其实洗洗泡泡还是可以重复用的。用完后用胰酶和 75%酒精泡，室温凉干。再次使用前用紫外里里外外都照上 30 min。就可以啦。

② 上层培养液:

上层培养液采用无血清培养基，为维持渗透压，需加入 0.05%-0.2% BSA。

③ 下层培养液:

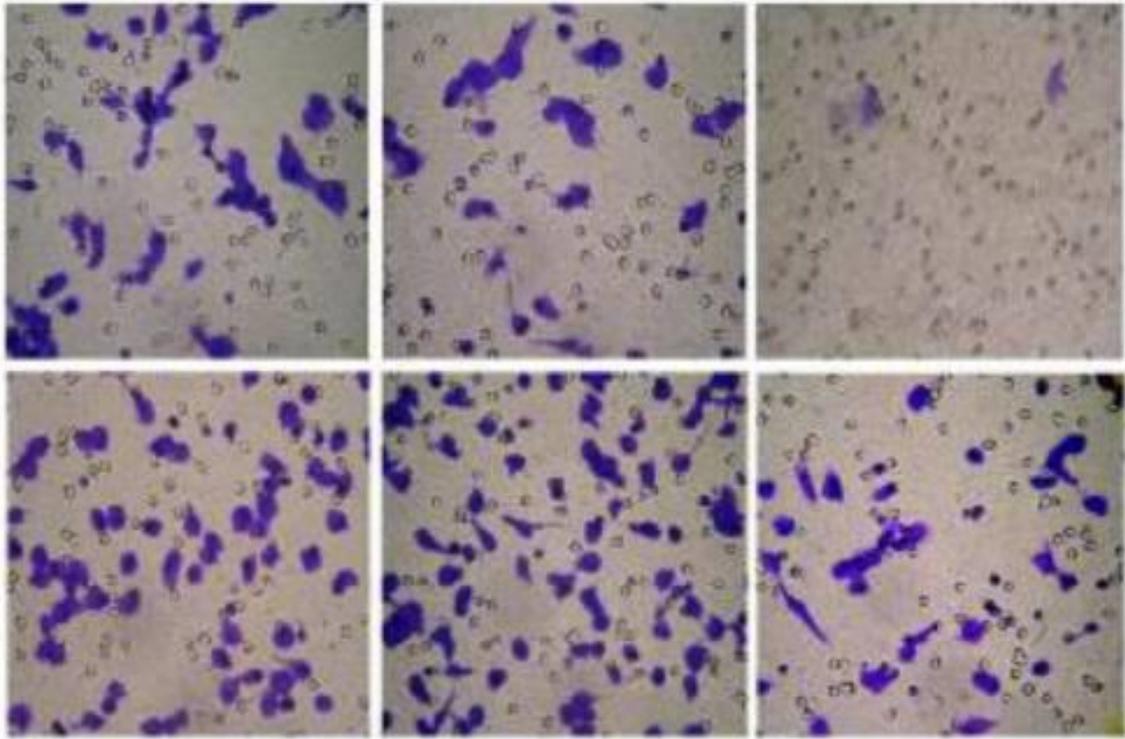
下层培养液采用含 5%—10% FBS 的培养基，具体浓度根据细胞侵袭力而定，侵袭力弱的细胞可适当提高 FBS 浓度。

④ 细胞培养板:

常用的细胞培养板有 6 孔板、12 孔板、24 孔板等。细胞培养板没什么特殊要求，普通的细胞培养板就可以。但要注意，细胞培养板应当与购买的 Transwell 小室相配套。不要一个大一个小，不配套啊。

⑤ 细胞计数:

那么，细胞迁移到下室了，如何计数和比较呢？用 PBS 缓冲液洗细胞 1-2 次，吸尽残余的液体，加入甲醇固定 20 分钟，弃固定液，加入结晶紫染液，染色 10-20 分钟，弃染色液，用 PBS 冲洗干净即可。如下图所示，哪组迁移的多，哪组迁移的少，是不是一目了然了呢？



干货 | 细胞培养液之四大金刚

作者：毛博

培养液既是供给细胞营养和促使细胞增殖的基础物质，也是细胞生长和增殖的环境，所以非常重要。细胞培养液是建立在平衡盐溶液(BSS)基础上，添加了碳水化合物、氨基酸、脂类、无机盐、维生素、微量元素和细胞生长因子等。那么，常用的培养液有哪些呢？它们的成分和特点是什么呢？它们各自的适用范围又有哪些呢？

四大金刚，各擅胜场

提到常用的培养液，其实就四种: MEM、DMEM、1640、F-12。这四种培养液涵盖了 90%以上

的细胞。下面，分别介绍一下它们各自的成分和特点。

先看一下，老大 MEM。MEM 作为四大金刚中的老大，为人老成持重，无所不能。所以，号称是应用最广泛的细胞培养液，其中含有 13 种必须氨基酸、8 种维生素、以及多种微量元素。呵呵，像不像保健品的广告用语？其实，真的是这样。老大作为带头大哥，能力是非常全面的，优点是非常突出的。

老二 DMEM，作为随时紧跟老大 MEM 的二弟，含有的营养成分其实是一模一样的。但是，老二青出于蓝而胜于蓝，浓度要高出 2~4 倍。

老三 1640，中规中矩，没有什么特别的优点，也没有什么明显的缺点。为人简单朴素，营养成分比较简单，比 DMEM 少一点糖和谷光甘肽。

老四 F12，作为四大金刚里面的小兄弟，是比较调皮的。它的优点是非常突出的，同时，它的缺点也是非常明显的。F12 也包括非必须氨基酸，维生素的范围亦很广，另外常规含有无机盐和代谢添加剂（例如核苷酸）。这些都是优点。但是，F12 中含有硫酸亚铁，据报道有神经毒效应。对于很多神经细胞是有毒性作用的。

下图是包括了四大金刚在内的细胞培养液的具体成分，供各位童鞋参考。

细胞系名称	细胞类型	物种	来源组织	培养液与血清
293	成纤维细胞	人	胚胎肾	MEM, 10% 马血清
3T6	成纤维细胞	小鼠	胚胎	DMEM, 10% FBS
A549	上皮样	人	肺癌	F-12K, 10% FBS
A9	成纤维细胞	小鼠	结缔组织	DMEM, 10% FBS
AtT-20	上皮样	小鼠	垂体肿瘤	F-10, 15%马血清+ 2.5% FBS
BALB/3T3	成纤维细胞	小鼠	胚胎	DMEM, 10% FBS
BHK-21	成纤维细胞	仓鼠	肾	DMEM, 10% FBS or MEM, 10% FBS and NEAA
BHL-100	上皮样	人	乳腺	McCoy'5A, 10% FBS
BT	成纤维细胞	牛	鼻甲细胞	MEM, 10% FBS and NEAA
Caco-2	上皮样	人	结肠腺瘤	MEM, 20% FBS and NEAA
Chang	上皮样	人	肝	BME, 10% 牛血清
CHO-K1	上皮样	仓鼠	卵巢	F-12, 10% FBS
Clone 9	上皮样	大鼠	肝	F-12K, 10% FBS
Clone M-3	上皮样	小鼠	黑色素瘤	F-10, 15%马血清+ 2.5% FBS
COS-1	成纤维细胞	猴	肾	DMEM, 10% FBS
COS-3	成纤维细胞	猴	肾	DMEM, 10% FBS
COS-7	成纤维细胞	猴	肾	DMEM, 10% FBS
CRFK	上皮样	猫	肾	MEM, 10% FBS and NEAA
CV-1	成纤维细胞	猴	肾	MEM, 10% FBS
D-17	上皮样	犬	骨肉瘤	MEM, 10% FBS and NEAA
Daudi	淋巴样	人	淋巴瘤患者外周血	RPMI-1640, 10% FBS
GH1	上皮样	大鼠	垂体瘤	F-10, 15%马血清+2.5% FBS
GH3	上皮样	大鼠	垂体瘤	F-10, 15%马血清+ 2.5% FBS

H9	淋巴样	人	T-细胞淋巴瘤	RPMI-1640, 20% FBS
HaK	上皮样	人	肾	BME, 10% 牛血清
HCT-15	上皮样	人	结肠腺癌	RPMI-1640, 10% FBS
HeLa	上皮样	人	宫颈癌	MEM, 10% FBS and NEAA (in suspension, S-MEM)
HEp-2	上皮样	人	喉癌	MEM, 10% FBS
HL-60	淋巴样	人	早幼粒细胞白血病	RPMI-1640, 20% FBS
HT-1080	上皮样	人	纤维肉瘤	MEM, 10% HI FBS and NEAA
HT-29	上皮样	人	结肠腺癌	McCoy's 5A, 10% FBS
HUVEC	上皮样	人	脐带	F-12K, 10% FBS 肝素 100 ug/ml
I-10	上皮样	小鼠	睾丸肿瘤	F-10, 15% 马血清+2.5% FBS
IM-9	淋巴样	人	骨髓瘤患者骨髓	RPMI-1640, 10% FBS
JEG-2	上皮样	人	绒毛膜癌	MEM, 10% FBS
Jensen	成纤维细胞	大鼠	肉瘤	McCoy's 5A, 5% FBS
Jurkat	淋巴样	人	淋巴瘤	RPMI-1640, 10% FBS

到什么山上唱什么歌

其实，大家对于细胞培养液的具体成分并不是特别关心。大家更关注的是，自己的细胞到底应该用什么培养液来养呢？这里的原则就是到什么山上唱什么歌，不同的细胞用不同的培养液。

老大 MEM，外号是应用最广泛的细胞培养液。顾名思义，MEM 可以用于绝大多数的细胞，特别适合于很多种哺乳动物细胞培养。

老二 DMEM 是在老大 MEM 的基础上发展而来的，double 了原来各成分的含量。分高糖型（含葡萄糖 4500mg/L）和低糖型（含葡萄糖 1000mg/L）两种，高糖型适用于生长较快，附着

性较差的肿瘤细胞，但是又不希望他脱离原来生长点的克隆培养，所以常用于杂交瘤技术中骨髓瘤细胞和 DNA 转染的转化细胞。低糖型对于生长速度较快、附着性差的肿瘤细胞有利。

老三 1640 培养液最初为培养小鼠白血病细胞而制备。开始的配方特别适合悬浮细胞的生长，主要针对淋巴细胞。其组成较为简单。但是，正是因为其简单，才可以适应很多种类细胞的生长。特别是主要用于一些悬浮细胞培养以及 monolayer culture of human leukemic cells 。

老三和老二的区别在于：1640 一般用于肿瘤细胞的培养，而 DMEM 用于较难养的细胞，比如正常细胞，因为前者的营养成分较低，而后者较高。

老四 F-12，最初开发用于支持 CHO、Hela 和 L-细胞生长，F-12 还用于培养原代大鼠肝细胞和前列腺上皮细胞增值。老大和老四联手，还是神经生物学最通用的培养基呢。MEM 和 F12 这两种培养基各取 1/2，就形成神经生物学最通用的培养基。已经成功的培养了外周神经元。

下面再送大家一个图，不同的细胞系对应的不同的培养液，供各位童鞋参考。

细胞系名称	细胞类型	物种	来源组织	培养液与血清
293	成纤维细胞	人	胚胎肾	MEM, 10% 马血清
3T6	成纤维细胞	小鼠	胚胎	DMEM, 10% FBS
A549	上皮样	人	肺癌	F-12K, 10% FBS
A9	成纤维细胞	小鼠	结缔组织	DMEM, 10% FBS
AtT-20	上皮样	小鼠	垂体肿瘤	F-10, 15%马血清+ 2.5% FBS
BALB/3T3	成纤维细胞	小鼠	胚胎	DMEM, 10% FBS
BHK-21	成纤维细胞	仓鼠	肾	DMEM, 10% FBS or MEM, 10% FBS and NEAA
BHL-100	上皮样	人	乳腺	McCoy'5A, 10% FBS
BT	成纤维细胞	牛	鼻甲细胞	MEM, 10% FBS and NEAA
Caco-2	上皮样	人	结肠腺瘤	MEM, 20% FBS and NEAA
Chang	上皮样	人	肝	BME, 10% 牛血清
CHO-K1	上皮样	仓鼠	卵巢	F-12, 10% FBS
Clone 9	上皮样	大鼠	肝	F-12K, 10% FBS
Clone M-3	上皮样	小鼠	黑色素瘤	F-10, 15%马血清+ 2.5% FBS
COS-1	成纤维细胞	猴	肾	DMEM, 10% FBS
COS-3	成纤维细胞	猴	肾	DMEM, 10% FBS
COS-7	成纤维细胞	猴	肾	DMEM, 10% FBS
CRFK	上皮样	猫	肾	MEM, 10% FBS and NEAA
CV-1	成纤维细胞	猴	肾	MEM, 10% FBS
D-17	上皮样	犬	骨肉瘤	MEM, 10% FBS and NEAA
Daudi	淋巴样	人	淋巴瘤患者外周血	RPMI-1640, 10% FBS
GH1	上皮样	大鼠	垂体瘤	F-10, 15%马血清+2.5% FBS
GH3	上皮样	大鼠	垂体瘤	F-10, 15%马血清+ 2.5% FBS

H9	淋巴样	人	T-细胞淋巴瘤	RPMI-1640, 20% FBS
HaK	上皮样	人	肾	BME, 10% 牛血清
HCT-15	上皮样	人	结肠腺癌	RPMI-1640, 10% FBS
HeLa	上皮样	人	宫颈癌	MEM, 10% FBS and NEAA (in suspension, S-MEM)
HEp-2	上皮样	人	喉癌	MEM, 10% FBS
HL-60	淋巴样	人	早幼粒细胞白血病	RPMI-1640, 20% FBS
HT-1080	上皮样	人	纤维肉瘤	MEM, 10% HI FBS and NEAA
HT-29	上皮样	人	结肠腺癌	McCoy's 5A, 10% FBS
HUVEC	上皮样	人	脐带	F-12K, 10% FBS 肝素 100 ug/ml
I-10	上皮样	小鼠	睾丸肿瘤	F-10, 15% 马血清 + 2.5% FBS
IM-9	淋巴样	人	骨髓瘤患者骨髓	RPMI-1640, 10% FBS
JEG-2	上皮样	人	绒毛膜癌	MEM, 10% FBS
Jensen	成纤维细胞	大鼠	肉瘤	McCoy's 5A, 5% FBS
Jurkat	淋巴样	人	淋巴瘤	RPMI-1640, 10% FBS

最后再唠叨一句，关于细胞培养液，一般的细胞系用 1640、DMEM 均可，我们以前常规用两种 1: 1 混合作为基础培养基，90%以上的细胞都可以养的很好，包括原代肿瘤细胞。需要特殊培养基的细胞，在文献里一般都会注明的。大家照着文献选用即可。

干货 | 培养液选配 7 个关键点，太实用了！

作者：毛博

培养液是人工模拟细胞体内生长的生存环境，对于细胞培养起着关键性作用。在这方面，毛博走了弯路之后得到一些宝贵的经验和教训，都是来自实战第一线的干货，字字血声声泪，先贡献给大家。

培养基，原配的总是最合适的

选择培养基没有一定的标准，某种培养基可以适合多种细胞，某种细胞也可以在不同培养液中生长。但是，建立某种细胞株所用的培养基应该是培养这种细胞首选的培养基。可以查阅参考文献，或在购买细胞株时咨询。例如，小鼠细胞株多选 1640；进行细胞杂交，基因转移实验，可选择 IMDM。另外，本实验室用惯了的培养基不妨一试。这些都是师兄师姐们用了几十年了。肯定好用的。

1640 还是 DMEM，取决于你发文章的决心



HyClone® DMEM / F-12 1:1

含 2.50 mM L-谷氨酰胺
含 10 mM HEPES
经 1 倍灭活过滤

货号: SH30023.01B

批号: NXA0548

规格: 1915

净含量: 500 ml

有效期: 2013-01-31

储存条件: 2-8°C

仅供科研 - 非生产用试剂
1. 用于细胞培养
2. 产品规格: DMEM / F12 1:1
3. 生产批号: 1915
4. 生产日期: 2012-11-15
5. 有效期至: 2013-01-31



Thermo

1640 的确是非常便宜的培养基，也很好用。所以在国内的实验室中，用的非常非常多。但是，它的缓冲力最弱，所以有时会对细胞的生长状态有影响，尤其是一些实验室长期传代状态不好的细胞。所以，毛博很败家地推荐：为了早点出文章，有条件还是用 DMEM，当然不是昂贵的 GIBCO 公司的，实在是太贵了。HYCLONE 的砍砍价，干粉很便宜，但是明显杂质和质量不如 GIBCO。一分价钱一分货。真的是真理哈。

2 到 3 周的量，多了也是浪费

一旦在新鲜培养基中添加了血清和抗生素时，应该在 2 到 3 周内用完它。因为，一些抗生素和血清中的基本成分在解冻后就开始降解。2-3 周后就降解完了。所以，一次少配一点，就不要偷懒了。

慎用碳酸氢钠

培养基的 pH 值随着碳酸氢钠量的增加，呈抛物线增长，当碳酸氢钠加到一定量时，pH 变化越来越小。而培养基的渗透压值随着碳酸氢钠量的增加，呈直线增长，碳酸氢钠量越大，培养基变成了高渗溶液，细胞会脱水萎缩滴。

血清分装防膨胀

必须贮存于 $-20 \sim -70^{\circ}\text{C}$ ，若存放于 4°C ，如同第三条所说的，2~3周就降解了。教大家一个小窍门：可将1瓶500ml的血清，每次40~45ml分装于无菌50ml离心管中，由于血清结冻时体积会增加约10%，必须预留此膨胀体积5~10ml，否则会把离心管冻裂滴。

血清解冻，慢是王道

科研资源网



一祺兽药



标准新生牛血清

(无菌过滤、未经灭活)

原 料：系采用出生20小时以内新生牛血清为原料
 性 状：澄清粘稠液体，有少量蛋白析出
 质量标准：符合2010年版《中国药典》
 规 格：500ml/瓶
 无菌试验：合格
 保 存：密封保存于-10℃至-30℃
 注意事项：热灭活后，将蛋白沉淀去除使用
 生产日期：
 有效期至：12月

平国生物科技(北京)有限公司
 地址：北京市海淀区北四环西路15号试验楼四层4294
 邮编 100089
 电话 18911849330 18911842330
 网址 www.pgwky.com
 邮箱 pingguoshengwu@126.com

血清的解冻和细胞的解冻正相反：细胞是越快越好；血清是越慢越好。血清解冻步骤：-20℃或-70℃冰箱拿出来，放到4℃冰箱，放一天。在这一天中，时不时地去摇晃一下，使温度与成分均一，减少沉淀的发生。一天过后，拿出来放到室温下，等血清恢复室温了，再分装。

热灭活？别上它的当！

掌握一条原则：除非必须，一般不要热灭活，因为会造成沉淀物显著增多，且会影响血清的品质。这些沉淀物在显微镜下观察，像是“小黑点”，常常误以为是血清遭受污染，又去过滤呀什么的，无端增加没有必要的工作量。这里毛博提醒大家：一般不要热灭活。

干货 | 铺出漂亮细胞板的要点顺口溜，收藏有益！

作者：毛博

做贴壁细胞的实验，经常需要做细胞铺板。这个实验看似简单，其实也不是那么好做的。关键是要铺得均匀铺得平整，要是中间密周围稀，或者周围密中间秃顶，那就露怯啦。这里，毛博给大伙儿分享一些技巧，按照实验步骤的前后顺序排列，并且总结为几句顺口溜，方便记忆。

收集细胞要混匀

消化后的细胞一定要充分混匀，要把聚在一起的细胞团充分地吹打开，最好是单个的状态，但同时又不能损伤细胞，可以用玻璃吸管的移液器操作。离心也很有讲究，一般用 1000 rpm/min 即可。离心力太大细胞容易抱团！然后悬浮离心后的细胞团时，先不要把所有液体都加进去！一般先加 2mL 液体，然后用 1mL 移液器轻轻将细胞吹起，细胞要像云雾一样散开，这样易于形成单细胞。象下图所示的这种移液器就非常好用。



接种细胞须小心

铺 6 孔板，12 孔板或 24 孔板，先在每个孔里面加 1mL 的培养基，晃动使之铺匀整个孔底，然后加入 1 mL 的细胞悬液。从孔的左边靠近底部慢慢加入，这样细胞悬液会平铺在整个孔底，细胞分散较均匀，注意加完细胞悬液后要放工作台静置一下。这里又有一个窍门，放在显微镜的载物台上面。因为显微镜的载物台是水平校正过的，比什么桌面、超净台什么的要平多了。在载物台上放置 20-30 分钟，细胞不差这一会温度和二氧化碳的，等细胞贴壁了，轻轻移入到孵箱中。

铺 96 孔板，我每孔是加 100 微升细胞悬液，加完半边板 48 孔后，将剩下的未加的细胞悬液再混一下，再继续加剩余的半边板子，都加完后盖上盖子，左手轻轻扶住板的左边，右手轻轻敲击板的右边缘，注意把握力度，敲三次即可，太大力或次数太多会导致细胞集中成堆。也有人推荐轻微的左三圈、右三圈、前三圈、后三圈。

轻轻敲打勿抱团

细胞悬液加完后，将细胞培养板抬高，对着灯光，从底部往上看，看细胞有没有抱团。如果有抱团的话，用手指从底部轻轻敲打，使之分散。也可以用平板振荡器稍稍振荡一下，效果不错。参数要设置成振幅小而频率高哈。



十字交叉要水平

观察和敲打后放入培养箱，然后画“十字”，就是把细胞培养板贴着培养箱搁板，前后方向来回晃动 10 次，再左右方向晃动 10 次，正好是一个“十”字形。然后就让它静静地呆在培养箱搁板上，没事不要去动它。这里要注意的是，托架应该装在四根立柱相同高度的孔上，培养箱的搁板要水平校正，尽量地做到水平。搁板会向一个方向倾斜，对于贴壁时间长的细胞，就算当时混匀了，放进培养箱后也摇匀了，但是重力作用下细胞也会向一侧聚集。培养箱里面或者外面尽量不要放可以产生振动的仪器，比如蠕动泵、离心机、涡旋器一类的仪器。这些仪器产生的振动对细胞贴壁有影响，也可能导致细胞贴壁不均匀。还是要给细胞一个安安静静生长环境，让他安静地做个美男子好了。



细胞铺板不难，但是细节很多，须知“魔鬼都在细节中”。理想的细胞铺板应该是下图这样的。希望大家都能够铺出这样漂亮的细胞来。

让细胞培养不再为难新手

作者：毕老师

细胞培养起初对于我这种“女汉子”性格的人来说，着实是枯燥至极的工作，因为面对的细胞，它不会说话不会笑不能对你有任何回应，而且对于喜欢外科喜欢拿刀的我来说，细胞培养更像是个内科医生做的事情，每天换液就如同换药，它污染了就需要上各种抗生素来“抢救”它。。。。。。可是随着一天天的相处，一天天的用心体会，我渐渐发现原来细胞培养也是一项十分有意思的工作，下面将我的一些经验分享给大家。

换液：

从培养箱中取出培养瓶：

用吸液管将瓶的废液全部吸出（在培养瓶的左下角吸走液体，勿接触细胞），吸管丢弃。

更新吸液管，从培养液贮存管中吸取新培养液，加入培养瓶，注意哦，千万不要直接冲洗细胞，细胞们都娇滴滴的，容不得半点“风吹雨打”。吸出废液至加入新液之间一般不超过 5-10 秒钟，以免细胞因干燥而死亡。

保留该吸管（节省一根是一根），用于吸取下一轮需要换液的同源细胞的废液，注意一定是废液。（同源细胞、无污染的几个培养瓶可用同一根吸管吸走或加入培养液。）

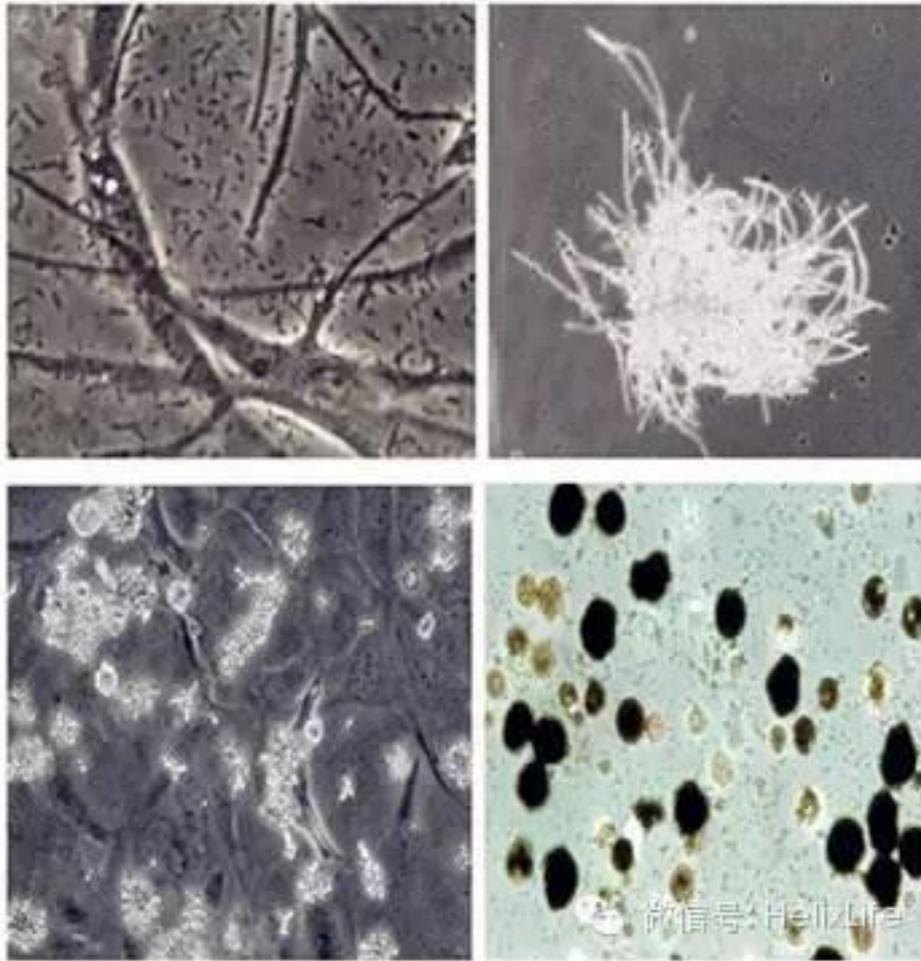
先换生长速度慢的细胞，再换生长速度快的（这似乎和我们平时“早起的鸟有虫吃”的原则不同，长得快的要后吃饭，嘿嘿）；先换无污染的，再换有污染的。

微生物污染处理：

每天到实验室的第一件事，肯定是看我的“心肝宝贝儿”——细胞，最害怕的事情莫过于发现细胞污染了，那种心情就像母亲每天醒来看自己的孩子，结果发现孩子生病了一样焦急难过。如何发现细胞污染呢？首先要在取出细胞后，先观察一下培养液的颜色，如果培养液都能看出污染了，那这个细胞基本就无药可救了。



培养液肉眼看着正常，细胞就一定正常吗？答案是否定的。最关键的还是要通过我们的必备神器——显微镜来观察，下面给大家看一些细胞污染的图片：



有微生物污染的一般均丢弃。如污染不严重而该细胞株较重要，则可试行治疗如下：尽量吸净原培养液装在有盖的小瓶子里，盖好；用过吸管放桌下收集有污染物品的盒子里；用 Hanks 液或培养液洗涤 2 次（环形摇晃几周，再将液体吸走，放在有盖的瓶子里）；加入抗生素。如为霉菌污染，则加抗霉菌素—两性霉素 B (Fugzone) 终末浓度为 2.5 ug/ml。预防量减半。

细胞污染不仅限于细菌等微生物，当同时培养多种细胞，细胞与细胞间也会发生交叉污染，这个时候我们可以用遗传霉素（Geneticin）终末浓度 100 ug/ml，如保存液为 1:30，则在培养瓶/皿中每 3 ml 培养液加 0.1 ml Geneticin。

单纯传代步骤：

以 25 cm² 培养瓶（6 ml）为例，用 5 ml 吸管将原培养液吸出；

用 2 ml 吸管吸取 D-Hanks 液 2 ml（12.5 cm² 培养瓶和 6 皿板用 1 ml）加入培养瓶，以洗清血清，轻晃几次后吸出；

用 2 ml 吸管吸加 TE 1/2（Trypsin 0.025% + EDTA 0.01%）2 ml，轻晃使之到达每个角落（一定要照顾到各个角落啊，即使是冷宫的细胞娘娘也要照顾到），放入 37℃ 水浴，使贴皿细胞脱落。

观察时见细胞基本浮起，用 2 ml 吸管加 0.2 ml 血清中和，吸出瓶中的液体及细胞（即 2.2 ml）。如按照 1:4 稀释传代，则 0.5 ml 传代（1.5 ml 保存或丢弃）加至 15 ml 离心管。该吸管可保留再用。

取等量的离心管作配对，进行离心（5分钟，标记60处，即1000-1500转/分）；

离心后用上一步骤保留的吸管将离心管中的上清液吸走；换一根5 ml吸管，吸取6.5 ml培养液，加5.5 ml至培养瓶（12.5 cm²培养瓶则吸取4.0 ml培养液，加3 ml至培养瓶），加1 ml至离心管，用巴氏管适度吹打5次，全部吸出，水平横持巴氏管滴入培养瓶，保留1-2滴加入血球计数板作计数。

将培养瓶置于培养箱。

以上都是常规的操作，也是每个科研狗每天都要面对的工作，貌似枯燥无味，实则妙趣横生，只要用心你会发现其实别有洞天。

咦，你怎么连 Vero 细胞都养不好？

作者：小杜

我：师兄师兄，能再给我一瓶 Vero 细胞吗？

师兄：前天不是给你了一瓶吗？

我：师兄，那，那一瓶被我给养坏了。

师兄：啊！那之前给你的那几瓶呢？

我：师兄，额额，那几瓶，都被我养死了。。。。。

师兄：咦，你怎么连 Vero 细胞都养不好？不过好在你运气好，有个乐于助人的师兄，今天我就来告诉你，Vero 细胞怎么养。

首先你要知道 Vero 细胞是什么。

Vero 细胞其实全名叫非洲绿猴肾细胞，是从健康非洲绿猴肾组织分离培养得到的。一谈起 Vero 细胞，肯定就是要和病毒以及疫苗联系起来。因为病毒疫苗的基础是细胞培养、收获足够量的病毒，那么 Vero 细胞就是在培养病毒时所需的一种细胞基质。

正因为如此，Vero 细胞是目前疫苗生产使用最多的一种传代细胞，目前已经广泛用于乙脑疫苗、流感疫苗、脊灰疫苗、轮状病毒疫苗、黄热病毒疫苗、甲肝疫苗、人用狂犬病疫苗等疫苗的生产。对于这个研究大方向的童鞋们来说，养好 Vero 细胞就应该是必备的技术基础了。

其次，它的形态简单描述为：铺路石样排列的贴壁细胞。一般情况下你看到的除了菱形的铺路石以外，肯定还有一些飘着的实心 and 空心的细胞，实心的是还没有来得及贴壁的细胞，那么空心的呢，对不起，这些是死细胞。如何使空心的细胞极少呢？这就涉及到如何养 Vero 细胞的方法了。

那么，如何养 Vero 细胞，从培养基讲起，其实一般来说，每个实验室都有自己独特的养细

胞的经验，就拿我摸索出来的经验来说，我认为培养基的配方就是养好 Vero 细胞的第一准则。

培养 Vero 细胞的培养基配方是：85%MEM+10%胎牛血清+2%碳酸氢钠+2%谷氨酸+1%的双抗。当然有些实验室建议如果是用胎牛血清的话，可以不用 10%这么高的浓度，但是，凭经验看，确实养得好的细胞都是通过好的培养基“金贵”出来的，如果细胞状态足够好，后面是可以将血清浓度降下来，这个对于细胞影响不是太大。

如果有纯的 MEM，就尽量用这个，不要轻易尝试一些比如 MEM-ALPHA 什么的培养基，原因就两个字“麻烦”。如果本身细胞状态就不够好，你又通过更换培养基浓度或是种类来折腾细胞，那就得不偿失了。那么养好 Vero 细胞的第二准则是什么呢？是消化。

我们知道对于贴壁细胞而言，消化是非常重要的一个步骤。我们用胰酶消化 Vero 细胞的时候有两个小 tips。

其一用 PBS 洗细胞三次以后，将胰酶加入培养瓶，10 秒左右去掉胰酶，放入 37℃培养箱消化，每隔 10 秒左右轻轻晃动培养瓶，直到观察到有流沙状细胞滑动。

其二是用 PBS 洗细胞三次以后，将胰酶加入培养瓶，一分钟以后倒置，将有细胞的面朝上，然后轻轻拍打，使细胞脱落。这两个小 tips 都很适用的，因为相对于拍打和 37℃消化而言，胰酶消化的时间过长，后者引起的细胞伤害更严重。

当然除此之外，**养 Vero 细胞和普通细胞一样**：要注意无菌操作、不要看细胞太勤、注意轻拿轻放、传一瓶拿一瓶、让细胞尽可能多的享受自己最适的生活环境。做到这些，你的细胞

养不好都难。

我：哇！师兄，听你这么一讲，我豁然开朗！

师兄：不要崇拜哥，毕竟哥也是从一步一步失败中总结走出来的。最后要注意，每一个实验室往往都有一套做这个东西最适用的方法，记得多问问师兄师姐。

干货 | 细胞培养中的“疑难杂症”，你遇到的都在这里了

作者：子非鱼

细胞培养做为生物学研究最基础的技术之一，可以说是渗透科研界的方方面面。工欲善其事，必先利其器。细胞好不好，就看你懂不懂细胞培养的各种技术了。那现在小鱼就将自己压箱底的细胞培养经验拿出来供大家分享。

♥ 原代培养

从原代组织中分离细胞的最常用的方法是酶解法（胰蛋白酶和胶原酶）。

用无菌的解剖刀和剪子将组织剪成 3~4mm 小片，用平衡液（无钙镁离子）清洗组织碎片后去除上清液，并加入 0.25%的胰蛋白酶（Trypsin，100mg 组织加入 1ml 胰蛋白酶）或者胶原酶（Collagenase，50~200 单位/ml），孵育 4-18h。离心取上清后，用平衡液清洗几次后，用完全培养基悬浮细胞，进行培养。

♥ 传代培养

依据细胞生长的特点，传代方法有 3 种：

1. 悬浮生长细胞传代（离心法）

将悬浮细胞离心（1000rpm，3 min）去上清，收集沉淀物加新培养基，混匀后进行传代培养。

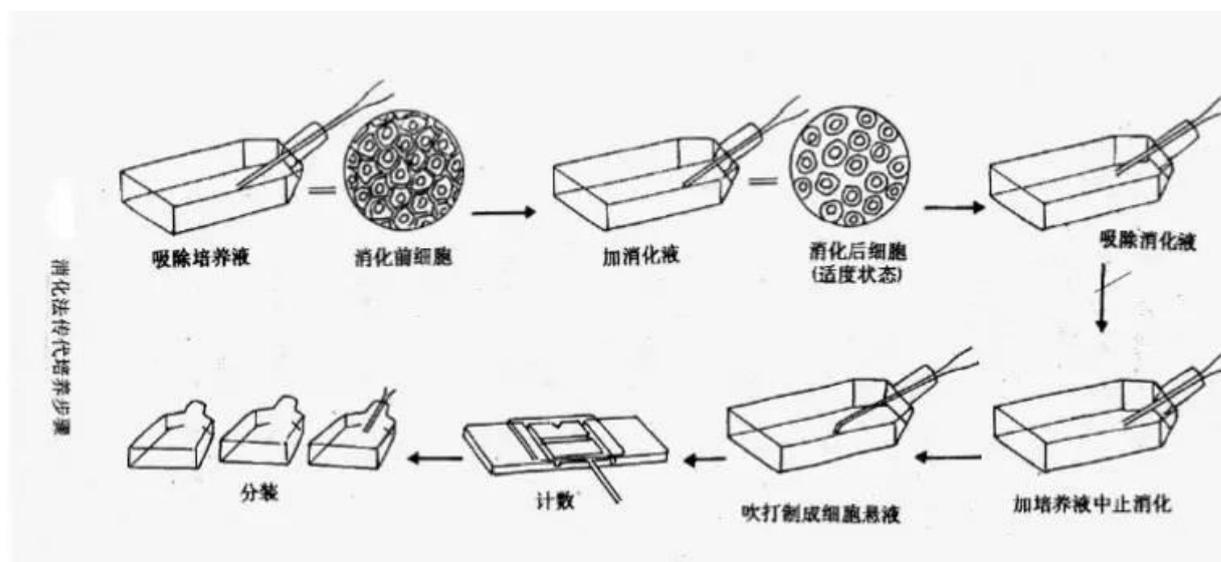
2. 半悬浮生长细胞传代（直接吹打法）

此类细胞（如 Hela 细胞）部分贴壁，但黏贴不牢，可用直接吹打法使细胞从瓶壁上脱落下来，进行传代。

3. 贴壁生长细胞传代（酶消化法）

去除瓶内培养液后，加入 1-2ml 0.25%的胰蛋白酶液（以消化液覆盖整个瓶底为准）37℃静

置 2-10min（显微镜下动态监测）。移去蛋白酶液，加入培养液反复吹打瓶壁细胞，离心将细胞沉淀用培养液制成细胞悬液。吸取 1/10—1/40 细胞悬液，接种于含有适量新鲜培养液的新培养瓶中进行传代培养。



注意事项：细胞接种数要达到 $5 \times 10^4 \sim 8 \times 10^5$ 个/ml，传代密度太低时，细胞容易死亡，在达到增殖期前有较长的滞留期；培养液由 pH 下降而呈黄色时，细胞已达最大密度而需要换液或传代；单层贴壁细胞，等长满培养瓶表面时，即可传代；吹打细胞时，动作要轻柔缓慢，减少对细胞的机械损伤；传代时细胞接种数量要多；培养基的 pH 要低些；首次传代时，小牛血清浓度可加大至 15%~20%。

♥ 细胞计数

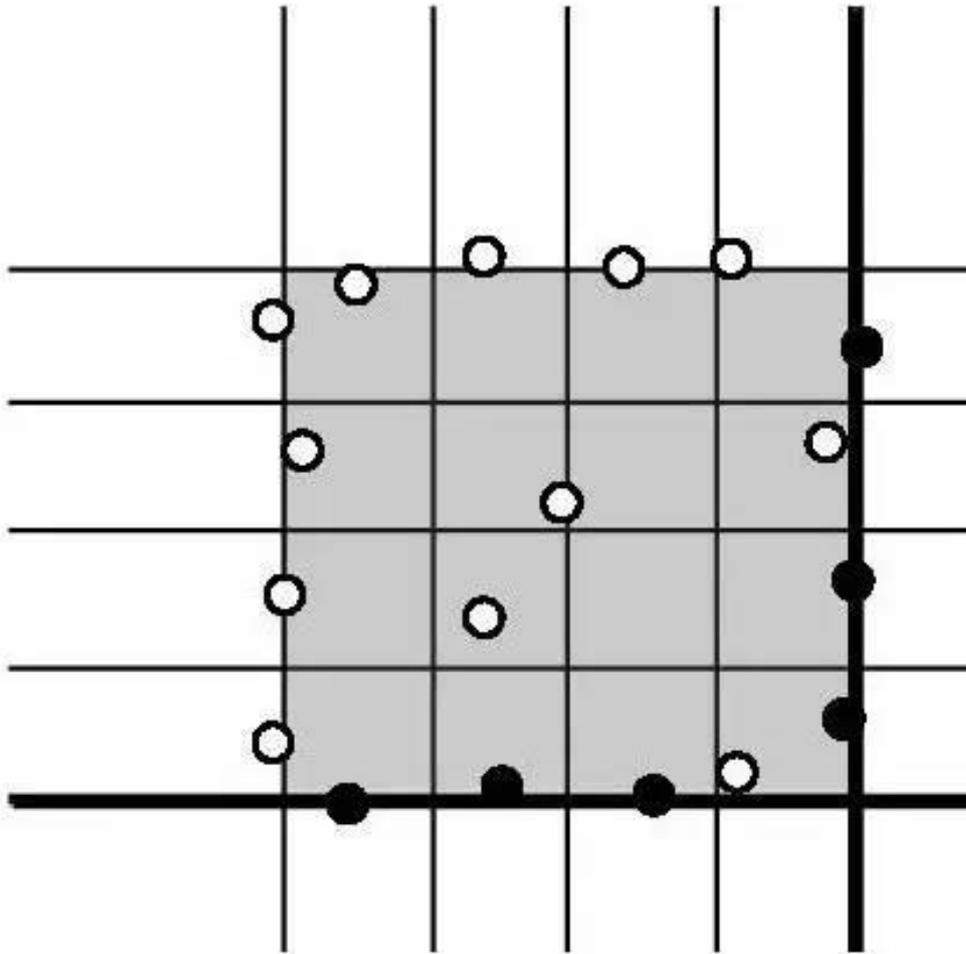
一般条件下具有一定密度的细胞才能生长良好，所以细胞计数对细胞培养也非常重要。计数结果以每毫升细胞数表示。可分为两种计数方法：血细胞计数器（手动计数）和 Coulter 计

数仪（自动计数）。

细胞计数步骤

- 1 将血球计数板及盖片擦拭干净，并将盖片盖在计数板上。
- 2 将细胞悬液吸取少许，滴在盖片边缘，使悬液充满盖片和计数板之间，静置 2min,镜下观察，计算计数板中四大格的细胞总数。

细胞数/ml=4 大格细胞总数/ 4×10^4



注意事项：压线细胞只计左侧和上方的。镜下偶见由两个以上的细胞组成的细胞团，应按单个细胞来计数，若细胞团占 10%以上，说明分散不好，需重新制备细胞悬液。

♥ 细胞冻存与复苏

考虑到培养细胞因传代而迟早出现变异，同时也为了避免长期培养中细胞遭到污染。要对细胞进行冷冻保存。细胞冻存及复苏的基本原则就是慢冻快融，尽量减少胞内水分子形成冰晶，最大限度保存细胞活力。细胞中常用的冻存保护剂是 DMSO 或者甘油。

冻存：1）将预先配制好的冻存液（20%血清培养基+10%DMSO）与制备的细胞悬液（ $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ /ml）以 1:1 的体积混匀，1ml 分装于冻存管中，密封后标记。2）冻存方法：
①先将冻存管放入 4℃冰箱，约 30min；置于-20℃冰箱，约 30-60min；然后有三种方法保存，择一即可：1、置于-80℃冰箱过夜，置于液氮罐中长期保存。2、将冻存管捆绑在一起，外层包以厚层棉花，置于-80℃冰箱过夜，置于液氮罐中长期保存。③、将冻存管放于程序降温盒中，并置于-80℃冰箱过夜，置于液氮罐中长期保存。



注意事项：由-80℃冰箱转移到液氮时速度要快，避免温度上升影响细胞活性。

复苏：1) 取出冻存管，立即放入 37 度水浴箱中快速解冻（1 分钟左右），水面不可没过盖子，以避免污染。2) 将冻存管移至无菌操作内。打开冻存管，将细胞悬液吸到离心管中，1000rpm, 5min，弃上清。3) 加入适量完全培养基，置于 37 度恒温箱中培养即可。

♥ 细胞活力鉴定

细胞活力=活细胞数/细胞总数×100%，常用台盼蓝法、MTT 法或者 CFSE 法进行细胞活力检测。

台盼蓝法

原理：活细胞不被染色，死细胞被染成蓝色。

方法：500ul 细胞悬液加入 500ul 0.4%台盼蓝染液，染色 2-3 分钟；将少许悬液涂于载玻片上，加上盖片，显微镜下取几个任意视野分别统计死细胞和活细胞数，计算细胞活力。

MTT 法

原理：活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶可使外源性 MTT 分解产生水不溶性蓝色结晶状甲瓚颗粒（Formazan）并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。DMSO 溶解甲瓚后，用酶联免疫检测仪在 540nm 或 720nm 波长处测定其吸收值，可间接反映活细胞数量。可用于生物活性因子的活性检测、大规模的药物筛选、细胞毒性试验鉴定等。

方法：将细胞悬浮液以 1000-10000 个细胞接种到 96 孔板，每孔体积 200ul，培养细胞 3-5d（依据实验目的和要求决定培养时间）后，每孔加入 MTT 溶液（5mg/ml 用 PBS 配制，pH=7.4）20ul，37℃温箱中孵育 4h 后，小心去上清，加入 150ul DMSO 溶解后，用酶标仪进行检测。（市场上售卖的 CCK8 试剂盒，便是对 MTT 法的一种优化）。

CFSE 法

原理：CFSE 进入活细胞后，可与胞内蛋白共价结合，水解后释放出绿色荧光。CFSE 随着细胞分裂而平均分配至子代细胞中，而导致荧光强度逐级递减，依据这一特性，可被用于检测细胞增殖活力。

方法：制备细胞悬液后，加入等体积的 CFSE 工作液（2.5-5uM），于 37℃孵育 10 min，用 10 倍体积的预冷的基础培养基（不加血清）立即终止标记 10min。用 PBS 离心洗涤两次后，用适量的完全培养液重悬细胞。培养一段时间后，离心收细胞，用 PBS 洗两次并重悬后，上流式仪器检测荧光强度的稀释比例。

技术 | 如何把细胞养的更漂亮

作者：子非鱼

1.对细胞君“量才适性”



不同的细胞，生长环境不同，除了细胞君其饮食习惯（培养基）的不同，还有就是细胞生长的空间密度问题。

有一些细胞就是喜欢热闹，对他们来说，数量多一点比较好生长，生长状态也比较好。这种一般是属于生长速度慢的细胞。比如内皮细胞。而有一些细胞则倾向于离群索居，数量少一点细胞状态会生长的比较好，譬如巨噬细胞和某些肿瘤细胞。尤其是巨噬细胞，生长速度非常得快，贴壁速度很快，所以传代时就应该留很少量的细胞，这样细胞状态会比较好。并且巨噬细胞比较喜欢玩小圈子（扎堆生长），而堆与堆之间是有空间的。如果长成相连在一起

的一满片的时候，细胞形态基本上就会差了，老化的会比较多，对后期实验结果是不好的。所以在养细胞的时候应该摸索该细胞喜欢的生长空间密度问题。

改善形态有技巧

对于有些人总是会遇到养的细胞形态怎么都不好的问题。这个其实是有一个方法可以改善的。对于贴壁细胞，如果细胞形态不好，（或者细胞形态不清晰，表面似有异物等）可以在传代的时候进行如下操作：

首先，倒掉旧的培养基，加入 **3ml** 新的培养基（有无血清的都可）洗涤一次，用滴管吸走，然后再加入 **3ml** 的培养基，进行预吹打，控制吹打力度，轻轻地大概沿着瓶底过一遍，然后吸走。这时候再开始正式的消化、吹打。（巨噬细胞我们只吹打，不消化的）

其次，把吹打下来的细胞悬液加入到新的培养瓶内，培养瓶事先加入培养基，放入培养箱内培养，按时间点观察细胞贴壁情况。**10** 分钟观察一次，**20** 分钟，**30** 分钟观察一次。选择一个时间点，已经有部分细胞贴壁的情况下，重新置于洁净台，底面朝上迅速倒出其中的培养基，加入 **3ml** 新培养基再轻轻洗一次。然后加入完全培养基培养。后续观察细胞生长情况以及形态。我称之为“二传”。呵呵。

如果一次效果还不理想，可重复多次。直到找到细胞完美形态。其中要注意，结合细胞喜欢的生长情况。喜欢多一点数量长得好的细胞你就等贴壁细胞比较多点的时候再传。

过饱过饥均不宜



关于培养瓶内加入培养基的量的问题，这个是要靠自己去摸索你所养的细胞的。并不是小的玻璃方瓶 12ml，大方瓶 14ml 的。有些细胞反而是培养基少一点相反细胞形态会长得比较好。（可能也是竞争很大，有优胜劣汰吧。呵呵。）对于生长速度快的细胞，易生长的细胞加少一点培养基细胞形态会更好。但是要注意换液掌握。

“端籽择邻”，为细胞提供最适宜的生长环境



小鱼发现生长速度快的细胞在玻璃瓶内生长的状态会比一次性塑料瓶相对好一些。而对于同一种细胞，在其生长旺盛快速的时期在玻璃瓶内的生长状态也比塑料瓶内好。这可能是因为塑料瓶比玻璃瓶更容易贴壁。生长速度快的细胞在塑料瓶这种相对“更安逸”的环境里反而长得状态不如玻璃瓶好。

孟母三迁居处，选择良好的环境，来影响孟子的成长，所以对待细胞也要“断杼择邻”，对于生长速度慢的细胞如果想要更漂亮的细胞状态，塑料瓶比玻璃瓶会好，对于生长速度慢的细胞，玻璃瓶则会更好。同样，对于同一种细胞，在其生长速度慢的时候，塑料瓶会好一点，比如刚刚复苏的时候，或者原代培养的时候。而在其生长旺盛的时候，玻璃瓶则相对会好一点。

经验 | 我的细胞复苏后怎么直接挂了？

作者：子非鱼

作为一名资深拖延症患者，小师弟养细胞的时候，非得看到细胞在细胞瓶上像上海早晚高峰的地铁一样拥挤不堪了，才肯摁下视频暂停键去给细胞传代换液，于是，N天以后，细胞房传来一阵哀嚎。

小师弟：师姐师姐，为什么我昨天复苏的细胞怪怪的？形状变了，感觉就是萎靡不振的样子。

师姐：天啊，培养基都变黄了，你这细胞长太密了。下次冻存时可以让细胞密度小一点。不过复苏后细胞状态不好还有几种原因：细胞可疑污染；细胞已经开始开始凋亡或崩解；冻存前连续培养超过两个月，细胞形状已有改变。因此，冻存细胞时，要待细胞增殖旺盛，情况稳定，试验效果良好才冻存，复苏以后才会长得好哦！

从此以后，师弟对养细胞比对女漂还上心，时时进出细胞间对细胞嘘寒问暖，然而，又N天以后，细胞房又传来熟悉的哀嚎声。

小师弟：师姐，为什么？为什么？我的细胞复苏后长不起来？

师姐瞄了几眼：噢，你的细胞应该“孤独死”了~

小师弟：什么？师姐你不要逗我了。

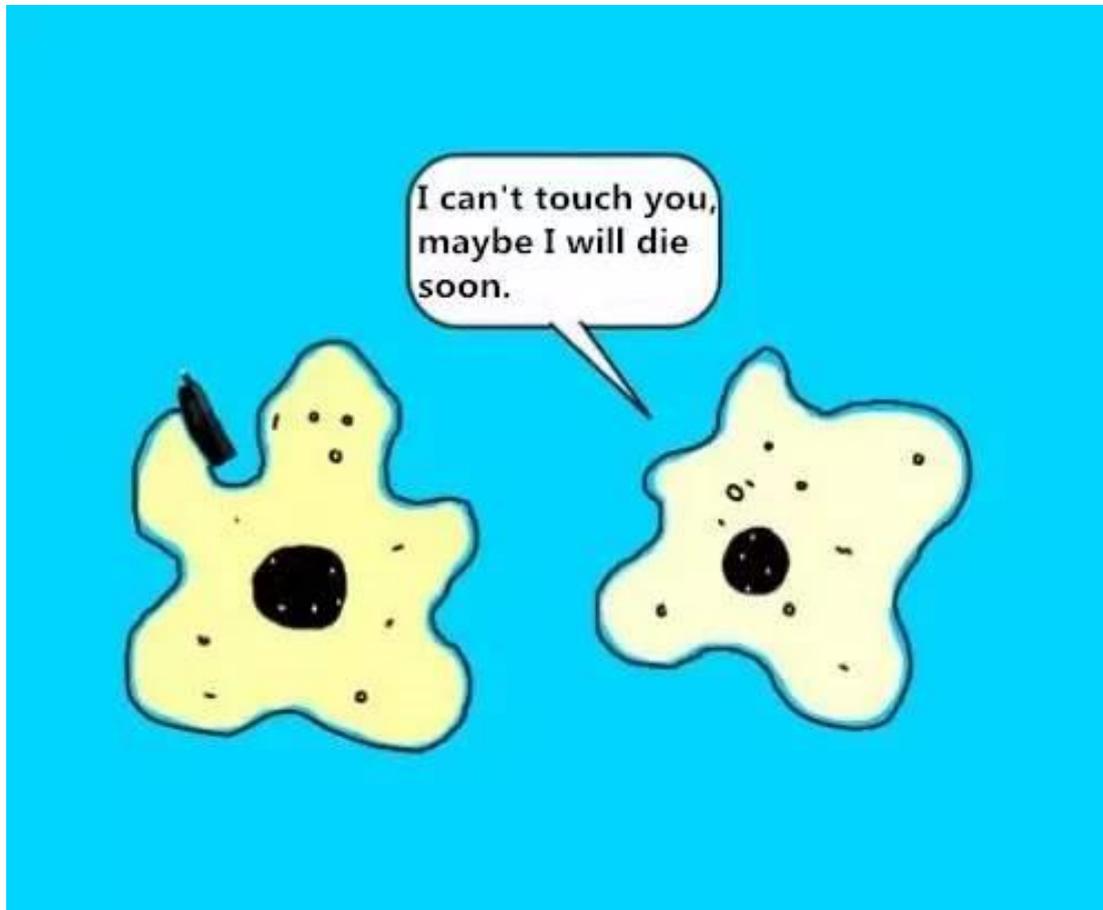
师姐：就是细胞数太少。



小师弟:师姐，还有什么影响细胞复苏的因素，求求你一次性把话说完吧，我快崩溃了。

细胞数太少：细胞也会害怕孤独，健康生长需要细胞间的连接，冻存时细胞浓度低于 $1\sim 5 \times 10^5$ 个/ML，复苏很难成功。

解决：细胞计数，离心后调整细胞浓度。（不要重新洗细胞）

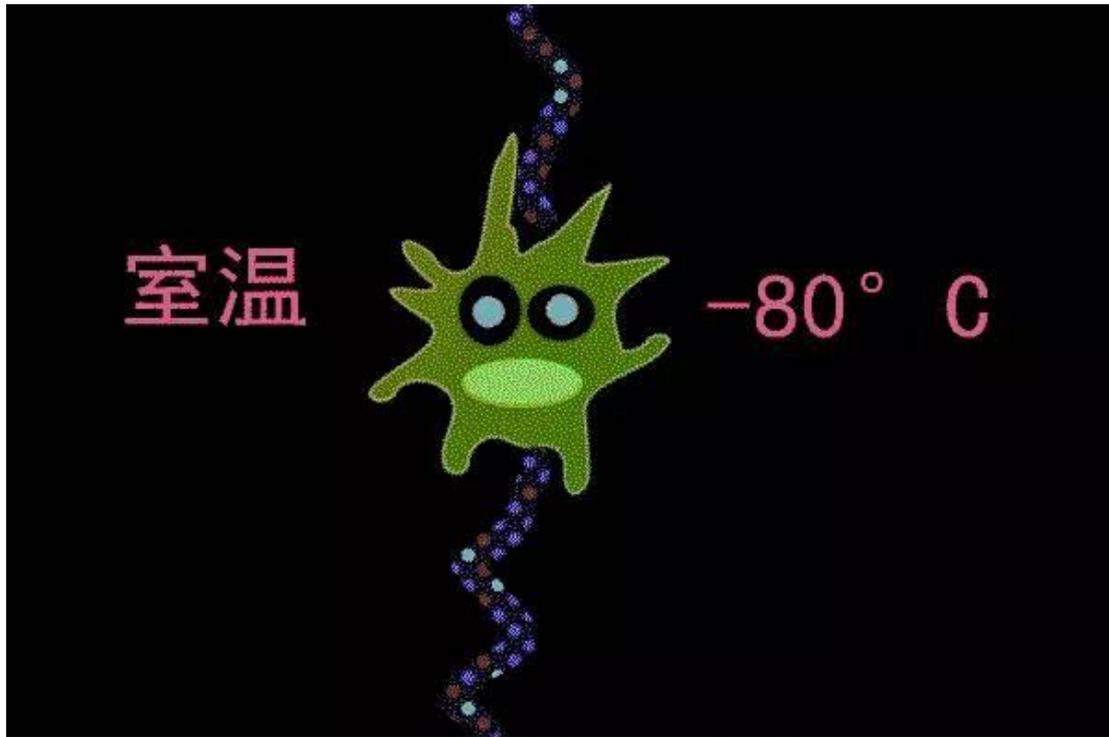


冻存时盖子拧不紧：冻存管的盖子一定要拧紧，否则复苏水浴时会渗水，造成污染。

解决：冻存时确保盖子拧紧，并选择原配的管子和盖子（不同牌子、型号的管子会有差别）

冻存时没有严格进行梯度降温：直接放在-80度冰箱里的冻存盒，冻存盒壁太

薄，细胞在被迅速降温。



解决：冰火两重天的生活环境不适合细胞君，谨记：缓降！选择厚壁泡沫塑料盒，或塞入大量干棉花。

-80 度放太久：放在-80 度冰箱超过半年。（冰箱的温度难以恒定：开门/关门，电压不稳定等）

解决：尽快转入液氮。

液氮不足：液面不能漫过所有细胞。

解决：定期测量液氮储备，保证细胞全部浸在液面下。

取错细胞：-170 度的液氮罐，多冻啊，液氮罐也不能打开太久，于是手忙脚乱之中找不到 or 拿错冻存管的事也是时有发生。

解决：每支冻存管都标上细胞的名称，冻存时间，并记录在册。拿细胞时戴手套。

水浴时间太长：2min 还没融化。（冻存管的壁较厚，隔热）

解决：（1）适当提高水浴温度（37 度—40 度）。（2）要是冬天，就选用保温盒。

冰盒内时间太长：或许因为细胞房人满为患，超净台使用紧张，复苏 1h 后，还没有加入新的培养液。（高浓度 DMSO 防止胞内形成冰晶，冻存时保护细胞，但复苏融解后，浸泡时间太久会，对细胞有毒性）

解决：提前预定超净台，减少复苏后插在冰盒里等待的时间。

失去耐心：复苏三四天后，细胞没有任何动静，认为失败，倒掉所有细胞。（有些细胞复苏后一星期，才有起色）

解决：不要换液，耐心等待，两周后再做决定。

这些样本冻存和复苏的坑，怎么破？

作者：向日葵

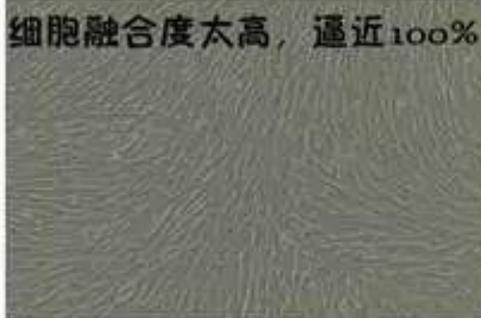
小葵最初做实验的时候，往往看个大概就开始操作了，常常以为自己都会了，但经常掉坑里。想少走弯路，就要深谙其中门道，避开前人所遇到的陷阱。今天小葵就来讲讲自己亲身经历的那些不堪回首的过往，希望大家引以为戒。

复苏时遇到冻存时挖的坑

实验室偶尔也会发生这样的情况：“靠，细胞要死了，赶紧冻掉，不能让细胞死在我手里。”“天呢，细胞培养液都这么黄了，赶紧冻掉。”“妈呀，细胞融合度都逼近 100%了，赶紧冻掉。”“咦，细胞好像少了点，算了，就这样吧。”如果你复苏的细胞就是上面这些人所留下来的，那就要格外注意了。



警察叔叔，看就是这群坑货，把细胞糟蹋成这样就给直接冻存了。

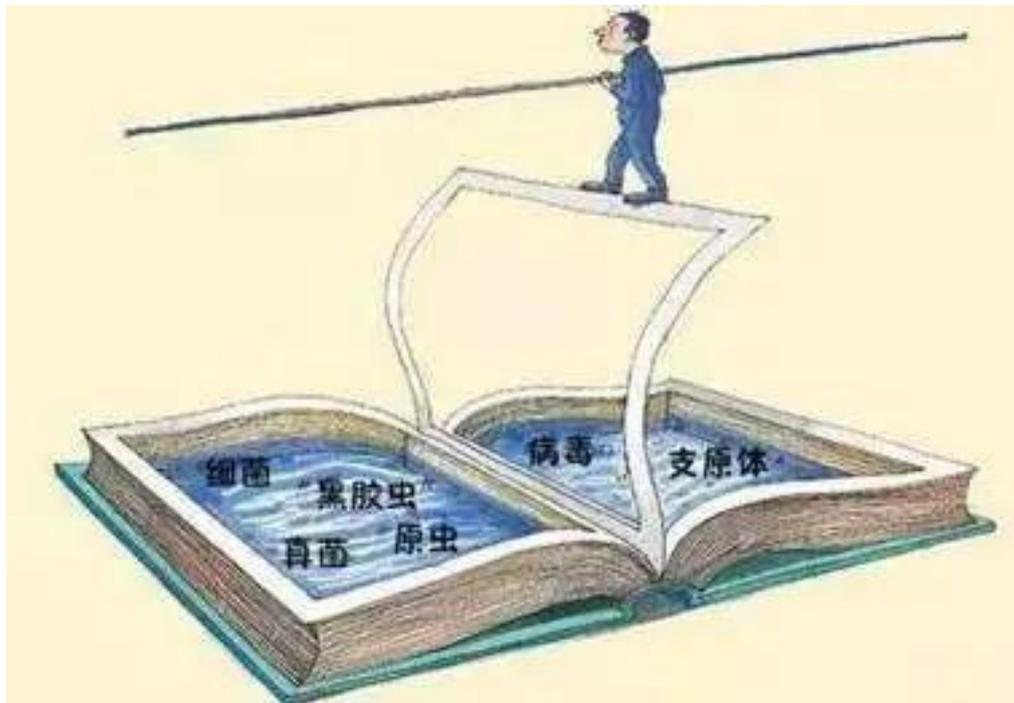


解决方法：

所谓知己知彼才能百战不殆，在复苏前，一定要先清楚地了解这份细胞的增殖能力。如果增殖能力不高，接种时就要增加细胞接种密度并添加 5%~10% 的血清。如果细胞本身数量就非常少，也可以不离心，直接接种培养（加入培养基的体积 > 5 倍的冻存细胞体积）。复苏后 3 天内尽量少对细胞进行操作，延迟换液时间。

无孔不入的微生物

做实验就像走钢丝，稍不留神就会跌进充满微生物的沼泽中不能自拔。



解决办法：

冻存时，一定要拧紧冻存管的盖子，否则水浴复苏的时候，水浴锅中的水就会渗入到冻存管中去，造成细胞的污染并会使那些低免疫力的接受移植的患者产生严重的感染。

推荐几款最新的细胞干式复苏的仪器给大家，可以避免传统人工水浴方法的污染风险并且在复苏的整个过程中可对数据进行追踪。

INNOTHAW



适用于冻存袋



适用于冻存管

细胞非正常“复苏”

那是一个安静的下午，大家都在专心地做着实验，突然听到有人大叫“这是谁的细胞，一直放在外面，都化了。”原来刚才同事取细胞的时候，把整个冻存架都拿了出来，后来居然忘记再把它放回液氮罐中。而此时细胞们已经无一幸免地“融化了”。

解决办法：

马上种瓶，千万不要把这些细胞继续放回液氮罐中冻存。此时细胞内已经有大量的冰晶形成，细胞膜已经受到损伤，如果离心就会造成细胞膜完全破碎、细胞立即死亡的后果。所以切记不要离心，而应直接种瓶，也不要进行吹打，只轻轻摇晃。培养时加入 10% 的血清，种瓶后

48h 内都不要对细胞进行操作。这是一个真实的案例，后来在大家的努力下，那些增殖能力本来就旺盛的细胞还是活了下来。

备注：本办法也同样适用于那些停电后造成超低温冰箱升温（一般升温到-40℃时就要小心了）的情况。

拿错了细胞，养了别人家的“孩子”

电视剧里抱错孩子的狗血剧情也同样会发生在实验室中。学校的液氮罐基本上都是公用的，所以如果样本标记不详就会发生拿错的情况。

解决办法：

每支冻存管上都应用冻存专用的记号笔详细标记上细胞名称、冻存时间、样本批号等信息并将这些信息详细记录在册。存放细胞时，最好规定每个人的存放位置，免得下次找细胞的时候非要把整个液氮罐翻个底朝天才找得到。复苏拿取细胞时，也应在对应的存放位置处进行查找，找到对应的细胞后应核查记录册上的信息是否与冻存管上的细胞名称、冻存时间、样本批号一致。

安全第一，细胞第二

凡是和液氮接触的操作，都应该注意安全。小编的同事 Z 就在一次打开液氮罐盖子的时候被气体冲击了眼睛，导致眼睛当场流血，不过后来经过医治已经没有什么大碍了。还有小编的同事 L 在前单位工作时有一次在样本保存室里突然晕倒了（估计是液氮罐漏气所致）。

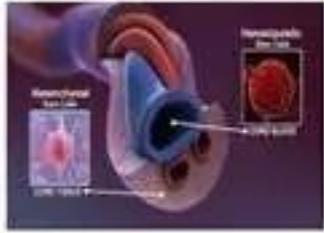
解决办法：

操作人员在接触液氮罐时应戴防护面罩、防护手套，穿防护衣，防止冻存管或气体爆裂对人体造成伤害。在存放液氮罐的房间中也应装有检测气体浓度的报警装置，防止人员晕厥的现象发生。大家在做实验的时候一定要小心操作、注意安全。

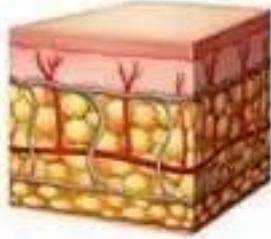
如何让冻存的组织满血复活

很多时候我们都会遇到组织复苏培养的成功率低、长势慢的情况，这到底是哪里出错了呢？

脐带



脂肪



胎盘



组织冻存怎么解?



解决办法:

- (1) 组织要剪得足够小;
- (2) 程序降温盒不要立马放入 -80°C 冰箱中, 应先置于 4°C 冰箱内 15min~30min;
- (3) 冻存液的体积应至少是组织体积的 2~3 倍;
- (4) 组织复苏后进行培养时, 应在培养基中加入 5%~10%的血清。

复苏后, 细胞不见起色就扔掉? !

复苏 2~3 天后，认为细胞没有明显增殖就扔掉细胞，但其实有些细胞需要复苏一周后才会发生明显的变化。



解决办法：

如果复苏培养 3 天后细胞仍不见增殖，先不要着急换液。试着补加血清、细胞因子，等一周后再看细胞增殖情况再定。

心急冻不了好细胞

冻存时，不要将细胞放入刚刚从-80℃冰箱中取出的程序降温盒内（此时盒内的异丙醇还是冻住的）。这样会导致细胞在一开始的时候就进入低温状态，影响细胞复苏后的存活率。

解决办法：

将程序降温盒提前拿至室温中，使细胞可以从室温降至-80℃。

常规的程序降温盒中是填充了异丙醇的，所以能够以每分钟一度的速度进行降温。但是异丙醇属于有毒溶剂，又容易挥发，长期使用不但会对环境造成污染也对实验人员的安全有不利影响。推荐一款新的细胞程序降温盒，不需要填充异丙醇就可以正常工作，而且很容易打开盖子，方便拿取。



新型程序降温盒

其他注意细节：

- 1、刚刚复苏的细胞就像刚刚出生的小 BABY 一样脆弱。一切接触细胞的动作都要尽可能地轻柔。
- 2、低速离心，离心力不超过 300g。
- 3、除了极少数细胞对 DMSO 过敏外，大部分的细胞都不需要去除 DMSO。细胞复苏后可直接接种，第二天进行换液即可。
- 4、配置好的冻存液在 4℃冰箱内可以暂存 1 周，在-20℃冰箱内可以保存一个月。不过最好还是现配现用、不要反复冻融。
- 5、 DMSO 存在一定的毒性，配置冻存液时一定要戴好手套。
- 6、 复苏时使用的培养基最好与冻存前使用的培养基一致。
- 7、 取冻存盒的时候一定要谨防冻伤，不要把你的小鲜肉“粘”到冻存盒上面。
- 8、 复苏第二天看一下细胞，如果细胞状态不行可以补加一下血清、因子。

附:

表 1 生物样本及样本提取物常用保存方式比较

保存方式	用途	原理	优点	缺点
深低温冻存				
-196°C/-150°C	用于组织及组织提取物的长期保存	深低温使酶失活，细胞内生化反应停止	全面保护核酸及蛋白等各种生物大分子，效果稳定	操作及运输有风险，需特定空间，耗费液氮或能源
-80°C	用于组织及组织提取物的长期保存	深低温降低酶活性	全面保护核酸及蛋白等各种生物大分子，效果稳定	RNA需联合特异性稳定剂使用；耗费能源，存在电力崩溃等风险
常温保存				
石蜡包埋	广泛应用于组织学、免疫组织化学等领域，分子领域尚处于展望阶段	将组织脱水干燥，核酸及蛋白相关酶失活	技术成熟，经济方便，空间利用率高	传统固定液影响大分子质量；新型固定液未能投入广泛使用
FTA cards	用于DNA、质粒等的长期常温保存	所含特殊基质可使蛋白降解、核酸酶失活，并使核酸处于脱水干燥状态	使用方便，效果稳定，空间利用率高，可满足DNA相关的多种实验	破坏细胞结构；可保存的样本量较小
DNA/RNA shells	用于DNA/RNA的长期常温保存	专用容器，使核酸处于隔绝水、光、微生物等有害因素的环境	安全稳定，空间利用率高，不影响下游实验	样本处理需专业仪器，初期成本高
DNA/RNA stable	用于DNA/RNA的长期常温保存	在核酸表面形成保护屏障，隔绝水、光、微生物等有害因素	空间利用率高，核酸回复率高，不影响下游实验	样本处理需专业仪器，初期成本高
Allprotect	用于组织的短期常温保存，适用于组织采集阶段或转移过程	保护剂渗透入组织，对内部核酸及蛋白形成化学保护	使用方便，对组织短期常温保护效果好	常温环境保存组织时间太短，其RNA1周后即发生降解
RNA later	用于组织的短期常温保存，适用于组织采集阶段或转移过程	保护剂渗透入组织，对内部核酸及蛋白形成化学保护	使用方便，保护组织中RNA的同时不会影响其中的DNA和蛋白	对组织的保护有时间限制

图片来源于 eBiobank

表 2.生物标本的特定生物标志物稳定性与贮存温度/持续时间的关系

(稳定性符号为：M，多个结果；N，不稳定；S，稳定。)

生物样本	持续时间	贮存温度	跟踪分析物	稳定性
骨髓细胞	40~42月	-85℃, -140℃, -190℃	细胞数和粒细胞-单核细胞集落形成细胞 (CFU-C)	M
骨髓细胞, 外周血单个核细胞 (PBMCs)	48小时, 26~78月	-90℃	细胞复苏, 集落形成单位-粒细胞巨噬细胞 (CFU-GM), 自体细胞克隆潜力, 造血祖细胞	M
红细胞	37年	-10℃~-75℃	冻融洗涤复苏, 溶血, ATP, 2, 3-二磷酸甘油酸 (2, 3-DPG) 与 P50 (即血红蛋白氧饱和度50%时相应的氧分压) 水平, 和正常红细胞钾水平的60%。	S
造血祖细胞	1~31月	-80℃	细胞复苏, 活力, 集落形成单位-粒细胞巨噬细胞 (CFU-GM)	M
造血干细胞 (HSCs)	5~14年	-196℃	活力, 集落形成。	S
造血干细胞 (HSCs)	12~24月	-40℃, -80℃, 130℃	活力, 集落形成。	M
造血干细胞 (HSCs)	11~19年	-180℃	活力, 集落形成。	S
肝细胞球体 (海藻酸钠微囊包裹)	1~12月	-80℃, -196℃	肝特异性蛋白的酶联免疫吸附测定	N
外周血造血祖细胞 (PBPCS)	10-12个月	-140℃	有核细胞计数、多向克隆形成法, 长期培养起始细胞 (LTC-IC) 和红系爆增式形成试验	S
外周血造血祖细胞 (PBPCS)	1-2年	-80℃, -196℃	膜完整性, 克隆形成	M
外周血造血祖细胞 (PBPCS)	7周	-80℃	CD34 ⁺ 粒细胞巨噬细胞集落形成单位 (CFU-GM)、红系爆增式集落形成单位 (BFU-E)	M
外周血造血祖细胞 (PBPCS)	30天	-150℃, -80℃, -30℃	膜完整性, 细胞凋亡, 坏死	M
外周血造血祖细胞 (PBPCS)	5年	-80℃, -135℃	总有核细胞, 细胞活力 (吖啶橙和碘化丙啶), CD34+细胞含量、粒细胞-巨噬细胞集落形成单位含量	M
外周血造血祖细胞 (PBPCS)	1-61个月	-80℃	粒细胞-巨噬细胞集落形成单位 (CFU-GM), 红系爆增式集落形成单位 (BFU-E)	M
血小板	9天	-80℃	Septin 2	M
精子	7天, 3个月	-70℃, -196℃	动力, 形态学	M

生物样本	持续时间	贮存温度	跟踪分析物	稳定性
乳腺癌	100天	-20℃, -196℃	特异性雌激素受体	S
心脏瓣膜	3个月, 1, 2年	-80℃, -135℃	氘标记的甘氨酸	M
前列腺组织提取液、血浆	45天	-20℃, -90℃	肌酸激酶	M
生殖道	2-8周	-196℃	雌激素和孕激素受体	S
皮肤	1-12个月	-196℃	染色体	S
乳腺、结肠、肝、肺、卵巢, 子宫内膜, 子宫颈	5天	-70℃	DNA、RNA	M
肿瘤组织, 肿瘤细胞	1年	-80℃	8胞周期	M

图片来源于 eBiobank

实验室撩妹技能，一份完整的细胞急救秘籍就够了

作者：向日葵

一日小葵路过细胞培养室，突然听到一个声音传来“谁要能救我的细胞，我就嫁给谁。”哇塞，这年头，不要房，不要车，只要会培养细胞就能娶到媳妇？！

为解救师妹的细胞，就得对症下药才行。一般细胞出现问题的原因可以从 5 个方面来着手。只要抓住这 5 点，救细胞就是小 case。



1. 样本自身的原因

种子好不好很重要

如果你拿到的细胞已经是很多代之后的了，培养的时候就会力不从心，可以重新复苏更原始的细胞进行培养。

如果你拿到的是冻存的细胞，那就有可能在冻存时该细胞的增殖能力就很弱了，可以通过查看以往的操作记录来判断。



还有一点就是个体差异，毕竟就算凤姐化再浓的妆，也不能和高圆圆长得一样。

可以在培养前通过已知的标准对样本进行筛选，从而减少个体差异带来的影响。

2.外来物种入侵

常在河边走，哪有不湿鞋

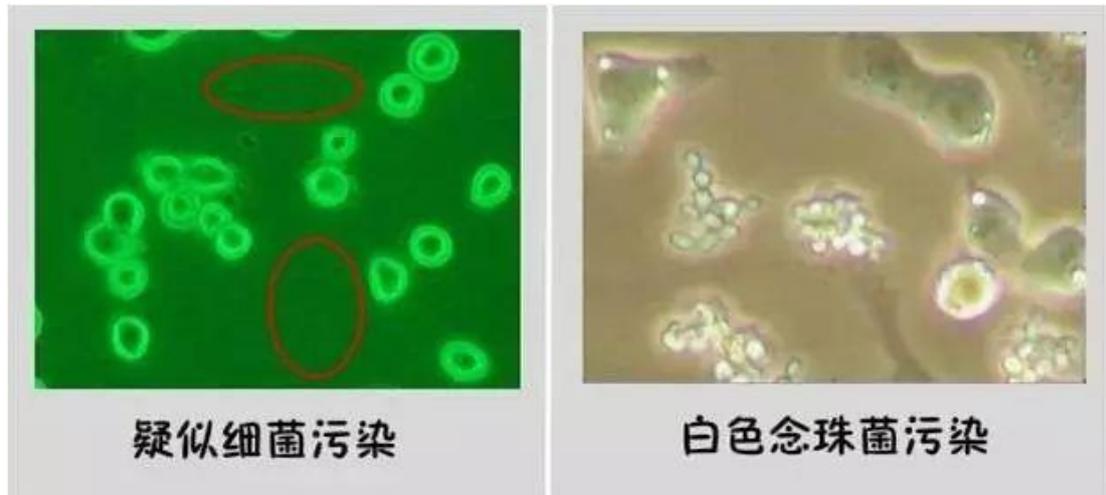
如果相同样本来源的其他批次的细胞并没有出现问题，你就要思考一下你是不是“中奖了”。

请及时对可疑细胞以及细胞使用的试剂进行隔离。



细菌污染

污染后培养液变黄并且浑浊（浑浊是关键，变黄也可能是你的细胞太密了。切勿见到黄的就以为污染。）高倍镜下观察到有小黑点会动，一般发现的时候已经是中晚期。如果细胞是上临床的还是扔了吧，别擅自处理。实验用的，可换液后补加双抗；双抗的浓度不要过大，个人用过青霉素：100IU/ml，链霉素：100ug/ml，隔 1-2 天换液，细胞后来好好的。



发生在细胞增殖能力旺盛期时的污染一般都能救过来,不过也有可能影响试验数据; 如果污染发生在细胞状态本身就不好的情况下就很难救活了。

真菌污染

早期很难发现, 在镜下会有丝状物, 污染严重时可以用肉眼看到明显的绒团状。

真菌污染是中头奖了, 你可以自拍一下留做纪念。这个时候你不仅要担心这份细胞, 还要担心实验室在内的所有细胞的安危。



不建议用抗生素处理继续养。建议把所有接触到的试剂清除掉，培养箱、超净台、整个实验室都需要进行全面的消毒清洁。

支原体污染

一般劣质的血清里会带有支原体，感染后，细胞病变不明显，只是慢慢死亡。用肉眼不易发现，镜下观察背景较脏，用 PCR 检测最为可靠。如果细胞珍贵的话，可以用市场上的支原体清除剂去除一下。

“黑胶虫”、原虫

“黑胶虫”的存在与血清质量有关，无法过滤去除。当细胞增殖旺盛时影响不大，可换液后更换试剂，无其他特殊处理方式。

交叉污染

共用试剂、耗材，同时操作不同的样本，都极易造成交叉污染。交叉污染之王应该属于 HeLa 细胞了，世界上已有很多细胞都受其污染，致使许多实验宣告无效。



病毒

培养过程中，如果没有除去潜在的病毒，就会产生病毒污染。目前，从原代猴肾细胞的培养中已发现不少于 20 种血清性病毒。

潜在病毒是细胞大量生产疫苗、干扰素等生物制品制作中的难题。

3. 设备

工欲善其事必先利其器

别以为买了大公司的仪器就可以高枕无忧。有时培养箱上的显示器明明显示 CO₂ 浓度为 5.0%，其实际情况却可能已经 <5% 了。

观察细胞的培养液颜色，如果培养液偏紫红，那可能是培养箱中 CO₂ 浓度不达标导致 Ph 偏碱，最好及时更换培养环境，重新调试培养箱。

定期对设备进行调试很重要，特别是对停机后再启动的仪器。

4. 试剂

巧妇难为无米之炊

如果使用同批次试剂的细胞大部分都出问题了，就需要考虑是否试剂出现了问题。检查试剂的规格、效价是否与之前一致，如有改变则需修改加入的量；检查试剂的品牌是否与之前一致，如有更换应验证该品牌是否能适用于这类细胞。检查试剂的有效期是否过期、存放位置是否有问题、是否反复冻融等，以免试剂已因此而失效。



根据不同人的需求选择不同的菜
产地不同的蔬菜口感不同
新鲜程度很重要
加点味精更美味，不过尽量不加



根据不同的细胞选择不同的试剂
品牌不同的试剂效价不同
低温保存，开瓶后尽快用
加点FBS效果更好，不过尽量不加

建议选定试剂后不要轻易更换试剂的品牌、规格以及供应商。对新进的试剂进行小规模测试，测试结果达标后再大规模使用。

5、操作

虽不想承认是自己的问题，但有时不得不面对



组织贴壁是否成功?

组织接种于皿后, 应放于培养箱“干烤”一段时间, 当组织紧贴于皿时, 再加入培养基。不要频繁动皿, 不益太早换液。

如果组织贴壁未做好, 可以试着把飘着的组织重新接种到新皿中, 重新贴壁。原代的时候还是建议加点 FBS, 临床上也没有严格规定不准加 FBS, 只要在后期检测残留量就行。

酶消化是否成功?

消化前，组织尽量剪得小点；消化液体积 \geq 组织体积；消化时仔细观察组织的状态，一般消化快结束时组织会变得很松散，形态变模糊；消化时加点蛋白会有效地保护细胞。

使用消化酶的时候注意该组织是否需要 2 种及以上的消化酶同时作用？以及该消化酶是否需要其他离子来刺激？

如果酶消化后得到的细胞很少，建议在小的培养瓶中先养，待细胞增殖后再挪到大瓶中。前期也可以加点 FBS。

传代时的消化？

如果你突然发现自己的细胞比以往难消化时就要小心了，这时应分段消化。把那些能正常消化下来的细胞单独培养；对那些难消化的细胞再消化一次，单独培养，并检测一下这些细胞的表型及相关特征，看是否已经发生分化或老化。

冻存环节？

当我们一次性保存 20 个冻存管的细胞时，如果不注意操作就会使每个管子内的细胞量差异特别大。尽量使用 5mL 移液管而非 10mL 移液管来重悬细胞，在滴加细胞悬液时尽量快点，保持细胞在每个冻存管内均匀分散。

通过在冻存管或冻存袋下放置冰块，冻存液预冷等操作使整个冻存环节保持在低温下完成。

复苏环节？

复苏后的细胞不要着急处理（换液），给予更多的时间让细胞适应。

如果你的细胞在复苏时不顺利（复苏时间过长，运输途中温度没有控制好），不要离心，直接加培养液（体积 ≥ 5 倍的冻存细胞悬液体积）进行培养，离心会使原本脆弱的细胞膜破裂，待后期换液去除 DMSO 即可。

细胞急救秘籍今天就讲到这里。你可以先把这篇文章保存下来，当你遇到问题的时候再来看也许会更有感觉。其实很多时候，我们是不清楚到底是哪方面出现问题的，这个时候就需要一步步去排除可能原因，切勿盲目地一次性改变多个条件。

细胞培养是一个不断进步的过程，要想成为达人，看几篇文章哪够？在平时做好积累，量变才会有质变。



不说了，小编要去把妹了
记得点完赞再走

让肿瘤君滚蛋，从分离树突状细胞开始

作者：叶军

电影《滚蛋吧！肿瘤君》里，熊顿的主治医生梁医生霸道却不失风度与温柔地对熊顿说：“我

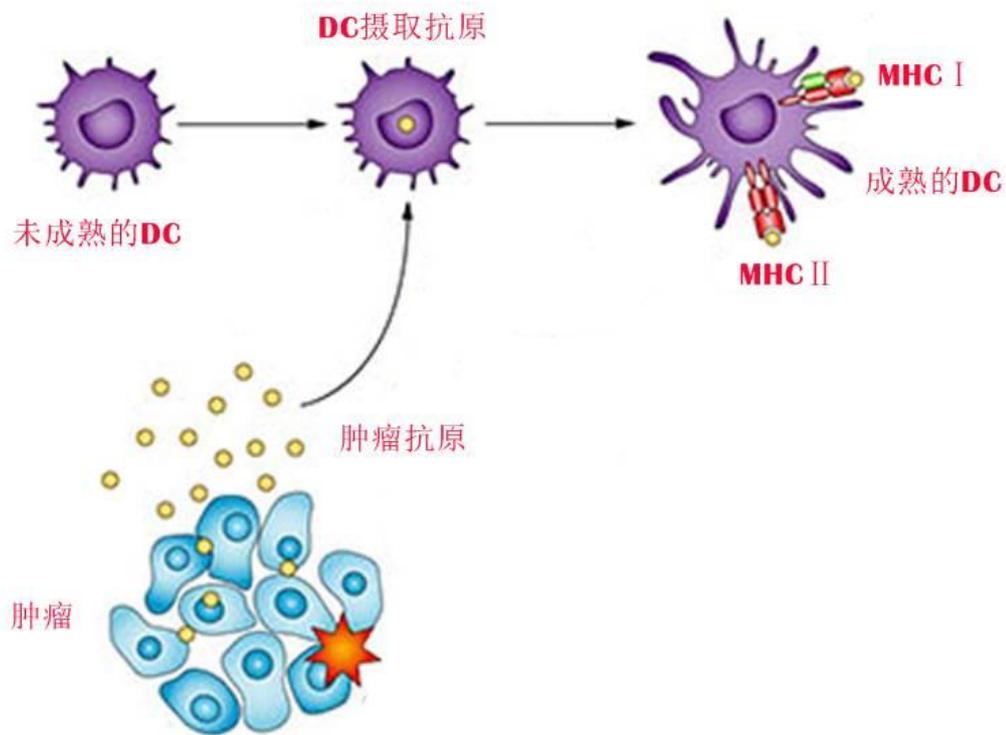
负责治病，你负责相信我！”。

然而，事实证明，仅仅依靠传统治疗肿瘤的三驾马车——“手术”、“化疗”和“放疗”以及梁医生这碗霸气外漏的心灵鸡汤，并没有什么用。



近年来，随着对肿瘤免疫微环境研究的兴起和深入研究，通过激发和增强机体的免疫功能，增强肿瘤微环境抗肿瘤免疫力，从而实现控制和杀伤肿瘤细胞的抗肿瘤疗法——肿瘤免疫治疗，成为肿瘤治疗研究领域的后起之秀，已逐步发展为继手术、放疗和化疗之后的第四大治疗方法，在临床治疗肿瘤过程中显示出了巨大的潜力。

要是梁医生能手握“肿瘤免疫疗法”（不是魏则西事件里的“假肿瘤免疫疗法”哦）这把利剑，那么熊顿身体里面目狰狞的肿瘤君是不是分分钟无所遁形呢？



为了帮助梁医生拯救万千少女，让小编先来分析分析肿瘤免疫疗法里的一个关键角色——树突状细胞（Dendritic cell, DC）。

DC是目前已知体内最重要的抗原递呈细胞。在肿瘤环境中，DC通过摄取、加工处理和呈递肿瘤抗原来激活T细胞免疫响应，达到清除肿瘤细胞的目的。

通俗来说，DC就像是北京赫赫有名的“朝阳群众”，一旦发现有不法分子（肿瘤君），立即怀揣着情报向警察（T细胞）举报，然后警察（T细胞）开着警车拘捕不法分子（肿瘤君）。

但是只有成熟的DC（训练有素的“朝阳群众”）才具有激活T细胞免疫响应的能力。接下来，

小编带你走向训练 DC 的第一步——如何从小鼠骨髓内提取分离并培养 DC。

- 1.**脱颈椎处死 C57BL/6 小鼠（5~6 周龄），75%酒精中浸泡 10 min；
- 2.**无菌状态下取股骨和胫骨，75%酒精浸泡 2 min 后用 RPMI-1640 培养基冲洗 3 次；
- 3.**分别于骨两端剪去约 2 mm，暴露骨髓腔，用 1 mL 注射器（26G 针头）吸取 RPMI-1640 培养液，从骨干的一端刺入骨髓腔，将骨髓冲洗到 50 mL 无菌离心管中，每根骨头反复 4~6 遍。离心，1500 rpm×10 min。
- 4.**弃去上清，加入 5 mL 红细胞裂解液，轻轻吹打均匀后于室温下静置 2 min 溶解红细胞，加入 25 mL PBS，4℃离心，1500 rpm×5 min，弃上清。用 RPMI-1640 培养液洗涤 2 次。
- 5.**用 RPMI-1640 培养液洗涤后将细胞用 RPMI-1640 完全培养基悬浮，用 10 mL 移液管吸取离心管内的细胞悬液，过 200 目细胞筛于 50 mL 离心管中，细胞计数后离心。

用含 rmGM-CSF（20 ng/mL）和 IL-4（10 ng/mL）的 RPMI-1640 完全培养基混悬后分至 6 孔培养板中（ 5×10^5 个细胞），并在每孔中加入至 2 mL。

6.将细胞培养板放入 37℃，含 5% CO₂ 的孵箱中培养。此时为 **day 0**。

7.培养 48 h 后，每孔补充 3 mL 含 rmGM-CSF (20 ng/mL) 和 IL-4 (10 ng/mL) 的 RPMI-1640 完全培养基，继续培养。此时为 **day 2**。

8.培养 48 h 后，吸取孔内 2 mL 培养基于 50 mL 离心管内，离心 500 g×7 min，去上清后用含 rmGM-CSF (20 ng/mL) 和 IL-4 (10 ng/mL) 的 RPMI-1640 完全培养基 2 mL 混悬后加入到孔内，继续培养。此时为 **day 4**。

9.培养 72 h 后，用吸管轻轻吹打后收集所有悬浮细胞，即为富集的小鼠骨髓来源的树突状细胞。此时为 **day 7**。

至于后面的技能，还需要各位科研工作者的万般努力。

万千少女靠梁医生，梁医生靠各位科研小白了。

涨姿势！3D 多细胞肿瘤球的培养，手把手教给你

作者：叶军

3D 多细胞肿瘤球是在体外应用组织培养方法使肿瘤细胞以多细胞集聚体的形式生长成为具有三维结构的球体。

与传统的 2D 贴壁细胞培养模型相比，3D 多细胞肿瘤球可以通过模拟三维细胞网络、细胞与基质、细胞与细胞之间的相互作用，从而更加贴近肿瘤组织中相应的病理生理特征。

因此，3D 多细胞肿瘤球培养模型已经逐渐应用于干细胞培养和分化、癌症研究、药物和毒性筛选及组织工程等特定应用中。

虽然 3D 多细胞肿瘤球模型具有更显著的实体肿瘤生理相关性，但是与 2D 贴壁细胞培养模型相比，获得大量相对统一的 3D 多细胞肿瘤球模型需要一系列的培养过程和表征手段。

本文利用 Liquid Overlay 的制备方法，以乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 为模型制备 3D 多细胞肿瘤球并采用倒置显微镜、激光共聚焦显微镜和环境扫描电镜对其进行详细表征。

实验前准备工作

1. 提前 24 h 取 12 mL DMEM 和 RPMI 1640 完全培养基（含 10%FBS，下同）于 50 mL 离心管内，置于 4°C 冰箱中预冷；

2. 将分装好的 Matrigel 基质胶提前 24 h 从 -20°C 放入 4°C，使其融化成液体状态；

3. 将无菌的 1 mL 移液器枪头放入无菌 50 mL 离心管内，置-20℃冰箱预冷。

琼脂糖包被 96 孔板

1. 准确量取 6 mL RPMI 1640 培养基（或 DMEM 培养基）于 2 个 10 mL 的注射玻璃瓶内，加入 90 mg 琼脂糖，盖塞后放入 80℃的水浴锅内加热溶解 30 min；

2. 加热结束后，将注射瓶放入灭菌锅内，115℃灭菌 30 min；

3. 灭菌完成后，迅速取出注射瓶放入超净台内。将注射瓶内的琼脂糖溶液倒入无菌的加样槽中，用多通道移液器以每孔 60 μL 的量加入 96 孔板内。

注意：由于琼脂糖溶液在室温时会凝固，因此从灭菌锅内取出琼脂糖溶液后一定要快速转移至超净台内并迅速加入至 96 孔板中。

此外，为保证加样时琼脂糖不冷却，需要同时灭菌加样槽和 100 μL 的移液器枪头。

4. 加入完成后，96 孔板要保持水平约 30 min 使孔内的琼脂糖凝固。

配置含 Matrigel 基质胶细胞悬液

1. 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞（或 MCF-7 细胞），胰蛋白酶消化后进行细胞计数，用 RPMI 1640 完全培养基（或 DMEM 完全培养基）将细胞悬液浓度调整至 2.0×10^5 cells/mL，备用。

2. 将盛满碎冰的烧杯喷完酒精后放入超净台内，将 RPMI 1640 完全培养基以及解冻的 Matrigel 基质胶从冰箱内取出置于冰上。

注意：由于 Matrigel 基质胶在室温下溶液凝固，因此在操作过程中一定要保持低温。

3. 将预冷的移液器枪头取出放置于超净台内。根据计算量（2.5%，v/v）用移液器将 300 μ L Matrigel 基质胶加入到 12 mL RPMI 1640 完全培养基内，迅速混匀。

注意：由于 Matrigel 基质胶在室温下溶液凝固，因此使用的移液器枪头也需要预冷。

4. 加入步骤 1 中的细胞悬液（约 600 μ L），使细胞浓度为 10000 cells/mL，迅速混匀，备用；

将细胞悬液铺入琼脂糖包被的 96 孔板

1. 将上述步骤 4 中配置好的含有 Matrigel 基质胶的细胞悬液放入加样槽内，用多通道移液器吸取 200 μL 加入到包被琼脂糖的 96 孔板内。

2. 采用低温离心机进行离心，离心条件为 4 $^{\circ}\text{C}$ ，1000 $\times g$ ，10 min。

注意：离心 96 孔板时为保持无菌，将 96 孔板的周围用封口膜封住。

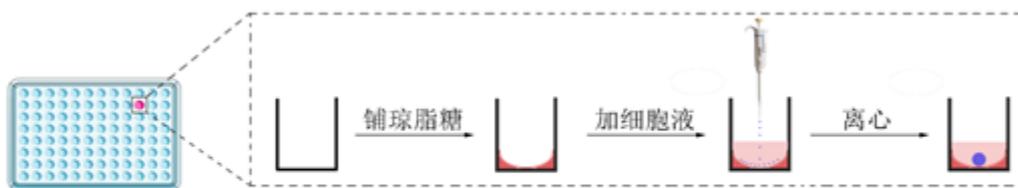


图 1

3. 离心完成后，取出 96 孔板，摘下封口膜，喷洒酒精后放入培养箱内培养。整个培养流程如图 1 所示。

4. 在培养的第 3、5 和 7 天，更换孔内的 100 μL 培养基并采用倒置显微镜观察肿瘤球的形态。

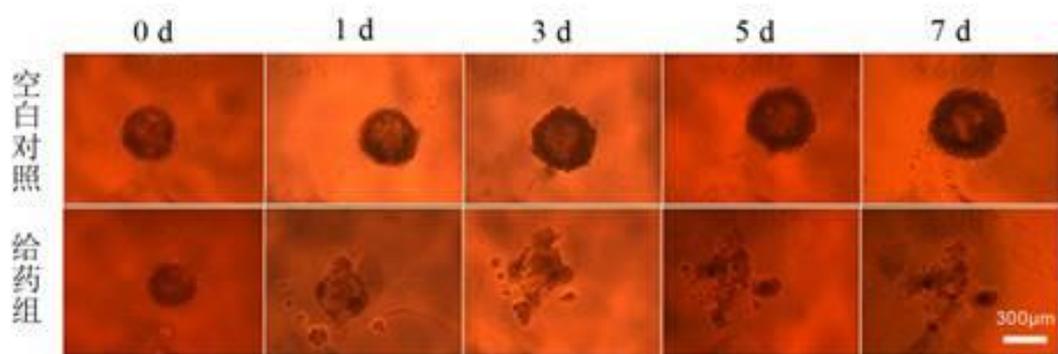
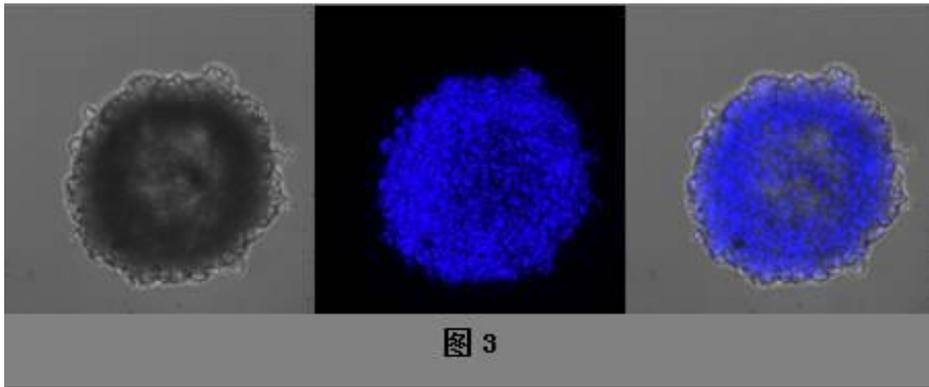


图 2

5.若要采用 3D 多细胞肿瘤球进行药物试验，在培养 7 天后，用移液器取出孔内的 100 μL 培养基，加入 100 μL 给药溶液，然后置于培养箱内培养并定期采用倒置显微镜观察肿瘤球的生长状况（图 2）。

3D 多细胞肿瘤球的表征

1. 倒置显微镜观察 3D 多细胞肿瘤球形态：直接将 96 孔板置于倒置显微镜下观察即可。
2. 激光共聚焦显微镜观察：用移液器小心取出孔内的肿瘤球，用 PBS 清洗 3 遍后，采用 4% 多聚甲醛固定，并用 Hoechst 33258 对细胞核进行染色，PBS 清洗 3 遍后在激光共聚焦显微镜下观察（图 3）。



3.环境扫描电镜观察：用移液器小心取出孔内的肿瘤球，用 PBS 清洗 3 遍后，固定干燥后进行环境扫描电镜观察（图 4）。

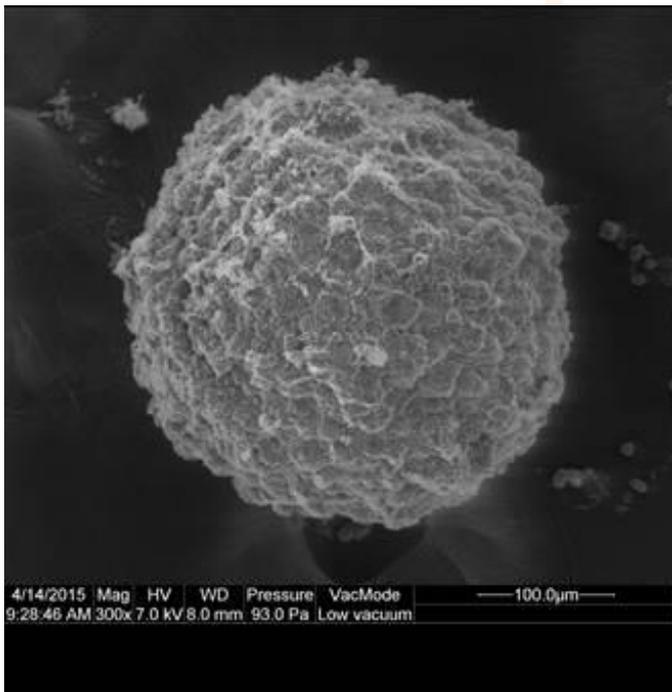


图 4

干货 | 细胞养得好，习性掌握牢

作者：刀王

刀王执念于养细胞，一些经验压箱底了也没有用，还是拿出来跟大家分享吧～细胞养得好不好，就看你懂不懂细胞的各种习性了。

不同的细胞喜欢的环境是不一样的

这个不仅仅是说培养基的不同，还有就是细胞生长的空间密度问题。有一些细胞是数量多一点比较好生长，生长状态也比较好。这种一般是属于生长速度慢的细胞。譬如内皮细胞。而有一些是细胞是数量少一点细胞状态会生长的比较好，譬如巨噬细胞和某些肿瘤细胞。尤其是巨噬细胞，生长速度非常得快，贴壁速度很快，所以传代时就应该留很少量的细胞，这样细胞状态会比较好。并且巨噬细胞比较喜欢扎堆生长，而堆与堆之间是有空间的。如果长成相连在一起的一满片的时候，细胞形态基本上就会差了，老化的会比较多，对后期实验结果是不好的。所以在养细胞的时候应该摸索该细胞喜欢的生长空间密度问题。



培养的细胞形态怎么养都不好

这个其实是有一个方法可以改善的。对于贴壁细胞，如果细胞形态不好，（或者细胞形态不清晰，表面似有异物等）可以在传代的时候进行如下操作：

首先，倒掉旧的培养基，加入 3ml 新的培养基（有无血清的都可）洗涤一次，用滴管吸走，然后再加入 3ml 的培养基，进行预吹打，控制吹打力度，轻轻地大概沿着瓶底过一遍，然后吸走。这时候再开始正式的消化、吹打。（巨噬细胞建议只吹打，不消化）

其次，把吹打下来的细胞悬液加入到新的培养瓶内，培养瓶事先加入培养基，放入培养箱内培养，按时间点观察细胞贴壁情况。10 分钟观察一次，20 分钟，30 分钟观察一次。选择一个时间点，已经有部分细胞贴壁的情况下，重新置于洁净台，底面朝上迅速倒出其中的培养基，加入 3ml 新培养基再轻轻洗一次。然后加入完全培养基培养。后续观察细胞生长情况以及形态。通常称之为“二传”。



如果一次效果还不理想，可重复多次。直到找到细胞完美形态。其中要注意，结合细胞喜欢的生长情况。喜欢多一点数量长得好的细胞你就等贴壁细胞比较多点的时候再传。反之亦然。

关于培养瓶内加入培养基量的问题

这个是要靠自己去摸索的。并不是小的玻璃方瓶 5ml，大方瓶 10ml 的。有些细胞反而是培养基少一点相反细胞形态会长得比较好。（可能也是竞争很大，有优胜劣汰吧）。对于生长速度快的细胞，易生长的细胞加少一点培养基细胞形态会更好。但是要注意换液的掌握。



关于选择培养瓶的问题

个人发现生长速度快的细胞在玻璃瓶内生长的状态会比一次性塑料瓶相对好一些。而对于同一种细胞，在其生长旺盛快速的时期在玻璃瓶内的生长状态也比塑料瓶内好。这可能是因为塑料瓶比玻璃瓶更容易贴壁。生长速度快的细胞在塑料瓶这种相对“更安逸”的环境里反而长得状态不如玻璃瓶好。



所以对于生长速度慢的细胞如果想要更漂亮的细胞状态，塑料瓶比玻璃瓶会好，对于生长速度快的细胞，玻璃瓶则会更好。同样，对于同一种细胞，在其生长速度慢的时候，塑料瓶会好一点，比如刚刚复苏的时候，或者原代培养的时候。而在其生长旺盛的时候，玻璃瓶则相对会好一点。

传代时消化的问题

可以这样说，对于需要消化传代的细胞，每一次的消化都是对这个细胞存活与否，状态好与不好最至关重要的考验。

很多同学都遇到过这个问题，自己养的细胞开始的几代长的还挺好的，可是穿过几代之后就发现自己的细胞不行了，状态越来越差劲了。对于这个问题，可以非常肯定地说，你的消化

环节出问题了。你**每一次的消化都让细胞受到较大损伤了**。所以，越长越差。



在消化的过程中，你加入胰酶后，所有细胞都在被胰酶消化着，但是我们忽视了一个问题就是，细胞的生长状态是不一样的，每一个细胞的贴壁情况也是不一样的，有的贴壁牢固，有的贴壁没有那么牢固的，所以，让所有的细胞消化同样的时间对细胞是不公平的，他们受到了差别待遇当然会有脾气啊。。呵呵。大家争取争取做到因材施教，比如试试下面的“**四步消化法**”。（以**难消化细胞**为例）

具体操作

1). 首先不加胰酶，倒掉旧培养基加入少量新培养基洗 1-2 遍（目的是将漂浮着的死细胞之类尽量洗掉）。

2). 然后再加入少量新培养基直接吹打一遍, 这一遍是把贴壁不牢固的细胞吹打下来。再用培养基洗一遍, 两次所得悬液混合传入新瓶。(你可以将这些传入新瓶培养, 以与后面胰酶消化过的细胞对比观察看谁长的更好一点就知道该细胞对胰酶的敏感度了。)

3). 吸干净瓶内剩余液体, 加入 0.3ml 左右的胰酶润洗一遍, 吸掉弃之, 再加入 1ml 左右的胰酶消化。消化的同时置于显微镜下观察, 待细胞与细胞之间间隙明显的时候立即吸掉胰酶与干净子弹头里备用, 加入新培养基开始吹打, 吹打 2-3 遍后吸取悬液于试管或新瓶暂存。用 2ml 左右新培养基洗一遍与前面的混合。(也可以传入新瓶培养, 以与后面及前面的做对比。)

4). 然后把前面刚吸出来的胰酶重新加进去瓶里继续消化剩余的贴壁牢固的细胞。当然你也可以用新的胰酶, 如果你们那比较富裕的话, 呵呵。继续镜下观察, 待剩余细胞间隙明显, 细胞独立开来的时候, 吸掉胰酶, 加入新培养基吹打。悬液传入新瓶培养(根据实际情况把握)。

关于换液传代时候洗瓶的问题

这个没有经过大规模验证。对于用 DMEM 培养基培养的细胞, 你在洗的时候如果是用无血清 1640 去洗细胞在随即后的几次中会比用 DMEM 洗的长的要好。同样, 用 1640 培养的也有这个现象。

如果不嫌麻烦的话, 可以用 PBS 来洗, 洗的效果和用无血清培养基洗的效果基本上是一样的, 对于有些细胞会更胜一筹。洗的目的主要是洗去培养瓶里残留的血清, 防止它对胰酶的影响。这样能够保证胰酶的消化能力优先, 是很关键的一点。

分享 | 如何构建单克隆细胞群?

作者：元元

由单个细胞繁衍所形成的的细胞群就叫单克隆细胞群。如今慢病毒转染构建稳定表达细胞系，以及 *crispr/cas9* 的普及，很多实验工作人员都在寻找构建单克隆细胞群的方法。

特别是做肿瘤相关研究的，单克隆细胞群的构建显得尤为重要。做这个实验要做好时间大概一个月甚至需要更久。不过，如果构建成功单克隆细胞群成功的话，相信文章的档次也将升一个台阶。

首先收集适应性的培养基，这一步是实验的关键。很多人做这个实验的时候细胞总活不了的原因就在这。因为新鲜的完全的培养基里不含细胞生长所需的细胞因子，所以如果直接做单克隆实验经常会发现细胞还没分裂就死了。

步骤：

1.培养同源细胞（未克隆前的同一细胞株）至半汇合状态，更换一次培养液，再培养 24h，吸出所有培养液，以 3000r/min 离心，再经滤器过滤（目的去除细胞及其残渣），注意防止污染。其次配制细胞培养所需要的应用液。

2.取一份适应性培养基加 2 份培养液

最后就是通过无限稀释的方法，分离出细胞。

3.取一瓶处于对数生长期的细胞或者转染的细胞系，按常规消化、离心、计数，

4.稀释：将细胞稀释成每 100ul 约含 50 个细胞，打匀，

5.接种：用 20uL 移液枪吸取细胞悬液先点几个孔，每孔约 2uL，其液滴如芝麻大小，然后在倒置显微镜下观察，如每孔 1~2 个细胞，说明细胞浓度合适，则可一次点完 96 孔板。若不然，则可使液滴增大或缩小，或者再加细胞，或者再加培养液稀释。

6.记录：在倒置显微镜下观察 96 孔板，将只有单个细胞的序号记录下来，然后仅给单个细胞孔加培养液 200uL（应用液），置 CO₂ 培养箱或者空气培养箱培养。

（事实上文献是这么做的，但是在倒置显微镜中，细胞没贴壁的情况下观察细胞个数非常困难，即使看到了一个细胞的，也有可能不是单个细胞。所以建议 4-8h 细胞贴壁后再行显微镜下观察，肿瘤细胞是单个细胞的做一下标记）

7.连续观察几天，会发现有一些孔的单个细胞并没有成活，这一部分孔就可以剔除掉。几天之后细胞分裂完注意只要有一个单克隆的细胞群的孔留下，其余的都不要。

刚开始细胞长得比较慢，不用着急，也不用换液，等细胞长得比较好，一个细胞克隆群长到接近 20 个细胞的时候，这时候就可以将细胞消化下来，换到 24 孔板里样。（一般情况下，96 个孔，细胞数量控制得好，一个 96 孔板能够构建 10 个左右的单克隆细胞群）。

8.接下来就正常培养，24 孔板移到 12 孔板，再移到 6 孔板，从 24 孔板移到 12 孔板就不需要应用液了，用新鲜的培养基就行了。

整个实验过程，如果是 2 天就能传一次代的细胞，一般一个月左右就能构建成功单克隆细胞群。

6.2 细胞形态检测

实验 | 细胞污染后，你该做的那些事儿

作者：燕子

师弟：师姐，快来帮我看一下，我的细胞好像污染了，都长毛了，怎么办？

师姐：多久没换液了？培养箱里还有其他细胞污染吗？还有显微镜下这么黑呼呼的，是好
像吗？

师弟：~~~师姐~~~

师姐：赶紧把这 96 孔板拿出去扔了，爬片了这么多天，就可以上激光共聚焦拍了，这节骨
眼上!!

师弟：师姐，那你是怎么做的？我的操作到底哪里出问题了？

师姐：我不过是“死操作”，再加上一点小聪明罢了。

细胞培养中最常见污染的是细菌、真菌和支原体污染。判断细胞是否污染的一种简单方法是，
如果是细菌污染，培养基应该很快变浑浊（红的培养基变黄变浑浊）；如果是真菌感染，初期
感染可以在低倍镜下可以看到黑点，特别是成团的黑点，如果无法确定，就换高倍镜，如果
是死细胞，在高倍镜下就可以分辨，而真菌在高倍镜下仍然是小黑点。如果是支原体污染时，
外观没有明显的变化，但会使细胞生长速率减慢难以察觉。细胞一旦污染，大多数较难处理
（只有扔）。

看来师弟的细胞被污染了是板上钉钉了的，那到底哪里出了问题？下次改怎么避免。

污染一： 培养箱太久没清洁



细胞污染了，不要直接扔了培养皿就不管了；首先你还得看看这个恒温培养箱里其他培养皿或孔板里的细胞是否污染，如果有而且好几个板子都有类似的污染块，那很可能是培养箱中的水或者空气污染了，得给培养箱做个大扫除，重新酒精消毒，照紫外；孵箱里的水，不仅没了得加还得记得十天半个月的就用酒精擦擦托盘。

污染二：超净台和桌面，东西太多太乱



超净台不是储物箱，什么培养皿、各种规格的板子、枪头就不要堆在超净台！这样就会有許多紫外线顾不到的卫生死角。细胞房其他的桌面，同样切忌东西堆积如山，不要将酒精棉球、标签纸、牛皮纸买来后全部堆在细胞房！一不小心“飘”进你的细胞培养板里，细胞就会死给你看！

污染三：细胞房人多口杂，难管理



试验室人多好啊，大家可以一起愉快的玩耍，而在细胞房这种卫生要求高，人多了，不确定因素多了，难以保证试验在无菌条件下操作。出入试验室，实验服当风衣穿，不扣纽扣，不戴鞋套，犹入无人之境，来去自由；超净台做实验时，喜欢说话聊着做试验，殊不知你喷口气，里面就有很多细菌呢！

污染四：避免违规操作

1. 为节省时间，有人已经用超净台四个多小时，不开紫外灭菌 30min,酒精擦拭后直接开始试验。

2. 器材或者溶液很久没有，未检测是否污染直接使用；离心管多次使用，枪头为图方便交叉使用。
3. 超净台不点酒精灯；点了酒精灯放在右上角，而你在左下角做试验（和没点也没差!）
4. 不带手套，徒手操作。虽然你用洗手液洗了好几次，还直接往手上喷 75%乙醇，也真是胆大，长久以往手上的皮肤肯定会被烧伤。



避免污染，规范操作

细胞培养间配备枪式移液器、手术器械、离心机、冰箱等专用仪器设备以及专用的实验服和

拖鞋，并定期消毒。专用物品只在培养间内使用，不得带出细胞房。无菌操作工作区域应保持清洁及宽敞。必要物品可暂时放置，其他实验用品用完即应移出，以利于气流的通畅。培养细胞过程中使用的所有实验用具，如移液管、一次性枪头、一次性塑料离心管、冻存管等需 121°C 高压灭菌 20 分钟后 37% 烤干备用，一些玻璃器皿如细胞培养瓶等须先泡酸、洗净、晾干后再高压灭菌。

技术 | 越经典越流行：细胞划痕实验技巧

作者：毛博

今天毛博给大家介绍一个经典而简单的实验。谈到这个实验，毛博就想起了一首老歌“你伤害了我，却一笑而过”。因为这确实是一个通过伤害细胞的方法来检测细胞运动的方式，这就是细胞划痕实验。越是经典越是永不过时，越是简单越有力量！这个实验成本非常低，却可以用来检测贴壁生长肿瘤细胞的侵袭转移能力，虽然是小米加步枪，但胜过洋枪洋炮，值得一试！



材料仅仅需要 6 孔板，marker 笔，直尺，20 微升枪头（灭菌），PBS，和无血清培养基。怎么样？简单吧？

准备工作：所有能灭菌的器械都要灭菌，直尺和 marker 笔在操作前紫外照射 30min（超净台内）

流程也非常简单：

- 1、先用 marker 笔在 6 孔板背后，用直尺比着，均匀地划横线，大约每隔 0.5 到 1cm 一道，横穿过孔。每孔至少穿过 5 条线。

2、在孔中加入约 5×10^5 个细胞，具体数量因细胞不同而不同，掌握为过夜能铺满。

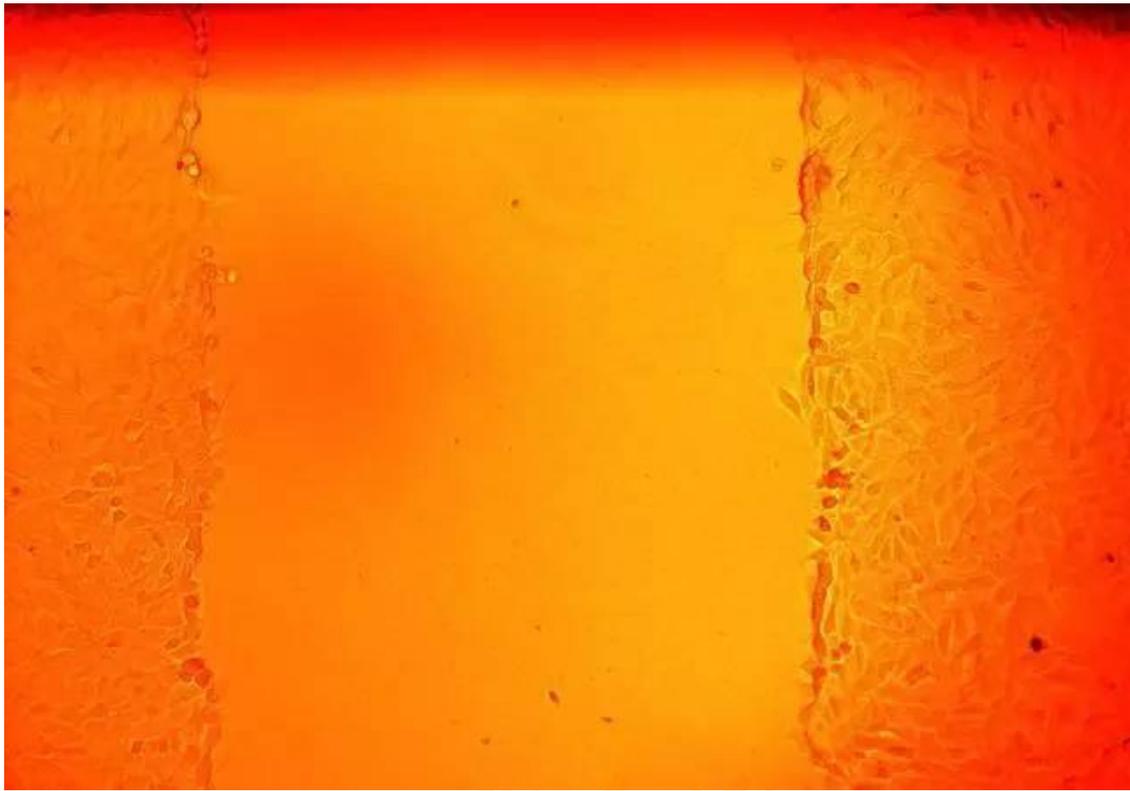
3、第二天用枪头比着直尺，尽量垂直于背后的横线划痕，枪头要垂直，不要倾斜。

4、用 PBS 洗细胞 3 次，去除划下的细胞，加入无血清培养基。

5、放入 37°C 5% CO_2 培养箱培养。按 0、6、12、24 小时取样，拍照。

下面是一系列经典的被伤害了的细胞照片：

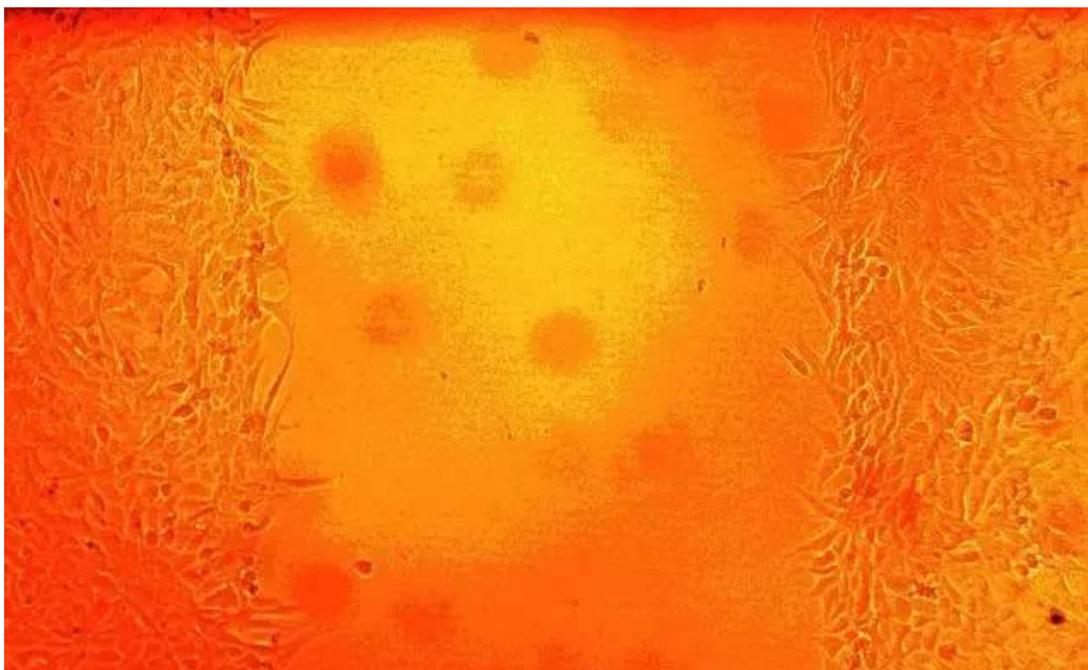
0h



6h

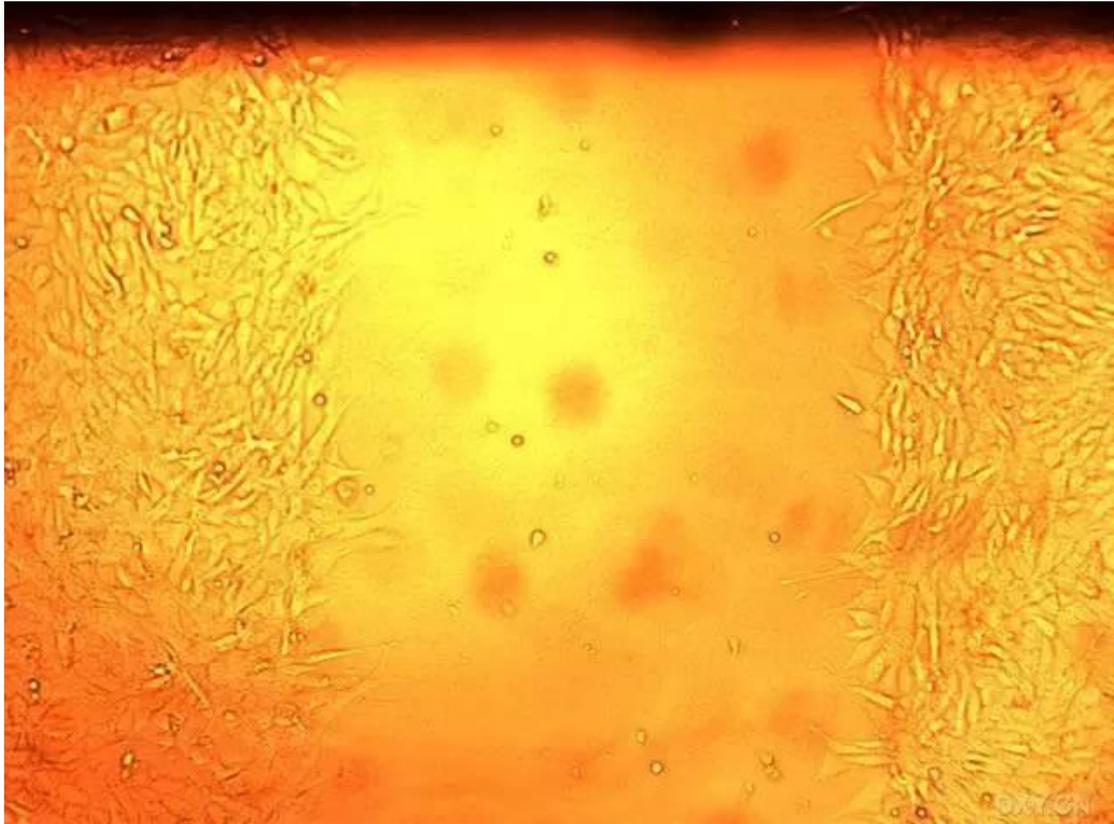


12h



24h

科研资源



大家看到没有，细胞被伤害之后，慢慢地长起来。这个时候，长起来慢是正常的，因为是要覆盖划痕后空出来的部分。我们也正是通过这种方法来检测细胞运动的方式。如果是肿瘤细胞的话，可以用这个实验来检测贴壁生长肿瘤细胞的侵袭转移能力。

细胞划痕实验看上去简单，其实还是有些小细节需要注意的：

在上述实验步骤第 3 划痕之前，是不用倒培养基的。划痕后再倒掉培养基加 PBS 清洗后，加

无血清培养基。细胞长到融合成单层状态时，在融合的单层细胞上人为制造一个空白区域，称为“划痕”。划痕边缘的细胞会逐渐进入空白区域使“划痕”愈合。因此是整个培养皿都加培养基的，观察部位是划痕而已。

有童鞋可能要问：为什么要使用无血清培养基？答案是：成分明确，避免血清的成分不稳定。不象血清里面这么多乱七八糟的动作。

那么，细胞划痕实验加的无血清培养基里含有生长因子吗？答案是加。因为主要检验的是细胞的转移能力，所以还是需要这些东西滴。

有些童鞋在做第 4 步的时候，用 PBS 冲洗的时候。一下子就把细胞冲散啦。这个很可能是由于细胞本身贴壁不牢，还没等消化，就被 PBS 冲散啦。贴壁细胞贴壁不牢证明状态非常不好，可能是污染导致，建议不要用于下一步实验。重新复苏吧。这里也有个小窍门，用 1ml 枪沿 6 孔板壁成 45 度打进 PBS，避免简单粗暴。

实验 | 快速识别与处理常见细胞污染的技巧

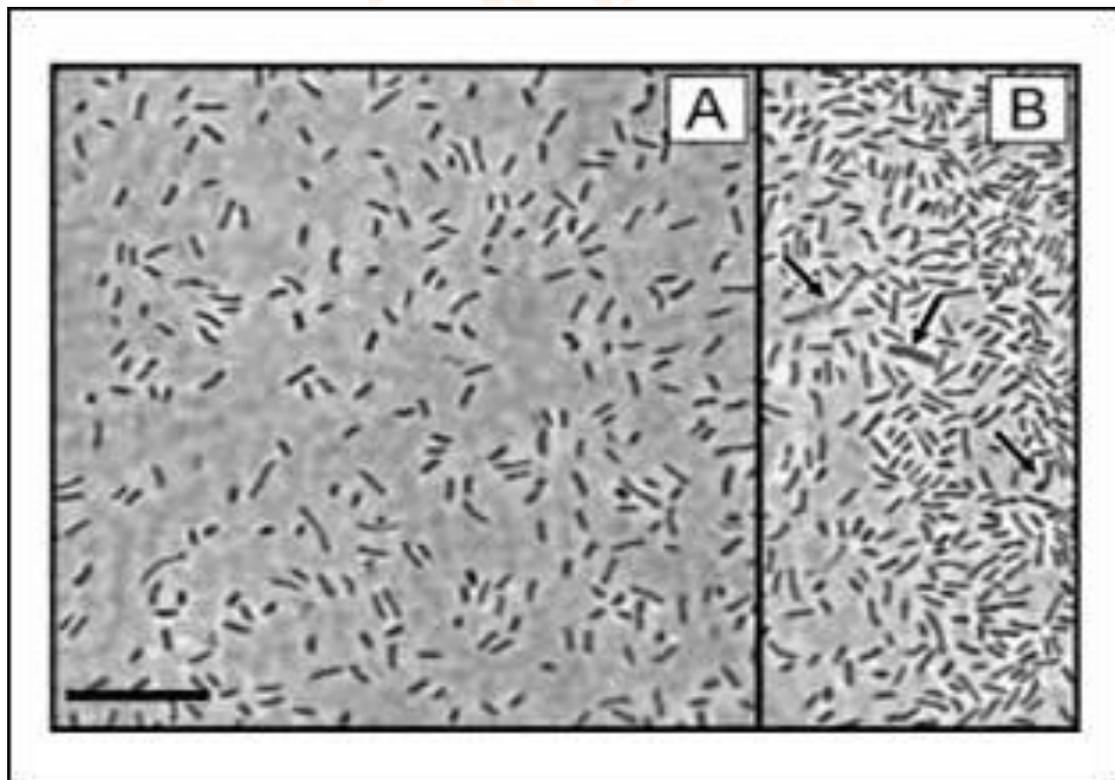
作者：毛博

细胞培养质量的好坏，直接关系到实验进行得顺利与否。无数童鞋都经历过因为细胞污染而影响实验进度的问题，被老板批评是小事，要是影响到按时毕业可就粗大事了。

下面，毛博讨论一下细胞培养常见污染的认识及处理。

1、细菌：

识别：细菌在显微镜下为黑色细沙状，根据感染细菌的不同，可有不同的外形，有球形，链形，杆形等。大家不必深究。只要发现培养液浑浊变黄，培养瓶顶部有一层细沙一样的东西。就知道大事不好啦。见下图。

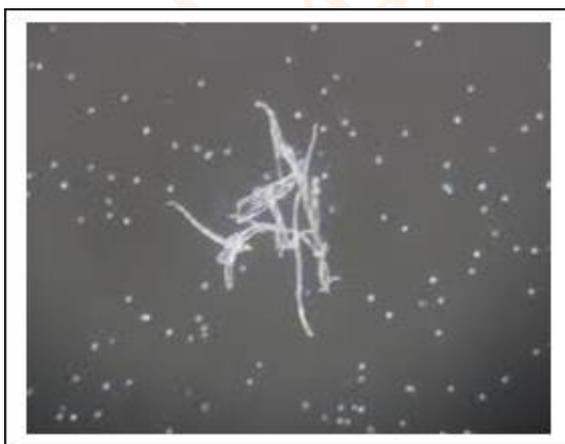


处理：可在培养液中加相应的抗生素处理。可以用四环素，庆大霉素，或者链霉素，前两者的工作浓度是 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；链霉素的工作浓度是 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。其实，毛毛虫说句实话，一旦发生污染，就已经大势已去了。如果细胞不是特别特别珍贵的话，还是趁早扔了，重起炉灶吧。

所以，最重要的还是防范于未然。做好培养间，CO₂ 孵箱，器皿和培养液的消毒灭菌工作。在操作的时候，严格执行无菌操作规范。

2、霉菌：

识别：因为培养液是清亮的，所以霉菌污染非常难以早期发现，等发现时往往已经为时过晚了。培养液中慢慢地出现絮状杂质，镜下可见呈细丝状的团状漂浮物，如同风中柳絮。细胞仍可生长，但时间一长，细胞的状态就变差。见下图。

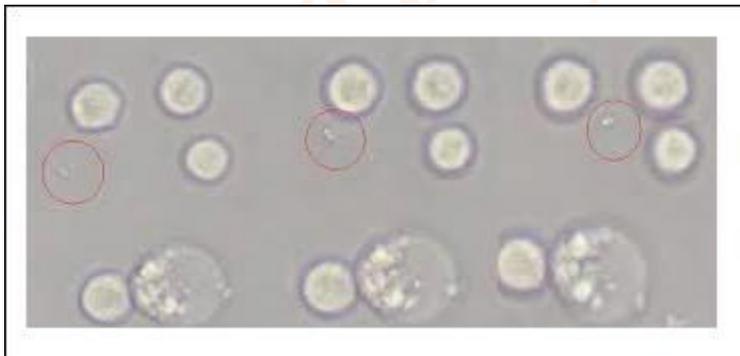


处理：细胞一旦被霉菌污染，很难挽救，两性霉素 B 或制霉菌素都于事无补，建议果断舍弃该污染细胞，将环境彻底消毒。

采用酒精彻底地擦洗一遍 CO₂ 孵箱。然后再用新洁尔灭擦洗一遍。把水盘里加上饱和量的硫酸铜。

3、支原体：

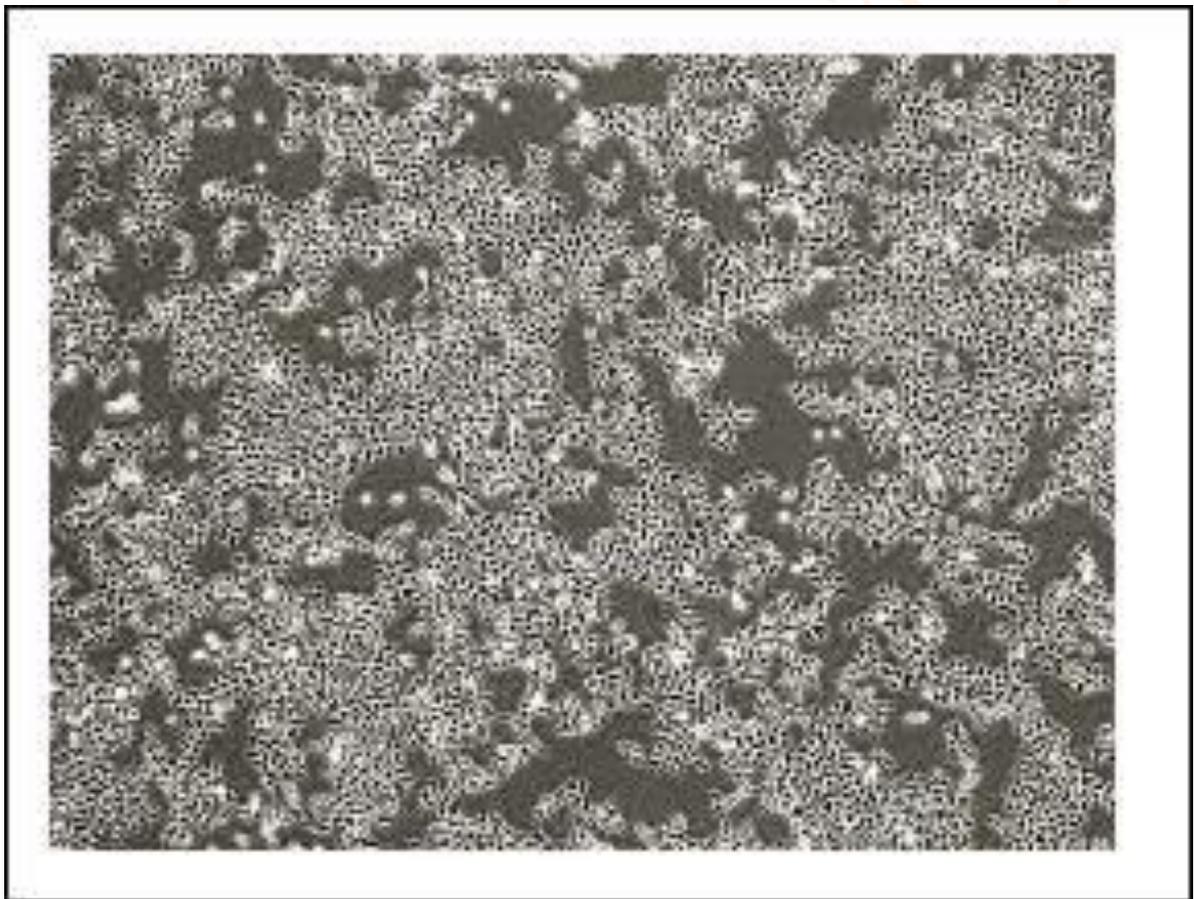
识别：多为多边形，培养液一般会变浑浊。支原体感染细胞以后，细胞病变不很明显，只是和你一起慢慢变老。支原体污染后，可影响所有的细胞生长参数。故进行实验前，必须确认细胞为 mycoplasma-free，实验结果之数据方有意义。



处理：没有什么好处理的。直接扔了吧。污染到其他的细胞就亏大发了。还是那句话，预防为主。

4、黑蚊虫：

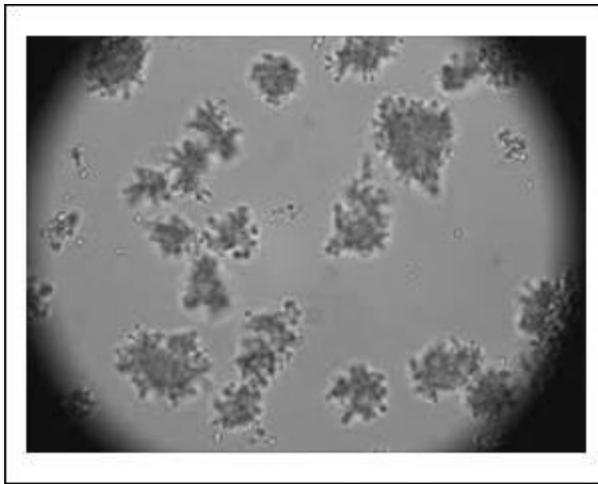
识别：谁都不知道所谓的“黑胶虫”是什么东西。据说是纳米级的细菌。低倍下为黑色点状，高倍下可看见黑色的小虫游来游去。培养液也是不浑的，一般不会太影响。但是如果太多了，也会影响细胞生长和实验结果。



处理：因为根本不知道这是什么物种，所以也谈不上什么处理方式。建议如果细胞有可能是此种污染的话，可以增加细胞的种板密度，以提高细胞的生存率。

5、真菌：

识别：真菌污染和霉菌污染差不多。一般培养液清亮，所以很难早期发现。镜下有时候象丝状，有时候象珊瑚状。慢慢地会长出很细的黑色丝状物。这个时候，已经晚了，细胞很难救活了。



处理：同霉菌污染一样，没有什么好处理的，直接扔了吧。然后彻底消毒灭菌培养间，CO₂ 孵箱，器皿和培养液。亡羊补牢吧。

综上所述，两个原则：预防为主，果断扔掉。如果细胞实在特别特别特别珍贵。那就只好死马当活马医了。用广谱抗生素 5 倍推荐浓度冲击一下。当然细胞状态差的话不一定熬得住。同时增加传代时的细胞的密度，培养基中的血清浓度，勤换液。也可以不加抗生素进行单克

隆有限稀释至 96 孔板，再克隆化。

T 细胞活性检测，六大妙招全 get ✓

作者：子非鱼

众所周知，T 细胞家族这个名门望族的子弟繁多，亚型也是不一而足，如 Th1、Th2、Treg、Th17 等；加之膜结合受体研究技术的局限性，因而想将发现 T 细胞的庐山真面目确实存在一定的困难。

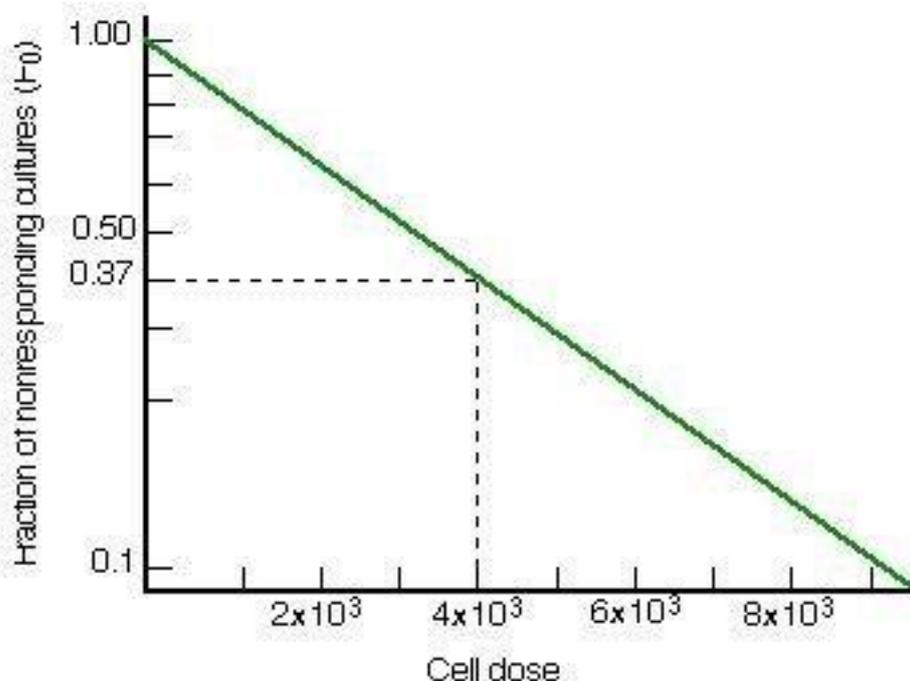
好在研究者们凭着多年与 T 细胞家族打交道的经验，总结出六大妙招，可让弥漫在 T 细胞反应之上的浓雾吹散几分。常言道，万变不离其宗，六大招式虽各有千秋，但总归离不开以下两种类型方式来检测 T 细胞对刺激的反应性。

- 1) 分析 T 细胞特征性反应，如细胞因子分泌等
- 2) 分析 T 细胞表面的特异性受体。

限制稀释培养法

该技术主要是通过 T 细胞的各种稀释液测量对特定抗原产生活化反应的 T 细胞比例，并测量 T 细胞反应呈阴性的微孔数目。

无需太多数学模型，但在短时间内，每个孔中活性 T 细胞的分布应遵循泊松分布（因为这些细胞应该是随机分布的），进而可利用这些信息来计算活性 T 细胞的数量。更多相关数学知识，可查看此网站 <http://www.biology-pages.info/L/LimitingDilution.html>



而从泊松分布中可知如果反应阴性孔的比例为 37%，则每孔平均有一个抗原特异性 T 细胞。

那么在读出产生 37% 阴性孔的细胞数后，就可计算出活化 T 细胞的比例。比如，每孔细胞接种 5000 细胞产生了 37% 的阴性孔，则活化 T 细胞比例为 1/5000。而当小鼠获得免疫后，该比例应该会增加，表明抗原促进了 T 细胞增殖。

ELISPOT

然而，如果你若要进行更详细的研究，如 T 细胞表型等，有限的稀释培养法是相当费力的。此时，ELISPOT（酶联免疫斑点，一种 ELISA 衍生技术）则通过检测细胞因子产生来间接反映出活化 T 细胞的类型。

简言之，在用非反应性血清进行封闭前，先通过单克隆或多克隆抗体涂覆 PVDF（聚偏二氟乙烯）微孔板，并将 T 细胞与刺激物一起培养，以活化 T 细胞来分泌细胞因子。随后细胞因子可被包被于微孔表面的抗体所捕获。

接下来，就需要洗涤平板以除去细胞碎片、未结合的抗体和培养基，再加入与发色（着色）底物（通常是辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）偶联的第二抗体。

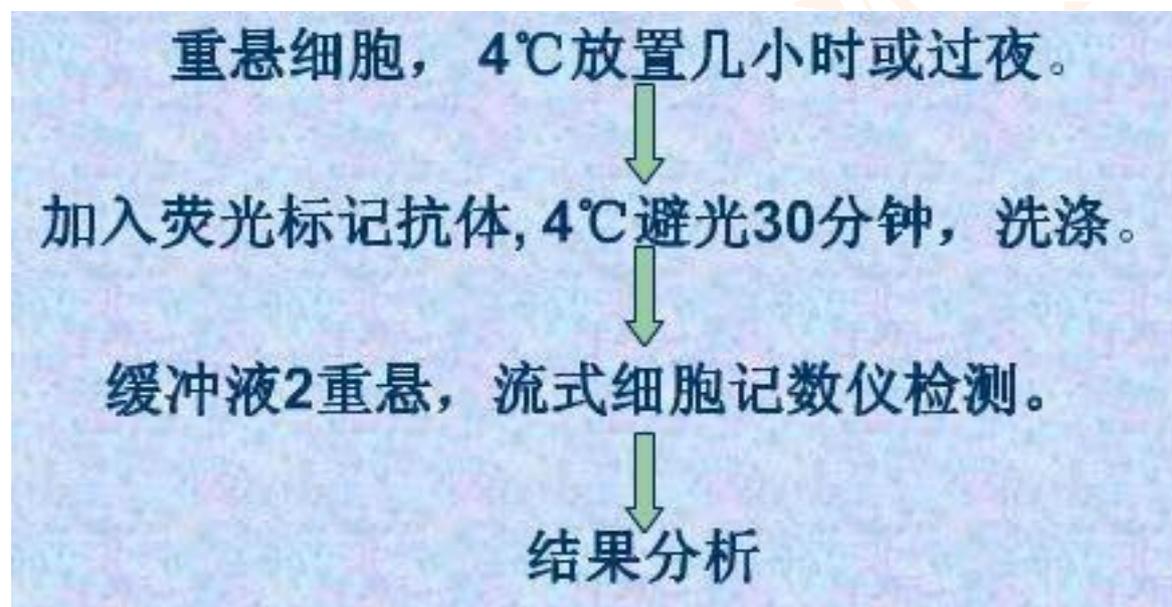
在显色反应的作用下，细胞分泌这种可溶性蛋白的相应位置上显现清晰可辨的斑点，可直接在显微镜下人工计数斑点或通过 ELISPOT 分析系统对斑点进行计数。

其中，1 个斑点代表 1 个活性细胞，从而计算出分泌该蛋白或者细胞因子的细胞的频率。（某些研究不仅要测细胞因子生成量，还需检测分泌此细胞因子的细胞频率）。

尽管 ELISPOT 要比 ELISA 和有限稀释法等更灵敏，能从 20-30 万细胞中检出 1 个分泌该蛋白的细胞。但该方法确实也具有自己的缺点，因为其在描述单细胞的细胞因子分泌谱时仍然受到限制。此时，我们仍可通过细胞内染色法在单细胞水平体现出细胞因子分泌情况。

细胞内染色

在做细胞内染色时，需要先用蛋白质转运抑制剂(如 Monensin 或 Brefeldin)来抑制细胞因子的分泌，可使新产生的细胞因子滞留在细胞内；而后通过破膜剂来使荧光抗体进入细胞并特异性标记细胞内相应抗体，最后以流式细胞术来检测并分析相应细胞因子以及细胞的质和量。但这种方法有一个缺点，就是细胞在被 4%多聚甲醛固定的过程中就已经死亡了。



细胞因子捕获

而另一种替代细胞内染色的方法也能克服了 ELISPOT 的问题，即通过双特异性抗体 (Bispecific antibody, BsAb) 来捕获细胞因子。

双特异性抗体作为抗体界的新贵，可将两种不同抗体的重和轻链对结合，因而拥有者两种特

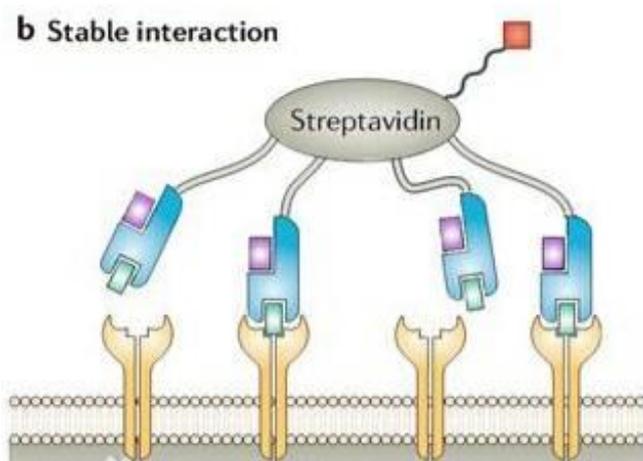
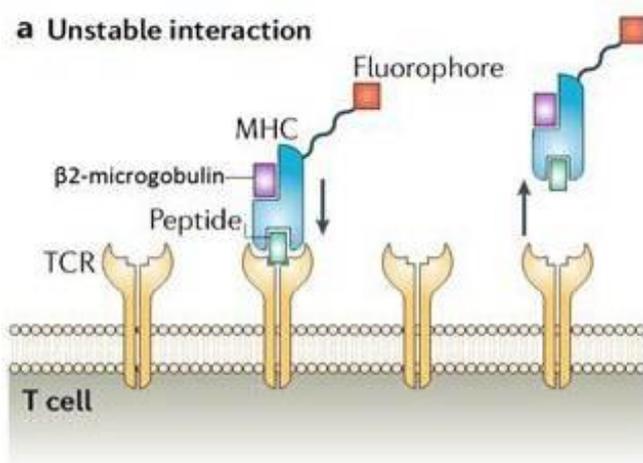
异性抗原结合位点，其中一个靶向 T 细胞的表面标记，如 MHC，而另一个则靶向特定的细胞因子。

所以双特异性抗体可在靶细胞和功能分子之间架起桥梁。在用蛋白质转运抑制剂处理活化的 T 细胞后，再用双特异性抗体结合并激活 T 细胞，如果 T 细胞分泌特定细胞因子，那么与细胞表面结合的混合抗体就能捕获这些细胞因子，而后再用一种带有标记的第二抗体来检测细胞因子即可。

四聚物染色

T 细胞的反应也可以通过其表面受体 TCR 的特异性来测量，比如使用荧光标记的特异性 MHC: 肽四聚物。

由于可溶性 MHC 单体分子与 TCR 的亲和力很低、解离快，而多价分子可与一个特异性 T 细胞上的多个 TCR 结合，使其解离速度大大减慢。为此，可通过生物素-亲和素级联反应放大原理构建 MHC 类四聚体。



即通过基因工程技术将生物素酶底物肽加到 MHC 类分子重链的羧基端而形成融合蛋白，并在体外按一定比例与 β 微球蛋白及特异性抗原短肽共孵育，折叠成正确构象后形成 pMHC。

将生物素标记在底物肽的赖氨酸残基上，使得一个标记荧光素的链亲和素与四个生物素标记的 pMHC 复合物结合形成四聚体。当该四聚体与 T 细胞表面的特异性 TCR 结合后，即可通过流式细胞仪进行定量检测分析。

谱系分析和生物传感器的检测

T 细胞群的多样性可以通过谱型来定义。先通过凝胶电泳可视化 CDR3 区域来比较表达相同 V 段的受体。而后通过 Biosensor 来测量配体与其互补的抗原受体之间的结合和解离率。

其中，待测试的配体是固定在镀金表面上，可溶性 T 细胞受体在与该配体结合一段时间后在洗涤的条件下可发生解离，而结合和解离的过程可用生物传感器进行实时测量。

生物传感器的测量原理在于分子间的相互结合可影响玻璃芯片表面的一个偏振光源的全内反射，进而可通过反射光的角度及强度变化来检测镀金玻璃芯片表面分子的结合能力并分析出结合率和解离率，可形成随时间变化的“传感器图”。

当然，受体也可固定在镀金表面上。当系统处于饱和状态（即结合与解离之间处于一种平衡状态）时，图线将趋于平稳，表示饱和受体将不再与配体相结合。

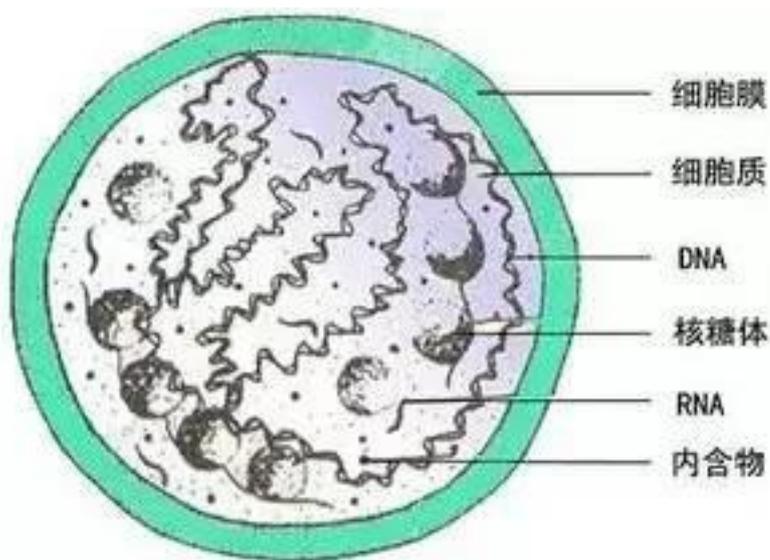
此时通过洗涤可将未结合的分子洗去，在继续洗涤后，已结合的配体均将与受体发生解离，而后相互作用的测量曲线会开始下降，显示解离发生的速率。

参考资料：<http://bitesizebio.com/22831/six-ways-to-measure-t-cell-responses/>

如何火眼金睛的鉴别细胞支原体污染

作者：刀王

刀王听到粉丝谈论的较多的话题是细胞中枪了，怀疑是支原体的污染所致，如果的确受到污染，往往对我们的实验产生非常不好的影响，发现的早则耽误些功夫重新培养细胞，发现的晚可能一段时间内的实验都白做了…刀王今天总结一下如何通过不同的检测方法检测到支原体的踪迹。



支原体模式图 微信号: HelixLife

支原体是非常微小的微生物，其直径只有 $0.2-0.8\mu\text{m}$ ，是细胞培养中令人头疼的大问题。关键是其污染源简直来自四面八方：

培养基

血清

实验操作者

…

会影响：

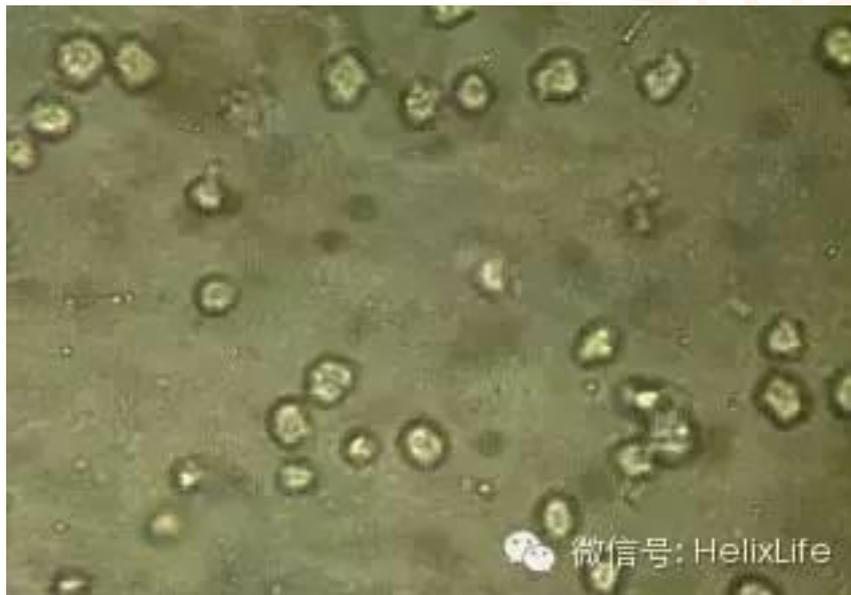
细胞生长率

细胞形态

基因表达

细胞代谢和细胞活力。

支原体感染不易察觉，因此对培养细胞定期进行支原体检测就非常重要。



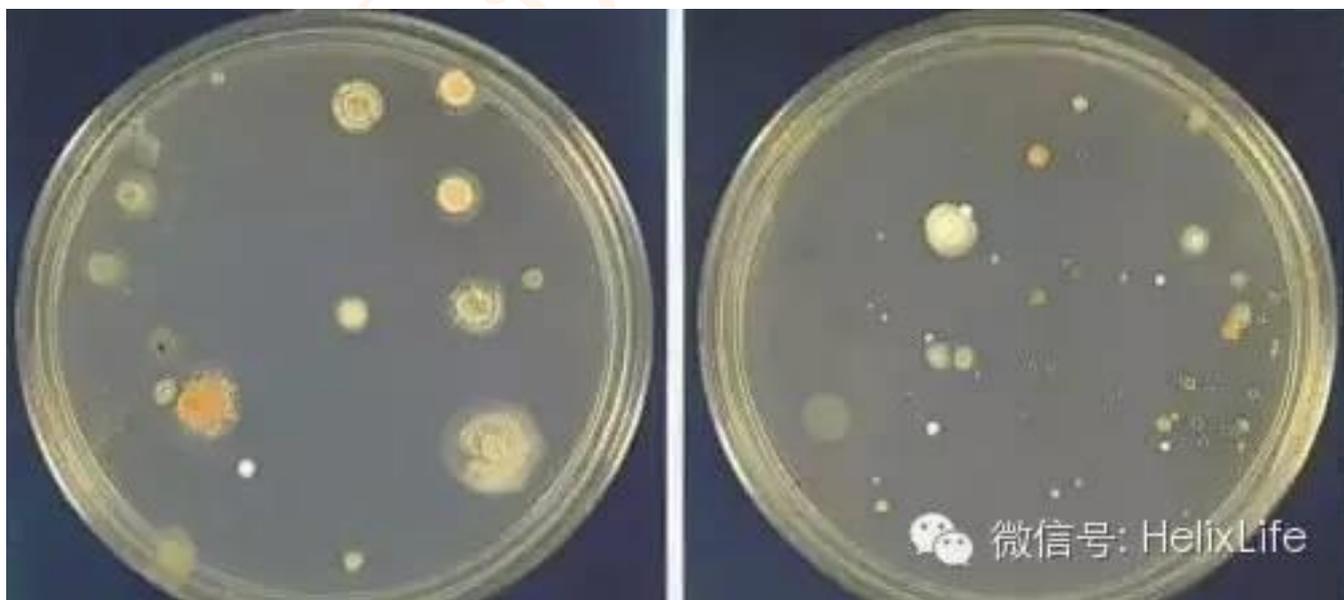
支原体污染示例图

污染实验室培养细胞的支原体主要有八种，但还没有哪种检测方法能够单枪匹马把这八种支原体都检测出来。支原体非常顽强，通常用于细胞培养的绝大多数抗生素都对其无效。例如青霉素主要作用于细菌细胞壁，但支原体没有细胞壁因此就不受影响。

无懈可击的细胞培养技术始终是预防支原体感染的最佳方式，另外及时找出受到支原体感染的培养物也很重要，这样才能在感染扩散前快速采取有效措施。刀王就为你介绍几种在培养细胞中检测支原体的常用方法。

分离培养法

分离培养法是支原体检测的金标方法，其检测精确度最高。这种方法是从可疑的细胞培养体系中取样，并接种到最适宜支原体生长的琼脂平板上。如果样本中含有支原体，它们就会在这种琼脂平板上疯狂生长，最终形成明显可见的特征性菌落。分离培养法基本不会出现假阴性结果，因此被誉为支原体检测金标准。



不过分离培养法也存在**两个弊端**：

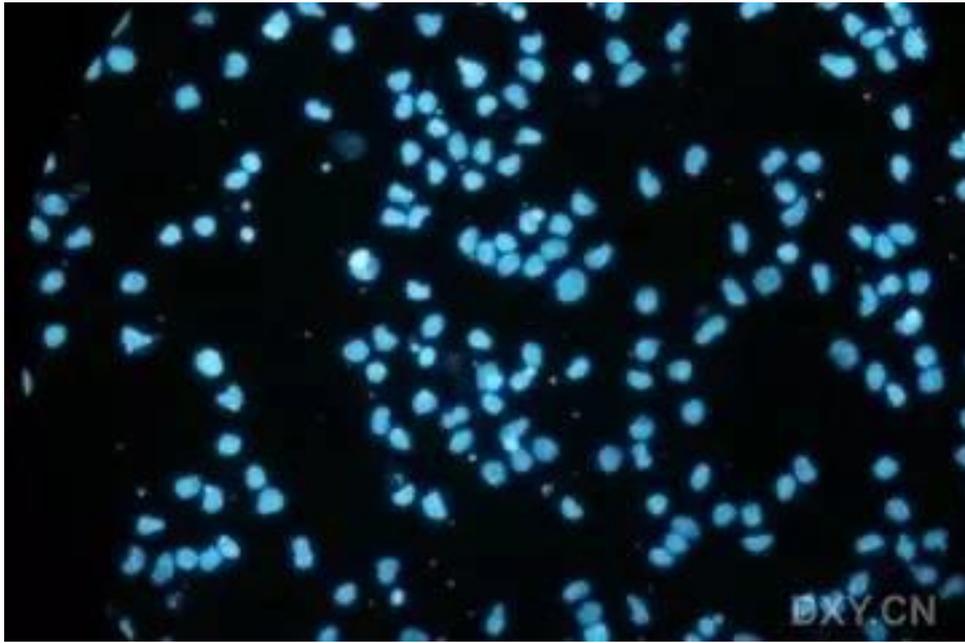
一是检测时间太长，支原体要长出明显克隆至少需要 4 周时间；

二是尽管可以检测绝大多数支原体种类，分离培养法也有力所不及的时候，例如支原体 *M.hyorhinis*。

如果你实在不想等这么久，或者希望在分离培养法的等待过程中先拿到初步结果，你可以试一试 **DNA、PCR 或酶学检测方法**。不过需要注意的是，上述检测方法都不能单独检出所有类型的支原体，而且灵敏度也没有分离培养法高，所以最好结合使用两种方法以获得最可靠的检测结果。

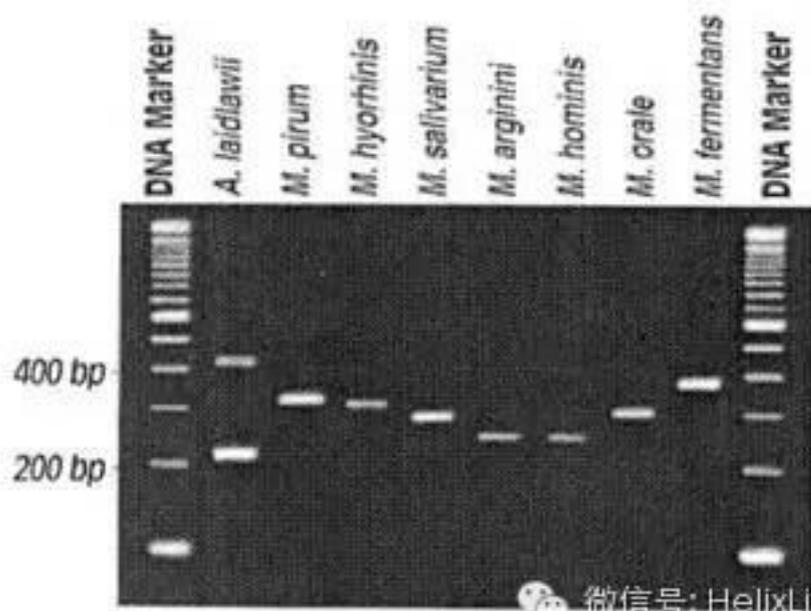
DNA 检测

DNA 检测需要将可疑样品与指示细胞共同培养，因此一般需要几天时间。DNA 检测所用的指示细胞通常是细胞质区域较大的 Vero 细胞，如果原样本中含有支原体，那么当细胞 DNA 被荧光染料（如 Hoechst 染料）染色时，就可以在指示细胞的核周围观察到荧光斑点或荧光颗粒。分离培养法用来检测支原体 *M.hyorhinis* 菌株并不可靠，而 DNA 法可以准确的将其检测出来。



PCR 法

PCR 法也可以检测 *M.hyorhinis* 菌株，PCR 法检测支原体只需几个小时，是最快但也是最不灵敏的支原体检测方法。该方法采用针对支原体 DNA 的引物用 PCR 检测可疑样本，其中 PCR 引物通常针对支原体的 16S rRNA 基因。在凝胶电泳过程中，支原体 DNA 会显示为特异性条带，以此指示支原体的存在。PCR 法可以检测大多数支原体，但谨慎起见最好同时使用另一种检测方法来进行验证。



酶学检测和 ELISA

此外，也还存在一些其他支原体检测方法。例如酶学检测是将可疑样本添加到特定底物中，在这一体系内支原体的酶可以将 ADP 转化为 ATP，随后能利用 ATP 发光的 luciferase 酶就可以指示支原体的存在。ELISA 也能用于支原体检测，以 ELISA 法为基础的支原体检测一般使用针对支原体 16S rRNA 基因的带标记探针或抗体，来检测培养物中是否含有支原体。



定期检测

支原体感染会使培养细胞慢慢枯萎，因此对培养细胞定期进行支原体检测非常重要。一般来说每 1 至 3 个月就应该进行一次支原体检测。将定期支原体检测常规化坚持下去，是细胞培养实验室应对支原体感染的关键。



预防支原体污染的建议：

细胞培养工作中，主要从以下几个方面来预防支原体的污染：

控制环境污染；

严格实验操作；

细胞培养基和器材要保证无菌；

在细胞培养基中加入适量的抗生素。

支原体污染细胞后，特别是重要的细胞株，有必要清除支原体，常用方法有

抗生素处理

抗血清处理

抗生素加抗血清和补体联合处理

支原体最突出的结构特征是没有细胞壁，一般来讲，对作用于细胞壁生物合成的抗生素，如内酰胺类、万古霉素等完全不敏感;对多粘菌素(polymycin)、利福平、磺胺药物普遍耐药。对支原体最有抑制活性及常用于支原体感染治疗的抗生素是四环素类、大环内酯类及一些氟喹诺酮;其他类抗生素如氨基糖苷类、氯霉素对支原体有较小抑制作用，所以常不用来作为支原体感染的化学治疗剂。InvivoGen 公司研究开发的新一代支原体抗生素 M-Plasmocin 能有效地杀灭支原体，不影响细胞本身的代谢，并且用 M-Plasmocin 处理过的培养细胞，不会重新感染支原体。

支原体污染在细胞培养中实际上是比较常见的，据资料，可达 30%甚至更高。支原体污染时细胞表现为长得不好，也不死亡，同时，培养基又是清亮的。时间长达一周也没有什么变化。这时基本上可以判断出是支原体污染了，愿意检测就检测一下，不愿意直接用清除试剂处理吧。

避免细胞污染，可以从预防着手，超净工作台物品放置要合理、进入细胞房要换鞋和穿实验服、实验员戴手套后要用酒精等消毒、避免细胞交叉污染等等。

霾的季节，别让细胞房也进了霾

作者：刀王

看过柴静的视频后，刀王觉得，其实不只是外界环境的污染让人可怕，身为科学工作者，特别是在细胞房工作的人员来讲，同样要对细胞房的洁净度保持足够的敏感度。

今天 doctor W 给大家普及一下**如何控制你的细胞房洁净度**。

细胞房要求的洁净度为**万级**，标准的细胞实验室都会专门开辟 5~8 个平方出来建造细胞房，细胞房只要够放置实验室样品及必需的设备即可，面积无需过大而造成浪费，面积过大对于做细胞房空气净化工程来说不仅仅是提高建造成本而已，日后的运行及维护费用也会高的令人惊讶。



细胞房外源性污染源，主要是**通过门和细胞房内外通道侵入的室外空气**。因此细胞房的布置通常都采用按照工艺操作的关键程度，**洁净度的高低由里往外逐级减弱，抵御室外污染空气的侵入**。同时为物料和人员进出细胞房设置相应的控制措施，例如物料的气闸、人员的无菌更衣系统以及室内废弃物传递出来的通道等。

细胞房内的污染源，主要来自于细胞房内**必要的操作人员和部分工艺设备**，通常细胞房内操作人员的四周区域是洁净度最差的区域，也是无菌技术中重要的控制内容。



细胞房各级别空气悬浮粒子的标准规定如下表:

洁净度 级别	悬浮粒子最大允许数/m ³				近似对应 传统规格
	静态		动态		
	≥0.5μm	≥5μm	≥0.5μm	≥5μm	
A 级	3520 (ISO5)	20	3520 (ISO5)	20	100 级
B 级	3520 (ISO5)	29	352000 (ISO7)	2900	100 级
C 级	352000 (ISO7)	2900	3520000 (ISO8)	29000	10,000 级

D 级	3520000 (ISO8)	29000	不作规定	不作规定	10,0000 级
-----	----------------	-------	------	------	-----------

细胞房应每月检查菌落数。以下步骤给大家参考：

在超净工作台开启的状态下，取内径 90mm 的无菌培养皿若干，无菌操作分别注入融化并冷却至约 45℃的营养琼脂培养基约 15ml，放至凝固后：

倒置于 30~35℃培养箱培养 48 小时；

证明无菌后，取平板 3~5 个，分别放置工作位置的左中右等处，开盖暴露 30 分钟；

倒置于 30~35℃培养箱培养 48 小时，取出检查。

细胞房浮游菌数、沉降菌数洁净区微生物监测的动态标准如下表：

洁净度级别	浮游菌 cfu/m ³	沉降菌 (f90mm) cfu /4 小时(2)	表面微生物	
			接触 (f55mm) cfu /碟	5 指手套 cfu /手套
A 级	<1	<1	<1	<1

B 级	10	5	5	5
C 级	100	50	25	—
D 级	200	100	50	—

一般的细胞房洁净度级别控制在 C 级（刀王刚刚检测了自己所在的细胞房，恩 不错，没有给自己丢脸，C 级妥妥的！），生物安全柜和超净台控制在 A 级，大家根据标准测一测自己的实验室吧，不达标的赶紧偷偷整改妥善！

如果你的实验室是四级生物安全级别，好吧，这里的标准不适用于你，你走吧，埃博拉不归我管……

6.3 细胞计数

技术 | 12345，上山打老虎：细胞计数方法漫谈

作者：毛博

“12345，上山打老虎”这是毛博小时候经常唱的一首童谣，也教会了我怎么数数字。这项技能很重要，多年以后毛博远渡重洋，在米国实验室打工的时候还要经常用到这项技能，那就是细胞计数吧。其实，细胞计数最关键的不是计数，而是计数活细胞。因为在那一大堆细胞里面，肯定有死有活的，只有活的才对我们的实验有意义，是吧？所以，细胞计数最关键的就是首先要鉴别细胞的死活。

细胞计数的实验用品非常非常简单，都是任何一家实验室常备的：**0.4%台盼蓝溶液、95%乙醇溶液、普通显微镜、试管、吸管、细胞计数板、绸布**。这里的台盼蓝就是用来鉴别细胞死活的。台盼蓝又称为活体染料，不能透过活细胞正常完整的细胞膜，故活细胞不会染上任何颜色。而死亡细胞的细胞膜通透性增高，可使染料进入细胞内而使细胞染上蓝色。

细胞计数的具体步骤如下：

1.计数板处理

用 95%乙醇溶液把计数板使劲地擦擦擦后，再用绸布擦干净，再拿一张盖玻片，也用绸布擦干净。最后把盖玻片覆盖在计数板上。

2.制备细胞悬液

将细胞用生理盐水制备成适当浓度的细胞悬液。再向计数板滴一滴。向计数板中滴细胞悬液时要干净利落，量要适当，过多易使盖片漂移，或淹过盖片，过少则容易出现气泡。这样多算失败。重头再来吧。



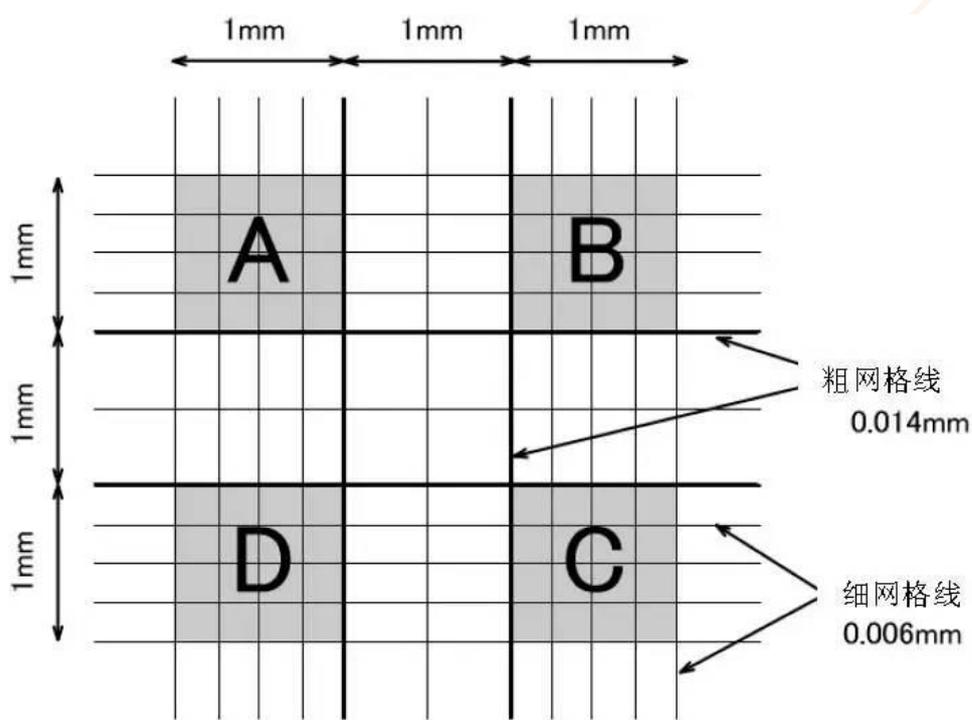
3.染色

按与细胞悬液 1:1 的比例，用滴管吸取 0.4%台盼蓝染液，从计数板边缘缓缓滴入，使之充满计数板和盖片之间的空隙中。不要使台盼蓝染液流到旁边的凹槽中或带有气泡，否则也算失败哈！要重做滴。稍候片刻，将计数板放在低倍镜下（10 倍即可）观察计数。

4.计数方法

计算计数板的四角大方格内的细胞数。如下图所示，只计数 A、B、C、D 这四个大格子里面的细胞哈。计数时，只计数活细胞。镜下观察，凡是亮晶晶的不着色的透明的为活细胞，凡

是染上蓝色者为死细胞。若聚成一团的细胞，则只算一个细胞哈。在一个大方格中，如果有细胞位于线上，按照“计下不计上；计左不计右”的原则，即“计下线细胞不计上线细胞，计左线细胞不计右线细胞”。如果不放心的话，可以重复计数 2-3 次，算一个平均值即可。



5.计数的换算

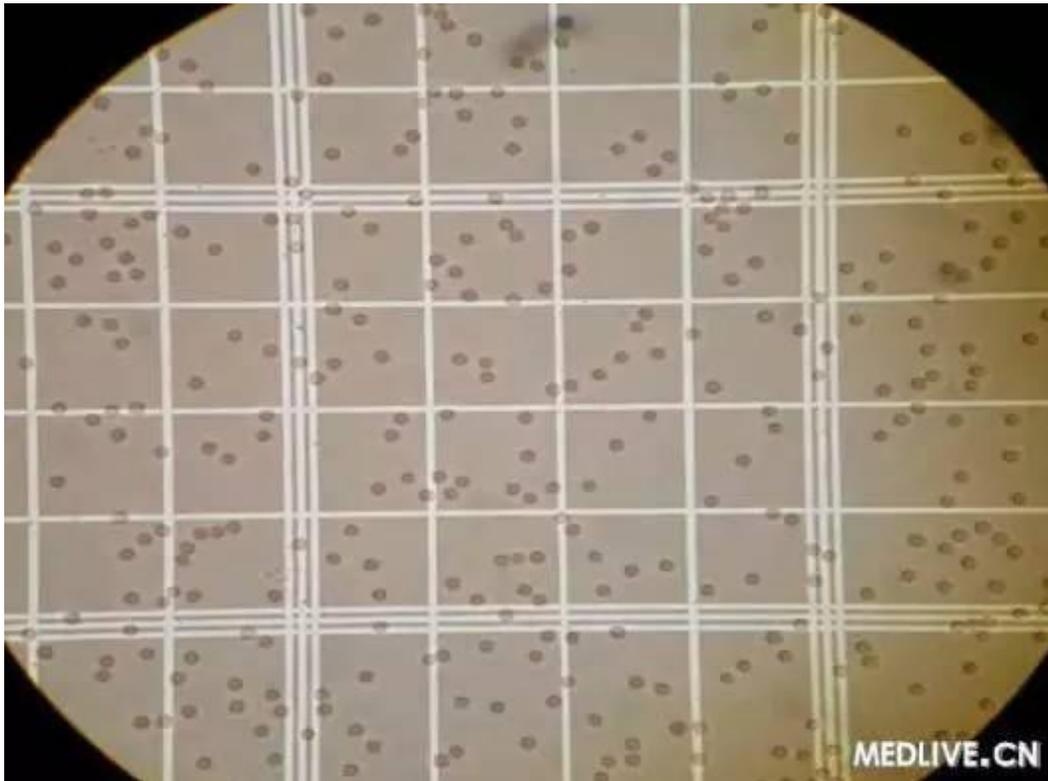
计完数后，需换算出每 ml 细胞悬液中的细胞数。每一大方格内细胞数 $\times 10,000 =$ 细胞数/ml，故可按下式计算：细胞悬液的浓度=细胞数/ml = 4 个大格细胞总数/4 $\times 10,000$ 。如计数前已稀释，可再乘稀释倍数。

好了，计数完毕，打完收工。大家也可以看到，细胞计数不是什么高大上的技术。但是，还是一个非常常用的技术。因为任何涉及到细胞计数的实验，首先就是要确定细胞的浓度和数量。现在有细胞计数仪。可以代替人工细胞计数。不过说句实话，一般不是土豪实验室的话，都没有配备。毛博当年在米国做博士猴的时候，也是用以上的方法人工计数的。人工计数的准确性一点不比细胞计数仪差，而且时间短，费用低，就算是穷人实验室的小米加步枪，效果也不一定比土豪实验室的飞机大炮差。

细胞计数快准狠，还得靠 ImageJ 这两把刷子！

作者：子非鱼

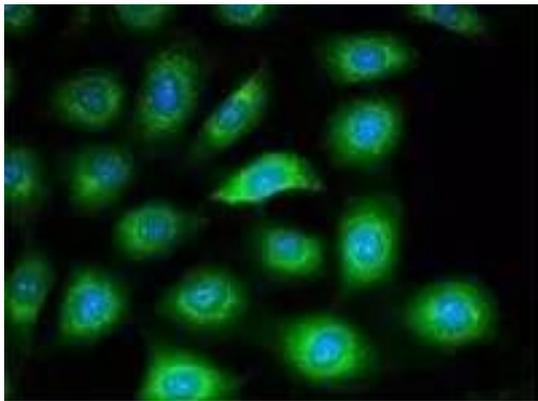
遥想当年，初遇细胞实验时，最让小编头疼的就是给细胞计数了。虽然计数板这个傻瓜式检测方法比较简单粗暴，但总会让人晕头转向、数到眼瞎，而且万一一个不小心被其他人打断了思路，分分钟前功尽弃，真是恨不得以头抢地尔。



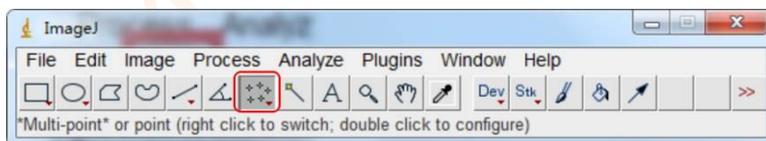
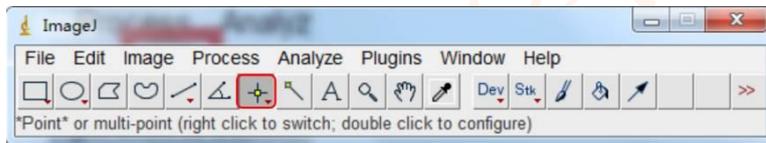
然而各位小伙伴之所以觉得数细胞如此辛苦，是因为大家还没有掌握细胞计数的正确操作。此时，ImageJ 这个大家耳熟能详的图像操作软件，携带着两大法宝，可快速将大家从数细胞这个大坑中解救出来。

法宝一：多点工具法

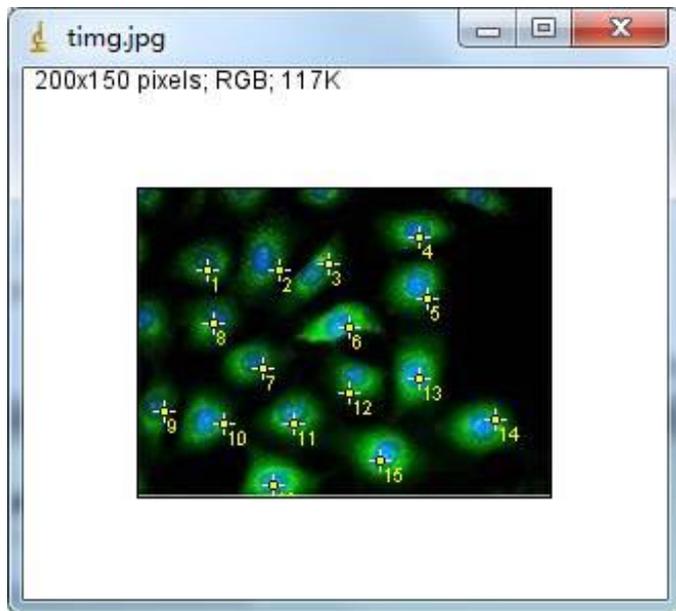
1. ImageJ 打开一张需要计数的图片。



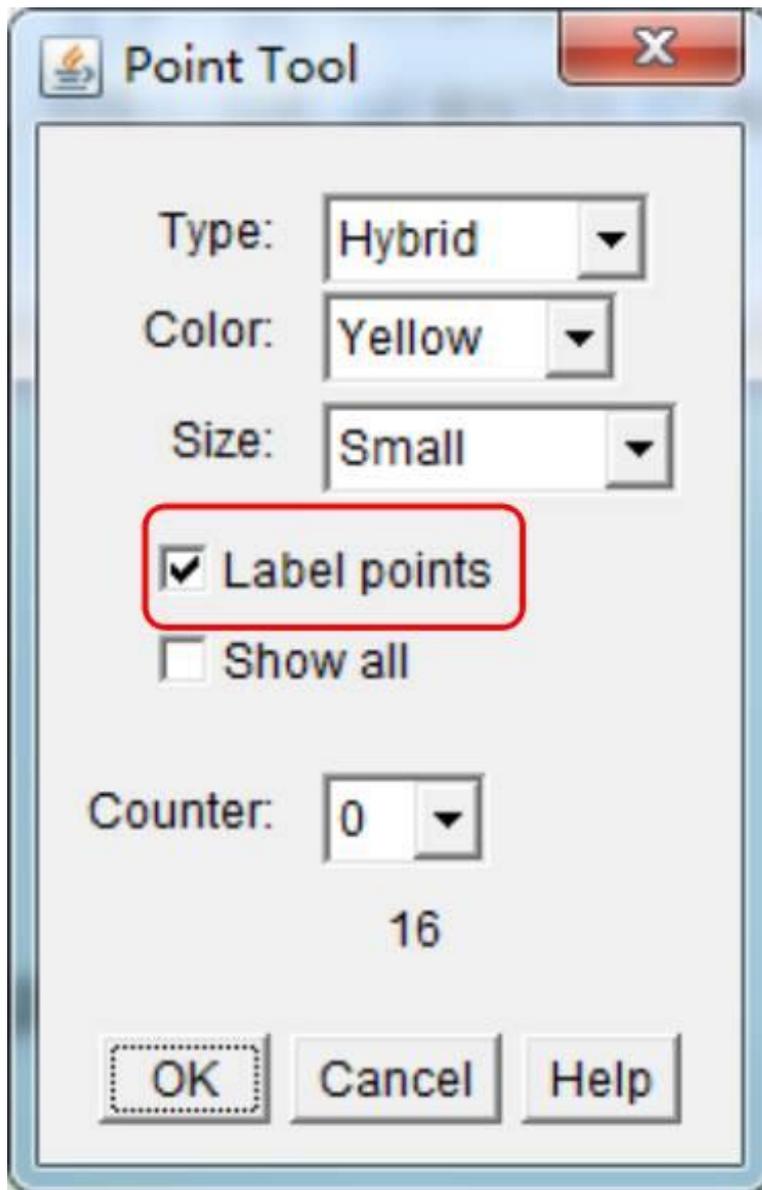
2. 激活多点工具。其位置在点工具菜单里 ，右击点菜单，选择多点工具 。



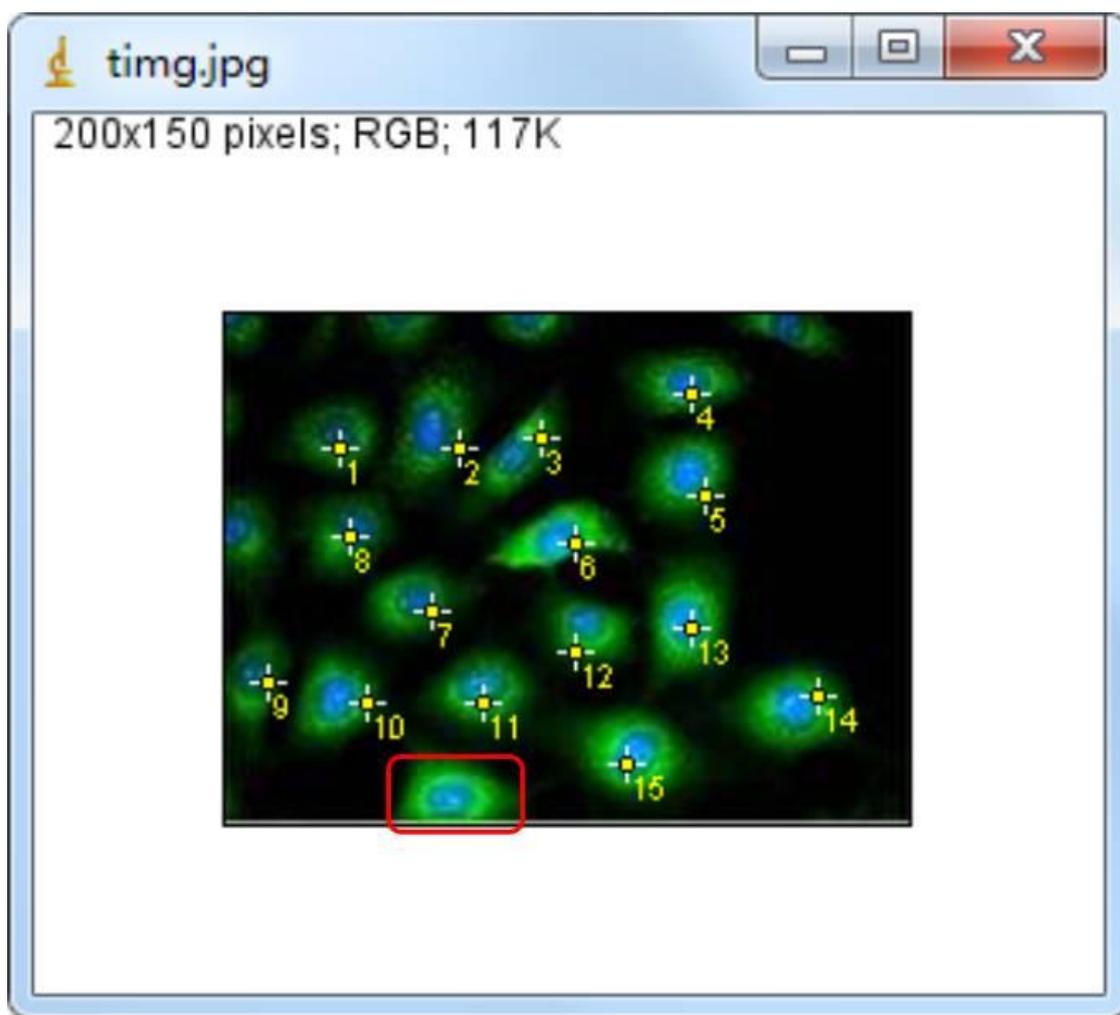
3. 直接在图中点击目标即可，软件会自动在点旁边出现数字代表数量。



4: 双击点工具菜单 ，可以修饰点的形状 (Type)、颜色 (Color)、大小 (Size)。但记住勾选 Label points。

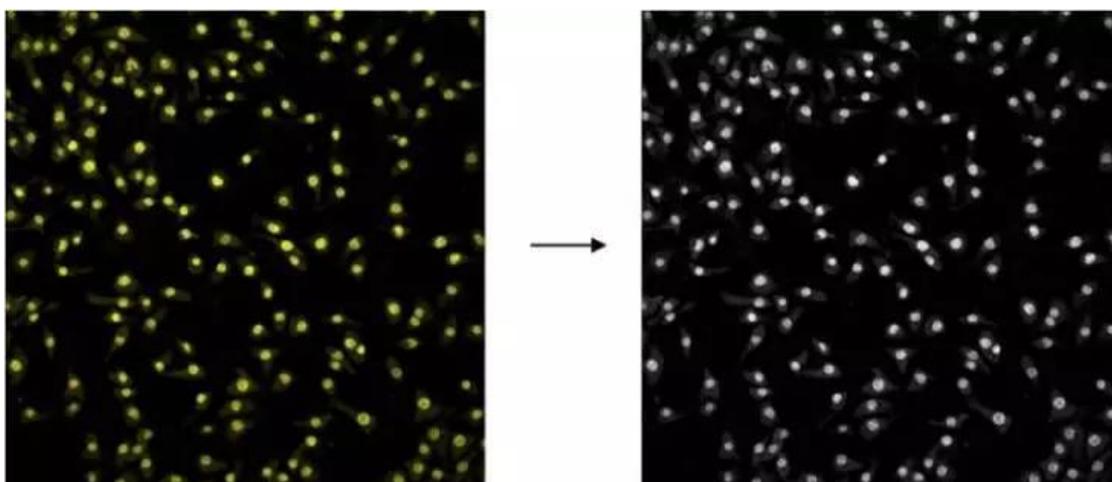


5: 若点选错误，可以按住 Alt，然后单击点，就会去除点，并且重新计数。

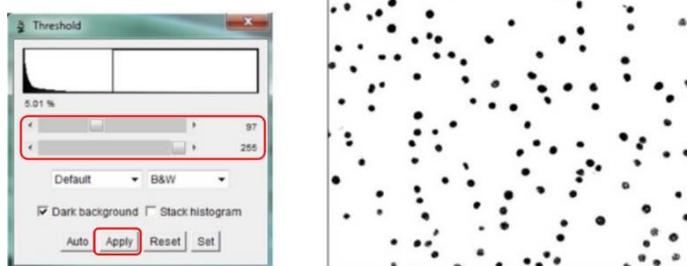


法宝二：阈值分割法

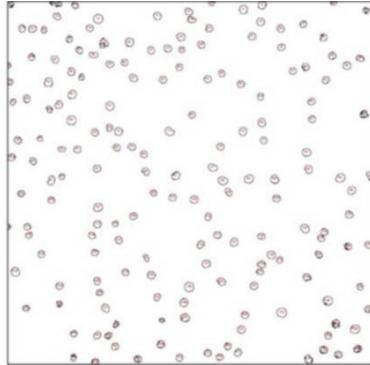
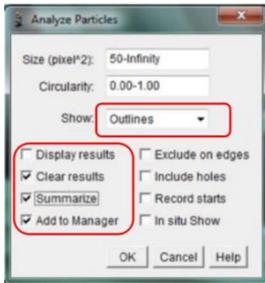
1. 将图像拖动到 ImageJ 工具箱中，点击 Image > Type > 8-bit ，将图片变为黑白图，细胞为白色，背景为黑色。



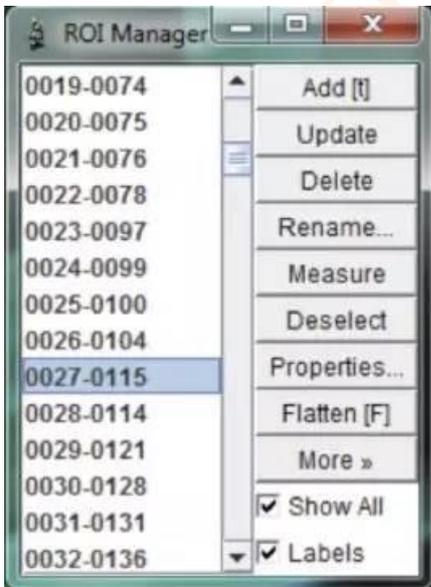
2. 反转图片，Edit>Invert，使得细胞为黑色，背景为白色。随后调整阈值，Image>Adjust>Threshold，通过阈值窗口中的滑块调节合适的阈值，将目标包含在阈值内。调节合适后，点击阈值窗口中的应用 Apply，则调节好的区域就变成黑色区域。



3. Analyze>Analyze Particles。弹出窗口，Size 表示设定以像素为单位的区域大小是我们想要计数的。勾选 Display results (显示结果)，Clear results, Summarize (总数) 即可。也可以在 Show 下拉菜单选择 Outlines，展示区域轮廓。



4. 点击 OK，弹出结果窗口，从中我们可以看到细胞总计数，也可以看到目标区域的整体面积，以及每个目标区的面积。



Summary window table:

Slice	Count	Total Area	Average Size
Counting Cells.tif	179	52191	291,570

参考文献: Quick and Easy Automatic Cell Counting

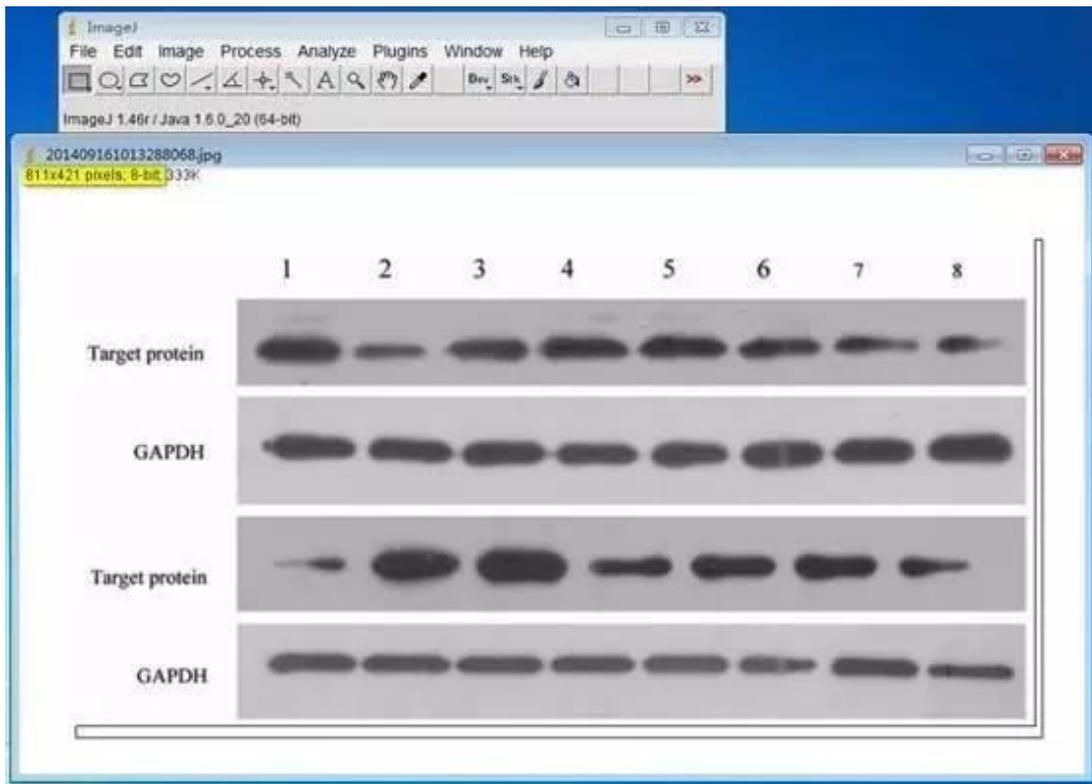
灰度分析神器: Image J

作者: 叶子

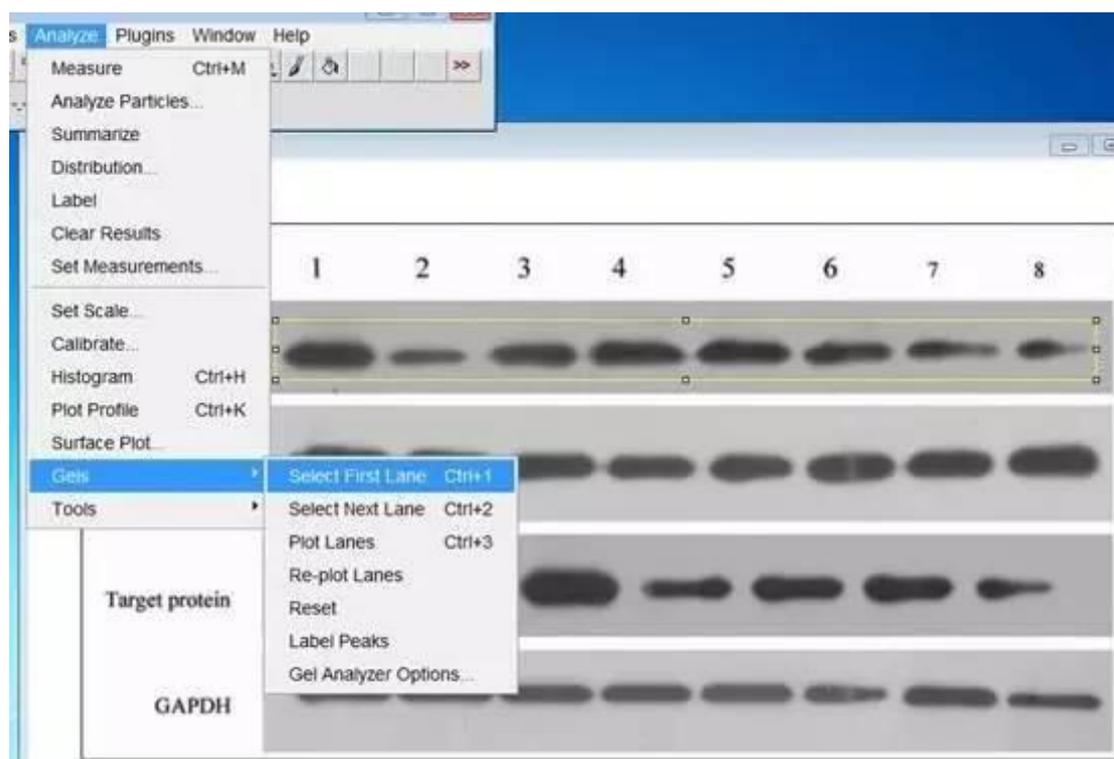
Image J 用于生物医学领域最多的就是条带灰度值分析 (DNA 电泳或者 Western Blot 条带分析) 和细胞计数。来具体看看怎么操作。

条带灰度值分析

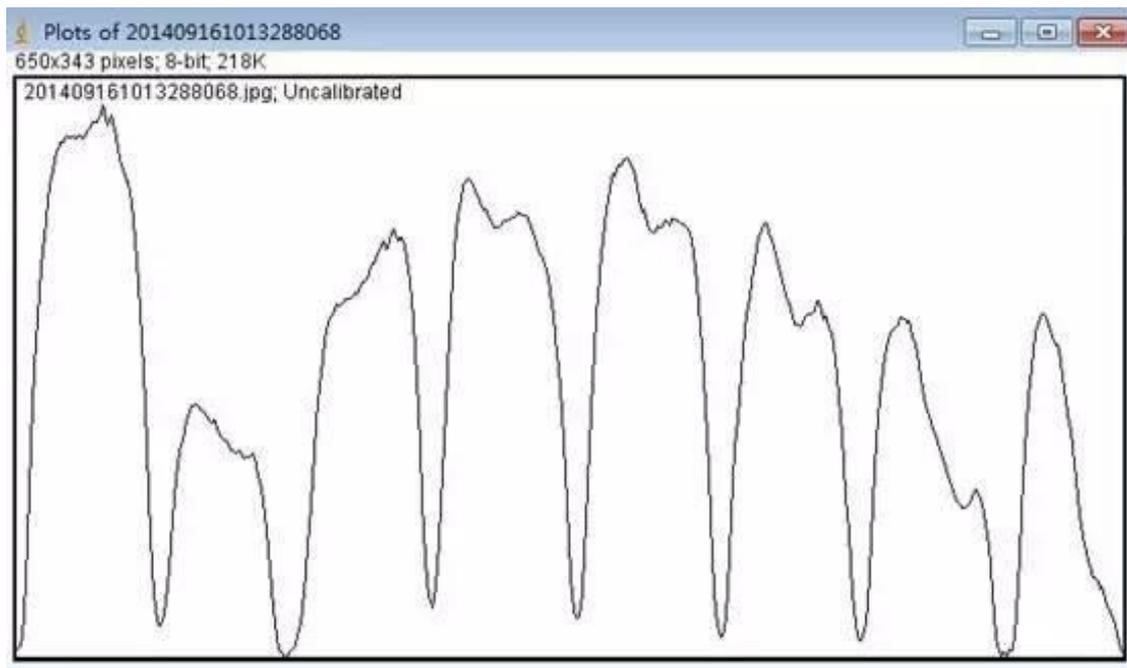
打开 Image J 软件, 在 File 里打开图片, 并且转化为 8-bit 灰度图(Image→Type→8bit)。



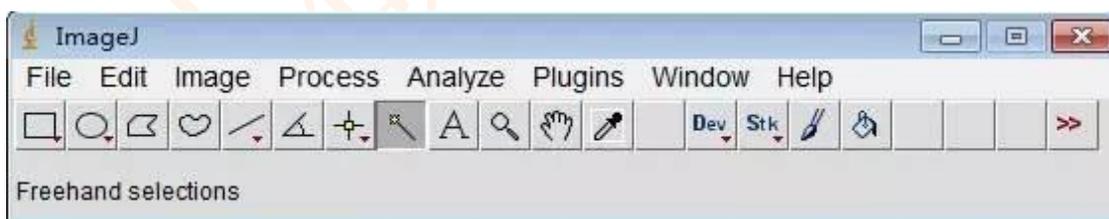
方框工具选择并画出条带，然后选择 Analyze→Gels→Select First Lane。

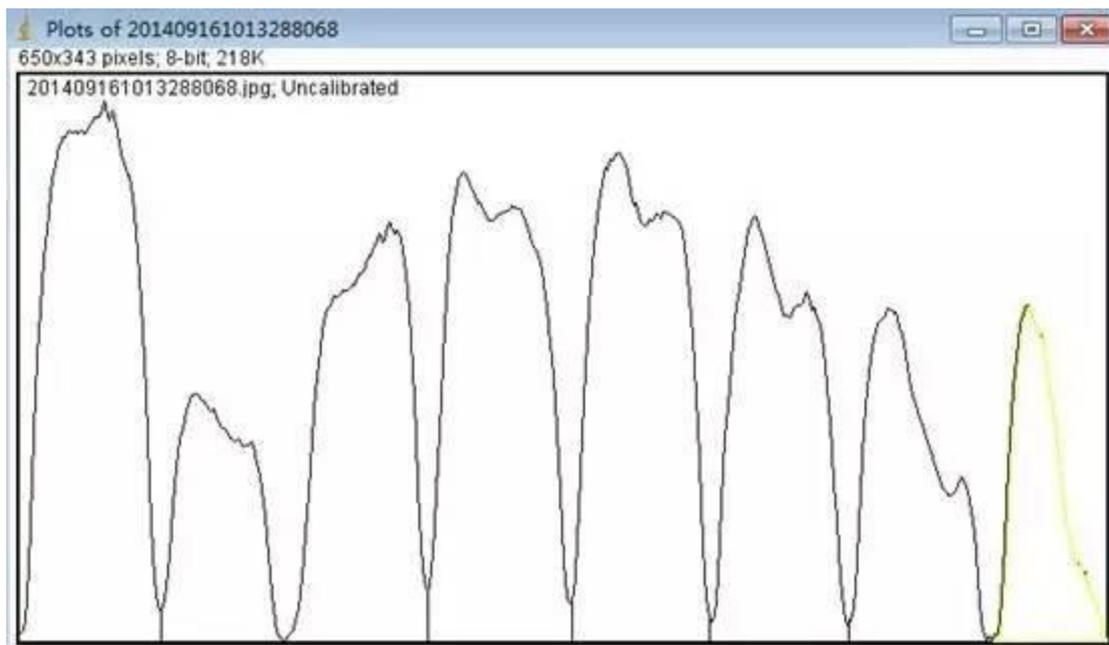


最后按 Analyze→Gels→plot Lanes，就会出现山峰样图。



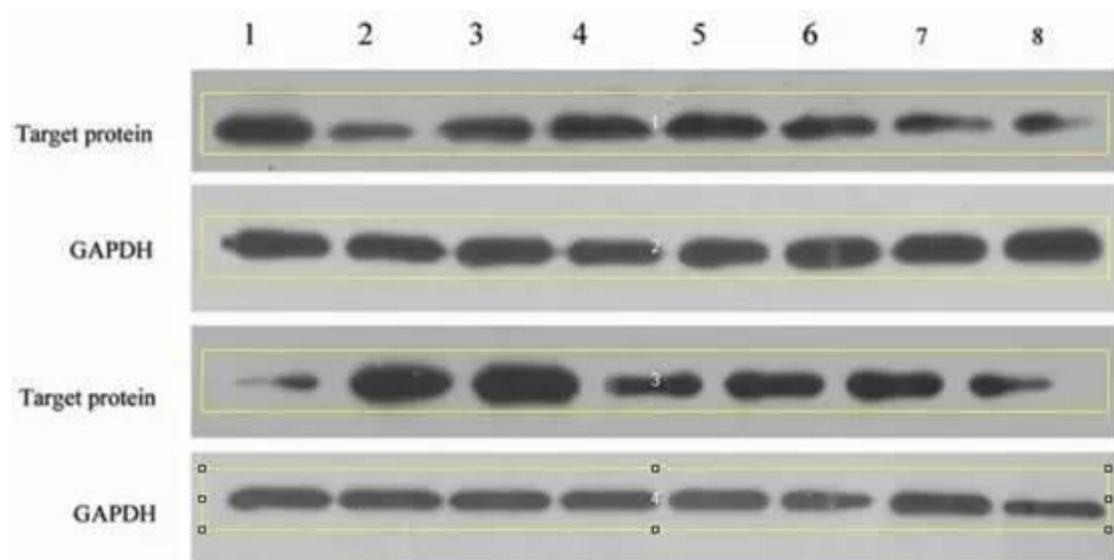
但这样是不够的，要把每个山峰分开。这就用到了直线功能，把下面都封口后点击"魔棒"。分别点击每个峰下方的区域，在"Results" 里就会出现面积，表示相应条带的灰度值。





Results	
Area	
1	19553.397
2	7479.205
3	14268.983
4	17964.154
5	17971.569
6	13992.276
7	9753.983
8	6728.497

如果要测多个条带的灰度，就用在 Select First Lane 后，点 Select Next Lane 来复选。这里注意，每个框的形状大小必须是一样的。



6.4 流式细胞术

流式细胞术：磨人小妖精是如何诞生的

作者：阿甘

做过流式细胞术的各位童鞋们知道，流式细胞术是一个专门虐狗（是实验狗，不是单身狗哟）的角色，我们对它是既爱又恨。那么，这项令众多实验狗们爱恨交织的技术是哪位大神发明的？这项技术又经历了哪些发展过程？

20 世纪初，细胞计数只能用细胞计数板，如何对细胞进行愉快方便的计数（想一想在显微镜下拿细胞计数板数细胞的感觉吧！）？于是乎，Moldaven 于 1934 年试图用光电仪记录流过 1 根毛细管的细胞数量，这是细胞检测自动化的最早想法，但是该方法灵敏度较低，误差较大。有没有什么神器可以解决这些问题？

转眼间到了 1953 年，美国电器工程师 Wallace H. Coulter（1913-1998）发明了一种全血细胞自动计数器并取得专利，这款细胞计数器是流式细胞仪的雏形（图 1）。这款仪器的灵敏度和精准度大幅提高（天了噜！我至今还在用细胞计数板数细胞！瞬间 OUT 的感觉！）。然而，该细胞计数器只能计算出全血的细胞数量，并不能计算出每种血细胞的数量。问题又来了，如何将不同类型的血细胞分选出来？细胞计数的神器有待进一步升级。

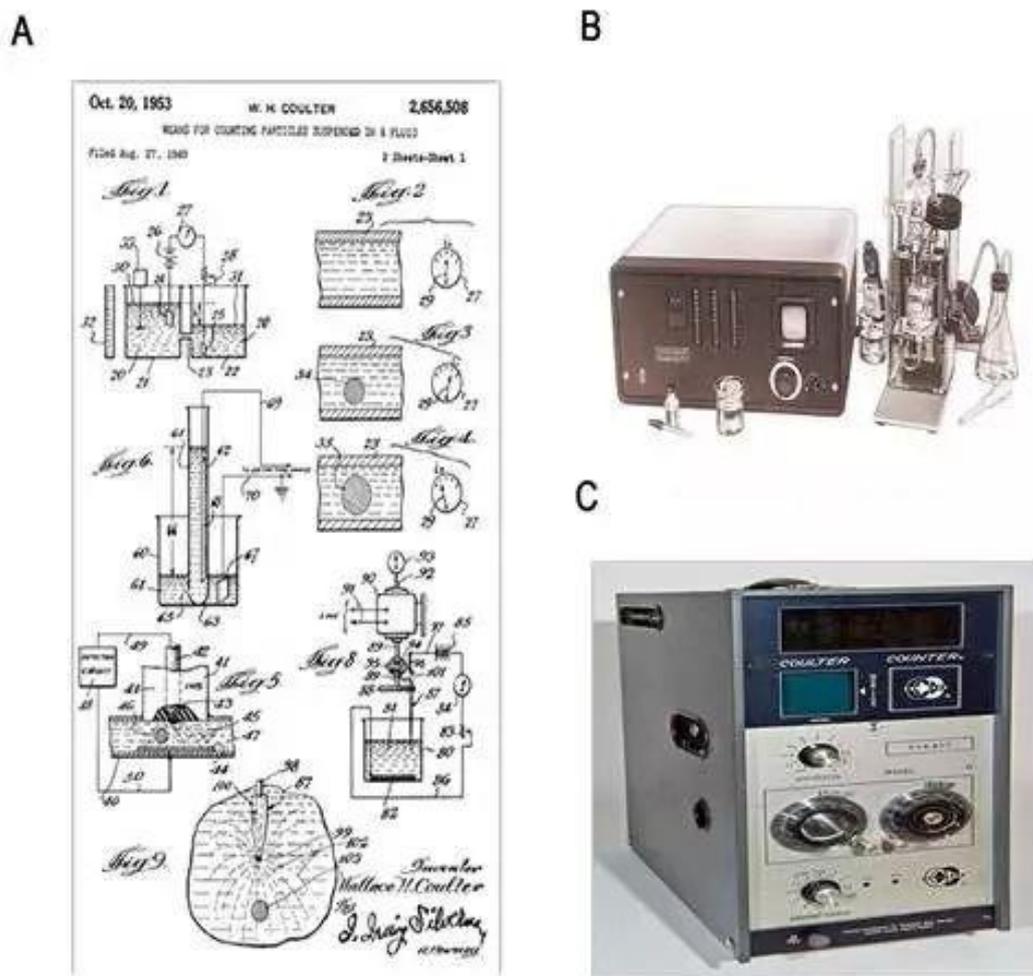


图 1 全血细胞计数器

图 A 全血细胞计数器专利图；图 B 1953 年型细胞计数器；图 C 1959 年型细胞计数器（图 A、B、C 均来源于维基百科）

Mack Fulwyler 在前人的基础上提出了真正意义上的流式细胞仪概念，并将该设想发表于 1965 年的 Science 杂志上。根据该设想，Mack Fulwyler 与 Wolfgang Göhde 于 1968 年发明了第一台荧光流式细胞仪并注册了专利（图 2）。该神器不仅能够检测出经荧光标记抗体染色的细胞的较弱的荧光信号，而且具有细胞分选功能。

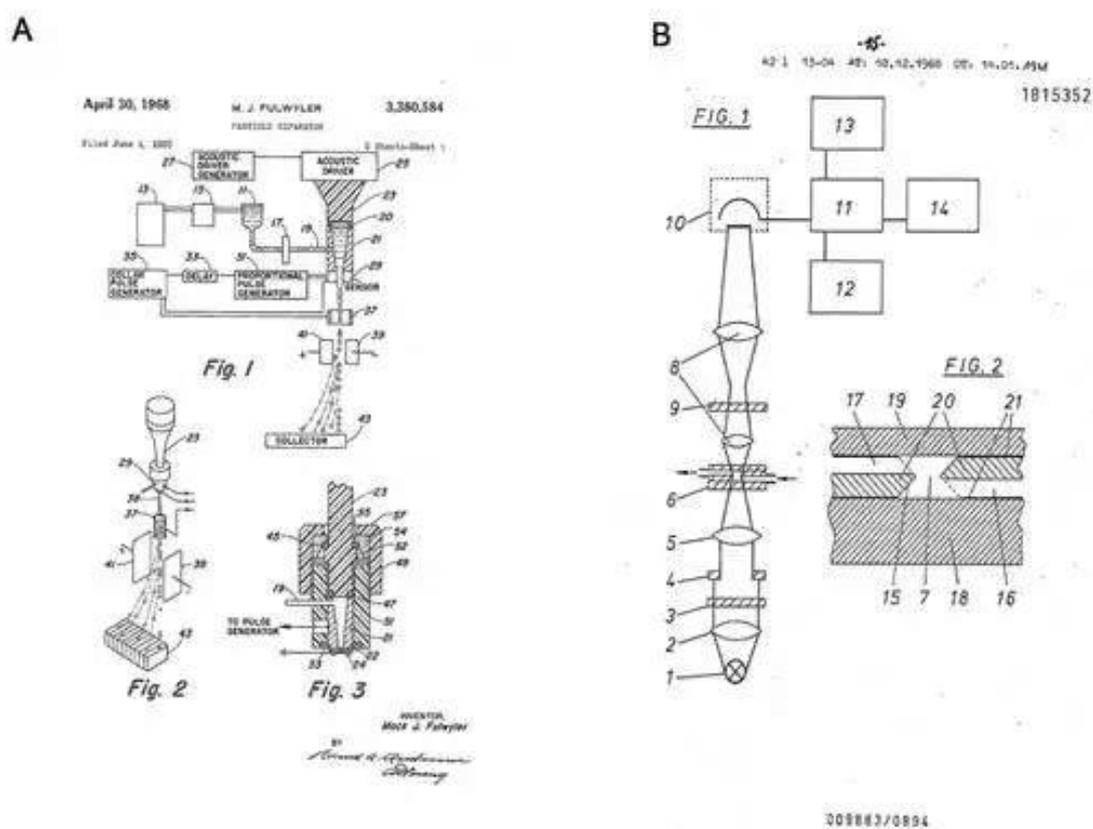


图 2 荧光流式细胞仪专利

图 A Mack Fulwyler 专利；图 B Wolfgang Göhde 专利（图 A、B 均来源于 Espacenet Patent Search）

荧光物质的种类有限，且多种荧光物质存在光谱上的重叠（图 3），如何更加精确地区分不同细胞？1972 年，Herzenberg 将单克隆抗体技术应用于流式细胞术，首次成功分离出脾脏

中的不同细胞。不同细胞表面带有不同的蛋白分子，应用单克隆抗体可以有效区分不同类型的细胞。

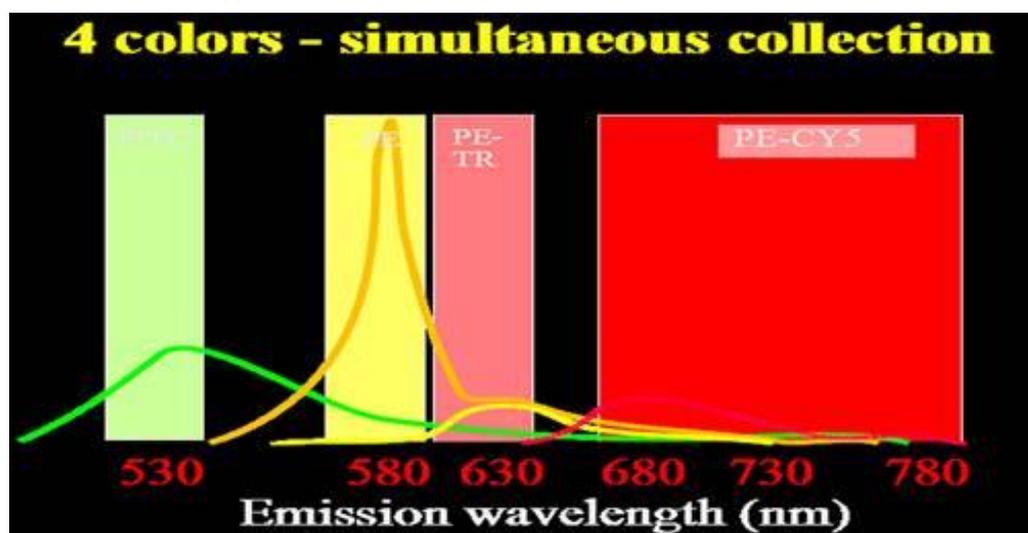


图 3 常见染料光谱重合范围（图片来源：维基百科）

流式细胞术发展趋势可归纳为：

- ①由傻大黑粗变精致玲珑；
- ②由色彩单一变丰富多彩；
- ③从粗略马虎变精准细致；
- ④从人工手动变自动智能。

个人认为，流式细胞术是一门集合少林、华山、武当等多家门派于一身的绝世武功。要想做好流式细胞术，必须要对各家武功烂熟于胸，还要勤学苦练，方能掌握此绝世武功，成为流式达人。

参考文献

1. Fulwyler MJ: Electronic separation of biological cells by volume. Science 1965, 150(3698):910-912.
2. Julius MH, Masuda T, Herzenberg LA: Demonstration That Antigen-Binding Cells Are Precursors of Antibody-Producing Cells After Purification with a Fluorescence-Activated Cell Sorter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1972, 69(7):1934-1938.

流式细胞术及常见问题分析

作者：网络

目前，流式细胞术广泛应用于细胞表面和细胞内分子表达特征的分析，界定不同类型的细胞群，测定分离出的亚类纯度，分析细胞的大小和总量，它可以同时分析单个细胞的多个参数。它主要用于检测标记在抗体上的荧光强度，这些荧光抗体则可以检测与特定细胞分子结合的蛋白或配体，如与 DNA 结合的溴化丙啶 (PI) 等。

染色步骤包括：将培养的细胞或组织样品制成单细胞悬液，然后将细胞放入管子或酶标板中与荧光标记或未标记的抗体孵育。之后将细胞放入流式细胞仪中进行分析。

悬浮缓冲液中染色的细胞样品通过流式细胞仪时，由于鞘液的作用被限制在液流的轴线上，从而通过一个非常小的喷嘴。这种微小的“液束”使细胞一个接一个地通过激光，细胞/粒子通过通道时散射的光线被多个探测器检测到。其中光柱前有一个检测器（称为前向角

散射或简称 FSC)，它的旁边有几个检测器（称为侧向散射或简称 SSC）。荧光检测器用于检测荧光染料本身。粒子/细胞通过光束时，将出现光线散射，散射会通过前向散射和侧向散射被检测到。散射和荧光数据会结合起来分析。其中前向角散射光与细胞的大小有关；而侧向角散射则依赖于粒子/细胞的密度（比如胞浆颗粒数量，细胞膜尺寸），并往往以这种方式，根据不同的大小和密度的差异而将细胞群区分开来。当由相应激发波长的激光激发时，用于检测或染色的荧光染料就会发光。这些粒子/细胞就可分别被检测并进行数据分析。

直接染色：

直接免疫荧光染色时，细胞与直接结合有荧光染料（如 FITC 标记）的抗体孵育。它的优点在于只需要抗体孵育这一个步骤，从而消除了来自二抗的非特异性结合的可能性。这对细胞内染色特别有用，由于大的抗体荧光分子复合物包括二抗被困在细胞内造成背景，或甚至无法进入细胞，阻止了一抗的检测。

间接染色：

间接染色时，一抗不是荧光染料直接标记的，而是通过荧光染料标记的二抗检测。另外可选择使用亲和-生物素系统，即抗体与生物素结合并且通过荧光染料标记的亲生素来检测。随着标记二抗越来越多的应用，可针对不同的目标蛋白制出未标记的一抗，然后用标记二抗进行流式细胞仪分析，这拓宽了研究者对目标蛋白的选择范围。

细胞内染色：

应用流式细胞术的细胞内源性抗原在染色时，应采取各种不同的固定和通透方法，以使

抗体能接近胞内蛋白。

任何情况下，要获得成功的染色都必须对实验条件进行优化，包括测定抗体效价，采用合适的对照设定流式细胞仪，并且（如有必要）优化样品的固定和通透方法。

选择荧光结合染料

对一个给定的抗体，从阴性中分辨出阳性细胞的能力，往往取决于所用的荧光结合染料。

各种荧光染料相对强度的一般准则是，从最亮到最暗，PE（藻红蛋白），PE-Cy7，PE-Cy5，APC > APC-Cy7，Alexa Fluor 47，Alexa Fluor 700 > FITC，Pacific Blue，Alexa Fluor 488。这是使用信噪比的一般模式，但对于个别抗体仍有些差异。

一个高表达的抗原通常可以被几乎所有的荧光团分辨。一个低强度表达的抗原可能需要使用较亮的 PE 或 APC，提信噪比，把未染色细胞中足够分离出阳性细胞。

荧光染料强度的相对差异取决于仪器，这是因为在不同的仪器上激光和过滤器的组合差异。一定要使用适当的 FACS。

流式细胞术常见问题分析

无信号/荧光强度弱

不正确的信号补偿:检查流式细胞仪阳性单一颜色对照是否正确, 通道和补偿设置是否能正确地捕获所有粒子;

没有足够的抗体来检测:增加抗体的量/浓度;

无法接近细胞内目标:检查目标蛋白是否在细胞内。对于胞内染色, 确保有足够的通透性。为防止细胞表面蛋白质的内化, 该过程应用冰冷的试剂, 在冰上或 4 °C 进行, 以终止一切反应。加入叠氮钠可防止表面抗原的修饰和内化带来的荧光强度的损失。对于细胞系染色, 胰蛋白酶可以引起细胞表面蛋白质的内化, 尤其是细胞表面分子, 可能需要更温和的分离方法;

细胞内染色结合荧光分子太大:对细胞内染色实验, 荧光分子应具有较小的分子量。大分子量荧光染料会降低抗体的动力和其进入细胞的可能性;

激光器未对齐:确保流式细胞仪的激光器正确对齐, 必要时通过运行液流检查微球来调整路线。如果激光器不能正确对准或发生漂移时, 您可能需要考虑联系此机的客服;

目标蛋白不存在或处于低水平表达:确保组织或细胞类型表达的目标蛋白处于一个足够检测的量;

可溶性或分泌型目标蛋白:目标蛋白是否可溶并从细胞内分泌? 需要嵌合在细胞膜上或存在于细胞质里以便流式细胞仪能很容易检测到。通过高尔基体封闭的步骤, 比如加入 **Brefaldin A**, 可提高细胞内染色信号;

补偿过高或增益过低:使用阳性对照再次设置流式细胞仪, 利用补偿以确保细胞的荧光信号不被切断, 提高增益以增强信号 (在合理的范围内);

荧光分子的荧光逐渐消退:抗体可能放置时间太长或没有避光, 新鲜抗体是必需的;

一抗和二抗不匹配:二抗应该是和一抗来源物种相同 (例如第一抗体来源于兔, 就要使用抗兔的第二抗体);

荧光强度过高

抗体浓度过高:这将导致较高的非特异性结合或非常高的荧光强度。减少每个样本中加入的

抗体量;

过量抗体被困:这是细胞内染色特有的问题,较大的荧光分子使抗体被困在细胞中。确保洗涤步骤充分,包括在洗涤缓冲液中加入吐温或 Triton;

封闭不足,与封闭步骤一样,抗体中加入 1-3% 封闭试剂;

背景高或阳性细胞百分比高

增益设置过高或补偿过低:使用阳性对照再次设置流式细胞仪,用补偿减少小颗粒背景并减少增益以降低信号;

抗体过量:降低抗体浓度。您还可以在洗涤缓冲液中添加去污剂,以确保洗去多余的抗体;

观察到两个或多个细胞群但应该只有一群细胞

不止一类细胞表达目的蛋白:检查样品中所有细胞类型的预期表达水平,如果必要确保细胞充分分离;

出现细胞双峰:细胞双峰在图上显示两倍的荧光强度的第二种细胞类型。染色前轻轻地混合细胞,在放入流式细胞仪前用吸管再次混匀,也可以筛选或过滤细胞以除去团块(30 μ m 的尼龙网);

侧向散射背景偏高(来自小颗粒);

细胞裂解:确保样品中细胞没有裂解和破裂。样品应是新鲜的并且是正确制备的。细胞不能高转速离心或剧烈震荡;

细菌污染:确保样品不受污染。细菌会低水平自发荧光,这也会导致高粒子率。

低粒子率

每毫升的细胞数量太少:制备 1×10^6 个细胞/ml。确保细胞充分混合（操作要轻）；

细胞聚集，阻塞管道:染色前轻轻吹打几次确保形成同源单细胞悬液。确保运行之前再次混匀。在极端的情况下，可筛选或过滤细胞以去除团块（ $30 \mu\text{m}$ 的尼龙网）；

高粒子率

细胞数量过多:将细胞稀释成 1×10^5 至 1×10^6 个细胞/ml 样品

干货 | 流式细胞分选的那些事儿

作者：罗小黑

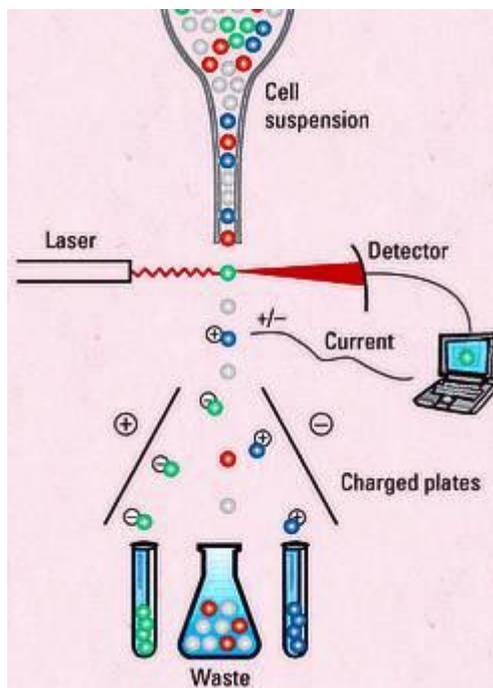
将感兴趣的目的细胞分离纯化出来，一直是细胞生物学中的一个重要研究手段。无论是体外刺激研究细胞因子的表达谱，还是细胞共培养检测细胞功能，均对细胞的纯度具有很高的要求。

目前分离纯化细胞的手段主要有两种：

MACS（magnetic-activated cell sorting），原理就是用结合了磁珠的抗体去标记细胞，让目的细胞带上磁珠，通过磁场将结合了磁珠与没结合磁珠的细胞分离开来。MACS 是细胞分选的重要手段，设备简单，只需要一块磁铁，不需要专门的大型仪器，得到的细胞活性好，适合

大多数的实验室。缺点就是能分选的细胞类型有限。

FACS (fluorescence-activated cell sorting), 也就是我们今天要了解的流式分选。这部分原理与流式分析一致。利用荧光素标记不同的分子, 通过调节合适的电压、补偿等, 通过荧光将目的细胞与非目的细胞区分开来。



MACS 和 FACS 的优缺点:

比较内容	FACS	MACS
设备要求	具有分选功能的流式细胞仪	专用的磁铁和柱子
试剂	荧光抗体	磁珠结合抗体
操作人员要求	需专门培训	操作简单
对细胞刺激	大	小
多种标记细胞	可以分选	不能分选
表达丰度低的细胞	可以分选	不能分选
识别细胞大小和颗粒度	可以识别	不能识别
多种细胞分选	四路同时分选	不可以同时分选多种

流式分选和流式分析在样本的准备上具有很多相通的地方，都是把样本处理成单细胞，最后上样的时候让细胞处于单个悬液的状态。绝大部分人不需要进行仪器的操作，更关心的是如何提高细胞得率以及如果提高分选出来的细胞活性等问题。

首先是样本的准备，无论是组织还是血液来源的细胞，均应保证细胞在上样之前处于比较好的状态。

提示：

可以在重悬细胞的时候 PBS 中加入 1%-2%的胎牛血清

大部分流式分选仪的上样器均没有冷却系统，要想分选后获得比较好的细胞活性，应尽量减

少细胞在室温的暴露时间

样本较多的时候可以分成小份体积上样，每次 1ml 或者 2ml，剩下的放在冰箱冷藏。

该方法长时间分选的时候能较好地提高分选出来的细胞活性，缺点就是人不能长时间离开，以防止样品跑空，空气进入分选管道。

其次，我们来聊一聊分选的模式，一般的流式分选仪上都有三种模式：**纯化 (purify)**、**富集 (enrich)**、**单细胞 (single cell)**。我们需要知道的是，流式分选是针对细胞所在的液滴进行操作，而不是针对细胞本身。

三种模式的异同点：

液滴情况	纯化模式	富集模式	单细胞模式
没有细胞	不分选	不分选	不分选
只有 1 个细胞，该细胞为非目标细胞	不分选	不分选	不分选
只有一个细胞，该细胞为目标细胞	分选	分选	分选
2 个以上细胞，无目标细胞	不分选	不分选	不分选
2 个以上细胞，目标细胞和非目标细胞共存	不分选	分选	不分选
2 个以上细胞，均为目标细胞	分选	分选	不分选

由上表我们可以看到，单细胞模式细胞得率最低，只有液滴中有一个且只有一个目标细胞才会被分选。纯化模式分选出来的都是目标细胞，纯度和单细胞模式分选一致。富集模式分选出来的纯度最低。

那么，如何提高分选效率？答案就是尽可能地使细胞分散成单个细胞状态。防止细胞粘连，同时细胞密度不宜过大，尽量使每个液滴中只含有一个细胞。在分选之前可将细胞用含 EDTA 的 PBS 清洗，去除钙离子，或者加入适度的 DNA 酶，去除死细胞 DNA 产生的粘连。EDTA 可能会对检测造成一定的影响，具体细胞还得具体分析。

最后，细胞分选出来后我们需用离心管或者流式管收集，为了保证细胞的活性，收集管里需要放置一定的培养液，起到缓冲作用也可以给细胞提供一定营养。如果分选出来的细胞需要进行培养，还可在收集管中加入一定浓度的抗生素。如果分选环境不是特别干净，切记收集后要用含抗生素的 PBS 进行清洗，再用含抗生素的培养基进行培养，以防止细胞污染。

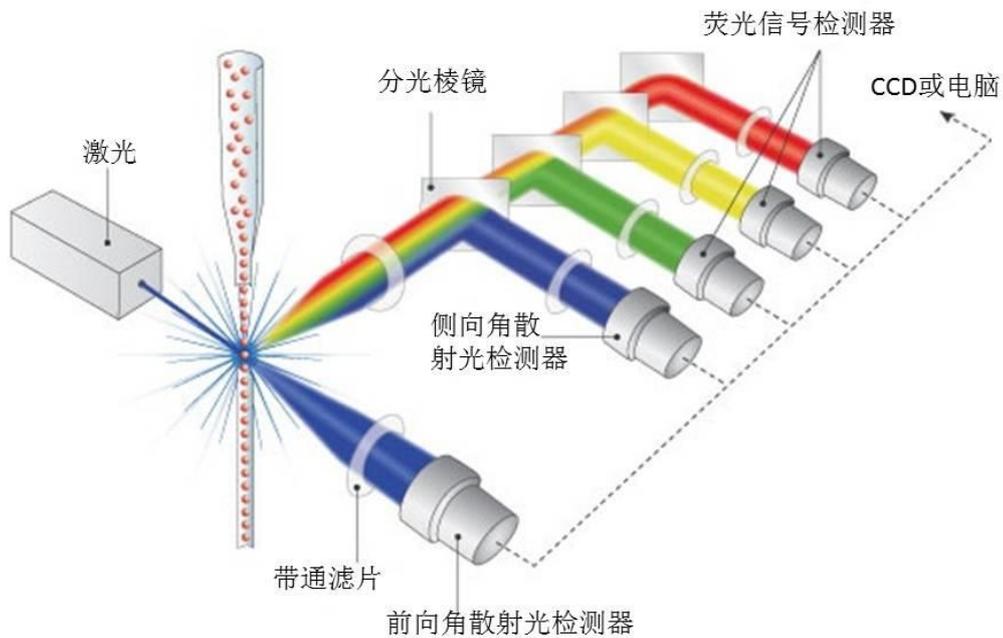
流式分选可用的很多，特别提出的一点是它除了可以进行四路分选以外，还可以分选单细胞，直接用 96 孔板进行收集，可以往每个孔里都只分选 1 个细胞。对于筛选细胞稳转株或者做单抗的同学来说可以大大缩短筛选细胞单克隆的时间。

干货 | 流式细胞术之染料选择那些事儿

作者：罗小黑

很多朋友面对各种各样颜色的流式抗体，在选择及搭配上就犯了难，在此我们需要了解下流式细胞仪的各个激发光及各个接收通道是如何工作的、常见的荧光素有哪些、这些荧光的特性是什么样的。了解了这些，选择抗体和搭配不同的颜色就变得非常简单了。

我们再回过头来看看流式细胞仪的原理，熟悉一下流式细胞仪的光路系统。



从这张图中我们可以看到，激光照射细胞后会产生很多波长的信号，不同的透镜和滤光片将不同的荧光素的荧光信号区分开，由不同的通道进行接收。光信号通过光电倍增管转化为电信号，不同强弱的信号反应了细胞不同的物理或者化学性质。

不同型号的流式细胞仪所配备的激光数目和接收通道可能是不同的，常见的是 488 激光器、此外还有紫外激光器、紫激光器以及红激光器。通道的顺序一般为 488 激光器先排序，紫外或紫激光器次之，红激光器最后。来源于同一个激光器的信号，原则上按波长从短到长进行排序，当然也可以自定义通道顺序。通道既可以以数字命名也可以以主要的荧光素进行命名。

目前市场上用得最多三种激光主要是 488nm、405nm、633nm。我们来看一下某流式细胞仪的通道排序和每个通道接收的荧光的纳米范围。

数字序号命名	通道主要荧光素命名	激光器	接收波长范围/nm
FL1	FITC	488nm	530/40
FL2	PE	488nm	575/25
FL3	PE-TxRed	488nm	613/20
FL4	PE-Cy5	488nm	680/30
FL5	PE-Cy7	488nm	>750
FL6	Pacific blue	405nm	450/50
FL7	Cascade Yellow	405nm	530/40
FL8	APC	633nm	665/20
FL9	APC-Cy7	633nm	>750

从这个表中我们可以看到该流式细胞仪属于 3 个激光，9 个接收通道的类型。每个接收通道有一定的范围，**530/40nm** 的意思是指该通道能接收 **510nm~550nm** 波长的荧光。请注意不要误解成了可以接收 **490nm~570nm**。我们还可以看到，每个通道有个代表性的荧光素，那么是不是这个通道只能用这一种荧光素呢，答案是否定的。了解了流式细胞仪接收通道的特性，我们还需要了解下荧光素的特性。

流式细胞术发展至今，已有多种荧光素被用于流式分析，我们来看一下常见的荧光素有哪些。

荧光素	中文名	激发光波长	发射光波长	基本用途
FITC	异硫氰酸荧光素	488nm	525nm	检测抗原
PE	藻红蛋白	488nm	575nm	检测抗原
PE-TxRed	藻红蛋白德克萨斯红	488nm	612nm	检测抗原
PerCP	多甲藻叶绿素蛋白	488nm	677nm	检测抗原
PE-Cy5	藻红蛋白-花青素5	488nm	670nm	检测抗原
PE-Cy7	藻红蛋白-花青素7	488nm	770nm	检测抗原
APC	别藻青蛋白	652nm	660nm	检测抗原
APC-Cy7	别藻青蛋白-花青素7	652nm	778nm	检测抗原
CFSE	羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯	488nm	518nm	细胞示踪
(E)CFP	(加强)蓝色荧光蛋白	408nm	475nm	指示蛋白
(E)GFP	(加强)绿色荧光蛋白	488nm	507nm	指示蛋白
(E)YFP	(加强)红色荧光蛋白	488nm	527nm	指示蛋白
Hoechst33342	烟酰己可碱33342	350nm	470nm	DNA分析
PI	碘化丙啶	488nm	620nm	DNA分析
DAPI	4',6-二脒基-2-苯基吲哚	358nm	461nm	DNA分析
7AAD	7-氨基放线菌素D	546nm	655nm	细胞活性
Fluo-4	--	488nm	516nm	游离钙离子
DCFH-DA	--	488nm	525nm	活性氧检测

注：荧光素的激发波长是指最适合激发波长，流式细胞仪不一定配备该波长的激光，可选择相近波长的激光进行激发。荧光素的发射波长是一个区间，不是一个点。上表指的发射波长是指该荧光素的最强发射波长。

除了上表的常见荧光素，目前还有 Alex Fluor 系列，该系列荧光素比一般的荧光素信号更强，

光稳定性更好，并且很多可以代替上表中的传统荧光素，选择和搭配的原理和普通荧光素是一致的。了解了不同荧光素的激发波长及发射波长之后，我们把它对应到流式细胞仪的激光器和接收通道上，就知道该如何选择荧光素了。

在搭配之前，我们需要明白的一点，就是不同激光器对应的通道，在物理上是分隔的，比如 PE-Cy5 和 APC，这两个荧光素的接收波长是重叠的，但前者的激光器是 488nm，后者是 633nm，因而这两个荧光素可以同时使用互不干扰。在搭配抗体之前，首先应该了解所需要使用的流式细胞仪有哪几个激光，选择不同激光器激发的抗体是最保守并且不会错的，比如 Pacific Blue（405 激光器）、PE（488 激光器）、APC（633 激光器）这三个一起用基本不会出错。如果需要更多的颜色，需要使用同一个激光器激发的时候，关注下荧光素的发射波长，差异越大越好。看到这，是不是觉得流式抗体的选择非常简单了？

干货 | 流式细胞术关键问题：样本制备

作者：罗小黑

经常有临床的同学需要用到流式去检测自己的样本，但是却往往不知道从哪里下手，面对各种高大上的理论一头雾水。今天就来帮大家解决“制备流式细胞术样本”这个关键问题。



流式细胞术，简称流式，它的样本制备和染色方法是进行流式分析的基础，它对样本的要求是必须能在鞘液中流动，因此无论是培养的细胞还是从各种组织中取出来的细胞，首先需要做的就是将待测试样本制备成单细胞悬液！黏连细胞的存在会改变细胞群体的真实分布情况，大的团块甚至会堵塞液流系统影响仪器的正常运转，因此单细胞悬液的制备是重中之重！

以人外周血和小鼠脾脏为例，来学习一下单细胞悬液的制备。

外周血

1. 取人外周血 5mL，肝素抗凝，用等量 hanks 缓冲液或者 RPMI 1640 稀释成 10mL,混匀；
2. 淋巴细胞分离液 10mL 加入离心管中，轻轻将稀释后的外周血加入到淋巴细胞分离液液面上，保持清晰分层状态。
- 3.室温下 400g 离心 30min。

注：步骤也可参考所购买的淋巴细胞分离液说明书。特别需要强调的是，离心的过程中上升速度宜慢，离心完后降速阻力一定要为零，不然会将分好层的淋巴细胞分离液打乱，得不到好的分离效果。

4.离心完后可以见到离心管内的血液分为清晰的四层，上层为血浆层，可以取来做 ELISA。中间层为分离液层。在上中层界面处有一个以单个核细胞为主的灰白色云雾带，即为淋巴细胞和单核细胞，还包括血小板。底层为红细胞。

5.吸出中间层单个核细胞，如有红细胞污染稍微破红即可。

注：这么做的好处是血浆可拿来作别的实验，如果需要检测的外周血特别少，只有几十微升，可以直接用红细胞裂解液破红，鉴于外周血中红细胞较多，破红时间会比较长。

小鼠脾脏

1. 将小鼠脾脏取出，用研磨棒轻轻磨匀（此处可选用 5mL 注射器的针柄，橡皮头对细胞损伤小），将磨好的细胞悬液过 200 目的纱布，400g 离心 5min，弃上清。

2. 将红细胞裂解液加入，弹匀，通常十几秒即可，加大量 PBS 清洗，离心，弃上清，再拿 PBS 重悬，即为单个细胞。

注：不同的组织细胞需不同组合酶进行消化。将组织剪碎消化以后进行清洗，离心，过滤，重悬，即为单细胞悬液。同时需要注意有的酶会将细胞的表面标志消化掉，可能影响相关实验结果。因而需要通过不同的方法对自己的结果进行验证。

在制备好单细胞悬液后，我们下一步需要学习的就是如何对已经**制备好单细胞悬液的样本进行染色**。以免疫细胞为例，一个 TEST 所需要的细胞量以 10^6 为适宜。

1. 先将细胞至于流式管中，300~400g 离心 5min（为什么不用 rpm 表示转速是因为每台离心机半径不同，其 rpm 对应的 g 都不一样），倒干全部上清（实际上倒不干，约剩 25ul 左右），轻轻弹匀。

2. 如果是髓系细胞，一定要加入 Fc block。因为我们染色用的荧光抗体是 IgG，它的结构是酱紫的，Fab 段能够特异性识别我们要染的标志，但有一个 Fc 的尾巴，而髓系细胞高表达 Fc 受体，所以这个 Fc 的小尾巴就可能粘到 Fc 受体上去，造成非特异染色，背景荧光很高很有可能把真实信息掩盖掉。很多说明书上会说这是选择性步骤，如果是不表达 Fc 受体的细胞，省掉这一步也没关系，但如果不知道是否表达，那还是都加吧。Fc block 通常以 1:100 或者 1:200 的比例用流式缓冲液稀释，每管加入 25ul 稀释好的 Fc block 工作液，混匀，置于冰上孵育 10min。

3. 接下来就是配制染色用的抗体工作液了，每管抗体都有一个推荐用量，以一个 TEST 为例，将一定量的抗体和 50ul 流式缓冲液混匀，直接加入到已经用 Fc block 孵育好的样本中（Fc block 孵育好之后不用清洗离心），将加好荧光抗体并混匀的样本置于冰上，避光，孵育 30min，染色就完成啦。实际上，孵育 30min 和孵育 10min 好像没差别，赶时间可以省省。但是对于表达比较弱的抗原，还是应该严格按照 protocol 来，并且需要比较强弱的分子应该严格保持染色时间一致。

那么问题来了.....流式抗体都死贵死贵，按推荐用量三下两下就没了，老板天天黑着一张脸不给买怎么办？在此教大家一个省钱大法（此处应有掌声），实际上几乎所有抗体推荐量基本都是过量的，可以根据你买的品牌以及所染抗原等大胆尝试减量使用，用一半的推荐量，甚至五分之一十分之一的推荐量，观察染色效果有无差别（我反正用过十分之一都没有问题，抗体生产商和抗体销售看到这是不是想揍我）。此外，抗体的染色效果跟绝对量关系相对较小，跟抗体浓度关系较大，因而大家也可以通过缩小染色体积提高单位体积的抗体浓度来减少开支。



4. 染色好之后，加入 1mL 的流式缓冲液，400g 离心 5min，弃上清，再加 400uL~500uL 的流式缓冲液重悬，就可以上机检测啦。此处需要注意的是，不管你前面过滤了多少遍，上机之前一定要拿 200 目纱布再过滤一遍，尤其是肿瘤细胞或者组织来源的细胞，会形成黏连，千万不要怕麻烦。

5. 如果处理完单细胞悬液，染色完等等时间很晚了来不及上机检测了怎么办？可以在染完色之后用固定液对细胞进行固定，再避光保存就可以了。常用的固定方法有甲醛法和乙醇法。**检测细胞表面标志通常用甲醛固定，终浓度为 1%。检测 DNA 通常用乙醇固定，终浓度为 70%。**目前有很多商业化的固定剂可选，方便快捷。但是！有的染料染完是不能固定的，比如测活性氧的探针及测细胞凋亡的试剂盒等，染完必须检测，请认真阅读所用试剂的说明书。

6. 如果你需要同时检测细胞表面和细胞内的抗原，那么先按上面的步骤染完，再将细胞进

行固定、破膜，按上面的步骤把细胞内的抗体加一遍，搞定。固定可能会改变某些抗原表位，因而染胞内抗原之前最好先将表面抗原染完再固定。固定液和破膜液都有商业化的可选，非常方便。需要注意的是染核抗原和胞浆抗原，所需要的破膜液不太一样。为了避免广告嫌疑在此就不具体推荐品牌了。

听上去好像很简单的样子。那么流式缓冲液是个什么玩意儿呢？虽然有商家也卖这个东东，但是鉴于我们比较穷所以都是用 PBS 代替。实际上，**流式缓冲液的成分主要是 PBS、BSA 以及叠氮化钠**。一般来说是 PBS 加上 1%的 BSA 再加 0.05%的叠氮化钠，BSA 的存在是为了使细胞保持较好的活性，而叠氮化钠是一种呼吸抑制剂，目的是维持细胞在染色过程中生理状态不发生太大改变。鉴于叠氮化钠是个剧毒物，省掉它对大部分抗原来说影响也不大，所以通常情况下不用也可以。但是，本着严谨科学的态度，你一定要知道这个东东在这里是干什么用的。

处理好之后就需要上机检测了，接下来会教大家如何设门分析自己的样品，如何使用流式细胞术中引用率最高的软件 flowjo 分析自己的数据，敬请期待！

经验 | 读懂流式细胞术，走向实验巅峰

作者：罗小黑

流式细胞术，顾名思义，是研究细胞的一种技术，但是它的研究对象绝对不仅仅局限于真核细胞，还可以研究细菌、病毒以及各种蛋白等等。无论你是基础科研工作者还是临床医生，你都得上这项技术。



自 1974 年 BD 公司和斯坦福大学联合研制出世界上第一台商用流式细胞仪以来，作为集 N 个学科的智慧于一身，将计算机技术、电子工程、数学、光学、流体力学和有机化学等学科巧妙融合起来而诞生的这台仪器—流式细胞仪在免疫学、细胞生物学、发育生物学、细胞动力学、生理学、分子生物学等生物学和医学研究的各个领域得到了广泛的应用。

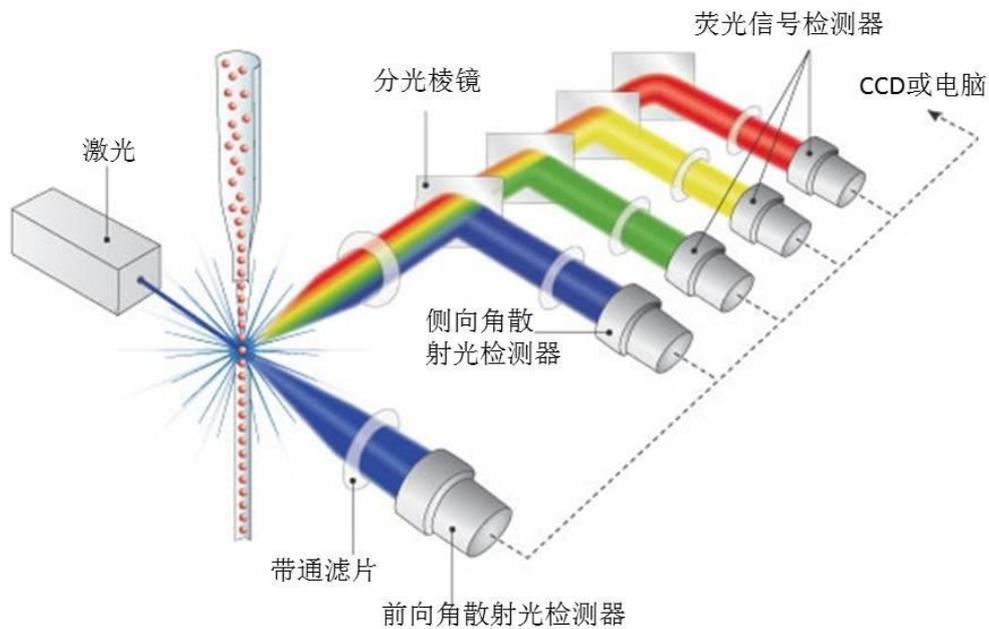
这一技术不仅仅为科研、临床及教学等不同领域的研究工作提供了强有力的工具，而且为医疗和农牧业生产等应用领域提供了及其重要的支持。接下来我带大家一起来学习一下，流式细胞术是个什么东东？它能做什么？以及，怎么做？

首先我们来瞻仰一下老祖宗们通过思想火花的碰撞以及孜孜以求互相借鉴最后化茧成蝶孕育了流式细胞仪的艰难历程：

时间	关键人物	事件
1940年	哈佛大学医学院的Albert Coons	发展了在抗体上交联荧光标记物的技术，荧光标记的抗体技术获得了广泛的应用；
1949年	电气工程师Wallace Coulter	发明了血细胞计数仪，用于记录细胞数量，能快速自动计数白细胞和红细胞，这个仪器很快成为了医院血液实验室的必备仪器，同时于1953年申请了美国专利；
1964年	洛斯阿拉莫斯国家实验室物理学家Mack Fulwyler	结合了Counter的方法学与喷墨技术，进一步发展了流式细胞术。在喷墨技术中，通过喷嘴的快速振动，可以使液流断开形成均匀的、单一的液滴，这样就可以在适当的时间给特定的液滴充电并收集它；
1967年	IBM沃森研究中心的工程师Louis A. Kamensky等	设计了分选仪器，它能给注射器提供电刺激，从液流中拉出感兴趣的目标细胞，并将这些细胞收集起来进行分析；（这便是流式分选的雏形）
1969年	洛斯阿拉莫斯国家实验室的Van Dilla及其同事们	报道了第一台荧光检测的流式细胞仪，该仪器用了Kamensky设计的照射系统和电子检测系统以及Fulwyler分选仪的快速流动和振动的液流系统，这样仪器就有了液流系统、检测系统，并使用了氩离子激光作为

从此流式细胞术的发展就狂奔在了康庄大道上，应用可谓遍地开花。

接下来，我们来一起学习一下流式细胞仪的工作原理：在一定的压力下，鞘液带着细胞或者微粒通过喷嘴中心进入到流式照射室，在流式照射室的分析点，激光照射细胞并发生散射和折射，发射出散射光，同时被荧光标记的颗粒发射出荧光。散射光和荧光分别被不同的检测器接收，通过光电倍增管将检测到的荧光信号转换成电信号，这些电信号放大后再经过数字化处理输入电脑，供我们进行分析。原理如下，一图读懂流式细胞仪：



了解了流式细胞仪的原理，最最重要的是，对不同专业不同背景的我们来说，流式细胞术，到底能干什么呢？

第一、流式细胞术可以用来检测细胞表面以及胞内的各种标志，对细胞进行分群鉴定以及各种蛋白表达量高低的比较。比如 CD3 是 T 细胞的标志、CD19 是 B 细胞的标志、EpCAM 是上皮细胞的标志等。不仅仅是免疫细胞，其他的如肿瘤细胞、成纤维细胞、干细胞等都可以用流式细胞术进行检测。实体组织只要经过处理后制成单细胞悬液也能用流式细胞术进行分析和分选。如果你是一名临床医生，想比较不同治疗方式的患者预后跟治疗方案有什么关系，想通过外周血进行分析的话，流式细胞术可以派上大用场，比如可检测不同治疗方案的患者其外周免疫格局发生了什么变化。

第二、通过标记 Ki67、BCL-2、caspases 等增殖及凋亡相关基因，流式细胞术可用来检测细胞的增殖以及凋亡。此外还有 CFSE、以及 PI-annexin V 等染料，可用来进行增殖和凋亡分析，在药物对肿瘤影响的研究过程中应用广泛。

第三、流式细胞术可用来分析细胞周期。细胞核 DNA 含量随着细胞增殖周期时相的不同而发生变化，用 DNA 染料进行染色，DNA 含量多，荧光信号强，DNA 含量少，荧光强度低。通过对细胞瞬间的快速测定，判断细胞所处的细胞周期时相，并分析群体细胞中处于不同周期时相的细胞比例，以研究细胞的周期，DNA 复制和染色体倍性等。在肿瘤学研究中尤其常用，可以此来判断药物对肿瘤细胞影响、肿瘤的生长速度与患者预后等。

第四、流式细胞术可用于疾病诊断中病原微生物的检测，以及环境中饮用水、湖泊、河流、原油中的微生物和海洋微生物检测等。

第五、流式细胞术还可用于农林畜牧养殖业，如依据 DNA 含量，用于玉米、向日葵、葡萄等的倍性鉴定，分选 X、Y 精子以控制家畜性别。

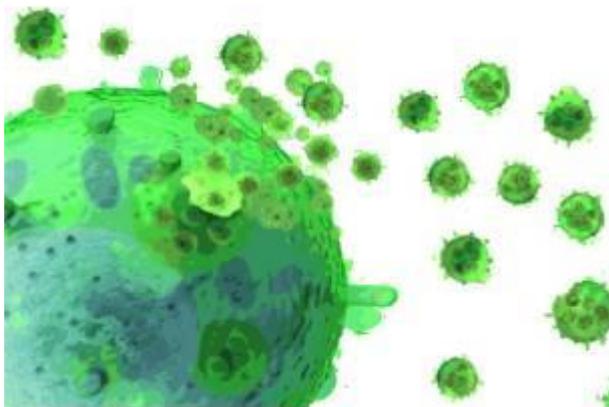
除了以上最常用的几个方面，还有很多其他的高逼格用法。如流式微球阵列 (cytometric bead

array) 检测可溶性蛋白, 也称 CBA 法, 通过不同的 CBA 试剂盒, 将捕获微球包被上不同的抗体, 对可溶性蛋白进行检测, 类似于今天的 luminex 法, 对于稀有样本的检测具有很大的优势。与 luminex 不同的是, 它不需要额外购买检测仪器, 只要有流式细胞仪就可以进行检测。小伙伴们根据自己的需要对这一高大上的技术进一步探索吧!

姿势 | 量化成像流式细胞分析技术的两大超越和三大功能

作者: 燕子

最近几年, 一种叫做 Exosome (外泌体) 的小囊泡正受到大家的广泛关注。Exosome 是直径约为 30-100nm, 密度在 1.13-1.21g/ml 的小囊泡。Exosome 天然存在于体液中, 包括血液、唾液、尿液和母乳, 是活细胞分泌的来源于晚期核内体(也称为多囊泡体)的膜性囊泡。最早在 1987 年发现于体外的绵羊红细胞上清液中。随着研究深入, 人们发现 Exosomes 是细胞间进行物质交换、信息交流的重要载体, 可携带包括蛋白质、mRNA、miRNA 在内的多种物质, 参与细胞迁移、细胞通讯、血管新生、肿瘤细胞生长和肿瘤细胞免疫等过程。因此外泌体有望成为疾病风险预估或者临床诊断的工具。

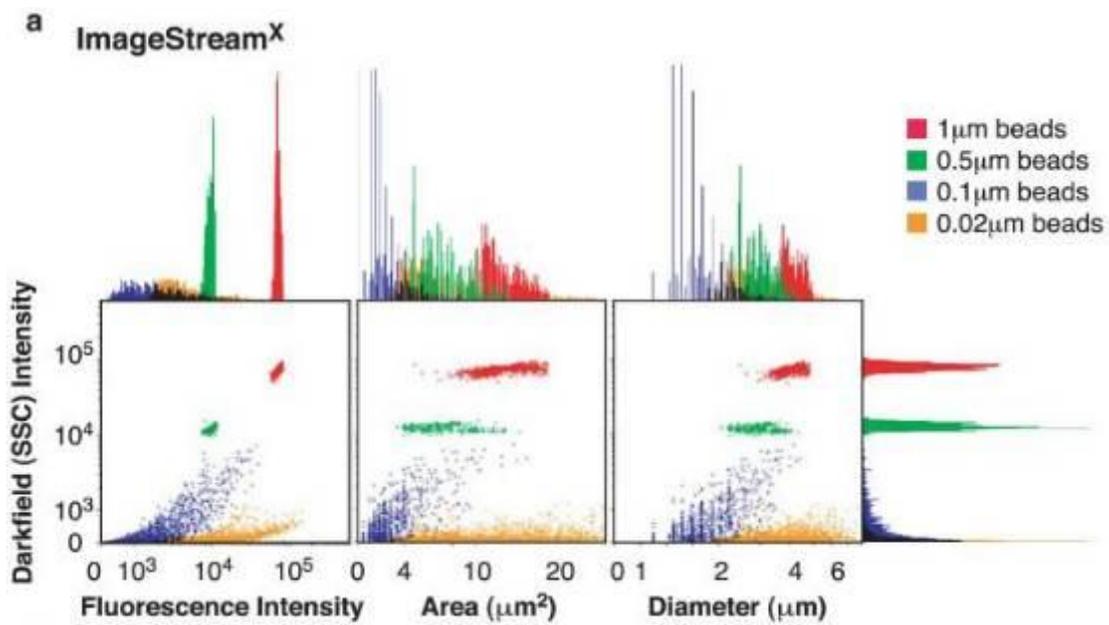


由于产生外泌体的样本复杂多样，迫切的需要开发一种精确定量检测样本中外泌体的技术，用以研究外泌体功能，以及细胞与外泌体的相互作用，传统流式细胞技术（包含颗粒技术）能拍摄到细胞分泌和吞噬外泌体，但对吞噬过程进行量化分析无法客观定量外泌体。于是现代量化成像流式细胞分析技术应运而生，很好地解决了上述问题。量化成像流式细胞技术因其**灵敏度高、高通量、检测样本量低，并且适合检测全血、血浆、白细胞上清液等复杂样本**，成为定量检测外泌体释放的最佳研究工具。

大数据：呈现细胞和小颗粒物的细节。能过同时采集 **12 个通道（明场、暗场和 10 个荧光通道）** 中的细胞和颗粒物图像，可以采集到液流中快速移动的细胞和小颗粒物的清晰图像。

大软件：对海量数据进行快速分析的统计学功能。每个检测通道都有 **100 余种** 量化参数，如面积、直径、长度、厚度、细胞短轴与长轴比值、荧光强度等等，这些参数可以提供传统流式和显微成像设备都不具备的量化统计学功能，获得全新的细胞或颗粒物量化统计学数据，并设置为向导式模块化操作。

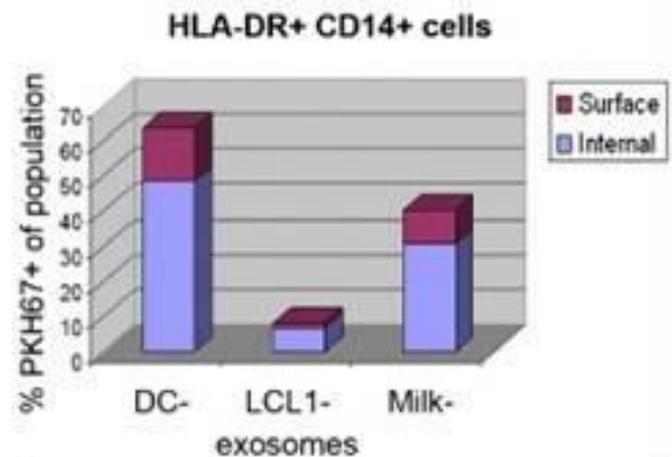
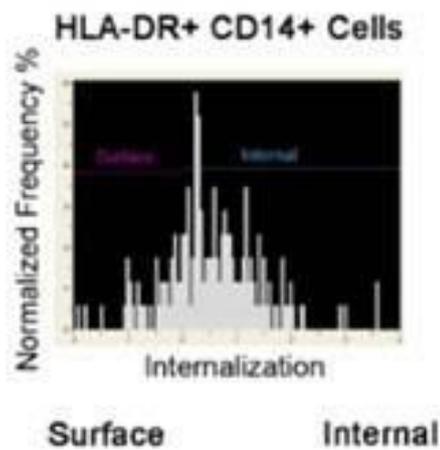
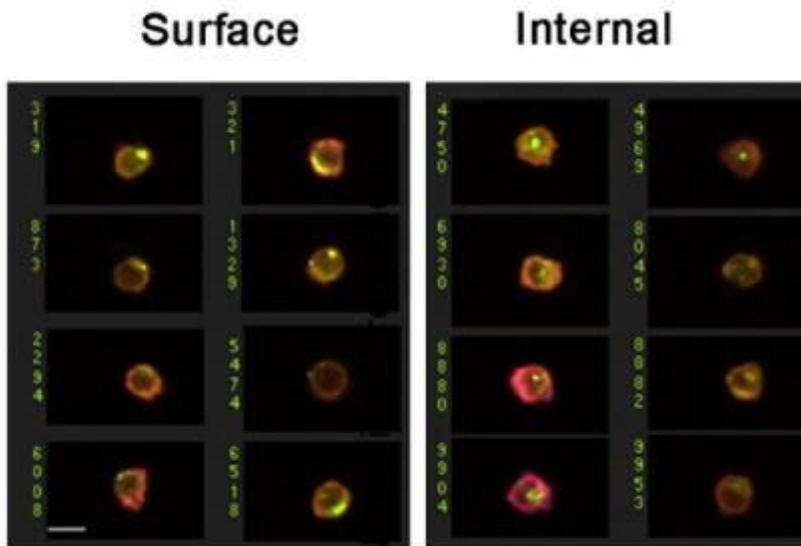
利用 Amnis 成像流式细胞分析仪（下同 Amnis）检测到了直径 20nm 微珠的荧光信号，并拍摄到了直径为 100nm 的微珠图像。这个结果证明了 Amnis 的灵敏度和图像分辨率足够检测直径范围在 30-100nm 的外泌体。



功能 1: 定量外泌体与肿瘤细胞、免疫细胞的相互作用

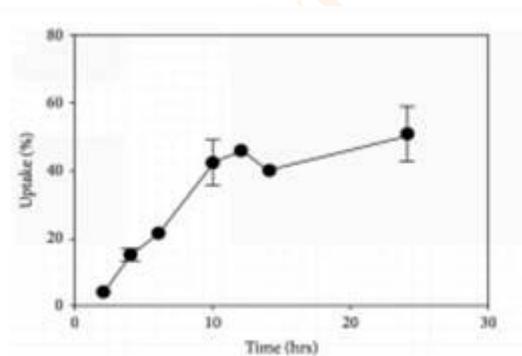
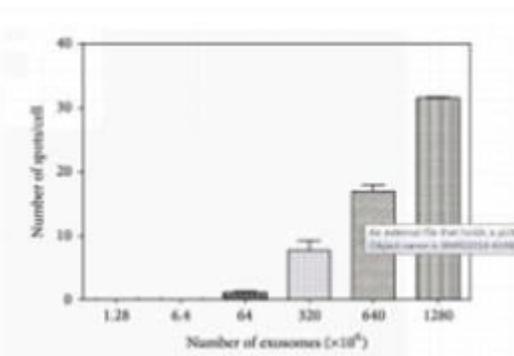
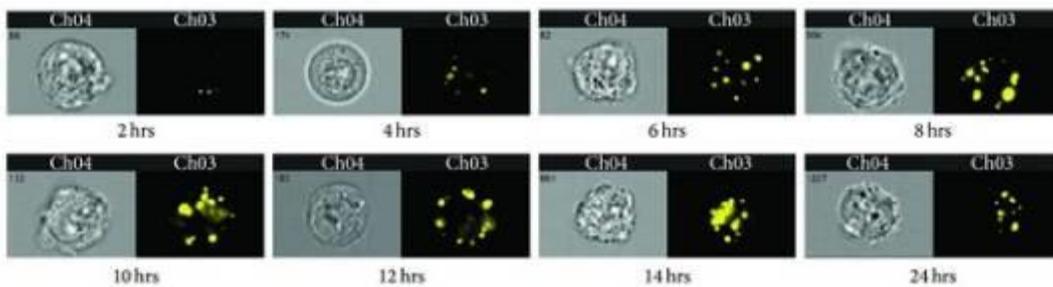
Sarah E. Headland 等利用 Amnis 对来源不同的外泌体是否可以选择性地被人类外周血中不同的免疫细胞吞噬进行了研究。他们分别富集了来源于 DC 细胞、LCL1 细胞以及人奶中的外泌体，并把这些不同来源的外泌体用 PKH67 标记后，与人外周血单个核细胞一起孵育。内吞参数 (Internalization) 主要用来测量细胞内与细胞外的荧光比值，内吞参数值越大，代表细胞吞噬了更多的颗粒物。

结果如下图所示，绿色标记的外泌体主要被 HLA-DR+CD14+ 单核细胞吞噬，通过统计分析不同来源的外泌体被单核细胞吞噬的情况，发现 DC 细胞和人奶来源的外泌体更容易被单核细胞吞噬。

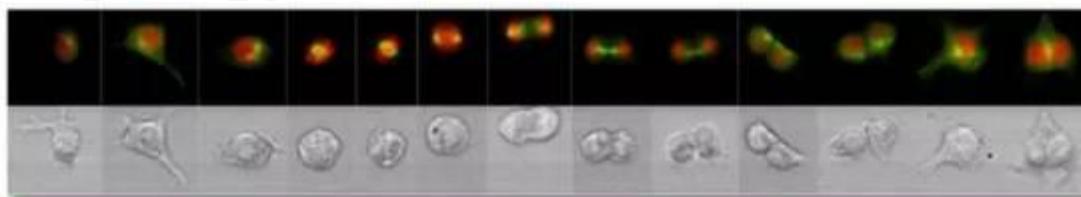


功能 2：研究肿瘤细胞对外泌体的吞噬功能

Carrie A. Franzen 利用 Amnis 检测了膀胱癌细胞对外泌体的内吞，证明了内吞作用是随着外泌体数量增加和时间延长而增多，内吞作用受到肝素钠的阻断。图中黄色的点状结构是 PKH26 标记的外泌体，计点 (spot count) 模块可以自动统计特定区域内的点状荧光信号的数量。外泌体有望成为膀胱癌早期检测与风险分级的标志物。



功能 3: 可研究细胞形态功能等方面的变化



时期	G0/G1期	S期	G2/M期	前期	中期	后期	末期	凋亡
细胞比例 (%)	48.1	25.2	15.1	0.4	0.5	0.05	0.04	0.5

由于 Amnis 的分析软件具有细胞凋亡、细胞周期、细胞形变、蛋白转位、共定位等智能模块,

有利于进一步探索外泌体的作用机理和功能。以细胞周期为例，Amnis 在研究细胞周期变化时，不仅可以提供 G0/G1 期、S 期和 G2/M 期细胞的百分比，还可以通过遗传物质在细胞核内形态的变化，根据细胞核面积以及最大荧光强度等特殊的量化参数，分析 M 期前期、中期、后期及末期等几个亚期。当分析细胞健康状态时，通过细胞核大小和形态的变化，区分凋亡细胞和坏死细胞。通过蛋白转位模块研究 NFκB 等蛋白从细胞胞浆到细胞核内的转运情况，Amnis 作为 western blot 更好的替代方案帮助科学家研究外泌体与细胞信号传导之间的关系。

参考文献:

[1] Sarah E. Headland, et al. Cutting-Edge Analysis of Extracellular Microparticles using ImageStreamX Imaging Flow Cytometry. Scientific Reports. | 4 : 5237 | DOI: 10.1038/srep05237(2015)

[2] Carrie A. Franzen, et al. Characterization of Uptake and Internalization of Exosomes by Bladder Cancer Cells. Research Article .Volume 2014, Article ID 619829, 11 pages

[3] Helen Vallhov, et al. Exosomes Containing Glycoprotein 350 Released by EBV-Transformed B Cells Selectively Target B Cells through CD21 and Block EBV Infection In Vitro. The Journal of Immunology. 2011; 186:73-82

技术 | 五颜六色的天外流星：流式细胞术

作者：毛博

自上世纪 70 年代问世以来，流式细胞术（FCM）在基础科研和临床诊断和治疗上得到了越来越广泛的应用。但是，做 FCM 往往会遇到荧光信号太弱的情况。好不容易搞了一管细胞去做流式，却做不出荧光信号。真的是急死个人。其实，毛博也是到米国做博士猴以后才开始做流式的。时间不算长。但是做得非常非常多。每天都要做好几次。什么五花八门的细胞和抗体都做过；什么匪夷所思的情况都碰到过。下面，毛博根据在米国做流式的经验教训，总结出了**导致 FCM 荧光信号太弱的五个大坑**，以及避免掉坑里的一些独门秘籍，都是血泪总结哟。

1. 荧光淬灭

如果抗体孵育时间太长，而又迟迟没有去做流式，荧光是会逐渐淬灭的。例如，直接染色法孵育时间是半个小时，而你 12 个小时后才去做流式，结果能好吗？解决办法只有一个，就是**严格按照孵育时间，时间一到就去做，不能偷懒**。那么，机器正好被人占了怎么办？毛博自己的经验是，把试管放在冰里面，可以稍稍延长淬灭的时间。毛博当年的实验室离流式细胞机房十万八千里，每次都是抱着冰桶屁颠屁颠跑过去的。生怕荧光淬灭！



2. 染色顺序

在进行多荧光染色的时候，由于不同抗体分子和荧光染料特性不同，以及相应的抗原分子在细胞表面的分布不同，其染色顺序可能影响细胞的染色结果和细胞活性。即相同的细胞，由于染色顺序的原因，可能导致荧光强度的差异。解决办法为：**预实验**。做一系列的样本，包括染色前样本，各种抗体和染料的不同染色顺序的样本，通过对染色前和染色后各种样本进行比较分析，判断染色顺序对细胞造成的影响，从中挑选出合适的染色方案。

3. 染色方案

很多时候，荧光染色信号太弱，是由于染色方案不合理造成的。解决的方案同上：**预实验**。在正式开始实验之前，通过预实验，设计出一个完美的染色方案。要考虑使用什么试剂，试剂质量，试剂用量，孵育时间以及洗涤次数等等多方面的因素。染料的浓度，染色时间，染色温度要求都很严格，不同物种，不同组织的细胞染色时间也略有不同。最终目的是使所设计的方案背景荧光尽量小，特异性染色荧光尽量强。

4. 激发光

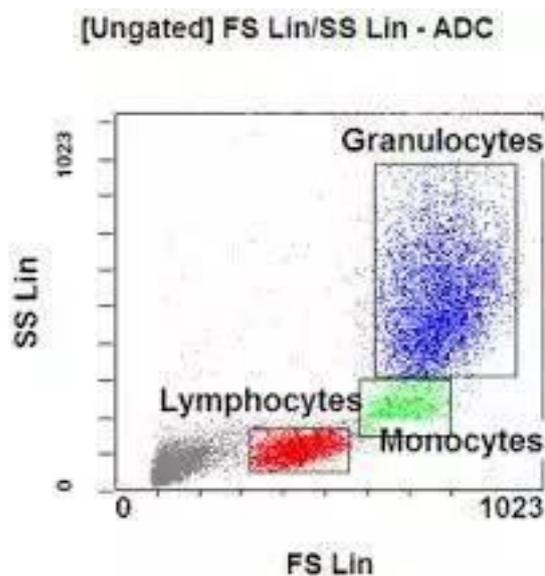
不同的抗原，其激发光的波长是不一样的。如果选择了不合适的波长，也会造成荧光信号太弱的问题。解决方案很简单：**就是严格按照抗原选择合适的波长**。不要想当然地瞎选。下面是一个例子：

激光波长/nm	荧光素	抗原
405	Cascade Blue	CD45RA
	Cascade Yellow	CD3
488	FITC	CD28
	PE	CD49f
	PE-Cy5	CD11a
	PE-Cy5.5	CD27
	PE-Cy7	CD4
595	Alexa	CD62L
	APC	CD45RO
	APC-Cy5.5	CD8
	APC-Cy7	CD57

5. 样本的背景信号过高

有时候细胞悬液里面有很多的细胞碎片和死细胞，造成样本的背景信号很高，掩盖了我们真正需要的荧光信号。为了更加灵敏地检测细胞，就需要在散射光 FSC 设定合适的阈值，低于 FSC 阈值的信号不被检测，高于 FSC 阈值的信号才能被检测，其目的是去除大量的背景信号。通过设定合适的阈值就可以有效地排除死细胞和碎片的干扰，剩下的主要是白细胞的信号，从中可以初步看出存在不同的亚群。

下图是一个红细胞裂解得很好的血液样本，设定合适的阈值排除了所有的背景信号，余下的全部是白细胞的信号：



图中可以很清晰地分辨出白细胞的不同亚群，分选这三个不同亚群的细胞，在显微镜下观察确认这群细胞：FSC 和 SSC 均较小的一群细胞，染成红色的，是淋巴细胞；FSC 和 SSC 均较大的一群细胞，染成蓝色的，是中性粒细胞；FSC 和 SSC 适中，染成绿色的是单核细胞。而最下面那些灰色的，就是被排除了的细胞碎片和死细胞。

其实，做 FCM 还是挺好玩的。现在已经可以同时做 **13 种** 颜色了。毛博在米国的时候，最多做过同时分析 **4 种** 颜色的。看着显示屏上面五颜六色的细胞，特别是得出自己理想的结果的时候，还是挺有成就感的。以上毛博介绍了自己做 FCM 的一些体会心得，希望对大家有所帮助。

干货 | Flowjo 教你把流式数据一网打尽！

作者：子非鱼

Flowjo 是目前最受欢迎的流式数据分析软件，因为它简单易用并且十分有效。则本文将其基本操作以及对细胞凋亡和细胞周期的 Protocol 分享给大家。

1.打开 Flowjo 软件

双击桌面 FlowJo 软件图标，进入软件工作台。



软件工作台由菜单栏、常用工具栏、组空间和样本空间组成。



2.Flowjo 分析单标样本

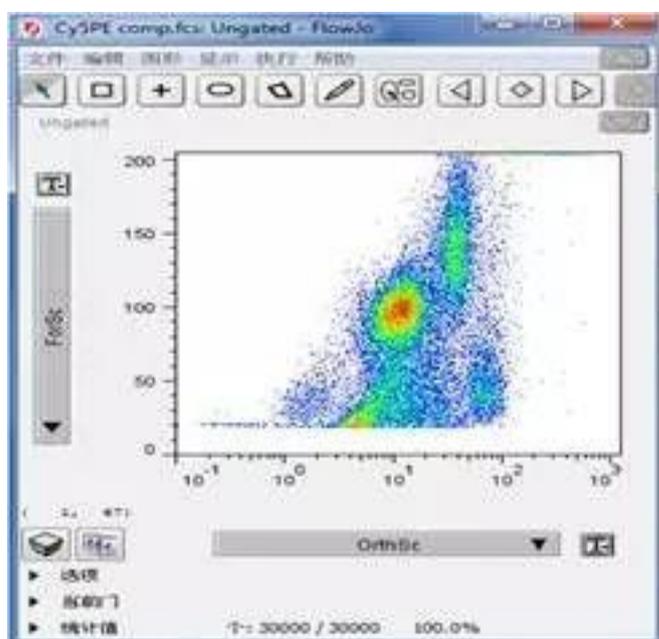
单标记样本数据常用的显示方式是单参数直方图。通常横坐标可以是线性标度或对数标度，代表着所检测的荧光或散射光的强度；纵坐标表示的是横坐标某一特定荧光强度的细胞数，有时也用相对百分比来表现。

以 3 color comp 文件夹中的 CyPE comp.fcs 进行分析演示。将此文件夹移至桌面，并把该数据文件夹从桌面拖入 Flowjo 中的组空间中。



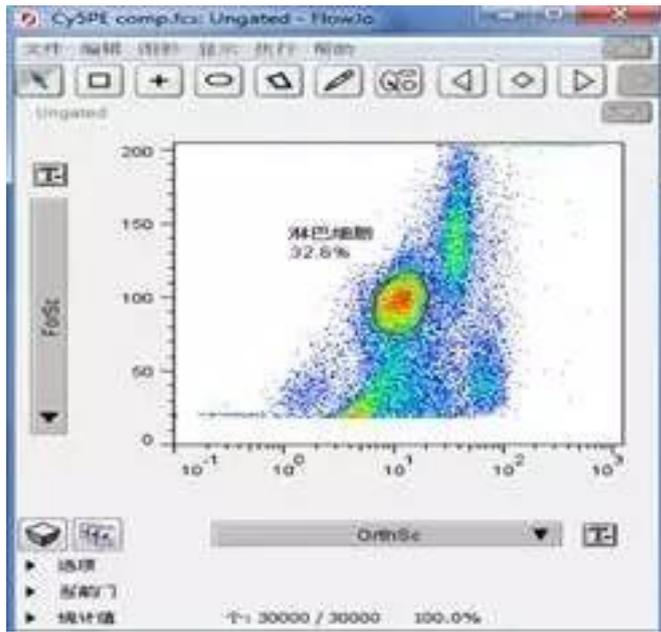
在组空间中单击选中“3 color comp”组，此时在样本空间里显示“3 color comp”组中的所有样

本。而后在样本空间中双击“Cy5PE comp.fcs”，出现图形窗口。

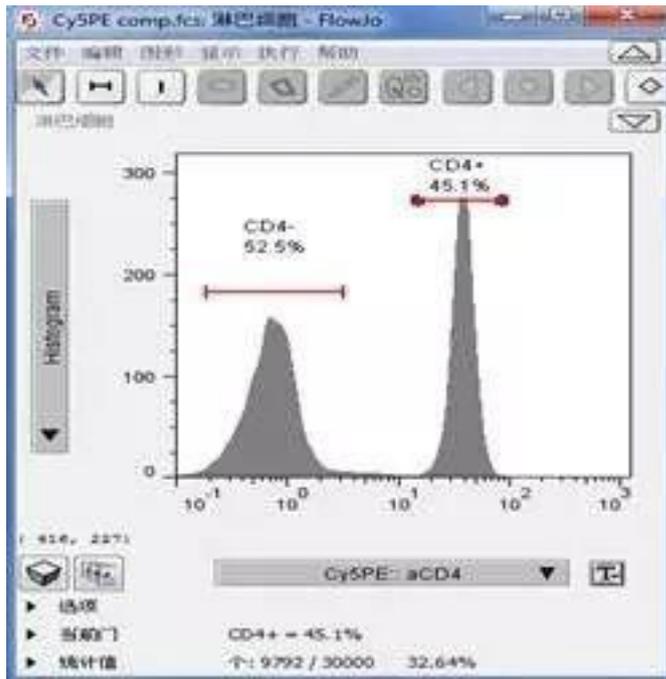


此为二维点图，X轴选择 SSC（侧向散射，细胞内颗粒结构越复杂，质量越大，SSC 越大，反之越小。）Y轴选择 FSC（前向散射，细胞越大，FSC 越大；反之越小。）

选择设门工具（矩形门 、椭圆门 、多边形门 、自动门 ）中的任意一个，在二维点图中选中淋巴细胞。



在图形窗口中双击选中的淋巴细胞，生成新的图形窗口。在 X 轴选择 Cy5PE:CD4，Y 轴选择 Histogram，选择设门工具（区域门 、双分门 ）中任意一个，在单参数直方图中设门。

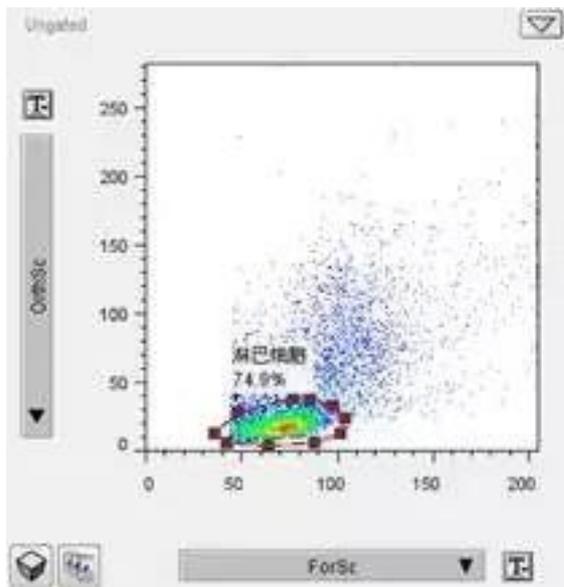


3.Flowjo 分析多色标样本

多色标记样本，包含双标记、三标记及以上的样本。横坐标和纵坐标分别代表与细胞有关的两个独立参数，平面上的每一个点表示具有相应坐标值的细胞。

以三标记样本为例，选择 3-color-experiment 文件夹中的 931115-B02-Sample01.FCS 进行分析演示。同样，在在样本空间中双击“931115-B02-Sample01.FCS”样本，出现图形窗口，显示为

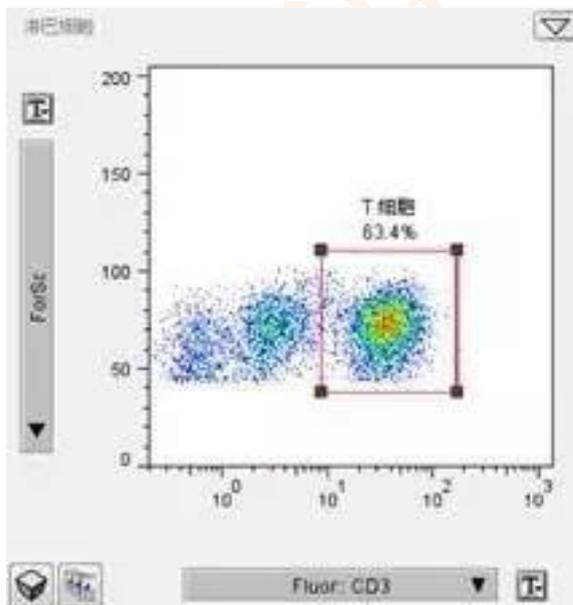
二维点图。X 轴选择 FSC，Y 轴选择 SSC。然后选择多边形设门工具 ，在二维点图中选中淋巴细胞。



双击淋巴细胞门，出现图形窗口，X 轴选择 Fluor::CD3，Y 轴选择 FSC。使用矩形设门工具



选中 CD3 阳性细胞，设门并命名为 T 细胞。



双击 T 细胞门，出现图形窗口，在 X 轴选择 Cy5PE::CD4，Y 轴选择 PhyEry::CD8，使用十字门

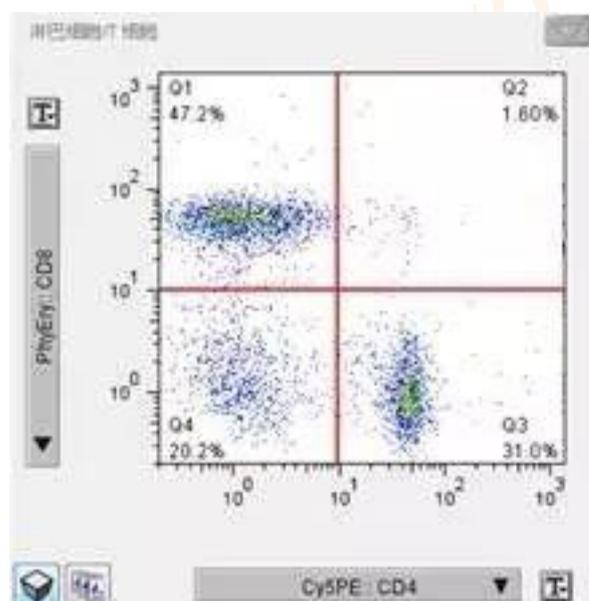
工具  设门（拖动鼠标将四分门移到目标位置即可，一般根据细胞分群的趋势，四分门的界定线可设在阴性、阳性细胞的分群处），如下图所示：

Q1: CD8 单阳性细胞，为 CD8+ T 细胞

Q2: 双阳性细胞

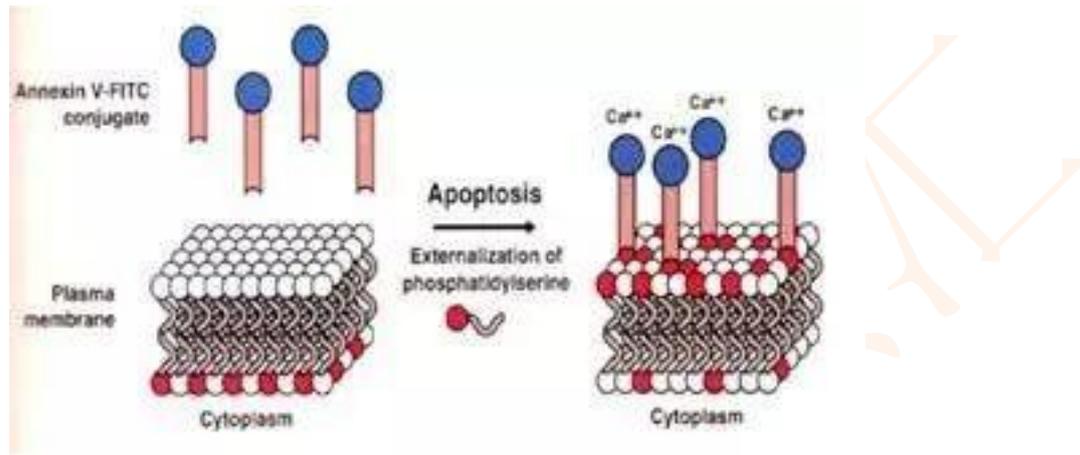
Q3: CD4 单阳性细胞，为 CD4+ T 细胞

Q4: 双阴性细胞

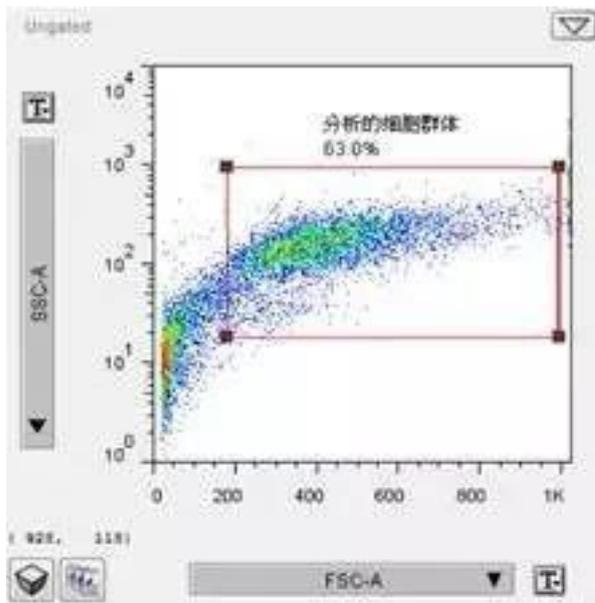


4.Flowjo 检测细胞凋亡

细胞凋亡又称细胞程序性死亡，有别于细胞坏死。细胞凋亡是指在生理病理情况下机体为维护内环境的稳定，通过基因调控及酶的参与下，使一些衰老细胞高度有序的自动死亡过程。Annexin V-FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡是实验室常用的一种方法。通常 Annexin 单阳性的细胞的话，就是凋亡早期细胞，如果 Annexin, PI 双阳性的话，即是坏死细胞。



将凋亡样本拖入 Flowjo，双击原始数据打开图形窗口。X 轴选择 FSC-A，Y 轴选择 SSC-A。分析凋亡的细胞选择上图所示的细胞群体进行分析。细胞碎片不予分析。



在 SSC/FSC 图中双击“分析的细胞群体”，X 轴选择 FITC,用来表示 AnnexinV-FITC。Y 轴选择 PE-Texas,用来表示 PI。用四分门设门工具界定活细胞和凋亡细胞。如下图所示：

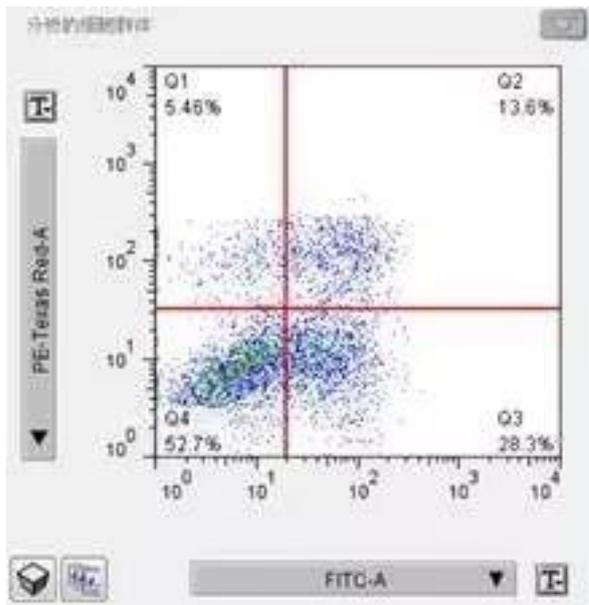
Q1: (AnnexinV-FITC)-/PI+, 此区域的细胞为坏死细胞。也可能有少数的晚期凋亡细胞在其中，甚至机械损伤的细胞也包含其中。

Q2: (AnnexinV+FITC)+/PI+, 此区域的细胞为晚期凋亡细胞。

Q3: (AnnexinV-FITC)+/PI-, 此区域的细胞为早期凋亡细胞。

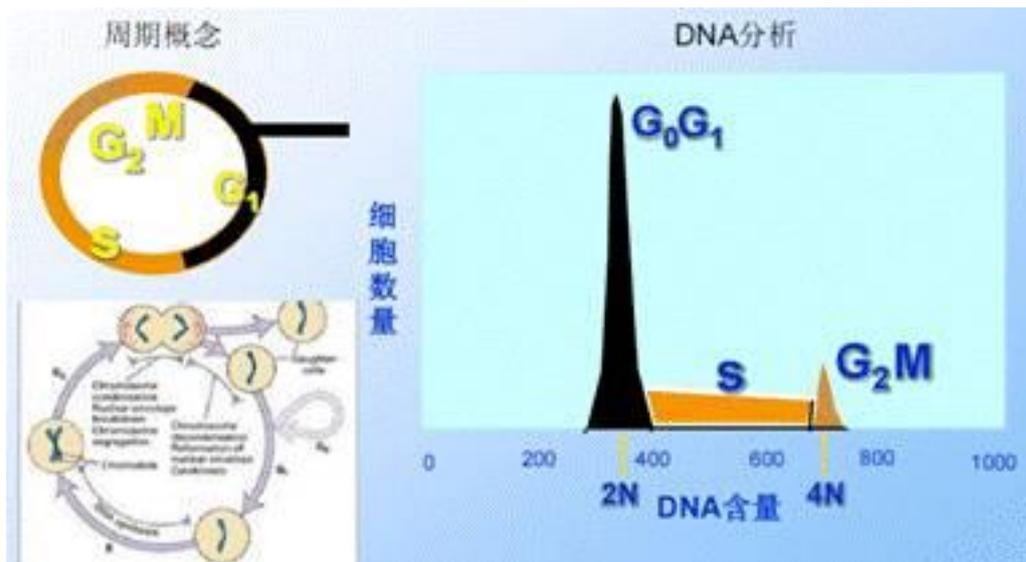
Q4: (AnnexinV-FITC)-/PI-, 此区域的细胞为活细胞。

通常统计细胞凋亡率时采用 Q2+Q3，晚期凋亡+早期凋亡群（即所有 AnnexinV 阳性群）。



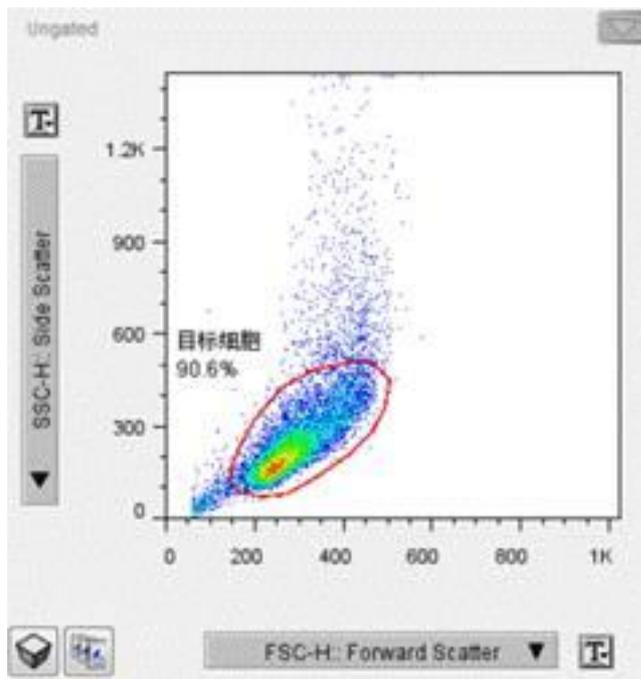
5.Flowjo 检测细胞周期

细胞周期的检测是流式细胞仪最为广泛的应用之一。细胞周期是指以有丝分裂方式增殖的细胞从亲代分裂结束到子细胞分裂结束所经历的过程。通常由 G1 期、S 期、G2 期和 M 期组成。细胞在 G1 期完成必要的生长和物质准备，在 S 期完成染色体 DNA 的复制，在 G2 期进行必要的检查和修复，以保证 DNA 复制的准确性。在 M 期完成遗传到子细胞中的均等分配，使细胞进行分裂。

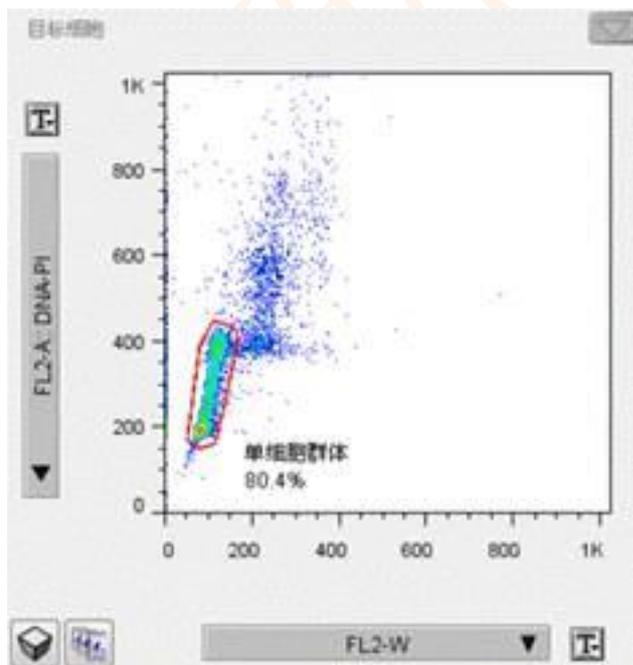


细胞周期检测中 PI 最为常用。PI 为插入性核酸荧光染料，能选择性的嵌入核酸 DNA 和 RNA 双链螺旋的碱基之间与之结合，其结合的量与 DNA 的含量成正比例关系，用流式细胞仪进行分析，就可以得到细胞周期各个阶段的 DNA 分布状态，从而计算出各个期的百分含量。

以 cell cycle 文件夹中的 5206.001，PI 标记为例，设门选取目标细胞群体，将细胞碎片排除在外。即双击工作台中的 5206.001 样本，打开图形窗口。X 轴选择 FSC-H，Y 轴选择 SSC-H，细胞碎片位于左下角的位置，设门选中目标细胞，如下图：

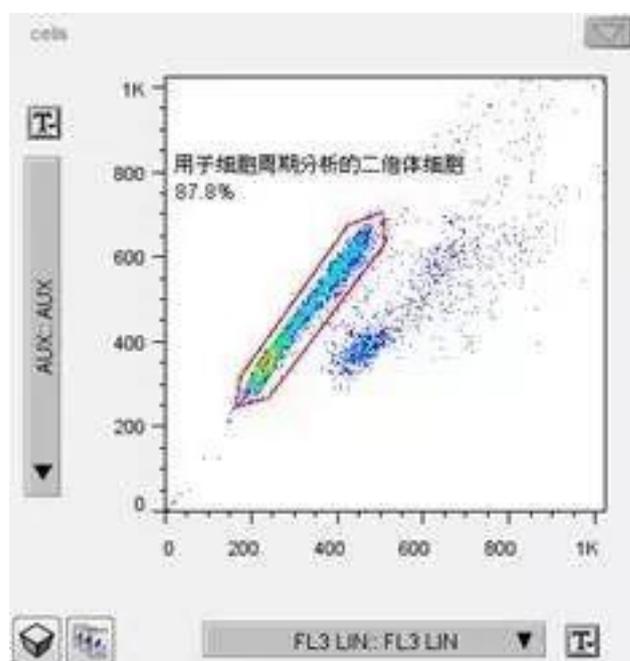


设门选中要进行细胞周期分析的单细胞群体，排除粘连细胞（粘连在一起的双细胞或多细胞团块等）的影响。X轴选择 FL2-W(width)，Y轴选择 FL2-A(area)，设门方式如下图：

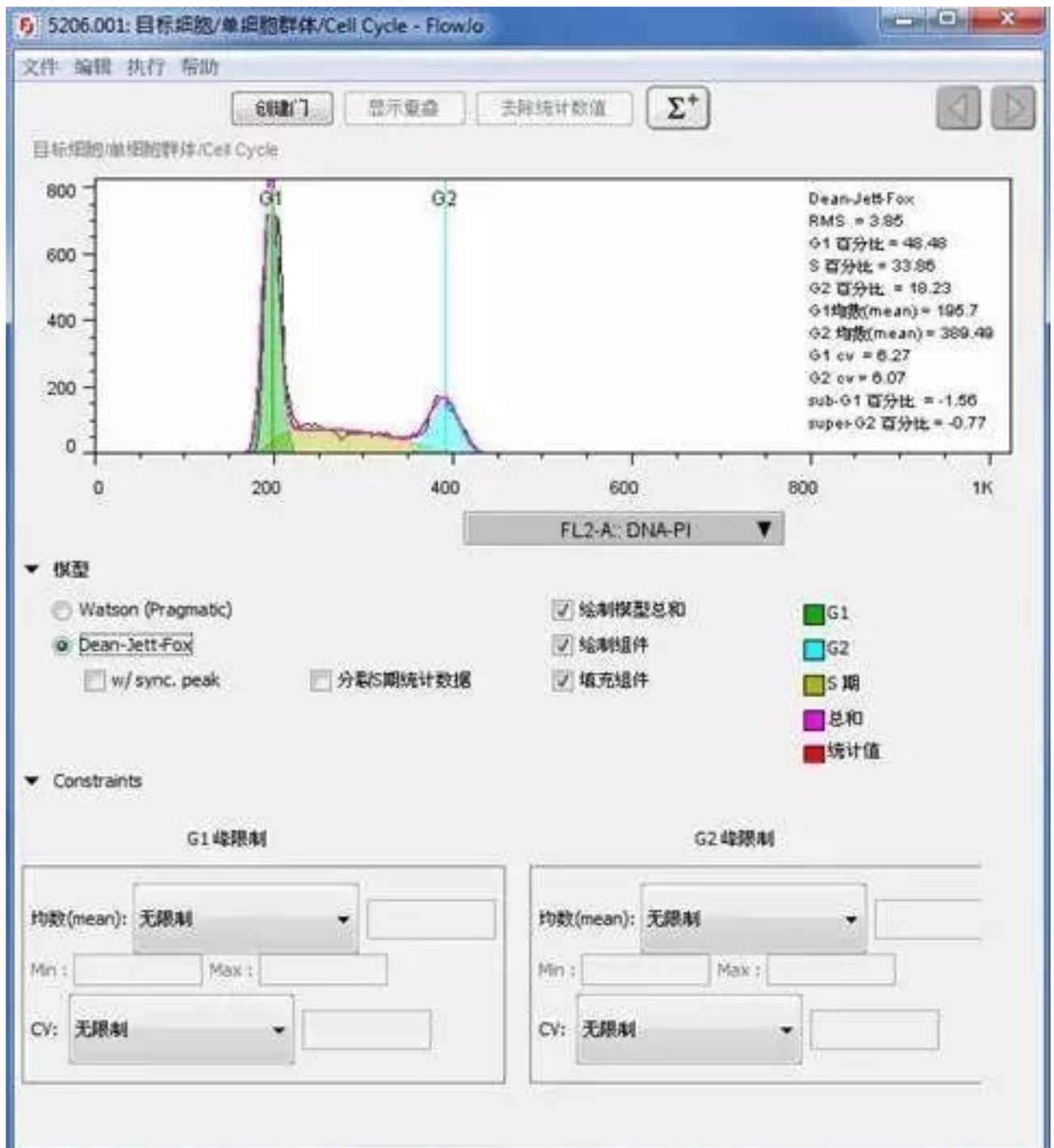


BD 的流式仪采集的数据：在进行周期分析的时候，通常是采用 FL2-A 与 FL2-W（或者 FL2-A 与 FL2H）进行设门。

Beckman 的流式仪采集的数据：X 轴选择 FL3-LIN,用来表示 PI 的线性信号。Y 轴选择 FL3-PEAK,用来表示 PI 的峰值信号。设门方式如下图：



在 FlowJo 工作台选中“单细胞群体”这个节点，在菜单栏的“工具”中选择“细胞周期”，打开周期分析窗口。得到 G1 期、S 期、G2 期细胞百分比，G1 期 CV 值和 G2 期 CV 值等数据。



图中粉色的曲线是周期拟合的模型曲线，黑色的为样本曲线。理想状况是粉色和黑色曲线吻合一致为最佳。拟合的好坏可以根据右边的 RMS 值来判断。RMS(root mean square error)值越小越好，当周期拟合的不好时，可以通过更换拟合模型（Watson 和 Dean-Jett-Fox）或

者更改限制条件确保（G1 是 G2 的两倍）进行调整。

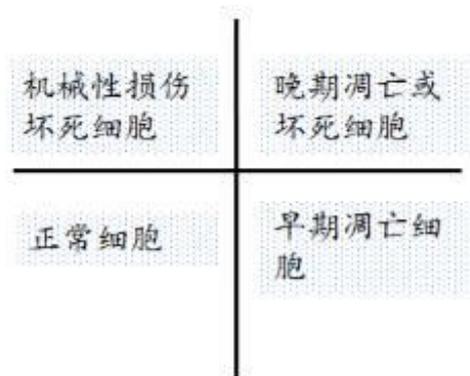
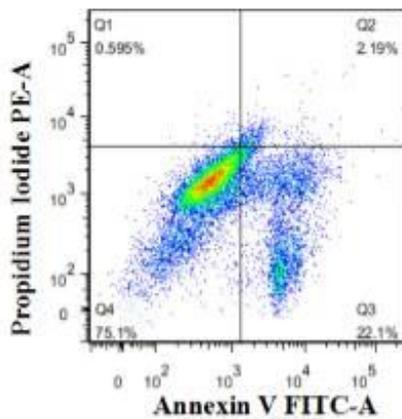
而 G1/S/G2 百分比：G1/S/G2 期细胞所占的百分比。G1/G2 均数：G1/G2 期细胞荧光强度的平均数。CV（Coefficient of Variation，变异系数）：仪器因素和样品制备及染色过程对标本的人为影响。通常 G0/G1 峰的 CV 来检测分辨率或精度。G1 cv/G2 cv：G1/G2 峰的变异系数，其大小反映了 G1/G2 峰的宽度，数值越小，峰越窄。

分享 | 为何我的流式凋亡染色术研一做到了研二？

作者：亢小玉

初次接触流式细胞术检测细胞凋亡实验还是在研一的时候，那时候不由分说按照说明书的实验步骤，第一步，第二步....结果一年过去了，应该着色的不着色，应该凋亡的不凋亡，终于经过一年的不断思考和实验操作的改进，研二有了果断的进步。现在终于有机会和大家一起分享，为什么研一的流式研二才出结果？

为了方便大家理解我先呈现了一个结果图如下，就是因为这个结果图困惑了一年，因为我的实验结果，总是会出现这样那样的非正常的现象：



现象（一）当做单阳管 Annexin-FITC 时，第四象限总是为空，没有早期凋亡的细胞，98%都是正常细胞；

现象（二）当做单阳管 PI 时，第二，三象限也总是为空，98%都是正常细胞；

现象（三）好不容易单染实验可以着色，但是在加药观察细胞凋亡的情况时，总是不尽人意，第三象限总是比第四象限细胞百分比多；

现象（四）在实际操作实验中，第二象限代表机械性损伤的细胞总比第四现象早期凋亡的百分比多；

现象（五）细胞染色不分团，做不到理想的流式结果图。

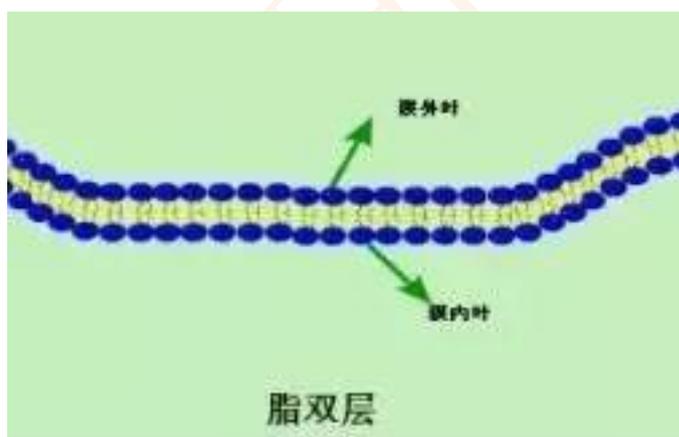
这四个象限做了一年都没有理想的结果，但是也经过这一年的时间潜心的总结和弄透了原理及方法，终于做出了客观的结果。下面我就给大家总结一下我的学习经验。希望对正在做流

式细胞术检测凋亡实验的你能够答疑解惑。

从细胞结构开始说起

真核细胞的三大重要结构为细胞膜，细胞核和细胞质。细胞的周围有一层由脂分子双层和蛋白质构成的单位膜，称之为细胞膜或质膜。质膜具有通透性，脂溶性的物质很容易通过质膜，水溶性物质包括小分子，是很难透过质膜，如果想要穿过质膜，需通过通道实现。

细胞膜上的膜脂约占膜的 50%，主要分为 3 类，磷脂，鞘脂，和固醇类。而磷脂约占膜脂的 50%，磷脂的分子结构特点。其头部基团由带负电的磷酸基团结合氮碱基构成，例如胆碱，乙醇胺，丝氨酸和肌醇等。尾部由两条长短不一的烃链构成，为非极性的疏水区如下图（1）。膜脂的分布具有不对称性如下图（2）。



图（1）

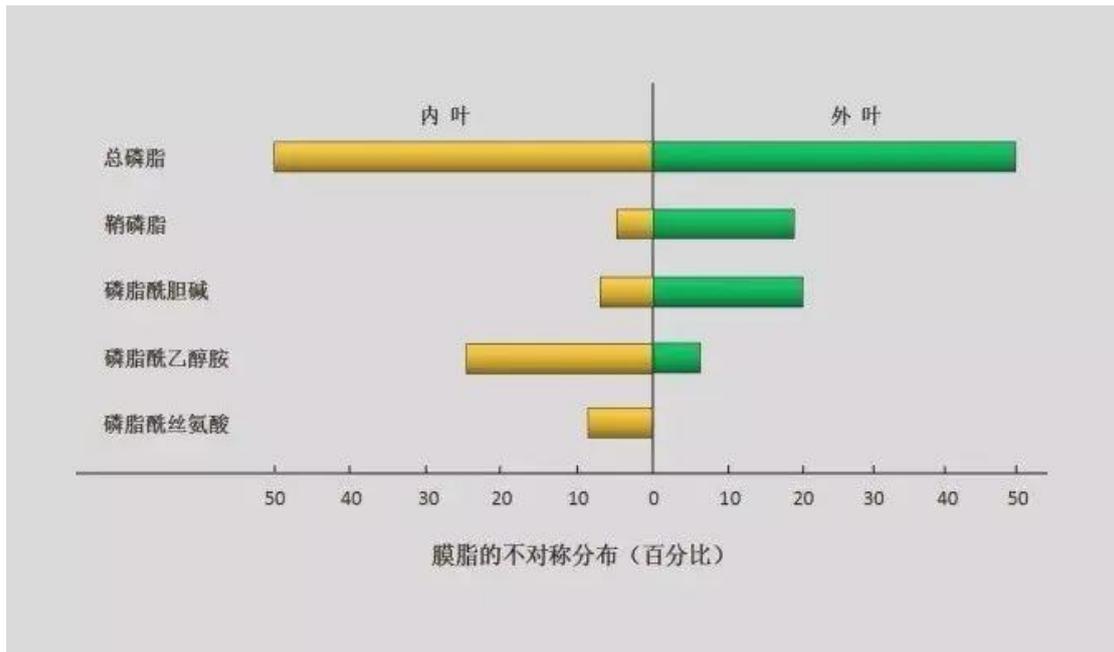
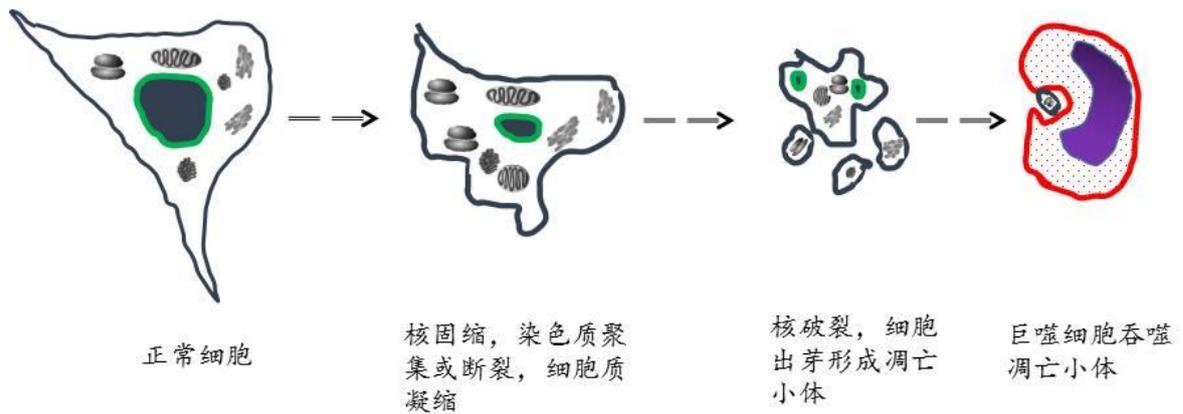


图 (2)

细胞凋亡的概念

是细胞的一种程序性死亡，首先细胞会轻微的蜷缩，染色质会聚集和断裂，并且细胞质也凝缩；继而细胞核破裂，细胞通过出芽的形式形成一个个凋亡小体，凋亡小体有细胞膜封闭，而且会被吞噬细胞吞噬，所以不会有内容物释放，故不会发生炎症如下图。



分析流氏试剂的原理

Annexin V 是一种分子量为 35~36kD 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，能与磷脂酰丝氨酸 (PS) 高亲和力特异性结合。将 Annexin V 进行荧光素 (常用 FITC、PE 或 Biotin 标记)，以标记了的 Annexin V 作为荧光探针，利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生。

碘化丙啶 (propidine iodide, PI) 是一种核酸染料，特异性是不能透过完整的细胞膜，但在凋亡中晚期的细胞和死细胞，PI 能够透过细胞膜而使细胞核染色，发红光。因此将 Annexin V 与 PI 匹配使用，就可以将凋亡早晚期的细胞以及坏死细胞区分开来。

磷脂酰丝氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 活细胞中，PS 主要存在于细胞膜的内测小叶如图(2)，当细胞接受凋亡刺激后，PS 通过依赖 ATP 主动运输机制以及在 ATP 依赖的磷脂转位酶的作用下从细胞膜的内叶翻转到细胞表面，从而暴露在细胞外环境中，因其带有磷酸基团的负电，从而被高亲和力的 Annexin V 识别并结合。

最后分析实验步骤

1.收样。将细胞浓度控制为每管为 10^6 个/ml，取 200 ul，1000 rpm×3 min。贴壁的细胞需用胰酶消化注意不含 EDTA。

2.PBS 清洗 2-3 次，1000 rpm×3 min 离心。

3.将细胞重悬于 100 ul binding buffer，分别加入 2 ul Annexin-V-FITC 和 PI，轻轻混匀，避光 37 孵育箱上放置 10 分钟。

4.转至流式检测管，每个样品临上机前加入 400 ul 左右 PBS 稀释和过滤，30 分钟内迅速检测。

经过反反复复对这四个方面进行分析研究，最后才总结出我的实验问题，如下：

第一，根据细胞膜结构和细胞凋亡的概念分析，细胞凋亡是程序性的过程，我在加药损伤等待细胞早期凋亡的时间上正好去捕捉到它的合理的百分比，是非常困难的。因此在得到合理的百分比的时间我必须做的实验是利用最简单的 DAPI 染色或者 Hoechst 染色，观察加药时间的时间点上细胞核的状态变化，准确判断细胞早期凋亡发生的时间点；

第二，根据细胞膜结构和流式试剂的原理分析，保证细胞膜的完整性，Annexin V 在早期凋亡才能染上，因为早期凋亡是染色在细胞膜上，因此可想而知，如果细胞在收样处理的时候，

细胞膜破损，那是一定染色不上去的，所以尽可能的减少细胞膜的破损，不用 EDTA 的胰酶消化和尽可能的等细胞边缘变圆有脱落的时候再用枪头吹打；

第三，根据流式试剂和流式仪器分析，细胞取样时为了避免染色不上和堵塞流式进样管，必须将细胞消化清晰不可有粘附或者成团抱在一起，可在消化以后镜下观察（必须得进行的操作）；

第四，根据流式试剂的原理分析，染色要避光，Annexin V 一般是标记上的荧光，如 FITC 携带绿光。而且染色的时候细胞内 buffer 需要充分混匀；

第五，根据流式仪器分析，上机检测之前，尽可能在显微镜下观测，细胞膜有没有着绿色，细胞核有没有着红色，直接可以观察到早期凋亡和坏死细胞，并且在有根据的情况下去上机检测；

第六，根据流式仪器分析，一般情况下需要设置组别如下表，当单阳管染色不上，补偿调剂不好的时候需要与操作流式染色的工作人员沟通，是用活细胞做单阳管染色，还是处理过的细胞做单阳管染色，并调节补偿，达到最理想的实验效果。

名称（管数）	Annexin V-FITC	PI
阴性对照（1）	—	—
单阳 1 管（1）	+	—
单阳 2 管（1）	—	+

一份流传江湖的“免疫磁珠分选”宝典

作者：中子

我还记得研究生期间刚上高级免疫那会儿，老师在七尺讲台前曾经说：“科研不简单啊，而且科研经费是个大问题！你们知道吗，就你们硕士期间每年那点（1200 大洋）科研经费，3 年才 3600，即使是博士，每年 2400 的科研经费，3 年才 7200，那点钱买个磁珠都不够！”

哎呀，My God！那时中子就在想，磁珠分选这个“高大上”的实验到底是什么鬼，未免也太贵了！！然后赶紧看了看：

MACS（磁性细胞分选技术）是一种广泛用来磁性分选多种细胞或者生物分子的技术。

- 基于抗体对抗原的特异性识别
- 磁性微珠直接或者间接偶联在抗体上，从而与细胞相连
- 在高强度、梯度磁场中达到细胞磁性分离的目的

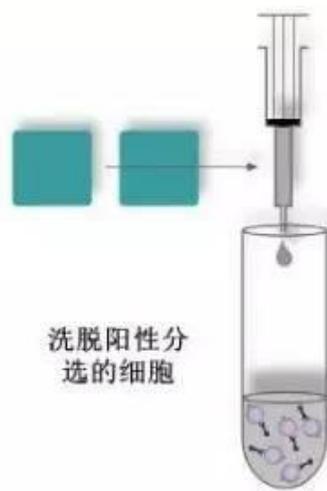
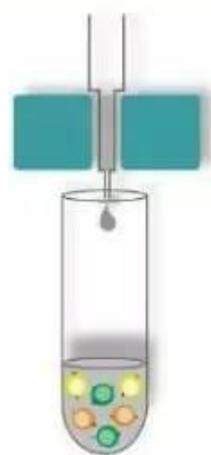
微信号: HelloLife

真是的，一遇到那些什么特异性识别、分选之类的话果然就是成本蹭蹭的往上涨了！

现在，MACS 技术已成为细胞分选的标准方法，从实验室到临床，从小规模到大规模，从常见细胞到稀有细胞和复杂的细胞亚群，从人类和小鼠细胞到其它种系的细胞，MACS 技术提供了一种可在每一个实验室进行高品质细胞分选的方法。

好在如今有大 Boss 的各种基金支持，终于不用担心经费问题了（其实，磁场、吸附柱、磁珠加在一起的价格约 1 万左右，但那时对于 3 年科研经费才 3600 元的我们确实是个大数目）。

MACS® 磁性分选



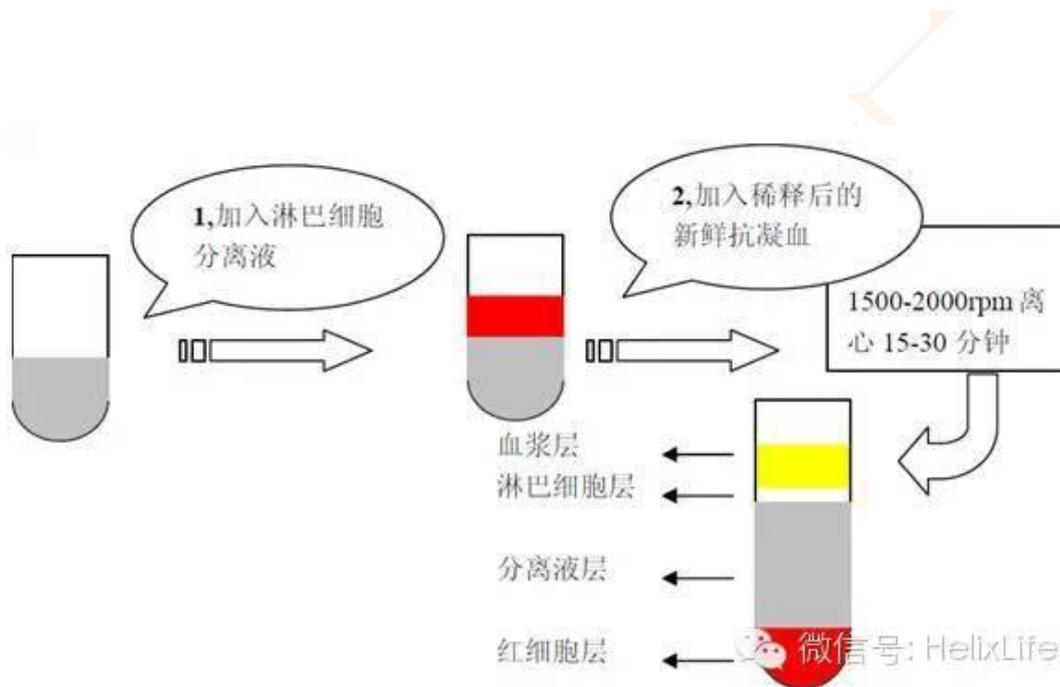
微信号: HeixLife

现在我需要做的就是静心、耐心、恒心，完成技术操作了。今天就以**血液标本**为例，跟大家分享一下**磁珠分选技术要点**：

1. Ficoll 分离单个核细胞：按照淋巴细胞分离液：血样=1:1 的比例。注：在试管中预先加入淋巴细胞分离液，小心地将血样标本沿试管壁、并贴近液面缓慢加入到倾斜的淋巴液面

上，再轻轻竖起，离心 $1800r \times 15min$ ；

2. 此时离心管中由上至下细胞分为四层。第一层为血浆层；第二层为环状乳白色淋巴细胞层；第三层为透明分离液层；第四层为红细胞层；用巴氏吸管收集第二层细胞放入新的试管中，加入约 2-3ml PBS 重悬洗涤后离心 $2000r \times 10min$ ，弃上清；



3. 将分离出的单核细胞用 90ul PBS 重悬，每 10^7 个细胞加入 10ul 磁珠抗体（如果细胞数较多，相应增加 PBS 和磁珠的量如 $180+20$ ），将细胞与免疫磁珠混匀， $4^{\circ}C$ 下孵育 15min；注：为了让磁珠与细胞表面抗原充分结合，可每隔 5min 摇晃混匀一下。

4. 孵育结束后，每 10^7 个细胞用 1ml PBS 洗涤， $1200r \times 10min$ ，弃上清；

5. 再用 PBS-Ab（配方：200ml PBS 中加入 1g 牛血清白蛋白和 0.46g EDTA）500ul 重悬细

胞，若细胞数目再多至 10 的 8 次方个，相应 PBS-Ab 量增加。

6. 将柱子放入 MACS 磁场，安装好柱子如下图，放置试管架，加入 500ul PBS-Ab 冲洗柱子；



7. 待柱子冲洗完毕后加入细胞悬液，再待柱子留空后每次加入 500ul PBS-Ab 冲洗，共三次；流出液即为阴性细胞；

8. 收集阳性细胞，将柱子小心移出磁场，放入到 1.5ml EP 管中，吸取 1ml PBS-Ab 入柱子，用附带的活塞用力迅速将细胞冲出，此为所分选出的阳性细胞。

9. 若细胞多可将其分为三管，留作 RNA、DNA、Protein 用及细胞滴片（四个比例可为 400ul、200ul、300ul、100ul），4℃下离心 2000r×2min

① 第 1 管，弃上清，加入 350ul RNA later 重悬，留作提取 RNA 用；

② 第 2 管及第 3 管，弃上清，细胞团直接-80℃冻存，留作 DNA、Protein 用。

③ 细胞滴片：若分选后细胞量较多，可行此步骤，将 100ul 分选后细胞用 400ulPBS 重悬，混匀后分别吸取 100ul 滴片共可以滴 4 张，然后晾干（无需全干），浸入到固定液（甲醇/冰醋酸=3:1）中即可，放入-20℃长期保存。

小伙伴们看完宝典快去苦练神功吧！

6.5 细胞周期增殖凋亡

MTT 结果不准确？IC50 不会算？让科研老腊肉来拯救你

作者：腊肉

细胞增殖检测已经广泛应用于分子生物学、肿瘤生物学、免疫学和大规模药物筛选等研究领域。检测方法主要分为两类：一类是直接测定进行分裂的细胞数来评价细胞增殖能力，如 Ki67、BrdU 以及 EdU 细胞增殖检测等；一类是通过测定活性细胞数目来间接反映细胞增殖能力，如 MTT、CCK-8 等。

在上述检测方法中，MTT 法风靡各大实验室，一度成为科研老腊肉和小鲜肉的一项必备的实验技能。虽然 MTT 法由来已久且流传甚广，但是对于初次接触 MTT 的科研小白来说，要想在短时间内将 MTT 法练就“稳（重复性好）、准（准确性高）、狠（操作速度快）”也是一个

不小的挑战。

任性娇柔的细胞以及操作细节的忽视很容易就把你拉进“大幺蛾子没有，小幺蛾子不断”的悲催循环中。诸如细胞铺板不均匀、铺好的细胞状态差、复孔之间的吸光度差异大，以及吸光度值忽高忽低等各类小幺蛾子在 MTT 实验中屡见不鲜。

那么科研小鲜肉如何快速从老腊肉手里练就“稳、准、狠”的 MTT 技能呢？让小编慢慢告诉你。

1、MTT 溶液配制

将 MTT 粉末用 PBS 配制成 5 mg/mL 的溶液，过滤除菌分装，避光储存于 -20°C。临用前取出放置 4°C。

2、细胞接种

将状态良好的细胞以**合适的密度**接种于 96 孔板是 MTT 法的一个关键步骤。细胞的接种密度与细胞的种类以及给药孵育的时间密切相关，过多或过少的细胞密度都会影响实验结果的准确性和重复性。

因此在正式做 MTT 实验前不能依赖网上提供的 MTT 方法，需要通过预实验来确定细胞的接种密度。

1) 收集对数生长期的 MCF-7 细胞，用完全培养基将细胞浓度稀释成 2000、3000、4000、5000、6000 和 8000 cells/mL 的细胞悬液，以每孔 100 μ L 细胞悬液接种于 96 孔板中，每个细胞浓度接种 3 孔即可，放入细胞培养箱内培养；

注意：接种细胞时先将细胞悬液吹打均匀，然后倒入加样槽内，用多通道移液器吸取细胞悬液后将枪头贴 96 孔板的孔壁添加细胞悬液，添加完成后不要晃动 96 孔板，直接放入细胞培养箱内培养。如此操作可以大大提高接种的均匀度，而且还可以使细胞在孔板内的均匀分布，不聚集。

2) 在接种后的第 48、72 和 96 h 取出 96 孔板，倒置显微镜下观察孔内细胞的生长汇合程度并拍照保存；

小编以 96 h 的观察结果为例（图 1）。从图 1 中可以看出，以 4000 cells/mL 浓度接种的孔内细胞在培养 96 h 后生长汇合约 80%~90%，而 6000~8000 cells/mL 浓度的孔内细胞已经长满，而细胞在长满状态下会发生接触抑制生长现象。

因此，后续若要采用 MTT 法考察药物作用于 MCF-7 细胞 72 h 后对细胞的毒性特性（或细胞增殖抑制），那么在接种 MCF-7 细胞时则宜按 4000 cells/mL 的细胞浓度接种于 96 孔板。这里选择观察 96 h 是将细胞接种后贴壁 24 h 与加药孵育 72 h 计算在了一起。

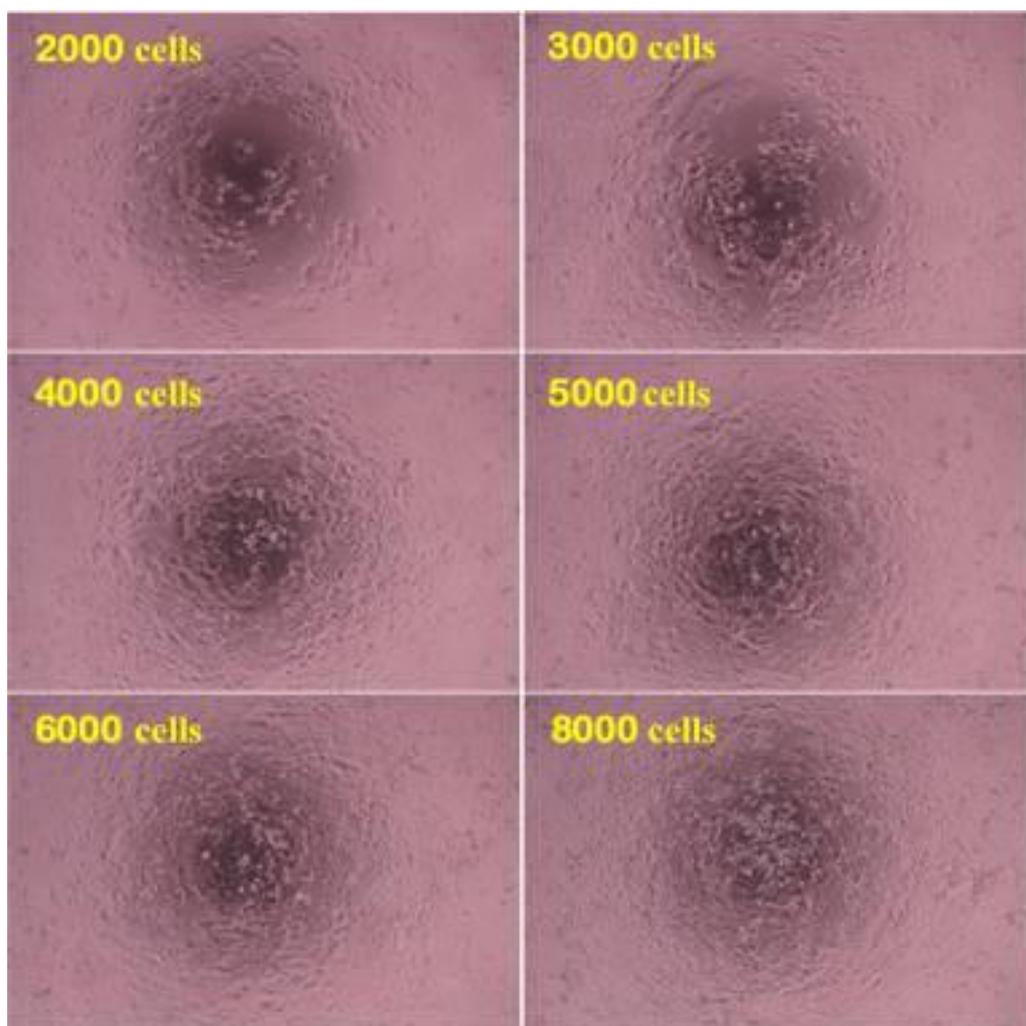


图 1

3) 确定好细胞接种浓度之后，按照上述方法以 4000 cells/mL 细胞浓度接种于 96 孔板中，并培养 24 h 使细胞贴壁。

注意：96 孔板的外周孔共 36 孔不要接种细胞，用 100 μ L PBS 填充。接种细胞时需要定时摇晃加样槽，防止加样槽内细胞悬液沉降，进而导致多通道移液器每次移取的细胞悬液数量不一致。

3、加药处理

- 1) 取出接种细胞的 96 孔板，吸弃孔内培养基，对照组加入 200 μL 完全培养基，加药组加入 180 μL 完全培养基，每组设置 6 个复孔为宜；
- 2) 将药物（或药物的 DMSO 溶液）用完全培养基稀释成 10 倍给药浓度的系列梯度浓度给药溶液；
- 3) 以每孔 20 μL 的量加入稀释的系列浓度梯度给药溶液，然后放入细胞培养箱内孵育 72 h。

4、测定

- 1) 孵育结束后，取出 96 孔板，吸弃孔内药物溶液，用 PBS 清洗 2 次后加入 20 μL MTT 溶液，然后放入细胞培养箱内孵育 4 h；
- 2) 孵育结束后，吸弃孔内 MTT 溶液，加入 150 μL DMSO，轻微震荡 10 min 后用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度值，并计算出平均值和 SD（图 2）。

注意：吸弃 MTT 溶液时适当倾斜 96 孔板，然后用多通道移液器贴壁吸取 MTT 溶液。

浓度 (ng/mL)	吸光度	SD	N
0 (对照组)	1.1	0.05	6
1	1.05	0.04	6
5	0.98	0.03	6
10	0.75	0.04	6
20	0.5	0.03	6
50	0.3	0.03	6
100	0.25	0.04	6
200	0.22	0.04	6

图 2

5、计算 IC50 值

1) 将浓度转换为对数形式并将给药组吸光度均值除以对照组吸光度均值得到细胞存活率均值 (图 3);

Log ₁₀ 浓度	存活率 (%)	SD (%)	N
0.00	95.45	3.64	6
0.70	89.09	2.73	6
1.00	68.18	3.64	6
1.30	45.45	2.73	6
1.70	27.27	2.73	6
2.00	22.73	3.64	6
2.30	20.00	3.64	6

图 3

2) 打开 Graphpad Prism 7.00, 选择 XY 图 (图 4);

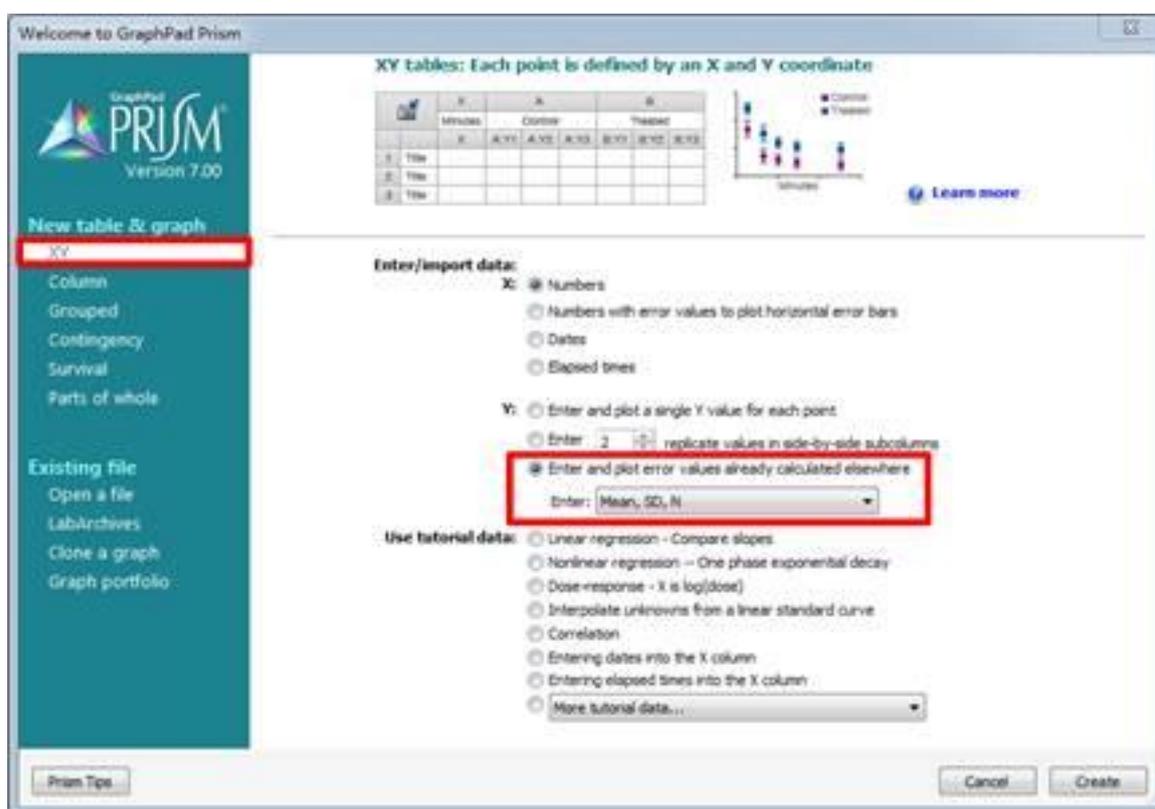


图 4

3) 将图 3 中的数据复制到 Graphpad 中, 点击 Analyze (图 5), 选择 Nonlinear regression (curve fit) (图 6), 点击 OK;

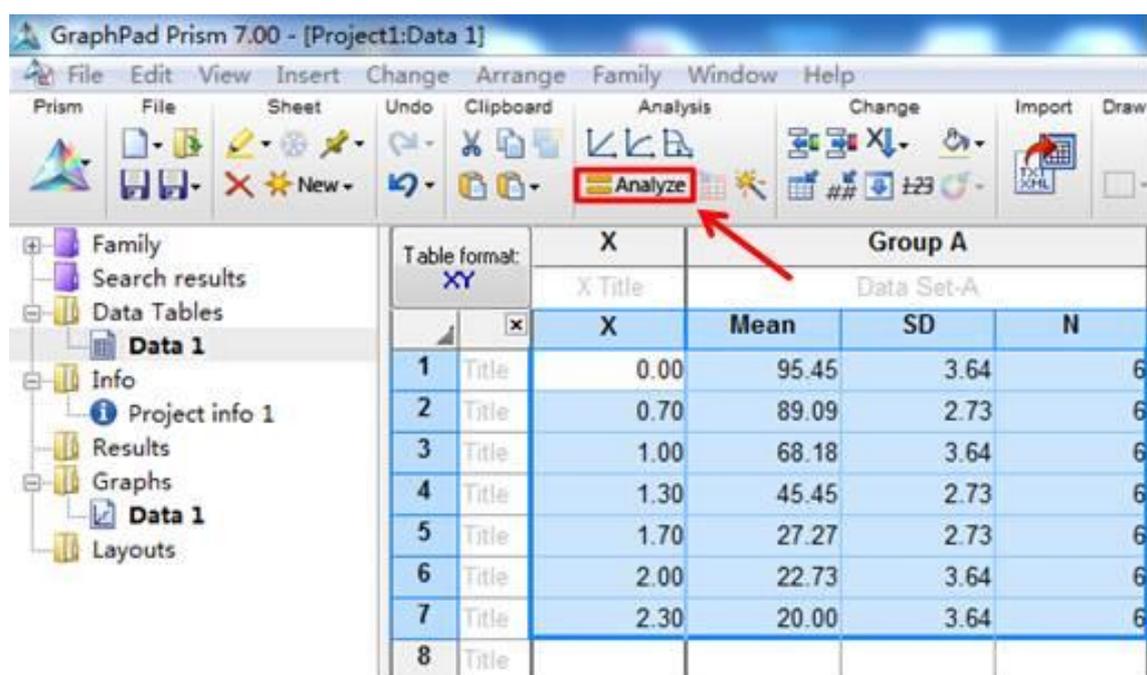


图 5

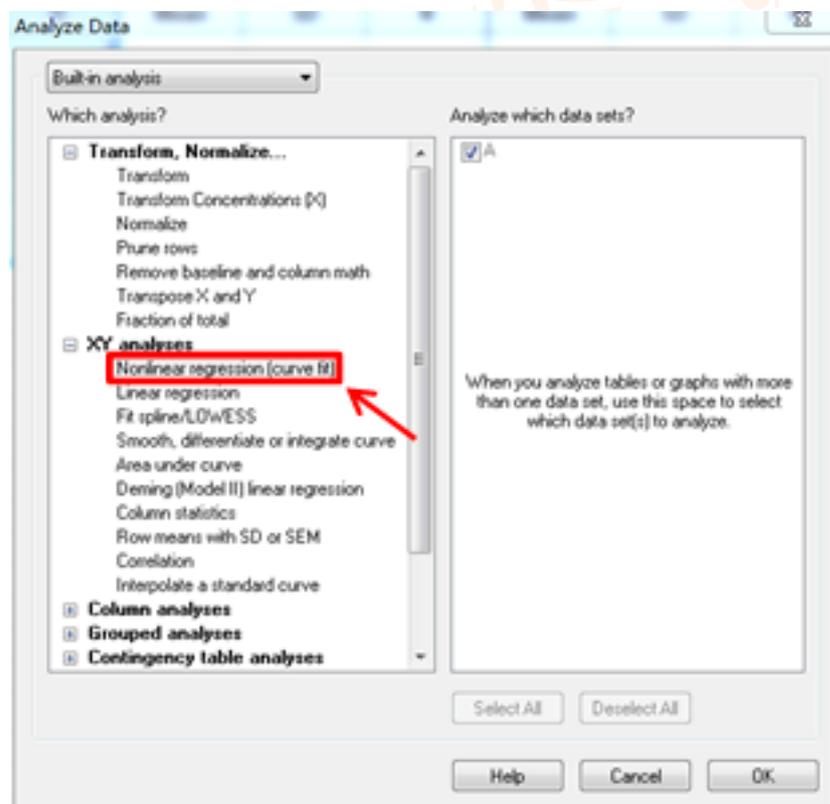


图 6

4) 选择 Dose-response-Inhibition 项下的“[Inhibitor] vs. normalized response-Variable slope” (图 7), 点击 OK;

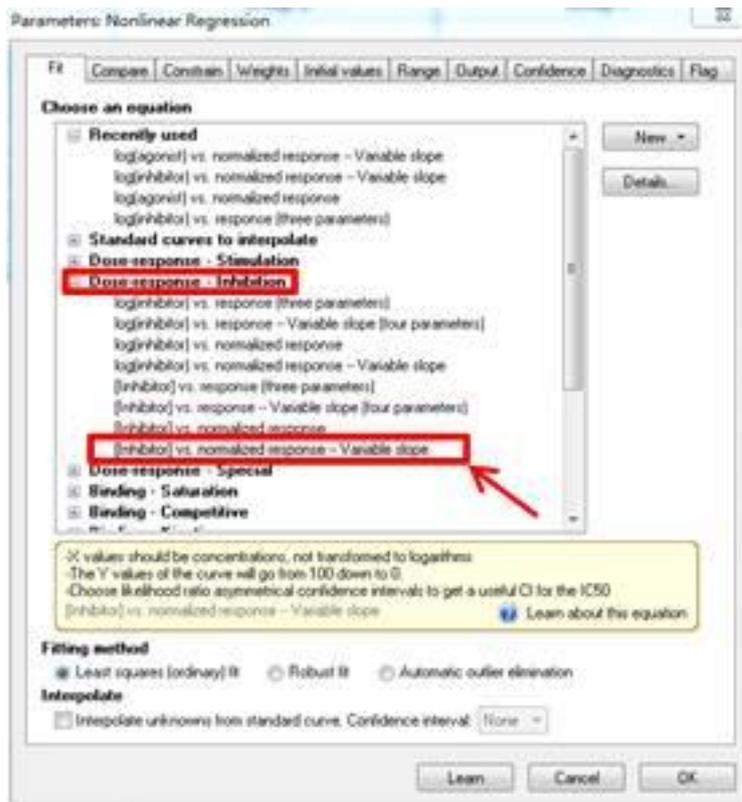


图 7

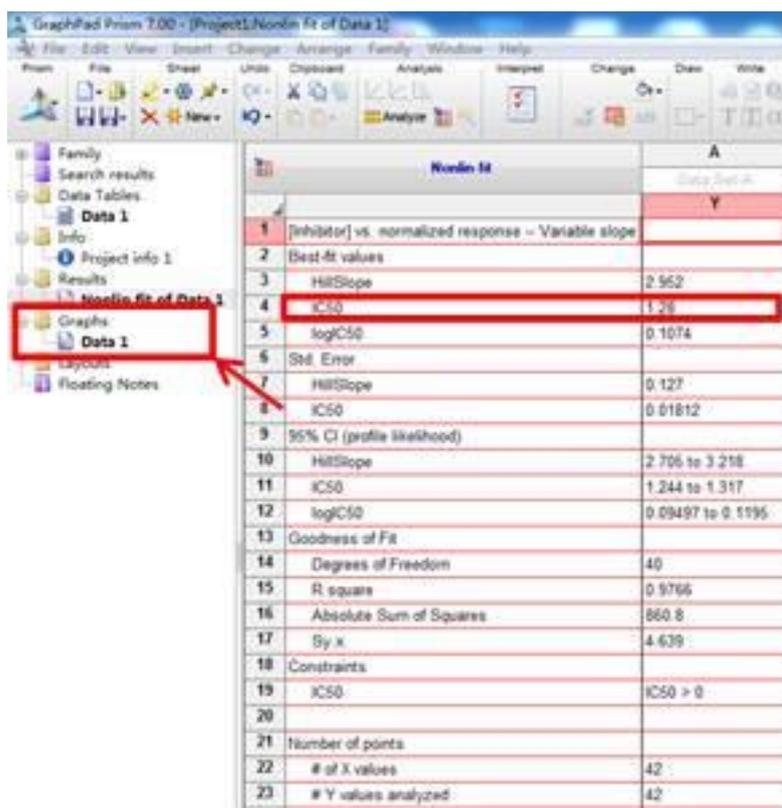


图 8

5) 从图 8 中可以得到软件模拟计算出的药物 IC50 为 1.28 ng/mL。选择图 8 中 Graphs 项下的 Data 1 可以得到数据图 (图 9)，经过简单的调整就可以得到最终的数据图 (图 10)；

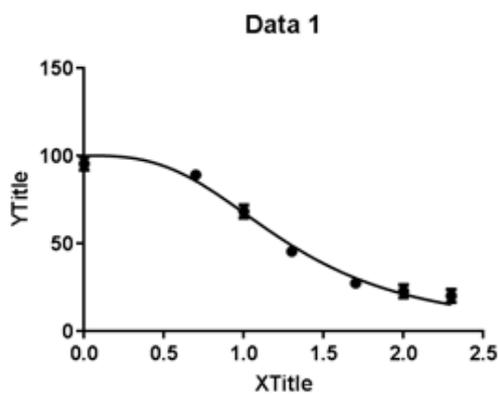


图 9

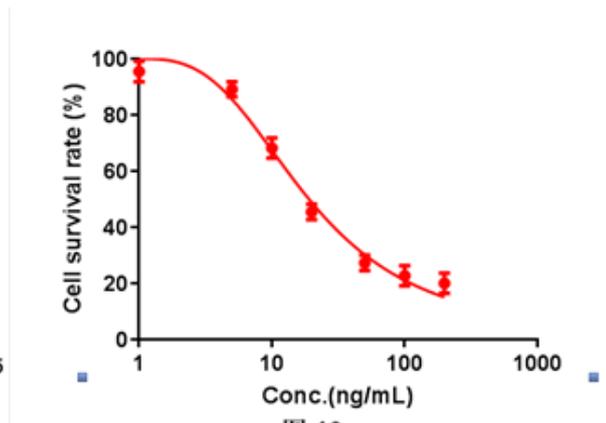


图 10

6、MTT 法的更新版

虽然 MTT 法在细胞增殖检测方面应用广泛，但由于 MTT 法形成的甲臞不溶于水，需要先吸弃 MTT 溶液然后加入 DMSO 溶解之后才能测定，这不仅使测定的工作量增加，而且在吸弃 MTT 溶液时不可避免地会带走甲臞，因此也会降低实验结果的准确性和重复性。

因此检测试剂公司急科研小白之所急，瞄准商机开发了 CCK-8 试剂盒。与 MTT 法相比，CCK-8 所产生的产物溶于水，因此在加入 CCK-8 孵育后立即可以进行吸光度检测，既提高了实验效率又增强了实验的重复性。

尽管有了 MTT 的更新版，但是前期实验设计包括细胞密度的确定以及药物浓度范围的筛选依然是该实验的关键。

缉拿细胞凋亡背后真凶，就靠这六大法宝！

作者：子非鱼

我们都造，细胞君素来脾气火爆不好惹，一个不高兴就死给你看。人生百态，死法万千，但对于细胞而言，谢幕的方式主要有两种：凋亡&坏死。相比于简单粗暴、极其惨烈的坏死之法，凋亡则是有计划的优雅老死的一个过程。

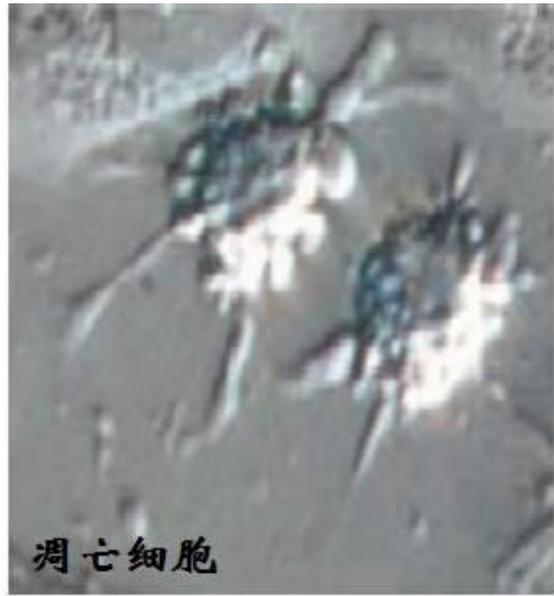
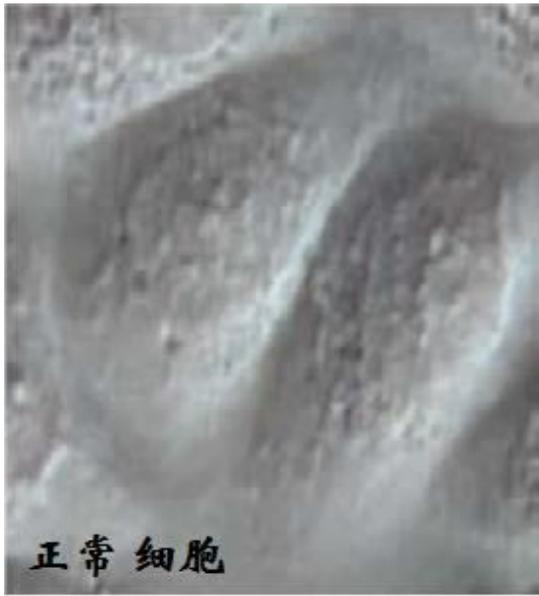
细胞凋亡打包于无形，消匿于免疫，凋亡联自噬，回收再利用，维持体内稳态。一旦它状况百出，许多面目狰狞的疾病就纷至沓来，如老年痴呆或肿瘤君的造访就与凋亡过多或过少有着千丝万缕的关系。

因而，为保机体内一方安定，各位带着尚方宝剑的使者（凋亡检测方法），应研究者们之命，誓将细胞凋亡的背后真凶缉拿归案。

细胞凋亡

形态学检测

#1 使者熟知凋亡细胞的各种形态、姿势，身背照妖镜（各类显微镜），对行来过往的细胞进行逐个排查。只要细胞皱缩、变形、空泡化，抑或裂解为凋亡小体，那都逃不过光学倒置显微镜的火眼金睛。



而且还有吉姆萨染色、瑞氏染色等两位“助攻”齐上阵，将凋亡细胞的染色质浓缩、边缘化，核膜裂解、染色质分割成块状等典型形态一展无遗，以确保没有漏网之鱼。

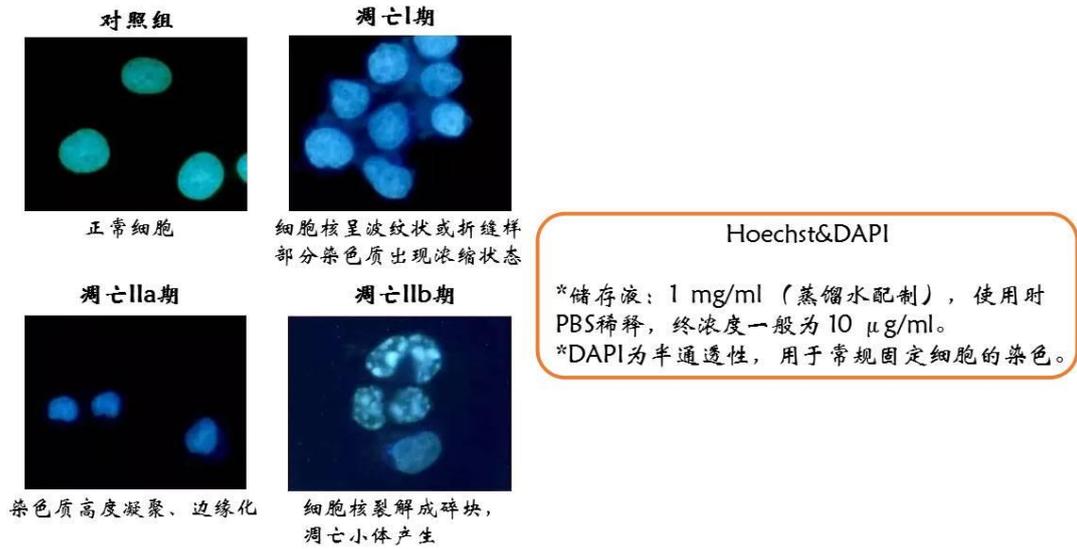
Giemsa staining 姬姆萨染液
(天青色素、伊红、次甲蓝的混合液)

瑞氏
Wright's stain
(美蓝-伊红)



当然这还只是#1 使者小试牛刀，真正的大招在后面。当它以细胞核染色质的形态学改变为指标来评判细胞凋亡的进展情况时，就会祭出两大神器：荧光共聚焦激光扫描显微镜和透射电子显微镜。此种神器一出，凋亡细胞纷纷束手就擒。

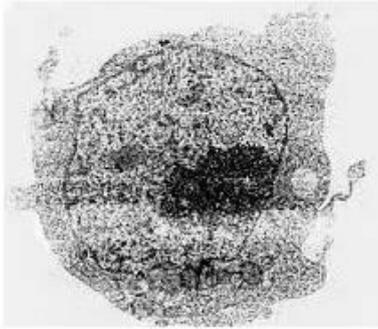
前者可让安装过“GPS 定位器”（特异性染料—Hoechst 33342、Hoechst 33258、DAPI，可非嵌入式结合 A-T 碱基区）的 DNA 在受到紫外线激发时会发射明亮的蓝色荧光。



DAPI染色, HeLa细胞凋亡时核染色质的形态变化

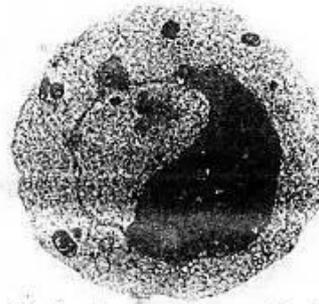
同时, 电镜下可看到凋亡细胞体积变小, 表面微绒毛消失, 细胞质浓缩。

对照组



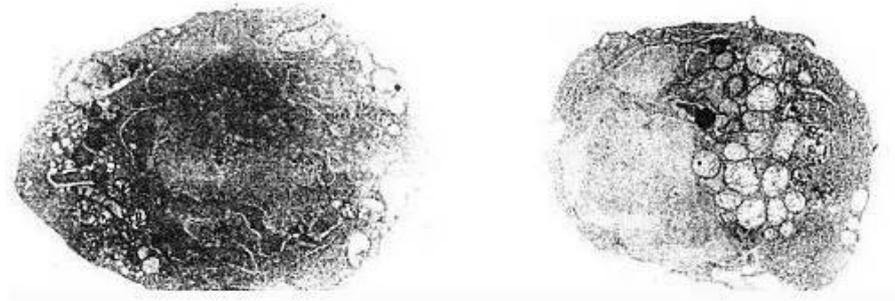
正常细胞

凋亡II期



染色质高度凝聚、边缘化
凋亡小体产生

凋亡I期 (pro-apoptosis nuclei)



核内染色质高度盘绕，出现空泡结构

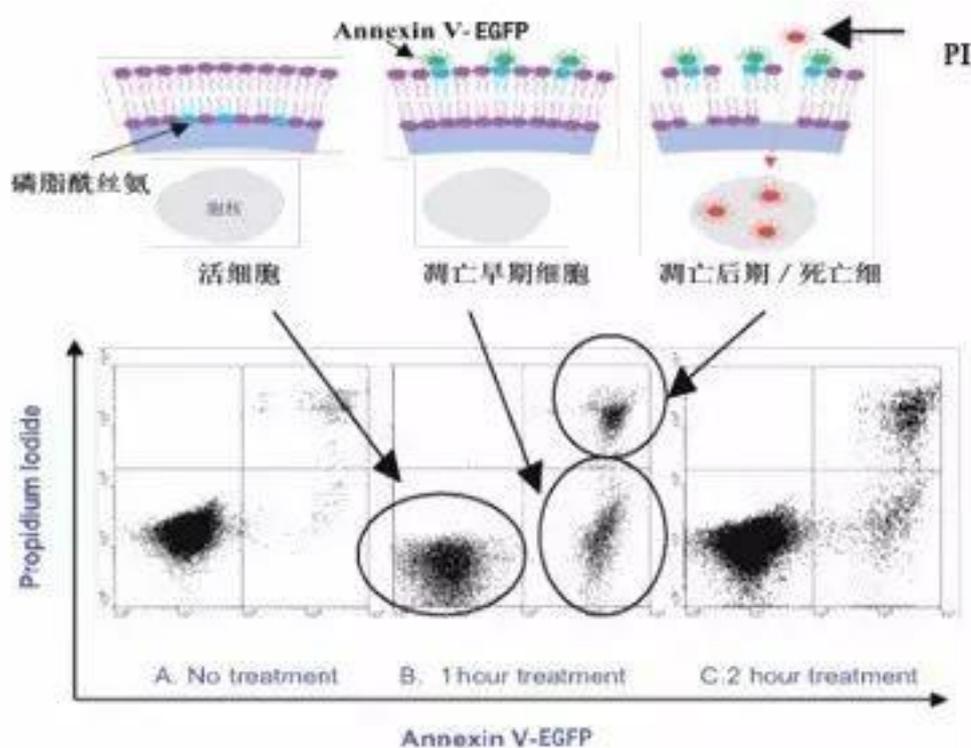
电镜下, Jurkat细胞凋亡时核染色质的形态变化

Annexin V/PI 染色

都说男女搭配，干活不累。这不，#2 使者 Annexin V (Ca²⁺依赖的磷脂结合蛋白) 就经常与其搭档 PI (碘化丙啶) 染料共同捕获凋亡细胞。之所以将这两位称为细胞界的“黑风双煞”，是因为只要他俩一出手，就能将凋亡早晚期细胞和死细胞区分开来。

常言道，不怕神一样的敌人，就怕猪一样的队友。每当“猪队友”磷脂酰丝氨酸 (PS) 从细胞膜内翻转到细胞膜外时，就会不自觉地泄露细胞凋亡的蛛丝马迹，而且它本身也会很快被高

亲和性的 Annexin V 逮个正着，同时也会产生绿色荧光。虽说当细胞膜完整时，PI 暂无用武之地，但一旦细胞膜破损后，PI 就会趁此机会混入细胞核内部，而后嵌入 dsDNA 释放红色荧光。

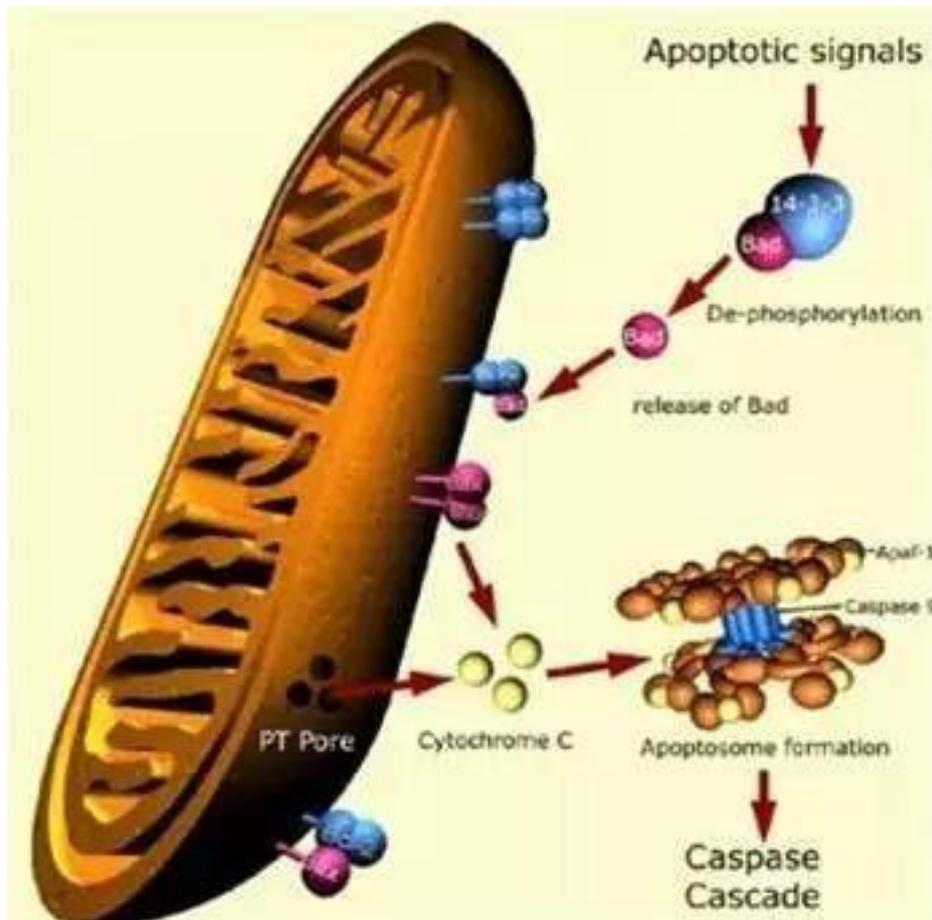


凋亡“枢纽”线粒体的检测

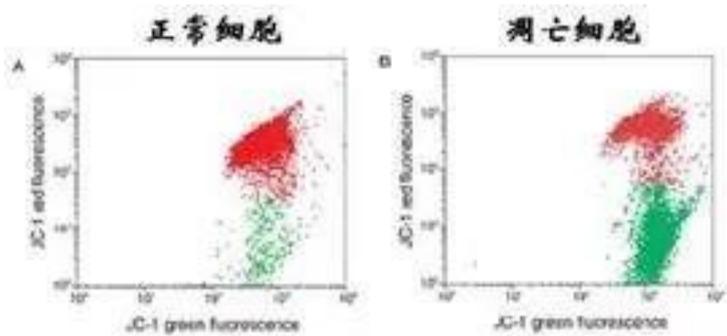
细胞开启花样作死之路，线粒体居功至伟。这个一眼看去像花生的线粒体可是细胞生命活动的控制枢纽，不仅掌控着细胞能量代谢，还是细胞凋亡调控中心。

现已知晓，一向狡猾的 Bcl-2 家族会通过各亚家族成员（Bad 与 Bax 亚家族成员）里应外合来获取情报，并改变线粒体膜的通透性，致使跨膜电位 ($\Delta\psi_m$) 消失，开启渗透转运孔 (PT pore) 并释放间谍分子：细胞色素 C (Cytc) 和 AIF，进而诱导 Caspase 凋亡信号通路的级联

发生。

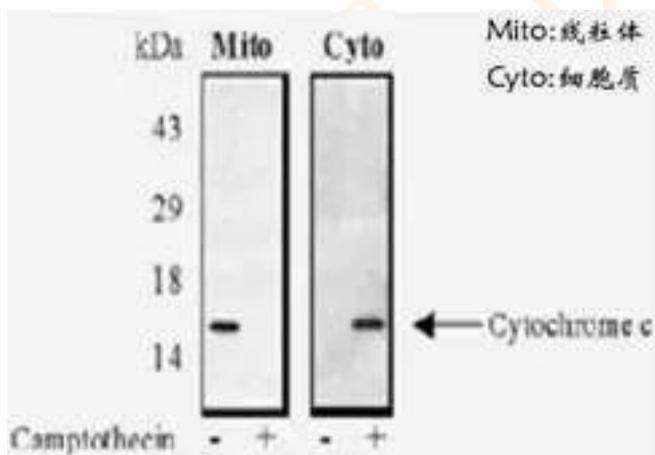


因此，#3 使者（一些亲脂性阳离子荧光染料如 Rhodamine123、JC-1、TMRM 等）常会单枪匹马地深入虎穴来验证细胞是否发生凋亡：正常细胞中，他在线粒体形成聚集体，发出强烈红色荧光；而细胞凋亡时，因电位的消失，他以单体形式存在于胞质中并发出绿色荧光。



将正常培养的细胞和诱导凋亡细胞加入终浓度为 Rhodamine123 (1mM)、JC-1 (1mM)、TMRM (100nM)，37°C 平衡30min，流式细胞检测细胞的荧光强度。

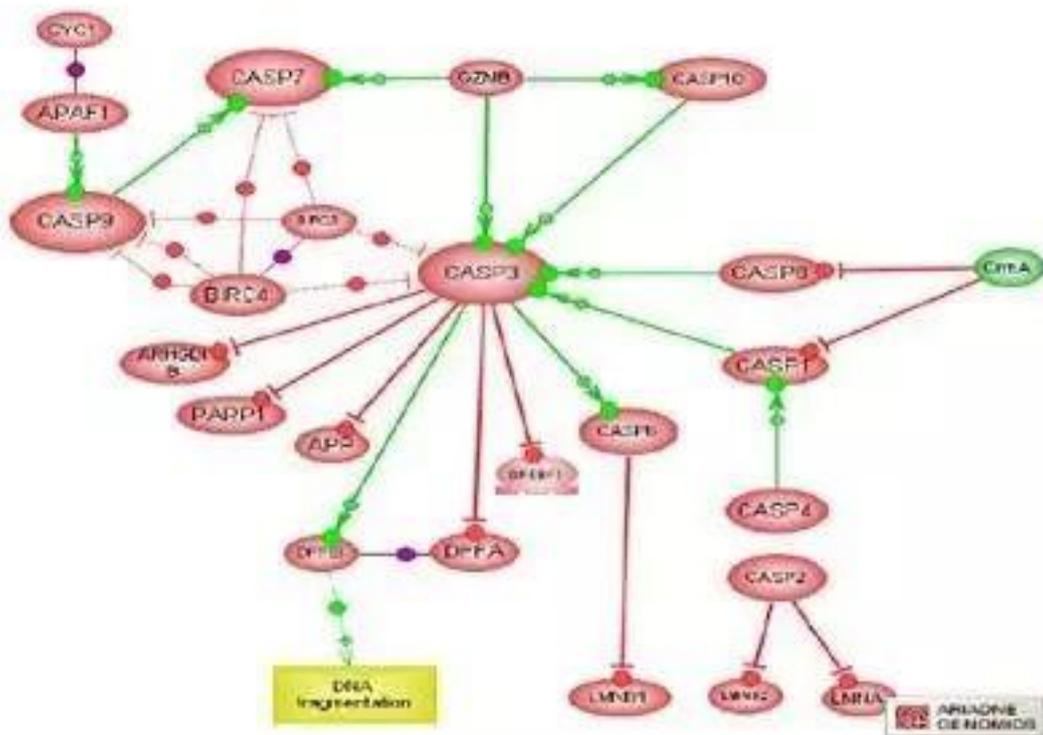
然而，#4 使者则另辟蹊径，它对释放的间谍分子采取着紧追盯人的方式，用相关试剂盒分离出细胞中的线粒体和细胞质成分，再通过 SDS-PAGE 电泳对其进行分开审讯，最后用专门的抗体“锁链”——Cytochody 将细胞色素 C (Cytc) 缉拿归案。



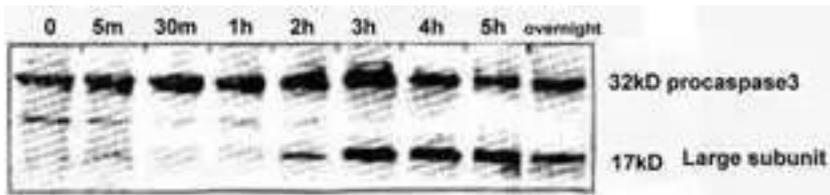
Jurkat 细胞用喜树碱 (Camptothecin) 诱导凋亡 6h 后，细胞色素 C 从线粒体转位于细胞质中。

Caspase 活性检测

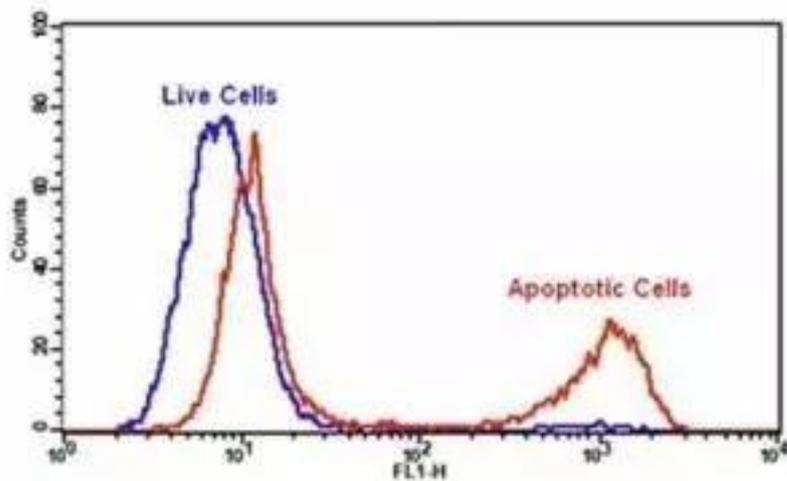
除了线粒体，Caspase 家族也经常为细胞凋亡“出谋划策”。因而，只要 Caspase 身份败露，那么其凋亡罪名跑不了，且不同的 caspase 的激活还能用来区分凋亡的信号通路，比如：caspase-8 活化代表细胞外凋亡信号通路，caspase-9 活化则代表线粒体信号通路。



而#5 使者的重心在于抓捕 Caspase-3，为了让其现身和坦白从宽，western blot、流式细胞术等手段轮番上阵，这才知晓 Caspase-3 正常以酶原（32kD）的形式存在于胞浆中，在凋亡早期被激活后，可裂解为两个大亚基（17kD）和两个小亚基（12kD），而在细胞凋亡的晚期和死亡细胞，caspase-3 的活性明显下降。



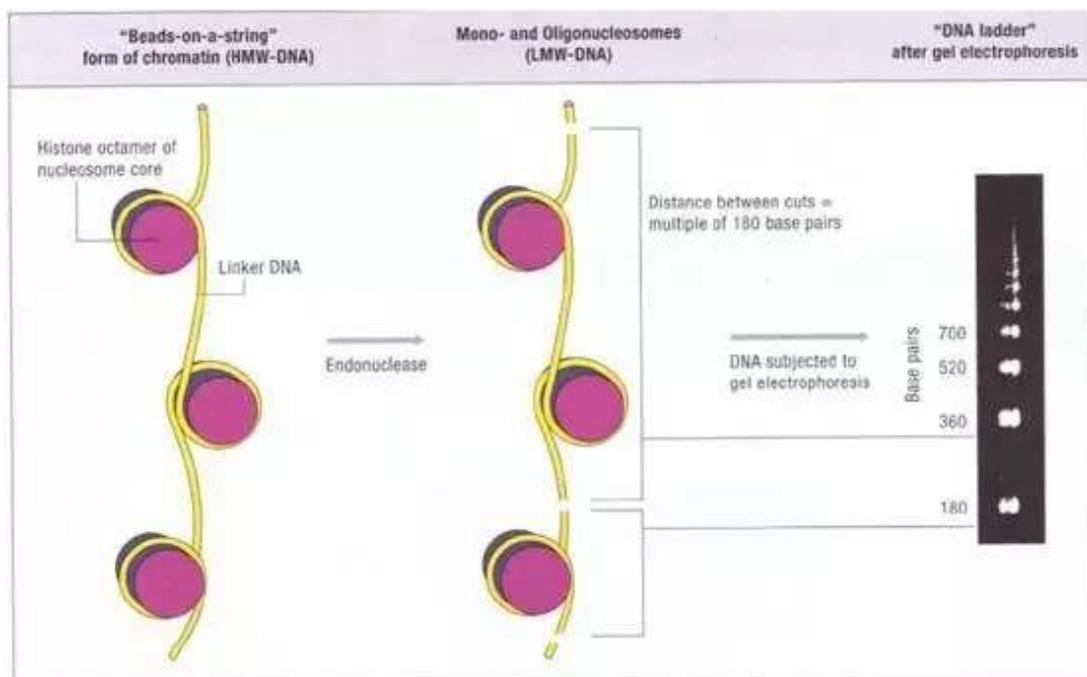
western blot检测caspase-3的活化片段



流式细胞术检测Jurkat细胞凋亡时Caspase-3阳性细胞数

DNA 片段化检测

DNA 作为细胞内曾经的王者，在面临细胞全面崩溃时不仅无力回天，甚至于它本身都断裂成一段一段的。而我们#6 使者只需要让断裂 DNA 从小到大排排站就可以让其老实交代了细胞的死亡真相：凋亡时 DNA 在核小体间有规律的断裂并会产生 180-200bpDNA 片段；而坏死细胞的 DNA 则会断裂为无特征的杂乱片段。

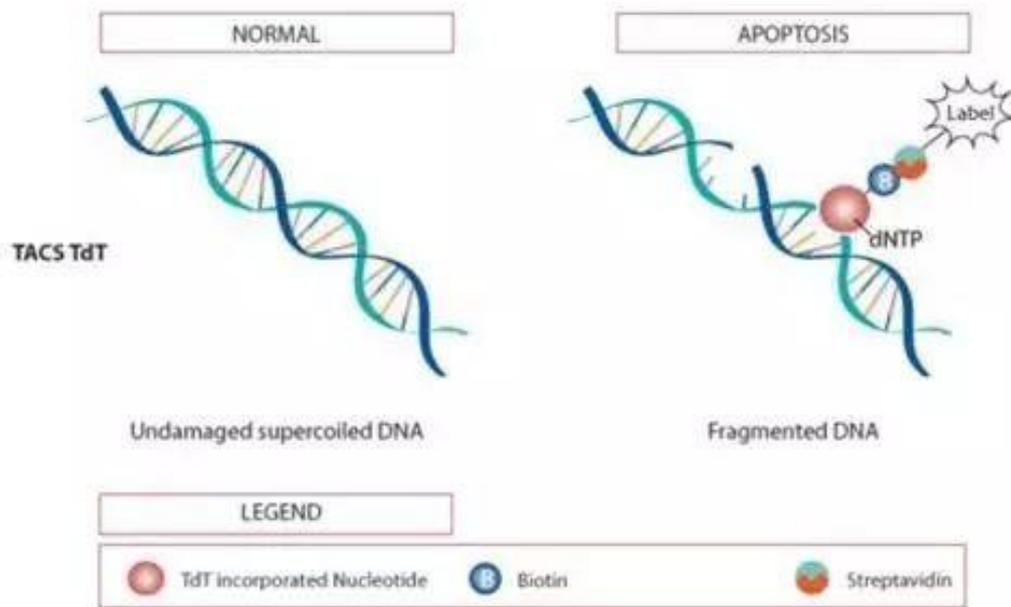


▲ Figure 4: The biochemistry of DNA

有时，在凋亡细胞比例较低以及检测样品量很少（如活体组织切片）情况下，直接琼脂糖电泳可能观察不到核 DNA 的变化。此时就到了 LM-PCR（ligation-mediated PCR）大显身手的时候，在 ApoAlert LM-PCR Ladder Aay Kit（CLONTECH 公司）帮助下，将核小体的梯度片段连上特异性接头并专一性地扩增，可灵敏地检测凋亡时产生的核小体的梯度片段。

Tunel 检测法

此外，围绕 DNA 断裂的还有具有“神侦探”之称的#7 使者。他很快就发现，细胞凋亡时 DNA 双链或单链断裂会产生大量的粘性 3'-OH 末端。以此为线索，在脱氧核糖核苷酸末端转移酶（TdT）协助下，他成功将生物素/荧光素标记的 dUTP 绑定在 3'-OH 末端，并通过酶联显色或荧光检测来定量分析结果。



总之，细胞凋亡就是犯罪集团（凋亡通路中的各种分子）促成的，不能因为逮住了一个犯罪分子（单一指标）就轻易断定其凋亡罪行。毕竟，细胞凋亡事件中，每个指证只维持一段时间，因而各位小伙伴们应该广撒网、多捞鱼，最好能在不同时间段进行多指标（下图中各种凋亡分子）的同时检测，这才能以多种犯罪证据来进行确定其犯罪事实。

最后为了不造成冤假错案，阳性&阴性对照也是必不可少的，如此才能保证检测结果的准确性。

- 促凋亡分子

Bax, Bcl-Xs, Bak, Bad, Bid, AIF, Apaf-1等

- 抑制凋亡分子

Bcl-2, Bcl-XL和bcr/abl kinase等

- 相关信号通路分子检测

抗凋亡信号通路

PI3K-Akt pathway

NIK-NF- κ B pathway

促凋亡信号通路

MKK-JNK pathway

Fas-FADD pathway

P53 pathway

参考文献: Analyzing Apoptosis – A Review of Analytical Techniques

技术 | 邪不压正,看细胞凋亡检测各显神通

作者: 子非鱼

小鱼之前也提到,细胞君可不好惹的,一不高兴,就死给你看,凋亡过多,有可能得老年痴呆,凋亡过少就可能得肿瘤。诚然,凋亡对胚胎发育及形态发生(morphogenesis)、组织内正常细胞群的稳定、机体的防御和免疫反应、疾病或中毒时引起的细胞损伤、老化、肿瘤的发生进展起着重要作用,并具有潜在的治疗意义,至今仍是生物医学研究的热点。

凋亡的进程分为早、中、晚期,首先是细胞色素C和凋亡肽酶激活因子APAF1形成复合体,线粒体的功能发生衰退;后是caspase家族激活,磷脂酰丝氨酸外翻,这时细胞的形态已经

发生了改变，可以看到细胞变小，胞核皱缩；最后是细胞内 DNA 断裂，形成凋亡小体。

可以说，细胞凋亡就是犯罪集团(凋亡通路的各种分子)促成的，下面且看“大侦探们”（各种细胞凋亡检测方法）如何将这些嫌疑犯缉拿归案。



所谓闻道有先后，术业有专攻，侦探们也会对不同类型的案件不同的嫌疑犯有不同的敏感度。（根据不同的时期使用不同的检测方法。）

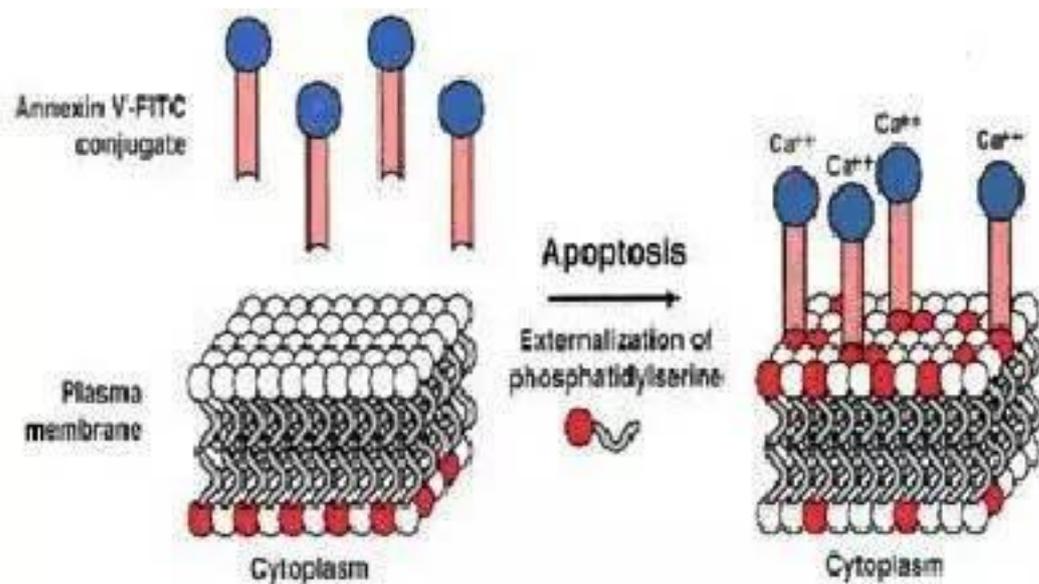
早中期

1. MitoSeorTM，线粒体膜电位变化逃不过他的火眼金睛

在凋亡研究的早期，在受到凋亡诱导后线粒体转膜电位会发生变化，导致膜通透性的改变。第一位侦探出动了——MitoSeorTM，一个阳离子性的染色剂，线粒体转膜电位有没变化逃不过他的火眼金睛，他通过深入虎穴来验证细胞有没凋亡：正常细胞中，他在线粒体中形成聚集体，发出强烈的红色荧光。凋亡细胞中，因线粒体穿膜电位的改变，他以单体形式存在于细胞液中，发出绿色荧光。用荧光显微镜或流式细胞仪可清楚地分辨这两种不同的荧光信号。CLONTECH 公司的 ApoAlert Mitochondrial Membrane Seor Kit 就采用这种原理来检测线粒体膜电位的变化。但是，这种方法不能区分细胞凋亡或其他原因导致的线粒体膜电位的变化。

2. 磷脂酰丝氨酸外翻露马脚，被 Annexin V 逮个正着

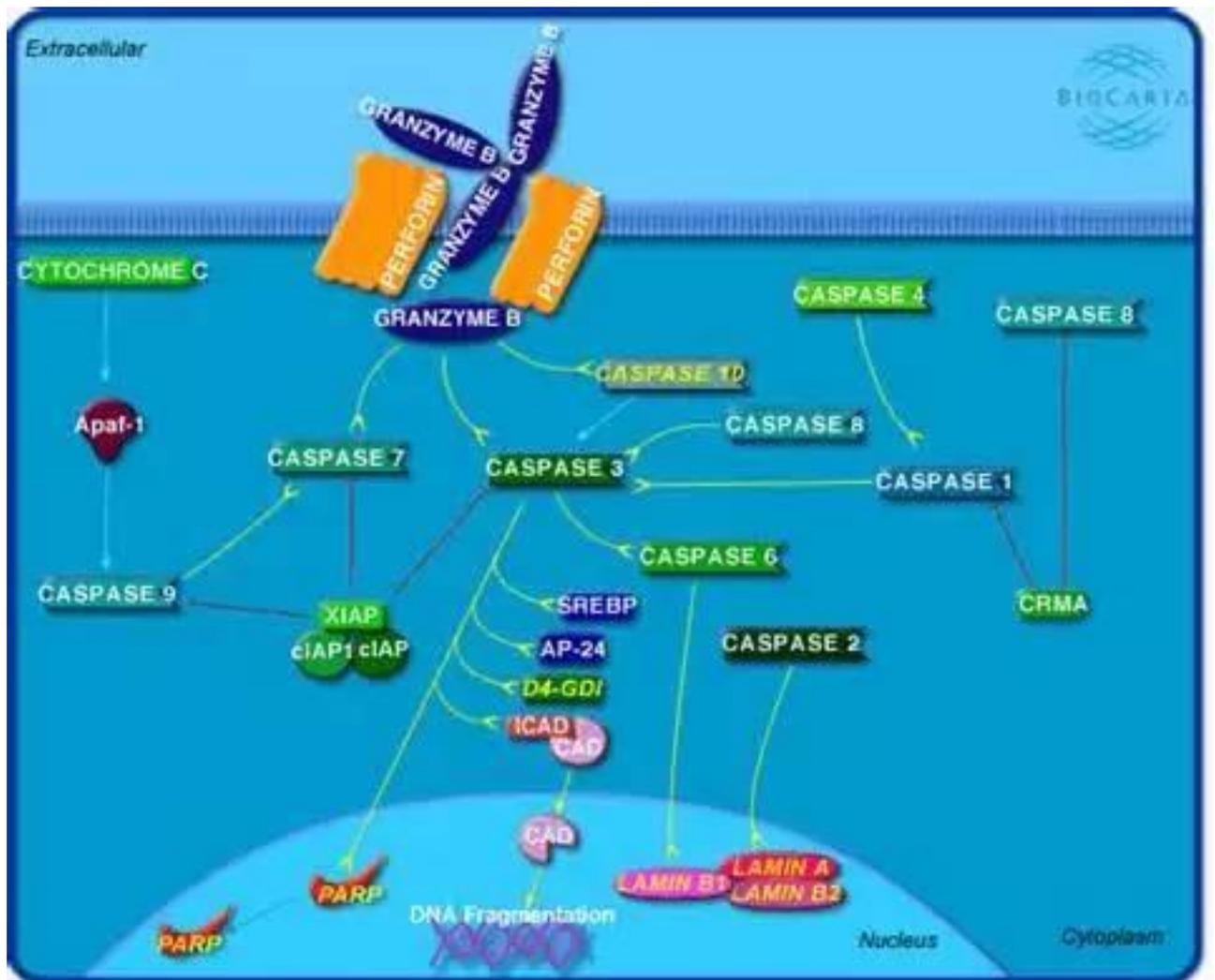
细胞膜磷脂酰丝氨酸（PS）从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的外侧，这是其参与细胞凋亡露出的马脚。于是，PS 外翻，被第二位侦探 AnnexinV 逮个正着，这家伙本质是一个钙依赖性的磷脂结合蛋白，能专一性的结合暴露在膜外侧的 PS，再通过简单的显色或发光系统进行检测。



美国著名生物试剂公司 CLONTECH 和 INTERGEN 公司分别开发了多种标记的 Aexin V 产品，简便快速，10 分钟就可完成检测。其中带荧光标记的 Aexin V-EGFP 及 Aexin V-FITC，灵敏度高，可作为流式细胞分选方法筛选凋亡细胞的基础。由于融合蛋白 Aexin V-EGFP，EGFP 与的结合比例为 1: 1，还可进行定量检测。除此之外，还提供生物素偶联的 Aexin V，可通过常用的酶联显色反应来检测。另外，MACS 公司将磁珠包被 Aexin V，可采用磁分选方法筛选凋亡细胞。

3.Caspase 身份败露，凋亡罪名难逃

Caspase 身份败露，一般都表明了其参与细胞凋亡这一事实，因此可以通过 caspase 活性来检测细胞凋亡。不同的 caspase 的激活还能用来区分凋亡的信号通路，比如：caspase-8 活化代表细胞外凋亡信号通路，caspase-9 活化则代表线粒体信号通路。让 Caspase 现身和坦白从宽的侦探有很多，比如免疫细胞化学、western、RT-pcr、酶活性测定等。



caspase 活性虽然是凋亡的可靠指标，但世事无绝对，在 caspase 被抑制时，细胞仍然会发生凋亡。因此，在研究凋亡时仅仅测定一个参数是不够的。明智的做法，就是采用两种或更多不同的方法来验证细胞的死亡方式。

晚期

1.一般围绕 DNA 断裂进行，TUNEL 是检测这项特征的“神侦探”

TUNEL 检测原理：细胞凋亡中，染色体 DNA 双链断裂或单链断裂而产生粘性 3'-OH 端，而生物素或荧光素标记的 dUTP 在脱氧核糖核苷酸末端转移酶（Tdt）的作用下掺入到 DNA 的 3'-OH 端，再通过酶联显色或荧光检测定量分析结果。

美国 Intergen 公司提供多种标记方法，直接荧光标记，地高辛介导荧光标记或过氧化物酶联显色，可做细胞悬液、福尔马林固定或石蜡处理的组织、细胞培养物等多种样本的检测。其中，直接标记步骤少，操作简便。而间接标记有信号放大的作用，检测灵敏度高。

2.让断裂 DNA 排队坦白从宽，LM-PCR Ladder 最厉害了！

晚期凋亡的细胞由于 DNA 的断裂，电泳可以发现 DNA ladder，因此这些从小到大排成队的 DNA 就老老实实在地交代了细胞凋亡的真相。当凋亡细胞比例较小以及检测样品量很少（如活体组织切片）时，直接琼脂糖电泳可能观察不到核 DNA 的变化。CLONTECH 公司的 ApoAlert LM-PCR Ladder Aay Kit 通过 LM-PCR（ligation-mediated PCR），连上特异性接头，专一性地扩增核小体的梯度片段，从而灵敏地检测凋亡时产生的核小体的梯度片段。

上述两种方法都针对细胞凋亡晚期核 DNA 断裂这一特征，但细胞受到其它损伤（如机械损伤，紫外线等）也会产生这一现象，因此它对细胞凋亡的检测会受到其它原因的干扰。

mRNA 水平的检测，专门缉拿细胞凋亡的主犯

如果说 caspase、PS 是细胞凋亡的帮凶，那么细胞凋亡的主犯就是那些表达异常的基因，检

测这些特异基因的表达水平也成为检测细胞凋亡的一种常用方法。据报道，Fas 蛋白结合受体后能诱导癌细胞中的细胞毒性 T 细胞等靶细胞。Bcl-2 和 bcl-X 作为抗凋亡（bcl-2 和 bcl-X）的调节物，它们的表达水平比例决定了细胞是凋亡还是存活。一般多采用 Northern 杂交和 RT-PCR 走胶对它们进行检测。随着近年来荧光定量 PCR 技术的发展，用定量 PCR 技术来检测基因表达水平无疑比之前者更快更准确。

分享 | 一文掌握细胞增殖七大法

作者：子非鱼

在科研中，小伙伴们经常需要检测细胞增殖情况，比如敲掉某个与细胞生长有关的基因以后，细胞是挂了还是增加了？又比如，要验证一种抗肿瘤药物的药效，怎么知道细胞存活量？小伙伴们，不必问师兄师姐了，史上最全的细胞增殖的检测方法，就在这里：

直接计数法

数到让你眼睛

简单粗暴，傻瓜式的检测方法！利用计数板或计数仪得出细胞的数目，然后对数目进行比较。

优点是简单，省钱！不需要特定的试剂和仪器，准确；缺点：不适合样品数量多的情况（数得头昏眼花上医院，老板可不会给你报销！）、不适合评估特定的亚群。

3H-TdR 渗入法

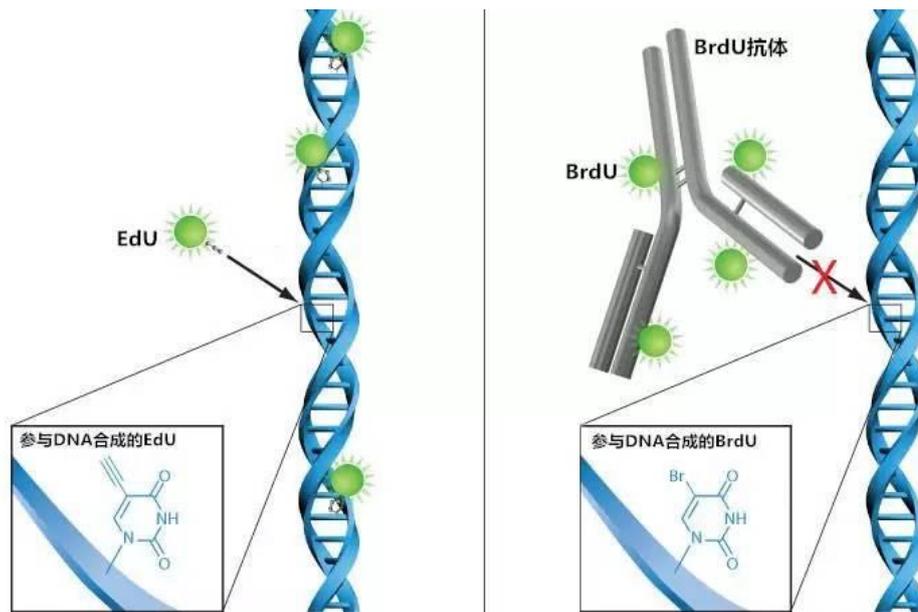
给 DNA 安装 GPS 定位器

胸腺嘧啶核苷 (TdR) 是 DNA 特有的碱基, 也是 DNA 合成的必需物质。用同位素 ^3H 标记 TdR 即 $^3\text{H-TdR}$ 作为 DNA 合成的前体能掺入 DNA 合成代谢过程, 那之后的每一条新合成的 DNA 双链像被安装了 GPS 定位器一样, 都能被液体闪烁计数器检测到, 通过测定细胞的放射性强度, 可以反映细胞 DNA 的代谢及细胞增殖情况。优点: $^3\text{H-TdR}$ 掺入法敏感性高, 客观性强, 重复性好。缺点: 需一定设备条件: 液体闪烁计数器, 这玩意不便宜, 同时还存在放射性核素污染问题, 真是伤钱包又伤身体。

BrdU/EdU 检测法

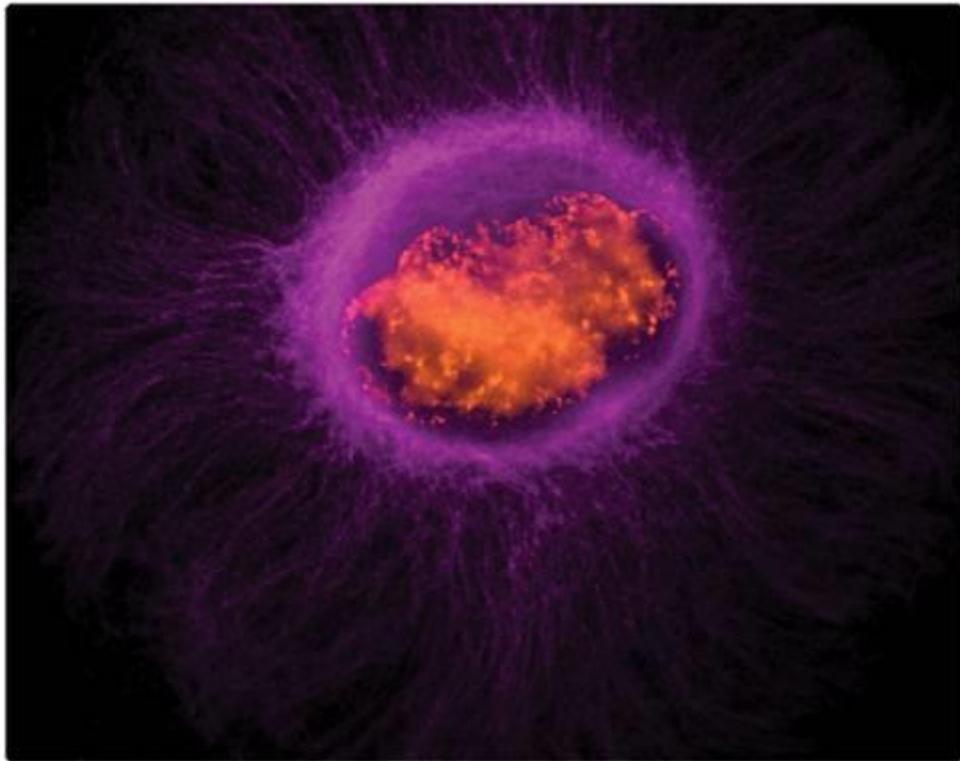
危险武打戏的大腕替身

5-溴脱氧尿嘧啶核苷 BrdU 是演艺圈大腕胸腺嘧啶的替身, 替身代替大腕胸腺嘧啶出演危险的武打戏——合成 DNA, 为了引人注目还要穿上特别耀眼的衣服——专一性抗体, 然后替身曝光在媒体的镁光灯 (免疫荧光、流式细胞术检测) 下, 狗仔队拍到替身, 替身知道纸包不住火, 就道出自己替大腕演过的武打戏 (合成 DNA 的量)。



EdU vs BrdU

EdU 检测法：EdU（5-Ethynyl-2'-deoxyuridine）是一种胸腺嘧啶核苷类似物，又是另一个替身 B 代替大腕胸腺嘧啶出演武打戏的戏码（合成 DNA）！就是 EdU 能够在细胞增殖时期代替胸腺嘧啶（T）渗入正在复制的 DNA 分子中，通过基于 EdU 与 Apollo 荧光染料的特异性反应快速检测细胞 DNA 复制活性，适用于细胞增殖、细胞分化、生长与发育、DNA 修复、病毒复制、细胞标记示踪等方面的研究，尤其适合进行 siRNA、miRNA、小分子化合物及其他药物的筛选实验。



HeLa cells were treated for 30 min with EdU

MTT 检测法

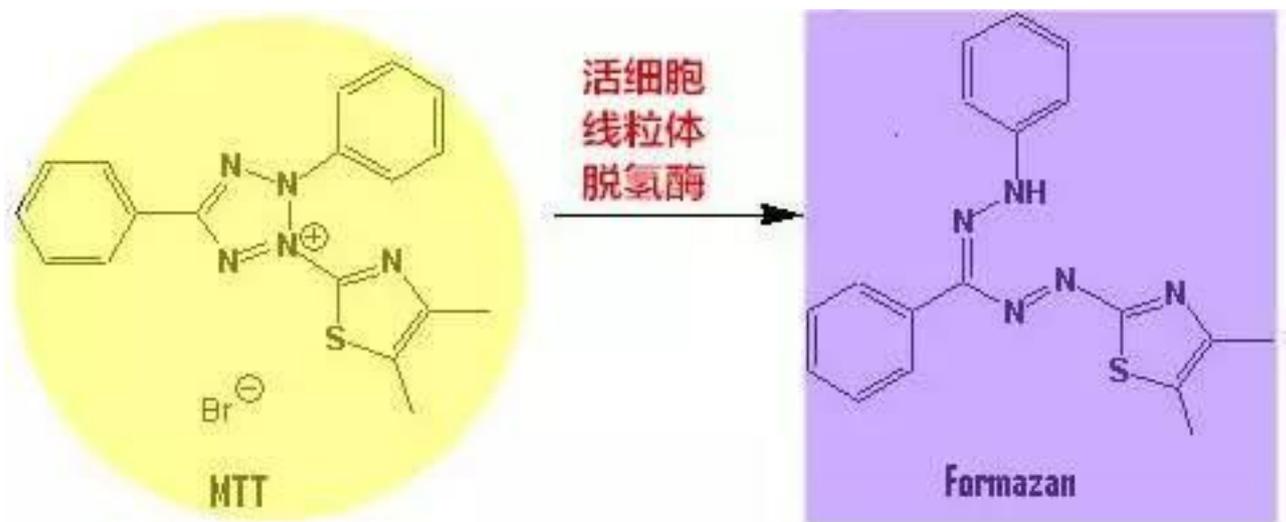
蓝姑娘牺牲小我成全大家的故事

MTT 这个名字太没个性啦，你到底是个啥？只是世人不懂我的深度，这是我的真身：



分子式 $C_{18}H_{16}N_5SBr$ ，人家还是有个中文名的，叫噻唑蓝，请叫我蓝姑娘 ~

在 MTT 检测中，细胞是死是活主要看线粒体内的脱氢酶有没有活性，那怎么知道他有没有活性？这时蓝姑娘就牺牲自己，为脱氢酶验明正身。如果线粒体内的脱氢酶有活性，他就能将黄色的蓝姑娘（MTT）分解成兰紫色的水不溶性的甲瓚，并沉积在细胞中，死细胞无此功能。然后二甲基亚砜（DMSO）能溶解细胞中的甲瓚，用酶联免疫检测仪在 490nm 波长处测定其光吸收值，可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内，MTT 结晶形成的量与细胞数和细胞活力成正比。



CCK-8 检测法

MTT 的升级版

CCK-8 就是 MTT 的升级版，CCK-8 细胞活性检测试剂中含有 WST-8——一种类似于 MTT 的化合物，在电子耦合试剂存在的情况下，可以为线粒体内的脱氢酶验明正身，在脱氢酶作用下，还原生成橙黄色的甲瓩产物。细胞增殖越多越快，则颜色越深；细胞毒性越大，则颜色越浅。对于同样的细胞，颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。用酶联免疫检测仪在 450nm 波长处测定其光吸收值，可间接反映活细胞数量。

CFSE 检测法

告诉你为什么细胞君“富不过三代”

羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯（CFSE）是一种可穿透细胞膜的荧光染料，可以不可逆地

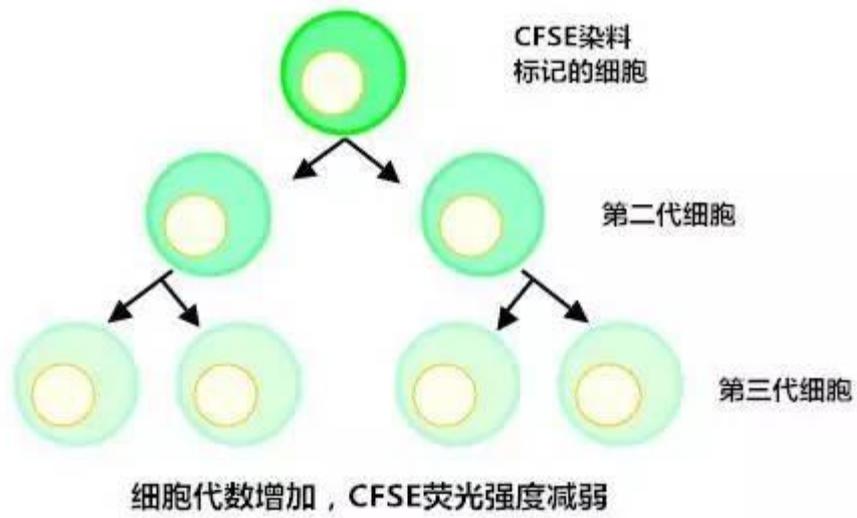
与细胞内的氨基结合偶联到细胞蛋白质上，是一种良好的细胞标记物。简单介绍以下 CFSE 检测法原理：

故事版：

就是讲述细胞君“富不过三代”的故事，CFSE 那点染料是细胞君白手起家赚来的第一桶金，细胞君将第一桶金平均分给两个儿子，他们每人只拿到父亲的一半财富，按照这个节奏发展，由儿子留给孙子的财富就更少了。因此只要知道他们获得的财富就可以知道他们是第几代人。

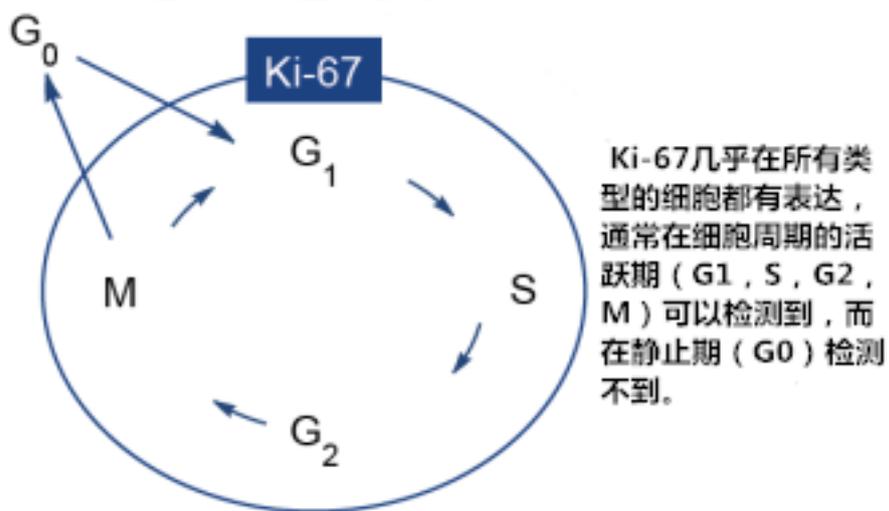
学术版：

CFSE 进入细胞后，可以不可逆地与细胞内的氨基结合偶联到细胞蛋白质上。当细胞分裂时，CFSE 标记荧光可平均分配至两个子代细胞中，因此其荧光强度是亲代细胞的一。在一个增殖的细胞群中，各连续代细胞的荧光强度呈对递减，利用流式细胞仪在 488nm 激发光和荧光检测通道可对其进行分析。



核抗原 Ki - 67 染色法

缺席 G₀ 期成靶标



Ki-67 染色，研究人员可以评估处于细胞周期所有活跃期的总增殖细胞的百分比。科研人员可以借此观察药物或未知化合物的刺激效应或抗增殖效应。可用免疫组织化学技术或流式细胞术检测。

适合才是最好的

怎样选择最适合自己的检测方法？萝卜青菜各有所爱？可以有，但重要的是根据你的细胞类型和研究方案做选择。比如说，如果你已经有了待测细胞(不论是在培养板还是在溶液中)，希望了解细胞增殖中的代谢活性变化，那可以使用四唑盐和比色法检测。相应的，如果你对 DNA 合成的改变更感兴趣，可以选择用 BrdU 标记，再通过比色法、化学发光或荧光检测进行分析。或者你研究的是单个细胞，也可以用 BrdU 标记来检测 DNA 合成，将其与荧光标记的相应抗体结合，然后通过流式细胞仪来进行流式分选。小鱼介绍的方案都是久经考验的可靠方法，选择最适合自己的检测方式，好结果自然水到渠成。

6.6 细胞免疫荧光法

TUNEL 荧光：熊孩子闯关记

作者：麦子

师兄是临床上的暖男，实验室里的熊孩子（PS：我是熊孩子的师妹）。那年春末夏初，我们被外（liu）派（fang）到郊区的一个实验室里做一些几乎陌生的实验。其中他负责的石蜡切片 TUNEL 荧光染色，整个过程都是满满的段子^▽^至于我犯的段子啊，往事不要再提，人生已多风雨.....

因为实验训练不足，师兄拿到了博士后师姐发来的 Protocol，心里像塞了一只原子弹，战战兢兢地开工了.....

首先，切片脱蜡水化。

这一步倒没有什么害怕的，因为之前做免疫组化的时候已经熟悉过了。步骤如下：

58°C 加热切片 15min 熔蜡，然后

二甲苯 3×5min

100% 乙醇 2×2min

95% 乙醇 2×1min

85% 乙醇 1×1min

70% 乙醇 1×1min

自来水 1×1min

PBS 冲洗 2×5min（先冲再泡 5min，嗯，沏奶茶的步骤嘛~）

不过我们深知后面还有很多坑.....



然后**增加样本通透性**。用 PBS 将蛋白酶 K 配置成 20ug/ml，每个样本加 100ul，使其完全覆盖标本，室温孵育 15min。

注：对细胞通透性的处理，孵育时间、温度和工作液的浓度等，都需要根据不同组织、切片厚度和固定方法摸索出合理的方案，这个具体还是请教你们实验室里有经验的师兄师姐吧~

PBS 冲洗 2×3min。一定要把蛋白酶 K 冲洗干净啊。

然后要把 PBS 擦掉。呃，好害怕纸巾碰到组织会发生什么糟糕的事情。。所以都是把载玻片背面的液体呼啦一擦，然后玻片立在纸巾上，让液体自然流下来，也蛮干净的啊~

TUNEL 反应

配制 TUNEL 反应液：25ul TdT + 475 ul FITC-12-dUTP 混匀。一人擦玻片一人配制反应混合液，Perfect！

然后处理组每个样本滴加 50ul 混合液，阴性对照组只滴加 50ul TdT。

赶紧避光，放湿盒里 37℃ 孵育 1 小时。

阳性对照组先滴加 100ul DNase I 反应液，室温孵育 15min，PBS 4×5min，擦干净再加混合液。

快去吃午饭~等愉快地吃完泡面回来一看，切片都干了!!! 液体都流向了一边，这湿盒一定是歪的~>_<~

向博士后师姐哭诉，师姐说，你们。。。可以先用疏水笔在样本周围画一圈啊。。。可以用封口膜盖上去啊。。。



好，我们重来一轮又走到了这一步。胆战心惊地揭下封口膜，PBS 冲洗 4×10min，然后擦掉。

复染

到这里，Protocol 上说，每个样本要滴加 300 微升 DAPI。

可是等我从-20℃取来 DAPI，一看是固体的!!! 还要现配!!! 还木有说明书!!!

师兄慌慌张张取来去离子水，然后用 PBS 200 倍稀释，可是.....



博士后师姐已经看不下去了，把她的即用型 DAPI 施舍给我们。

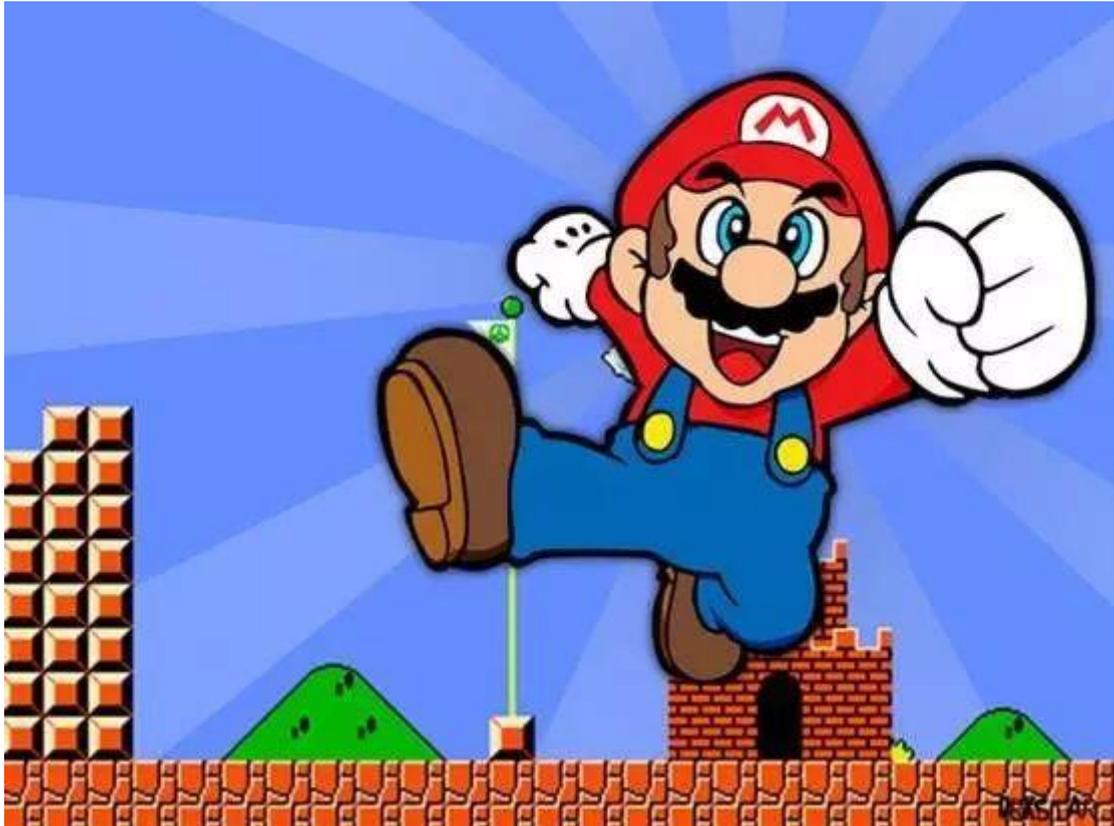
师兄边戴手套口罩边说：**DAPI 有毒，你闪开。**（☣v☣!! 毕竟我是有戴着两层手套还破了接触到二甲苯的经历.....）

注：所以实验前一定要检查好自己的药品和器材！！试剂是师兄买的，不造为什么会买到没有说明书的产品，难道我们金库空虚了~>_<~还有，DAPI 有毒，指的是它能快速进入活细胞中与 DNA 强力结合，有致突变、致癌的可能；而这也恰是它的工作原理，能将 DNA 染色。所以保护自己的同时，也要注意废液的妥善处理。

然后避光室温下放置 5min。

去离子水浸洗 4×10min。擦干玻片，用抗荧光衰减封片剂封片，指甲油固定盖玻片。

终于打通关了，可以拿到荧光显微镜下观察拍照了~



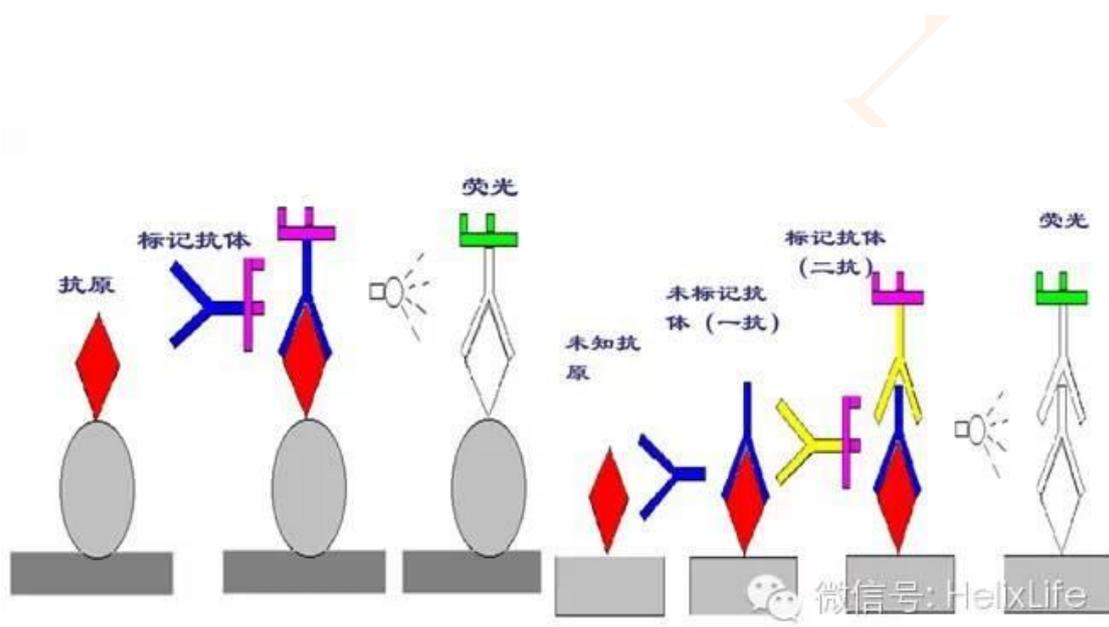
注：本故事纯属虚构，如有雷同，说的就是你。

如何用免疫荧光的方法征服萌妹子

作者：罗雨豪 张菲菲

眼见实验室刚来的师妹们都拜倒在大师兄的威信之下，每天跟着后面屁颠屁颠的学实验，一边学还一边投去羡慕崇敬的目光：“师兄，你好厉害，PCR 条带好亮”“师兄棒棒哒，western blot 杂出来了，而且还好干净”……这样下去怎么得了！看来我得拿出杀手锏，组会上秀秀免疫荧光的高大上照片来巩固一下自己的地位，哈哈。怎么让大家像我一样立马在实验室狂拽炫呢？我们今天就跟大家分享一下免疫荧光相关的实验经验！

简介：免疫荧光（immunofluorescence）技术是在免疫学，生物化学和显微技术的基础上建立的一项技术，再用荧光抗体（或者）抗原作为探针检测细胞或组织内相应的抗原（或抗体）。利用荧光显微镜可以看见荧光在细胞或者组织的表达，从而确认抗原或抗体的性质和定位。常用的方法有直接法和间接法。



方法	直接法	间接法
步骤	将荧光标记的特异性抗体（抗原）直接加在抗原（抗体）上，经一定的温度和时间染色，水洗-干燥-封片-镜检	先用已知未标记的特异性抗体（一抗）与抗原反应，再用标记的抗体（二抗）与其反应，形成抗原-抗体-抗体复合物，水洗-干燥-封镜-镜检
优点	操作简便、特异性高、非特异性染色少	敏感性高，目前多采用间接法
缺点	敏感性低	操作复杂

微信号: HelixLife

鉴于目前间接法的应用比较多，今天就给大家谈谈怎么用间接法做出让人心动的图，不多说了，直接上硬菜。

操作步骤:

- 1、调养好细胞状态,于前一晚种植与六孔板,若是用于转染质粒,推荐种植密度为 90%~95%,若是干扰片段或者 microRNA 的 mimics 等推荐种植 30%~50%密度
- 2、铺板后 24 小时内转染,超过 24 小时转染效率欠佳, 90%~95%密度一般 Lip2000 加 10ul/

孔，而 30%~50%加 5ul/孔，目的基因或片段根据样品说明书决定

3、转染 24 小时后将细胞用胰酶消化，种植于激光共聚焦小皿，若需要拍包膜表达的蛋白，密度可稍微高一点（60%~75%），若普通胞浆或胞核蛋白则密度低一点（20%~40%），很多同学担心铺皿后会被碰翻，有个小技巧可以推荐给大家，将皿置于洁净的六孔板中，对，你没听错，就是常用于细胞转染的六孔板，一方面可以起稳固作用，另一方面六孔板密封性良好，减少污染的可能

4、铺皿 24 小时后，吸去培养基，过滤级 PBS 清洗 2 遍

5、4%的多聚甲醛固定 15min，每个皿 200ul~300ul

6、过滤级 PBS 清洗 3 次，每次 5min，可上摇床

7、0.5%Triton 破膜穿孔，一般胞浆蛋白或胞膜蛋白 10min，胞核蛋白 13~15min

8、过滤级 PBS 清洗 3 次，每次 5min，可上摇床

9、吸净 PBS，山羊血清或 0.5%BSA 封闭 30min，个人偏好于用山羊血清封闭

10、吸净山羊血清，一抗（5%BSA 稀释）4 度孵育过夜

11、室温静置孵育 30min，吸去一抗，过滤级 PBS 洗 3 次，可上摇床

12、吸去 PBS，二抗（5%BSA 稀释）室温杂交 1 小时，从此步起后面所有操作需避光

13、吸去二抗，过滤级 PBS 清洗 3 次，可上摇床

14、吸去 PBS，DAPI（甲醇稀释）染色 5min

15、吸去 DAPI，过滤级 PBS 清洗 3 次，可上摇床

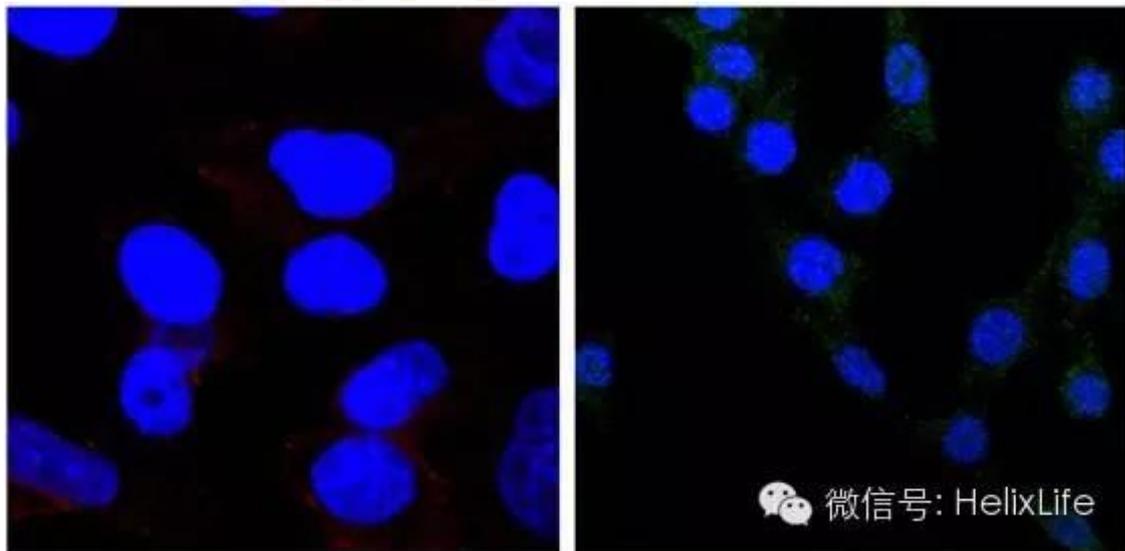
16、上机检测

如何做免疫荧光共定位

有同学想同时检测两个蛋白在细胞里的表达，看是否存在共定位现象，以此判断是否有可能存在相互作用。共定位操作基本与以上步骤一致，需要改变的是如下几步：步骤 10 中，需同时加入两种蛋白的一抗，而且**必须是不同种属的抗体**，比如我抗体 A 为鼠抗，那么抗体 B 就不能是鼠抗，常用的是兔抗。步骤 12 中，需同时加入**两种特异性二抗**，而且标记的荧光不能一样，比如加入山羊抗鼠的红光和山羊抗兔的绿光，这样若存在共定位，Merge 后会出现黄光。

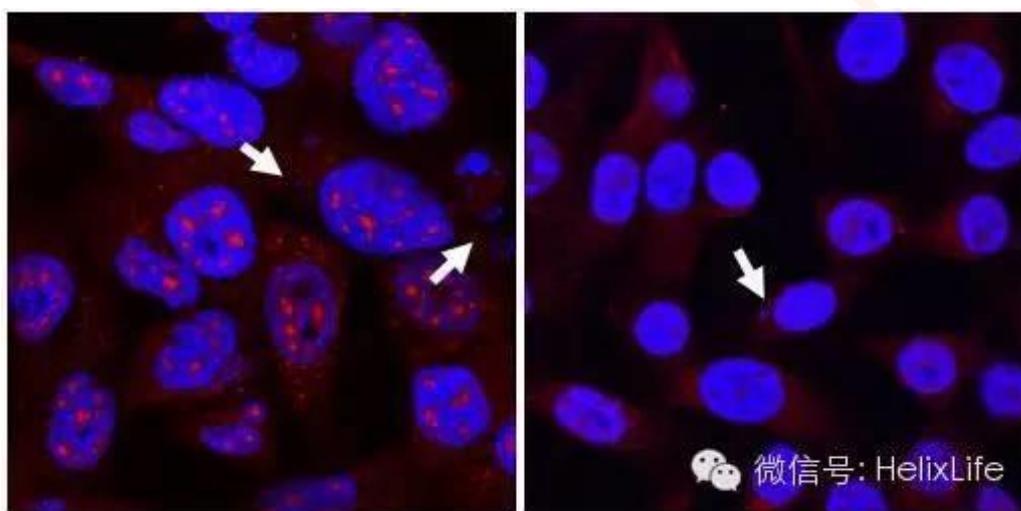
常见问题：

1、为什么我的镜下观察只有 DAPI 的蓝光，目的荧光几乎没有或者很弱？如图：



答：出现这种现象很有可能是抗体比例太低，需提高抗体浓度，可配合提高二抗浓度；共聚焦的激发荧光强度不够大；二抗孵育时是否是对应的种属，比如本来需要山羊抗鼠结果加为山羊抗兔

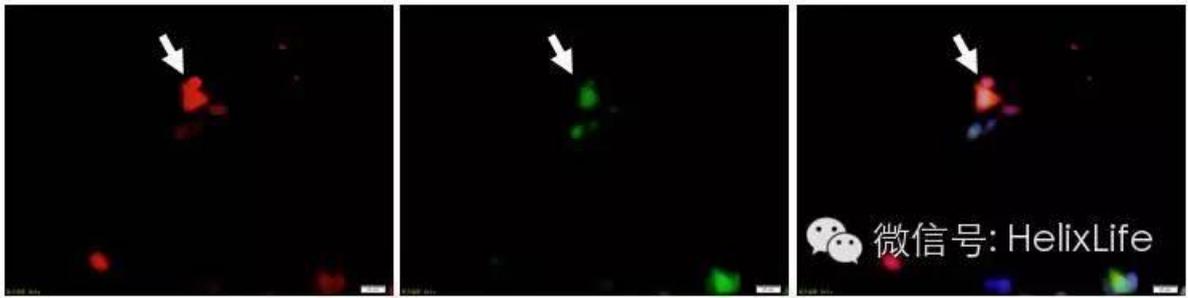
2、为什么我的细胞核周围总是存在有一些蓝色的小点点？比如：



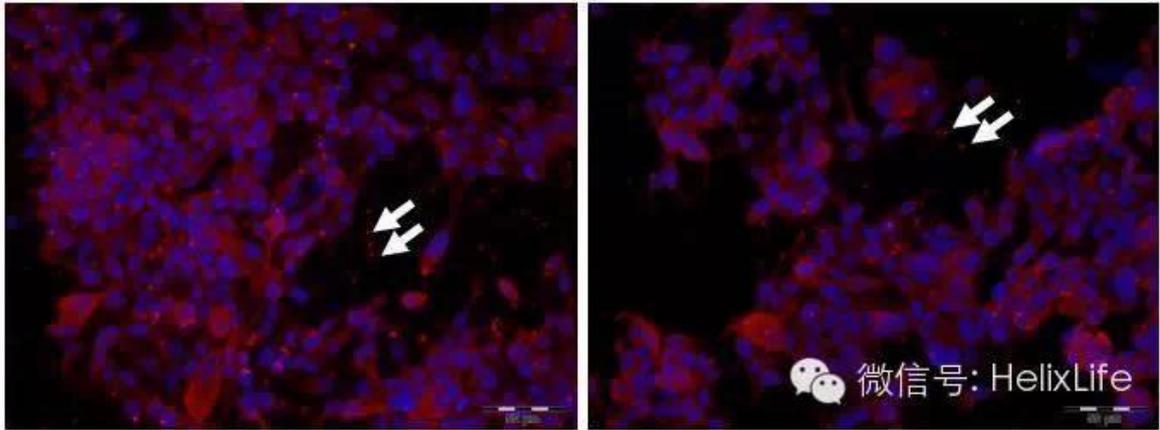
答：此种情况一般是支原体污染所致，建议用杀支原体药 2 周后再检测，或者通过提高共聚焦机器背景值来覆盖支原体荧光

3、共定位的视野该如何选择？

答：共定位时，首先判断哪些细胞是转染成功的，比如我过表达了蛋白 A，想做蛋白 A 和蛋白 B 的共定位关系，则在视野中寻找已成功转染蛋白 A 的细胞，一般荧光强度会显著高于周边其他细胞，再在这个细胞上观察蛋白 B 的表达，如图：

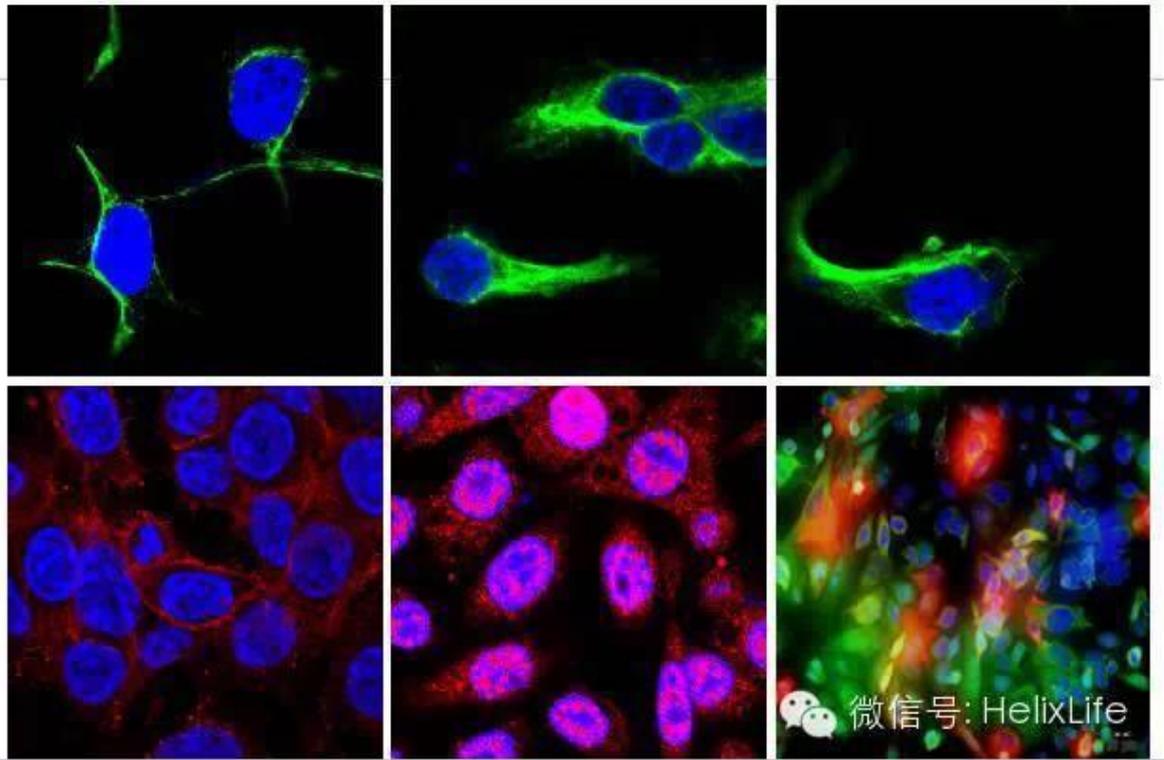


4、视野中细胞与细胞之间存在散在的发光点，如图：



答：有两种情况可造成：1，拍照时 PBS 量过少引起的非特异性；2，PBS 未过滤，未溶解的残渣黏附而导致

优秀作品展：



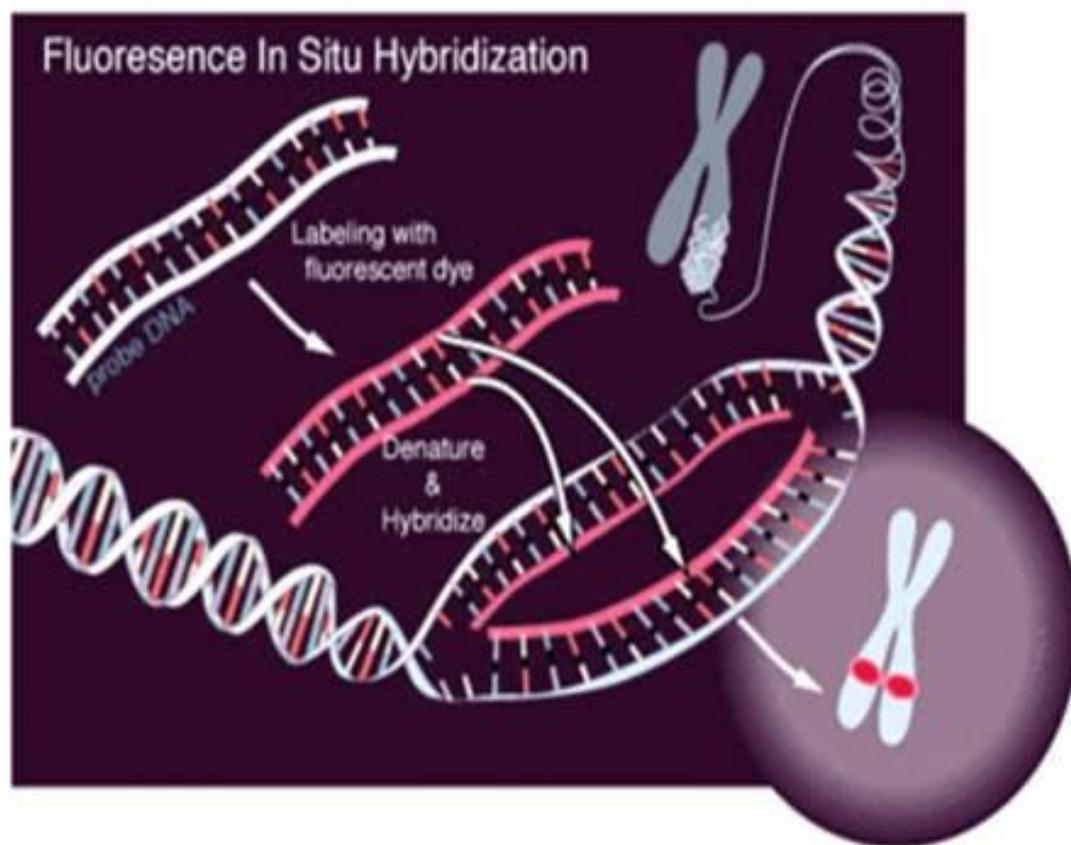
心得体会： 骚年们，心动不如行动。学好免疫荧光是高大上实验必备技能，当你的美图呈然纸上，就是萌妹子在你耳边高声的唱：“就这样被你征服。。”的时候！

经验 | 用钓鱼的心态，做荧光原位杂交实验

作者：毛博

荧光原位杂交（Fluorescence in situ hybridization, FISH），缩写为 FISH，就是鱼的意思，以此类推，做荧光原位杂交也叫钓鱼。其实，它的实验原理也挺像钓鱼的：它是用已知的标记单链核酸为探针，按照碱基互补的原则，与待检材料中未知的单链核酸进行特异性结合，形成可被检测的杂交双链核酸。由于 DNA 分子在染色体上是沿着染色体纵轴呈线性排列，因而探针可以直接与染色体进行杂交从而将特定的基因在染色体上定位。你们看，像不像在茫茫

大海里面钓鱼呢？探针像不像鱼钩呢？

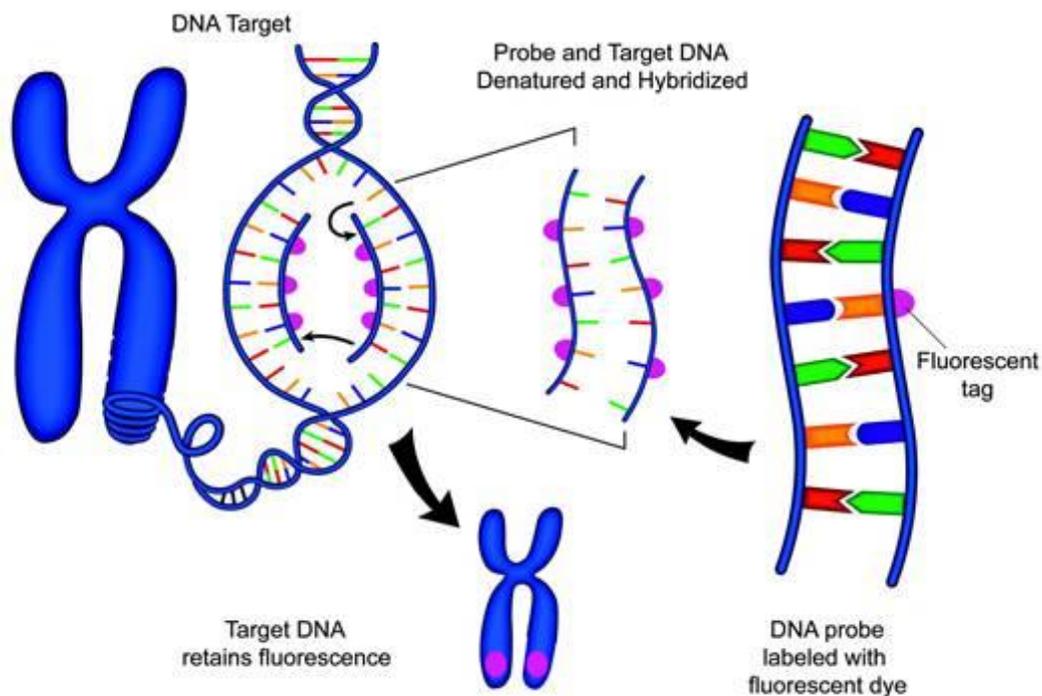


钓鱼实验的特点：操作烦琐，步骤简单。说它操作烦琐，是因为它的操作步骤巨多，每一步又需要相当长的时间，如果自己标探针的话每批标本大约三天时间（买试剂盒只需一天，但价格昂贵），你说是不是很烦琐？说它步骤简单则是因为 FISH 只要操作过程仔细，严格按照操作步骤操作，很容易做成功，比 PCR 要简单得多。

将烦琐的简单步骤做好也是有门道的，毛博这就将自己多年的经验总结分享给大家。

探针设计，量身定制：探针就是鱼钩。鱼钩不管用，还能钓得上大鱼吗？设计探针要根据实验的需要来进行，也就是说你要检测的目的基因决定你的探针设计。这就像是一个老练的渔夫会根据不同的鱼的种类来选择鱼钩一样。举个例子，如果目的基因大概是 1.8KB，可以直

接对 PCR 产物进行地高辛或生物素标记。也可以找技术服务公司帮你设计合成探针，每条探针设计合成大概 3500。



注意标本预处理细节：标本的处理也是关系到最后信号强弱的关键，但有些人不注意这些细节，结果造成荧光信号弱，难以分辨。这与预处理不当造成探针难以达到饱和而杂交难以进行有关。

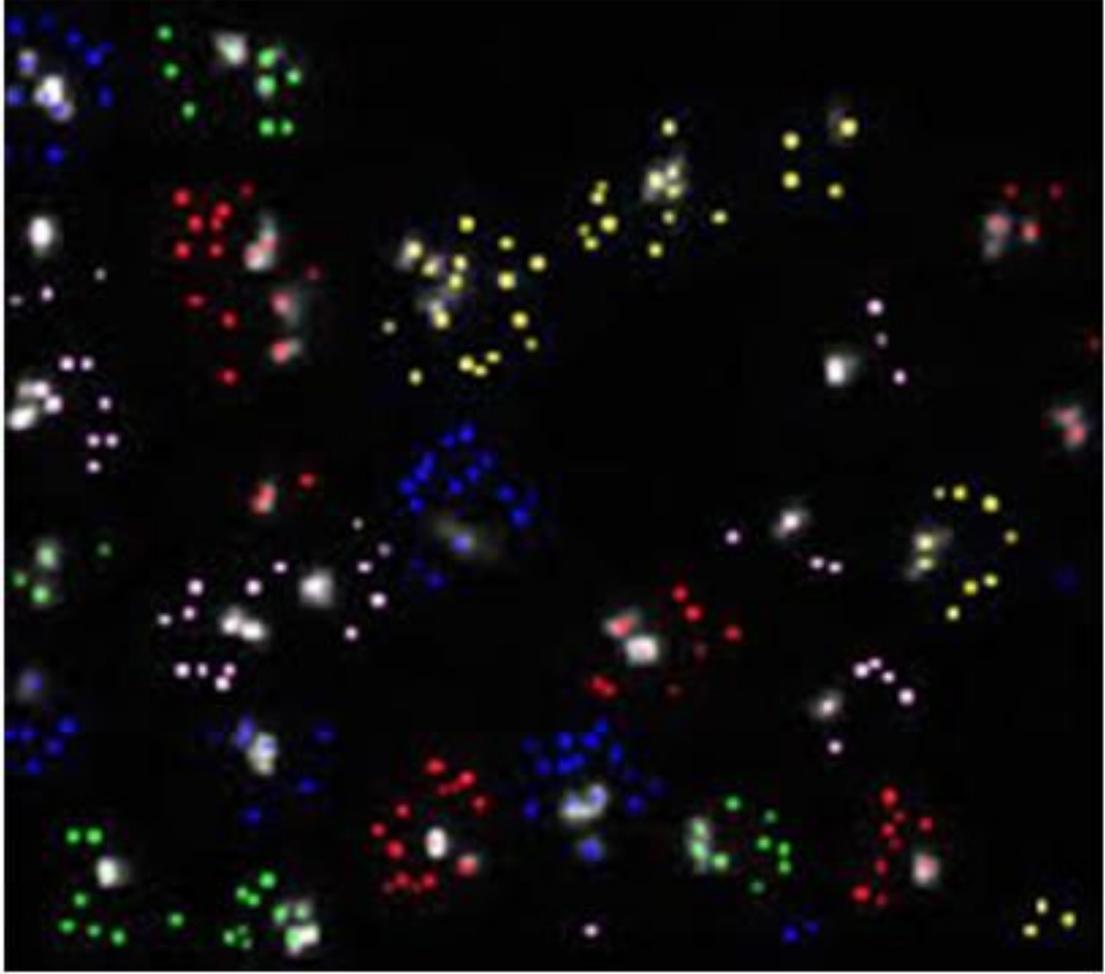
变性要规范：这一步是 FISH 关键中的关键。变性包括标本变性和探针变性，这两个步骤关系到 FISH 的成败，千万要严格按照操作规程进行，不但如此，特殊标本还要自己摸条件。试想变性不彻底，DNA 的双链都没能完全打开，杂交能顺利进行吗？

需要注意的就是以上这三点，还要唠叨一句：**操作荧光抗体时千万要避光**，否则将前功尽弃啊。举个例子吧。鱼竿，鱼钩，鱼饵都备齐了，也不能保证一定就能钓到大鱼儿。鱼儿上钩

了之后，还有一个把鱼拖上岸的最终过程。在 FISH，就是使用荧光显微镜观察和记录结果。在正常情况下，目前商业化的探针即使是杂交以后，荧光信号能保存半年之久。有时候，信号也会急剧衰减，几分钟后就不见了。就像鱼儿一开始上钩了，马上又挣脱鱼钩，重返大海了。出现这种情况，就是由于没有严格避光。因此在观察和记录的时候，要尽可能地在暗室里操作。这和以前洗照片是一个原理哈。



当然，也有偷懒的招术。那就是：**抗荧光淬灭剂（antifade）**，在封片观察的时候加入，可以**延缓荧光的淬灭**。毛博还要唠叨一句：如果一次没有成功，可以将探针洗掉，再进行杂交。这又像极了钓鱼。第一次鱼儿脱钩了，我们可以换个鱼钩再钓，直到钓到大鱼为止。FISH 其实做出来还是很漂亮很漂亮的。下面就是一张 FISH 的图，让我们一起感受一下生物学的大美。



大家看，像不像浩瀚的宇宙，璀璨的星空呢？其实，做 FISH 染出了一张漂亮的片子，也和渔夫钓上了一条大鱼一样。满满的成就感。

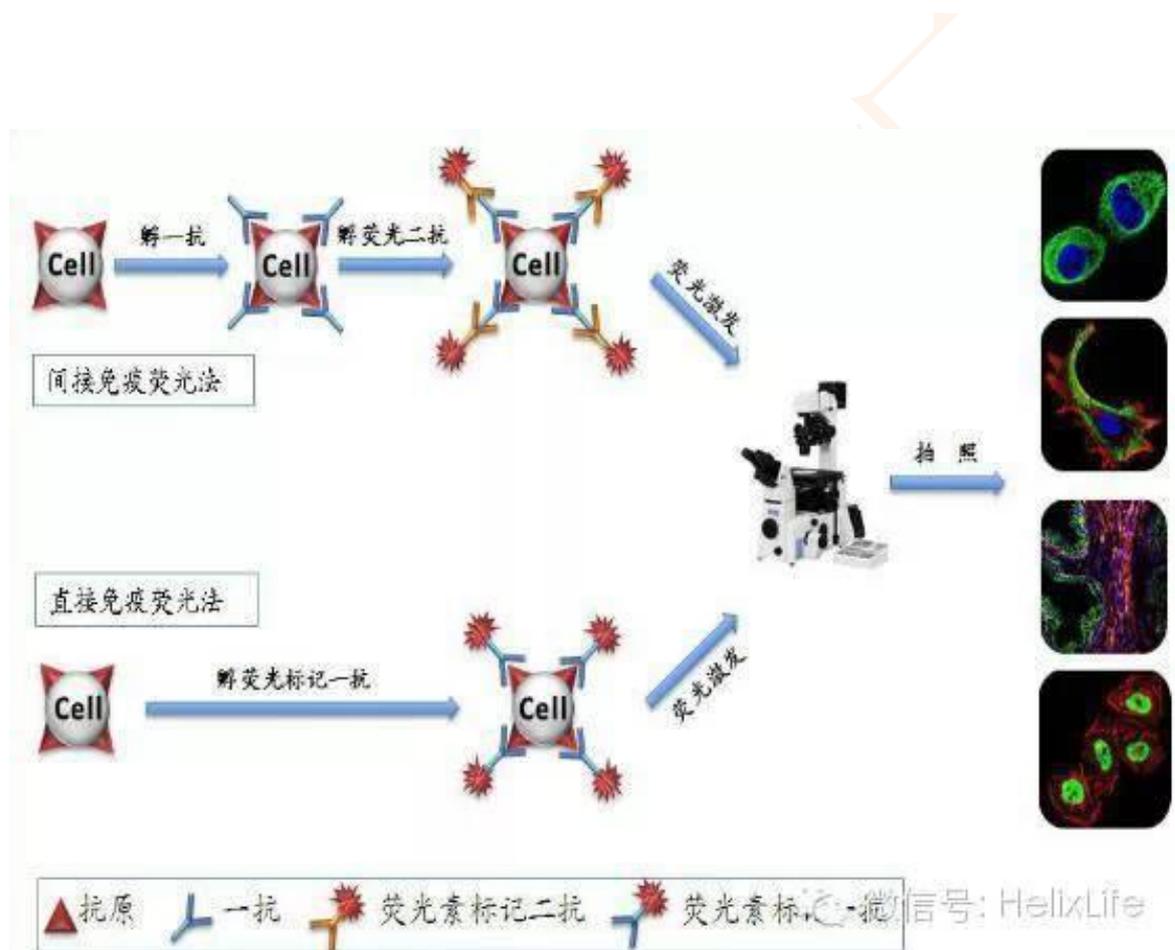
干货 | 轻松七步掌控免疫荧光

作者：中子

免疫荧光技术（Immunofluorescence technique）又称荧光抗体技术，它是标记免疫技术中

发展最早的，在**免疫学、生物化学和显微镜技术**的基础上建立起来的一项技术，对抗原进行细胞定性和定位分析。Coons 等于 1941 年首次采用荧光素进行标记而获得成功。自此该技术在科研领域发光发热啦！

免疫荧光主要有如图两种检测方法：



新手在开始免疫荧光实验的时候，经常被例如细胞铺板密度、细胞固定以及如何确保抗体特异性等问题困扰，以下是中子几年实验下来的一些小小建议，希望可以帮助小伙伴们获得更好的实验结果：

1、对于细胞爬片的免疫荧光选择合适的细胞种板密度

细胞数过多时，生长过密，细胞结构不清，易导致染色背景深，细胞数过少时，会使贴壁贴壁不佳，状态不好，一般以六孔板为例， $(1-5) \times 100000$ 比较适宜。

2、细胞更好地固定

为达到最佳检测效果，细胞需要经过固定和通透，此步骤很重要，现在固定液选择比较多，有 4%多聚甲醛、甲醇、乙醇、丙酮以及丙酮和甲醇混合液（1: 1），但效果最好的应用最多的还是推荐 4%多聚甲醛。

3、优化封闭液

为防止内源性非特异性蛋白抗原的结合，需要在一抗孵育前先用血清（与二抗来源一致 如一抗为兔抗，二抗为山羊抗兔，那么封闭液就用山羊血清）封闭，减弱背景着色。

血清封闭的时间是可以调整的，一般为 30min。

4、抗体的特异性，设立对照组

这个关系到结果的准确性，一定要选择特异性强的抗体，这样可以避免高背景和不理想的蛋白定位，并且选择合适的抗体稀释比例，一般 1: 20-100 之间比较合适，但还是要自行摸索最佳梯度，建立最好的稀释比例，抗体浓度过低，会导致产生的荧光过弱，影响结果的观察噢！加入荧光抗体后一定要记得避光!!! 每次试验时，建议设置以下三种对照：

- ① 阳性对照：阳性血清+荧光标记物
- ② 阴性对照：阴性血清+荧光标记物
- ③ 荧光标记物对照：PBS+荧光标记物

5、洗涤也要重视

为了防止一抗、二抗等试剂残留而引起非特异性染色，所以适当地加强清洗（延长时间和增多次数）尤为重要，一般在一抗的清洗是 5min*3 次；

注意：

- (1) 单独冲洗，防止交叉反应造成污染。
- (2) 温柔冲洗，防止切片的脱落；
- (3) 冲洗的时间要足够，才能彻底洗去结合的物质。
- (4) PBS 的 PH 和离子强度的使用和要求，建议 PH 在 7.4-7.6 浓度是 0.01M。（中性及弱碱性条件（PH7-8）有利于免疫复合物的形成，而酸性条件则有利于分解；低离子强度有利于

免疫复合物的形成，而高离子强度则有利于分解）

6、复染和封片是最后收尾工作

复染的目的是形成细胞轮廓，从而更好地对目标蛋白进行定位（一般常用 DAPI 复染）。而为了长期保存，我们一般用缓冲甘油等封片，此外还有专门的抗荧光淬灭封片液（如博士德等公司）；同时还要注意避免产生气泡。

7、见证“奇迹”的时刻——荧光显微镜下观察实验结果

荧光染色后一般在 1h 内完成观察，或于 4℃ 保存 4h，一般标本在高压灯下照射超过 3min，就有荧光减弱现象，经荧光染色的标本最好在当天观察，随着时间的延长，荧光强度会逐渐下降。

6.7 细胞转导

干货 | 细胞转染效率低下的八个大坑

作者：毛博

细胞转染是细胞生物学和分子生物学的一种常用的技术手段。而转染效率低下却是实验狗们经常遇到的问题，尤其是原代细胞转染，更是因为难度大，号称谁碰谁死，而令人谈虎色变。

不，应该是谈原代细胞色变。

细胞转染的 protocol 教科书和实验手册上面都有，毛博不想再重复了。这里，毛博根据自己做细胞转染近 10 年的经验和体会，总结出了导致转染效率低下的八大坑，以及避免掉坑里的一些做法。都是干货哟。

1.准备不足

做脂质体转染的时候，在开展正式实验前要多做预试验，优化转染条件。优化转染条件包括：脂质体的用量、DNA 密度、细胞密度、脂质体和 DNA 混合孵育时间等等。

2.电压过大

做电转的时候，如果电压太大，往往会发生细胞大量死亡的情况。不同的细胞，需要的电压是不一样的。这就要求我们多做预实验，多摸索条件。对于大多数细胞来说，其最佳电压位于 250-1250v/cm。另外，就是进行转染的细胞应该处于对数生长期。处于对数生长期的细胞的抗损伤能力是最强的。细胞浓度应该处于 5×10^6 到 1×10^7 / mL 之间。每次转染的质粒应该控制在 4-6 μg ，如果 $> 10 \mu\text{g}$ ，转染效率也大大降低。电击后，应该将 DNA 和细胞混合液在室温下放置 10 分钟，使细胞恢复损伤。

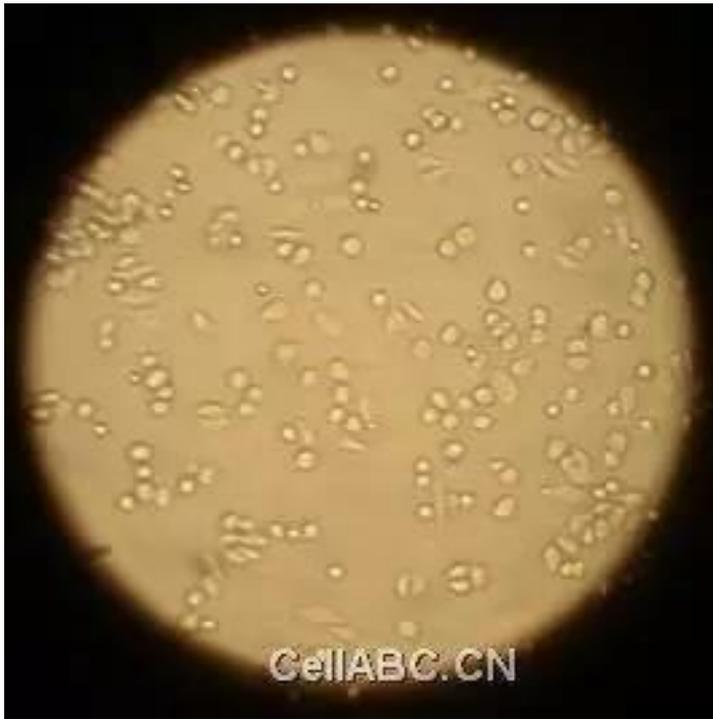
3.试剂过期

有时候转染效率低下，还要考虑会不会存在试剂过期的情况。毛博当年做转染整整半年，百思不得其解。最后发现，原来是 Lipofectamine 2000 过期了。换了之后，立马成功。根据我的经验，尽量使用开封半年内的 Lipofectamine 2000，因为过了半年后，就算没有过失效期，但是细胞毒性大大增加，而转染效率却大大下降。千万不要为了省钱，影响实验进度哈。



4.未加血清

转染后未及时加入血清，会导致细胞大量死亡。一般要在转染后的 4-6 小时换液且换为有血清的培养基。根据毛博的经验，其实也可以在原来的无血清培养基里面滴加血清。这个时候，最好不要换液，不要打扰细胞，让它安安静静地休息。但是也不能过早加入血清。过早的话，会引起未转染的细胞疯狂生长。那么，什么是最佳时机呢？在 20%的细胞变圆的时候，就是加血清的最佳时机。



5. 细胞污染

细胞污染也是造成细胞死亡，转染效率低下的一大原因。首先，转染细胞用的质粒必须保证无菌。而现在市场上的一般的质粒提取试剂盒都做不到绝对无菌。毛博这里再贡献一个独门绝招：将提完质粒后或者提的最后一步，用 75% 乙醇沉淀，这样就除菌了。

6. 质粒不行

转染用的质粒首先要保证数量，一般为 2 μg 以上。质粒纯度不够或者含有细菌 LPS 或其他对细胞有毒害作用的物质，也会影响转染效率。这个时候，就应该对质粒进行纯化和浓缩。

细胞转染率低？小心花样式“做死”！

作者：子非鱼

初出茅庐，才疏学浅，小鱼的师弟曾经做过一件令老板七窍生烟的事情，用了大半管的脂质体法(价值 2K 人民币)在 30 瓶细胞中做转染，转染 24 小时后，显微镜下看，顿时傻眼了，为什么俺的细胞转染率这么低？

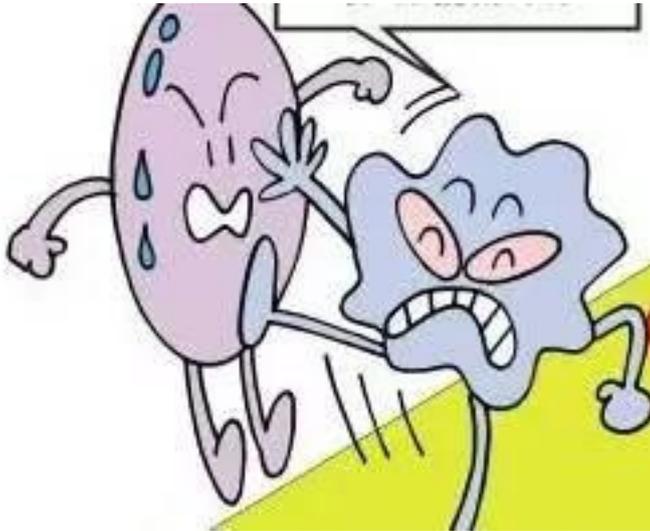
万念俱灰，最后无奈地把细胞全扔掉。结果老板知道了，就只有这个表情：



话说回来，细胞转染是否成功的影响因素很多，如需要转染的细胞类型（对于困难的细胞系尤其如此），需要被转染的分子（DNA、RNA、寡核苷酸、蛋白质），转染试剂等。但无论在何种情况下，转染的成功均取决于转染效率、低细胞毒性以及重现性这几个要素。

小鱼今天就试剂、细胞和 DNA 方面来聊聊造成细胞转染率低的原因。

转染试剂跟细胞系不 match



转染试剂跟细胞系也是讲究配合默契的，使用同一种试剂，不同细胞系转染效率通常不同。而每种转染试剂都会提供一些已经成功转染的细胞株列表和文献，通过这些资料可选择最适合实验设计的转染试剂。

花式“做死”细胞

1. 细胞已经传了“无数代”

因为懒,或者说豪迈不羁的个性,师兄曾以为荣的“细胞已经传了无数代”,结果老仰天长啸:为毛细胞转染效率低?细胞培养在实验室中保存数月和数年后会经历突变,总染色体重组或基因调控变化等而演化。这会导致和转染相关的细胞行为的变化。最适合转染的细胞是经过几次传代后达到指数生长期的细胞,细胞生长旺盛,最容易转染。

2. 不懂得把握时机

就像把妹也要看好时机,不要在人家还跟男票你侬我依的时候表白。转染也有适当的时机,相比较非分裂细胞——分裂细胞往往要比静止细胞更易于摄取并表达外源 DNA。因此对大多数转染操作而言,细胞都在转染当天或前一天种板。

同样重要的是细胞在种板进行转染时不应处于过度生长的状态,如癌细胞数量过多,互相叠加,这时细胞君堵得慌,吃不饱(营养物质耗竭),环境又恶劣(代谢废物积聚),健康生长无从谈起,哪来那么多精力跟你玩转染。

因此,一定要在最适细胞密度时转染,才能获得较高的转染率。不同的转染试剂,要求转染时的最适细胞密度各不相同,即使同一种试剂,也会因不同的细胞类型或应用而异。因此如果选用新的细胞系或者新的转染试剂,最好能够进行优化实验并为以后的实验建立一个稳定方法,包括适当的接种量和培养时间等等。

3. 各种微生物来捣乱

培养物可被细菌、酵母、真菌、病毒、支原体、甚至其他细胞种类所污染。各种污染都会导致产生错误的结果。支原体污染很普遍,它可改变细胞生长特性,酶的作用途径,细胞膜的组成,染色体结构,其结果致使非典型转染或转染效率偏低。和细菌及真菌不同,支原体这小鬼就因为瘦小可以胡作非为,能够通过大多数的无菌滤膜;还对常用抗生素有抗药性;而

且污染无法通过视觉检查发现。所以必需进行支原体污染的常规筛查。

4.交叉污染

如果同一个实验室同时培养不同种类的细胞，那就有可能发生这样的情节：**A** 细胞到 **B** 细胞家串门然后就在那落地生根，过了几个月 **B** 的子子孙孙完全占据了 **A** 的底盘。

5.抗生素会害死细胞君

本着要好好呵护细胞的心，为防止各种污染给他们添加抗生素，但这真是好心做坏事了。比如青霉素和链霉素，一般对于真核细胞无毒，但有些转染试剂增加了细胞的通透性，使抗生素可以进入细胞。这可间接导致细胞死亡，造成转染效率低。

6.可疑分子--血清的影响

有些转染技术如脂质体转染在有血清存在情况下效率很低，因此在转染前要除血清。



DNA 质量

1. DNA 不纯，带亲戚上阵

一般的转染技术（如脂质体等）基于电荷吸引原理，如果 DNA 不纯，带亲戚上阵，如少量的盐离子，蛋白，代谢物，这些污染都会显著影响转染复合物的有效形成及转染的进行。

2. 不懂得防内奸（内毒素）

内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁上的一种成分，我们目前用的质粒大多是从大肠杆菌中提取出来的，在提取质粒的过程中如果不经过特殊步骤的处理，是很难将内毒素去除干净的。如果提出来的质粒中残存内毒素，在真核细胞转染的过程中就会对细胞造成伤害，即使质粒浓度

再高，用最好的转染试剂，转染效率也好不到哪去！

就只有这些吗？不，影响转染的大头是什么？你肯定心里有数，因此，小鱼接下来会跟大家分享载体构建、转染方案和时间进度等其他影响转染的因素，敬请期待.....

干货 | 手把手教你做细胞转染（含操作指南）

作者：子非鱼

上周小鱼细述了影响细胞转染效率的三大重要因素（可查看《细胞转染率低？小心花样“做死”！》的文章），然而仍有不少研究僧曾在这个坑中跌爬滚打，被摔的鼻青脸肿。说到底转染方法太过五花八门，让人眼花缭乱。那么为了平安度过这道坎儿，选择一个适合的细胞转染方法才是至关重要的。

转染方法大比拼

众所周知，细胞转染技术主要分为三大类：化学法、物理法及生物学法。但是没有一种方法是放之四海而皆准的，即没有任何方法适用于所有细胞和所有实验。因而只有依据自己的实验要求选择理想的方法，才能获得漂亮的实验结果。



接下来，就对其中几种经典转染方法进行一一介绍。

1、DEAE-右旋糖苷法

常言道：同性相斥，异性相吸。因而，当带正电的 DEAE-右旋糖苷与核酸中带负电的磷酸骨架相遇，妥妥的火花四射，而后会被细胞膜抱团相拥并通过细胞内吞作用迎客到家。该法可用于瞬时转染，操作相对简单、结果可重复，但是对细胞有一定的毒副作用，且转染时需要血清。

DEAE-右旋糖酐介导转染的工作流程



2、磷酸钙法

通常穿了“隐身衣”核酸分子在“照妖镜”磷酸钙的作用下可形成“肉眼可见”的磷酸钙-DNA 共沉淀，可使共沉淀中浓缩 DNA 分子与细胞表面结合并通过内吞作用进入细胞。该法可用于瞬时或稳定转染。然而因其对 pH、温度和缓冲液盐浓度的微小变化十分敏感，所得结果容易出现差异，且对许多类型的细胞培养物(尤其是原代细胞)具有细胞毒性，转染效率较差。

科研资源网

磷酸钙共沉淀的工作流程

将核酸与氯化钙在磷酸盐缓冲液中混合，同时控制好pH、温度等条件

室温孵育，生成浓缩DNA的极小不溶性颗粒沉淀

将颗粒型沉淀分散到细胞中，促进DNA粘附在细胞表面

共沉淀通过内吞作用进入胞浆

分析细胞瞬时基因表达或者选择稳定性转染

3、人工脂质体法

带正电的脂质体与核酸带负电的磷酸基团形成复合物，进而可被细胞内吞稳定转染/瞬时性转染。这种方法几乎适用于所有细胞，转染效率高、重复性好，但转染时需要去除血清，转染效果随细胞类型变化大。



人工脂质体介导转染的工作流程

在单独试管中分别稀释核酸及转染试剂

脂质体与核算的磷酸骨架结合，形成复合物

脂质体上的正电荷有助于复合物与细胞膜结合

复合物通过内吞作用进入胞浆

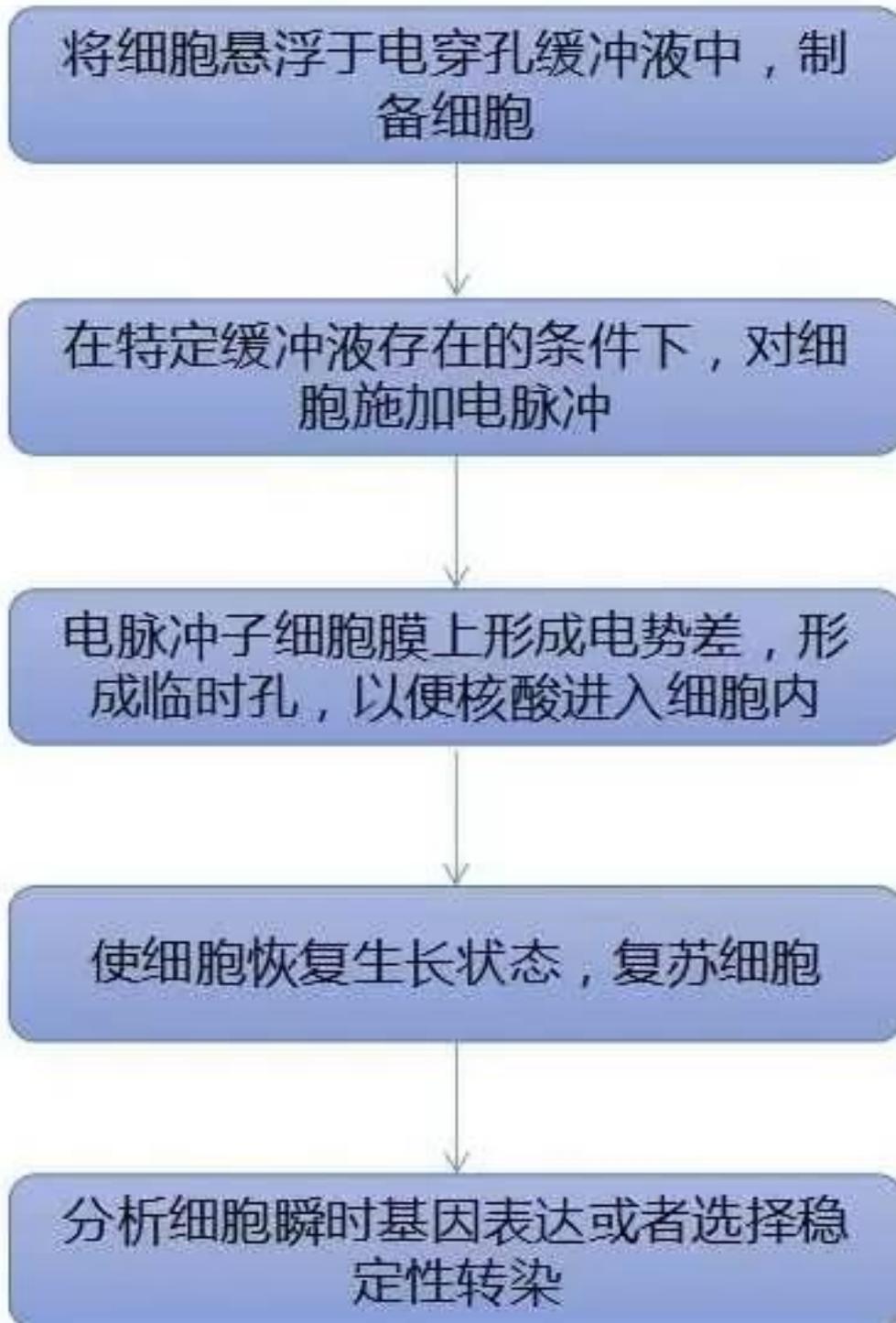
分析细胞瞬时基因表达或者选择稳定性转染

4、电穿孔法

有时，细胞有些“油盐不进”，就是不开放门户给核酸放行，此时各位小伙伴可采用一些强硬手段—电穿孔法。此法利用高脉冲电压破坏细胞膜电位，使得 DNA 通过膜上形成的小孔导入稳定/瞬时性转染，适用于所有类型的细胞，但细胞致死率高，DNA 和细胞用量大，且需根据不同细胞类型优化电穿孔实验条件。

其他物理基因输送法还包括基因枪、直接显微注射等方式。前者又称为粒子轰击，可将包裹着核酸的显微重金属颗粒告诉射入受体细胞内，适用于瞬时性转染。该技术可需要昂贵的设备，且细胞死亡率较高。而后者则是通过精细的注射针将核酸送入胞浆中，一次只能输送一个细胞中，适用于构建转基因动物或输送人工染色体。

电穿孔的工作流程



5、病毒转导法

一般，病毒介导的转染也称之为转导，它为难以转染的细胞类型提供了一种方法，可用于蛋白质过表达或抑制，是临床研究中最常用的方法。它通过侵染宿主细胞将外源基因整合到染色体中，可用于难转染细胞、原代细胞的稳定性转染。

科研资源网

病毒转导的工作流程



细胞转染操作指南：以脂质体为例

1.转染前

首先，准备细胞、质粒和实验所需试剂。细胞最好取实验室里已经验证的易转染细胞株，如 COS-1/Hela/CHO-K1 细胞，同时实验前要重新复苏一株低传代细胞来确保该细胞株未被其他细胞和微生物污染。

选择表达质粒载体如 β -gal 载体，GFP 载体等时，要先确保该质粒能在所选的细胞系中表达良好。同时质粒纯化时要注意纯化过程中勿使双链断裂以及无核酸酶和内毒素污染。

同时准备新鲜的培养基，使用前用 0.22 μ m 滤膜过滤培养基来确保培养基无污染。细胞培养过程中勿加抗生素，且需要不断监测细胞的生长情况。当细胞密度达到 50-80%时，可用于细胞转染。

2.转染中

首先，由于不同质粒和脂质体的最佳搭配比例不同，转染前应该做预实验来摸索一个最佳配比。作预实验时，按照质粒：脂质体=1:1、1:2、1:3、1:4 的梯度来检测最佳转染比例，如下表所示。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A 试剂对照	10 μ l	8 μ l	6 μ l	10 μ l	8 μ l	6 μ l	10 μ l	8 μ l	6 μ l	10 μ l	8 μ l	6 μ l
B 4:1	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l
C 3:1	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l
D 2:1	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l
E 1:1	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l
F DNA 对照	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l
G 空白对照 (仅含细胞培养物)	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l	10 μ	8 μ l	6 μ l
转染复合物制备时间	15 分钟孵育			20 分钟孵育			25 分钟孵育			30 分钟孵育		

同时也需要设立对照实验，如试剂对照：仅加入转染试剂，可确定转染试剂对细胞毒性。DNA 对照：仅加入 DNA，确定制备 DNA 的质量是否对细胞存在影响。空白对照：用空载体制备转染试剂复合物（建议 3: 1 的比例），确定转染后细胞生理或功能的变化是源于目标基因，还是源于转染过程本身。

其次，在正式实验中，需要小心轻柔将 lipo2000 加到培养基中并轻轻混匀，避免暴力吹打，使得脂质体失效。转染时各种培养皿添加的质粒和脂质体参考量见下表：

Culture vessel	Surf.area per well	Shared reagents		DNA transfection		RNAi Transfection	
		Vol.of plating medium	Vol.of dilution medium	DNA	lipofect-amine 2000	RNA	lipofect-amine 2000
96-well	0.3 cm ²	100 ul	2× 25 ul	0.2 ug	0.5 ul	5 pmol	0.25 ul
24-well	2 cm ²	500 ul	2× 50 ul	0.8 ug	2.0 ul	20 pmol	1.0 ul
12-well	4 cm ²	1 ml	2× 100 ul	1.6 ug	4.0 ul	40 pmol	2.0 ul
6-well	10 cm ²	2 ml	2× 250 ul	4.0 ug	10 ul	100 pmol	5 ul
60-mm	20 cm ²	5 ml	2× 0.5 ml	8.0 ug	20 ul	200 pmol	10 ul
10-cm	60 cm ²	15 ml	2× 1.5 ml	24 ug	60 ul	600 pmol	30 ul

3.转染后

首先，转染 24h 后需要观察转染过程对细胞毒性情况，如果毒性较高，可能是由以下原因造成的：

*初期细胞接种浓度太低

*转染复合物加入量过高，因为不同细胞对转染的敏感度不同

*转染后 6 小时需更换培养基，一是 lipo2000 具有一定毒性，二是培养基需要更换成有血清培养基。

其次，转染后需要对转染效率进行检测，比如观察转染后细胞荧光情况、qPCR 验证或 WB 检测敲减或者过表达蛋白。

*对于 β -gal 表达载体：可用 β -gal 染色试剂盒进行细胞染色并观察细胞。转染效率高的细胞在染色孵育后 3-4h 即可观察到，转染效率低的细胞则需要更长的孵育时间。

*对于 GFP 表达载体：荧光显微镜下观察细胞。如果细胞能在显微镜下被观察到，至少需要有 10⁴-10⁵ 拷贝的 GFP 蛋白表达，表达太弱的细胞无法镜检。GFP 表达情况也能使用流式细胞仪进行检测，同时可加入 PI 进行染色以监测死细胞情况。

最后，若是转染后发现转染效率不高，可以通过两种方法增强转染效率。

(1) 复转染，即转染后 12-24 小时再次进行转染，前提是该细胞对脂质体的耐受性较好，转染后细胞死亡数较少。

(2) 通过药筛来杀死未转入成功的细胞。前提是该质粒带有抗生素抗性的基因。

附录：转染中可参考的数据

贴壁细胞接种数目	
培养容器规格	建议接种细胞数
6孔板	$0.8-3 \times 10^5$
12孔板	$0.4-1.6 \times 10^5$
24孔板	$2-8 \times 10^4$
48孔板	$1-4 \times 10^4$
96孔板	$0.5-3 \times 10^4$
384孔板	2000-5000
60mm 培养皿	$1.5-6 \times 10^5$
100mm 培养皿	$1-2 \times 10^6$

悬浮细胞和巨噬细胞接种数目	
培养容器规格	建议接种细胞数
96孔板	$3-6 \times 10^4$ 悬浮细胞
24孔板	$1-2 \times 10^5$ 悬浮细胞
96孔板	$1-6 \times 10^4$ 巨噬细胞
24孔板	$0.4-2 \times 10^5$ 巨噬细胞
96孔板	$3-6 \times 10^3$ 分化巨噬细胞
24孔板	$1-2 \times 10^4$ 分化巨噬细胞

原代细胞接种数目	
培养容器规格	建议接种细胞数
6孔板	2×10^5
12孔板	1.2×10^5
24孔板	6×10^4
48孔板	4×10^4
96孔板	2×10^4

一文包揽细胞转染那些事儿（含操作视频）

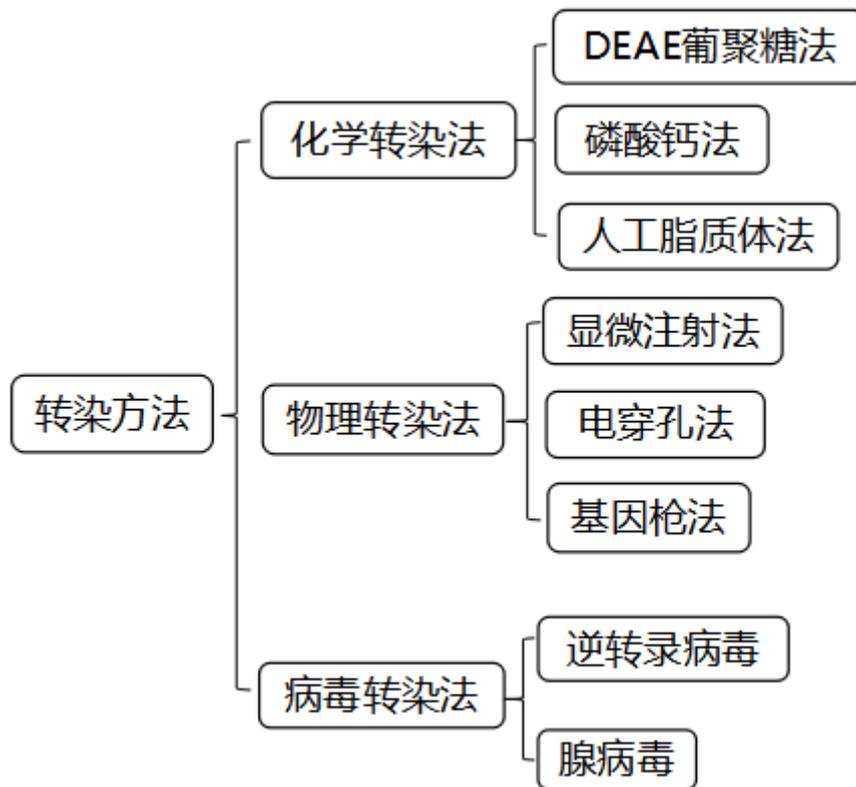
作者：子非鱼

细胞转染对初接触细胞实验的菜鸟而言，是一道难过的坎儿。当科研汪们在这个坎儿上摔了无数次的跟头后，心里的阴影面积便被无限扩大，似乎只要碰到细胞转染就永无翻身之日。然而现在就放弃该实验还为之过早。正所谓授之以鱼不如授之以渔，同时也为了让大家成功跨过这道坎儿，小鱼这就把做细胞转染的技巧分享给大家，让你分分钟从菜鸟变成细胞转染达人！

细胞转染是指将 DNA 或 RNA 导入真核细胞中，用于研究基因功能和蛋白表达分析等，可依据是否整合到细胞基因组，分为瞬时转染（24-96h）和稳定转染。

	瞬时转染	稳定转染
目的	快速分析	为获得稳定表达外源基因的单细胞克隆
目的DNA与宿主染色体	未整合	整合
表达持续时间	随细胞分裂而稀释至丢失 只维持48-72h	随宿主细胞本身基因组一样复制、转录、翻译并可被稳定遗传
筛选办法	抗生素抗性	抗生素抗性

细胞转染方法类型及不同之处如下面两张图片所示，大家可以依据自己的实验需求来选择不同的实验方法。



转染方法	原理	应用	特点	
DEAE-右旋糖苷法	带正电的DEAE-右旋糖苷与核酸带负电的磷酸骨架相互作用形成的复合物被细胞内吞	瞬时性转染	相对简便、结果可重复 但对细胞有一定的毒副作用 转染时需要血清	
磷酸钙法	磷酸钙DNA复合物吸附细胞膜被细胞内吞	稳定转染 瞬时性转染	不适用于原代细胞 操作简单但重复性差 有些细胞不适用	
电穿孔法	高脉冲电压破坏细胞膜电位，DNA通过膜上形成小孔导入	稳定转染 瞬时性转染 所有细胞	适用性广但细胞致死率高，DNA和细胞用量大，需根据不同细胞类型优化电穿孔实验条件	
阳离子性的脂质体法	带正电的脂质体与核酸带负电的磷酸基团形成复合物被细胞内吞	稳定转染 瞬时性转染 所有细胞	适用性广，转染效率高 重复性好但转染时需要血清 转染效果随细胞类型变化大	
病毒介导法	通过感染宿主细胞将外源基因整合到染色体中	逆转录病毒法	稳定转染 特定宿主细胞	可用于难转染的细胞、原代细胞，体内细胞等 但携带基因不能太大 细胞需处分裂期 需考虑安全因素
		腺病毒法	瞬时转染 特定宿主细胞	可用于难转染的细胞 需考虑安全因素

其中，实验中应用最广泛的是脂质体介导的细胞转染。

细胞转染具体实验步骤的视频：

一般影响转染效率的主要因素：细胞、血清、抗生素、核酸质量与数量、转染技术。只要在这几个因素上多加注意，就可以避免掉进细胞转染效率低下的大坑。

细胞

1. 选择**传代次数较低并处于对数生长期的细胞**进行转染。对大多数细胞而言，均需要在转染当天或前一天铺板，第二天上午进行转染，48h 后收集细胞进行功能检测。对于原代细胞，可用促有丝分裂刺激物进行细胞活化。
2. 对于贴壁细胞，一般要求在转染前一日，用胰酶处理为单细胞悬液，重新接种于培养皿或瓶，最好在转染前 4 小时换一次新鲜培养液。
3. 支原体污染会严重降低细胞转染的效率，且支原体不会像细菌污染那么明显，因而**转染前**可用环丙沙星处理细胞以除去支原体。

4. 细胞转染时需要一定的细胞密度，以 **70-90%（贴壁细胞）** 或 **$2 \times 10^6 - 4 \times 10^6$ 细胞/ml（悬浮细胞）** 为宜。

核酸质量和数量

1. 选择**高纯度（OD₂₆₀/280 比值在 1.8 以上）且去除内毒素的 DNA** 进行细胞转染。如果 DNA 的纯度差，则其携带的少量的盐离子、蛋白、代谢物污染都会显著影响转染复合物的有效形成及转染的效率。又因含有内毒素的质粒会对细胞有很大的毒性作用，因而建议使用 QIAGEN 公司的超纯质粒抽提试剂盒对 DNA 进行纯化。

2. **DNA 分子构象也会影响转染的效率。**超螺旋的质粒可达到较高的瞬时转染效率，线性质粒则更容易整合到宿主基因组中。

3. 当转染的 DNA 会编码对细胞有毒害作用的产物时，可使用**弱启动子或可诱导的启动子**限制毒性基因产物表达对细胞造成的损害。

4. 对于病毒载体还需考虑安全因素，可设立空载体和用其他基因相同载体构建的阳性对照来排除毒性影响的干扰。

5. DNA 含量应该控制在 4-6ug，如果超过 10ug，转染效率会大大降低。

血清

1. 建议在转染前先测试出对细胞生长良好的血清批号，转染时用同一批号的血清，并设立阴性对照（不加转染试剂及外源 DNA）以测试细胞生长是否正常。
2. 为了避免干扰 DNA 和阳离子脂质体形成复合物，在转染细胞时需用**无血清无抗生素的 OPTI-MEM 培养基**来提高转染效率。
3. **转染后 4-6 小时需更换培养基**，一是因为脂质体具有一定毒性，二是因为培养基需要更换成有血清培养基。一般当 **20%的细胞变圆时，就是加血清的最佳时机**。
4. 阳离子脂质体和 DNA 的最佳量在使用血清时会会有所不同，因此如果想在转染培养基中加入血清，需要对条件进行优化。

抗生素

1. 抗生素如青霉素和链霉素，一般对真核细胞无毒，但由于阳离子脂质体试剂增加了细胞的通透性，可使抗生素进入细胞，降低了细胞的活性，导致转染效率降低，所以**转染培养基中不能使用抗生素**。
2. 抗生素在细胞转染后期起到**筛选**作用，由于基因转染到细胞内之后要一段时间才能表达

出蛋白质，所以筛选不能太早;但是筛选时间也不能太晚，因为转染了外源基因的细胞代谢负荷较大，增殖较慢，时间长了，就会被没有外源基因转入的细胞所淹没，最终导致筛选不出阳性克隆。**一般要在转染 48 小时之后才开始加抗生素筛选。**

3. 挑出单克隆后就可以用维持浓度，一般是筛选浓度的 1/2。在维持抗性筛选过程中，**每 3~5 天都要更换一次含有抗生素的筛选液。**

抗生素名称	特点
GeneticinR试剂 (G418硫酸盐)	广泛用于筛选哺乳动物、植物、或酵母细胞。 稳定筛选的金标准 常用浓度从2-100mg/ml,一般在14左右即可筛选出稳定的克隆细胞
Zeocin™选择性抗生素	哺乳动物细胞系、酵母、昆虫细胞和细菌 筛选时的浓度范围为50-2000ug/mL (一般为300ug/ml)，具体浓度取决于细胞类型。
潮霉素B	干扰80S核糖体的易位并导致误译，从而抑制蛋白质的合成。 筛选时的浓度范围为100-1000ug/ml (一般为200ug/ml)，使用时应依据各细胞系进行优化。
嘌呤霉素	翻译抑制剂，对原核细胞和真核细胞均有效,低抗生素浓度时即可导致细胞迅速死亡。 其浓度为2-5ug/ml时对贴壁的哺乳动物细胞有效，而浓度低至0.5-2ug/ml时对悬浮细胞有效。
杀稻瘟菌素	强效翻译抑制剂，对原核细胞和真核细胞均有效。 该试剂通常在浓度达50ug/ml时对大肠杆菌有效，而浓度低至2-10ug/ml时即可对哺乳动物细胞有效。

转染试剂

1.许多转染方法需要优化 DNA 与转染试剂比例，细胞数量，培养及检测时间等。转染时各种培养皿添加质粒和脂质体参考量见下表：

Culture vessel	Surf.area per well	Shared reagents		DNA transfection		RNAi Transfection	
		Vol.of plating medium	Vol.of dilution medium	DNA	lipofect-amine 2000	RNA	lipofect-amine 2000
96-well	0.3 cm ²	100 ul	2× 25 ul	0.2 ug	0.5 ul	5 pmol	0.25 ul
24-well	2 cm ²	500 ul	2× 50 ul	0.8 ug	2.0 ul	20 pmol	1.0 ul
12-well	4 cm ²	1 ml	2× 100 ul	1.6 ug	4.0 ul	40 pmol	2.0 ul
6-well	10 cm ²	2 ml	2× 250 ul	4.0 ug	10 ul	100 pmol	5 ul
60-mm	20 cm ²	5 ml	2× 0.5 ml	8.0 ug	20 ul	200 pmol	10 ul
10-cm	60 cm ²	15 ml	2× 1.5 ml	24 ug	60 ul	600 pmol	30 ul

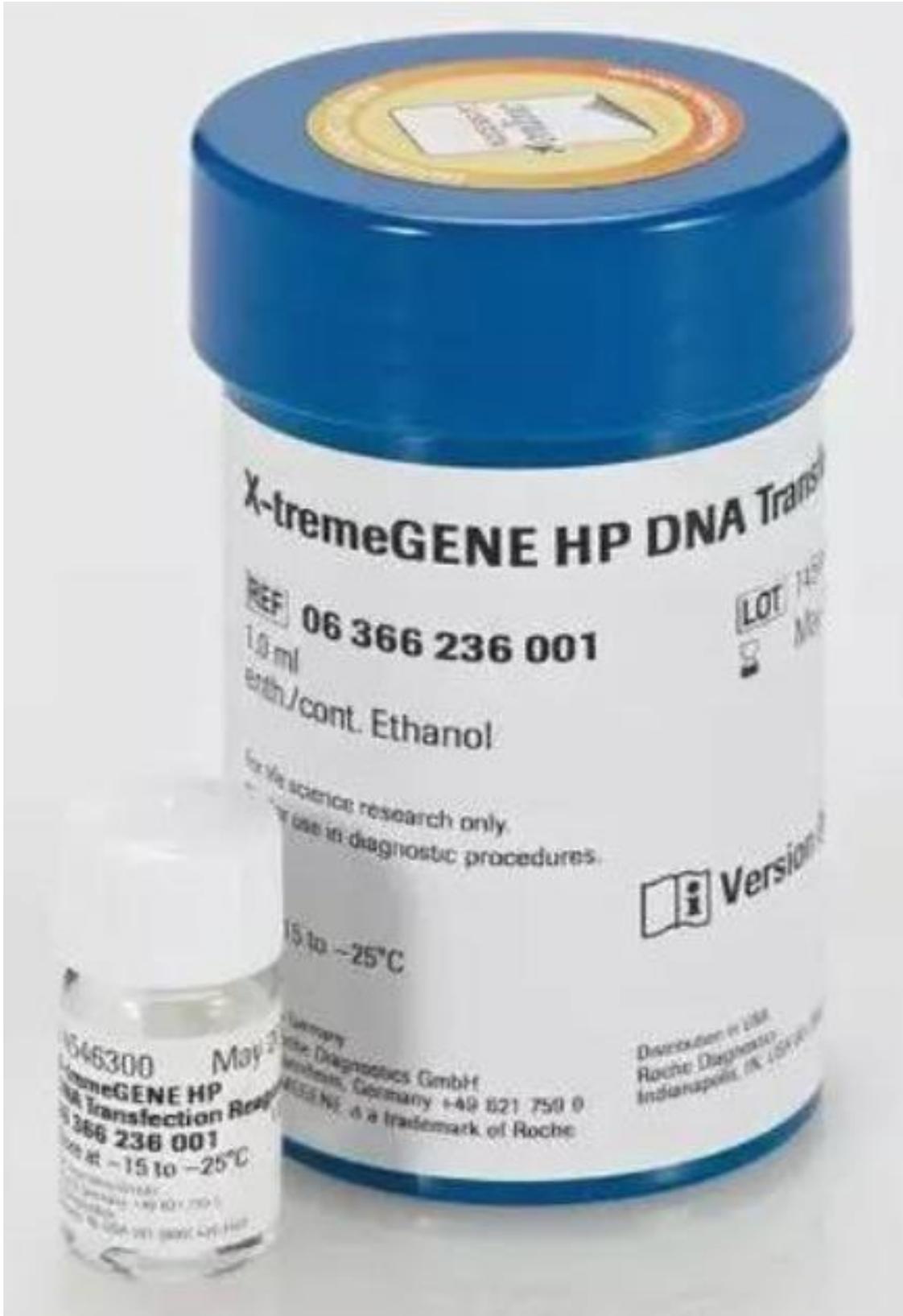
2. 不同质粒和脂质体的最佳搭配比例不同，转染前，**需要优化一个最佳配比**。质粒：脂质体 =1:1,1:1.5,1:2,1:2.5,1:3,1:3.5 的梯度比例来检测最佳转染比例（一般质粒带有荧光，可通过观察每组荧光强弱来判断转染效率，没有荧光可通过 qPCR 来检测各组转染效率）。

3. 用脂质体转染时，要**小心轻柔**的将脂质体加入到培养基中并**轻轻混匀**，避免粗暴吹打使脂质体失效。

4 在此小鱼向大家推荐两款**高性能转染试剂**：**X-tremeGENE 9** 和 **X-tremeGENE HP**。它们能够提供高的转染效率、重复性和细胞存活率。



X-tremeGENE 9 试剂是一类非脂质体型多组份试剂，具有极低的细胞毒性、操作简便、在含血清条件下对各类常用细胞系仍均具有较高的转染效率等诸多优点，它非常适合开展各类细胞分析应用。



X-tremeGENE HP 试剂是一种无动物源成分的非脂质体转染试剂,可成功转染多种真核细胞,包括昆虫细胞和难转染细胞系(如 Sf9、U-2 OS、MEF、MCF7、Hep G2、PC-3、HeLa、HT-29、HT-1080、K-562、RAW 264.7、Jurkat、PC-12 和 HCT 116)。

转染技术

1. 设置阴性和阳性对照: 一般在转染后 24-48h,靶基因即在细胞内表达。可依据不同的实验目的, 24-48h 后即可进行靶基因表达的检测等实验。
2. 转染后效率的检测方法: 观察转染后细胞荧光情况; qPCR 验证; WB 检测敲减或过表达蛋白。
3. 转染效率低, 可采取以下两种方法: 1)复转染, 即转染后 12-24h 再进行转染, 前提是该细胞对脂质体的耐受性较好, 转染后细胞死亡数较少。2)通过药筛来杀死未转入成功的细胞, 前提是该质粒带有抗生素抗性的基因。
4. 电转时, 不同的细胞需要的电压是不一样的, 需要做预实验, 摸索最佳条件。对于大多数细胞而言, 最佳电压位于 250-1250v/cm。电击后, 应该将 DNA 和细胞混合液在室温下放置 10min,使细胞恢复损伤。

细胞电转的实验步骤的视频:

转染做不好，自挂东南枝

作者：向日葵

那是一个阳光明媚的上午，小编正要去参加 PARTY，突然接到导师的电话说是试剂到了，可以开始做转染实验了.....



不要做实验的时候



老板说要做转染的时候

导师的话怎么敢不听，可是小编是个放养的孩子，还没有做过转染实验呢。怎么办？只能去求助师兄师姐了，好在师兄看在我平时请他吃辣条的份上，给了我一本《葵花宝典之细胞转染》让我自学。

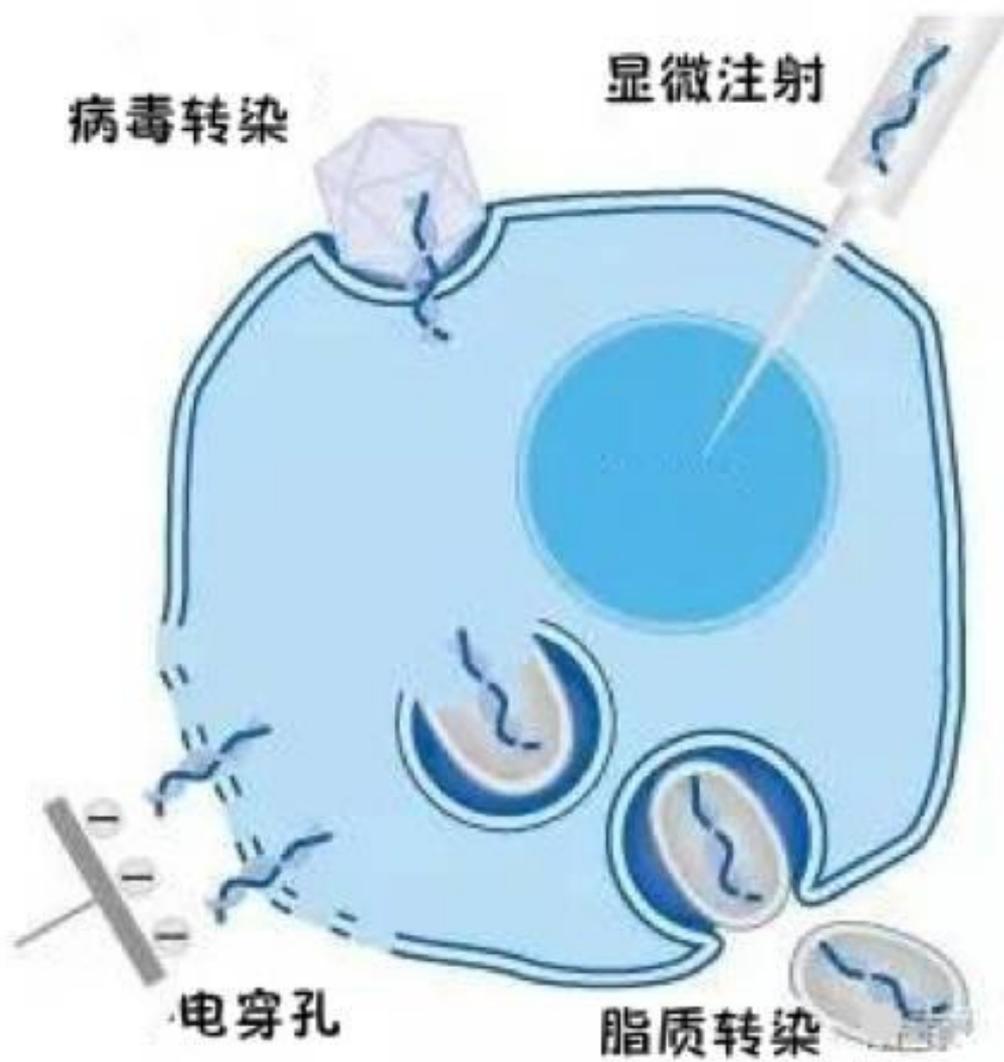


翻开本子，第一页介绍了细胞转染的类型。

转染 (Transfection) 是指将 DNA 或者 RNA 导入真核细胞中的过程。若 DNA 未与宿主细胞染色体整合，称为“瞬时转染”，若 DNA 与宿主细胞染色体整合并随后者的复制而复制，称为“稳定转染”。

	瞬时转染	稳定转染
目的	快速分析目的基因的表达，不需要选择性筛选细胞。	获得稳定表达外源基因的单细胞克隆需要选择性筛选出稳定转染的细胞
特征	表达效率高。 导入的高拷贝数的遗传物质导致高水平的蛋白质表达。	表达效率低。单拷贝数或低拷贝数的稳定整合的DNA导致较低水平的蛋白质表达。
载体的选择	DNA载体和RNA载体都可用于瞬时转染。	只有DNA载体可用于稳定转染。 RNA载体本身不能稳定地导入细胞中。
表达持续时间	导入的遗传物质与宿主染色体未整合。 持续时间短。	可长期表达
操作周期	周期短	周期长
应用范围	通常不适合使用具有诱导型启动子的载体的研究。	适用于使用带有诱导型启动子的载体的研究。

转染的方法有很多，例如病毒转染、显微注射、脂质体转染、电穿孔法.....



转染前，应根据实验目的、实验室现有的条件选择合适的细胞转染方法。

	转染方法	优点	缺点
瞬时转染	葡聚糖法	操作简单 便宜	只限于瞬时转染 转染效率低
	腺病毒法	可用于难转染的细胞	需考虑安全因素
	磷酸钙共沉淀	适用于生产瞬时和稳定的蛋白质 转染效率高（不限制细胞系）	可重复性较差 有细胞毒性，尤其对原代细胞 不适用于动物体内转染
	阳离子脂质体	适用于生产瞬时和稳定的蛋白质 操作简单、转染效率高	需进行条件优化 有些细胞系不容易转染
	电转法	不需要载体 不限制细胞类型和条件 条件优化后可快速转染大量细胞	成本高 会对样品产生物理损伤 细胞死亡率高
稳定转染	逆转录病毒法	可用于难转染的细胞、原代细胞、 体内细胞等	细胞需处于分裂期 需考虑安全因素

“原来除了导师让我做的脂质体转染之外，还有那么多转染方法啊。不管了，今天先主要学习一下脂质体转染方法再说。”

脂质体转染

原理：转染试剂中的阳性离子与核酸中的阴性离子相结合后形成复合物。复合物通过细胞内吞作用将核酸转移至细胞中。

Lipid-Mediated Transfection in Mammalian Cells

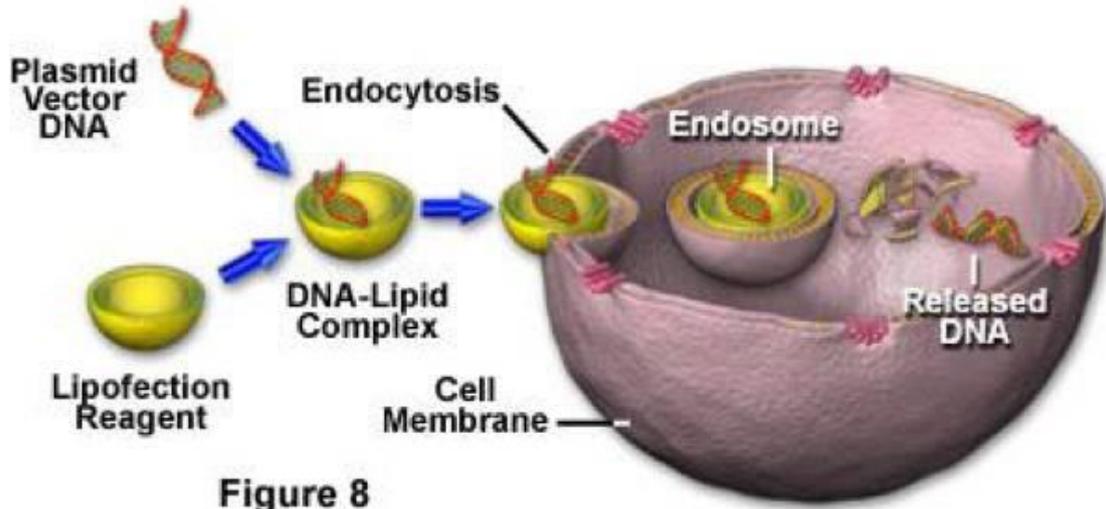
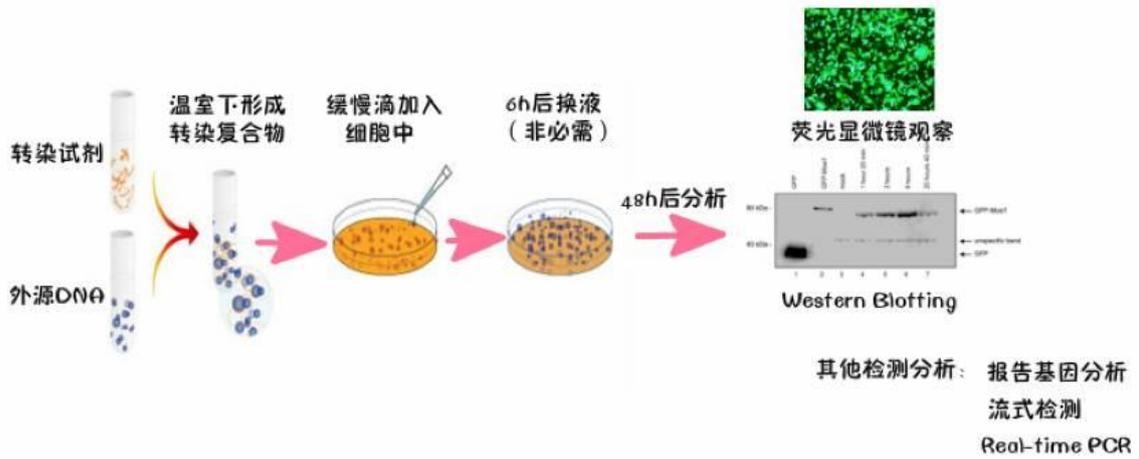


Figure 8

基本步骤:



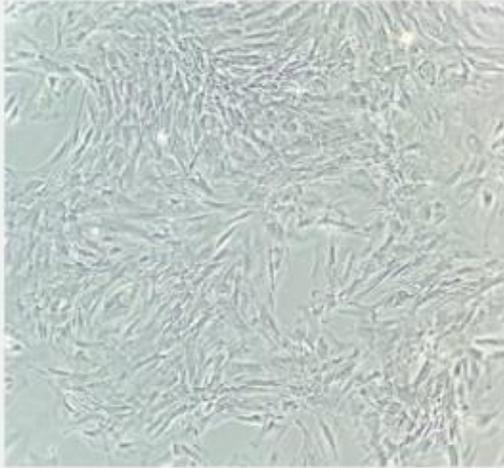
细胞转染效率影响因素

细胞密度、细胞代数、DNA 的质量、DNA 与转染试剂的比例、血清质量都将影响细胞转染效率。



1、细胞质量

细胞代数：细胞在传代过程中会逐渐老化，不要用“骨灰级别”的细胞。选择低代数、处于对数生长期的细胞进行转染。



代次高、老化的细胞：
增殖能力差
转染后细胞容易死亡



“僵尸”：
行动缓慢
容易被豌豆射手杀死

刚复苏的细胞：每个人都有起床气，细胞也有。刚复苏的细胞，应继续培养 1~2 代，让细胞完全“苏醒”后再进行转染。



细胞密度：转染时，细胞密度应根据转染试剂种类和实验目的来确定。一般来说，转染时的细胞密度应控制在 50%~80%之间较好。

同时应注意在转染后 48h，细胞收获时，细胞不要长得过“爆”。细胞接触抑制会严重影响细胞的状态（周期进程阻滞，凋亡增加等）从而影响实验结果。



怎么这么挤，我要生气咯

交叉污染：如果同一个实验室同时培养两种以上的细胞，那就有可能发生这样的情节：A 细胞不甘寂寞跑到 B 细胞家聊天然后就在那常住下了，从此以后 A、B 细胞傻傻分不清。



像喜羊羊一样，设置门禁，杜绝外来物种的入侵

2、微生物

细胞污染的种类可分为细菌、真菌、病毒、支原体.....所有污染都会产生错误的结果。在这些污染中，支原体污染较为普遍。

支原体污染几乎可以影响所有细胞的生长参数、代谢、染色体结构，其结果可导致非典型转染、转染效率偏低、研究数据不准确。在转染前可以使用环丙沙星提前处理一下细胞培养物。

如果发生污染最好还是扔掉细胞，重新转染。

3、核酸质量

在转染过程中，纯度不高的 DNA（带有少量的盐离子、蛋白、代谢物等其他杂质或提取的 DNA 中残存内毒素）会严重影响转染效率。

除此之外，DNA 分子构象也会影响转染的效率。其中超螺旋的质粒可达到较高的瞬时转染效率。

DNA 含量应该控制在 4~6ug，如果超过 10ug，转染效率就会大大降低。



核酸质量：
纯度、分子构象、质量

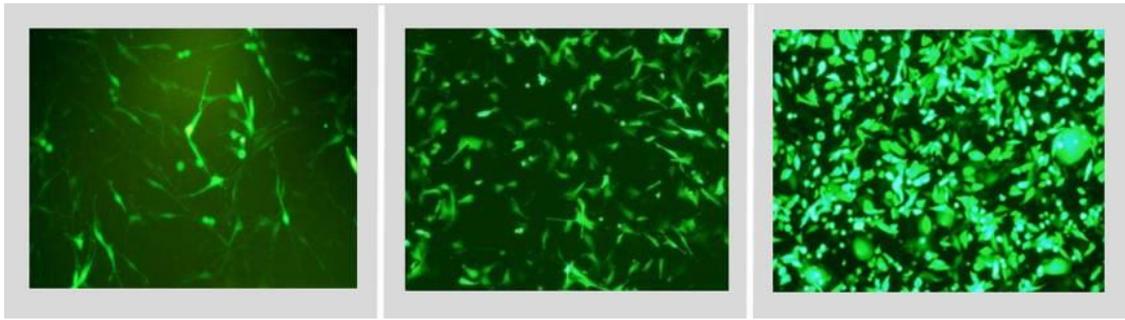


钻石质量：
净度、色泽、切工、重量

4、转染试剂

在转染前应优化质粒和脂质体的最佳配比。按照质粒：脂质体=

1:1,1:1.5,1:2,1:2.5,1:3,1:3.5 的梯度比例来检测最佳转染比例（若质粒带有荧光，可通过观察每组荧光强弱来判断转染效率，若不带荧光可通过 qPCR 来检测各组转染效率）。



每种转染试剂都会提供一些已经成功转染的细胞株列表和文献,通过这些资料选择适合本细胞系的转染试剂。

5、血清

在转染前应先筛选出能促进本细胞系生长良好的血清批号。

为避免干扰到 DNA-脂质体复合物的形成,在转染细胞时需用无血清无抗生素的培养基,以此来提高转染效率。

在转染后 4~6 小时内需更换培养基,一是为了去除具有毒性的脂质体,二是为了更换成有血清的培养基以提供更多营养物质给细胞。



转染后4-6h, 需更换成有血清
培养基, 维持细胞生长活性



路飞与海军战斗后需补充能量

如果想要在转染时加入血清,则需要设置实验对现有的条件进行优化,找到合适的转染试剂。

6、操作

细胞铺板

若在细胞铺板时操作不注意,则很可能会导致细胞分布不均。在接种平板时,可以先用培养基润湿整个板底,再加入细胞悬液。

转染时间

正在分裂的细胞往往要比处于静止状态的细胞更易于摄取并表达外源 DNA。因此对大多数转染操作而言，细胞都应在转染当天或转染前一天进行接种。

试剂的配置

DNA 与脂质体应充分混匀，混匀后静止 10~15min。（混匀时应用无血清培养基或 PBS 来稀释。）

转染时

DNA-脂质体复合物应缓慢加入培养皿中并同时轻摇培养皿，以确保复合物的均匀分布，避免局部浓度过高。

换液

动作应尽量轻柔，此时细胞极为脆弱、贴壁性变差、很容易在外力的作用下悬浮起来进而导致细胞在换液过程中的损失。

换液前，应先将培养基预热。



“原来细胞转染也有这么多门道，我先试着做做看，等遇到解决不了的问题再去问师兄。”

说说稳转系那些事

作者：凌风

稳转系嘛

现在哪个做实验能少的了稳转系？

随随便便你不敲个东西

过表达个东西

都不好意思投文章！



不要逼我出手
Don't make me moves yh31.com

关于稳转系

你需要知道的是

那些拿病毒转染的才是稳转系

像那些 siRNA

质粒瞬转的

都！不！叫！

你哪里见过稳转系

还要隔两天就要转个小干扰

转个质粒来维持的哇？

Step1: 构建质粒

你想敲除啥

想过表达啥

就把它 p 到你心仪的载体中

这个当然可以找公司来做啦

你还可以挑选

想不想要荧光

要带什么抗性

这个红的绿的

blas/puro 抗性就看您心情了~

Step2: 包病毒

把目标质粒

包装质粒

一起导到工具细胞中

过个 48 小时

收个病毒

浓缩下

你就可以去-80°C 保存啦~

Step3: 转染细胞

把你的 target 细胞铺到板里

40-50%的密度就行

(太多就容易满啦, 转染效率就不高了)

把病毒和 polybrene 一块加进去

再来两天

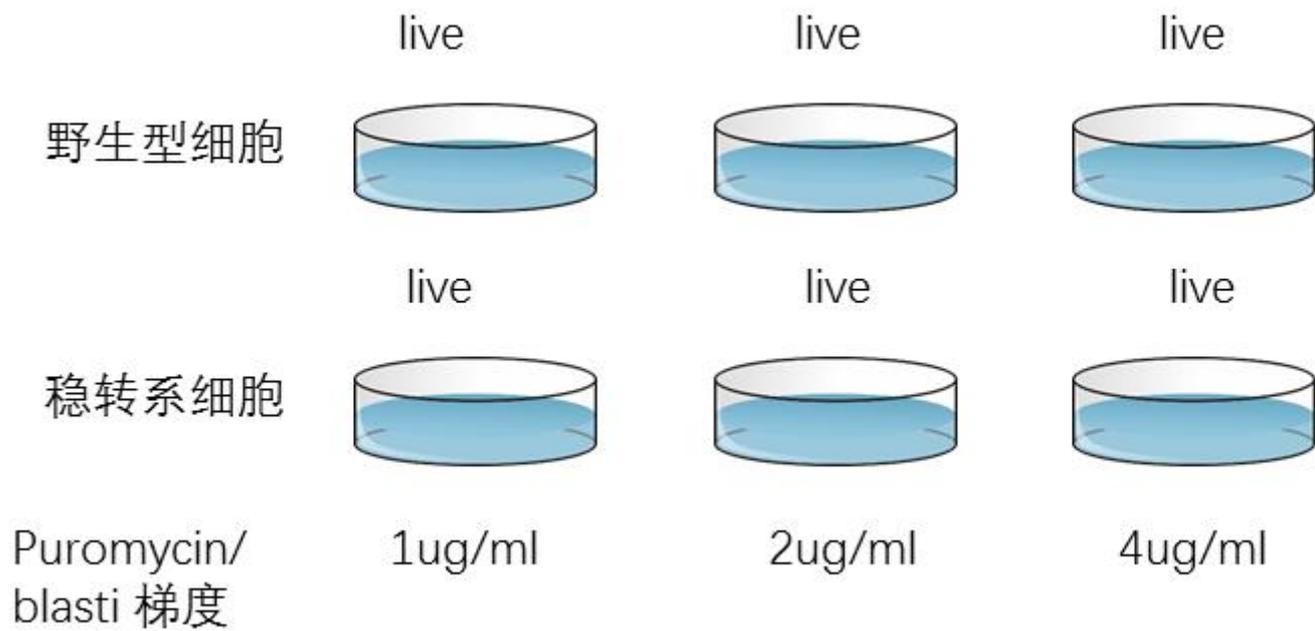
就等着看荧光吧!

(知道为啥有人钟爱荧光了么)~

Step4: 筛选稳转系

亮了, 你就可以开始筛选了!

怎么筛呢?



就是这样啦

将细胞稀释到 1000 个细胞/mL

将抗生素做一个浓度梯度

最好你可以看看文献里

别人对你的 target 细胞是哪个浓度

比如

1ug/mL, 2ug/mL, 3ug/mL,, 10ug/mL

找出在 10~14 天内

细胞全部死亡的最低 BLA 浓度

筛选时用这个浓度

或者再高一个梯度都可以啦！ Puro 筛一两个星期

最少得传几代吧~

blas 你就得多筛会啦

最少也得两三周吧！

接下来

就是你亮亮的稳转系啦！



是不是很得意！

7 实验动物

7.1 动物伦理与争议

姿势 | 小心小鼠环境毁了你的动物实验

作者：麦子

今天让我们来谈谈动物实验缺陷，小鼠身上看上去很有希望的疗法，通常很少在人体起到同样的作用，这一点已不足为奇。但往往，在一种小鼠中成功的实验性治疗方案甚至不能在其他小鼠中起效，即实验结果难以重现，这表明许多啮齿动物研究可能会从一开始就有缺陷。



“我们都认为小鼠看上去比较简单，但实际问题要复杂的多。”耶鲁大学的兽医神经病理学家 Caroline Zeiss 说道。研究人员很少报道如老鼠的食物、垫料或光照等微妙的环境因素；因此，尽管大量的研究表明这些因素可以显著影响动物的生物学，但在各大小实验室这些条件差别很大。

小鼠接收不同照料带来的实验结果差异震惊了很多人，约翰霍普金斯大学的病理学家 Cory Brayton 说道。在小鼠模型上的一次会议上，她和其他人探讨了许多阻碍了小鼠研究结果被重复的生物因素。

实验结果产生差异的多方面因素

加州大学的神经学家 Christopher Colwell 亲身经历了这些问题。他和一个同事在同一转基因小鼠中研究自闭症，但同一行为测试获得了不同的结果。最终他们找出了原因：Colwell 研究昼夜节律，使他的老鼠白天处在黑暗的环境中，欺骗它们生物钟是在晚上，以便夜间活动的动物白天测试时更警觉。他的同事则没有这么做。

Colwell 注意到无视小鼠的昼夜节律，可以对许多行为实验结果产生偏见。他还补充道，大部分在半夜工作的人的社会和认知测试都不会做的很好。

食物营养因素

营养也可以确定一个小鼠研究成功或失败，但 Brayton 表示，许多研究人员甚至不知道他们动物饲料的来源。一些小鼠食物含有雌激素和干扰内分泌的化学物质，可以影响癌症研究等疾病。用于肥胖研究的高脂肪、高糖的食物容易迅速腐臭，在研究人员还没有弄清楚为什么时，小鼠可能会停止进食、体重减轻。

食物的选择也可以改变小鼠的肠道微生物组。杰克逊实验室兽医病理学家 Catherine Hagan Gillespie 发现，来自不同供应商之间的小鼠肠道中细菌种类相差很大。在另一篇未发表的研究中，她发现，小鼠肠道细菌的分类在行为测试上显示不同焦虑水平。

但很少有行为科学家考虑进行微生物评估，Hagan Gillespie 说道。即使他们选择去做，所涉及的额外工作可以增加研究的复杂性和成本。并且小鼠微生物对广泛的因素敏感，比如空气质量、母体应激和免疫功能。

杰克逊实验室的微生物基因组学副主任 George Weinstock 说道，肠道微生物的差异也许可以解释为什么相同基因突变的小鼠可以有不同的特征或表型。杰克逊实验室，为世界范围内的研究繁殖和供应小鼠，严格控制食物的类型和数量和水的 pH 值等因素。即便如此，在其三个饲养站点的小鼠之间还是发现了区别。Weinstock 表示，该公司已开始研究，如何通过提供小鼠的特殊食品和保健指导，来规范其客户的实验。

给研究带来的时间压力

Zeiss 说科学的竞争属性会增加研究者们对改变他们所设计的动物研究的抵抗。如果科学家们必须在正确的实验节点处理他们的动物，分析临床和生物标志物的变化，包括老龄鼠和包含两性以确保结果代表广泛的群体，并控制环境变量，每个实验将需要更长的时间，甚至可能不能出版。

美国国家卫生研究院（NIH）已经采取措施解决这些问题。在可以进入临床试验之前，它的一些机构需要复制某些动物试验疗法，但 NIH 表示并不强求所有机构都予以实施。2014 年，NIH 开始要求研究者在研究中包括雌性动物，开始向抱怨成本的研究人员增发补助金。但该机构还没有发布任何特定的基金或补充来研究其他混杂因素。

信息来源：<http://www.nature.com/news/a-mouse-s-house-may-ruin-experiments-1.19335>

神奇实验动物世界，你到底了解多少？

作者：子非鱼

实验动物之所以能撑起科研界的半壁江山，主要是因为他们屡次在医学界中建下奇功，而且无论是生物医学领域中的临床研究还是实验室研究，其重大发现均离不开实验动物。



那神马才是实验动物呢？简言之，就是经 Scientists 特殊饲养的动物，比如呆萌小鼠、娇小斑马鱼等等，而不同的实验目的，为其代言的实验动物自然也不同。



实验动物们肩负着非常重要的使命，并积极献身于科研实验，不仅促进了医学科学的迅速发展，也解决了许多以往不能解决的实际问题和重大理论问题。



像我们小鼠，凭借着小型啮齿类哺乳动物的生殖优势，当仁不让地成为科学研究的首选对象之一。又因我们在帮助人们认识生命现象及其背后机理中发挥了无可替代的作用，同时也在基础医学研究领域拥有着无与伦比的地位，便成就了我们在实验动物界的霸主地位。



疫苗研制



食品药物研发



生命科学研究



凭着这种俯首甘为孺子牛，挥蹄勇做千里马的精神，我们深受科研者青睐。为此，我们的动物福利也成为了重中之重，而为了确保我们能有最大的产出，科研者们也是蛮拼的。



我们居住的“公寓”有着独立的换气系统，且每个“套间”里都有着不交叉独立的进气和排气口。最让人羡慕的是我们的换气系统中每个都安装了过滤设备，能有效的过滤病毒和细菌。



豪华公寓



独立套间

除了被净化的饮用水，我们的饮食标准也堪称为 5 星级。美味的配方饲料富含了多种蛋白质、脂肪、ATP、维生素等，而且依据用途不同，还可将其分为高脂饲料、普通饲料、繁殖饲料。



高脂饲料

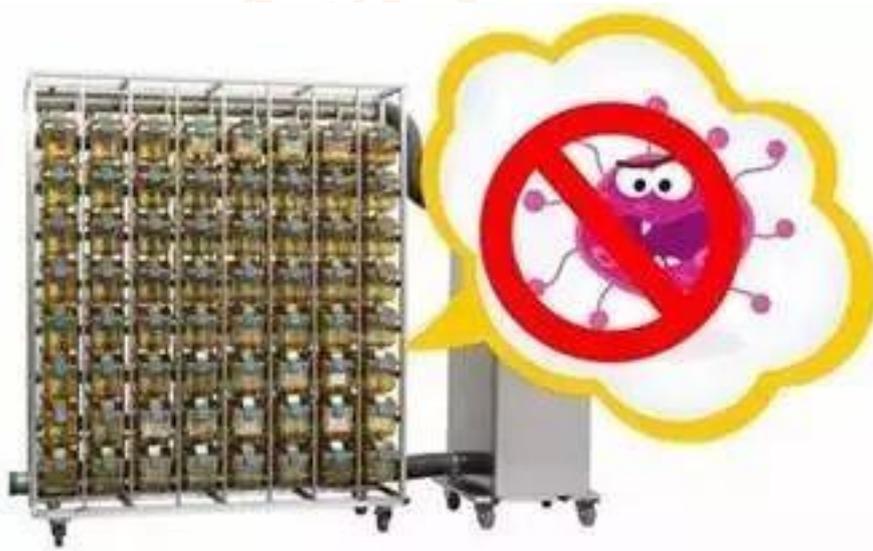


普通饲料



繁殖饲料

我们所处的地方，一年四季如春，即没有所谓的雾霾天，也没有“桑拿天”，连噪音都被控制在 60 分贝之内，堪称绝佳居住之地呢。



在我们小鼠的世界中存在等级深严的阶层划分。以实验动物的洁净程度来分，我们分为以下四级。



I.普通级 (CV)

不携带人兽共患病和动物烈性病原体的动物，微生物控制等级最低。
2001年该等级被取消。



II.清洁级 (CL)

除了普通动物应排除的病原体外，不应携带对实验干扰大的病原和寄生虫。
我国规定科学研究中使用的大小鼠，必须达到清洁级和清洁级以上，否则不予申请和验收、鉴定。



III.无特定病原体级动物 (SPF)

除了清洁级动物应排除的病原体外，不应携带对实验干扰大的微生物。
获取国际公认，国家级科研项目的御用动物，如免疫、肿瘤、疫苗研制等。



IV.无菌级动物

不携带任何微生物和寄生虫。
主要用于制备悉生动物（只接种某种已知特定的微生物）和免疫肿瘤学研究。

俗语云，有人的地方就有江湖，我们鼠界也不例外。依据遗传程度，我们分成了四大派系。



“愿天下间所有情侣都是失散多年的兄妹”这句话在我们近交系小鼠身上得到了淋漓尽致的体现。为了避免遗传背景差异对实验结果造成影响，科学家们则采取了逆天的强制爱，人为地让 20 代以上连续全同胞兄妹开展啪啪啪运动（近交系数达 98.6% 以上），以此获得等位基因纯合、遗传背景相似的近交系小鼠，亲手打造了一个打娘胎里就注定的爱情故事。

近交系小鼠之三大品系



Balb/c小鼠

这家子的兄妹间的暧昧关系外人还真不好说。但胜在繁殖力强，一窝又一窝的。



C57BL小鼠

这家子皮肤都黑。有些鼠天生脑子进水（遗传性脑积水），骨骼上多有变异，经放射线照射后淋巴瘤发生率达 90%-100%



C3H/He小鼠

这家子的乱伦自1920年就开始了，尽管彪悍的人生无需解释，但却会一生薄命。14月大时自发肝癌发病率达85%，自发性乳腺肿瘤发病率也高。

至于远交系小鼠，它们之间的事情就没有那么难以启齿。它们有些像古代的皇室，血统纯正但不干乱伦的事情。通常是某个有血缘的群体，在不引进其他品系的动物或新血缘的情况下，个体间以随机交配的方式，连续繁殖 4-5 代以上所形成的动物种群。

远交系小鼠之常见品系



昆明小鼠



ICR小鼠

这个大家族并无特殊八卦可说，但是他们经常吹嘘四处散播自己的优点：适应性强、繁殖力强、实验重复性强，导致人类经常将其用于药理药效学研究、药品生物制品及化学品安全性评价研究等，因而该家族的失踪人口也是蛮多的。

而在突变型小鼠中，免疫缺陷型小鼠的出现则开创了肿瘤学和免疫学的里程碑。最早发现的裸鼠就是于 1962 年在非近交系小鼠中偶然得到无毛小鼠，是一种先天性胸腺发育不良突变小鼠。

突变型小鼠



裸鼠

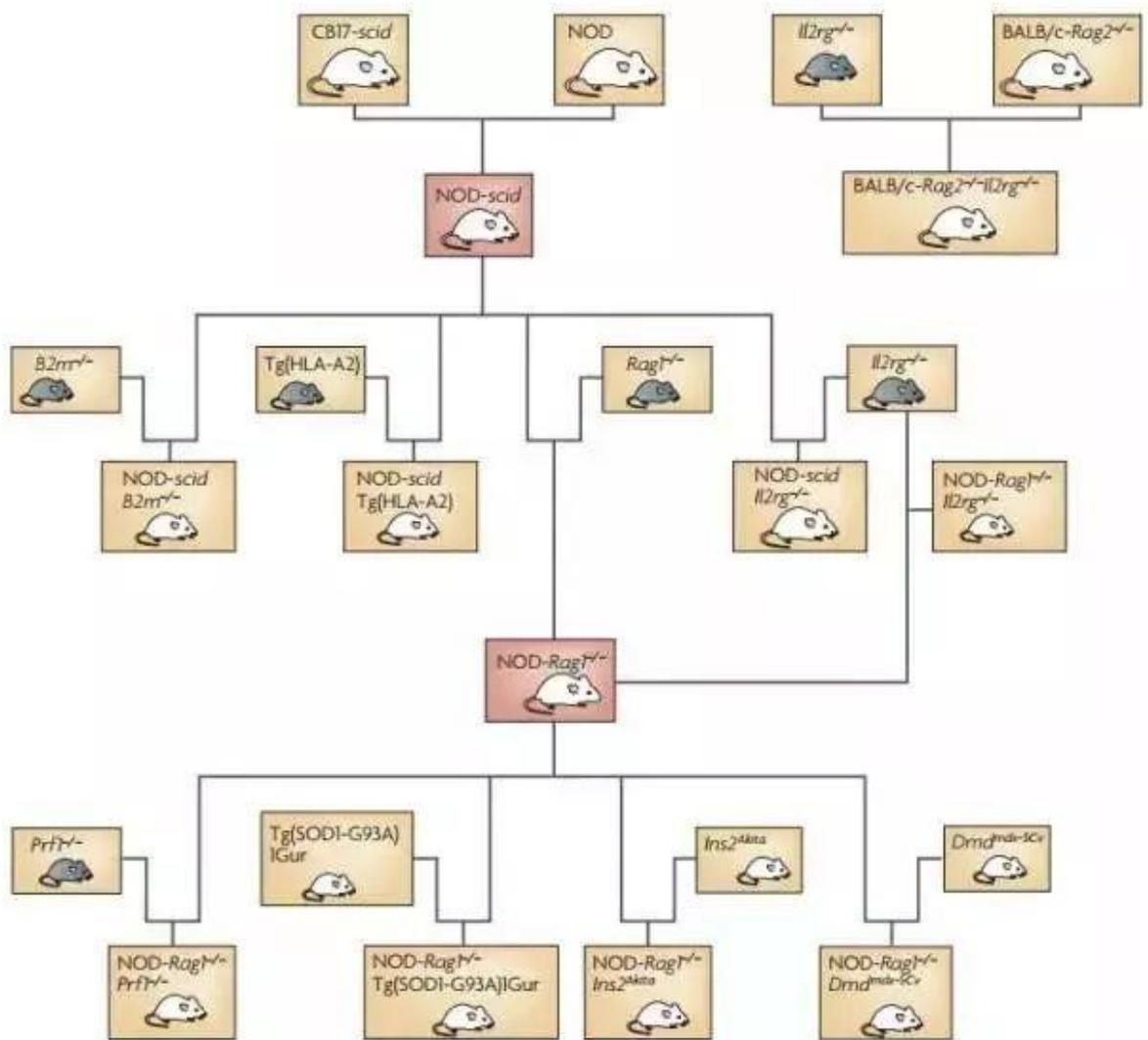
这哥们身患先天性丑癌，但即便如此，人类依然不肯放过它，成天往它身上打肿瘤，丑的只能宅在家里以泪洗面。



SCID小鼠

它和裸鼠一样是个病秧子，淋巴系统严重受损，极易得病，庆幸的是，五官清秀，还算个美人胚子。

其实，当下生物医药研究中大部分人源化的动物模型，都是由免疫缺陷型小鼠相互杂交而产生的（如下图），因而不同的杂交基因型具备不同属性，使用于不同的适应症研究。



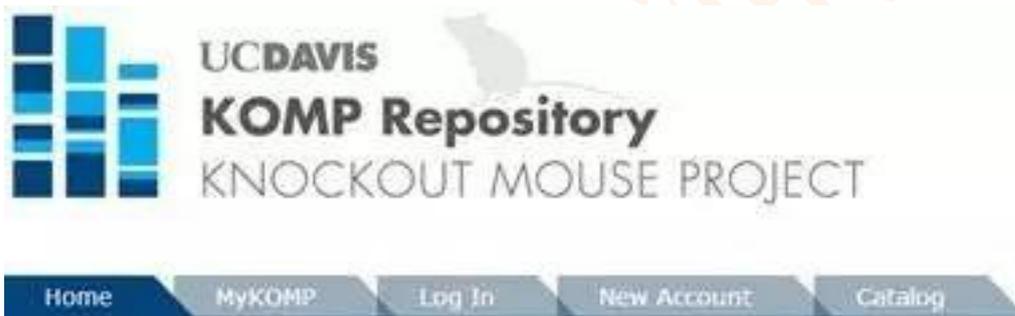
未来随着生物技术的不断进步，对实验小鼠的基因修饰和人工诱导突变也会越来越普遍，人类也将会获得了更多具有遗传修饰的实验小鼠，如嵌合体小鼠、转基因小鼠等。至于对我们的购买，这些网站请你收好~

1) MGI



<http://www.informatics.jax.org/>

2) KOMP



<https://www.komp.org/>

3) IMPC



<http://www.mousephenotype.org/>

4) 南大模式动物中心



<http://www.nrcmm.cn/>

5) 中国遗传工程小鼠共享资源联盟



<http://cmsr.nrcmm.cn/>

动物实验做得好，只因做了这些...

作者：子非鱼

要想发表高分 SCI 文章，往往需要和动物实验打交道。为了获得理想中的动物实验结果，对科研汪而言，具有扎实的相关基础知识就是必不可少的。现在小鱼就从实验动物的饲养条件、给药剂量及方式和分组及编号三个方面对动物实验的基础知识进行盘点。

实验动物的饲养环境

做动物实验，最先要做的事情就是要养好动物。因而，**好的动物饲养环境，对于动物实验的成功也是最基本的保证**。然而万事开头难，这也是个看似平常，但却有着不少细节的问题。

一般情况下，小鼠是大多数实验室采用的实验动物模型。由于小鼠对环境适应性的自体调节能力和疾病抗御能力较其他实验动物差，且小鼠的品种和品系繁多，各个品种和品系都有自己的特殊要求，即不同等级的小鼠应生活在相应的设施中，因此必须根据实际情况给予一个清洁舒适的生活环境。

现阶段很多高校一般都会有专门的动物房及专业的饲养员进行培养，所以可能更多时候，小伙伴们所纠结的是对于实验动物，每笼该饲养多少才算合适呢？毕竟，每种动物都有一个合适生存的最小平均空间，低于这个空间则会出现一些相互打架、易致病等一系列不良现象。

在此小鱼建议大家，针对小鼠笼/大鼠笼，每笼饲养 5 左右为宜，最多不超过 7 只。豚鼠通常被置于兔笼或大鼠笼中，一般以 3-4 只为宜。兔、猫、狗等，一般都是每笼只养一只，且有专门的笼具。

在实验小鼠中，转基因老鼠可以说是特别娇贵的存在，其饲养的条件及要求均要高于普通小鼠。SPF 级环境是饲养转基因小鼠的必备环境，其中，高压灭菌过的垫料和 M5 型的小鼠饲养笼是其标准配备，不仅饲料要采用 60Co γ 射线灭菌的无菌全价营养颗粒料，且饮用水也是

高压灭菌后的纯净水（每周换水 2-3 次）。饲养室内每天也需经紫外灯照射两小时杀菌。

另外，需要密切观察转基因小鼠的饮食、活动及全身情况。如果小鼠食欲旺盛；眼睛有神，反应敏捷；体毛光滑、活动有力；粪便黑色呈麦粒状，则说明转基因小鼠处于健康状态，可用于后续其他的生物实验。

给药剂量的换算

动物实验中，最常涉及的就是给药剂量的估算，想来大多数同学都是通过查文献、参考别人使用的药物剂量来设计自己的实验，但是如果是一种新型研发药物时，又该如何确定实验动物的给药剂量呢？

此时可参考徐叔云教授主编的《药理实验方法学》中一个关于人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值的表格来计算使用药品的剂量。（该表格几乎被药理专业的人们奉为经典，一直在科研中沿用）

	小鼠 (20g)	大鼠 (200g)	豚鼠 (400g)	兔 (1.5kg)	猫 (2.0kg)	猴 (4.0kg)	狗 (12kg)	人 (70kg)
小鼠	1.0	7.0	12.25	27.8	29.7	64.1	124.2	387.9
大鼠	0.14	1.0	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56.0
豚鼠	0.08	0.57	1.0	2.25	2.4	5.2	10.2	31.5
兔	0.04	0.25	0.44	1.00	1.08	2.4	4.5	14.2
猫	0.03	0.23	0.41	0.92	1.0	2.2	4.1	13
猴	0.02	0.11	0.19	0.42	0.45	1.0	1.9	6.1
狗	0.008	0.06	0.10	0.22	0.23	0.52	1.0	3.1
人	0.0025	0.018	0.031	0.07	0.076	0.163	0.32	1.0

上述表格中的最后一行，便是剂量换算中的折算系数（已经把体重与体表面积的关系折算过了），依据公式可将人的临床剂量转换为实验动物的剂量。

举个栗子，如人的临床剂量为 X mg/kg，换算成大鼠的剂量 $Y = X$ mg/kg \times 70kg \times 0.0018/0.2kg=6.3 X mg/kg。即按单位体重的剂量来算，大鼠的等效剂量相当于人的 6.3 倍。依次类推，可以算出小鼠、豚鼠等其他动物剂量与人的比值。

动物	小鼠	大鼠	豚鼠	兔	猫	猴	狗
剂量比值	9.1	6.3	5.42	3.27	2.66	2.85	1.87

Tips: 1) 人的临床剂量通常会以 mg/d 来表示，此时，需要将其转化成 mg/kg 来代入公式中。
2) 这种换算关系的前提是各种动物对某种药物的敏感程度是一样的。因而，在实际的动物实验中，药物剂量的确定一半可参考等效剂量，一半需要设置药物浓度梯度来摸索最佳给药剂量。3) 以上表格中，人的体重设为 70kg，但是实际上人的体重更接近于 60kg 左右。如此修正后表格如下图所示。

动物	小鼠	大鼠	豚鼠	兔	猫	猴	狗
剂量比值	8.65	5.98	5.15	3.11	2.59	2.70	1.78

同样，给药途径也对药物的作用产生一定的影响。给药途径一般常见的有腹腔注射，皮下注射等方式。

前者在给小鼠注射时，将针头约以 10°角从下腹部刺入皮下，然后再以 45°角刺入腹腔，注入药液，穿刺部位不宜太高，否则药液会注入到胸腔；后者在给小鼠注射时，则将注射器针头以 10°角刺入前肢腋部或颈背部皮下。注射后，皮下可见一隆起小包，然后将针头稍向后退出一段再顺时针转动针尖拔出，以防漏药。

不同给药途径剂量的换算如下图所示。

给药途径	静脉	口服	皮下注射	肌肉注射	腹腔注射
药品利用度	全部入血循环， 无吸收过程	25-30%	40-50%	80%	80-85%
与静脉的剂量比	1	3.3-4倍	2-2.5倍	1.25倍	1.18-1.25倍
与口服的剂量比	0.25-0.33倍	1	0.5-0.6倍	.32-0.4倍	0.3-0.35倍

实验动物的分组及编号

实验小鼠常需要标记以示区别，编号的方法很多，应根据小鼠的品系、数量和观察时间长短等因素来选择合适的标记方法。

其中，化学药品涂染小鼠被毛法是实验最容易掌握且最常用的方法。常用的涂染化学药品有三种：1) 涂染红色：0.5%中性红或碱性品红溶液。2) 涂染黄色：3-5%苦味酸溶液。3) 涂染黑色：煤焦油的酒精溶液。实验中应根据小鼠的品系选择染料的颜色。

一般用一种化学药品涂染实验动物背部被毛即可，如果实验动物数量较多，可选择两种染料。但是该法对实验周期短的实验动物合适，因为时间长了染料的颜色易退掉。这对辛辛苦苦做实验，期待有个好结果的童鞋而言，可是个灾难性的打击。

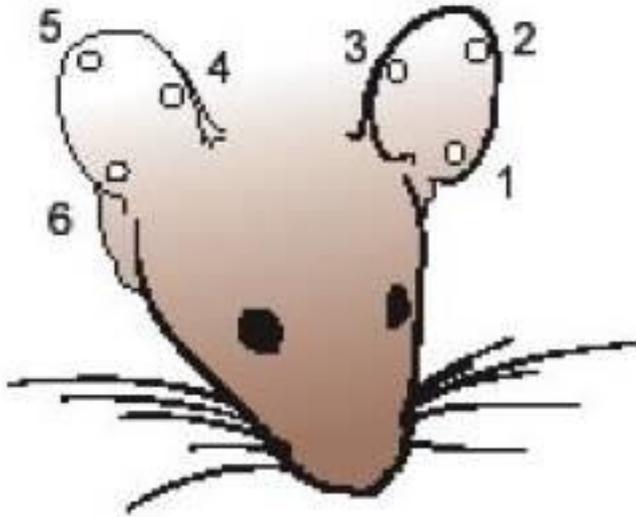
下面小鱼简单介绍下用染料给小鼠编号的原则：先左后右，从前到后。#1：涂染到左前肢；#2：左侧腹部；#3：左后肢；#4：头顶部；#5：腰部；#6：尾部；#7：右前肢；#8：左腹部；#9：右后肢。且联合使用不同颜色可将编号编至 99 号。



也许有的小伙伴们仍会担心即使用新染料给小鼠编号,短期内染料掉色的可能也不是没有的,有木有一劳永逸的标记小鼠的方法么?在此,小鱼再给大家推荐两个可让小鼠终身标号方法。

1) 打耳孔法或剪缺口法。

前者即利用打孔机在鼠耳一定位置打一小孔来表示一定的号码,后者用剪子在耳缘剪缺口,剪完后还应用滑石粉捻一下,以免愈合后看不出来。总的来说,一般习惯在耳缘内侧打小孔,按前、中、后分别代表1、2、3号,在耳缘部打成一个缺口,分别表示4、5、6号,打成双缺口则表示7、8、9号。右耳表示各位,左耳表示十位,再加右耳中部打孔表示百位。该法可以编至1~400号。



2) 剪趾法，即将小鼠左右前肢的脚趾按不同排列代表不同的数字，一般习惯从左向右第一趾为#1，第二趾为#2，前一、二趾同时剪去为#3，第三趾为#4，前三趾同时剪去为#5，第一、三趾同时剪去为#6，第四趾剪去为#7，第一、四趾同时剪去为#8，第二、四趾同时剪去为#9。右前肢表示个位，左前肢表示十位，按此法四肢可标号至 4999 号。



7.2 实验动物模型

动物爱清洁——我的干净，你不知道

作者：麦子

在世人的眼中，我不是个爱干净的家伙，成日穿梭在垃圾堆中，不洗澡，不刷牙，一身臭烘烘的，这世上爱我只有猫，可是我不爱他。

我听亲戚们说，要想过上“高帅富”的生活，只能进实验室这个“皇宫”，但是进去的没有一个能活着出来，关于实验室，只能是个传说.....

据说那里面的家伙都很爱干净，难道他们天天洗澡嘛？可是我们小鼠的爪子这么短，后

背是挠不到的，怎么洗？我的脑海中充满了问号。

四等“高帅富”：清洁级动物

他们在微生物控制方面，除要求必须不带有兽共患病原和烈性传染病病原及常见传染病病原之外，还要求排除对科学实验研究干扰大的病原体的动物。

看着他们生活的环境，真是羡慕，不愁吃喝，一个个长得白白胖胖的。我照了照镜子，我长像丑陋，唯一的优点就是抗病力强，浑身都是病原体还好好地活着。



三等“高帅富”：无特定病原体（SPF）动物

他们体内无特定的微生物和寄生虫存在，但非特定的微生物和寄生虫是容许存在的。这种三等公民在实验室数量最大，也是目前国内外使用最广泛的实验动物。

这一笼笼的全都是，我之前也想过，我如果把自己洗干净，再去看看个医生，把该灭的虫给灭了，该治的病都给治了，那么我应该可以在月黑风高混进去凑数。



但是医生说我想太多了，SPF 来源于无菌动物繁育的后裔，亦可经剖胎取后，在隔离屏障设施的环境中，由 SPF 亲代动物抚育。也就是说，人家爹妈就是“高帅富”。这年头，连老

鼠都拼爹。

二等“高帅富”：悉生动物

他们是与无菌动物相同的方法取得饲养（剖腹取胎，在隔离器内饲养）、但明确的物体内所给予的已知微生物的动物。

我满脑子的问号。难道说我要先把体内的微生物全部杀灭，然后吞服一种或几种已知的微生物，我就是悉生动物了？医生又说我想太多了。

一等“高帅富”：无菌动物

他们身上检不出任何活的微生物和寄生虫。他们据说生活在下面的房子里，我的乖乖，跟外星人住的一样。他们吃的喝的，包括他们呼吸的空气，都极严格。这等生活，不是我天朝屌丝可以想像的。



我研究了各种传说，发现我长相和毛色都跟实验室里的“高帅富”不太一样，难道这真的
是一个拼爹的年代？为了改变自己和下一代的命运，我决定，削发为尼，把全身剃得光光的，
再饿他个三天三夜，在一个月黑风高的夜晚，溜进实验室冒充裸鼠。

我是小鼠，你们了解我吗？

作者：麦子

我那么可爱，我还会卖萌，

你们却要拿我做实验，没事还把我宰了。

给我立个纪念碑？

请问你们立碑之前征求过我们的感受吗？

要不，我给你们立个碑？

顺便把你们扔进火葬场？

近交系小鼠（品系太多，只介绍 3 种）

这件事情不太好意思说，家丑不外扬，我爸爸跟我妹妹有一腿，我妹妹跟我叔叔有一腿，我叔叔跟我有一腿，我弟弟跟我姑姑有一腿.....总之很混乱，我也承认我们这一大家子重口味，但是还不及你们人类明星间混乱的关系。因为都是近亲繁殖，所以我们遗传物质很像。

1、BALB/c 小鼠

他是我们近交系小鼠中的一种，由亲兄弟姐妹遗传繁殖，至于具体是哪个哥和哪个姐生的，我也搞不清了。至于他又看上了哪个妹妹，我也不是太了解。他们家兄妹之间暧昧的关系外人不好说。但不得不提他们家的人真的很能生，一窝又一窝，过年去他家拜年，基本叫不上名字来，今年生的？哪个生的？你不要来问我，我的头顶飞过一群乌鸦.....



2、C57BL 小鼠

他们家的人皮肤都黑，家里有些人天生脑子进水（遗传性脑积水），至于脑子进水的那些，智商有无异常，我们也没有考究过，反正我们老鼠不上学也不考试。有许多骨骼方面的变异。全身经放射线照射后，淋巴瘤发生率达 90%~100%，所以他们家的生病了从来不敢去拍片子。



3、C3H/He 小鼠

他们家更彪悍，相互之间的乱伦从 1920 年就开始了，那时候共产党还没有成立。但是他们家的人都短命，可能是近亲繁殖太久，14 月大的时候自发肝癌发病率达 85%，自发性乳腺肿瘤的发病率也很高，每年不知道吃他们家的“白豆腐”多少回，隔三差五就死人。一生波折，一生薄命！



远交群小鼠（品系太多，只介绍两种）

这件事情就没有那么难以启齿，远交群小鼠有点像古代的皇室，血统纯正但不干乱伦的事情，远交系小鼠跟我们近交系是不通婚的，可能是因为他们比较清高，觉得我们家的事有伤风化。

1、昆明小鼠

Hi，我是昆明小鼠，正宗国产货。

首先申明，我也不想被人绑着的情况下跟大家打招呼，我是找工作被人骗了，他们说招

人参加国家自然科学基金项目，我做了份不错的简历，突出“我抗病力和适应力很强，繁殖率和成活率高。”的优点，于是他们录用了我。这年头失业率很高，3000块钱连农民工都招不到，只够招个大学生，我想有份工作不错了，就来报道上班，万万没想到是被人实验，哎，虚假广告害死人。



2、ICR 小鼠

他们家并无特殊八卦可以说，但他们经常吹牛四处散播自己优点：“适应性强，体格健壮，繁殖力强，生长速度快，实验重复性较好。”我想吹吧，这么能干，多半又要被人类拿去灌药后拿去开肠破肚。这不，昨儿还跟聊着天的阿三，今天就失踪了。吹牛皮就这家人的毛病。



突变型小鼠

1、裸鼠

我远房表哥很丑吧？

这件惨案要追溯到 1962 年，英国格拉斯医院 Grist 在非近交的小鼠中偶然发现个别无毛小鼠，后来证实是由于基因突变造成的并伴有先天性胸腺发育不良，这就是我表哥的祖先。

我表哥不但丑，身体也差，易患病毒性肝炎和肺炎，所以只能宅在家里以泪洗面。

丑有什么影响？

你们一点都不关心我表哥，就知道成天往他身上打肿瘤。

丑得找不到老婆好不好？



2、严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠

跟我表哥一样，我的闺蜜也是个病秧子，她是一种淋巴细胞发育分化过程严重受损的突变系小鼠，很容易生病，林黛玉转世。不过万幸的是，五官清秀，还算是个美人胚子。我有一次想将她介绍给表哥做女朋友，无奈我表哥裸鼠相貌丑陋，此事无疾而终。



常见肿瘤动物模型一览

作者：翠花

利用实验动物进行整体水平的肿瘤研究，是基础研究中的重要组成，可以说是高分文章必备之选。翠花这里给大家汇总了常用的肿瘤动物模型，欢迎收藏！

1、自发瘤模型：实验动物未经任何有意识的人工处理，自然发生肿瘤

肿瘤	品系	年龄(月)	性别	自发率(%)
乳腺癌	C3H	14	雄	80-90
		6	雌	90-100
	A系小鼠	/	雌	30-80
	CBA小鼠	/	雌	60-65
	Wistar大鼠	12	雌	约90
白血病	AKR小鼠	6-12	雄	76-90
			雌	68-90
肺癌	A/He	18	雌/雄	约90
	C3H/He	14	雌	80-90
肝癌	C3H/He/Ola	14	雌/雄	80-90
垂体肿瘤	C57BR/Cd	12	雄	约30
	DBA	12-18	雌/雄	50-60
卵巢癌	BALB/c	/	雌/雄	70-80
纤维肉瘤	(BALB/cXC57BL/6)F1	18	雄	约30

优点:

- ①近似人类肿瘤发生过程，实验结果更易于外推到人；
- ②相比移植瘤，对药物的敏感度不高，疗程长，便于进行综合治疗；
- ③可观察遗传因素在肿瘤发生上的作用。

缺点:

①个体之间生长速度差异较大, 肿瘤发生发展参差不齐, 很难在限定时间内获得大量生长均匀的荷瘤动物;

②试验周期长;

③需要的动物数多, 耗费大。

应用: 应用于病因学研究, 可转为移植瘤, 而继续发挥作用。

2、诱发瘤模型: 利用外源性致癌物引起细胞遗传特性改变, 从而出现异常生长活性细胞, 形成肿瘤。常用实验动物为大鼠, 也有用小鼠、豚鼠、兔、犬等。

致癌物	给药方式	剂量	时间(天)	肿瘤类型	发生率
苯并花	皮肤涂抹	0.1%, 1次/周	120-200	多发性乳头瘤	90%
	皮肤滴落	0.5%, 5次/周	150-200	孤立性乳头瘤	90%
	皮下注射	5mg/只, 共1次	90-120	局部纤维肉瘤	90%
二甲基苯	皮肤涂抹	0.15ug/只, 2次/周	90-15	多发性乳头瘤	90%
7,12-二甲基苯 蒽	静脉注射	出生后48,50,52 天, 8mg/只/次	100	乳腺癌	90%
二乙基亚硝酸胺	口服	5ng/kg, 2次/周	120-180	肝癌	90%
乙基苯基亚硝酸胺	口服	每天1mg/kg	150-250	食管癌	80%

优点：

- ①近似人类肿瘤发病特点和过程（约 80%人癌是由环境因素引起的）；
- ②可以根据需要有目的进行诱导；

缺点：

- ①诱导时间长（3-5 个月，甚至 1-2 年），成瘤率不高；
- ②动物死亡率高，花费大；
- ③诱导剂有毒，需谨慎操作；
- ④肿瘤出现的时间、部位、病灶数等在个体之间表型不均一。

应用：常用于验证可疑致癌因素的作用以及在肿瘤病因学及肿瘤预防研究。

3、移植瘤模型：将动物或人体肿瘤细胞/组织移植到动物体内连续传代而形成肿瘤，分为同种动物移植以及异种动物移植，主要是人体肿瘤的异种移植；后者应用更多一些。一般将人体细胞或组织移植于免疫缺陷的动物体内（为了避免免疫排斥），动物只是作为一个供给营养和生长环境的载体，肿瘤还能保持着人体肿瘤的组织学、免疫学及生物特性，是研究人体肿瘤最重要的模型之一，这里列举几个常用的模型：

品系	特性	用途
BALB/c 裸鼠	生长发育不良，繁殖力低下，易发生严重感染 胸腺缺失，为第 11 对染色体隐性遗传 由于无胸腺，仅有胸腺残迹或异常上皮 不能使 T 细胞正常分化，故 T 细胞免疫缺陷 B 淋巴细胞正常，但功能缺陷，抗体主要为 IgM，只有少量 IgG 无接触敏感性，无移植排斥反应。	广泛用于免疫学、肿瘤学和疾病发生机理的研究
CD-1 裸鼠	胸腺缺失，T 细胞免疫缺陷	免疫学、肿瘤学等方面的研究 由于是封闭群动物，有较好的生长繁殖能力 机体抵抗力较强，更利于长期及慢性实验
NU/NU 裸鼠	通常 NU/NU 与 CD-1® Nude 小鼠表现相同 胸腺缺失，T 细胞免疫缺陷	免疫学、肿瘤学等方面的研究 生长繁殖能力强，机体抵抗力强，更利于长期及慢性实验
SCID 小鼠	T、B 淋巴细胞联合免疫缺陷、NK 细胞活性低下、无循环补体、巨噬细胞和抗原提呈细胞功能损害	非肥胖糖尿病/人类肿瘤移植的最佳研究模型之一 Life

优点：

- ① 移植瘤保持着原发肿瘤的大部分生物学特性；
- ② 几乎所有类型人类肿瘤均能在免疫缺陷动物体内建立可移植性肿瘤模型；
- ③ 同样的接种条件，动物个体间生长速度一直，成瘤速度差异较小，接种成瘤率高；
- ④ 实验周期短。

缺点：

- ① 肿瘤增殖时间短，与人体肿瘤不同；
- ② 免疫缺陷动物需要生活在无菌环境，SPF 动物房费用高；

③人体肿瘤的所有细胞亚群不能全部出现在移植瘤中；

④获得的肿瘤组织的间质可能带有免疫缺陷动物的成分。

4、基因组修饰模型：通过在动物整体敲除或插入特性的基因而建立的肿瘤模型。

几个常用的转基因模型：

类型	特性	寿命	备注
p53 ^{+/m} 小鼠	具有较强的抑制肿瘤发生的能力	98周	衰老模型
p53 ^{-/-} 小鼠	在非常小的月龄就发生肿瘤，6个月大时75%的小鼠发生各种类型肿瘤。淋巴瘤发生率高。	10个月	肿瘤模型
p53 ^{+/-} 小鼠	对肿瘤易感，但与p53 ^{-/-} 相比发生较晚。更易发生骨肉瘤和软骨组织肉瘤。	/	
转HBx小鼠	诱导小鼠肝癌		
转Ras小鼠	诱导小鼠胰腺瘤		
k-ras突变与TGFβ2R敲除	诱导胰腺导管腺瘤		
转HER2/neu小鼠	诱导小鼠乳腺癌		
转MMTV-PyMT小鼠	诱导乳腺癌(易肺转移)		
转SV40T	诱导小鼠前列腺瘤		

优点：

- ①为环境因素与遗传背景相互作用的研究提供了很好的模型；
- ②小鼠能自发地发生某种特定的肿瘤；
- ③对于研究肿瘤发生机理、肿瘤免疫逃避来说，转基因肿瘤动物模型可能有更大的优势。

缺点：

- ①模型建立过程较长；
- ②费用比较高。

应用：研究癌前病变以及肿瘤发生发展过程。

不同种属、品系和类型的实验动物其肿瘤学方面的性状各不相同，在做研究的时候，一定要根据目的选择合适的动物模型，配上合适的实验方案，才能发挥其优势，此外，好的研究模型可以给文章增色不少哦！

肿瘤模型技术要更新了！

作者：子非鱼

肿瘤细胞构建的最大问题在于肿瘤微环境的复杂性，人类的机体并不像培养皿（瓶）般是塑料的。而且随着癌症的复杂性被越来越多的研究揭露出来，肿瘤组织不仅仅是由肿瘤细胞所

组成的观点已经成为普遍共识，因而，许多研究人员都认为是时候升级他们在实验室中构建肿瘤模型的方法及技术了。

肿瘤模型构建的瓶颈

肿瘤细胞构建的最大问题在于肿瘤微环境的复杂性，人类的机体并不像培养皿（瓶）般是塑料的。而且随着癌症的复杂性被越来越多的研究揭露出来，肿瘤组织不仅仅是由肿瘤细胞所组成的观点已经成为普遍共识，因而，许多研究人员都认为是时候升级他们在实验室中构建肿瘤模型的方法及技术了。

英国 Barts 癌症研究中心的科学家 Fran Balkwill 解释到：“这是因为肿瘤的生长及其传播需要机体的大量细胞对其进行推动作用，总的来说，肿瘤细胞微环境即是肿瘤细胞对机体其他正常细胞的招募及破坏过程。”然而现阶段，大多数研究者所培养的肿瘤细胞模型均忽略了肿瘤微环境这一个重要因素对肿瘤的影响。

因此，由欧洲研究委员会和英国肿瘤研究中心资助的 CANBUILD 工程期望能够在实验室里构建一种新型的可模拟肿瘤微环境的肿瘤细胞模型，并为以后检查肿瘤治疗效果提供一个更精准的实验模型。

剖析肿瘤组织

在项目研究的早期，该研究团队主要聚焦于分离肿瘤组织并分别研究肿瘤组织的每个细胞成分，这对如何构建肿瘤细胞模型是非常重要的。

Balkwill 认为，剖析肿瘤组织，跟拆解一个手表、一架飞机或一辆汽车十分类似，拆解过程并不会告诉你如何将它们恢复原状，但是至少这个过程让你了解构成这些事物的组成成分。然而对于癌症组织的各种细胞类型，研究人员的了解还是非常少。

该研究团队在剖析肿瘤的研究方面已经投入很长的时间（约 3 年时间），目前而言，他们已经对如何控制癌症患者，尤其是患有卵巢癌的女性患者中的肿瘤微环境有了深入的了解。更重要的是，通过剖析肿瘤组织，研究人员对如何在实验室里构建可模拟肿瘤微环境的肿瘤细胞模型有了总体的规划。接下来的这个视频则揭示这个研究团队是怎样剖析肿瘤组织的。

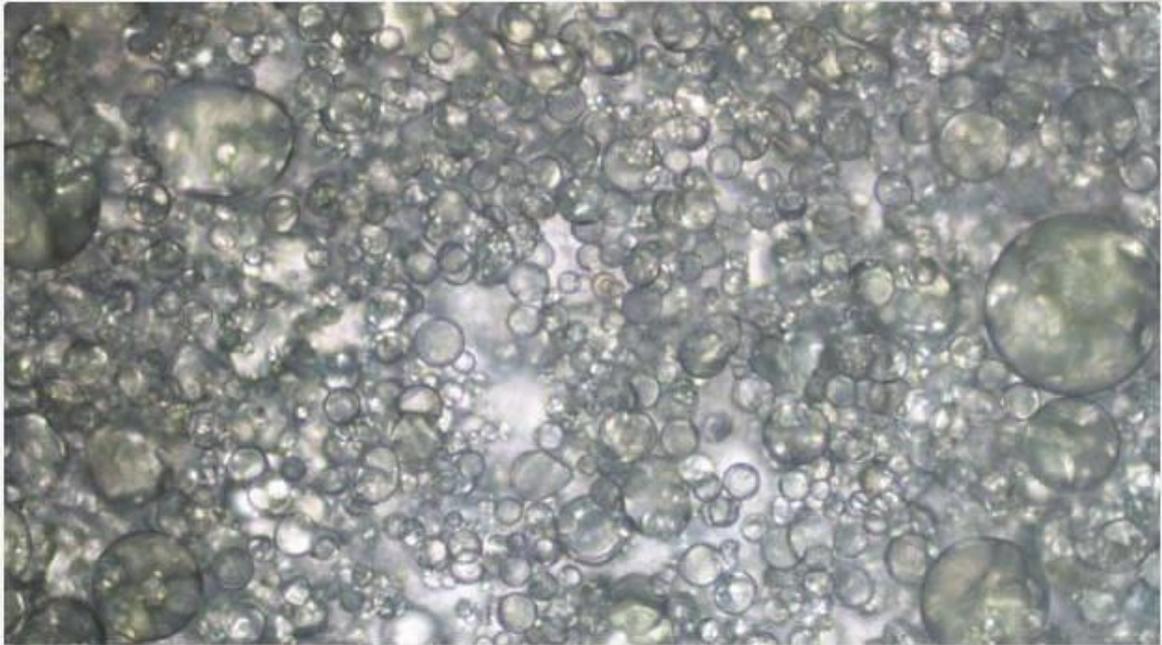
视频链接：

下一步计划

卵巢癌往往会在其肿瘤细胞在机体扩散后才能得到真正的确诊，对女性健康具有极大的威胁。因而，该研究团队开始构建部分的卵巢癌肿瘤细胞模型。

为了进一步研究卵巢癌细胞是如何进行全身扩散的，研究人员已经在实验室里成功构建了促进卵巢癌细胞扩散的一种常见的归巢组织——脂肪组织，即连接肠道的大网膜。构建好的组织细胞在其他类型的细胞的支持下能在实验室里生长几周左右。

Balkwill 指出，我们正准备将该组织添加到肿瘤细胞中，这对进一步完善卵巢癌细胞模型的构建起到重要的作用。



Fat cells growing in the lab will form the foundation of one of the team's models. Credit: CANBUILD team

精准的肿瘤研究实验模型

Balkwill 和她的团队对这项研究抱有很大的期望。她们希望所构建肿瘤模型的方法也能适用其他的肿瘤细胞，并最终能为科学家提供一个更精准的肿瘤实验研究模型。

众所周知，在某种情况下，癌症患者体内免疫细胞仍有具有识别并破坏肿瘤细胞的能力，但是大多数时候，患者的免疫功能基本处于不应答状态，究其原因，一方面是因为免疫细胞被耗尽，另一方面也是因为免疫细胞被抑制了。因而现在更多的治疗癌症的方法是尝试使患者机体的免疫细胞得以再次活化。

因而，Balkwill 希望她的研究团队所构建的精准的人造肿瘤能够为最新的免疫治疗效果的检测提供一个更准确的模型。尽管现在所构建的肿瘤模型仍具有一定的局限性，但是这个方法不仅能帮助科研人员更好的了解肿瘤细胞是如何形成及生长的，对于动物实验和计算机对肿瘤微环境的模拟模型更是一个极好的补充。

在实验室中构建新型的肿瘤细胞模型，不仅可促进科研人员对肿瘤生物学的理解，而且对后续肿瘤最新治疗方法的效果检测也是极其重要的。

参考文献：Building tumours in the lab - a how to guide

8 生信工具

来聊一聊那些五花八门的生信数据库

作者：麦子

当我们资源不足时，自然会想要找一些省钱的办法来发文章，穷则思变嘛。生信是个好办法，可是有些医生朋友还是觉得不太熟悉，别说后边的分析方法了，就连最开始找数据都不好找。研究肿瘤的比较有福，肿瘤的数据最丰富了，像大名鼎鼎的 TCGA、Ocomine 等。可研究其他疾病的怎么办，有没有疾病特异性数据库呢？

资源上哪找

随着研究成果的积累，大大小小的数据库们就冒了出来，驻扎在互联网的各个角落，现在已

经有了上千个。

找数据比较权威的资源集中站，是牛津大学出版社的 *Nucleic Acids Research* (NAR) 杂志。从 1994 年开始，NAR 每年都要出版分子生物学数据库特辑 (database issue)，收录新增的数据库、盘点旧数据库的更新状况、移除失效链接等，做个总结。目前最新版是第 24 版，即 2017 版。

The 24th annual *Nucleic Acids Research* database issue: a look back and upcoming changes

Michael Y. Galperin , Xosé M. Fernández-Suárez, Daniel J. Rigden

Nucleic Acids Research, Volume 45, Issue D1, 4 January 2017, Pages D1–D11,

而所有收录的数据库可以在 NAR 的网站上找到，下面是一个按字母排序的列表

<https://www.oxfordjournals.org/nar/database/a/>

不过找起来更方便的可能是按功能分类查找：

<https://www.oxfordjournals.org/nar/database/c/>

NAR 把数据库分为 15 个类别（有些数据库会同时被分到好几个类别）：

NAR Database Summary Paper Category List

[Nucleotide Sequence Databases](#)

[RNA sequence databases](#)

[Protein sequence databases](#)

[Structure Databases](#)

[Genomics Databases \(non-vertebrate\)](#)

[Metabolic and Signaling Pathways](#)

[Human and other Vertebrate Genomes](#)

[Human Genes and Diseases](#)

[Microarray Data and other Gene Expression Databases](#)

[Proteomics Resources](#)

[Other Molecular Biology Databases](#)

[Organelle databases](#)

[Plant databases](#)

[Immunological databases](#)

[Cell biology](#)

有些分类下边还有子类别，可以跟据自己的目的逐级点开，找到相应的资源。比如想找个特定的疾病，就点开 [Human Genes and Diseases](#)，下边还有 4 个子分类，其中癌症基因数据库是单独一个子类（[Cancer gene databases](#)），其他的疾病可以点开 [Gene-, system- or disease-specific databases](#)，就可看到具体数据库列表。

[Gene-, system- or disease-specific databases](#)

[ADHDgene](#)

[ALPSbase](#)

[AlzGene](#)

[Androgen Receptor Gene Mutations Database](#)

[Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology](#)

[AutDB](#)

[AutismKB](#)

[Autophagy Database](#)

[Beta Cell Genomics - No longer in operation](#)

[BGMUT](#)

[BTKbase](#)

[CADgene](#)

这当然只是一部分啦~

图中可看到注意力缺陷多动障碍(ADHDgene), 自身免疫性淋巴细胞增生综合征(ALPSbase), 阿兹海默病(AlzGene) 等等。

点进去会有数据库的描述说明, 或详或略。并附有数据库网站链接, 点进去就是了。

ADHDgene

NAR Molecular Biology Database Collection entry number 1536

<http://adhd.psych.ac.cn/>

Wang Jing

Contact wangjing@psych.ac.cn

Database Description

Genetics of Attention Deficit Hyperactivity Disorder

注意数据库的质量

数据库这么多, 也有大小之分, 当然不是随便一个数据库拿来就用, 用了就能得到非常牢靠的研究成果。

一个成功的数据库背后, 要有良好的管理维护工作。大数据库为什么著名、好用, 是因为有一个大集团在运营。比较著名的机构有美国国家生物技术信息中心(NCBI)、欧洲分子生物学实验室-欧洲生物信息学研究所(EMBL-EBI)、瑞士生物信息学研究所(SIB)、日本国立遗传学研究所(NIG)、华大基因(BGI)等。

而一些小团队为自己特定的研究领域创建的数据库, 质量就参差不齐了, 上边提到的疾病特异性数据库大多属于此类。

虽然小团队不容易跟大佬竞争，而且有时候同一个领域会有好几个相似的数据库，NAR 也不介意都收录，只要它们符合一定质量条件，且还在运营、维护、为研究者提供服。因为 NAR 鼓励良性竞争，让那些数据库经历时间的考证明自己。像研究 G 蛋白耦联受体的 GPCRdb 和研究碳水化合物活性酶的 CAZy 就是小团队的成功范例。

对于用户来说，采用一个数据库做研究之前要多留心，要了解好它的数据来源和运营维护情况，是否有及时回应用户的反馈，是否有版本控制；还要多检索文献，看看这个数据库的使用情况，大家利用它做出了哪些成果，反馈如何等等。必要时可多找几个相关的数据库互相佐证。

参考资料：

1. 生物信息学：基础及应用. 清华大学出版社. 2014.
2. <https://academic.oup.com/nar>
3. The 24th annual Nucleic Acids Research database issue: a look back and upcoming changes

基础扫盲贴：如雷贯耳的 BLAST 到底是啥？

作者：麦子

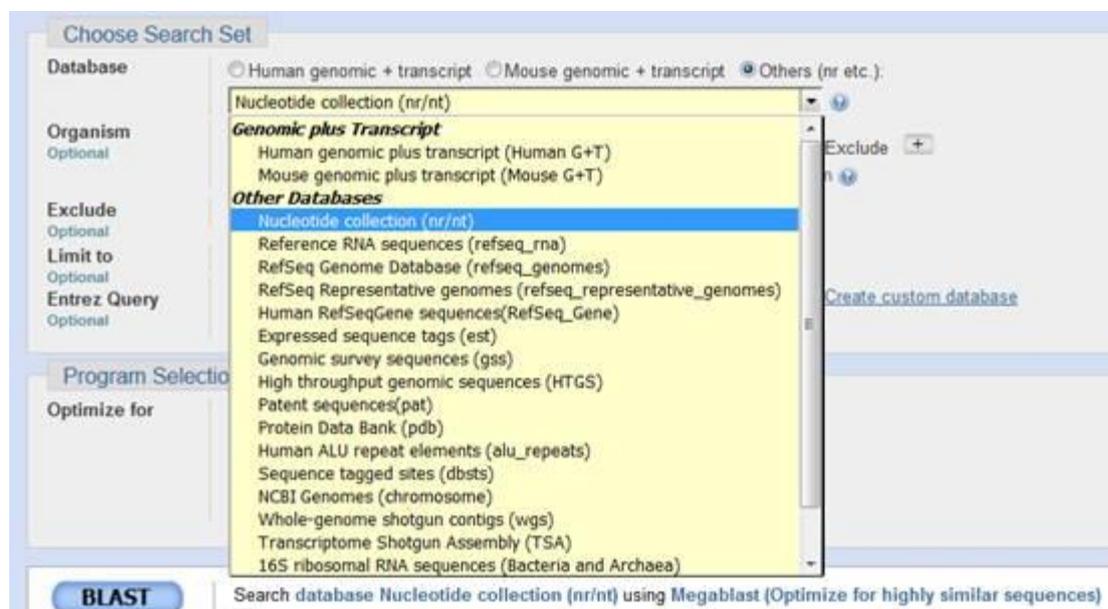
Blast (Basic Local Alignment Search Tool)，可谓生信领域最常用的工具，拿到一段序列（测序结果，或设计好的引物等等），一般都会去 blast 一下，查找相似序列。在查找相似序列的基础上衍生出了各种作用，比如鉴别基因组，蛋白质，查找特定靶区，检验引物特异性等等。自打 1990 年由 Altschul SF 等人开发出来，NCBI 引进，至今还在改善，更新算法。

量身选用数据库

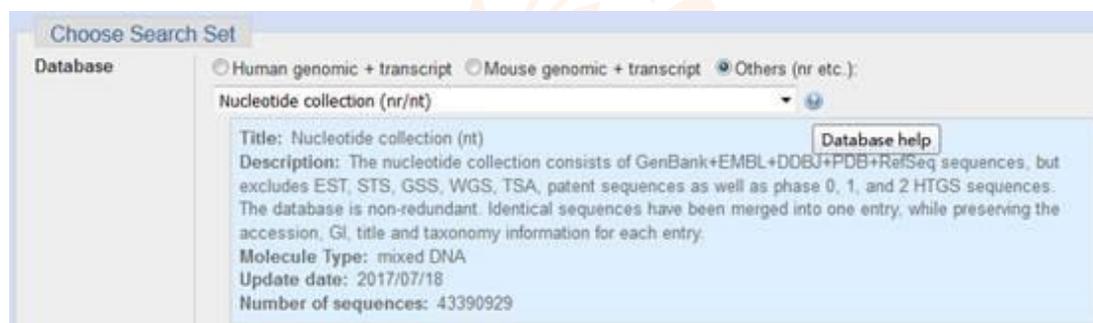
网址：<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

做 BLAST 不仅要考虑选择哪种算法，还要考虑选哪个数据库来比对。我们最常用的可能就人

类或小鼠基因组+转录组，但仍可根据自身情况选择合适的数据库，能大大节省检索时间，并提高返回的结果的质量和特异性。



不过这么多库怎么选呢，可以点一下旁边的问号（Help），查看选所的数据库的说明：



再者，如果你已经知道你要查的序列来自哪个物种，或你要跟哪个物种比对，也可以在 Organism 选项框中输入，也可以减少 BLAST 的操作程序，节省时间。

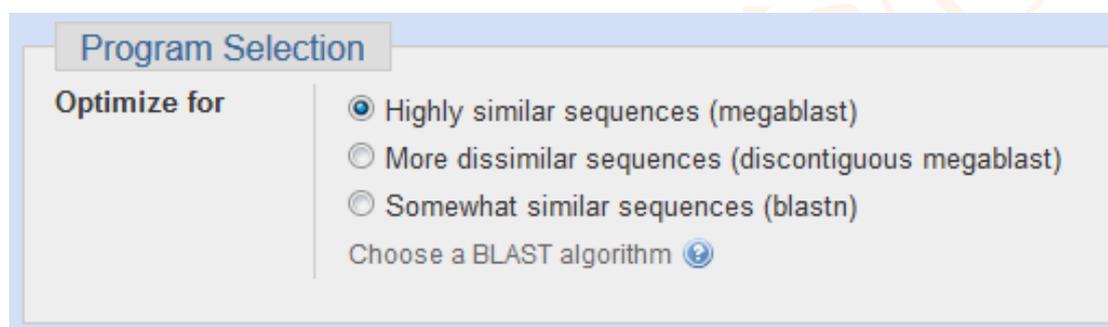


不同的序列要用不同的算法

BLAST 工具跟一套手术器械似的，不同的算法干不同的活，得根据自己需要的信息，选择需要的工具。可以看到检索页面上方有 5 个选项卡，分别代表 5 种查询类型。



各大类之下可能还有几个小分类可选：



它们的功能要点总结如下：

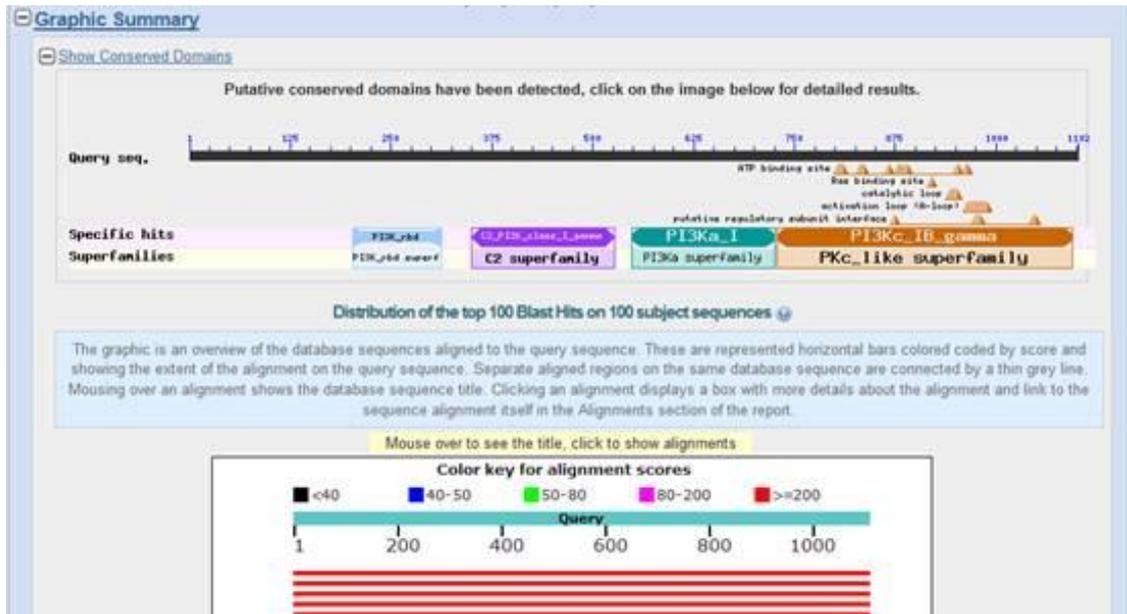
页面	查询 VS 数据库	比对类型	算法与特征
Nucleotide blast	核酸 VS 核酸	核酸 VS 核酸	Megablast :物种内比较。这个算法为是鉴定最相似的序列而优化过的。它要先找到至少一段 28 个碱基完全匹配的序列, 再进行全段比对。 Discontiguous megablast :物种间比对, 查找编码序列。 Blastn :将库中的核酸序列逐一与所查序的序列比对。适合较短的序列, 物种间比较。
Protein blast	蛋白 VS 蛋白	蛋白 VS 蛋白	Blastp :将库中的蛋白序列逐一与所查序的序列比对。 DELTA-BLAST :蛋白相似检索, 比 blastp 更为敏感。 PSI-BLAST :用位置特异性迭代(PSI)算法做 blastp。算法比较复杂, 适用于查找亲缘关系较远的蛋白家族, 是查找蛋白序列最敏感的方法。 Quickblastp :今年五月新上线的比对蛋白质的算法, 特点嘛, 就是快。 PHI-BLAST :将输入的蛋白质模式作为限定查找相似蛋白序列, 不适用于亲缘关系远的蛋白。
blastx	核酸(翻译) VS 蛋白	蛋白 VS 蛋白	Blastx :将一段核苷酸序列可能的六种翻译形式与库中的氨基酸序列比对, 找到它潜在的蛋白产物。
tblastn	蛋白 VS 核酸(翻译)	蛋白 VS 蛋白	Tblastn :有点像 Blastx 反过来, 将库中的编码序列翻译成蛋白质序列, 跟输入的蛋白序列比对, 找到库中跟查询序列相似的编码序列。
tblastx	核酸(翻译) VS 核酸(翻译)	蛋白 VS 蛋白	Tblastx :将查询序列和库中的序列都翻译成蛋白再比对, 找到数据库中跟查询序列相似的编码序列。

结果解读

找一小段蛋白序列来试一下那个新算法 Quickblastp。可能是我的序列太短了, 并没有感觉到 Quick (0.0) 如果你的序列够长可以体会一下。

首先会看到一个表头, 展示这次比对的基本信息, 如比对类型、序列长度、所选的数据库等等, 就不贴图了。

接下来就是图形描述 (Graphic Summary)。



第一部分是保守域，当检测到时才会显示。

第二部分是比对上的序列（hit）在查询序列上的分布。有刻度的条带是序列的坐标，其下的每一个细条带代表一段 hit，其颜色是按上方的颜色标尺显示比例得分（alignment score），得分越高，相似度越高。另外还可注意 E value，E 值越低，相似度越高，点击可显示详细信息。

保守域也可点开查看详情，在每个 hit 上悬浮鼠标可看到它编码的蛋白的 3D 结构图以及功能等详细说明，在下方的列表中点开+号还可看到具体的序列。

Conserved domains on [gi|21237725|ref|NP_002640|]

View Standard Results

phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma isoform [Homo sapiens]

Protein Classification

C2_P13K_class_I_gamma and PI3Kc_IB_gamma domain-containing protein (domain architecture ID 10639766)
 protein containing domains PI3K_rbd, C2_P13K_class_I_gamma, PI3Ka_I, and PI3Kc_IB_gamma

Graphical summary Zoom to residue level show extra options

Query seq. 1 125 250 375 500 625 750 875 1000 1102

ATP binding site
 Ras binding site
 catalytic loop
 activation loop (A-loop)
 putative regulatory subunit interface

Specific hits

PI3K_rbd
 C2_P13K_class_I_gamma
 PI3K_C2

Non-specific hits

PI3K_rbd superfamily

Superfamilies

PI3K_rbd superfamily
 C2 superfamily

Search for similar domain archi

List of domain hits

#	Name	Accession	Interval	E-value
[H]	PI3Kc_IB_gamma	cd00894	Catalytic domain of Class IB Phosphoinositide	729-1095 0e+00
[H]	C2_P13K_class_I_gamma	cd08399	C2 domain present in class I gamma phospho	350-527 1.05e-111
[H]	PI3Ka_I	cd00872	Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) class I, acc	549-725 1.64e-88

Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) class I, accessory domain ; PIK domain is conserved in substrate presentation. In general, PI3K class I prefer phosphoinositol (4,5)-bisphosphate as a substrate. Mammalian members interact with active Ras. They form heterodimers with adapter molecules linking them to different signaling pathways.

Pssm-ID: 238444 Cd Length: 171 Bit Score: 284.21 E-value: 1.64e-88

gi|21237725|549 NQLRQLEAIIATDPLNPLTAEDKELLVHFVYELHPFATPHLFSVYVWQQEIVARTVQLARRvvdqSALDVGLTM 628
 Cdd:cd00872 1 NEEREQLEAIIARDFSELTEEDKELLVHLPHCRKPKQALPHLLLSVYVWKRDDVAQMQQLKRW----PKLKPQAL 75

这样便可对你的序列特征和功能有个大致的了解。

参考资料：

1. <http://bitesizebio.com/21223/how-does-blast-work/>
2. <http://bitesizebio.com/26522/blast-off-the-basic-local-alignment-search-tool-explained/>
3. ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/factsheets/HowTo_BLASTGuide.pdf

不明觉厉！酰基-生物素交换法是个什么鬼？

作者：老鹏

大家在读医学研究文献时常常会看到一种不明觉厉的研究技术，叫“Acyl-biotinyl Exchange”，

翻译过来就是“酰基-生物素交换法”。这种方法主要用于研究蛋白质所发生的翻译后修饰。

大多数蛋白分子都有多个不同的翻译后修饰机制，用以调节蛋白功能。蛋白质最常见的翻译后修饰方式叫磷酸化，主要发生在丝氨酸、苏氨酸等残基位点上，常常通过特异性的抗体进行检测。

除了磷酸化之外，蛋白质的翻译后修饰的方式还有很多，例如糖基化、乙酰化、甲基化、亚硝基化、谷胱甘肽化、棕榈酰化等等。探索蛋白质翻译后修饰的生物学意义是生命科学的研究热点之一。

对于医学研究而言，如果你在课题研究过程中发现某种新报道的蛋白质翻译后修饰刚好参与调控疾病过程中该蛋白的功能变化，那么恭喜你，一篇不错的好文章已经在不远处招手啦。

1

酰基-生物素交换法是一种常见的检测蛋白质翻译后修饰的方法。蛋白质的半胱氨酸残基上的巯基基团，由于其高反应性，很容易发生各种氧化还原反应或酰化反应。酰基-生物素交换法的实质是将所要检测的翻译后修饰转化为酰基化的生物素基团。

整个交换过程要分三步完成：

第一步，先封闭可能干扰检测的噪音，就是其他可被生物素酰基化的氨基酸残基基团；

第二步，通过某种方式将所检测的翻译后修饰特异性的转变成可进行酰基化反应的状态，如还原态的巯基状态或游离的胺基状态；

第三步，将生物素通过酰基化反应，结合那些转变生成的可发生翻译后修饰的氨基酸残基。这样，原来的蛋白质翻译后修饰会交换成酰基化的生物素。再通过可以选择性结合生物素的亲和素制备层析柱，就可以富集这些生物素化的蛋白，再通过抗体一一检测。

2

亚硝基化修饰是一种发生在半胱氨酸残基巯基上的蛋白质翻译后修饰，对很多心脑血管疾病相关的蛋白功能有重要的调节效应。

以亚硝基化为例，可以帮助我们了解如何通过酰基-生物素交换法来研究蛋白质的翻译后修饰。下面让我们一起看看如何在实验室里通过酰基-生物素交换法检测某个蛋白亚硝基化水平吧。

首先，工欲善其事必先利其器。不要嫌麻烦，**认认真真的配制几种溶液吧。**

第一种，叫 HEN buffer（11.9150g HEPES 羟乙基哌嗪乙磺酸，NaOH，0.0584g 乙二胺四乙酸，0.004166g 新亚铜树碱，加入到 200 ml 超纯水中），这可是整个酰基生物素交换反应发生的基础缓冲液哦。

第二种，叫 HENS buffer，就是在 HEN buffer 的基础上，加入一定比例的 SDS（一般是把 HEN buffer 和 25% 的 SDS 按 9:1 配好）。

第三种，叫裂解液，是在第一种 HEN buffer 的基础上，每毫升体积里加入 1% 的 NP40 10 μ l，protease inhibitor cocktail 10 μ l，1 mM 的 PMSF 10 μ l。裂解液是最先用到的液体，用于破碎细胞或组织。

第四种，叫洗脱液，在第二种 HENS buffer 的基础上，加入 DTT 配制而成（一般 DTT 的终浓度为 100-200mM）。

3

然后，我们就可以按照上面介绍的三大步，对蛋白质上亚硝基化修饰的巯基来进行 Acyl-biotinyl Exchange Reaction 了。

第一步，封闭可能产生干扰的噪音：将细胞或组织样本按 10 μ l/mg 或 500 μ l/孔（六孔板）加入裂解液，在冰上进行超声裂解处理 5 分钟，立即 4 $^{\circ}$ C 下 12000g，离心 15 分钟。取上清，加入 4 倍体积的 blocking buffer。

所谓的 blocking buffer，就是在每 ml HENS buffer 中加入 10 μ l MMTS 储液（MMTS 的全称是 methyl methanethiosulfonate，是一种特异性的巯基封闭剂，用二甲基甲酰胺配制到 2M 的储液浓度）。封闭反应在 50 $^{\circ}$ C 的恒温水箱中进行，一般要 20 分钟到半小时。

第二步，将亚硝基化修饰的巯基转化为可进行酰基化反应的游离巯基：把裂解液转入离心管里。在离心管中一次性加满 -20 摄氏度的丙酮，-20 $^{\circ}$ C 下静置 40 分钟，立即 4 $^{\circ}$ C，5000g

离心 20 分钟，去除上清。

重复步骤三次后得到比较纯净的蛋白质。去除丙酮上清后，向沉淀加入用 HENS buffer 所配制的维生素 C (20 mM, 1ml)，溶解蛋白并将亚硝基化信号转变为可酰基化的巯基分子。

第三步，将生物素通过酰基化反应结合这些转变生成巯基。加入用 HENS buffer 所配制的生物素 biotin-HPDP (1mM, 1ml)，室温下孵育 2 小时（用摇床，一定要注意避光）。反应完成后再用丙酮沉淀的方法，去除反应液里小分子，制备纯化蛋白。

把反应液转移入离心管里。在离心管中一次性加满-20 摄氏度的丙酮，-20℃静置 40 分钟，立即 4℃，5000g 离心 20 分钟，去除上清。重复步骤三次。用 2~3ml 的 HENS buffer 完全溶解沉淀物。

最后，我们还有一个很关键的实验步骤，就是从一堆蛋白质里把亚硝基化修饰的蛋白分拣出来进行抗体检测。不要忘了哦，此时，那些原本亚硝基化修饰的蛋白质早已被换成了带有酰基生物素标签的蛋白，找出它们可一点也不难。

我们用一种填料亲和素-agarose 制备成亲和层析小柱，这可是个很高大上的玩意，可以把带有酰基生物素标签的蛋白统统结合上去。

将溶解沉淀蛋白的 HENS 液灌注亲和素-agarose 洗脱柱，循环多次，并用洗脱液冲洗灌注亲和素-agarose 洗脱柱（确保洗脱液充满整个柱体），在 100℃时处理 20 分钟后，打开亲和素-agarose 洗脱柱下盖，收集含目标蛋白洗脱液，并且用洗脱液继续冲洗 2~3 次。收集蛋白。

酰基-生物素交换法的步骤虽然比较复杂，但是并不需要特殊的实验设备，属于成本不高但逼格很高。基本上可以做 WESTERN BLOTTING 实验的实验室都可以做这方面的研究。

4

而且，做疾病模型中的蛋白质翻译后修饰的文章还不算很多，相当抢手，可以多多关注哦。

注意事项：

不是所有蛋白都会发生亚硝基化修饰。先做好文献调研。

维生素 C 还原处理的时间不宜太长。

Biotin-HPDP 最好配成储液后分装成小支。

丙酮沉淀蛋白后要尽量吹干或挥干里面的丙酮残留。

亲和素-agarose 洗脱柱填装制备时要注意推平，不要产生缝隙或气泡。

如果对该技术有兴趣，推荐几篇文献看一看：

1. ffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH (2001) Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol* 3:193–197.

2. ffrey SR, Fang M, Snyder SH (2002) Nitrosopeptide mapping: a novel methodology reveals S-nitrosylation of dexras1 on a single cysteine residue. *Chem Biol* 9:1329–1335.

3. stafa AK, Kumar M, Selvakumar B, Ho GP, Ehmsen JT, Barrow RK, Amzel LM, and Snyder SH (2007). Nitric oxide S-nitrosylates serine racemase, mediating feedback inhibition of D-serine formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 2950-2955.

GEO 数据挖掘的正确姿势！

作者：老谈

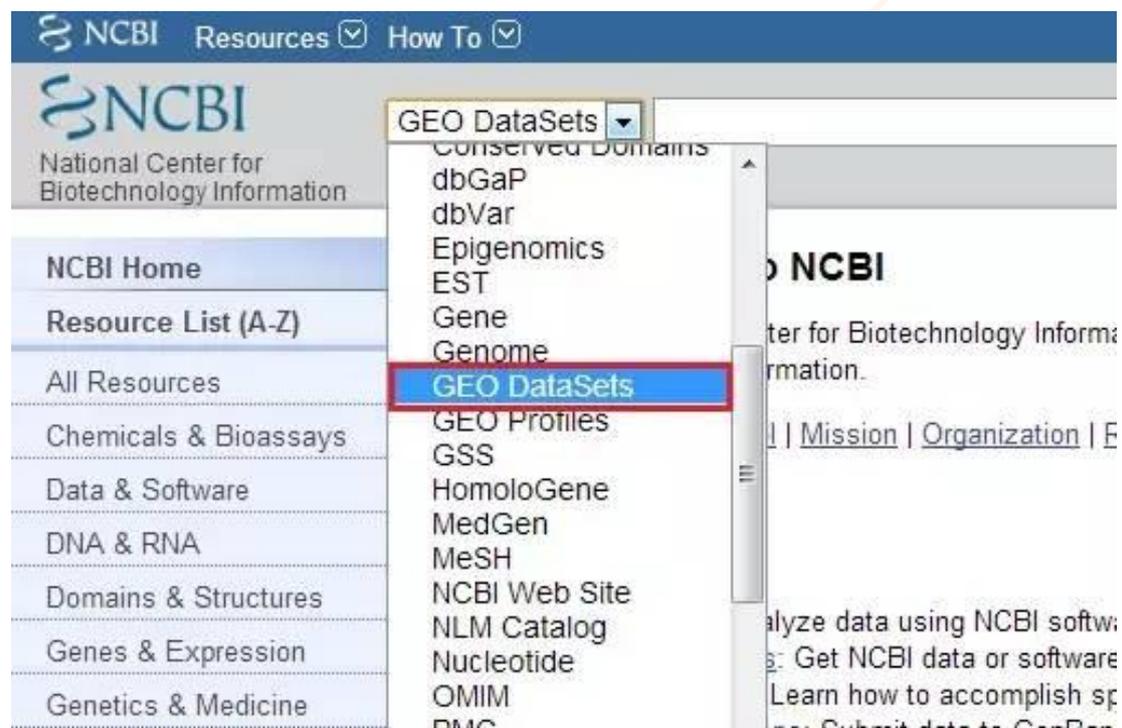
在大数据的时代背景下，高通量测序技术及基因芯片技术的快速发展，使得基因数据呈井喷之势。而 GEO 作为世界上最大的免费的储存基因表达的数据库，包含了大约 16 亿个测量值，这些输入的数据很多还没有被破解，只是以原始资料存在，研究者可进一步挖掘其中包含的

生物信息。

今天老谈以“肠癌”为例，带大家走上寻宝之路，教教大家如何在 GEO 数据库上找到宝贝。

1、打开 NCBI 官网：www.ncbi.nlm.nih.gov。

2、搜索 GEO 的数据库，找到 GEO DataSets。



3、搜索肠癌“Colorectal Cancer”，即可获得所有肠癌的芯片数据。

Display Settings: Summary, 20 per page, Sorted by Default order **Send to:**

Results: 1 to 20 of 12951
[<< First](#) [< Prev](#) Page 1 of 648 [Next >](#) [Last >>](#)

[EphB2-selected populations of intestinal crypt cells](#)

1. Analysis of intestinal epithelial cells FACS-sorted according to high, medium or low EphB2 receptor levels. Intestinal stem cells (ISC) highly express EphB2 receptor which becomes gradually silenced as cells differentiate. Results provide insight into a molecular program specific for normal ISCs.

 **数据组等级聚类热图**

Organism: Mus musculus

Type: Expression profiling by array, transformed count, 3 cell type sets

Platform: GPL1261 Series: GSE27605 6 Samples 研究项目编号

Download data: GEO (CEL) 检测平台类型编号

DataSet Accession: GDS4514 ID: 4514 数据集编号

[PubMed](#) [Similar studies](#) [GEO Profiles](#) [Analyze DataSet](#)

4、选择需要研究的芯片点击进入，例如我们搜索了一个 II 期肠癌的芯片数据库。

	表达谱	分析工具	样本分类
DataSet Record GDS4513:	Expression Profiles	Data Analysis Tools	Sample Subsets
Title:	Clinical outcome of stage UICC II colon cancer patients		
Summary:	Analysis of tumor cells from sporadic stage UICC II colon cancer patients who were treated by elective standard oncological resection but developed relapse during follow-up. Results provide insight into the challenges of constructing molecular signatures predictive for patient outcome.		
实验设计			
Organism:	<i>Homo sapiens</i>		
Platform:	GPL570: [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array		
Citation:	Gröne J, Lenze D, Jurinovic V, Hummel M et al. Molecular profiles and clinical outcome of stage UICC II colon cancer patients. <i>Int J Colorectal Dis</i> 2011 Jul;26(7):847-58. PMID: 21465190		
论文			
Reference Series:	GSE18088	Sample count:	53 样本数

5、直接点击进入后，会获得该基因芯片的结果，并进入分析工具的面。

Data Analysis Tools

Find genes

Compare 2 sets of samples 选择二阶样本分组

Cluster heatmaps

Experiment design and value distribution

Find gene name or symbol: 填选需要研究的基因

Find genes that are up/down for this condition(s): disease state other

6、在 Data AnalysisTools 中可以进行进一步的数据分析，例如将原有样本群按照自己需要的分类再进行细分，并可筛选需要了解的某基因的表达谱。例如，如果要找耐药相关的基因，P-gp 可介导肠癌多药耐药，那我们就要从 P-gp 入手，搜索该芯片中 P-gp 的表达谱。

GEO Profiles ▾ GDS4513[ACCN] p-GP
Save search Advanced

Display Settings: Summary, Sorted by Subgroup effect Send to:

Results: 3

[ABCB1 - Clinical outcome of stage UICC II colon cancer patients](#)

1. Annotation: ABCB1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1
Organism: Homo sapiens
Reporter: GPL570, 209993_at (ID_REF), GDS4513, 5243 (Gene ID), AF016535
DataSet type: Expression profiling by array, transformed count, 53 samples
ID: 94418000

[GEO DataSets](#) [Gene](#) [UniGene](#) [Profile neighbors](#) [Chromosome neighbors](#) [Sequence neighbors](#)

同源基因
Homologene neighbors

表达谱相近 **染色体位置相近** **序列相近**

表达谱

7、获得表达谱信息之后，在链接中可以发现 Profile neighbors，即表达谱相近的基因，这就是我们需要寻找的与 P-gp 相关的有可能共表达的基因了。同样，通过 GEO Profiles 的搜索，也同样可以得到所有芯片数据中该基因的表达谱情况，并根据需求进行查找可能的共表达基因。

How To 

GEO Profiles  ABCB1 输入基因

GEO表达谱搜索 Save search Advanced

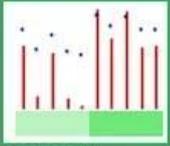
Display Settings: Summary, 20 per page, Sorted by Subgroup effect Send to:

Results: 1 to 20 of 5299 << First < Prev Page 1 of 265 Next > Last >>

[Abcb1b - Fibroblast growth factor-23 transgenic model](#)

1. Annotation: Abcb1b, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B
 Organism: Mus musculus
 Reporter: GPL81, 93414_at (ID_REF), GDS3361, 18669 (Gene ID), M60348
 DataSet type: Expression profiling by array, transformed count, 10 samples
 ID: 55070492

[GEO DataSets](#) [Gene](#) [UniGene](#) [Profile neighbors](#) [Chromosome neighbors](#) [Sequence neighbors](#) [Homologous neighbors](#)



8、对所有该基因的表达谱分析后，同样可以获得可能的信号通路。

Filters: [Manage Filters](#)

Profile data 

[Download profile data](#)  下载表达谱

Profile pathways 

[Find pathways](#)  可能的表达谱通路

9、点击后，可直接转入 Flink 显示可能的通路，使用极方便。

The screenshot shows the FLink web interface. At the top, there are logos for NCBI and FLink. Below the navigation bar, the page title is "FLink - Frequency weighted Links". A sub-header indicates "Links from geoprofiles records to biosystems records weighted by frequency (click to see details)". The interface includes tabs for "Gene" and "BioSystems", and buttons for "Clear Selections", "Show", "Download CSV", and "Summary". A table displays the following data:

Frequency	BSID	Source	Name
1	961276	KEGG	Galactose di pathway, gal glucose-1P
1	938405	REACTOME	GPCR down
1	938140	REACTOME	Opioid Signa
1	938139	REACTOME	PLC-gamma
1	938138	REACTOME	Signaling by
1	938136	REACTOME	NGF signalli plasma men
1	938127	REACTOME	PLCG1 even

“oncomine” ——如何在大数据时代挖掘肿瘤数据

作者：老谈

“大数据”时代已经降临，在商业、经济及其他领域中，决策将日益基于数据和分析而作出，而并非基于经验和直觉。这是一场革命，庞大的数据资源使得各个领域开始了量化进程，无论学术界、商界还是政府，所有领域都将开始这种进程。

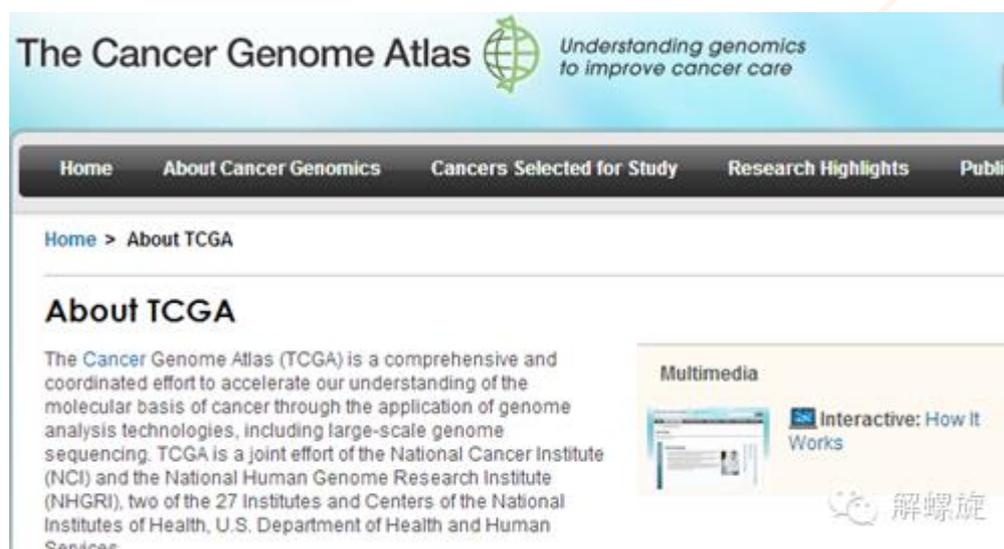
--by 老谈

在生物学领域，大数据的整合分析更是亟不可待。到目前为止，在肿瘤方面已有 **oncomine** 和 **TCGA** 这两个数据库，可供分析参考。

先说 TCGA，TCGA 只提供数量有限的癌症基因表达谱，但是不能够提供相关分析。其数据库数据涉及到相关癌症基因的 mRNA/microRNA 表达谱、拷贝数变异、突变等大量的生物

信息学数据。TCGA 网络中，数据类型包括拷贝数结果、杂合缺失、SNP 等。

另外，在搜索 TCGA 数据如何使用的过程中，相信小伙伴们会遇到 level 1, level 2.....等字眼。起始 level 1 指的是原始数据；level 2 指的是处理过的数据：经过标准化后的单样本数据或对存在或者不存在特定分子异常的解释；level 3 指的是经过分割、解释的数据：来自单个样本的经过处理的数据的汇集；level 4 指的是感兴趣的区域：基于两个或多个数据的关联，包含分子异常，样本特征，临床变量。换句话说，也就是数据的权限，level 越高，数据可及性越低。



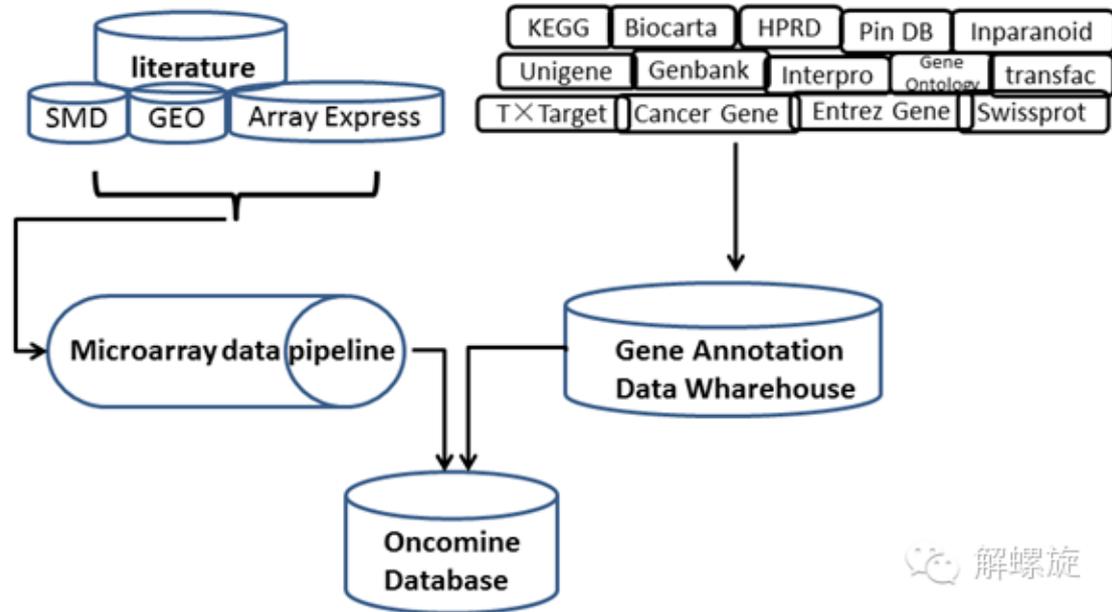
Oncomine 是目前世界上最大的癌基因芯片数据库和整合数据挖掘平台，旨在挖掘癌症基因信息。到目前为止，该数据库已经收集了 715 个基因表达数据集，86733 个癌症组织和正常组织的样本数据。Oncomine 拥有最全的癌症突变谱、基因表达数据以及相关的临床信息，可利于发现新的生物标记物或新的治疗靶点。



Oncomine 的使用并非免费的，广大高校的小伙伴们可要好好的珍惜自己的学生身份，在校生可以通过学校的邮箱注册使用，今天就先给大家介绍下这个数据库的功能，有兴趣的同学可以自行研究，下期也会详细介绍使用流程。

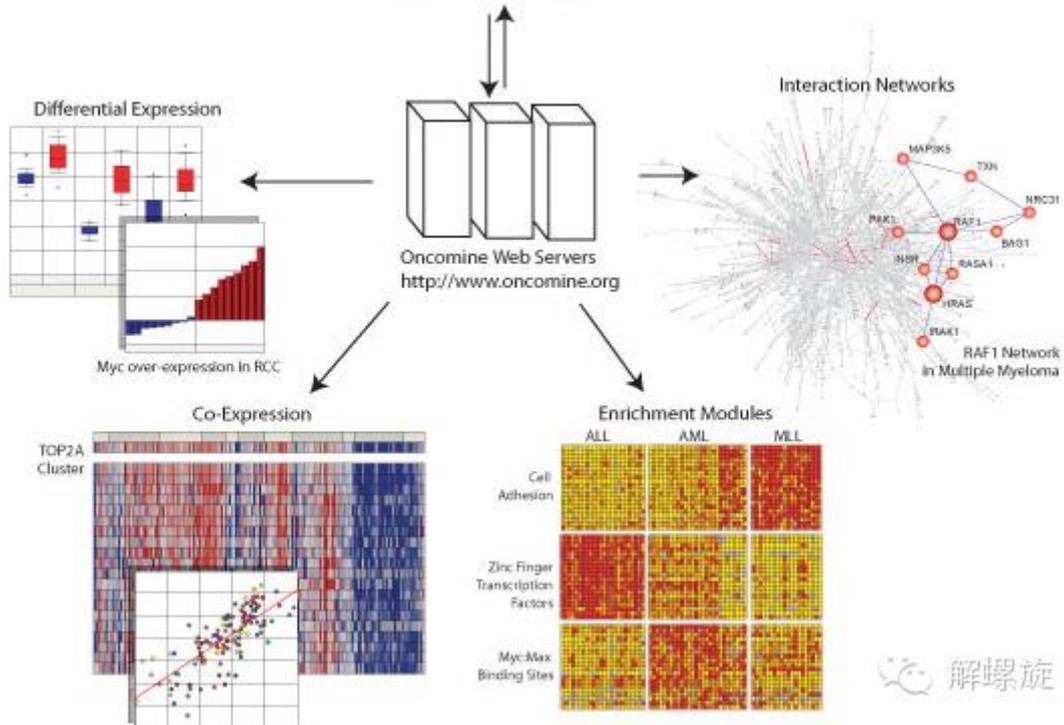
如下图所示，oncomine 整合了文献及芯片数据库中高质量标准的肿瘤组织芯片结果，14 个注释数据库的分析，并且 oncomine 里的数据会随着这些数据可的跟新而及时跟新。通过 oncomine 网站（www.oncomine.org）分析，可以得到差异表达的结果，共表达分析，富

集分析，相互作用的网络、及 meta 分析。



解螺旋

接上图



解螺旋

通过 oncomine, 可以进行**差异表达分析、共表达分析**, 查找某种癌症中差异表达的**基因, 确定目的基因, 确定研究方向**。对于研究方向还没有确定的临床医生, 如果想要通过芯片筛选确定感兴趣的研究分子, 可以通过 oncomine 数据挖掘的方法确定研究方向。不仅可以为您节省科研成本, 而且其信息也更加全面。

Oncomine (二): 如何查询基因 X 在不同肿瘤临床样本中的表达值

作者: 老谈

Oncomine® Research Edition: 715 datasets and 86,733 samples

A promotional banner for Oncomine Research Edition. The background is dark blue with a grid of glowing data points and charts. The text is white and reads: "Design better experiments. Gain more insights. Prepare to publish faster." The word "WORLD" is visible in the background on the right side.

Design better experiments.
Gain more insights.
Prepare to publish faster.

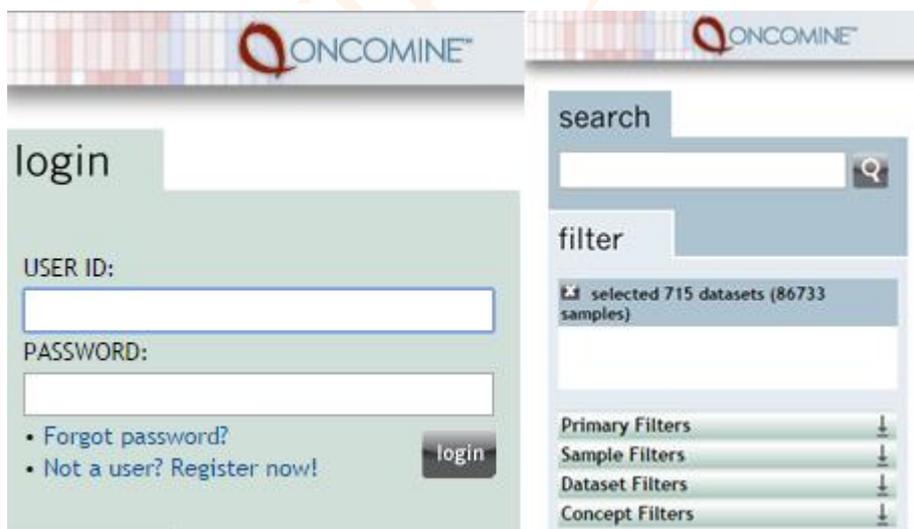
背景回顾

Oncomine是目前世界上最大的癌基因芯片数据库和整合数据挖掘平台，旨在挖掘癌症基因信息。通过oncomine，可以进行差异表达分析、共表达分析，查找某种癌症中差异表达的基因，确定目的基因，确定研究方向。

老谈之前给小伙伴们介绍过“oncomine”——如何在大数据时代挖掘肿瘤数据。那如果我有一个基因 X，如何通过 oncomine 来查询该基因在不同肿瘤临床样本中的表达值呢？

--by 老谈

输入网址 www.oncomine.org 后，页面左上角要求登陆账号和密码，账号和密码可以通过学校邮箱申请。



页面登陆后，页面大致分为左中右三块，主要操作在左侧，如上图所示。从中可以看出，oncomine 数据库整合了 715 个 datasets，共 86733 例样本。通过 filter 设置，找到需要的信息。下方有 4 个 filter，通过↓箭头可以展开相关选项。

假想了解乳腺癌中目的基因 ERBB2 在癌症组织和正常组织中的表达情况

设置限定条件:

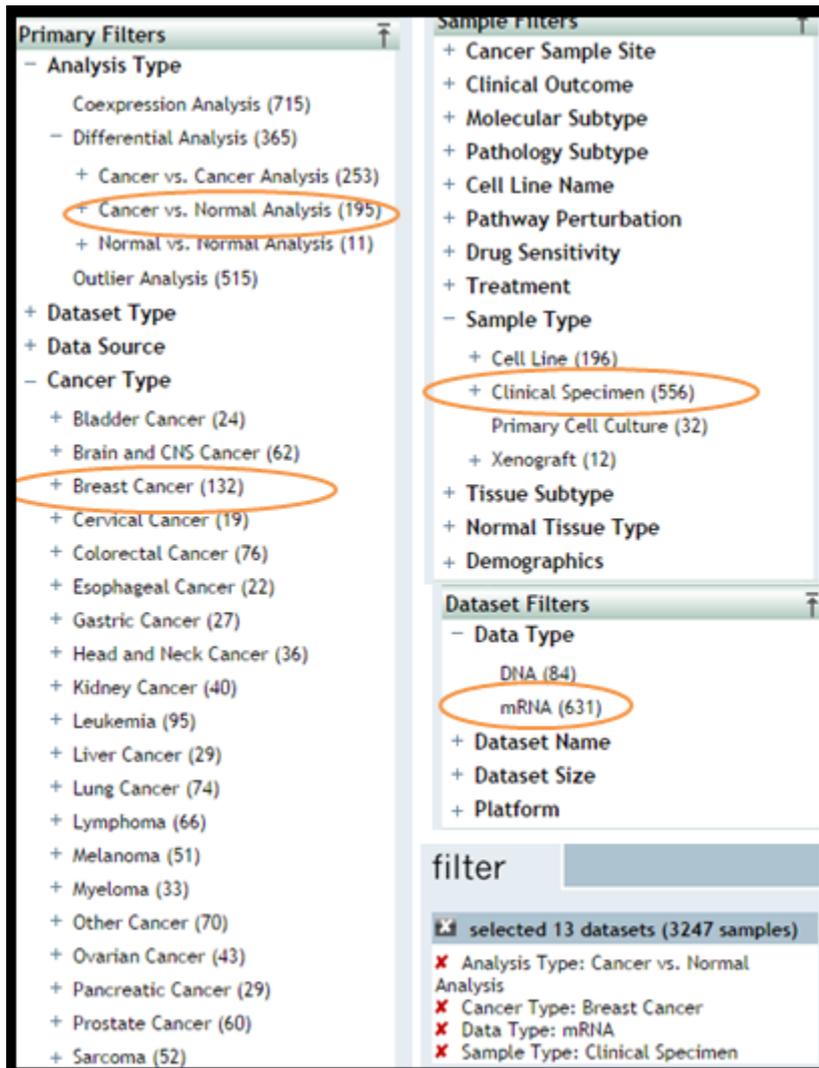
从 **primary filter**→**Analysis Type** 选择 cancer vs. normal Analysis

从 **cancer type** 选项选择自己研究领域的癌症类型, 比如选择 breast cancer

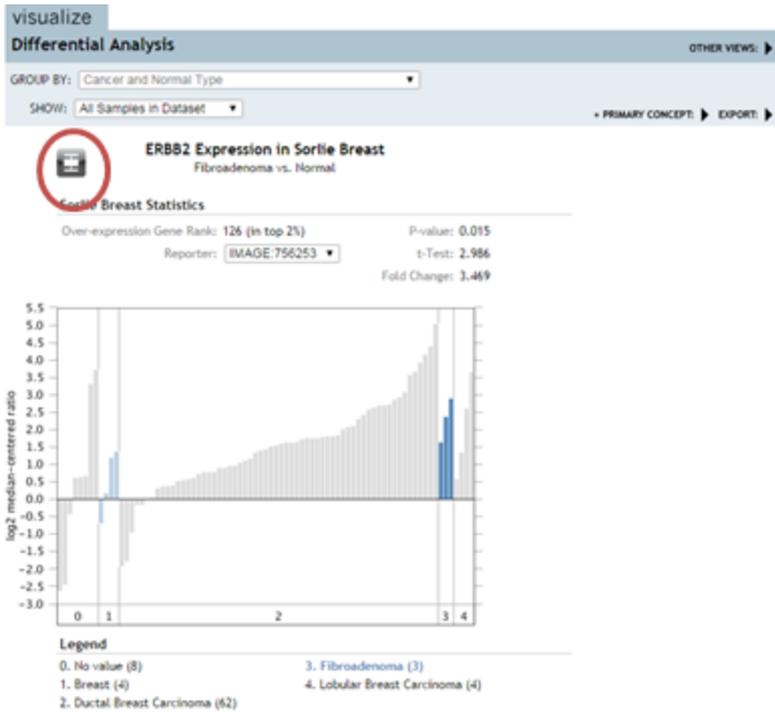
从 **sample filter**→**sample type** 选择 clinical specimen

在 **Dataset Filters**→**Data Type** 选择 mRNA



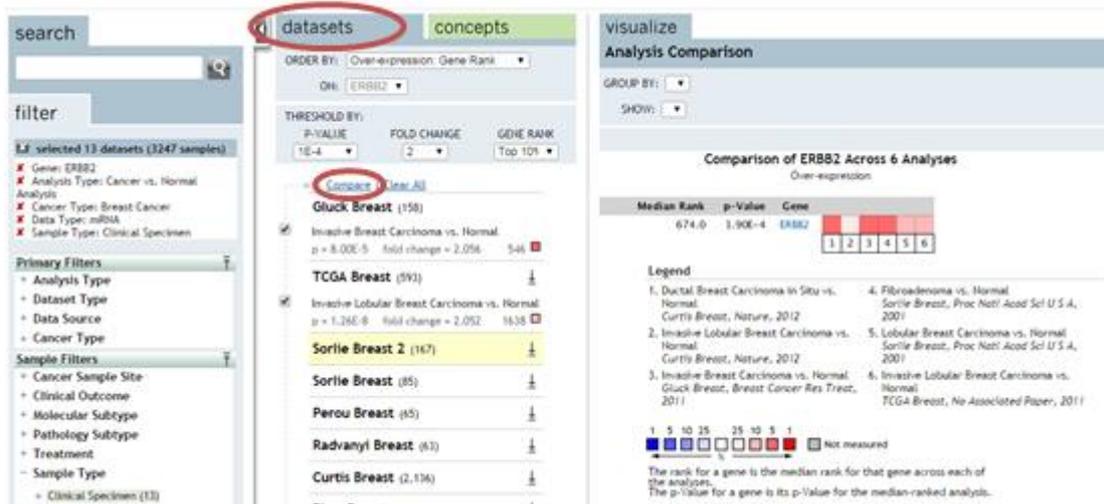


所有的设置会在 filter 一栏显示，最后，在 search 搜索框中输入目的基因 ERBB2，在 visualize 视图下选择 show all sample in dataset，显示结果如下：该基因在不同类型乳腺癌中的表达情况。并且，可以通过点击圈出处的按钮，改变数据表现形式。



另外，还可以选择多个数据库进行 meta 分析，说明数据的可信程度。

首先是数据库 datasets 的选择，在对应的 dataset 前打勾，然后点击 compare，结果在 visualize 界面中查看结果。



在 visualize 界面中, 会存在中位秩和 p-value, 中位秩用于评估数值的不可信度, 体现在 p 值上, p 值越小说明可信度越高。(中位秩: 用于获取不可靠性估计值的量度。中位秩是在 N 个单元样本第 j 次失效时真实失效概率在 50%的置信水平上应具有的值, 或者是不可靠性的最佳估计值。)

老谈杂谈:

以上内容用一句话概括为“在临床样本数据库中分析差异表达的基因, 确定研究方向”。当然, 也可以在 Analysis Type 处选择共表达分析。细胞间的相互作用除了蛋白-蛋白、蛋白-RNA、RNA-RNA 之间的相互作用, 另外有时候某些蛋白之间也会存在共表达的关系, 这一关系也可通过 oncomine 进行分析哦。

史上最全的 lncRNA 数据库大全及心得分享

作者: 老谈

miRNA 研究热度正在消减, lncRNA 却热火朝天。虽然老谈一直默默觉得部分 lncRNA 就是伸长了的 miRNA, 其作用机制比较类似, 但有关所有 lncRNA 全方面的功能研究还需要进一步的探索。小伙伴们更需要装配研究的利器, 帮助我们在寻求相关 lncRNA 信息时能够手到拈来, 不费吹灰之力! 今天老谈就跟大家分享一些研究 lncRNA 的数据库, 帮助大家做好科研准备工作。当然 lncRNA 数据库较之于 miRNA 可能相对较少, 毕竟后者的研究已

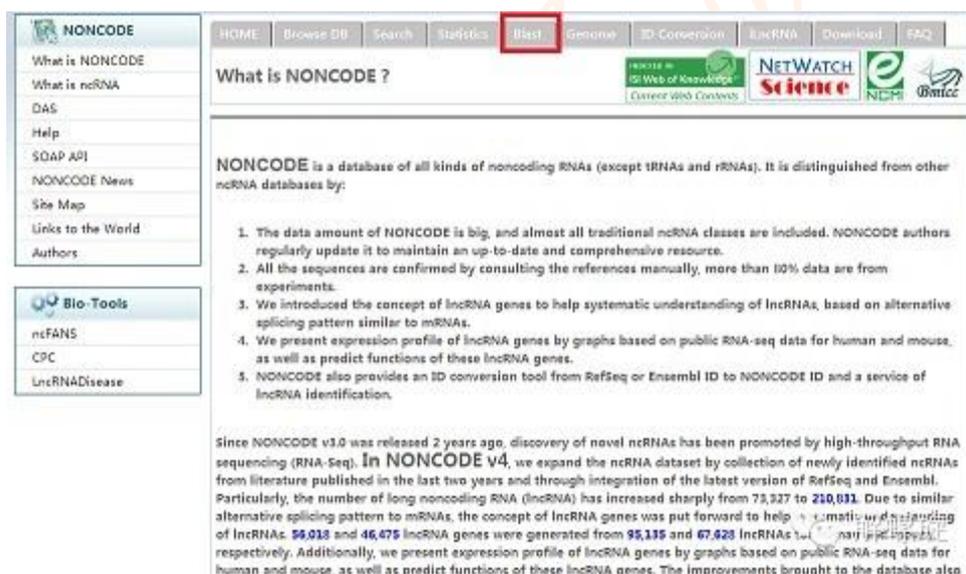
经非常成熟。

--by 老谈

1. NONCODE

NONCODE 提供对长链非编码 RNA 的全面注释，包括表达和 *ncFANS* 计算机软件预测的 *lncRNA* 功能。这是非编码 RNA 研究的知名数据库，已经更新到 2014 年的 8 月了。

网址：<http://www.noncode.org>



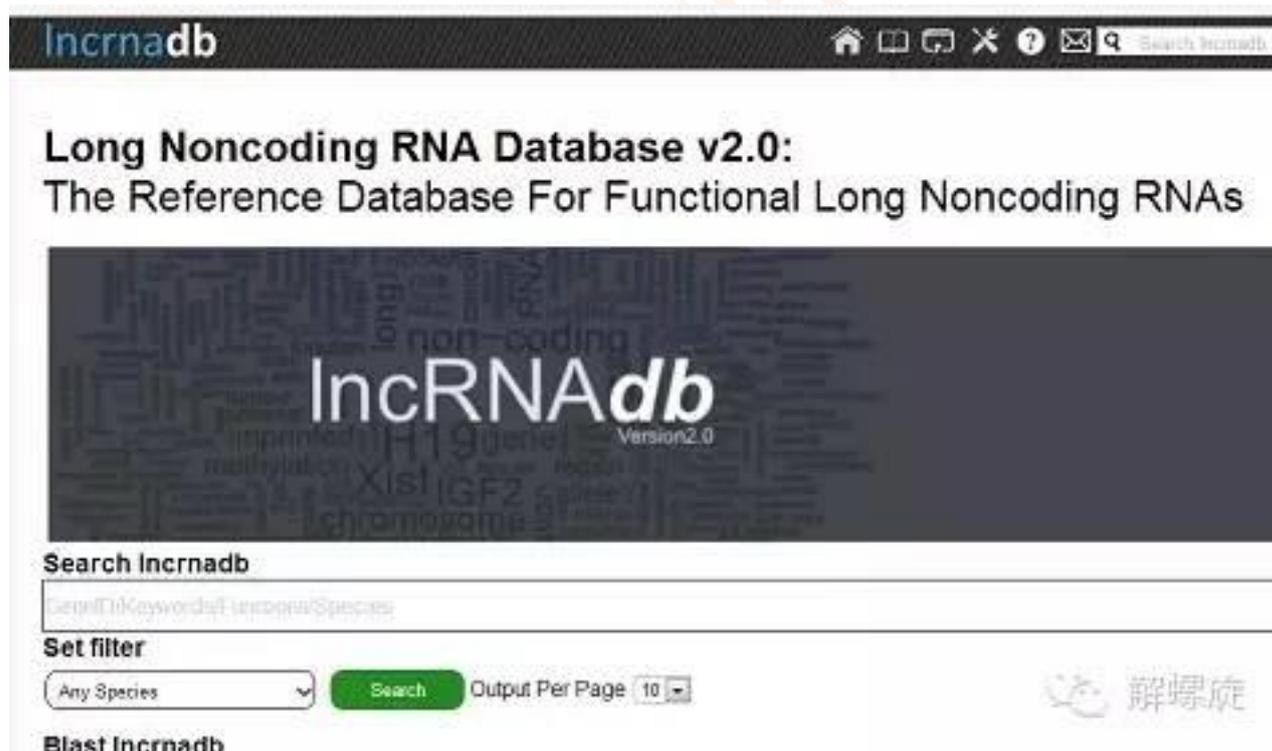
Note: 小伙伴们小心使用时状况百出，这个网站对 *lncRNA* 的命名方法是他们网站内部命名的系统!! 要哭了有没有，根本找不到你要的 *lncRNA*……但有个办法解决，因为他们

网站有 *Blast* 的系统，你如果有 *lncRNA* 的序列的话，还是能找到对应的编号的。对于 *lncRNA* 在不同组织中的表达还是挺有用的。

2. lncRNADB

提供有生物学功能的长链非编码 *RNA* 的全面注释。这是长链非编码 *RNA* 研究领域的大牛 *Johnmattick* 实验室构建的网站。

网站: <http://www.lncrnadb.org/>



Note: 这个用下来凭良心说还行，输入 *lncRNA* 名称之后，会对这个 *lncRNA* 的功能及表达进行注释。这个网站用的是 *NCBI* 上 *Gene* 的命名法，使用上还是没有障碍的。

3.CHIPbase

提供长链非编码 RNA 的表达图谱和转录调控的全面鉴定和注释。整合了高通量的 RNA-seq 鉴定的 lncRNA 及其表达图谱和 CHIP-Seq 实验技术鉴定的转录因子结合位点。

网站: <http://deepbase.sysu.edu.cn/chipbase/>

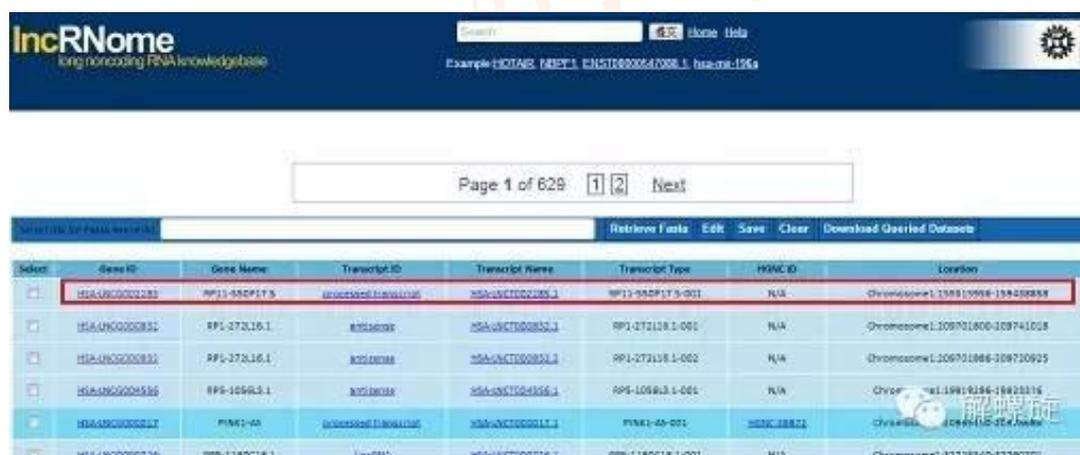


Note: 中大的这个数据库主要是对于一些 lncRNA 的表达及 lncRNA 与转录因子之间的关系的一个注释数据库。主要可以了解与转录因子相关的 lncRNA 的结合情况。要调取 lncRNA 的表达数据, 劝你选别的数据库, 因为这个网站极其坑爹, 只能输入 GeneSymbol, 并不是基因名, 其实是 lncRNA 的转录名, 一般是什么 “RP11-XXXX”。举个例子: lncRNA2-1 的基因名其实 “LncRNA2.7”, 转录名是 “RP11-34P13.8”, 这需要注意哦。

4.IncRNome

超过 18000 转录本目前已作为 *lncRNA* 标注，覆盖先前注释非编码转录本，包括大型基因间非编码 *RNA*，反义 *RNA* 和加工的假基因。但在提供稳定的注释，交叉引用和生物相关的信息资源方面有显著的差距。由印度 *CSIR* 基因组和整合生物学研究所研究人员开发的 *IncRNome*，旨在填补这一空白，他们通过把生物显著性的各种各样的信息注释整合到一个全面的知识库。

数据库 URL: <http://genome.igib.res.in/IncRNome>



The screenshot shows the IncRNome database interface. At the top, there is a search bar with a search button and a 'Home Help' link. Below the search bar, there is a navigation bar with 'Page 1 of 629' and 'Next' button. The main content is a table with columns: Select, Gene ID, Gene Name, Transcript ID, Transcript Name, Transcript Type, HGNC ID, and Location. The first row is highlighted in red and contains the following data:

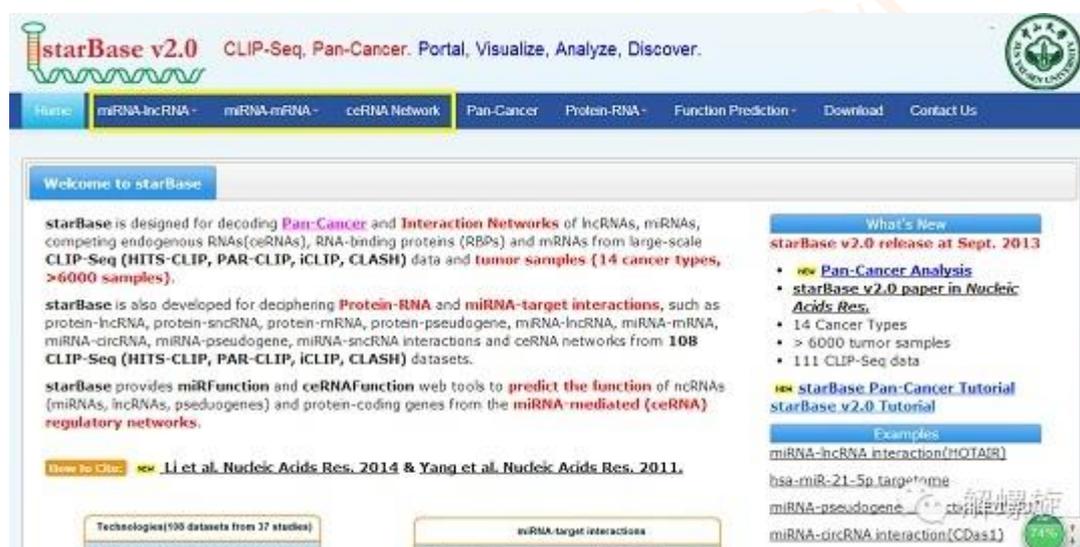
Select	Gene ID	Gene Name	Transcript ID	Transcript Name	Transcript Type	HGNC ID	Location
<input type="checkbox"/>	HSA-UNC000128	RP11-582P17.5	RP11-582P17.5-001	HSA-UNCT000128.1	RP11-582P17.5-001	N/A	Chromosome1:13819958-13820088
<input type="checkbox"/>	HSA-UNC000820	RP1-272L16.1	RP1-272L16.1-001	HSA-UNCT000820.1	RP1-272L16.1-001	N/A	Chromosome1:106701806-106741018
<input type="checkbox"/>	HSA-UNC000820	RP1-272L16.1	RP1-272L16.1-002	HSA-UNCT000820.1	RP1-272L16.1-002	N/A	Chromosome1:106701806-106720925
<input type="checkbox"/>	HSA-UNC000536	RP5-106A3.1	RP5-106A3.1-001	HSA-UNCT000536.1	RP5-106A3.1-001	N/A	Chrom: "X1:19918186-19920116
<input type="checkbox"/>	HSA-UNC000217	PINK1-01	PINK1-01-001	HSA-UNCT000217.1	PINK1-01-001	HGNC:18871	Chromosome1:10941102-10941102
<input type="checkbox"/>	HSA-UNC000020	RP9-1180C18.1	RP9-1180C18.1-001	HSA-UNCT000020.1	RP9-1180C18.1-001	N/A	Chromosome1:13728340-13730701

Note: 三哥三姐确实 NB，但记住，查询的话，还是转录名：“RP11-XXXX”那种，也有其他命名法的“HAS-LNCXXXX”这种。功能上挺强大，有 *lncRNA* 的二级结构，*lncRNA* 的蛋白互作功能预测，还有 *lncRNA* 的 *SNP* 位点。总的来说还不错，就是搜索起来麻烦点。

5.Starbase

一个高通量实验数据 *CLIP-Seq*(或称为 *HITS-CLIP*, *PAR-CLIP*, *iCLIP*)和 *mRNA* 降解组测序数据支持的 *microRNA* 靶标数据库,包含了 *miRNA-mRNA*, *miRNA-lncRNA*, *miRNA-circRNA*, *miRNA-ceRNA* 和 *RNA-protein* 等的调控关系。整合和构建多个流行的靶标预测软件的交集和调控关系。

网址: <http://starbase.sysu.edu.cn/>

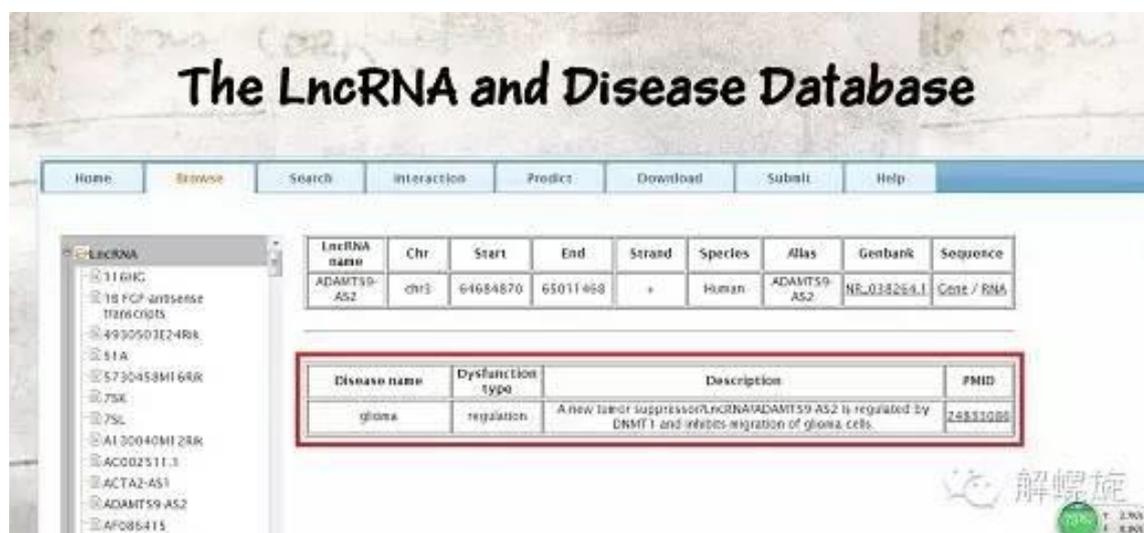


Note: 中大的良心之作, 主要功能就是查询 *lnc* 与 *miRNA* 的互动, 蛋白及 *lncRNA* 的互动, 以及正在火的 *ceRNA* 预测。不过主要功能其实还是在 *miRNA* 上。

6.LncRNADisease

提供了文献报道的疾病相关的长链非编码 *RNA* 的注释。

网站: <http://cmbi.bjmu.edu.cn/lncrnadisease>



Note: 可以在网站中浏览, 注意, 是浏览 *lncRNA* 与疾病的关系注释, 其实还是蛮有用的。可以免去我们为 *lncRNA* 名字纠结的麻烦。

老谈杂谈:

lncRNA 的种类远远超过编码 *RNA*, 4%~9%的哺乳动物基因组序列产生的转录本是 *lncRNA* (相应的编码蛋白的 *RNA* 比例是 1%-5%)。另外, 还有 *LNCipedia*、*NRED*、*PLncDB* 等 *lncRNA* 数据库, 功能与上述几个略有重复, 老谈觉得精通几个功能强大的足矣! 不过分享再多也需要小伙伴们亲身使用才能真正带来益处。

miRNA 数据库大全

作者：老谈

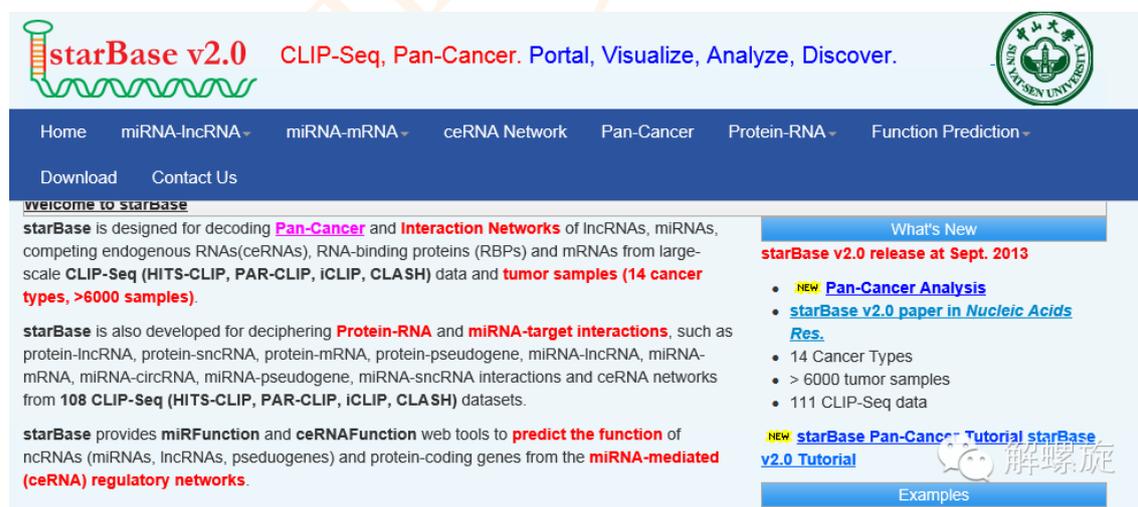
如今的生物学研究已经离不开生物信息学的辅佐,这里老谈给大家介绍目前研究 miRNA 的一些在线数据库,看看它们是如何帮助你们在摸爬滚打中找准方向的。这些数据库中既有“进口”冲锋枪 miRbase,又不乏“国产”战斗机 starbase。每一个数据库的功能又不尽相同,既有分子间相互作用的预测,又有对已报道实验结果的总结和整合。

——by 老谈

1、starBase:

一个高通量实验数据 CLIP-Seq (或称为 HITS-CLIP,PAR-CLIP,iCLIP) 和 mRNA 降解组测序数据支持的 microRNA 靶标数据库,包含了 miRNA-mRNA, miRNA-lncRNA, miRNA-circRNA, miRNA-ceRNA 和 RNA-protein 等的调控关系。整合和构建多个流行的靶标预测软件的交集和调控关系。最新版本发布时间: 2013 年 11 月。

网址: <http://starbase.sysu.edu.cn/>



starBase v2.0 CLIP-Seq, Pan-Cancer. Portal, Visualize, Analyze, Discover.

Home miRNA-lncRNA miRNA-mRNA ceRNA Network Pan-Cancer Protein-RNA Function Prediction

Download Contact Us

Welcome to starBase

starBase is designed for decoding **Pan-Cancer** and **Interaction Networks** of lncRNAs, miRNAs, competing endogenous RNAs(ceRNAs), RNA-binding proteins (RBPs) and mRNAs from large-scale **CLIP-Seq (HITS-CLIP, PAR-CLIP, iCLIP, CLASH)** data and **tumor samples (14 cancer types, >6000 samples)**.

starBase is also developed for deciphering **Protein-RNA** and **miRNA-target interactions**, such as protein-lncRNA, protein-sncRNA, protein-mRNA, protein-pseudogene, miRNA-lncRNA, miRNA-mRNA, miRNA-circRNA, miRNA-pseudogene, miRNA-sncRNA interactions and ceRNA networks from **108 CLIP-Seq (HITS-CLIP, PAR-CLIP, iCLIP, CLASH)** datasets.

starBase provides **miRFunction** and **ceRNAFunction** web tools to **predict the function** of ncRNAs (miRNAs, lncRNAs, pseudogenes) and protein-coding genes from the **miRNA-mediated (ceRNA) regulatory networks**.

What's New

starBase v2.0 release at Sept. 2013

- **NEW Pan-Cancer Analysis**
- **starBase v2.0 paper in Nucleic Acids Res.**
- 14 Cancer Types
- > 6000 tumor samples
- 111 CLIP-Seq data

NEW starBase Pan-Cancer Tutorial starBase v2.0 Tutorial

Examples

2、miRbase:

众所周知的 microRNA 基因注释数据库。目前 miRBase 只提供了 microRNA 的靶标的预测软件的链接（如：PicTar）。最新版本发布时间：2010 年 9 月。

网址：<http://mirbase.org/index.shtml>

miRBase

MANCHESTER 1824

Home Search Browse Help Download Blog Submit

Search

Latest miRBase blog posts

[High confidence miRNA set available for miRBase 21](#) By sam (July 3, 2014)
As mentioned previously, we briefly held off from releasing the set of "high confidence" miRNAs for miRBase 21, because of a last-gasp bug. Those data are now available, tagged with the label "high confidence" on the entry pages, and for download on the FTP site. The total number of miRNAs labelled "high confidence" has increased [...]

[miRBase 21 finally arrives](#) By sam (June 26, 2014)
Apologies for the longer-than-usual wait. miRBase 21 is now available on the website, and all data available for download on the FTP site. As usual, the release notes describe the major changes. Of particular note this time, the Genome Reference Consortium have released a new human genome assembly, GRCh38. We have therefore remapped the human [...]

miRNA count: 28645 entries

[Release 21: June 2014](#)

Search by miRNA name or keyword

Download published miRNA data

[Download page](#) | [FTP site](#)

miRBase: the microRNA database

miRBase provides the following services:

- The [miRBase database](#) is a searchable database of published miRNA sequences and annotation. Each entry in the miRBase Sequence database represents a predicted hairpin portion of a miRNA transcript (termed mir in the database), with information on the location and sequence of the mature miRNA sequence (termed miR). Both hairpin and mature sequences are available for [searching](#) and [browsing](#), and entries can also be retrieved by name, keyword, references and annotation. All sequence and annotation data are also [available for download](#).
- The [miRBase Registry](#) provides miRNA gene hunters with unique names for novel miRNA genes prior to publication of results. Visit the [help pages](#) for more information about

3、ChIPBase:

整合 CLIP-Seq 和 ChIP-Seq 的数据探讨 microRNA 的转录和转录后调控，构建转录因子 ->microRNA->靶标的调控网络。最新版本发布时间：2012 年 11 月。

网址：<http://deepbase.sysu.edu.cn/chipbase/>



ChIPBase
Decoding transcription factor binding maps and transcriptional regulation

Home LncExpression ChIP-Seq LncRNA MicroRNA Browser OtherNcRNA Protein TFBScluster Tools Download

About the ChIPBase Site

Welcome to ChIPBase

ChIPBase, an integrated resource and platform for decoding **transcription factor binding maps**, **expression profiles** and transcriptional regulation of **long non-coding RNAs (lncRNAs, lincRNAs)**, **microRNAs**, **other ncRNAs (snoRNAs, tRNAs, snRNAs, etc.)** and **protein-coding genes** from **ChIP-Seq** data. ChIPBase currently includes **millions** of transcription factor binding sites (TFBSs) among 6 species. ChIPBase provides several web-based tools and browsers to explore TF-lncRNA, TF-miRNA, TF-mRNA, TF-ncRNA and TF-miRNA-mRNA regulatory networks. (**NEW Release 1.1: 1 November 2012**, [Tutorial](#))

How to cite:
If you make use of the data and web-server presented here, please cite the following article in addition to the primary data sources:
Yang JH, Li JH, Jiang S, Zhou H and Ou LH.
[ChIPBase: A database for decoding the transcriptional regulation of long non-coding RNA and microRNA genes from ChIP-Seq data](#).
Nucleic Acids Res. 2013 Jan;41:D177-87. Epub 2012 Nov 17
[\[Full Text\]](#) [\[Full Text \(PDF\)\]](#) [\[Supplementary Data\]](#)

4、Tarbase:

一个收集已被实验验证的 microRNA 靶标数据库。最新版本发布时间：2009 年 1 月。

网址：<http://microrna.gr/tarbase/>



DANA LAB - Tarbase

Click on the wheel to show search filters

Search for Tarbase by

Advanced options:

- Select species:
 - CANCER/NCCTES
 - EUZANS
 - DROSOPHILA
 - HELIOGASTER
 - HOMO SAPIENS
 - MUS MUSCULUS
- Select var. method:
 - Reporter Gene Assay
 - Northern/Western Blot
 - PCR
 - Electrophoretic
 - Sequencing
 - Other
- Select regul. type:
 - UP
 - DOWN
- Select these valid, as:
 - POSITIVE
 - NEGATIVE
- Select publ. year:
 - All
 - Year

Click to reveal gene and miRNA information

Gene-miRNA interaction information

Click on the wheel to show search filters

Click to reveal gene and miRNA information

Information of the corresponding publication

Gene name	miRNA name	Methods	Valid. type
1	FISH (HOMO SAPIENS)	see list of	Indirect

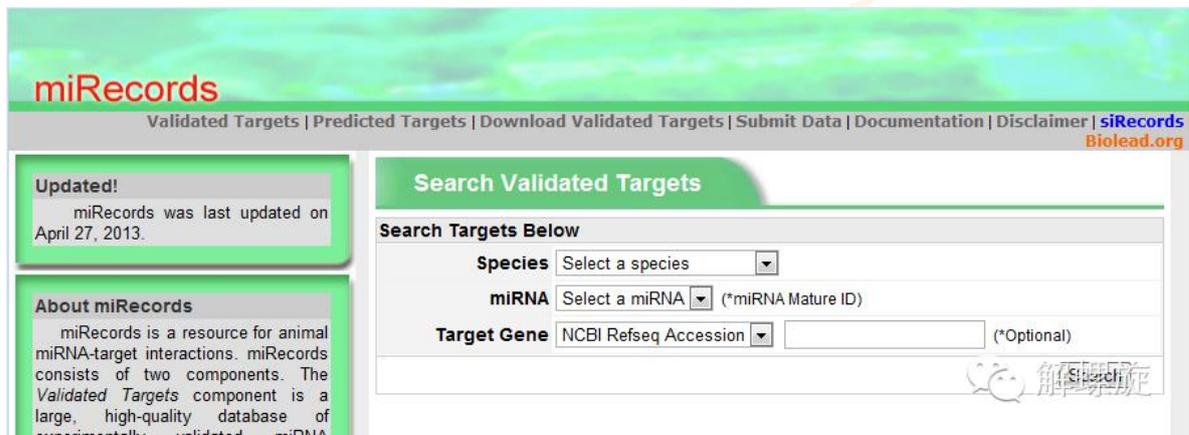
Authors Year Methods Validated as Regulation Valid type Region

Cell types: Comments: There are no user comments.

5、miRecords:

一个整合的 microRNA 靶标数据库。整合多个靶标预测软件的调控关系。最新版本发布时间：2010 年 11 月。

网址：<http://mirecords.biolead.org/>



6、targetScan:

基于靶 mRNA 序列的进化保守等特征搜寻动物的 microRNA 靶基因。是预测 microRNA 靶标假阳性率较低的软件。而且是 microRNA 领域大牛 Bartel 实验室开发的。最新版本发布时间：2009 年 4 月。

网址：<http://www.targetscan.org/>

Search for predicted microRNA targets in mammals

[\[Go to TargetScanMouse\]](#)

[\[Go to TargetScanWorm\]](#)

[\[Go to TargetScanFly\]](#)

[\[Go to TargetScanFish\]](#)

1. Select a species

AND

2. Enter a human Entrez Gene symbol (e.g. "LIN28A")

AND/OR

3. Do one of the following:

- Select a broadly conserved* microRNA family
- Select a conserved* microRNA family

7、PicTar:

基于 microRNA 或 microRNA 靶标联合作用等特征开发的搜寻动物的 microRNA 靶基因。假阳性率也较低。是 microRNA 领域大牛 Rajewsky 实验室开发的。最新版本发布时间：2007 年 3 月。

网址：<http://pictar.mdc-berlin.de/>

Welcome To PicTar

PicTar is an algorithm for the identification of microRNA targets. This searchable website provides details (3' UTR alignments with predicted sites, links to various public databases etc) regarding:

- (1) microRNA target predictions in vertebrates ([Krek et al, Nature Genetics 37:495-500 \(2005\)](#))
- (2) microRNA target predictions in seven *Drosophila* species ([Grassein et al, PLoS Comp. Biol. 1:e13 \(2005\)](#))
- (3) microRNA targets in three nematode species ([Lall et al, Current Biology 16, 1-12 \(2006\)](#))
- (4) human microRNA targets that are not conserved but co-expressed (i.e. the microRNA and mRNA are expressed in the same tissue) ([Chen and Rajewsky, Nat Genet 38, 1452-1456 \(2006\)](#)) [co-expressed targets](#)

New: co-expressed human microRNA target predictions are now available



8、PITA:

基于靶位点的可接性和自由能预测 microRNA 的靶标。是著名的生物信息学家 Segal 实验室开发的。最新版本发布时间：2008 年 8 月。

网址：http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html/

 Segal Lab of Computational Biology			
		HOME RESEARCH PEOPLE PUBLICATIONS GENOMICA SOFTWARE INTERNAL	
Main			
Supplementary Data	PITA catalogs of predicted microRNA targets		
Download Predictions	Files contain lists of predicted microRNA targets in worm (based on ce6 genome assembly), fly (dm3), mouse (mm9) and human (hg18). We follow standard seed parameter settings and consider seeds of length 6-8 bases, beginning at position 2 of the microRNA. No mismatches or loops are allowed, but a single G:U wobble is allowed in 7- or 8-mers. In genes missing a 3' UTR annotation, 500 bp (fly), 800 bp (human and mouse) or 300 bp (worm) downstream of the annotated end of the coding sequence were used as the predicted UTR. For each organism, a catalog with zero flank and with a flank of 3 and 15 bases upstream and downstream (see text for details).		
Search Predictions			
Browse Predictions			
Predict your UTR			
Download executable			
FAQ / Notes	Versions History		



9、RNA22:

基于序列特征预测 microRNA 的结合位点。是几个流行的 microRNA 靶标预测软件的其中一个。IBM 公司的研究团队开发的。最新版本发布时间：2007 年。

网址：<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html/>

10、miRanda 和 microRNA.org:

是著名的 MemorialSloan-Kettering 癌症研究中心的研究人员开发的软件和数据库。miRanda 的最新版本又叫 mirSVR。最新版本发布时间：2010 年 8 月。

网址：<http://www.microrna.org/microrna/home.do/>

11、MicroCosm:

EMBL-EBI 的 Enright 实验室开发的 microRNA 靶标数据库。最新版本发布时间：2010 年 8 月。

网址：<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>

12、miRTarBase:

整合实验证实的 microRNA 靶标的数据库。最新版本发布时间：2010 年 10 月。

网址：<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.html/>

13、miRGator v2.0:

整合 microRNA 表达、靶标和疾病相关信息的数据库。最新版本发布时间：2010 年 11 月。

网址：<http://mirgator.kobic.re.kr:8080/MEXWebApp/>

14、MiRNAMap:

动物的 microRNA 基因及其靶标的数据库。最新版本发布时间：2008 年 1 月。

网址：<http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/>

15、miRDB:

动物 microRNA 靶标预测和功能注释数据库。最新版本发布时间：2010 年 8 月。

网址：<http://mirdb.org/miRDB/>

16、RNAhybrid:

一个基于 miRNA-target 配对自由能预测 microRNA 的靶标。最新版本发布时间：2011 年 6 月。

网址：<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/>

17、miRGen:

microRNA 基因和 microRNA 靶标数据库。最新版本发布时间：2007 年 1 月。

网址：<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html/>

KEGG 数据库入门：pathway 信息查询

作者：翠花

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)，是日本京都 Kanehisa Laboratories 阅读文献手工整理（手绘）的一个庞大的数据库（包括信号通路、基因、疾病、药物等等）；这里的手绘的意思可能是指人工以特定的语言格式来确定通路各组件的联系；基因组信息主要是从 NCBI 等数据库中得到的，除了有完整的基因序列外，还有没完成的草图。

今天就翠花就讲讲：在研究中如何使用 KEGG 数据库进行信号通路查询，这可是 KEGG 数据库的入门级知识哦！

翠花以一个例子入手帮助小伙伴们更好的了解一下操作过程。

已有的前期实验结果：构建了沉默新基因 A 表达的质粒，转染肺癌 549 细胞系，确定敲减效率，上流式细胞仪检测，发现细胞周期被阻滞（cell cycle arrest）在 S 期。那么我们现在需要从细胞周期的角度阐明新基因 A 促进肺癌细胞系 549 增殖的分子机制。

1 .首先打开 KEGG 主页：<http://www.kegg.jp/>，点击下图框中的 KEGG PATHWAY 链接。

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

KEGG is a database resource for understanding high-level functions and utilities of the biological system, such as the cell, the organism and the ecosystem, from molecular-level information, especially large-scale molecular datasets generated by genome sequencing and other high-throughput experimental technologies (See Release notes for new and updated features).

New service GhostKOALA for metagenome annotation is available.

Main entry point to the KEGG web service

[KEGG2](#) [KEGG Table of Contents](#) [Update notes](#)

Data-oriented entry points

KEGG PATHWAY KEGG pathway maps [Pathway list]

KEGG BRITD BRITD functional hierarchie [Brtd list]

KEGG MODULE KEGG modules [Module list | Statistics]

KEGG ORTHOLOGY Ortholog groups [KO system | Annotation]

KEGG GENOME Genomes [KEGG organisms]

KEGG GENES Genes and proteins [Release history]

KEGG COMPOUND Small molecules [Compound c

KEGG REACTION Biochemical reactions [Reaction modules]

2. 输入关键词: cell cycle



KEGG PATHWAY Database

Wiring diagrams of molecular interactions, reactions, and relations

[KEGG2](#) [PATHWAY](#) [BRITD](#) [MODULE](#) [KO](#) [GENOME](#) [GENES](#) [LIGAND](#) [DISEASE](#) [DRUG](#) [DBGET](#)

Select prefix

Enter keywords

Pathway Maps

[No pathway | data history]

3. 出现结果:

Pathway Text Search

Number of entries in a page

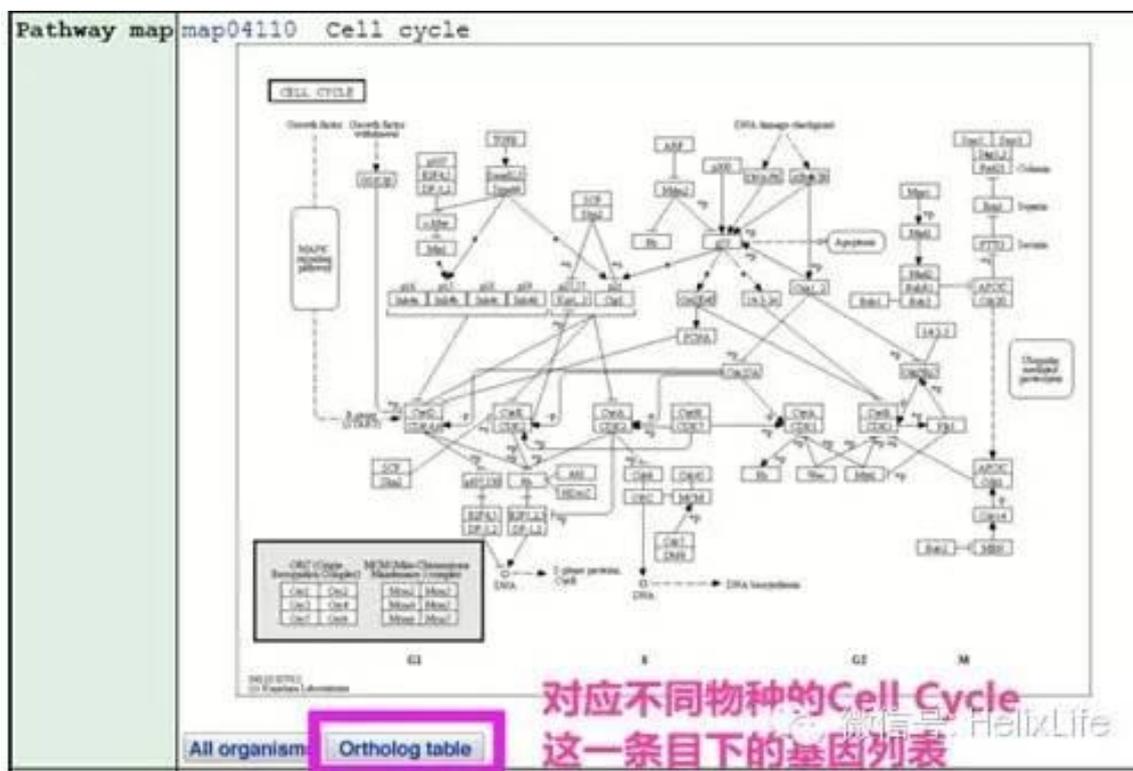
Page : of 4 Items : 1 - 20 of 77

Entry	Thumbnail Image	Name
map04110	 A complex network diagram showing various proteins and their interactions in a cell cycle pathway. A large purple checkmark is drawn over the diagram.	Cell cycle
map04112	 A network diagram showing the cell cycle pathway in Caulobacter. A watermark for '微信号: HelixLife' is visible in the bottom right corner of the image area.	Cell cycle - Caulobacter

4. 点击 map 04110, 出现 KEGG 对 cell cycle 的描述:

Entry	map04110	Pathway
Name	Cell cycle	
Description	<p>Mitotic cell cycle progression is accomplished through a reproducible sequence of events, DNA replication (S phase) and mitosis (M phase) separated temporally by gaps known as G1 and G2 phases. Cyclin-dependent kinases (CDKs) are key regulatory enzymes, each consisting of a catalytic CDK subunit and an activating cyclin subunit. CDKs regulate the cell's progression through the phases of the cell cycle by modulating the activity of key substrates. Downstream targets of CDKs include transcription factor E2F and its regulator Rb. Precise activation and inactivation of CDKs at specific points in the cell cycle are required for orderly cell division. Cyclin-CDK inhibitors (CKIs), such as p16Ink4a, p15Ink4b, p27Kip1, and p21Cip1, are involved in the negative regulation of CDK activities, thus providing a pathway through which the cell cycle is negatively regulated. Eukaryotic cells respond to DNA damage by activating signaling pathways that promote cell cycle arrest and DNA repair. In response to DNA damage, the checkpoint kinase ATM phosphorylates and activates Chk2, which in turn directly phosphorylates and activates p53 tumor suppressor protein. p53 and its transcriptional targets play an important role in both G1 and G2 checkpoints. ATR-Chk1-mediated protein degradation of Cdc25A protein phosphatase is also a mechanism conferring intra-S-phase checkpoint activation.</p>	
Class	Cellular Processes: Cell growth and death BRTE hierarchy	
Pathway map	map04110 Cell cycle 	
Module	All organisms Ortholog table M00284 Origin recognition complex [PATH:map04110] M00285 MCM complex [PATH:map04110]	

5. 所有物种中相关基因的详细列表



Ortholog table

PATHWAY: 04110

All Page: 1

Grp	Genus	Organism	K04503 (CCND1) [65]	K10151 (CCND2) [74]	K10152 (CCND3) [52]	K02089 (CDK4) [52]	K02091 (CDK6) [69]	K06618 (RB1)[66]	K04681 (RBL1)[63]	K16332 (RBL2)[60]	K06619 (ABL1)[66]	K06067 (MDAC1_2) [134]	K17454 (E2F1)[59]	K091 (E2F2)
E.An	Homo	hsa	595	894	896	1019	1021	5925	5933	5934	25	3065 3066	1869	1870
E.An	Pan	ptr	747442	747123	462689	452025	746968	452715	735916	467978	464802	740850 462950 104001071	458184	46915
E.An	Pan	pps	100995605	100990850	100972595	100976294	100981258	100973837	100986097	100978830	100994981	100978715 100980497	100983073	10098

每个基因在 KEGG 数据库里面有对应的 ID，例如 CCND1 对应的 ID 号：K04503，CDK4 对应 K02089，我们后面会用到。

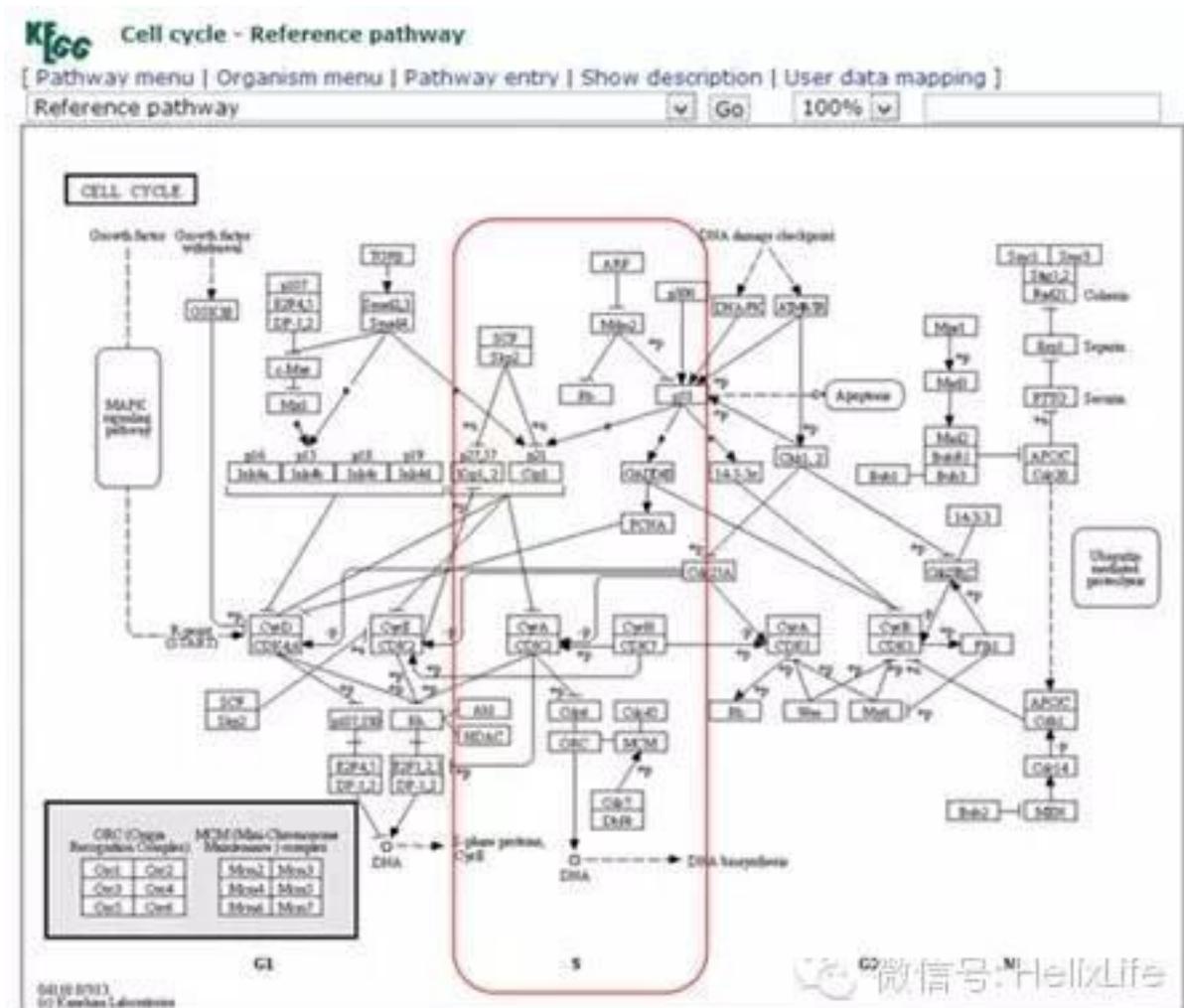
Module	M00284	Origin recognition complex [PATH:map04110]
	M00285	MCM complex [PATH:map04110]
	M00297	DNA-PK complex [PATH:map04110]
	M00381	SCF-SKP2 complex [PATH:map04110]
	M00389	APC/C complex [PATH:map04110]
	M00691	DNA damage-induced cell cycle checkpoints [PATH:map04110]
	M00692	Cell cycle - G1/S transition [PATH:map04110]
	M00693	Cell cycle - G2/M transition [PATH:map04110]
Disease	H00409	Type II diabetes mellitus
	H00631	Cornelia de Lange syndrome (CdLS)
	H00713	Beckwith-Wiedemann syndrome
	H00848	Ataxia with ocular apraxia (AOA)
	H00881	Li-Fraumeni syndrome
	H00992	Seckel syndrome
	H01007	Choroid plexus papilloma
	H01023	Juvenile polyposis syndrome
	H01102	Pituitary adenomas
	H01288	Mosaic variegated aneuploidy (MVA) syndrome
	H01385	Rienhoff syndrome
Other DBs	GO:	0000278
Reference	PMID:	7908906
Authors	Matsuoka S, Yamaguchi M, Matsukage A	
Title	D-type cyclin-binding regions of proliferating cell nuclear antigen.	
Journal	J Biol Chem 269:11030-6 (1994)	

相关的不同模块、疾病、日本 Kanehisa Laboratories 的工作人员整理这个信息库所参考的文献，其它的数据库，例如 GO: 0000278，可以用 Gene Ontology 这个数据库直接查到在这个数据库中的信息：

mitotic cell cycle

Term Information	
Accession	GO:0000278
Name	mitotic cell cycle
Ontology	biological_process
Synonyms	None
Definition	Progression through the phases of the mitotic cell cycle, the most common eukaryotic cell cycle, which canonically comprises four successive phases called G1, S, G2, and M and includes replication of the genome and the subsequent segregation of chromosomes into daughter cells. In some variant cell cycles nuclear replication or nuclear division may not be followed by cell division, or G1 and G2 phases may be absent. Source: Reactome:69278, GOC:mah, ISBN:0815316194
Comment	None
History	See term history for GO:0000278 at QuickGO
Subset	goslim_yeast
Community	GN Add usage comments for this term on the GONUTS wiki.
Related	Link to all genes and gene products associated to mitotic cell cycle. Link to all direct and indirect annotations to mitotic cell cycle. Link to all direct and indirect annotations download (limited to first 10,000) for mitotic cell cycle.

6. 开始查基因 A 的下游机制，直接点击图，会出现相关的信号通路：



这是 KEGG 里面整理出来的 cell cycle 相关信号通路图，细胞周期中 S 期的相关基因（我们上面举的例子是 A 沉默后可以把细胞阻滞在 S 期），每个可以点击，例如：CDK2，查看这个基因的相关信息。



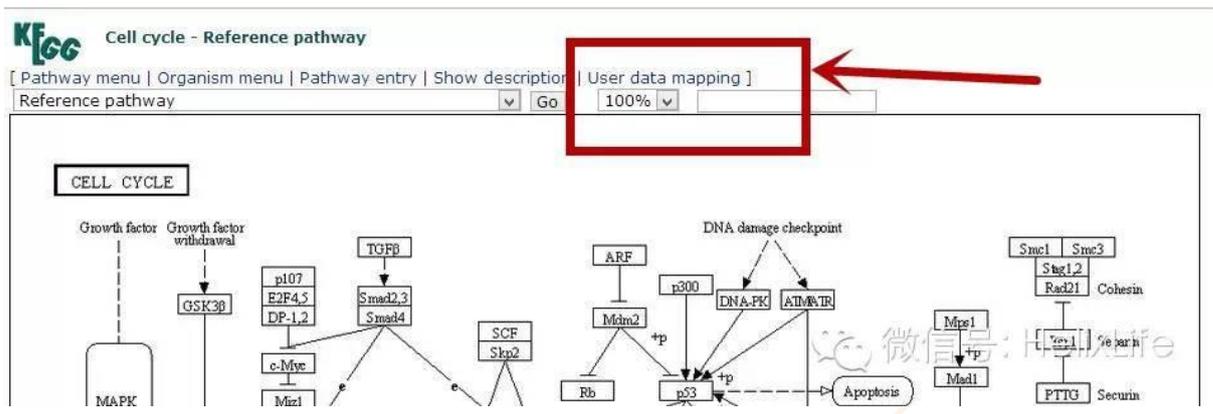
ORTHOLOGY: K02206

[Help](#)

Entry	K02206	KO
Name	CDK2	
Definition	cyclin-dependent kinase 2 [EC:2.7.11.22]	
Pathway	ko04068 FoxO signaling pathway ko04110 Cell cycle ko04114 Oocyte meiosis ko04115 p53 signaling pathway ko04151 PI3K-Akt signaling pathway ko04914 Progesterone-mediated oocyte maturation ko05161 Hepatitis B ko05162 Measles ko05168 Herpes simplex infection ko05169 Epstein-Barr virus infection ko05200 Pathways in cancer ko05203 Viral carcinogenesis ko05215 Prostate cancer ko05222 Small cell lung cancer	
Module	M00692 Cell cycle - G1/S transition M00693 Cell cycle - G2/M transition	
Brite	KEGG Orthology (KO) [BR:ko00001] Environmental Information Processing Signal transduction 04068 FoxO signaling pathway K02206 CDK2; cyclin-dependent kinase 2 04151 PI3K-Akt signaling pathway K02206 CDK2; cyclin-dependent kinase 2 Cellular Processes Cell growth and death 04110 Cell cycle K02206 CDK2; cyclin-dependent kinase 2 04114 Oocyte meiosis K02206 CDK2; cyclin-dependent kinase 2 04115 p53 signaling pathway K02206 CDK2; cyclin-dependent kinase 2 Organismal Systems Endocrine system	

微信号: HelixLife

7. 接着举例子：如果我选取了 10 个基因，CDK2, CycA, CDK7, CycH, Cdc6, ORC, Dbf4, Mdm2, Rb 和 Cdc45，经过 Western Blot 检测发现在分子 A 被干扰后，CDK2 上调，Cdc6 被下调，那么如何在图上标出来呢？



单击网络图右上角的 User data mapping:

Close

Enter objects one per line followed by bgcolor, fgcolor:

Default fgcolor: red

Pathway mapping
Clear

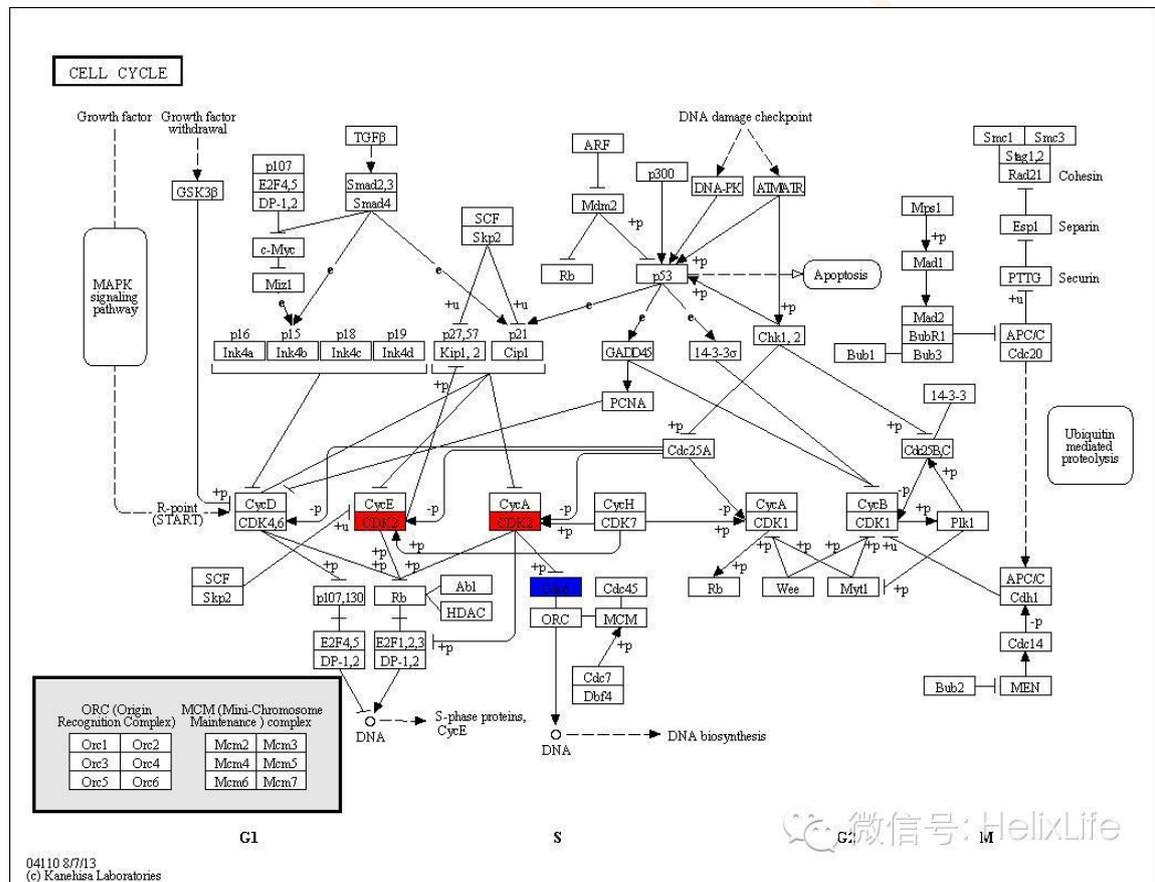
CDK2 的 ID 为 K02206，上调用红色表示；Cdc6 的 ID 为 K02213，用蓝色表示。

输入:

K02206 red

K02213 blue

Duang:



这样就好了，不过这张图是不是不好看呢？实际上，直接用 KEGG 上的图来说明下游分子机制的还是比较少的，不过有另外的软件（cytoscape）哦，下次翠花给你详细道来！

玩转 Pubmed 的 10 大绝招

作者：子非鱼

Pubmed 作为国际上公认的最具权威的生物医学文献数据库，是科研者文献搜索的重磅利器。因而为了让各位实验新手快速晋级为玩转 Pubmed 的科研达人，本文则将压箱底的 10 大绝招倾囊相授，希望能帮助大家一臂之力。

1. 广撒网，多捞鱼

在科研课题决定之初，利用 *Pubmed* 进行充分的文献调研早已是一件家常便饭的事情，然而让人头疼是，在搜索关键词后，跳出的结果大多不是自己想要的剧情，很多与关键词不匹配的文章充斥其中，无疑加大了研究者文献筛选的工作量。

举个栗子，打开 *Pubmed* 网页之后，在检索框中，输入 *Inflammatory bowel disease* *TNF* 后，点击“*Search*”或按 *Enter* 键，结果如下图所示。

Format: Summary Sort by: Most Recent Per page: 20

Send to

Search results
Items: 1 to 20 of 4681

4681篇呢！

<< First < Prev Page 1 of 235 Next > Last >>

- [Early anti-TNF/immunomodulator therapy is associated with better long-term clinical outcomes in Asian patients with Crohn's disease with poor prognostic factors.](#) **系统自动扩大**
Oh EH, Oh K, Han M, Seo H, Chang K, Lee SH, Kim GU, Song EM, Seo M, Lee HS, Hwang SW, Park SH, Yang DH, Kim KJ, Byeon JS, Myung SJ, Yang SK, Ye BD.
PLoS One. 2017 May 23;12(5):e0177479. doi: 10.1371/journal.pone.0177479. eCollection 2017.
PMID: 28542298
[Similar articles](#)

显然，对于输入 *Pubmed* 的多词词组，它会查询词组索引，如果查到相应词组会将其作为一个检索词来检索，但如果没有查到相应词组，则会将其拆分成单个词分别检索。所以 *Inflammatory bowel disease TNF* 就相当于 *Inflammatory AND bowel AND disease AND TNF*。

如果不想把词组分开咋办？方法很简单，四个锦囊妙计送给你：1) 加双引号：“*Inflammatory bowel disease*”*TNF*；2) 加标段标识[*tw*]：*Inflammatory bowel disease*[*tw*] *TNF*；3) 加短横线：*Inflammatory-bowel-disease* *TNF*；4) 加截词符*：*Inflammatory bowel disease** *TNF*

Search results
Items: 1 to 20 of 2625

查找的内容会更准确些

<< First < Prev Page 1 of 132 Next > Last >>

- [Early anti-TNF/immunomodulator therapy is associated with better long-term clinical outcomes in Asian patients with Crohn's disease with poor prognostic factors.](#)
Oh EH, Oh K, Han M, Seo H, Chang K, Lee SH, Kim GU, Song EM, Seo M, Lee HS, Hwang SW, Park SH, Yang DH, Kim KJ, Byeon JS, Myung SJ, Yang SK, Ye BD.
PLoS One. 2017 May 23;12(5):e0177479. doi: 10.1371/journal.pone.0177479. eCollection 2017.
PMID: 28542298
[Similar articles](#)

2.查缺补漏，MeSH 是“大功臣”

但是问题又来了，*Inflammatory bowel disease* 还有一种缩略写法 *IBD*，上面的搜索方式无疑会漏掉一些文献，而且还有一些关键词还会有很多同义词，不是一次性搜索就会全部出现的。此时，*Pubmed* 里的一款总结同义词的利器——*MeSH* 霸气上线了。

以 *liver cancer lncRNA* 为例，在 *MeSH* 里输入 *liver cancer*，就会跳出主题词 *liver Neoplasms*，这名词看上去可就高大上多了。

点击第一个主题词 *liver Neoplasms* 后，可寻找相应的副题词并进行打钩后，点击右边上的“Add to Search builder”加到你的关键词构建（*PubMed Search Builder*）中。这样第一条关键词就是“肝肿瘤的遗传学分析”

Liver Neoplasms
Tumors or cancer of the LIVER.

PubMed search builder options
Subheadings:

主题词的限定条件

<input type="checkbox"/> analysis	<input type="checkbox"/> embryology	<input type="checkbox"/> physiopathology
<input type="checkbox"/> anatomy and histology	<input type="checkbox"/> enzymology	<input type="checkbox"/> prevention and control
<input type="checkbox"/> blood	<input type="checkbox"/> epidemiology	<input type="checkbox"/> psychology
<input type="checkbox"/> blood supply	<input type="checkbox"/> ethnology	<input type="checkbox"/> radiotherapy
<input type="checkbox"/> cerebrospinal fluid	<input type="checkbox"/> etiology	<input type="checkbox"/> rehabilitation
<input type="checkbox"/> chemically induced	<input checked="" type="checkbox"/> genetics	<input type="checkbox"/> secondary
<input type="checkbox"/> chemistry	<input type="checkbox"/> history	<input type="checkbox"/> secretion
<input type="checkbox"/> classification	<input type="checkbox"/> immunology	<input type="checkbox"/> statistics and numerical data
<input type="checkbox"/> complications	<input type="checkbox"/> metabolism	<input type="checkbox"/> surgery
<input type="checkbox"/> congenital	<input type="checkbox"/> microbiology	<input type="checkbox"/> therapy
<input type="checkbox"/> cytology	<input type="checkbox"/> mortality	<input type="checkbox"/> transmission
<input type="checkbox"/> diagnosis	<input type="checkbox"/> nursing	<input type="checkbox"/> transplantation
<input type="checkbox"/> diagnostic imaging	<input type="checkbox"/> organization and administration	<input type="checkbox"/> ultrastructure
<input type="checkbox"/> diet therapy	<input type="checkbox"/> parasitology	<input type="checkbox"/> urine
<input type="checkbox"/> drug effects	<input type="checkbox"/> pathology	<input type="checkbox"/> veterinary
<input type="checkbox"/> drug therapy	<input type="checkbox"/> physiology	<input type="checkbox"/> virology
<input type="checkbox"/> economics		

Related information

PubMed

PubMed - Major Topic

Clinical Queries

NLM MeSH Browser

dbGaP Links

MedGen

Recent Activity

Turn Off Clear

然后不要退出，继续输入关键词 *lncRNA*，也通过“*Add to Search builder*”加到关键词构建中，这个时候需要注意的是，用“*And*”这种逻辑语言的话，就代表求交集了，当然还可以自主换别的逻辑语言。构建完你的关键词之后，点击了“*Search PubMed*”就 OK 了。



3.精确检索文章

当然你要是有所针对的或特异性的搜索具体作者、杂志或者其他信息等，还可以进行更加高级的检索，点 *Advanced* 就可以了！



进去之后是个这个界面，检索之后的步骤就是一样了的：

选择具体的限定条件

增加更多的限制

Query	Items found	Time
oplasms/genetics"[Mesh] AND "RNA, Long Noncoding"[Mesh]	168	02:23:11
er lncRNA	343	02:11:33

又或者，在 *Pubmed* 的主页面中，点击 *Pubmed Tools* 中的 *Single Citation Matcher*，进入以下界面，输入特定的杂志、日期、作者名字（第一作者或通讯作者）即可靶向某篇特定的文章。

PubMed Single Citation Matcher

Use this tool to find PubMed citations. You may omit any field.

Journal	Help	<input type="text"/>		
Date	<input type="text" value="yyyy/mm/dd"/>	(month and day are optional)		
Details	Volume	Issue	First page	
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
Author name	Help	<input type="text"/>		
Limit authors	<input type="checkbox"/>	Only as first author	<input type="checkbox"/>	Only as last author
Title words	<input type="text"/>			

Search

[Clear form](#)

4. 获取全文攻略

Pubmed 是摘要数据库，其本身并不提供文献全文服务。对于检索到的文献，若检索结果列表中显示的 *PMC Full text* 图标 的文章。这类文章可以直接到 *PMC* 中去阅读网页版的全文，或者在网页版全文阅读页面找到 *PDF* 下载链接进行下载。

See 1 citation found by title matching your search:

J Thorac Dis. 2013 Apr;5(2):198-9. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2012.03.18.

Surgical treatment of pulmonary tuberculosis: the phoenix of thoracic surgery?

Bertolaccini L¹, Viti A, Di Perri G, Terzi A.

⊕ Author information

KEYWORDS: Pulmonary tuberculosis; thoracic surgery

PMID: 23585949 PMCID: PMC3621931 DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2012.03.18

Free PMC Article



Save items

☆ Add to Favorites

Similar articles

[Application of pyrazinamide in our thoracic [Tuberkulozis. 199

[Late results in patients refusing thoracic sur[[Tuberkulozis. 199

另外, *LinkOut-more resources* 这里也可以链接到数据库, 若数据库中的有全文链接, 也可直接点击 *PDF* 进行下载。

LinkOut - more resources

Full Text Sources

[AME Publishing Company](#)

[Europe PubMed Central](#)

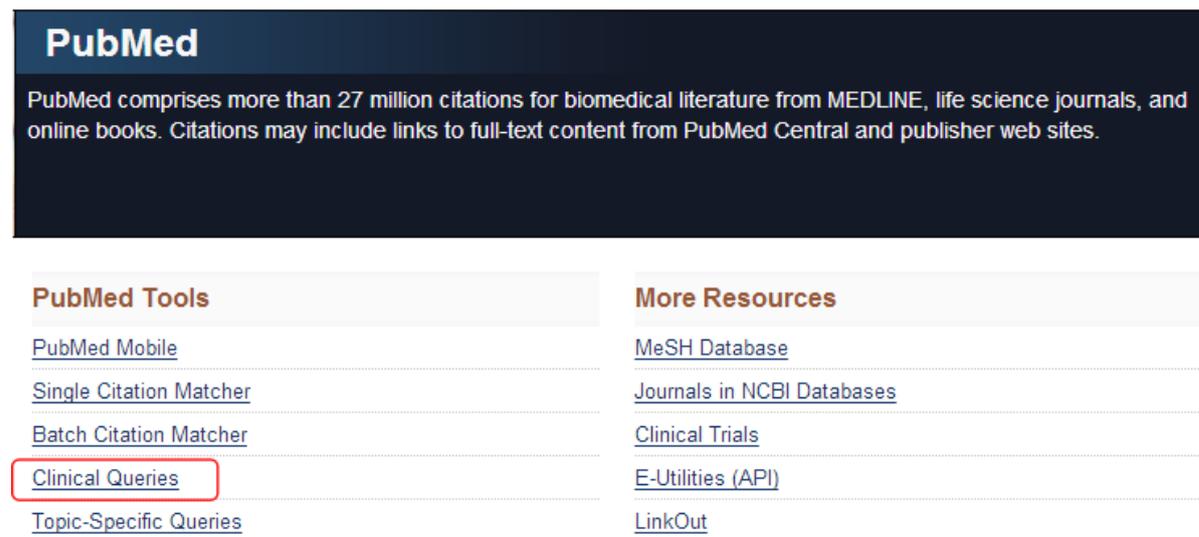
[PubMed Central](#)

[PubMed Central Canada](#)

5. 临床研究文献检索

一般, *Pubmed* 检索出的整体结果是未经分类, 研究者需自行阅读分类或使用 *filter*(过滤器)

自行筛选。因而，若想查看具有针对性的临床研究文章，也需花费大量的时间和精力。但是 *Pubmed* 主页里 *Pubmed Tools* 中的 *Clinical Queries* 可让研究者简便快捷的找到相关文献。



PubMed

PubMed comprises more than 27 million citations for biomedical literature from MEDLINE, life science journals, and online books. Citations may include links to full-text content from PubMed Central and publisher web sites.

PubMed Tools	More Resources
PubMed Mobile	MeSH Database
Single Citation Matcher	Journals in NCBI Databases
Batch Citation Matcher	Clinical Trials
Clinical Queries	E-Utilities (API)
Topic-Specific Queries	LinkOut

点击后，可进入以下界面，其中包括了三大板块：*Clinical Study Categories*（可选择病因、诊断、治疗、预后和临床预测指南等）、*Systematic Reviews* 和 *Medical Genetics*（临床遗传学）。

PubMed Clinical Queries

Results of searches on this page are limited to specific clinical research areas. For comprehensive searches, use PubMed directly.

IBD **输入一级关键词**

Clinical Study Categories

Category: Therapy
Scope: Broad

Systematic Reviews

Results: 5 of 785

Histologic scoring indices for evaluation of disease activity in ulcerative colitis.

Mosli MH, Parker CE, Nelson SA, Baker KA, MacDonald JK, Zou GY, Feagan BG, Khanna R, Levesque BG, Jairath V. Cochrane Database Syst Rev. 2017 May 25; 5:CD011256. Epub 2017 May 25.

Medical Genetics

Topic: All

临床遗传学

Results: 5 of 4199

ACF7 regulates inflammatory colitis and intestinal wound response by orchestrating tight junction dynamics.

Ma Y, Yue J, Zhang Y, Shi C, Odenwald M, Liang WG, Wei Q, Goel A, Gou X, Zhang J, et al. Nat Commun. 2017 May 25; 8:15375. Epub 2017 May 25.

选择病因、诊断、治疗、预后和临床预测指南等
Re: Fecal Microbiota Transplantation: From <> to Clinical Practice in Inflammatory Bowel Disease
Gianotti RJ, Moss AC. Gastroenterol Hepatol (N Y). 2017 Apr; 13(4):209-213.
Histologic scoring indices for evaluation of

选择右下的 *see all*, 回到 PubMed 主页。输入你的二级关键词: *TNF*, 点击搜索文章即可。

PubMed **输入二级关键词**

Format: Summary Sort by: Most Recent Per page: 20

Search results
Items: 1 to 20 of 404

<< First < Prev Page 1 of 21 Next > Last >>

6.追踪最新文献

首先 *sign in to NCBI*, 即登陆“*My NCBI*”, 没有的小伙伴可以注册一下。其次在搜索框中输入 *breast cancer*, 点击 *Search* 按钮后在新界面中点击 *Create alert*。



在新的界面中, 根据自己的研究热点、时间安排等来设置推送的文章内容以及接收频率。设置完成后点击 *save* 即可。

Your PubMed search

关注研究热点

Name of saved search:

breast cancer

Search terms:

breast cancer

研究限定条件

[Test search terms](#)

Would you like e-mail updates of new search results?

- No, thanks.
 Yes, please.

E-mail: (change)

Schedule:

Frequency: Monthly

文献推送时间及频率

Which day? the first Sunday

Formats:

Report format: Summary

文献推送格式

Number of items:

Send at most: 5 items

文献推送数目

Send e-mail updates even if I don't have any new results

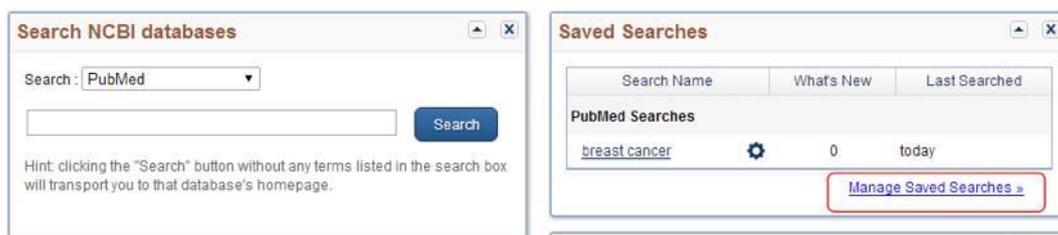
Any text you want to be added at the top of your e-mail (optional):

Save

Cancel

[Skip saving at](#)

之后，点击右上角的 *My NCBI*，可在以下界面中点击 *Manage Saved Searches*，可更改、删除自己的设置。



7.英文期刊查询

当已知杂志名称或者杂志 ISSN 号（国际标准期刊编号）时，在 *Pubmed* 检索框分类选项中选择“*NLM Catalog*”，在检索内容框中输入杂志名称（用引号进行限制）或 ISSN 号，点击 *Search* 进行检索即可。



当已知某篇英文文章时，以《*Surgical treatment of pulmonary tuberculosis:the phoenix of thoracic surgery*》为例，可在 *Pubmed* 中检索出该文章后，点击杂志名称

J Thorac Dis, 此时会跳出自动选择框, 点击选择“Search in NLM Catalog”, 即可进入杂志信息页面。

杂志名称
see 1 citation found by title matching your search:

J Thorac Dis. 2012.03.18. n.2072-1439.2012.03.18.

Surgical tuberculosis: the phoenix of thoracic surgery?

Bertolaccini L

Actions

- Search in PubMed
- Search in NLM Catalog
- Add to Search

Author information

KEYWORDS: Pulmonary tuberculosis; thoracic surgery

PMID: 23585949 PMCID: [PMC3621931](#) DOI: [10.3978/j.issn.2072-1439.2012.03.18](#)

Journal of thoracic disease

Author(s): Guangzhou hu xi ji bing yan jiu suo
Hu xi ji bing guo jia zhong dian shi yan shi

NLM Title Abbreviation: J Thorac Dis

ISO Abbreviation: J Thorac Dis

Title(s): Journal of thoracic disease.

Other Title(s): JTD

Publication Start Year: 2009

Frequency: Four no. a year **出版周期**

Country of Publication: China

Publisher: Hong Kong : Pioneer Bioscience Pub. Co.

Language: English

ISSN: 2072-1439 (Print)
2077-6624 (Electronic)
2072-1439 (Linking) **该杂志的官方网址**

LCCN: 2011243245

Electronic Links: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1685/>
<http://www.jthoracdis.com>

In: PubMed: v1, 2009-
PMC

Current Indexing Status: Not currently indexed for MEDLINE.

MeSH: Thoracic Diseases*

Publication Type(s): Periodicals

Notes: Vol. 1 complete in one issue.
Also issued online.
Description based on: Vol. 1, no. 1 (Dec. 2009); title from cover.
Latest issue consulted: Vol. 2, no. 4 (Dec. 2010).

Other ID: (OCoLC)711853068

NLM ID: [101533916](#) [Serial]

8.按照影响因子归类文献

同样 *sign in to NCBI*, 即登陆“*My NCBI*”。然后点击 *My NCBI*, 在新界面中 *Filter* 板块中点击 *Manage Filter*。

Search NCBI databases

Search: PubMed

Search

Hint: clicking the "Search" button without any terms listed in the search box will transport you to that database's homepage.

My Bibliography

Your bibliography contains **no items**.

[Manage My Bibliography »](#)

Recent Activity

Time	Database	Type	Term
05:17 AM	NLM Catalog	search	"J Thorac Dis"[Title Abbreviation]
05:08 AM	PubMed	record	Surgical treatment of pulmonary tub...
05:08 AM	PubMed	search	Surgical[Title] AND treatment[Title...
05:07 AM	NLM Catalog	search	"Journal of thoracic disease"
05:04 AM	NLM Catalog	search	Journal of thoracic disease

Saved Searches

You don't have any saved searches yet.

Go and [create some saved searches](#) in PubMed or our other databases.

[Manage Saved Searches »](#)

Collections

Collection Name	Items	Settings/Sharing	Type
Favorites	edit 0	Private	Standard
My Bibliography	edit 0	Private	Standard
Other Citations	edit 0	Private	Standard

[Manage Collections »](#)

Filters

Filters for: PubMed

You do not have any active filters for this database.

[Add filters for the selected database.](#)

[Manage Filters »](#)

然后点击 *Create custom filter*，创建一个新 Filter。

Your PubMed filter list

[Create custom filter](#)

You do not have any active filters for this database.

Create a new custom filter using the button above, or select filters from Browse/Search Panel to the right.

Add Custom Filter in PubMed

Supply query terms to be used as a filter in PubMed:

Query terms:

[Test This Query](#)

(See number of results for this query.)

Save filter as:

[Cancel](#) [Save Filter](#)

Published in the last 5 years

Review articles that review the literature on a subject

以 $IF > 30$ 为例，先在公众号里回复“ IF ”下载最新版本的影响因子 *Excel* 文档，打开选择

$IF > 30$ 的杂志名称并直接复制。



Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor
1	CA-A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS	20,488	131.723
2	NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE	283,525	59.558
3	NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY	25,460	47.120
4	LANCET	195,553	44.002
5	NATURE BIOTECHNOLOGY	48,650	43.113
6	NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY	31,545	39.416
7	NATURE MATERIALS	72,306	38.891
8	BIOLOGY	36,784	38.602
9	NATURE	627,846	38.138
10	Annual Review of Astronomy and Astrophysics	9,000	37.846
11	ASSOCIATION	129,909	37.684
12	CHEMICAL REVIEWS	148,154	37.369
13	NATURE REVIEWS GENETICS	30,286	35.898
14	Annual Review of Immunology	17,023	35.543
15	Nature Nanotechnology	40,881	35.267
16	SCIENCE	568,210	34.661
17	NATURE REVIEWS CANCER	41,846	34.244
18	CHEMICAL SOCIETY REVIEWS	99,930	34.090
19	REVIEWS OF MODERN PHYSICS	41,133	33.177
20	Living Reviews in Relativity	2,038	32.000
21	NATURE GENETICS	86,870	31.616
22	Nature Photonics	28,381	31.167
23	PROGRESS IN MATERIALS SCIENCE	9,196	31.083
24	PHYSIOLOGICAL REVIEWS	24,788	30.924
25	NATURE MEDICINE	65,230	30.357
26	NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE	33,792	29.298

然后以文本的形式粘贴在 *word* 文档中。

LANCET

NATURE BIOTECHNOLOGY

NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY

NATURE MATERIALS

NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY

NATURE

Annual Review of Astronomy and Astrophysics

JAMA-JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION

CHEMICAL



NATURE REVIEWS GENETICS

只保留文本 (T)

Annual Review of Immunology

Nature Nanotechnology

SCIENCE

NATURE REVIEWS CANCER

CHEMICAL SOCIETY REVIEWS

REVIEWS OF MODERN PHYSICS

Living Reviews in Relativity

NATURE GENETICS

Nature Photonics

PROGRESS IN MATERIALS SCIENCE

PHYSIOLOGICAL REVIEWS

NATURE MEDICINE

Ctrl+H 打开 Word 的替换功能，把^p（注：即换行符）替换为" [journal] or"，点击全部替换，如下图



然后在开头部位加上一个单引号"，同时将末尾的 or "删除，如下图：

加引号 "

CA-A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS"[journal] or"NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE"[journal] or"NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY"[journal] or"LANCET"[journal] or"NATURE BIOTECHNOLOGY"[journal] or"NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY"[journal] or"NATURE MATERIALS"[journal] or"NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY"[journal] or"NATURE"[journal] or"Annual Review of Astronomy and Astrophysics"[journal] or"JAMA-JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION"[journal] or"CHEMICAL REVIEWS"[journal] or"NATURE REVIEWS GENETICS"[journal] or"Annual Review of Immunology"[journal] or"Nature Nanotechnology"[journal] or"SCIENCE"[journal] or"NATURE REVIEWS CANCER"[journal] or"CHEMICAL SOCIETY REVIEWS"[journal] or"REVIEWS OF MODERN PHYSICS"[journal] or"Living Reviews in Relativity"[journal] or"NATURE GENETICS"[journal] or"Nature Photonics"[journal] or"PROGRESS IN MATERIALS SCIENCE"[journal] or"PHYSIOLOGICAL REVIEWS"[journal] or"NATURE MEDICINE"[journal] or"

删除

然后就可以 *Ctrl+A* --> *Ctrl+C* --> *Ctrl V* 将 *IF>30* 的杂志名称粘贴至 *Query terms* 中，同时为该筛选过滤条件命名为 *SciRes-Test*。

Add Custom Filter in PubMed



Supply query terms to be used as a filter in PubMed:

Query terms:

"CA-A CANCER JOURNAL
FOR CLINICIANS"[journal]
or"NEW ENGLAND
JOURNAL OF
MEDICINE"[journal]
or"NATURE REVIEWS
DRUG
DISCOVERY"[journal]
or"LANCET"[journal]

Test This Query

(See number of results for this query.)

Save filter as:

SciRes-Test

Cancel

Save Filter

点击 *save filter*, 即可保存该文献筛选条件。则在搜索文献时, 点击 *SciRes-Test* 即可查看 *IF>30* 的相关文献。

Filter your results:

All (142)

[2≤IF<3 \(9\)](#)

[3≤IF<5 \(36\)](#)

[5≤IF<10 \(46\)](#)

[10≤IF<20 \(18\)](#)

[20≤IF<30 \(2\)](#)

[30≤IF \(4\)](#)

[SciRes-Test \(4\)](#)

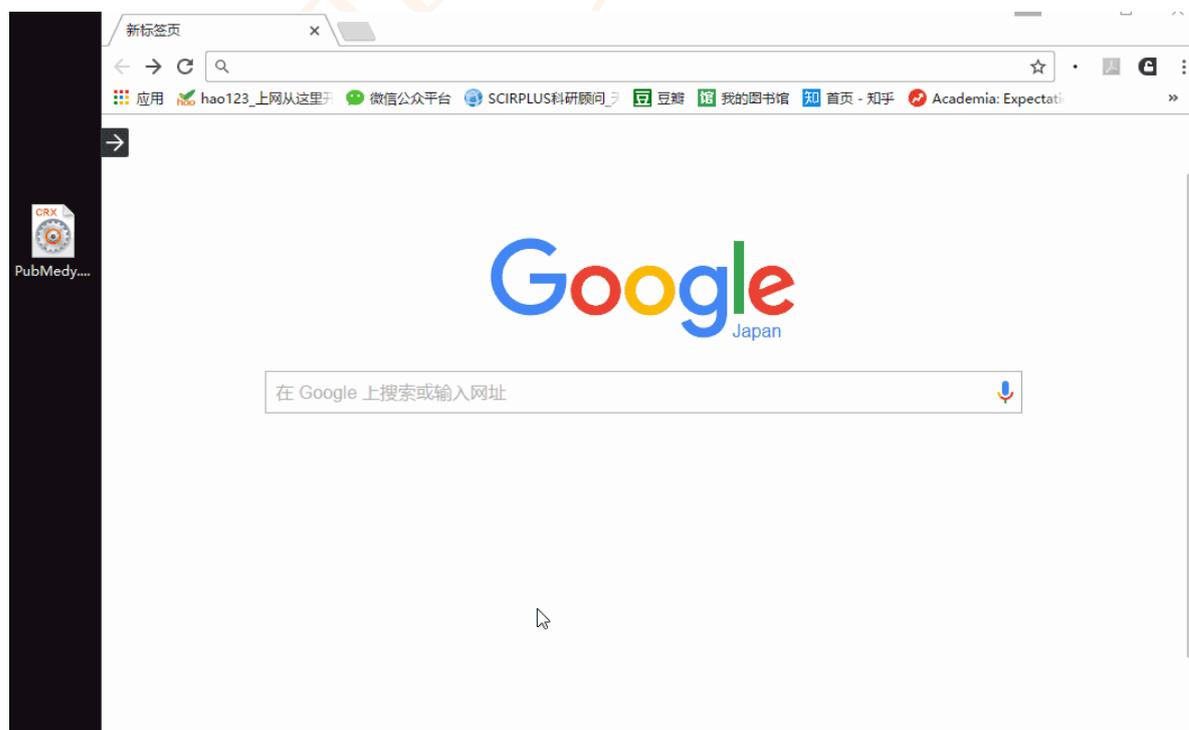
9. Pubmed 神插件

为了直接让 *Pubmed* 直接显示杂志的影响因子，可以通过以下两款神插件——*pubmedy* 和“医学文献助手”来实现。将其安装至浏览器后，会在 *Pubmed* 搜索界面下直接查看 *IF*、*Cited*、*Citation* 以及 *FullText(PDF) / direct pdf* 等。对于 *pubmedy* 插件，目前支持

以下 8 种浏览器，一般将插件直接拖入浏览器即可。



而 Google 浏览器的安装方式，如下图所示：



10.手机上优雅地使用 Pubmed

关注微信公众号：*Pubmedplus*，然后即可手机页面中点击 *pubmed* 进入搜索界面。





选择“搜索”按钮后，选择相关文献后，可查看其 *IF*(影响因子)、*Cited* (被引次数)、*Ref* (参考文献)、*Fullink*(全文链接，其中 *FreeFull* 是免费的)、*scihub*。

PubMed Lung cancer 搜索

PMID:27124450	IF:33.611	Cited:9
Ref:68	FullLink	Scihub

Metastasis as an evolutionary process.

Turajlic S, et al , **Science**, 2016 Apr 08

Abstract

Therapeutic advances in oncology have not fully translated to the treatment of metastatic disease, which

另外, 该搜索引擎还可进行中文搜索, 即实现中文输入检索式自动翻译为英文, 并进行搜索。
还可通过“一键翻译”将文章摘要直接翻译为中文, 准确度高!

PMID:19382895

IF:4.014

Cited:58

[Ref:103](#)

[Related](#)

[FreeFull](#)

[SciHub](#)

Cardiac renewing: interstitial Cajal-like cells nurse cardiomyocyte progenitors in epicardial stem cell niches.

Popescu LM, et al, [J Cell Mol Med](#), 2009 May



[More](#)

Abstract

点击



一键翻译

最近的研究表明，在心外膜内存在不同的细胞系，我们认为这个区域可以承载心脏干细胞龛（CSCN）。使用透射电子显微镜，我们发现在正常成年小鼠的心外膜中共存有至少10种类型的细胞：脂肪细胞，成纤维细胞，施旺细胞和神经纤维，分离的平滑肌细胞，肥大细胞，巨噬细胞，

实验菜鸟福音：Cell 杂志推出 STAR methods 新版块

作者：子非鱼

众所周知，实验 protocol 是科研汪们行走科研江湖的神兵利器。而对于初出茅庐的实验菜鸟而言，要找到一份正确的 protocol 并非易事。网上五花八门的 protocol 让人眼花缭乱，没有一双火眼金睛就很难辨别一份真正靠谱的 protocol，因而实验小白们经常会被信息不全的 protocol 带到“沟里”而不自知。

而近期 Cell 杂志推出了 STAR methods 新版块，则为实验猿们量身打造了一柄绝世好剑，可谓是为实验猿们在升级打怪的科研之路上提供了必要的装备支撑，真正做到了长剑一握，科研江湖任你驰骋！

新版块 STAR methods 的与众不同之处

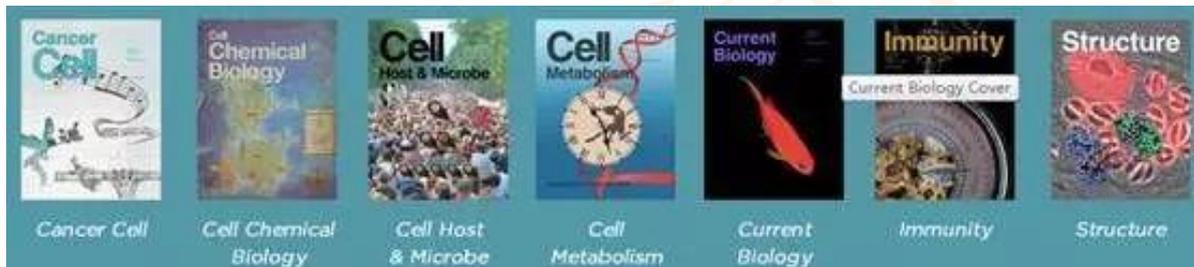
一直以来，文献中的 Method 部分都被认为是该文章中最难理解和最不感兴趣的一部分，但是实际上，它所包含的关键信息恰恰是其他研究者用以评论文章结论的最佳标准，以及开展自己的创新性研究中可借鉴的重要方法。Cell 杂志认为无论是希冀借此文章寻找新的灵感的跨学科研究者，还是从事相同领域研究的科研者，把握每篇文献中所包含的实验细节的清晰性和完整性对科研工作地开展都是至关重要的。

但遗憾的是，在现阶段，绝大多数文献中的 Method 部分通常会以“as described in references”的形式而将实验的详细信息一笔带过，这就迫使研究者需通过查询参考文献来了解实验的种种细节。为此，Cell 期刊杂志对 Method 进行升级改版为 STAR Methods，即 Structured（结构化）、Transparent（透明化）和 Accessible Reporting（可访问的学术报告）。除了常规的实验 protocol 外，STAR Methods 还会将研究中使用的关键试剂、抗体来源、动物模型以及生物软件汇总成一个“关键资源表”，让其他研究者对文章中实验方法的相关信息一目了然。

简言之，STAR Methods 即是将期刊发表的经典文献中科学信息流进行无缝整合后，提供一个直观严谨的实验框架，不仅可使得作者的文章表述变得更加清晰明了，同时也会加深读者对文章的深入理解。目前，该板块已经应用于 Cell 杂志旗下的几本子期刊，如下图所示：



自然，后续 Cell 期刊还会陆续将该板块添加至更多的子期刊中：

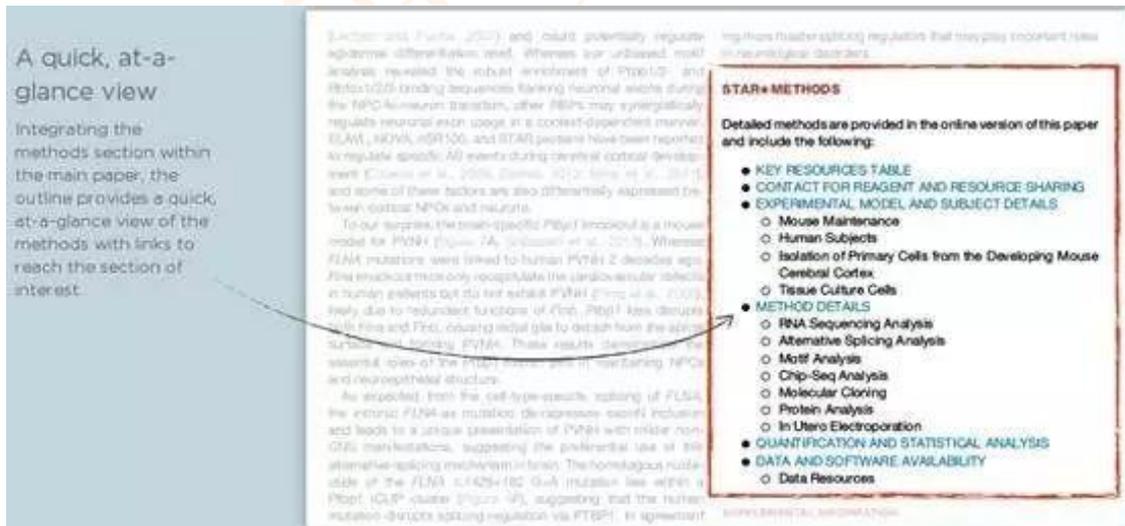


新版块 STAR methods 具体案例

举个例子：当某篇 Cell 发表的文章中含有 STAR☆Methods 时，则意味着该文章中已经提供了实验流程中所有的详细信息，不仅包括标准的实验 protocol，还包括试剂/抗体来源、所使用细胞株、动物模型等信息。



另外，STAR Methods 在整合了文章中使用的**所有实验方法**后，提供了简单直观的框架列表：**Key Resource Table**（关键资源表格）、**Contact For Reagent And Resource Sharing**（可通过邮件联系作者获取文章中共享的试剂与资源）、**Experimental Model And Subject Details**（实验模型及详细信息）、**Method Details**（实验的标准化 protocol）、**Quantification and Statistical Analysis**（实验结果数据分析）以及 **Data And Software Availability**（数据来源及相关生物信息软件的使用），因而研究者可通过点击相关选项进而链接到自己所感兴趣的实验部分：



在科研实验中，即便是同一种抗体/试剂，公司来源不同则质量不同，这可能与不同公司的

1298

抗体/试剂的生产工艺有关。而一旦抗体/试剂的可靠性较低，不仅会给实验带来灾难性的结果，也会让研究者陷入一种不知错在何处的窘境。

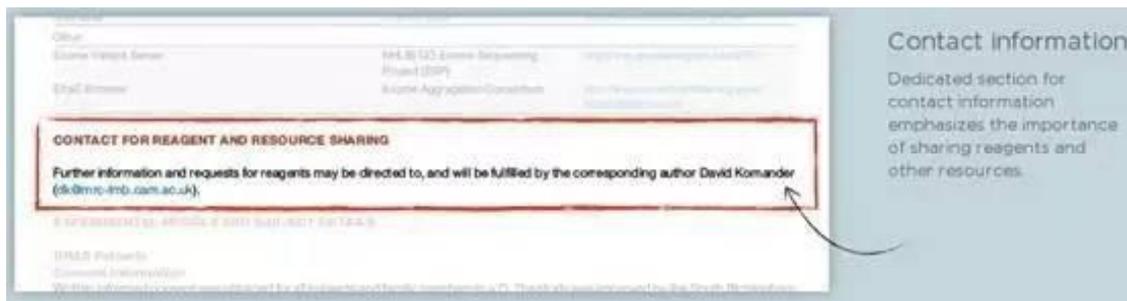
但在 Key Resource Table（关键资源整合表格）中，简单的三列表中就已经将抗体/试剂的名称、购买来源以及货号标注得清清楚楚。研究者可选取相同公司来购买已经过实验验证过的试剂/抗体，进而可提高实验的准确率。

Resource Information
A simple three-column table allows full reporting of reagent and resource information, including their source and identifiers.

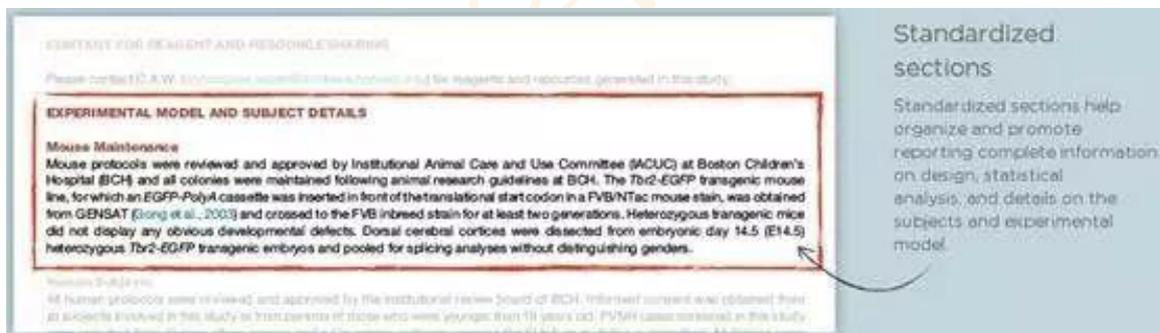
STAR METHODS
KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Mouse monoclonal anti-BrdU	Calbio	Cat#M0744; RRID: AB_10013660
Rabbit polyclonal anti-Flag	Cell Signaling Technology	Cat#23685; RRID: AB_10694612
Mouse monoclonal anti-Flag (M2)	Sigma-Aldrich	Cat#F3165; RRID: AB_2581529
Rabbit polyclonal anti-Fra	Epitomics	Cat#2242-1
Mouse monoclonal anti-Gapdh	Abcam	Cat#ab6254; RRID: AB_2107448
Rat monoclonal anti-HA	Roche	Cat#11857420001; RRID: AB_10094466
Rat monoclonal anti-Histone H3 (S21p)	Sigma-Aldrich	Cat#H9906; RRID: AB_260006
Rabbit polyclonal anti-AGE7	Abcam	Cat#15560; RRID: AB_443209
Goat polyclonal anti-Lamin B	Santa Cruz	Cat#sc-6217; RRID: AB_648158
Rabbit polyclonal anti-Ninein	Bethyl	Cat#A301-504A; RRID: AB_999627
Goat polyclonal anti-Ptp1	Abcam	Cat#ab6642; RRID: AB_505011
Rabbit polyclonal anti-Ptp2	Abcam	Cat#ab6641
Mouse monoclonal anti-Hydrin/ADP1	Abcam	Cat#ab66139; RRID: AB_10907198
Rabbit polyclonal anti-RhoA2/21229	Bethyl	Cat#A300-964A; RRID: AB_999476
Mouse monoclonal anti-RhoA/374621	Abcam	Cat#ab66077; RRID: AB_2236712

当然，也许有些试剂等资源价格确实昂贵又或者获取途径颇费周折，此时可以借由 **Contact For Reagent And Resource Sharing** 中所提供的邮件信息，来咨询文章作者能否友情提供一些共享的资源或试剂。此外，对于实验过程中所遇到一些问题也可通过邮件咨询与文章作者进行探讨。



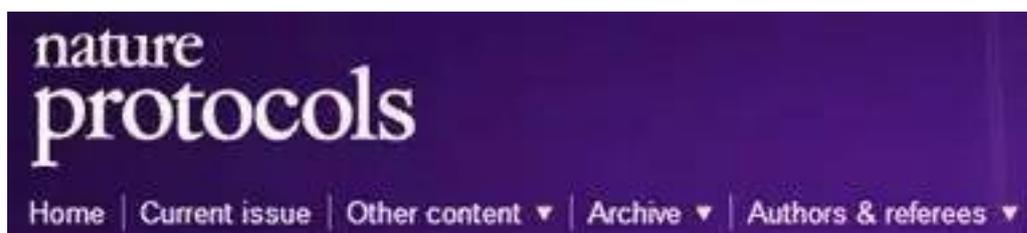
接下来，就是 STAR Methods 中的核心内容：Experimental Model And Subject Details（实验模型及详细信息）模块和 Method Details（实验的标准化 protocol）。该模块所提供的标准化实验 protocol 在经过文章作者反复验证后，确实有效可行。更重要的是这些 protocol 也许会对传统的经典方法进行了一定程度的改进，又或者其本身就是该研究领域中一种新的研究方法，那么研究者借助这些实验方法不仅可使科学研究事半功倍，也可为后续文章撰写增添亮点。这也是为什么小鱼喜欢从一些顶级期刊发表的文献中寻找 Protocol 的原因之一。



其他 protocol 查询方式

也许更多时候，小伙伴的 protocol 是源自于师兄师姐的亲授真传，但是由于每个人的实验习惯不同，很可能该 protocol 在传承几代后就不明所以了，然后不求甚解的的师弟师妹们就一直“错下去”，到头来会导致出现画虎不成反类犬的情况发生。因而，小鱼建议大家寻找靠谱 protocol，还是向大牛要比较好，这里推荐 7 个靠谱 protocol 网站，相信总有一款适合你。

#1: Nature protocol



该杂志文章倾向于描述详细的实验步骤及注意事项,以便使读者可以快速将该实验方法应用于各自领域的研究,查询时直接在首页搜索框输入实验技术名即可。

#2: Nature Methods



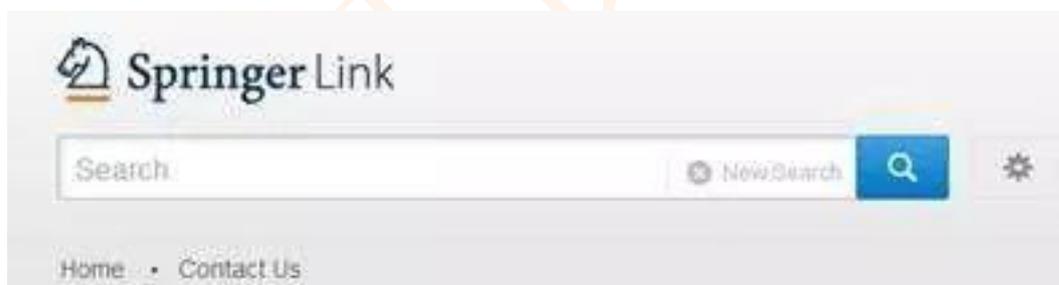
该杂志主要发表生命科学领域中新的研究方法或对经典方法有显著改进的相关论文。同样,查询时直接在首页搜索框输入实验技术名即可。

#3: Nucleic Acids Research Methods



登录网页，可按不同研究领域来查找具体的实验技术。

#4: Springer 出版社的 Methods 系列



打开 Springer 首页，在“Browse by discipline”一栏选择“Life science”，然后在“Content Type”一栏点击 protocol,出现以下页面，在搜索框输入关键词查询实验方法。

#5: 冷泉港出版社的 Protocols 系列



Cold Spring Harbor Protocols

HOME | ABOUT | SUBJECT CATEGORIES | ARCHIVE | SUBSCRIBE | ADVERTISE

首页显示的 protocols 大分类清楚了，想查什么技术方法就直接点击，每个大类下面有更细的分类，例如点击首页“Polymerase Chain Reaction (PCR)”，可以选择具体的 PCR 技术。

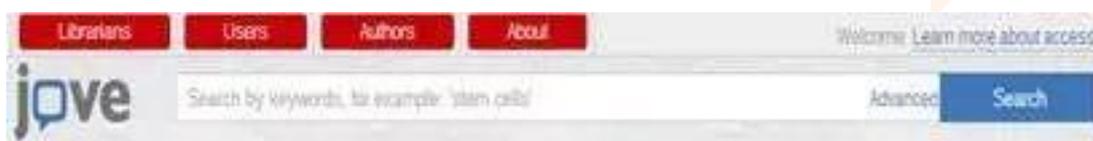
#6: google scholar 检索



pubmed 的文献更新速度比 google scholar 快。但是 google scholar 在检索 protocol 上更显优势：一是 google scholar 检索结果里有引用次数，一般来说，引用次数高的文献，其技术方法的可重复性高；二是 scholar 可以检索到专利和书籍里面的技术方法，特别是书籍里面的，

有很大的参考价值。

#7: 生物/医学实验视频杂志 JoVE



JoVE 全称 Journal of Visualized Experiments, 该网站是专门收集实验操作和视频的学术网站。觉得看 Protocol 很枯燥的同学, 可以考虑看看这个。

参考文献:

1. Empowering Methods, to Empower Scientists

2. A STAR Is Born

不了解生信? 没关系, 手把手教你从 GEO 数据库里挖掘一个课题!

作者: 大魔狮

近年来, 测序技术飞速发展, 在科研中更是十分普遍。大家一定发现, 随便翻开几篇文章都能找到 microarray、RNA-SEQ 等熟悉的字眼, 没个高通量测序都不好意思说自己搞了个课题!

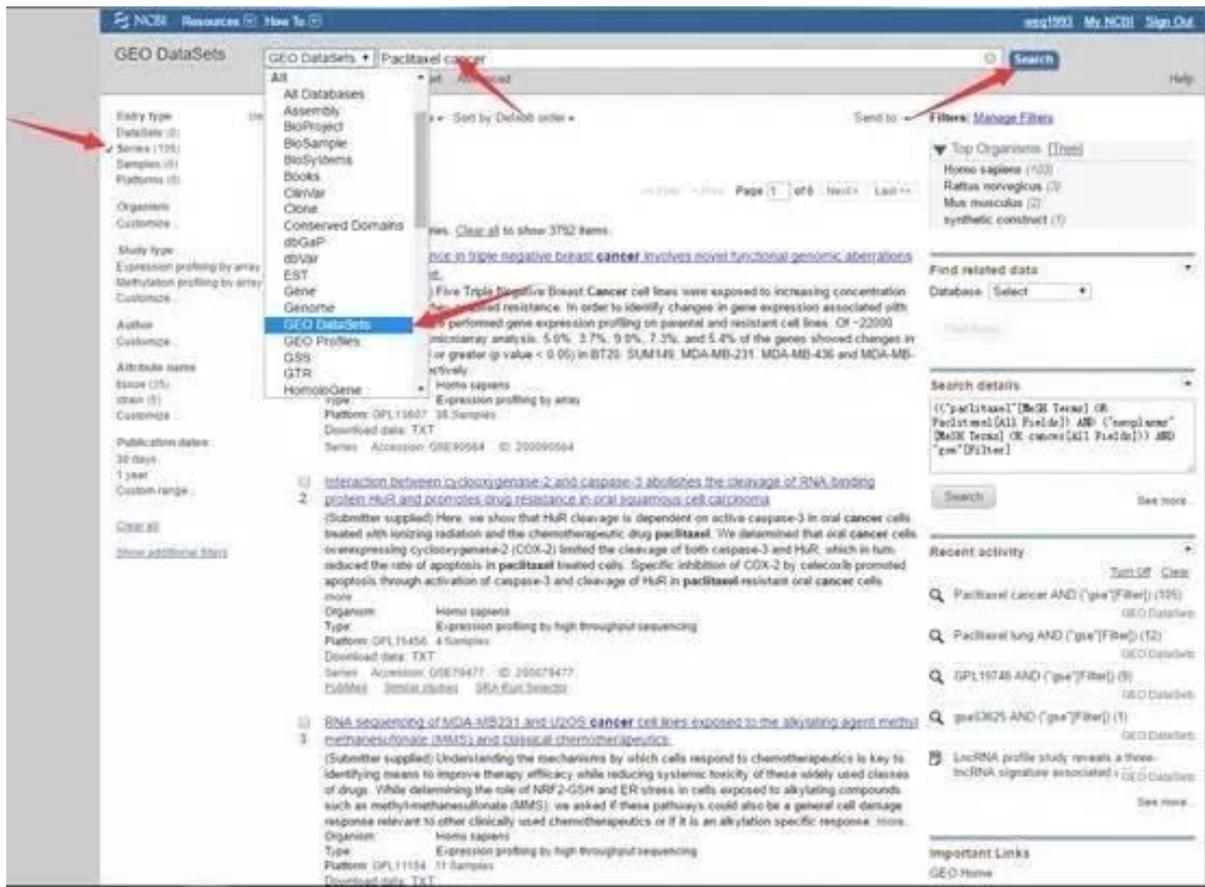
然而涉及到这些生信方面的技术,满屏幕的代码,看起来杂乱无章的数据,是否让你头大呢?科研经费紧张的你是否没有办法涉足大数据科研呢?没有过硬的关系网,是否很难搞到临床样本做大数据分析呢?

没关系,让我来教你怎么利用自己的电脑,运用 NCBI 的 GEO 数据库、EXCEL 等软件,傻瓜式的进行初级的大数据挖掘和分析,甚至找到一个 2-3 分的课题!

下面以癌症为例,我们可以这么想:紫杉醇 (paclitaxel) 是一个常见的癌症用药,但是经常因为耐药性而失去应有的疗效,那么其中的分子机制是否有研究的价值呢?

首先,打开 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),如下图选择 GEO Datasets,输入 paclitaxel cancer, 点击 Search 搜索。

出来以下结果:



一共 105 个是 Series，也就是别人做了测序并发文章以后上传到 NCBI 上的数据，后面的是测序平台、还有各样本的信息，大家有兴趣可以自己摸索以下，这里不涉及了。如果搜索到的结果较多，你也可以点击页面左侧的 series 来只显示我们需要的条目。我发现第七个搜索结果有点意思。

[Targeting of apoptotic pathways by SMAC or BH3 mimetics distinctly sensitizes paclitaxel-resistant triple negative breast cancer cells](#)

7.  (Submitter supplied) Standard chemotherapy is the only systemic treatment for triple-negative breast cancer (TNBC). Despite the good initial responses, resistance remains a major therapeutic obstacle. Here, we employed a High-Throughput Screen to identify targeted therapies that overcome chemoresistance in TNBC. We applied short-term paclitaxel treatment and screened 320 small-molecule inhibitors of known targets to identify drugs that preferentially and efficiently target paclitaxel-treated TNBC cells. more...

Organism: Homo sapiens
Type: Expression profiling by array
Platform: GPL16686 8 Samples
Download data: CEL
Series Accession: GSE86839 ID: 200086839
[Analyze with GEO2R](#)

点进去看看。

科研资源网

Scope: **Self** Format: **HTML** Amount: **Quick** GEO accession: **GSE86839** **GO**

Series GSE86839 [Query DataSets for GSE86839](#)

Status Public on Jan 26, 2017
Title Targeting of apoptotic pathways by SMAC or BH3 mimetics distinctly sensitizes paclitaxel-resistant triple negative breast cancer cells
Organism Homo sapiens
Experiment type Expression profiling by array
Summary Standard chemotherapy is the only systemic treatment for triple-negative breast cancer (TNBC). Despite the good initial responses, resistance remains a major therapeutic obstacle. Here, we employed a High-Throughput Screen to identify targeted therapies that overcome chemoresistance in TNBC. We applied short-term paclitaxel treatment and screened 320 small-molecule inhibitors of known targets to identify drugs that preferentially and efficiently target paclitaxel-treated TNBC cells. Among these compounds the SMAC mimetics (BV6, Birinapant) and BH3-mimetics (ABT-737/263) were recognized as potent targeted therapy for multiple paclitaxel-residual TNBC cell lines. However, acquired paclitaxel resistance through repeated paclitaxel pulses result in desensitization to BV6, but not to ABT-263, suggesting that short- and long-term paclitaxel resistance are mediated by distinct mechanisms. Gene expression profiling of paclitaxel-residual, -resistant and naive MDA-MB-231 cells demonstrated that paclitaxel-residual, as opposed to -resistant cells, were characterized by an apoptotic signature, with downregulation of anti-apoptotic genes (BCL2, BIRC5), activation of apoptosis inducers (IL24, PDCD4), and enrichment of TNF α /NF- κ B pathway, including upregulation of TNFSF15, coupled with cell-cycle arrest. BIRC5 and FOXM1 downregulation and IL24 induction was also evident in breast cancer patient datasets following taxane treatment. Exposure of naive and paclitaxel-resistant cells to supernatants of paclitaxel-residual cells sensitized them to BV6, and treatment with TNF α enhanced the potency of BV6, suggesting that sensitization to BV6 is mediated, at least partially, by secreted factor(s). Our results suggest that administration of SMAC or BH3 mimetics following short-term paclitaxel treatment could be an effective therapeutic strategy for TNBC, while only BH3-mimetics could effectively overcome long-term paclitaxel resistance

这里是对应文章的摘要，看看这批数据是怎么来的

Overall design The transcriptomes of naive, Paclitaxel residual and resistant MDA-MB-231 breast cancer cell lines were compared in biological triplicates. 这批数据的实验设计

Contributor(s) Busch H, Boerries M, Panayotopoulou E, Lev S
Citation missing Has this study been published? Please login to update or notify GEO.
Submission date Sep 12, 2016
Last update date Jan 28, 2017
Contact name Hauke Busch
E-mail hauke.busch@uni-luebeck.de
Phone +49-451-3101-8470
Organization name University of Lübeck
Department Lübeck Institute of Experimental Dermatology
Street address Ratzeburger Allee 160
City Lübeck
State/province Schleswig-Holstein
ZIP/Postal code 23538
Country Germany

Platforms (1) GPL16686 [HuGene-2_0-st] Affymetrix Human Gene 2.0 ST Array [transcript (gene) version]
Samples (8) GSM2309234 MDA-MB-231_naive_rep1
 at More...
 GSM2309235 MDA-MB-231_naive_rep2
 GSM2309236 MDA-MB-231_resistant_rep1

Relations
BioProject PRJNA342666

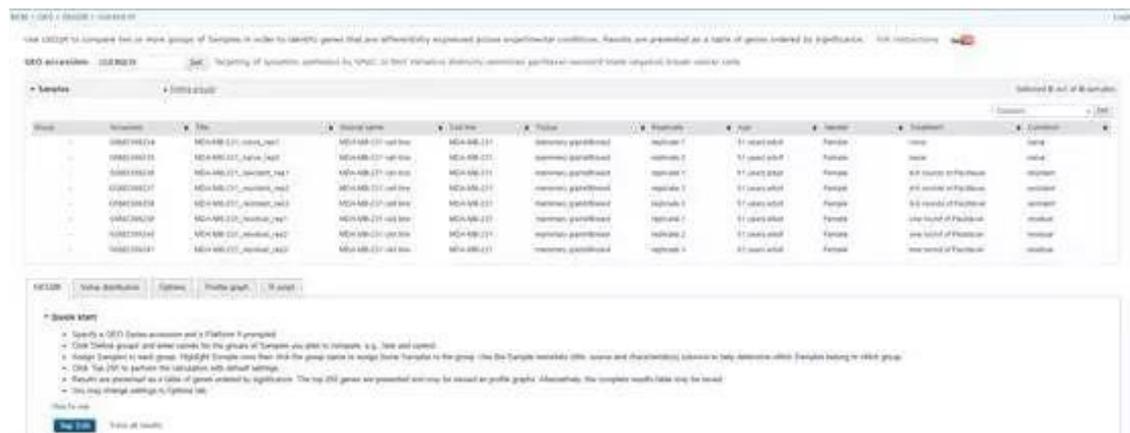
Analyze with GEO2R

Download family	Format
SOFT formatted family file(s)	SOFT ?
MINIML formatted family file(s)	MINIML ?
Series Matrix File(s)	TXT ?

Supplementary file	Size	Download	File type/resource
GSE86839_RAW.tar	69.8 Mb	(http)(custom)	TAR (of CEL)

Raw data provided as supplementary file
 Processed data included within Sample table

等我们阅读完摘要和实验组的处理方法，确定该数据符合我们的需求，就可以点击 **Analyze with GEO2R**，进入下面的页面，利用 NCBI 提供的工具进行数据分析。



接下来，我们点击 **Define groups**，输入两个分组，分别是 **normal** 和 **resistant**，并分别将普通的细胞系和耐药细胞系点击分入这两组，分组完毕后，点击 **save all results**，获取两组之间的差异表达基因（稍等几分钟）。

DAVID: Functional An... DAVID Functional An... GEO2R - GEO - NCI... National Center for Bi... GEO2R - GEO - NCI... GEO Accession viewer... 家彩器 - Google 搜索

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE86839

NCBI GEO Publications | FAQ | MIAME | Email | GEO Login

Use GEO2R to compare two or more groups of Samples in order to identify genes that are differentially expressed across experimental conditions. Results are presented as a table of genes ordered by significance. Full instructions

GEO accession: GSE86839 Set Targeting of apoptotic pathways by SMAC or BH3 mimetics distinctly sensitizes paclitaxel-resistant triple negative breast cancer cells

Samples: Define groups. Enter a group name. List. Selected 5 out of 8 samples. Columns: Set

Group	Accession	Cancel selection	Source name	Cell line	Tissue	Replicate	Age	Gender	Treatment	Condition
native	GSM2309234	native (2 samples)	MDA-MB-231 cell line	MDA-MB-231	mammary gland/Breast	replicate 1	51 years adult	Female	none	naive
native	GSM2309235	native (2 samples)	MDA-MB-231 cell line	MDA-MB-231	mammary gland/Breast	replicate 2	51 years adult	Female	none	naive
resistant	GSM2309236	resistant (3 samples)	MDA-MB-231 cell line	MDA-MB-231	mammary gland/Breast	replicate 1	51 years adult	Female	4-6 rounds of Paclitaxel	resistant
resistant	GSM2309237	resistant (3 samples)	MDA-MB-231 cell line	MDA-MB-231	mammary gland/Breast	replicate 2	51 years adult	Female	4-6 rounds of Paclitaxel	resistant
resistant	GSM2309238	resistant (3 samples)	MDA-MB-231 cell line	MDA-MB-231	mammary gland/Breast	replicate 3	51 years adult	Female	4-6 rounds of Paclitaxel	resistant
-	GSM2309239	MDA-MB-231_residual_rep1	MDA-MB-231 cell line	MDA-MB-231	mammary gland/Breast	replicate 1	51 years adult	Female	one round of Paclitaxel	residual
-	GSM2309240	MDA-MB-231_residual_rep2	MDA-MB-231 cell line	MDA-MB-231	mammary gland/Breast	replicate 2	51 years adult	Female	one round of Paclitaxel	residual
-	GSM2309241	MDA-MB-231_residual_rep3	MDA-MB-231 cell line	MDA-MB-231	mammary gland/Breast	replicate 3	51 years adult	Female	one round of Paclitaxel	residual

点击一个样本，然后再点击需要分配到分组，将样本加入分组

GEO2R: Value distribution | Options | Profile graph | R script

Quick start: Specify a GEO Series accession and a Platform if prompted. Click 'Define groups' and enter names for the groups of Samples you plan to compare, e.g., test and control. Assign Samples to each group. Highlight Sample rows then click the group name to assign those Samples to the group. Use the Sample metadata (Title, source and characteristics) columns to help determine which Samples belong to which group. Click 'Top 250' to perform the calculation with default settings. Results are presented as a table of genes ordered by significance. The top 250 genes are presented and may be viewed as profile graphs. Alternatively, the complete results table may be saved. You may change settings in Options tab.

How to use: [Top 250](#) [Save all results](#) 点击这里获取差异基因的分析结果

这里能看到这批数据每个样本的各种信息

得到如下的结果，把他们全选并复制，粘贴到记事本中，保存为 result.txt。

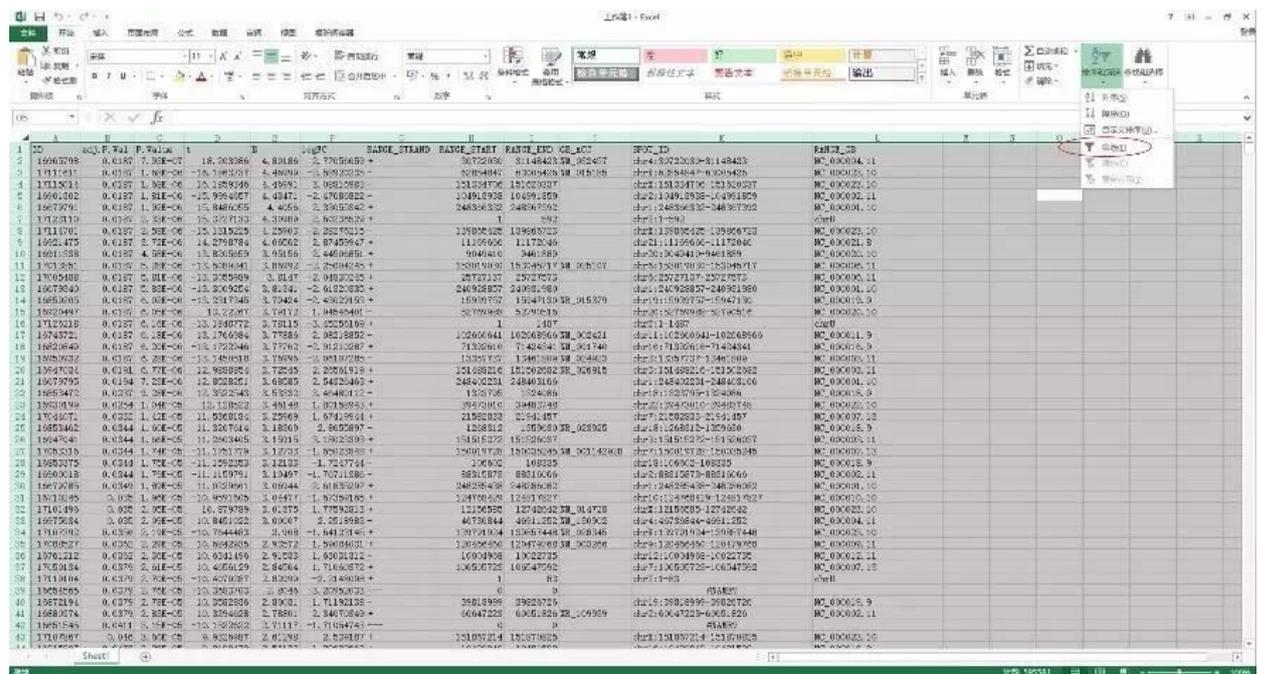
```

"ID" "adj. P. Val" "P. Value" "t" "B" "logFC" "RANGE_STRAND" "RANGE_START" "RANGE_END" "GB_AOC" "SPOT_ID" "RANGE_GB"
"16965798" "0.0187" "7.93e-07" "18.203986" "4.80186" "2.77056659" "2.30722030" "31148423" "NM_032457" "chr4:30722030-31148423" "NC_000004.11"
"17111611" "0.0187" "1.68e-06" "16.1863737" "4.46999" "2.5920235" "2.62854847" "63005426" "NM_015185" "chrX:62954847-63005426" "NC_000023.10"
"17115014" "0.0187" "1.68e-06" "16.1863737" "4.46999" "2.5920235" "2.62854847" "63005426" "NM_015185" "chrX:62954847-63005426" "NC_000023.10"
"16901302" "0.0187" "1.81e-06" "15.9994657" "4.43471" "2.4768822" "2.104913938" "104991859" "chr2:104913938-104991859" "NC_000002.11"
"16679791" "0.0187" "1.92e-06" "15.8486055" "4.4056" "2.3305342" "2.248366332" "248367392" "chr1:248366332-248367392" "NC_000001.10"
"17123110" "0.0187" "2.33e-06" "15.3727133" "4.30989" "2.60236529" "2.1" "592" "chrU:1-592" "chrU:1-592" "NC_000000.10"
"17147101" "0.0187" "2.58e-06" "15.1315225" "4.25930" "2.28276215" "2.139865425" "139866723" "chrX:139865425-139866723" "NC_000023.10"
"16921475" "0.0187" "3.72e-06" "14.798784" "4.06562" "2.87459947" "2.11169666" "11172046" "chr21:11169666-11172046" "NC_000021.8"
"16911338" "0.0187" "4.58e-06" "13.8205659" "3.95156" "2.44506851" "2.9049410" "9461889" "chr20:9049410-9461889" "NC_000020.10"
"17013851" "0.0187" "5.28e-06" "13.5089241" "3.86992" "2.25004245" "2.153019030" "153045717" "NM_025107" "chr6:153019030-153045717" "NC_000006.11"
"17005488" "0.0187" "5.81e-06" "13.3065989" "3.8147" "2.25727137" "2.25727137" "25727573" "chr6:25727137-25727573" "NC_000006.11"
"16979340" "0.0187" "5.83e-06" "13.3009254" "3.81341" "2.61320335" "2.24092857" "24092857" "chr1:24092857-24092857" "NC_000001.10"
"16959205" "0.0187" "6.02e-06" "13.2317345" "3.79424" "2.43028153" "2.15939757" "15947130" "NR_015378" "chr19:15939757-15947130" "NC_000019.9"
"16920497" "0.0187" "6.05e-06" "13.22267" "3.79172" "2.194546401" "2.52769988" "52769988" "chr20:52769988-52769988" "NC_000020.10"
"17126218" "0.0187" "6.16e-06" "13.1848772" "3.78115" "3.45256169" "2.1" "1487" "chrU:1-1487" "chrU:1-1487" "NC_000000.10"
"16743721" "0.0187" "6.18e-06" "13.1766984" "3.77886" "2.08218852" "2.10266041" "102668966" "NM_002421" "chr11:10266041-102668966" "NC_000011.9"
"16820849" "0.0187" "6.20e-06" "13.1722946" "3.77762" "2.91210287" "2.71382616" "71424341" "NM_001740" "chr16:71382616-71424341" "NC_000016.9"
"16950932" "0.0187" "6.28e-06" "13.1450518" "3.76996" "2.206107285" "2.13367737" "13461809" "NM_024923" "chr3:13367737-13461809" "NC_000003.11"
"16947034" "0.0191" "6.77e-06" "12.9888854" "3.72545" "2.26561919" "2.151488216" "151502682" "NR_028915" "chr3:151488216-151502682" "NC_000003.11"
"16679795" "0.0194" "7.23e-06" "12.8528251" "3.68585" "2.54326463" "2.248402231" "248403166" "chr1:248402231-248403166" "NC_000001.10"
"16853472" "0.0237" "9.28e-06" "12.3522543" "3.53322" "2.36480112" "2.1323795" "1324086" "chr18:1323795-1324086" "NC_000018.9"
"16930199" "0.0254" "1.04e-05" "12.128522" "3.46148" "2.18015943" "2.39473010" "39483748" "chr22:39473010-39483748" "NC_000022.10"
"17044071" "0.0332" "1.42e-05" "11.5368184" "3.25969" "2.167419944" "2.21582833" "21941457" "chr7:21582833-21941457" "NC_000007.13"
"16853462" "0.0344" "1.60e-05" "11.3267614" "3.18369" "2.8656977" "2.1268312" "1359630" "NR_023925" "chr18:1268312-1359630" "NC_000018.9"
"16947041" "0.0344" "1.60e-05" "11.2603405" "3.15916" "3.18023393" "2.151515272" "151526037" "chr3:151515272-151526037" "NC_000003.11"
"17053316" "0.0344" "1.74e-05" "11.1751779" "3.12733" "2.165023848" "2.150019728" "150035245" "NM_001142928" "chr7:150019728-150035245" "NC_000007.13"
"16853375" "0.0344" "1.75e-05" "11.1592353" "3.12133" "2.17247744" "2.106602" "108335" "chr18:106602-108335" "NC_000018.9"

```

接着我们将 result.txt 导入到 EXCEL 中(数据->自文本, 选择 results.txt 按默认设置导入即可)。

待数据导入完成，我们全选数据表，点击 EXCEL 的筛选功能，准备对数据进行筛选。



下一步，我们需要对差异表达基因的数据进行进一步的筛选。在这里，我们将 p -value (p 值，象征着差异的显著性) 和 $\log_{2}FC$ (\log_{2} 处理过的 fold change 值，象征着差异的倍数) 设定为： p -value <0.01 , $\log_{2}FC<-2$ or $\log_{2}FC>2$ 。即差异表达非常显著，并且差异表达在 4 倍或-4 倍以上。具体做法参见下图。

筛选 p -value:

The image shows an Excel spreadsheet with columns A through L. The data includes columns for ID, adj. P. Val., P. Value, logFC, RANGE_STRANI, RANGE_STAR, RANGE_EN, GB_ACC, SPOT_ID, and RANGE_GB. A '自定义筛选方式' (Custom Filter) dialog box is open, showing a list of filter options. A '显示行:' (Show rows:) dialog box is also open, showing a filter rule: '大于 2' (Greater than 2).

筛选 logFC:

The image shows the same Excel spreadsheet, but with a different '显示行:' (Show rows:) dialog box open. The filter rule is now '大于 2' (Greater than 2) for logFC. The spreadsheet shows the resulting 46 filtered rows.

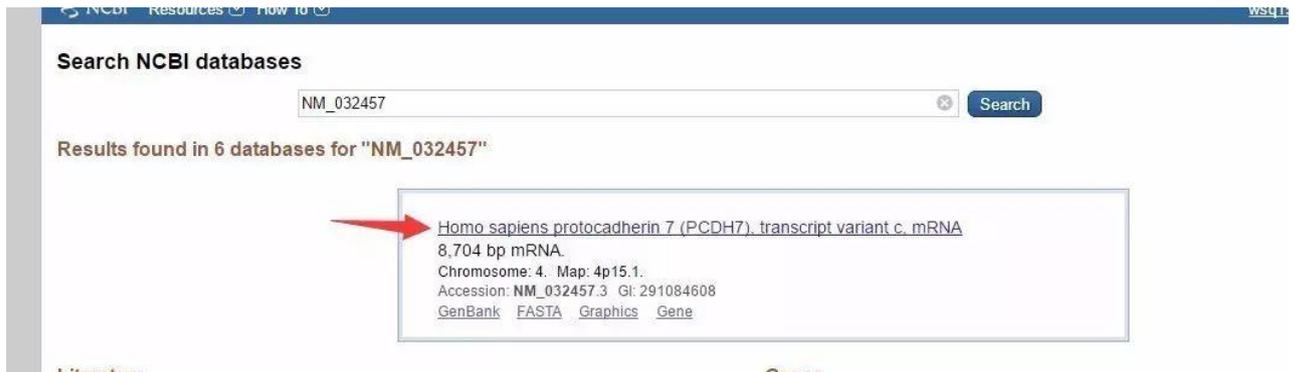
最后我们可以在 EXCEL 左下角的状态栏看到，一共筛选出来 46 个条目。

在 53617 条记录中找到 46 个

让我们回过头来看筛选完的数据表 GB_ACC 这列可以看到很多类似 NM_开头的序号，这些序号可以在 NCBI 上直接查询到对应的基因是什么，可以认为是该基因的身份证。

ID	adj.P.Val	P.Value	B	logFC	RANGE_STRAND	RANGE_START	RANGE_END	GB_ACC	POT_ID	RANGE_GB
16905798	0.0187	7.93E-07	18.203980	4.80186	2.77056659 +	30722030	3114842	NM_032457	hr4:30722030-31148423	NC_000004.11
17111611	0.0187	1.68E-06	-16.1863737	4.46999	-2.58920235 -	62854847	6300542	NM_015185	hrX:62854847-63005426	NC_000023.10
17115014	0.0187	1.68E-06	16.1859346	4.46991	3.08816983 +	151334706	15162033		hrX:151334706-151620337	NC_000023.10
16901302	0.0187	1.81E-06	-15.9994657	4.43471	-2.47686822 -	104913938	10499185		hr2:104913938-104991859	NC_000002.11
16679791	0.0187	1.92E-06	15.8486055	4.4056	2.33055342 +	248366332	24836739		hr1:248366332-248367392	NC_000001.10
17123110	0.0187	2.33E-06	15.3727133	4.30989	2.60236529 +	1	59		chrU:1-592	chrU
17114701	0.0187	2.58E-06	-15.1315225	4.25903	-2.28276215 -	139865425	13986672		hrX:139865425-139866723	NC_000023.10
16921475	0.0187	3.72E-06	14.2798784	4.06562	2.87459947 +	11169666	11172046		hrZ1:11169666-11172046	NC_000021.8
16911338	0.0187	4.58E-06	13.8205659	3.95156	2.44506851 +	9049410	946189		hrZ0:9049410-9461899	NC_000020.10
17013851	0.0187	5.23E-06	-13.5089241	3.86992	-2.25004245 +	153019030	15304571	NM_025107	hr6:153019030-153045717	NC_000006.11
17005488	0.0187	5.81E-06	-13.3055869	3.81447	-2.04830245 +	25727137	2572757		hr6:25727137-25727573	NC_000006.11
16679340	0.0187	5.83E-06	-13.3009254	3.81341	-2.61320335 +	240928957	24093198		hr1:240928957-240931980	NC_000001.10
16859205	0.0187	6.02E-06	-13.2317345	3.79424	-3.45029153 +	15939757	1594713	NR_015379	hr19:15939757-15947130	NC_000019.9
17126218	0.0187	6.16E-06	-13.1848772	3.78115	-3.45256169 +	1	148		hrU:1-1487	chrU
16743721	0.0187	6.18E-06	13.1766984	3.77886	2.08218852 -	102660041	10266890	NM_002421	hr11:102660041-102668906	NC_000011.9
16820849	0.0187	6.20E-06	-13.1722946	3.77762	-2.91210287 +	71392616	7142434	NM_001740	hr16:71392616-71424341	NC_000016.9
16950932	0.0187	6.28E-06	-13.1450518	3.76996	-2.06107285 -	13357737	1346180	NM_024923	hr3:13357737-13461809	NC_000003.11
16947034	0.0191	6.77E-06	12.9888854	3.72545	2.28561919 +	151488216	15150268	NR_026915	hr3:151488216-151502682	NC_000003.11
16679795	0.0194	7.23E-06	12.8528251	3.68585	2.54326463 +	248402231	24840316		hr1:248402231-248403166	NC_000001.10
16853472	0.0237	9.28E-06	12.3522543	3.53332	3.46480112 -	1323795	132408		hr18:1323795-1324086	NC_000018.9
16853462	0.0344	1.60E-05	11.3267614	3.18369	2.8655897 -	1268312	135963	NR_023925	hr18:1268312-1359630	NC_000018.9
16947041	0.0344	1.66E-05	11.2603405	3.15915	3.18023393 +	151515272	15152603		hr3:151515272-151526037	NC_000003.11
16679785	0.0349	1.89E-05	11.0229661	3.06944	2.61835297 +	248285438	24828608		hr1:248285438-248286082	NC_000001.10
16975634	0.035	2.09E-05	10.8451022	3.00007	2.2518963 -	40736844	4091125	NM_130902	hr4:40736844-40911252	NC_000004.11
17119104	0.0379	2.70E-05	-10.4070287	2.82099	-2.2148098 +	1	8		chrU:1-83	chrU
16854565	0.0379	2.78E-05	-10.3683703	2.8046	-3.20952033 -	0	0		#NAME?	
16890374	0.0379	2.83E-05	10.3294628	2.78901	2.34670349 +	60647223	6065182	XR_109939	hr2:60647223-60651826	NC_000002.11
17107867	0.046	3.60E-05	9.8326987	2.61298	2.539187 +	151867214	15187082		hrX:151867214-151870825	NC_000023.10
17019778	0.0473	4.27E-05	-9.6617423	2.48707	-2.61121732 -	46963107	4701009	NM_153840	hr6:46963107-47010099	NC_000006.11
16782939	0.0606	8.04E-05	8.7075234	1.99816	2.14582332 +	27305934	2793081		hr14:27305934-27930810	NC_000014.8
16885819	0.0617	8.66E-05	8.6023168	1.93954	2.02239353 +	132715850	13272310		hr2:132715850-132723108	NC_000002.11
17083911	0.0653	1.00E-04	8.3974473	1.82225	2.15337138 +	2029508	2029508		hr9:2029508-20295086	NC_000009.11
16947045	0.0777	1.38E-04	7.9634299	1.56129	2.36860098 +	151531825	15154627	NR_001086	hr3:151531825-151546276	NC_000003.11
16651297	0.0961	2.29E-04	7.3104105	1.13148	2.06138453 -	0	0		#NAME?	
16812929	0.0977	2.39E-04	7.2573473	1.09447	2.02090878 -	87965967	8797394		hr15:87965967-87973948	NC_000015.9
16943789	0.1062	2.83E-04	7.0475019	0.94487	2.14081933 +	111011566	11138459	NR_198196	hr3:111011566-111384597	NC_000003.11
16865341	0.1136	3.18E-04	6.9105483	0.84438	2.28774378 +	55009100	5502190	NR_002288	hr19:55009100-55021900	NC_000019.9
16782949	0.1266	4.17E-04	6.5921123	0.60163	2.16082643 +	27342317	2738394		hr14:27342317-27383949	NC_000014.8
16771555	0.1926	1.19E-03	5.4757025	-0.35942	2.77323088 -	0	0		#NAME?	
16679789	0.2185	1.66E-03	5.144837	-0.68037	2.08145162 -	24834328	24834433		hr1:24834328-248344331	NC_000001.10
16650019	0.2302	1.97E-03	4.9832106	-0.84933	2.37112557 -	0	0		#NAME?	
16995712	0.2318	2.11E-03	-4.9195716	-0.90909	-2.25024563 -	0	0		#NAME?	
16858555	0.2668	4.58E-03	4.103653	-1.20814	6.25184500 -	0	0		#NAME?	

我们尝试一下，将第一个序号放到 NCBI 上搜索：



这就是一个在耐紫杉醇细胞中差异表达的一个基因。到这里，其实已经可以作为一个课题的开头了，但是为了我们高（zhuang）大（da）上（bi）的追求，我们还有很多事情可以做。

给大家带来一个神奇的网站：DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>)

这是一个可以做 GO 分析，KEGG 通路分析，基因功能的批量注释等等非常实用的网站，操作很亲（sha）民（gua）在这里我简单介绍一下用法。

*** Welcome to DAVID 6.8 with updated Knowledgebase ([more info](#)). ***
 *** If you are looking for [DAVID 6.7](#), please visit our [development site](#). ***

Shortcut to DAVID Tools

Functional Annotation
 Gene-annotation enrichment analysis, functional annotation clustering, BioCarta & KEGG pathway mapping, gene-disease association, homologue match, ID translation, literature match and [more](#)

Gene Functional Classification
 Provide a rapid means to reduce large lists of genes into functionally related groups of genes to help unravel the biological content captured by high throughput technologies. [More](#)

Gene ID Conversion
 Convert list of gene ID/accessions to others of your choice with the most comprehensive gene ID mapping repository. The ambiguous accessions in the list can also be determined semi-automatically. [More](#)

Gene Name Batch Viewer
 Display gene names for a given gene list; Search functionally related genes within your list or not in your list; Deep links to enriched detailed information. [More](#)

Recommending: A [paper](#) published in *Nature Protocols* describes step-by-step procedure to use DAVID!

Welcome to DAVID 6.8

2003 - 2017

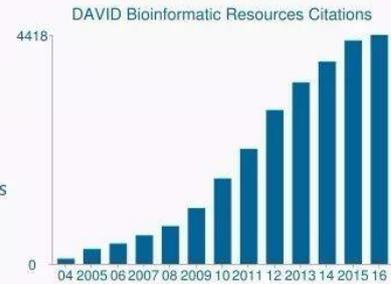
The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8 comprises a full Knowledgebase update to the sixth version of our original web-accessible programs. DAVID now provides a comprehensive set of functional annotation tools for investigators to understand biological meaning behind large list of genes. For any given gene list, DAVID tools are able to:

- Identify enriched biological themes, particularly GO terms
- Discover enriched functional-related gene groups
- Cluster redundant annotation terms
- Visualize genes on BioCarta & KEGG pathway maps
- Display related many-genes-to-many-terms on 2-D view.
- Search for other functionally related genes not in the list
- List interacting proteins
- Explore gene names in batch
- Link gene-disease associations
- Highlight protein functional domains and

What's Important in DAVID?

- [Cite DAVID](#)
- [IDs of Affy Exon and Gene arrays supported](#)
- [Novel Classification Algorithms](#)
- [Pre-built Affymetrix and Illumina backgrounds](#)
- [User's customized gene background](#)
- [Enhanced calculating speed](#)

Statistics of DAVID



- [> 26,000 Citations](#)
- Average Daily Usage: ~2,600 gene lists/sublists from ~800 unique researchers.

<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>

点击 **Functional Annotation** 进入如下页面。把我们刚才筛选出来的数据依下图指示操作，然后点击 **submit list** 提交并分析。

Functional Annotation Tool
DAVID Bioinformatics Resources 6.8, NIAID/NIH

*** Welcome to DAVID 6.8 with updated Knowledgebase ([more info](#)). ***
*** If you are looking for [DAVID 6.7](#), please visit our [development site](#). ***

Functional Annotation Tool

← Submit your gene list to start the tool! [Tell us how you like the tool](#)
[Read technical notes of the tool](#)
[Contact us for questions](#)

Key Concepts:

将数据表中GB_ACC那一列粘贴到这个框里

Term/Gene Co-Occurrence Probability
Ranking functional categories based on co-occurrence with sets of genes in a gene list can rapidly aid in unraveling new biological processes associated with cellular functions and pathways. DAVID 6.8 allows investigators to sort gene categories from dozens of annotation systems. Sorting can be based either the number of genes within each category or by the EASE-score. [More](#)

Gene Similarity Search
Any given gene is associating with a set of annotation terms. If genes share similar set of those terms, they are most likely involved in similar biological mechanisms. The algorithm tries to group those related genes based on the agreement of sharing similar annotation terms by Kappa statistics. [More](#)

选择GENBANK_ACCESSION

Term Similarity Search
Typically, a biological process/term is done by a corporation of a set of genes. If two or more biological processes are done by similar set of genes, the processes might be related in the biological network somehow. This search function is to identify the related biological processes/terms by quantitatively measuring the degree of the agreement how terms share the similar participating genes. [More](#)

Integrated Solutions

Functional Annotation	Numerous public sources of protein and gene annotation have been parsed and integrated into DAVID 6.8. DAVID 6.8 contains information on over 1.5 million genes from more than 65,000 species. A list of protein or gene identifiers can be uploaded all at once to extract and summarize functional annotation associated with group of genes or with each individual gene. Data can be displayed in chart or table format or downloaded to the user's hard drive.
Numerous Data Sources	
Co-occurrence Probability	
Use Homolog Annotation	
Dynamic Pathway Maps	
Disease Associations	

Upload | List | Background

Upload Gene List

[Demolist 1](#) [Demolist 2](#)
[Upload Help](#)

Step 1: Enter Gene List

A: Paste a list

NM_198196
NM_002288

Clear

Or

B: Choose From a File

未选择任何文件

Multi-List File ?

Step 2: Select Identifier

GENBANK_ACCESSION

选择Gene List

Step 3: List Type

Gene List

Background

Step 4: Submit List

稍等片刻即可得到分析结果页面：

Functional Annotation Tool
DAVID Bioinformatics Resources 6.8, NIAID/NIH

Home Start Analysis Shortcut to DAVID Tools Technical Center Downloads & APIs Term of Service Why DAVID? About Us

*** Welcome to DAVID 6.8 with updated Knowledgebase ([more info](#)). ***
*** If you are looking for DAVID 6.7, please visit our [development site](#). ***

Upload List Background

Gene List Manager

Select to limit annotations by one or more species
[Help](#)

- Use All Species -
Homo sapiens(14)
Unknown(1)

Select Species

List Manager [Help](#)

List_1

Select List to:

Use Rename
Remove Combine
Show Gene List

[View Unmapped Ids](#)

Annotation Summary Results [Help and Tool Manual](#)

Current Gene List: List_1 14 DAVID IDs
Current Background: Homo sapiens Check Defaults

Disease (1 selected)
 Functional_Categories (3 selected)
 Gene_Ontology (3 selected)
 General_Annotations (0 selected)
 Literature (0 selected)
 Main_Accessions (0 selected)
 Pathways (2 selected)
 Protein_Domains (3 selected)
 Protein_Interactions (0 selected)
 Tissue_Expression (0 selected)

Red annotation categories denote DAVID defined defaults

Combined View for Selected Annotation

在这个页面里面我们可以看到许多跟我们筛选出来的基因相关的信息，由于篇幅关系，我只挑一个来做示范，其他的大家可以自行学习。

我们点击最下方的 **Functional Annotation Table** 按钮，弹出窗口会出现一个表格（如果没有弹出，请查看你的浏览器是否屏蔽了弹出窗口），里面囊括了大量我们筛选出来的基因的相关信息，具体参见下图：

*** Welcome to DAVID 6.8 with updated Knowledgebase (more info). ***
*** If you are looking for DAVID 6.7, please visit our development site. ***

Functional Annotation Table

Help and Manual

Current Gene List: List_1
Current Background: Homo sapiens
14 DAVID IDs

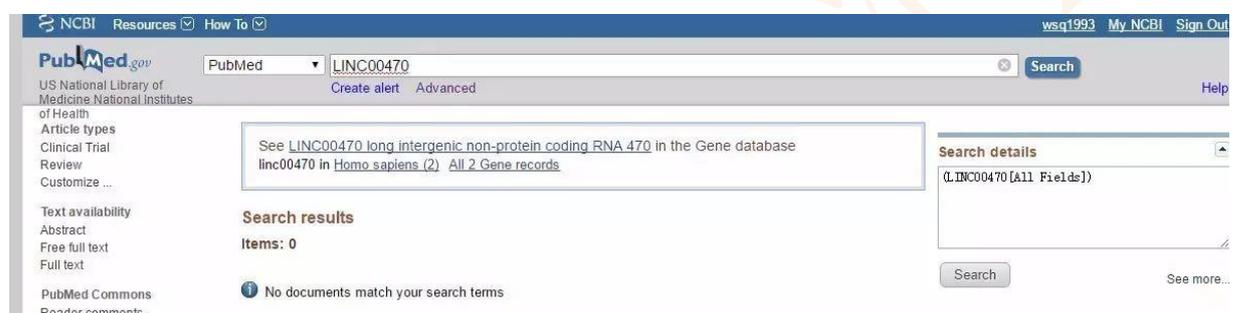
基因名称

DAVID ID	Gene Name	Related Genes	Homo sapiens
12 record(s)			Download File
NM_198196	C10orf106 (C10orf106)		Homo sapiens
COG_ontology	Translation, ribosomal structure and biogenesis.		
GOterm_BP_DIRECT	Cytokine production involved in inflammatory response; negative regulation of natural killer cell cytokine production; immune response; cell adhesion; cell matrix adhesion; response to lipopolysaccharide; negative regulation of interferon-gamma production; regulation of immune response.		
GOterm_CC_DIRECT	Cytosol; plasma membrane; integral component of plasma membrane; adherens junction; integral component of membrane.		
INTERPRO	Immunoglobulin subtype; Immunoglobulin-like domain; Immunoglobulin-B-like fold.		
OMM_DISEASE	C syndrome.		
SMART	IG.		
UP_KEYWORDS	Alternative splicing; Cell adhesion; Chromosomal rearrangement; Contractile proteins; Cytoskeleton; Disease mutation; Disulfide bond; Glycoprotein; Immunoglobulin domain; Membrane; Polymorphism; Proteomics identification; Reference proteome; Repeat; Signal; Transmembrane; Transmembrane-helix.		
UP_SEQ_FEATURE	chain:Trill cell-like protein; basic, compositionally biased region:Pro-rich, compositionally biased region:Pro/Ser/Thr-rich, disulfide bond, domain:Ig-like C2-type, domain:Ig-like V-type 1, domain:Ig-like V-type 2, glycosylation site:N-linked (GNLC...), sequence variant, signal peptide, splice variant, topological domain:Cytoplasmic, topological domain:Extracellular, transmembrane region.		
NM_015185	Cdk-47 guanine nucleotide exchange factor 3 (RAN1HGEP3)		Homo sapiens
GOterm_BP_DIRECT	Ion transmembrane transport; regulation of Rho protein signal transduction; positive regulation of meiotic process; positive regulation of GTPase activity; regulation of small GTPase mediated signal transduction.		
GOterm_CC_DIRECT	Cytosol; cytosol.		
GOterm_M_DIRECT	guanine nucleotide exchange factor activity; Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity.		
INTERPRO	Rho homology (RH) domain; Sec homolog-3 domain; Pleckstrin homology domain; Pleckstrin homology-like domain; Spectrin alpha chain SH3 domain.		
OMM_DISEASE	Epileptic encephalopathy, early infantile, 6.		
SMART	PHI; RHOGEP; SH3.		
UP_KEYWORDS	3D-structure; Alternative splicing; Complete proteome; Cytosol; Disease mutation; Epilepsy; Guanine-nucleotide releasing factor; Phosphatase; Proteomics identification; Reference proteome; SH3 domain.		
UP_SEQ_FEATURE	chain:Rho guanine nucleotide exchange factor 9, domain:DH, domain:PH, domain:SH3, helix, region of interest:Interaction with GHRH, sequence variant, strand.		
NM_153808	Human T-type calcium channel receptor 1 (HTRCR1)		Homo sapiens
GOterm_BP_DIRECT	cell surface receptor signaling pathway; G-protein coupled receptor signaling pathway.		
GOterm_CC_DIRECT	extracellular region; plasma membrane; integral component of membrane.		
GOterm_M_DIRECT	G-protein coupled receptor activity.		
INTERPRO	SEA domain; GPCR family 2, secretin-like; GPCR family 2, secretin-like; GPCR family 2, secretin-like; GPCR family 2-like.		
SMART	SEA.		
UP_KEYWORDS	Alternative splicing; Cell membrane; Complete proteome; G-protein coupled receptor; Glycoprotein; Membrane; Polymorphism; Proteomics identification; Receptor; Reference proteome; Secreted; Signal; Transducer; Transmembrane; Transmembrane-helix.		
UP_SEQ_FEATURE	chain:probable G-protein coupled receptor 110, domain:GPCR, domain:SEA, glycosylation site:N-linked (GNLC...), sequence conflict, sequence variant, signal peptide, topological domain:Cytoplasmic, topological domain:Extracellular, transmembrane region.		
NM_001886	arylcatamids deacetylase (AADAC)		Homo sapiens
COG_ontology	Lipid metabolism.		
GOterm_BP_DIRECT	anabolic metabolic process; metabolic process; positive regulation of trivalent catabolic process.		
GOterm_CC_DIRECT	endoplasmic reticulum membrane; integral component of membrane; plasma membrane.		
GOterm_M_DIRECT	catalytic activity; triglyceride lipase activity; lipase activity; hydrolase activity; serine hydrolase activity; deacetylase activity; alpha-beta hydrolase fold-3; Arylcatalamid deacetylase.		
INTERPRO			
PRK_SUPERFAMILY	arylcatalamid deacetylase.		
UP_KEYWORDS	Complete proteome; Direct protein sequencing; Disulfide bond; Endoplasmic reticulum; Glycoprotein; Hydrolase; Membrane; Polymorphism; Proteomics identification; Reference proteome; Signal anchor; Transmembrane; Transmembrane-helix.		
UP_SEQ_FEATURE	chain:arylcatamids deacetylase, disulfide bond, glycosylation site:N-linked (GNLC...), sequence conflict, sequence variant, topological domain:Cytoplasmic, topological domain:Luminal, transmembrane region.		
NM_007740	calbindin 28k (CALB2)		Homo sapiens
GOterm_BP_DIRECT	regulation of cytosolic calcium ion concentration.		
GOterm_CC_DIRECT	nucleus; cytoplasm; cytosol; non-binding; neuron; vesicle; terminal bouton; synapse.		
GOterm_M_DIRECT	calcium ion binding.		
INTERPRO	Ef-hand domain; Ef-hand-like domain; Ef-hand 1, calcium-binding site.		
SMART	EFB.		
UP_KEYWORDS	Calcium; Complete proteome; Metal-binding; Phosphoprotein; Proteomics identification; Reference proteome; Repeat; calcium-binding region:1, calcium-binding region:2, possibly ancestral calcium-binding region:3, calcium-binding region:4, calcium-binding region:5, calcium-binding region:6, possibly ancestral, chain:Calbindin, domain:EF-hand 1, domain:EF-hand 2, domain:EF-hand 3, domain:EF-hand 4, domain:EF-hand 5, domain:EF-hand 6, sequence conflict.		
NM_139892	cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1)		Homo sapiens
GOterm_BP_DIRECT	hydrogen ion transmembrane transport.		
GOterm_CC_DIRECT	mitochondrion; mitochondrial respiratory chain; integral component of membrane; respiratory chain complex IV.		
GOterm_M_DIRECT	cytochrome c oxidase activity.		
INTERPRO	Cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1); Cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1); Cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1).		
KEGG_PATHWAY	Oxidative phosphorylation; metabolic pathway; Cardiac muscle contraction; Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); Alzheimer's disease; Parkinson's disease; Huntington's disease.		
UP_KEYWORDS	Complete proteome; Membrane; Mitochondrion; Mitochondrion inner membrane; Polymorphism; Reference proteome; Transit peptide; Transmembrane; Transmembrane-helix.		
UP_SEQ_FEATURE	chain:cytochrome c oxidase subunit 1, mitochondrial, sequence variant, topological domain:Mitochondrial intermembrane, topological domain:Mitochondrial matrix, transit peptide:Mitochondrion, transmembrane region.		
NM_002283	hemopoietin (HPO)		Homo sapiens
GOterm_BP_DIRECT	regulation of immune response.		
GOterm_CC_DIRECT	extracellular region.		
GOterm_M_DIRECT	immunoglobulin subtype; Immunoglobulin-like domain; Immunoglobulin-B-like fold.		
INTERPRO	IG.		
SMART	IG.		
UP_KEYWORDS	Alternative splicing; Complete proteome; Disulfide bond; Immunoglobulin domain; Polymorphism; Proteomics identification; Receptor; Reference proteome; Secreted; Signal.		
UP_SEQ_FEATURE	chain:immunoglobulin-associated immunoglobulin-like receptor 2, disulfide bond, domain:Ig-like C2-type, sequence variant, signal peptide, splice variant.		
NM_029925	long interspersed non-protein coding RNA 470 (LINCR470)		Homo sapiens
UP_KEYWORDS	Alternative splicing; Complete proteome; Reference proteome.		
UP_SEQ_FEATURE	chain:intrachain-disulfide bond C10orf106, splice variant.		
NM_007421	matrix metalloproteinase 10 (MMP10)		Homo sapiens
GOterm_BP_DIRECT	proteolysis; viral process; extracellular matrix disassembly; collagen catabolic process; positive regulation of protein catabolism; cellular catabolic metabolic process; metalloste migration.		
GOterm_CC_DIRECT	extracellular region; proteinaceous extracellular matrix; collagen zone; extracellular matrix.		
GOterm_M_DIRECT	endopeptidase activity; metalloproteinase activity; serine-type endopeptidase activity; calcium ion binding; zinc ion binding.		
INTERPRO	Hemopoietin-like domain; Peptidase M10; metalloproteinase; Peptidomimetic binding site; Peptidase metalloproteinase; Peptidase M10; metalloproteinase; conserved site; Hemopoietin-like repeat; Peptidase M10A; catalytic motif; zinc-binding site; Peptidase M10B; Metalloproteinase catalytic domain.		
KEGG_PATHWAY	ECM-receptor pathway; Pathway in cancer; Bacterial cancer; Rheumatoid arthritis.		
OMM_DISEASE	Epidemiology bulosa dystrophia; autosomal recessive; modifier of; CUGO; rate of decline of lung function in.		
PRK_SUPERFAMILY	matrix metalloproteinase; stromelysin type.		
SMART	HS; ZNFS.		
UP_KEYWORDS	3D-structure; Autocatalytic cleavage; Calcium; Collagen; Collagen degradation; Complete proteome; Direct protein sequencing; Disulfide bond; Extracellular matrix; Glycoprotein; Histone interaction; Inhibitors; Metal-binding; Metalloproteinase; Phosphoprotein; Polymorphism; Protease; Reference proteome; Repeat; Secreted; Signal; Zinc; Zinc ion.		
UP_SEQ_FEATURE	chain:27 kDa interstitial collagenase, chain:77 kDa interstitial collagenase, chain:interstitial collagenase, disulfide bond, domain:Hemopoietin-like 1, domain:Hemopoietin-like 2, domain:Hemopoietin-like 3, domain:Hemopoietin-like 4, glycosylation site:N-linked (GNLC...), helix, metal ion-binding site:Calcium 1, metal ion-binding site:Calcium 2, metal ion-binding site:Calcium 3, via carbonyl oxygen, metal ion-binding site:Calcium 4, metal ion-binding site:Calcium 5, metal ion-binding site:Calcium 6, via carbonyl oxygen, metal ion-binding site:Calcium 7, via carbonyl oxygen, metal ion-binding site:Calcium 8, metal ion-binding site:Zinc 1, metal ion-binding site:Zinc 2, catalytic, metal ion-binding site:Zinc 3, in inhibited form, propeptide:inhibitor peptide; region of interest:metalproteinase sequence conflict, sequence variant, short sequence motif:cysteine switch, signal peptide, site:cleavage; by auto-his strand, turn.		
NM_025187	myc target 1 (MYC1)		Homo sapiens
GOterm_CC_DIRECT	nucleus; integral component of membrane.		
UP_KEYWORDS	Complete proteome; Membrane; Nuclear; Phosphoprotein; Polymorphism; Proteomics identification; Reference proteome; Transmembrane; Transmembrane-helix.		
UP_SEQ_FEATURE	chain:MYC target protein 1, modified residue, sequence conflict, sequence variant, short sequence motif:Spargite nuclear localization signal.		
NM_024893	nucleosoma 210 (NP210)		Homo sapiens
BIOCARTA	Mechanism of protein import into the nucleus.		
GOterm_BP_DIRECT	cellular export from nucleus; RNA export from nucleus; ribotic nuclear envelope disassembly; regulation of glucose transport; protein transport; viral process; access; amphotropism; viral transduction; virus absorption by DNA; intracellular transport of virus; regulation of cellular response to heat.		
GOterm_CC_DIRECT	nuclear envelope; nuclear pore; endoplasmic reticulum membrane; membrane; integral component of membrane; nuclear membrane.		
GOterm_M_DIRECT	protein dimerization activity.		
INTERPRO	Bacterial Ig-like group 2; Trovatin/tiratin cell adhesion.		
KEGG_PATHWAY	RNA transport.		
SMART	NP2.		
UP_KEYWORDS	Alternative splicing; Complete proteome; Endoplasmic reticulum; Glycoprotein; Membrane; mRNA transport; Nuclear pore complex; Nucleus; Phosphoprotein; Polymorphism; Protein transport; Reference proteome; Signal; Translocation; Transmembrane; Transmembrane-helix; Transport.		
UP_SEQ_FEATURE	chain:nuclear pore membrane glycoprotein 210, compositionally biased region:Poly-Ser; glycosylation site:N-linked (GNLC...), modified residue, sequence conflict, sequence variant, signal peptide, splice variant, topological domain:Cytoplasmic, topological domain:Luminal, transmembrane region.		
NM_037467	platelet alpha granule protein 1 (ALP1)		Homo sapiens
GOterm_BP_DIRECT	platelet degranulation; hemophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules.		
GOterm_CC_DIRECT	plasma membrane; integral component of plasma membrane; integral component of membrane; platelet alpha granule membrane.		
GOterm_M_DIRECT	calcium ion binding.		
INTERPRO	Cadherin; Cadherin, N-terminal; Protocadherin; Cadherin-like; Cadherin conserved site.		
SMART	Ca.		
UP_KEYWORDS	3D-structure; Alternative splicing; Calcium; Cell adhesion; Cell membrane; Complete proteome; Glycoprotein; Membrane; Phosphoprotein; Proteomics identification; Reference proteome; Repeat; Signal; Transmembrane; Transmembrane-helix.		
UP_SEQ_FEATURE	chain:Protocadherin 7, domain:Protocadherin 7, domain:Protocadherin 2, domain:Protocadherin 3, domain:Protocadherin 4, domain:Protocadherin 5, domain:Protocadherin 6, domain:Protocadherin 7, glycosylation site:N-linked (GNLC...), helix, modified residue, sequence conflict, signal peptide, splice variant, strand, topological domain:Cytoplasmic, topological domain:Extracellular, transmembrane region, turn.		

该基因参与的生物过程、相关的疾病等信息

最近几年长链非编码 RNA (LncRNAs) 研究很火热，正好结果里面有一个 long intergenic non-protein coding RNA 470(LINC00470)，我们就把他抓住，看看有没有可以挖的课题。

我们将 LINC00470 放到 PUBMED 上进行搜索，发现没有相关的文章！



那么下面怎么做，大家懂得，赶紧给老板写开题报告吧，嘿嘿嘿。

谁要想做的留个言，别闷声发大财哦！发了 SCI，记得请我吃鸡腿啊。

干货 | 师兄，我想用 MEGA 建个树，咋整？

作者：冬至

师妹：师兄，我想建个树。

师兄：啥树啊！你家的 family tree 啊？

师妹：师兄，你不要调戏我，我就建一个简单的进化树！这个怎么做啊？

简单呀，你可以用 MEGA，先去 MEGA 官网 (<http://www.megasoftware.net/>) 下载这个软件，免费的啊。MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 是一个功能非常强大的分子进化遗传分析软件，可用于序列比对、进化树的推断、估计分子进化速度、验证进化假说等。下面师兄给你详细介绍如何利用 Mega 软件构建进化树。

1. 首先将需要进行建树的序列保存为 fasta 格式，并将文件扩展名改为.fasta。

.fasta 序列格式以">"开头。">"后面这一行写名称，回车，下一行写序列，氨基酸序列类似，所有序列保存在一个 txt 文件中。例如：

```
>gene1/speciesname NCBI accession number
```

```
ATCGGCGTAGCTAGATGCTAGTATCGTA
```

```
>gene1/speciesname NCBI accession number
```

```
AGTAGCTAGTGATGTA
```

2. 点击 Align—Edit / built Alignment，选择创建一个新的比对，点 OK

根据要求选择 DNA 或者蛋白质序列

M6: ClustalW Parameters

Protein

Pairwise Alignment

Gap Opening Penalty	10
Gap Extension Penalty	0.1

Multiple Alignment

Gap Opening Penalty	10
Gap Extension Penalty	0.2

Protein Weight Matrix: Gonnet

Residue-specific Penalties: ON

Hydrophilic Penalties: ON

Gap Separation Distance: 4

End Gap Separation: OFF

Use Negative Matrix: OFF

Delay Divergent Cutoff (%): 30

Keep Predefined Gaps

Specify Guide Tree:

Help OK Cancel



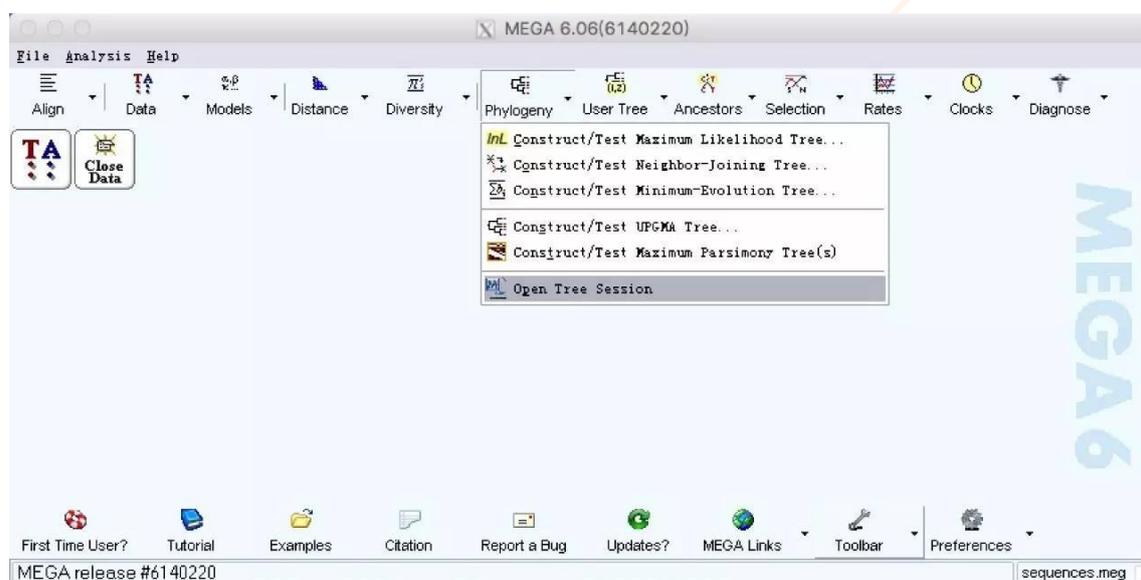
两端对齐之后

6. 然后点 Data—Export Alignment—MEGA format，选择一个地方保存，输入 Title，关闭多序列比对窗口，点击 NO。

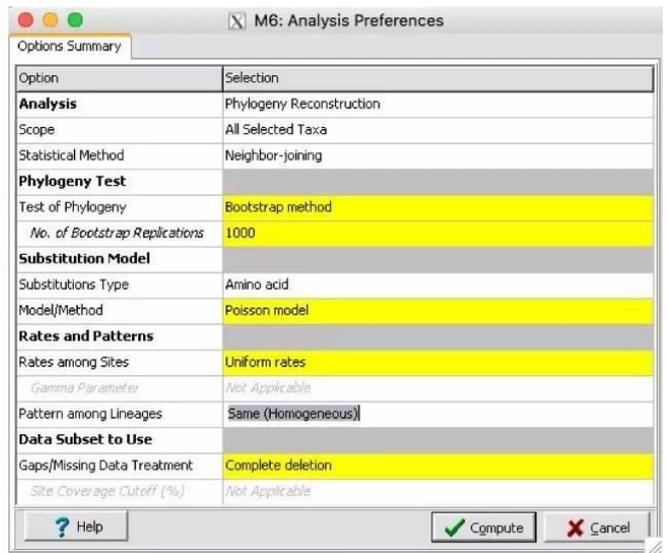
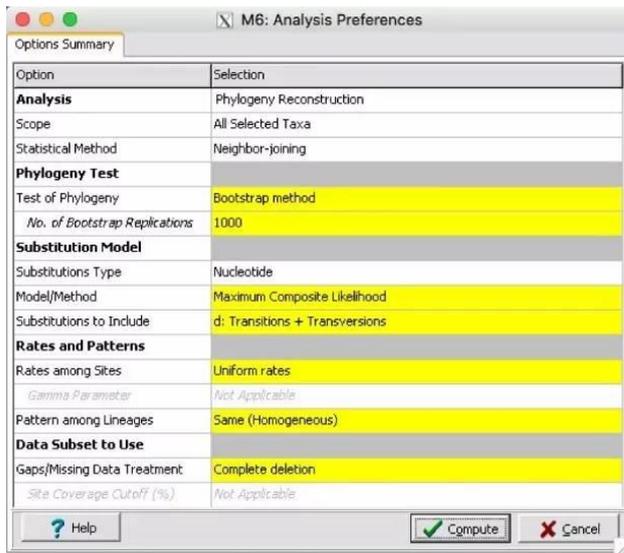
7. 点击 File，打开刚才保存的.Meg 文件



8. 点击 Phylogeny, 有 5 个构建进化树的方法, 一般选择 MaximumLikelihood (最大似然法)Neighbor-Joining(邻接法)和 Minimum-Evolution(最小进化法)方法, UPGMA 和 Maximum Parsimony 不常用, 点 YES, 运用当前数据。

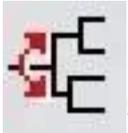
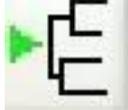


9. 在 Test of Phylogeny 选择 Bootstrapmethod; No.of Bootstrap replications 输入 1000; Mode/Method 核酸选择 Maximum Composite Likelihood, 氨基酸序列选择 Poisson model; Rates among sites 选择 Uniform rates; Gaps/Missing Data Treatment 选择 Complete deletion. 点击 Compute.(一般来说, 如果选择同一基因序列长度较一致, 物种间情缘关系较近, 每种模型构建的进化树差别不会很大。)

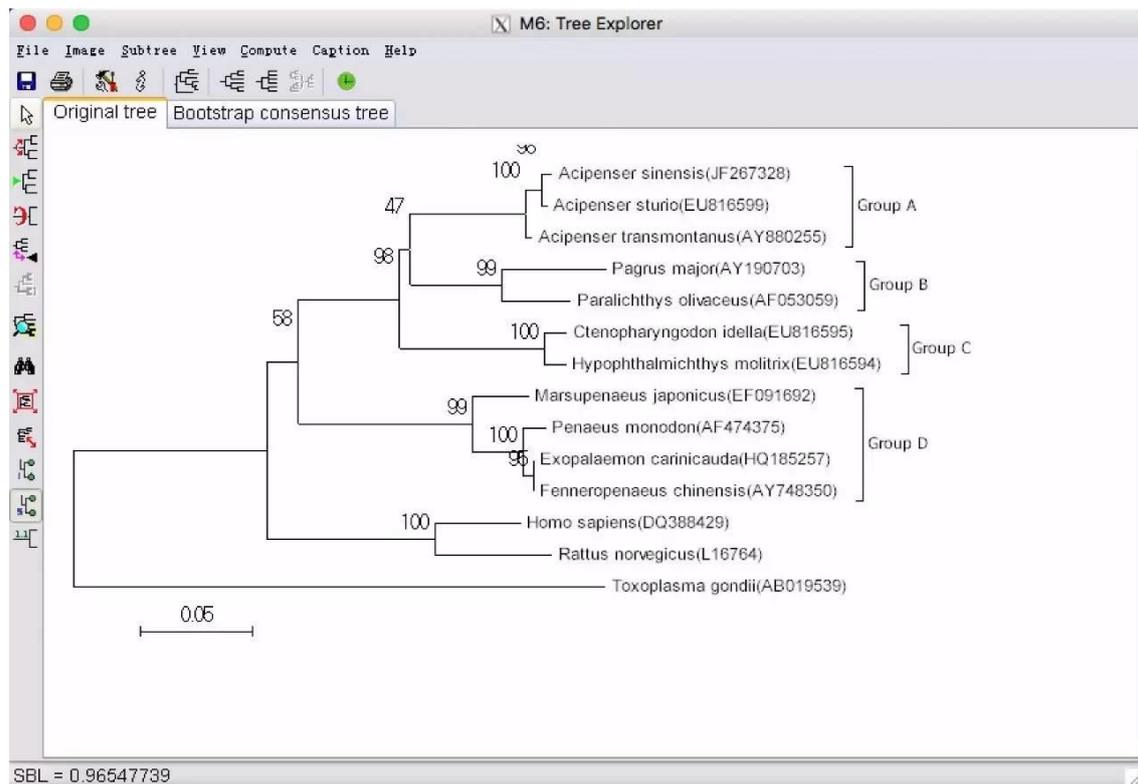


10. 选择在 original tree 中显示进化树，数字代表 bootstrap 值，一般 bootstrap 值>70 以上

的树具有可信度。工具栏上的不同按钮可以对树进行修饰，如  可以对不同聚类分

支命名；  可以交换聚类的位置；  选择树根，一般来说选择进化地位比较

远的物种作为树根；  选择树的不同表现形式。



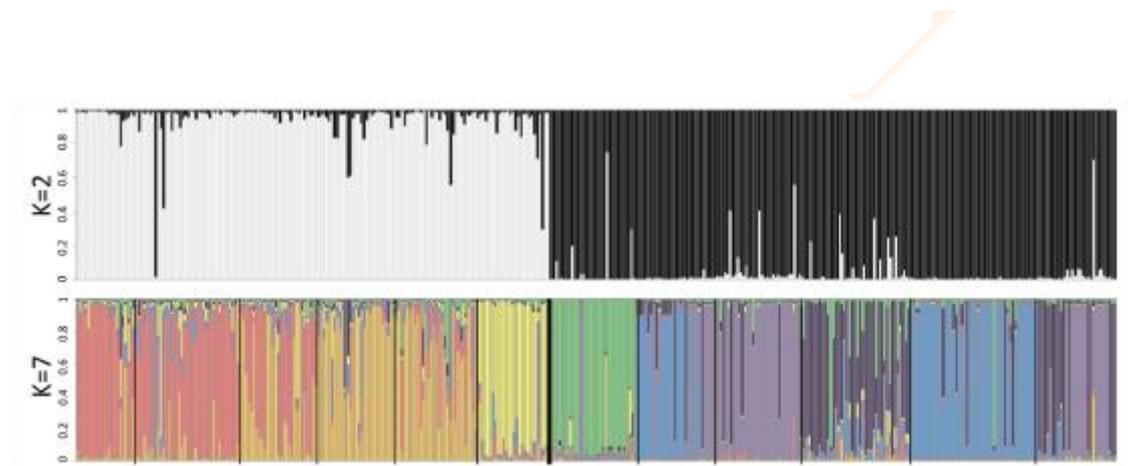
妥妥的 tree 来了，会了么？最后在 Image 下的 Save as 保存,有 3 种不同的图片格式 (.EMF、.PNG 和.PDF)。如果还需要对聚类图用其它软件进行修饰，建议保存为.EMF 格式。

群体结构三剑客—structure 入门

作者：Liufan

Nature Genetics 杂志曾发表了一项基于 **Structure**（被引用接近 20000 次的牛文）开发的一种可以用于扫描大量的遗传数据集新的机器学习算法—TeraStructure，引起了不少学者的关注。该工具可以用于推断个人祖先的遗传组成，识别疾病相关的遗传突变。那么 Structure 又是何物呢？

Structure 是由斯坦福大学 Pritchard 实验室开发的一款群体结构分析软件，通过该软件，我们直观了解个体间的分类关系—即将某个群体分为若干亚群、群体间是否存在基因交流以及每个个体混血程度是多少。



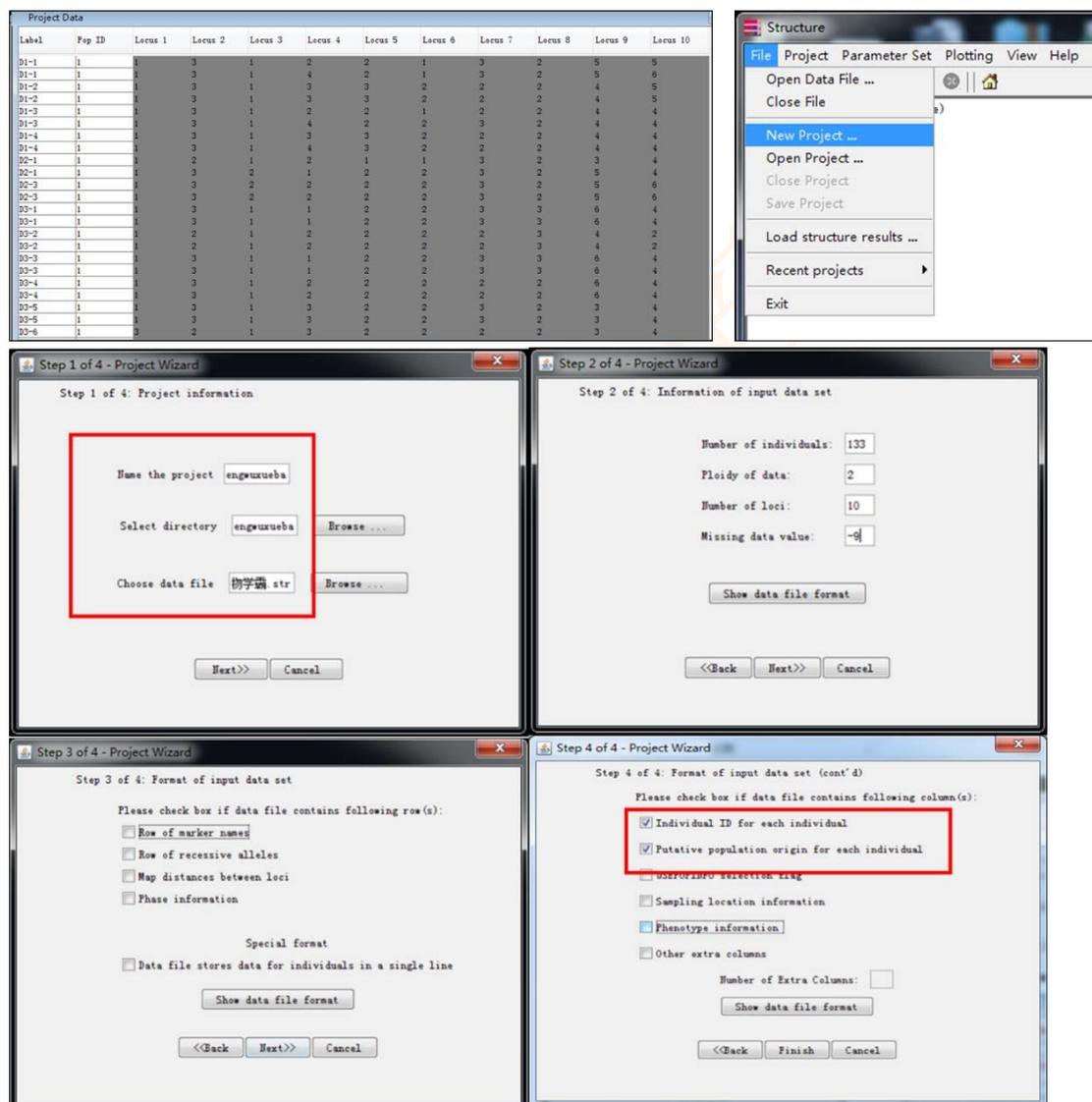
*图片引自 Ryck 等

Structure 中群体的亚群数被称为 K 值。上图中分别列出了 K=2 和 7 时的结果。图中每一种颜色代表一个类群，每个个体代表图中的一个柱状堆叠图，那么我们可以看出有些个体血统较为纯正，有些则出现了混杂。通过颜色我们便可以对种群中的个体进行不同亚群的划分。

话不多说，接下来奉上软件安装包及教程，最新版本为 v2.3.4，安装包可以向后台索要或自行下载，下载地址为：<http://pritchardlab.stanford.edu/structure.html>。

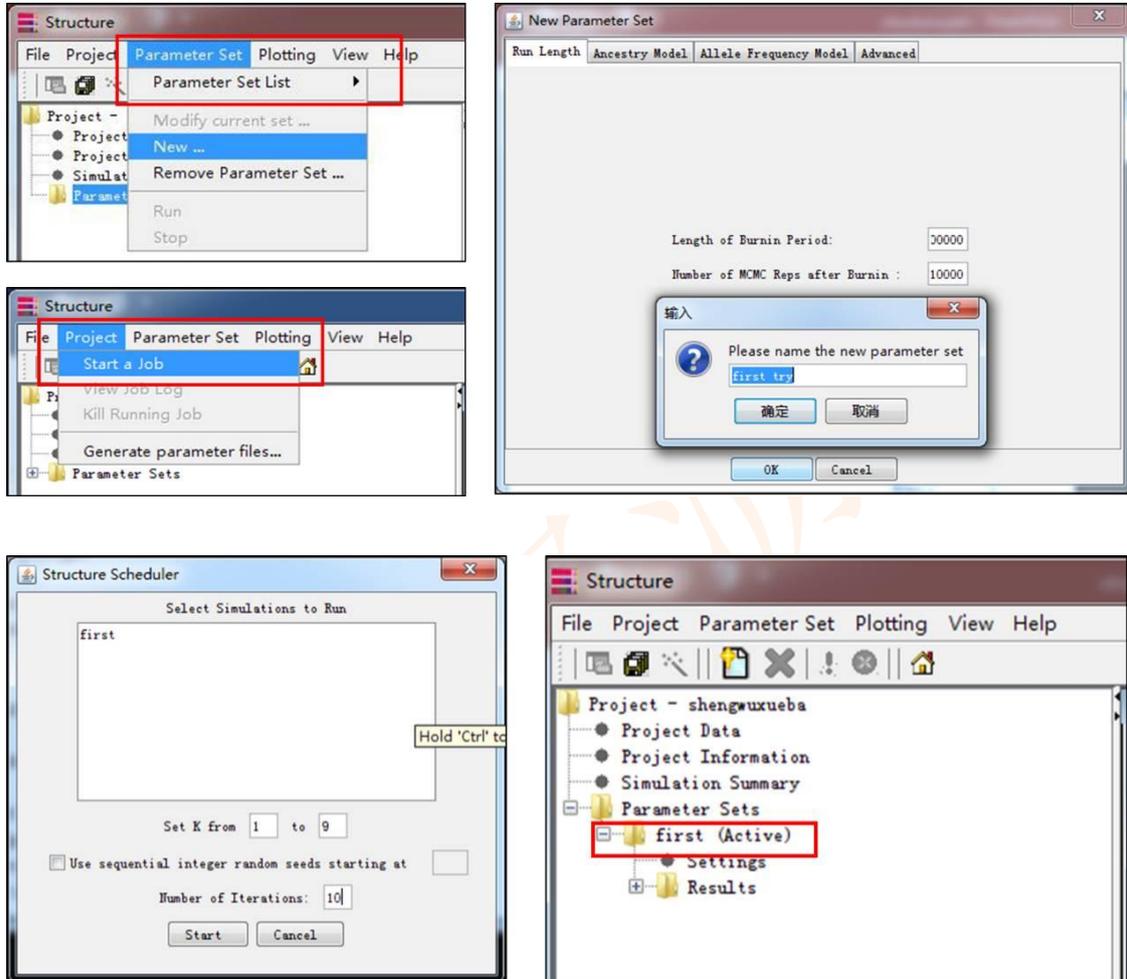
这里笔者会给出一个示例数据，万事俱备，打开软件，点击建立“new project”，输入项目的

信息（注意这里数据文件要和 `select directory` 在一个文件夹中），点击输入个体信息、位点信息、缺失值等信息，完成数据读入。如果数据无误那么软件会显示输入的数据，有误则会报错。



数据导入完毕后就可以设置参数了，点击 `parameter` 下的 `new` 进行参数设置，`length of burn-in period` 需要设置较大的数，这里设置为 100000，保存为 `first try`。接下来我们需要点击

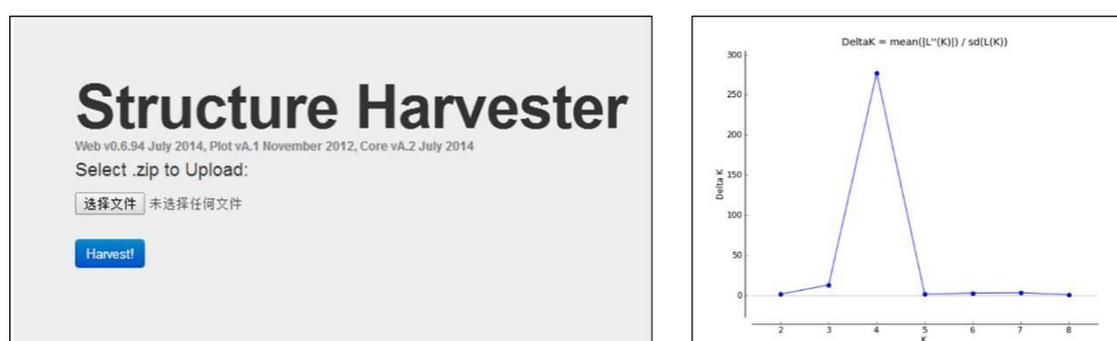
project 下的 start a job 开始任务。



这里设置 K 为 1~9，重复次数为 10 次，可以看到点击 start job 后，project 处于激活状态，软件此时已经开始运行。

运行完毕后，会得到一个 result 文件夹，里面包含有 90 次运行的结果，那么由于之前 K 取

了 1~9，哪一个 K 值是最佳的呢，这里采用 Evanno 等人的方法进行分析计算。在线分析的网址为 http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/。将 result 文件夹压缩上传即可一键分析。从而得出最佳的 K 值，最后将结果文件下载保存即可。



但上述分析给出的只是最佳的亚群数与一些矩阵数据——即每个样本的血统构成比例。要把上述数据变成漂亮的堆叠图形的话，还有绘图的步骤。这里需要再处理软件 CLUMPP 处理得到进一步的结果再进行绘图。绘图中最简单的画法便是使用 excel 将这个结果绘制为堆叠图，或者也可以使用其他专门的图形化软件，如 Distruct，这里便不一一介绍，只给出 Clumpp 与 Distruct 的下载地址及软件安装包。

Clumpp 下载地址为：<http://rosenberglab.stanford.edu/clumpp.html>。

Distruct 下载地址为：<http://web.stanford.edu/group/rosenberglab/distructDownload.html>。

参考文献：

[1]Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of

population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.

[2]Gopalan, P., Wei, H., Blei, D. M., & Storey, J. D. (2016). Scaling probabilistic models of genetic variation to millions of humans. *Nature Genetics*.

[3]Ryck, D. J. D., Koedam, N., Stocken, T. V. D., Ven, R. M. V. D., Adams, J., & Triest, L. (2016). Dispersal limitation of the mangrove *avicennia marina* at its south african range limit in strong contrast to connectivity in its core east african region. *Marine Ecology Progress*, 545, 123-134.

[4]Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study[J]. *Molecular ecology*, 2005, 14(8): 2611-2620.

ceRNA 研究从何起？3 种精确度预测 lncRNA 和 miRNA 结合

作者：Dr. 饕餮

越来越多的组织或者疾病特异性表达的 lncRNA 被证明通过 ceRNA 的作用发挥功能，成为研

究热点。功能强大的 ceRNA 也可以发表很好的文章，例如这篇中国学者今年八月发表在 nature communication 的文章：



Article | [OPEN](#)

Non-coding RNAs participate in the regulatory network of CLDN4 via ceRNA mediated miRNA evasion

Yong-xi Song, Jing-xu Sun, Jun-hua Zhao, Yu-chong Yang, Jin-xin Shi, Zhong-hua Wu, Xiao-wan Chen, Peng Gao, Zhi-feng Miao & Zhen-ning Wang 

研究 ceRNA 的第一步是寻找目的 lncRNA 可能结合的 miRNA，今天，我们就介绍两个在线网站，使用它们，可以分别从三个层面（预测；实验辅助预测；实验证明，精确度逐步上升）搜索感兴趣的 lncRNA 可能结合的 miRNA，助大家开启 ceRNA 研究的第一步。

以最早发现功能的 lncRNA HOTAIR 为例，带大家看看怎么寻找与 lncRNA 结合的 miRNA。

预测

预测使用的是 DIANA 数据库下的在线网站，链接如下：

http://carolina.imis.athenainnovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=lnabasev2%2Findex-predicted

数据库原文发表在 Nucl. Acids Res 上

Maria D. Paraskevopoulou, Ioannis S. Vlachos, Dimitra Karagkouni, Georgios Georgakilas, Ilias Kanellos, Thanasis Vergoulis, Konstantinos Zagganas, Panayiotis Tsanakas, Evangelos Floros, Theodore Dalamagas, and Artemis G. Hatzigeorgiou "DIANA-LncBase v2: indexing microRNA targets on non-coding transcripts" Nucl. Acids Res. (2016) gkv1270

进入网站后出现以下界面（以下图片点击可看大图）：

LncBase Predicted v.2

Please cite:
 Maria D. Paraskevopoulou, Ioannis S. Vlachos, Dimitra Karagkouni, Georgios Georgakilas, Ilias Kanellos, Thanasis Vergoulis, Konstantinos Zagganas, Panayiotis Tsanakas, Evangelos Floros, Theodore Dalamagas, and Artemis G. Hatzigeorgiou "DIANA-LncBase v2: indexing microRNA targets on non-coding transcripts" Nucl. Acids Res. (2016) gkv1270

miRNA

lncRNA

or

Search by location

Go to Experimental module ⇄

Welcome!

Search by inserting in the corresponding search fields:

- » [miRNA names \(miRBase v21\)](#)
e.g., hsa-let-7a-5p
- » [Ensembl IDs \(v77\), Refseq IDs and Cabili IDs](#)
e.g., ENSG00000235954, XLOC_000647
- » [combinations of the previous](#)

Need a quick start?

Run our example

网站分别可以通过 miRNA, lncRNA 和基因座位预测结合位点, 因为我们需要预测 HOTAIR 的结合, 需要在 lncRNA 的框里输入, 由下面可知, 需要把注释格式换成 Ensemble ID, 于是我们登陆 ensemble 的网站 <http://www.ensembl.org> 进行查询:

Only searching Human ▼

HOTAIR

2914 results match HOTAIR when restricted to species: Human ✕

[HOTAIR \(Human Gene\)](#)

ENSG00000228630 12:53962308-53974956:-1

HOX transcript antisense RNA [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:33510]

HOX TRANSCRIPT ANTISENSE RNA, NONCODING; **HOTAIR** [*611400] (MIM gene record; description: HOX TRANSCRIPT ANTISENSE RNA, NONCODING; **HOTAIR**;HOX ANTISENSE INTERGENIC RNA;;LONG INTERGENIC NONCODING RNA **HOTAIR**;;lincRNA **HOTAIR**.) is an external reference matched to Gene ENSG00000228630

[Variant table](#) • [Phenotypes](#) • [Location](#) • [External Refs.](#) • [Regulation](#) • [Orthologues](#) • [Gene tree](#)

得到了带 ENSG 号的 HOTAIRID，返回原来网站，输入 ID:

LncBase Predicted v.2

Please cite:
Maria D. Paraskevopoulou, Ioannis S. Vlachos, Dimitra Karagkouni, Georgios Georgakilas, Ilias Kanellos, Thanasis Vergoulis, Konstantinos Zagganas, Panayiotis Tsanakas, Evangelos Floros, Theodore Dalamagas, and Artemis G. Hatzigeorgiou "DIANA-LncBase v2: indexing microRNA targets on non-coding transcripts" *Nucl. Acids Res.* (2016) gkv1270

miRNA lncRNA or

果然，下方有选择显示，数据库里面有收录，选择后:

Filters ▼

Threshold:

Cell Types:

Tissues:

Category:

« 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 »

Gene	miRNA	Score	DIANA Links
HOTAIR	hsa-miR-6802-3p	1.000	mT TB InE mP
HOTAIR	hsa-miR-302f	0.998	mT TB InE mP
HOTAIR	hsa-miR-4743-3p	0.998	mT TB InE mP
HOTAIR	hsa-miR-5006-3p	0.996	mT TB InE mP
HOTAIR	hsa-miR-3622b-3p	0.994	mT TB InE mP
HOTAIR	hsa-miR-5006-3p	0.994	mT TB InE mP
HOTAIR	hsa-miR-6817-3p	0.994	mT TB InE mP
HOTAIR	hsa-miR-3622a-3p	0.993	mT TB InE mP
HOTAIR	hsa-miR-6511b-5p	0.993	mT TB InE mP
HOTAIR	hsa-miR-6817-3p	0.992	mT TB InE mP
HOTAIR	hsa-miR-326	0.990	mT TB InE mP

出现了按评分排序的 HOTAIR 结合 miRNA，有数百的之多，旁边还可以按照细胞系，组织和癌症等方面细分进行预测。运用这个，我们就可以得到基于序列结合预测的 lncRNA 和 miRNA 结合位点。

实验辅助预测

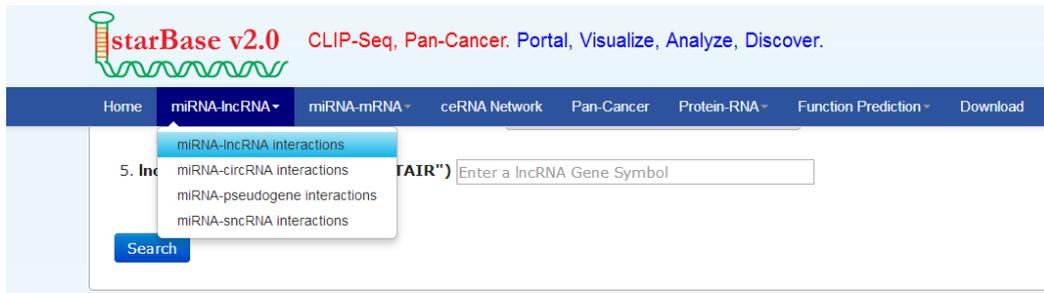
从上面我们看到，预测的 miRNA 太多，怎么样得到更为精确的数据呢？因为 miRNA 的结合需要 AGO 蛋白参与，一个有效的方法是 lncRNA 上和 miRNA 结合的位点也需要 AGO 蛋白的结合，加入了这个后，可以让预测更为准确。

基于这个原理介绍的网站是 starbase2.0，链接如下：

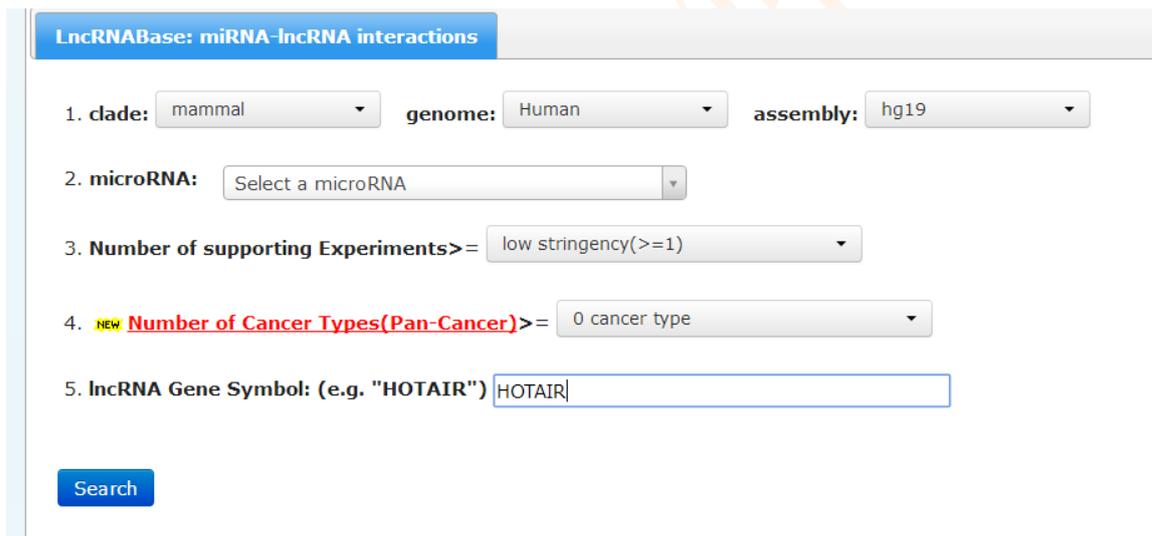
<http://starbase.sysu.edu.cn/mirLncRNA.php>

原文也发表在 Nucl. Acids Res 上。

进入后，我们找到 miRNA-lncRNA interactions 界面



输入 HOTAIR 就可以:



点搜索后, 只剩 30 个可能结合的 miRNA:

name	mirAccession	geneName	targetSites	bioComplex	clipReadNum	CancerNum
hsa-miR-761	MIMAT0010364	HOTAIR	1	1	5	0
hsa-miR-214-3p	MIMAT0000271	HOTAIR	1	1	5	0
hsa-miR-4295	MIMAT0016844	HOTAIR	1	1	5	0
hsa-miR-130a-3p	MIMAT0000425	HOTAIR	1	1	5	1
hsa-miR-326	MIMAT0000756	HOTAIR	1	1	8	3
hsa-miR-613	MIMAT0003281	HOTAIR	1	1	8	0
hsa-miR-148b-3p	MIMAT0000759	HOTAIR	1	3	24	2
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	HOTAIR	1	6	92	2
hsa-miR-19a-3p	MIMAT0000073	HOTAIR	1	1	5	1
hsa-miR-20a-5p	MIMAT0000075	HOTAIR	1	6	92	2
hsa-miR-19b-3p	MIMAT0000074	HOTAIR	1	1	5	1
hsa-miR-152-3p	MIMAT0000438	HOTAIR	1	3	24	0
hsa-miR-454-3p	MIMAT0003885	HOTAIR	1	1	5	0
hsa-miR-301a-3p	MIMAT0000688	HOTAIR	1	1	5	0
hsa-miR-1	MIMAT0000416	HOTAIR	1	1	8	4
hsa-miR-330-5p	MIMAT0004693	HOTAIR	1	1	8	1
hsa-miR-519d-3p	MIMAT0002853	HOTAIR	1	6	92	0
hsa-miR-217	MIMAT0000274	HOTAIR	1	3	31	0
hsa-miR-301b	MIMAT0004958	HOTAIR	1	1	5	0
hsa-miR-130b-3p	MIMAT0000691	HOTAIR	1	1	5	0

查看具体靶向位点:

(1) lncRNA:miRNA	HOTAIR:hsa-miR-761
Target Location	chr12:54356646-54356666[-]
Target Name	HOTAIR
Target Transcripts	HOTAIR-001
ClipSeq peakCluster	HPRT3_6853 (AGO2 PAR-CLIP HEK293)
ClipSeq ReadNum	5
miRNA-target	<pre> miRNA 3'-acACAGTCAAAGTGGGACGACg-5' ncRNA 5'-taTG-CAGTGGGACCCCTGCTGc-3' </pre>
alignScore	0

分别列出了 miRNA 的靶向位点和 AGO 蛋白的结合位点，非常具有可视化。运用这个软件，可以得出比较准确的 lncRNA 结合的 miRNA，当然，需要注意的是，这一步可能会筛去一些可能互作的 miRNA，需要和上一步结合来看。

实验证明

最精确的互作当然是实验证明过的互作啦，这个怎么查询，返回第一个网站

LncBase Predicted v.2

Please cite:
Maria D. Paraskevopoulou, Ioannis S. Vlachos, Dimitra Karagkouni, Georgios Georgakitis, Ilias Kanellos, Thanasis Vergoulis, Konstantinos Zagganas, Panayiotis Tsanakas, Evangelos Floros, Theodore Dalamagas, and Artemis G. Hatzigeorgiou "DIANA-LncBase v2: indexing microRNA targets on non-coding transcripts" Nucl. Acids Res. (2016) gkv1270

miRNA

lncRNA

or

点击下方实验按钮，换到基于实验的模式，再尝试搜索 HOTAIR:

Tsanakas, Evangelos Floros, Theodore Dalamagas, and Artemis G. Hatzigeorgiou "DIANA-LncBase v2: indexing microRNA targets on non-coding transcripts" Nucleic Acids Res. (2016) gkv1270

Bulk download:
We have updated the bulk download module, which simplifies the download process! Please find the new online form by following this [link](#)

miRNA or Search by location

ENSG00000228630 ✖

Go to Predicted module

Gene	miRNA	Pr. score	DIANA Links	Methods
HOTAIR	hsa-miR-130a-3p	0.803	mT TB InP mP	<input type="button" value="RS"/> <input type="button" value="NB"/> <input type="button" value="qP"/>
HOTAIR	hsa-miR-34a-5p	0.362	mT TB InP mP	<input type="button" value="RS"/> <input type="button" value="qP"/>

只剩两个 miRNA 啦，点进去后可以看到体系和参考文献，确实是已经报道的结合：

Gene	miRNA	Pr. score	DIANA Links	Methods
HOTAIR	hsa-miR-130a-3p	0.803	mT TB InP mP	<input type="button" value="RS"/> <input type="button" value="NB"/> <input type="button" value="qP"/>

Gene Details

Chromosome: 12
 Transcript: ENST00000424518
 Biotype: antisense
 Gene id: ENSG00000228630 [↗](#)
 Gene Name: HOTAIR
 UCSC graphic: [↗](#)
 Expression:

Cell Line	Tissue	Category
HeLa	Cervix	Cancer/Malignant

miRNA Details

Name: hsa-miR-130a-3p
 Sequence: cagugcaauguuaaaagggauc
 MirBase ID: MIMAT0000425 [↗](#)
 Related Diseases: [↗](#)

Publication	Tissue	Cell Type	Methods
Ma Ming-zhe et al. 2014	Gallbladder	GBCSD	<input type="button" value="RS"/> <input type="button" value="NB"/> <input type="button" value="qP"/>

Mol Cancer. 2014 Jun 23;13:156. doi: 10.1186/1476-4598-13-156.

Long non-coding RNA HOTAIR, a c-Myc activated driver of malignancy, negatively regulates miRNA-130a in gallbladder cancer.

Ma MZ, Li CX, Zhang Y, Weng MZ, Zhang MD, Qin YY, Gong W, Quan ZW¹.

[Author information](#)

总结

在疾病体系中研究 lncRNA，往往不知道怎么研究功能，此时，寻找其结合的 miRNA 就成为了其中一个突破点。运用以上网站，可以迅速预测不同精确度的 lncRNA 与 miRNA 的结合，给大家进行 ceRNA 的研究提供帮助。

9 高通量测序技术

漫谈 | 研究基因功能的“七大绝招”和“三板斧”

作者：唐凌峰

生命科学的研究有很大一部分集中于研究基因及其产物的功能。到底有哪些方法可以用来研究基因功能呢？本文初步总结为“七大绝招”和“三板斧”。掌握了这“七大绝招”和“三板斧”，设计实验更容易，看文献听学术报告也更轻松。

第一招：天地人合

无论是学习还是研究，必须遵循的一个原则是“从生活中来，到生活中去”。学习的时候，如果与日常生活中熟悉的、简单的事情结合起来理解，就可以化繁为简，化难为易。学习的目的是为了应用，学到的东西，必须应用到日常生活中去。

怎样研究基因的功能？要回答这个问题，我们先看怎样研究人的功能。假如你是男生，喜欢上了一个“女生”，可是这个“女生”长得扑朔迷离，帅气中带着妩媚，羞涩中透出豪爽。所以，你面临的第一个问题就是：TA 到底是男还是女？第二个问题是：TA 是不是学生？如果是的话，是本校的吗？你不认识 TA 的任何朋友，所以也没法打听。为了回答这几个问题，你决定翘课跟踪 TA。你发现，白天的大多数时间，TA 去了本校教学楼的教室。你守在教室的洗

手间旁边，观察 TA 下课的时候上洗手间，去的是男洗手间还是女洗手间。高兴的是，你发现 TA 去了女洗手间（终于松了一口气）。不过你比较小心，为防万一，你又跟踪她，看她晚上回宿舍去的是男生宿舍还是女生宿舍。不出所料，她去了本校的女生宿舍。这下你终于放心了：她是本校的一个女生。

因为她去女洗手间和女生宿舍，提示她是女的。因为她白天去本校教室，晚上去本校女生宿舍，提示她是本校女生。上述事例告诉我们：一个人什么时候，在哪里活动可以提示其身份。同样，基因表达的时间和部位，常常可以提示其功能。例如，如果基因 A 在胚胎发育过程中表达，成年后不表达，则提示该基因与发育有关。基因 B 在大脑的海马中表达，而海马与记忆有关，那么这个基因可能与记忆有关。

接下来的问题就是：她是哪个系的？她有什么兴趣爱好？你发现，她有两个形影不离的好朋友。你恰好有同学认识她的这两个朋友。同学告诉你：她两个好朋友都是中文系的，都喜欢打羽毛球。这时，你基本上就可以认为这个女生是中文系的，爱好之一是羽毛球了。

以上所述可以归纳为三点：天时，地利，人和。“天时”指基因及其产物什么时候表达，“地利”指的是基因及其产物表达于哪个部位。“人和”可以进一步引申为两点：1. 近朱者赤，近墨者黑。就是说一个人会与他经常接近的人相似。基因也是如此，相互作用的一些基因常常具有类似的功能，它们为了完成同一个功能而通力合作。例如，如果实验发现蛋白 C 与蛋白 D 相互结合，而基因 D 是某一信号通路的受体，则基因 C 可能也是该信号通路的成员。2. 近猪者吃，近墨者喝。就是说一个人不仅会经常接触与自己类似的人，还经常接触自己的工作对象。例如，一个经常与学生接触的人，既可能是学生（近朱者赤），也可能是老师（近猪者吃）。同理，与一个基因接触的其它基因或者物质，也可能是其作用的对象。例如，如果蛋白质 F 与 DNA 结合在一起，则提示其对 DNA 发挥作用，可能参与 DNA 复制、转录等。

“合”指的是合理。亿万年的进化使不合理的基因基本上都被淘汰了，所以存在的基因其功能必定是合理的，至少具有合理性的一面。合理的表现就是能够促进个体的生存和繁衍。合理遵循两个原则：一，经济原则。生物不会浪费物质和能量在一个无用或者冗余的基因上。凡是一个基因可以实现的功能，没有必要用两个基因。二，有效原则。基因的功能应该促进而不是损害生物的生存和繁衍。根据合理性原则，无需任何实验证据，我们不难想到非编码 DNA 序列是有用的，不是无用的垃圾。

第二招：患得患失

有人说，金钱不是万能的，但是没有金钱是万万不能的。那么，金钱到底有什么作用呢？有

两种方法可以知道答案。第一种方法是你去一个陌生的地方，突然钱包被偷，所有的现金、信用卡和可以换钱用的物品都没有了。此时，你就知道钱的作用是什么了。第二种情况是你买彩票突然中了一千万，很快，你也可以知道钱的作用是什么。得到和失去，都可以让我们知道事物和人物的功能，而其中失去更为有效。

得，指的是基因的过表达（Overexpression）；失，指的是基因敲除（Knockout）或者低表达（Under-expression）。例如研究的假说是基因 A 与记忆力呈正相关，那么可以这样设计实验：先过表达基因 A，预期结果是记忆力增强，再降低基因 A 的表达水平，或者完全敲除（如果不是 lethal 的话），预期结果是记忆力减弱。一个高质量的实验设计，一般应该“患得患失”，两方面的实验都要做。

我们不仅要“患得患失”，还要“斤斤计较”。因为过表达或低表达的水平不同，表型改变可能也不同，甚至看不到表型改变。例如，用 RNAi Knockdown 一个基因的表达水平的 70% 也许看不到任何变化，但是 Knockdown 90% 就能观察到表型改变了。所以，当过表达或者低表达研究基因却没有得到预期结果的时候，就需要考虑基因表达水平的变化是否不足。

有时即使完全敲除一个基因也看不到任何表型的改变，此时也不能下“研究基因与研究表型无关”的结论。这就好比一个桥有十个桥墩，如果只去除掉桥墩 4，在非过负荷的情况下，桥可能不会倒塌，可以正常通车。可是，如果先去除掉桥墩 5，再去除桥墩 4，桥就会倒塌了。我们能够认为桥墩 4 是无用的吗？当然不能。桥墩在这里好比处于同一个通路具有相似功能的基因，桥是否可以通车好比基因的表型是否正常。所以，在敲除一个基因 A 看不到表型改变的情况下，可以在基因 B（与 A 的功能具有相似性，或者是上下游的基因）敲除的动物模型上敲除基因 A，观察敲除后是否有变化。

有时候，全身性的过表达、低表达或者基因敲除会出现我们不想要的结果。例如，全身性的基因敲除会致命。为了解决这个问题，现已开发出许多种组织特异性和时间特异性的过表达、低表达和基因敲除技术，使得基因调控更加准确。

第三招：上下求索

基因需要经过转录为 RNA、翻译为蛋白质至少两步才能发挥功能。所以，研究一个基因的功能，就可以在 DNA、RNA 和蛋白质的水平分别进行研究。DNA 的水平相同，不代表 RNA 的水平相同；同样，RNA 的水平相同，不代表在蛋白质的水平相同。哪怕就是在 RNA 水平，还有不同的剪切的可能。

一个基因翻译成蛋白质之后，常常需要同其它的基因及其产物相互作用才能发挥功能。例如基因 S，翻译成蛋白质 S，如果它是配体，就需要和受体结合，然后受体激活信号通路。如果 S 鉴定出来了而其余的通路基因没有鉴定出来，那就可以研究上游的配体和下游的信号通路基因分别是什么。一个转录因子，常常可以激活或抑制一系列基因的表达，究竟可以控制哪些下游基因，也值得研究。蛋白质发挥功能，常常会有正性调控和负性调控因子。从上游来看，哪些基因及其产物可以促进或抑制研究基因的表达水平？具体机制是怎样的？从下游来看，哪些基因及其产物可以增强或者减弱研究基因的功能？具体机制是怎样的？这些都可以研究。

所以，研究一个基因，就可以在不同的表达水平和不同的作用水平上“上下求索”。

第四招：背井离乡

背井离乡，指的是 **misexpression**，就是在非正常时间、非正常位置、非正常物种（时间、地点、人物）表达一个基因。如果在正常情况下，研究基因具有特定功能，而且在非正常时间、非正常位置和非正常物种间表达的时候同样导致该功能，则我们下“该基因具有该特定功能”的结论就更有把握。

值得注意的是，**misexpression** 不产生预期表型，并不能认为研究基因与该表型无关。因为一个基因发挥作用，需要很多其它基因的帮助。如果 **misexpression** 的部位、时间、物种缺乏该基因发挥功能需要的辅助基因，或者多了可以抑制该基因功能的其它基因的表达，则可以导致预期表型无法产生。如果 **misexpression** 产生了某一表型，不代表该表型是该基因的正常功能，原因同上。所以，**misexpression** 告诉我们：该基因“可以”做什么，不代表该基因实际上做了什么。打个比方，我们把一个教授放到农村去，他没法接触到做科研需要的设备、文献等，而且迫于生计，他不得不自己种田维持生存。我们能够下结论说：教授的社会职能是种田吗？当然不可以。但是我们可以说：教授是“可以”种田的。

第五招：内外兼修

体外实验（**In vitro**）简单便捷，可以很快得到结果。可是，体外实验的条件和体内的情况不一样，体外实验得到的结果一般还需要体内实验（**In vivo**）来验证。“内外兼修”指的是既做体外实验，又做体内实验。这一招不是太常见，有些文章不一定同时做体内和体外实验。

第六招：十面埋伏

当你论证一个观点的时候，可能会有人反驳你。一篇好的文章，必须提前想到这些反驳，并通过做相应实验设下“埋伏”，反驳这些可能的反驳；此外，还应通过类似实验重复验证来增加结论的可靠性，这就叫做“十面埋伏”。

中医诊治病人，需要“望闻问切”，把四种方法得到的信息综合起来才能做出正确的诊断，这叫“四诊合参”。（题外话：电视剧里仅仅通过望诊或者仅仅把脉就开药的中医，基本上都是骗人的。实际生活中遇到这样的中医，可以判断为江湖游医。）历史学上有一个说法叫做“孤证不立”，就是说如果只有一条证据支持一个论点，那么这个论点是不可靠的。生活中，如果有一个人说某人有问题，他不一定真的有问题。可是如果很多人都说他有问题，那他很可能真的有问题了。

如果仅仅从一篇文章的角度来考虑，做这么多的实验不是很有必要。例如，做了第一个实验，结论成立的可能性是 80%，做了第二个，可能性上升到 95%。可是，科研是积累性的，你的结论是别人推理的基础，你推理的基础则是前人的结论。假如 A1 引用了你的文章，A2 又引用了 A1 的文章，如此反复一直到 A10。如果每篇文章结论正确的概率是 80%，则 A10 文章结论正确的概率是 $0.80^{10}=10\%$ ，如果每篇文章结论正确的概率是 95%，则 A10 文章结论正确的概率是 $0.95^{10}=60\%$ 。差别从一开始的 15%，变成 6 倍了。所以，多做实验增加结论的可靠性，对于科学的长期发展是至关重要的。

看文献的时候，你会发现作者做了一大堆实验，这么多的实验就像唐僧在你耳边念经一样，把你弄得晕头转向。为了提高看文献的效率，一般只看关键实验，次要的实验可以略过。当你做学术报告时，由于时间有限，只报告关键实验。等到观众提问时，这些次要实验就可以派上用场了。例如，听完你的报告，有听众提问说：“我觉得你的结果还有两种可能的解释，包括。。。你怎样得出这个结论的呢？”此时，你就可以从容自若的说：“这是一个很好的问题。针对第一种可能，我们做了 XX 实验，结论不支持这个可能。针对第二种可能，我们做了 XX 实验，发现。。。 ”看到了吧？这就是“十面埋伏”的妙处。

第七招：一网打尽

如上所述，每一个基因都有作用于它的上游基因，也有受它作用的下游基因。每一个上游基因和下游基因又分别有自己的上下游基因。除了上下游基因及其产物，细胞内、机体内的其它物质例如离子等也都会作用于基因自身。用马哲的观点来说就是联系无处不在，无时不有。

这些联系构成了一个复杂的网络。目前生命科学的一个发展趋势就是研究基因网络。所以，研究一个基因的功能，还可以构建出它所处的网络。

三板斧：天时地利，患得患失，十面埋伏

为了增加适用范围，上面一共总结出了七大绝招，但却不够简练。一个研究或者一篇文章，常常只用到其中的一部分。为了更加简洁，可以总结为最重要的“三板斧”：天时地利，患得患失，十面埋伏。“天时地利”，指的是基因何时何地表达。“患得患失”，其中“患失”比“患得”重要得多。“十面埋伏”，指的是立体论证。基本上，每一个研究都离不开这三板斧，上述文章就是一个很好的例子。而只要学会这三板斧，就可以做大部分科研了。所以，科研就是这么简单！

10 CRISPR 技术

盘点这些年的基因敲减技术

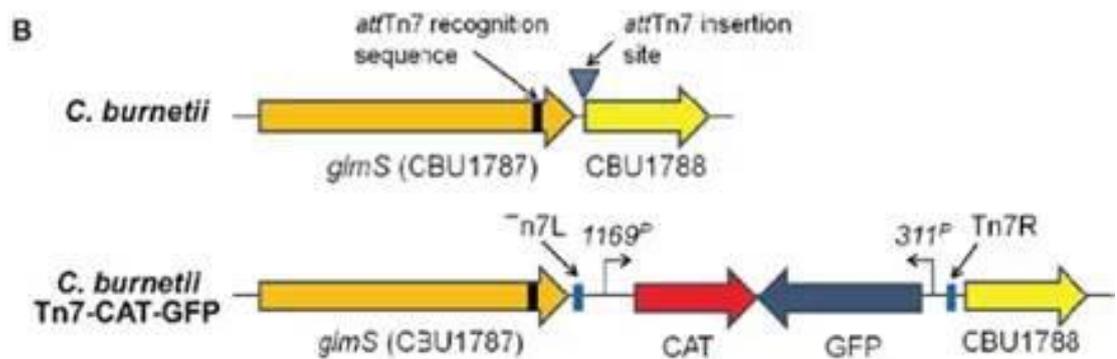
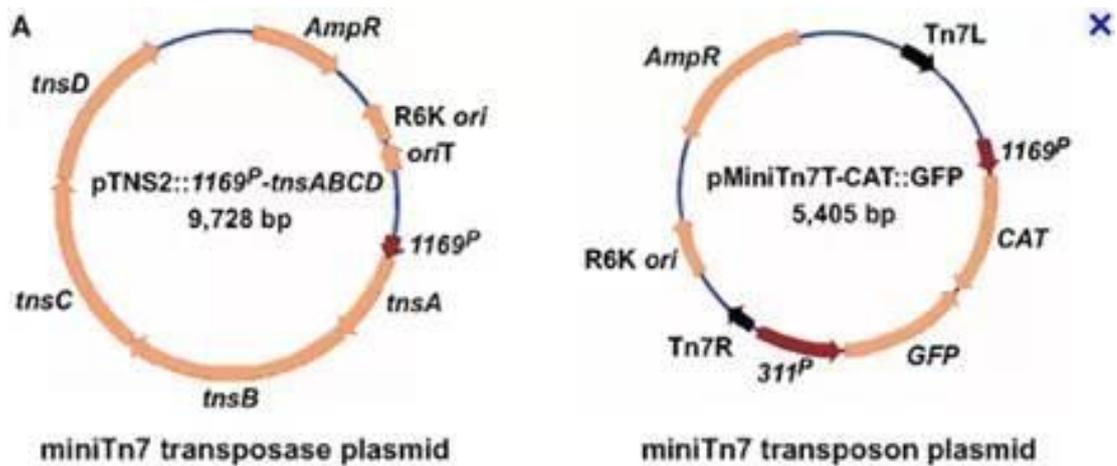
作者：老谈

导读

敲减技术哪家强，现在看来 Knock Out 技术还是 CRISPR 比较强。从去年开始，CRISPR 技术异军突起，就占据了敲减技术的主流，但敲减真的只有那么一点点方法么？当然不是，我们今天就来盘点一下敲减的技术。

这是**最早**的敲减方法，也就是通过同源整合的方式定点将基因敲除的方法。

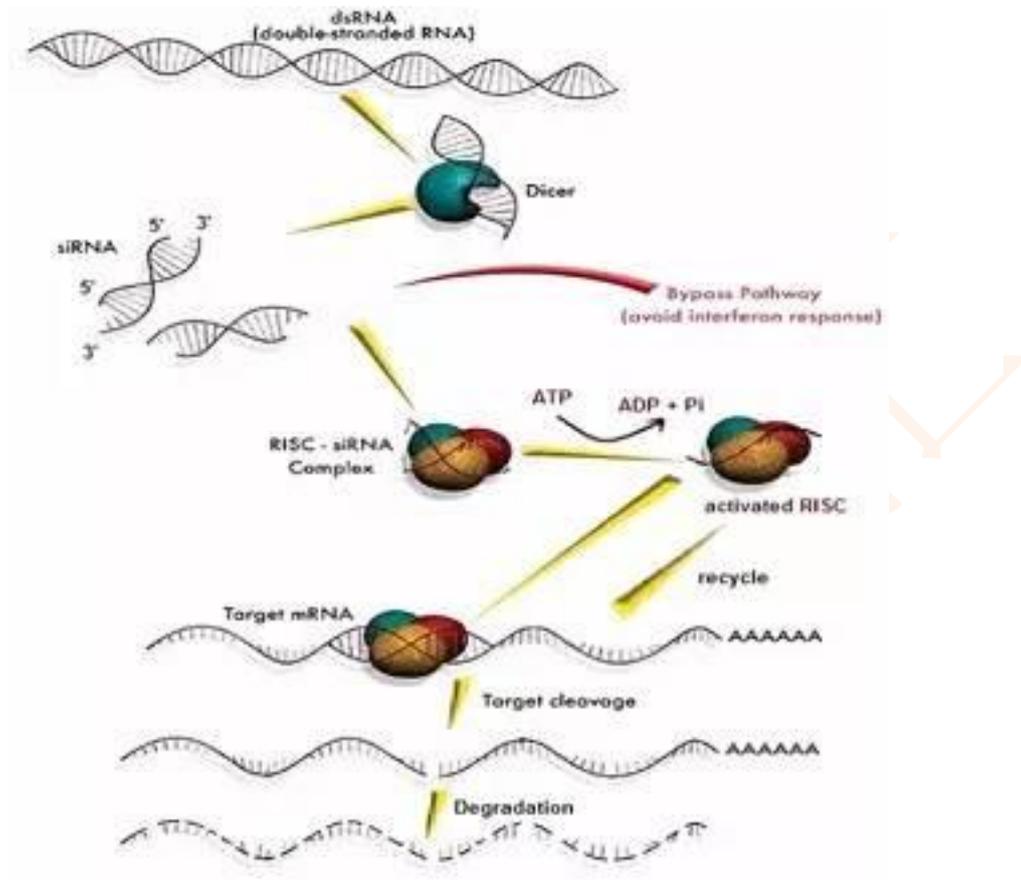
原理：自杀质粒通常为 R 质粒的衍生质粒，常有宿主范围广的特点，具有接合转移基因。它的复制需要一种特殊的蛋白，大多数细菌不产生这种蛋白质，因此，当进入寄主细胞时，要么不能复制，被消除，要么被整合入染色体上，和染色体一起复制。



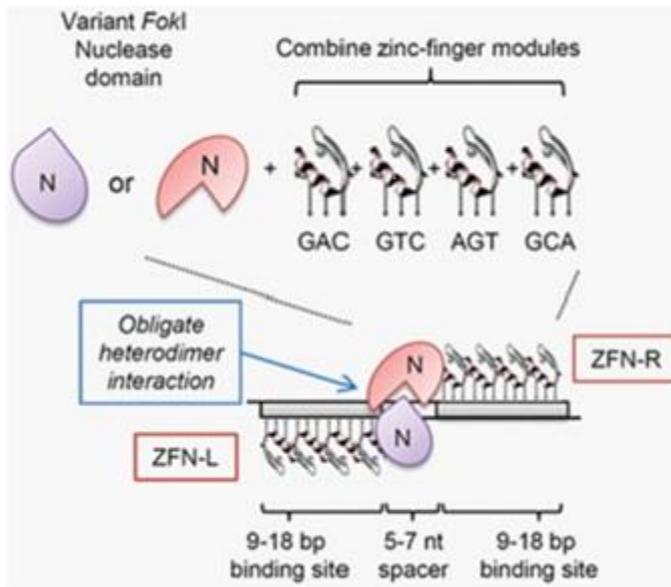
利用自杀质粒的这个特点，将基因工程技术构建的基因缺失的 DNA 片断，克隆入自杀质粒，利用缺失基因两端的同源片断，定位自杀质粒的整合位点。利用同源性 DNA 片断可发生重组的原理，构建精确基因缺失菌株。在多数情况下，利用自杀质粒，可随心所欲缺失大多数基因的任何部分。这种方法现在也还有人在使用，通过同源的重组可以随心所欲地敲减掉基因或者插入基因，但是这并不是最佳的方法。

后来随之出现的就是传说中的“siRNA”的方法，RNA 干扰现象是 1990 年由约根森 (Jorgensen) 研究小组在研究查尔酮合成酶对花青素合成速度的影响时所发现的。即用小片段的 RNA 把 RISC (RNA 沉默复合体) 来对基因进行沉默，在这个方法的基础上衍生出了“shRNA”和慢病毒敲减等等的方法。RNA 干涉 (RNAi) 在实验室中是一种强大的实验工具，利用具有同源性的双链 RNA (dsRNA) 诱导序列特异的目标基因的沉寂，迅

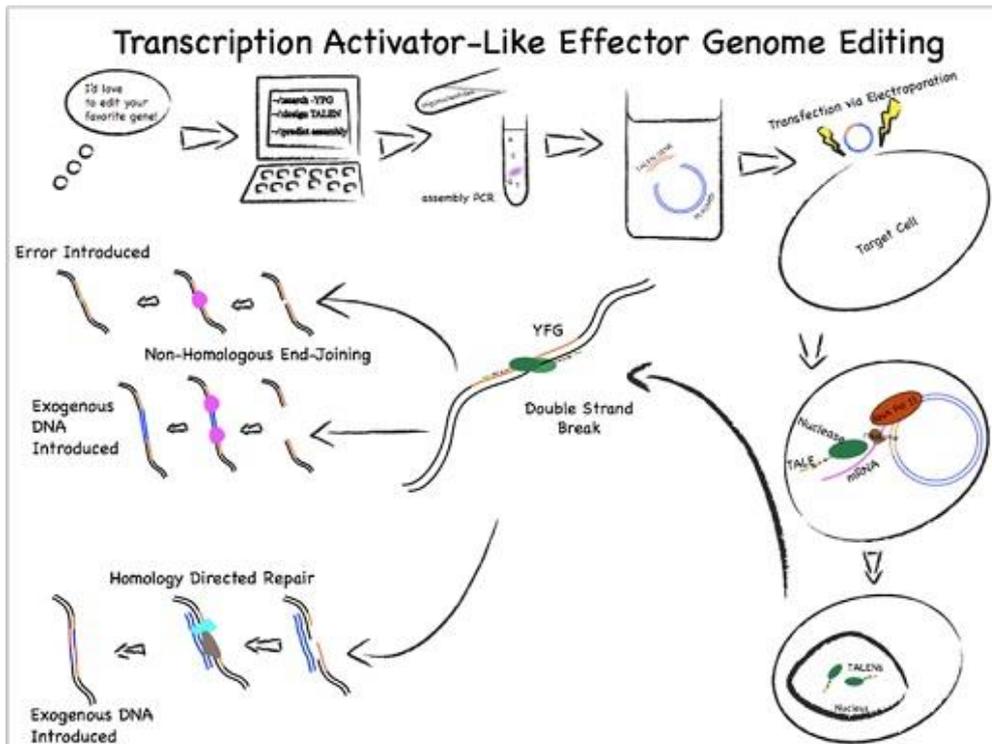
速阻断基因活性。但敲减效率也往往是 RNAi 的一个软肋。



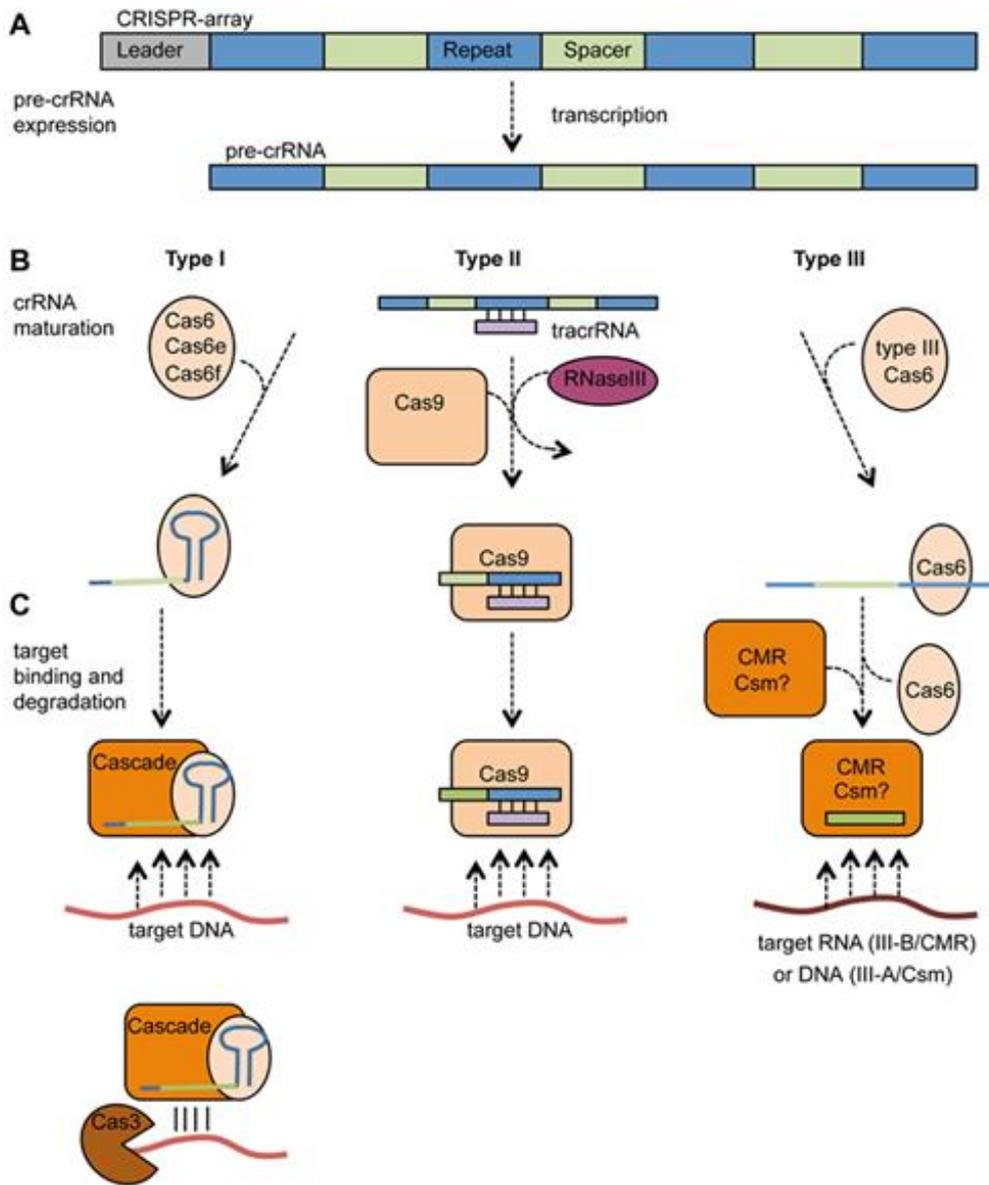
然后, 由于发现了锌指蛋白能特异性识别 DNA, 锌指核糖核酸酶 (ZFN) 由一个 DNA 识别域和一个非特异性核酸内切酶构成。DNA 识别域是由一系列 Cys2-His2 锌指蛋白 (zinc-fingers) 串联组成 (一般 3~4 个), 每个锌指蛋白识别并结合一个特异的三联体碱基。利用这种特性在串连的锌指核酸酶尾部加上了剪切酶, 于是就产生了 ZFN 这种技术。自此, 蛋白对 DNA 序列的识别就引入了基因敲减这个技术的行列。但据报道, ZNF 的脱靶效率会比较高, 所以这项技术的完善也还有很长的路要走。



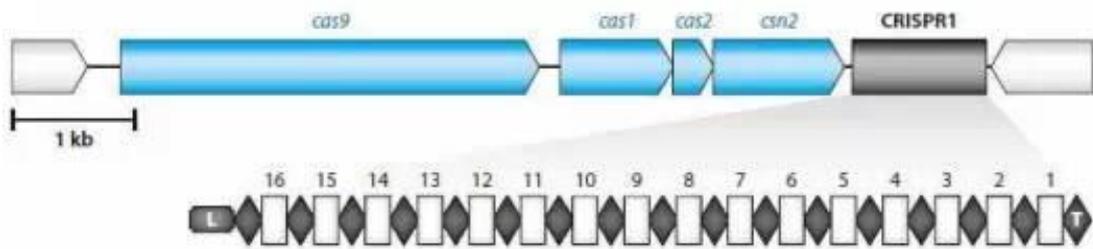
ZFN 技术虽然高大上，但是并不是那么稳定，于是根据这个思路，研究发现，*Xanthomonas TAL* 蛋白核酸结合域的氨基酸序列与其靶位点的核酸序列有较恒定的对应关系。研究者们利用来自 *Xanthomonas TAL* 的序列模块，构建针对任意核酸靶序列的重组核酸酶，在特异的位点打断目标基因，敲除该基因功能。成功解决了常规的 ZFN 方法不能识别任意目标基因序列，以及识别序列经常受上下游序列影响识别特性的问题，使基因敲除变得简单方便。就产生了 TALEN (transcriptionactivator-like (TAL) effector nucleases) 技术。



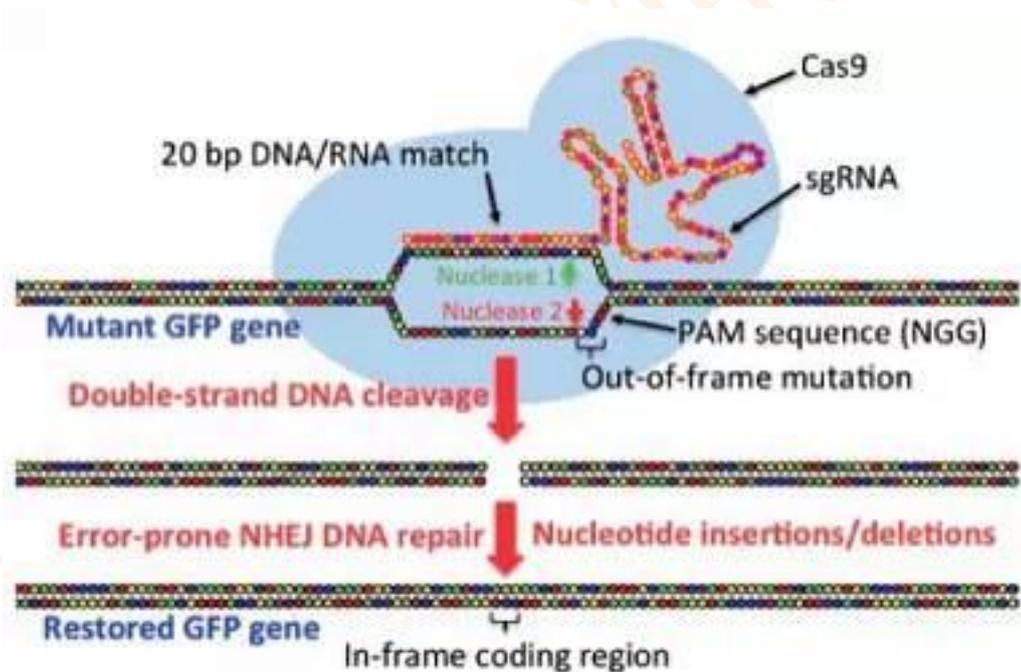
在蛋白识别 DNA 这种理论的基础上,最新的技术就是 CRISPR 技术。CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), 是最近几年才发现的原核生物中的调控 RNA, 第一次是在 1987 年在大肠杆菌中有报道, 到 2000 年时, 有人证实了目前为止, 已有 40%已测序的细菌和 90%已测序的古细菌中有报道。CRISPR 含有一个与噬菌体和质粒同源的短的重序列, 通过对外来同源的 DNA 作用对噬菌体有抗性, 影响质粒的连接, 是原核生物的免疫系统一部分。



CRISPR sequences 是一个高度多变的 DNA 序列，常包含一个 550bp 的 leader 序列和一系列重复单位 (repeat-spacer units)。重复序列长度在 24-48bp，他们通常会形成二重对称，因此会形成如发夹结构的二级结构，但不是回文结构，重复次数最高可达 250 次。



CRISPR/Cas 系统中 crRNA 与 tracrRNA (反式激活的 crRNA) 形成嵌合 RNA 分子, 即单向导 RNA (Singleguide RNA, sgRNA)。sgRNA 可以介导 Cas9 蛋白在特定序列处进行切割, 形成 DNA 双链断裂 (Double-Stranded Break, DSB), 完成基因定向编辑等的各类操作。



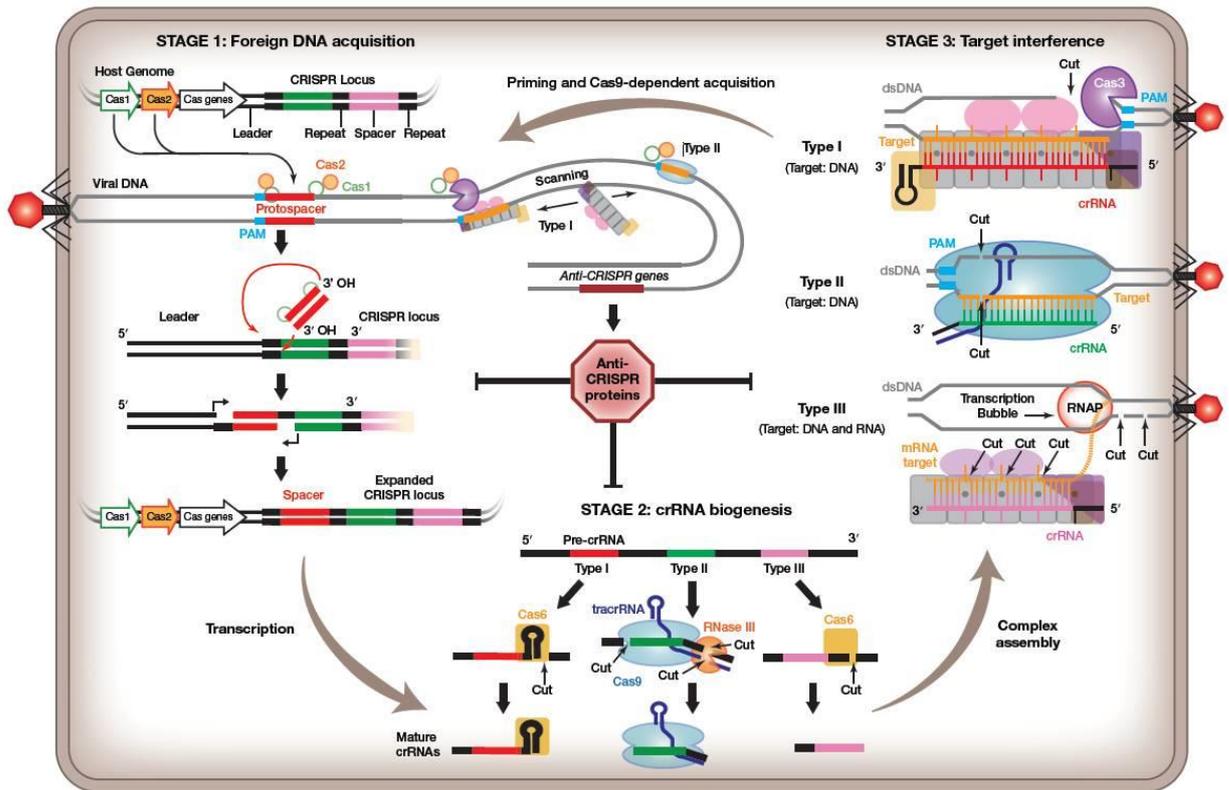
近年来 TALEN、ZFN 和 CRISPR/Cas 三大基因定点修饰技术已经广泛应用于生命科学与医学的各个方面, 包括但不局限于转基因动植物模型的构建、基因治疗及转基因育种等。虽然 TALEN、ZFN 和 CRISPR/Cas 三种技术在技术细节上有着各自独一无二的特色,

但它们在各类应用中的基本模式却是相似的。相信将来，基因的敲减技术，还会有突飞猛进的进步!

Cell 牛文，一图看破 CRISPR 操作系统

作者：麦子

近日，Cell 发表了一篇名为“SnapShot: CRISPR-RNA-Guided Adaptive Immune Systems”的精华文章，用一张图，就全解析了 CRISPR 系统的“中心法则”。今天就让麦子带大家分解此图，真正掌握时下这个可以对人、老鼠、斑马鱼、细菌、果蝇、酵母、线虫和农作物等细胞内的基因进行精确编辑的热门技术之精髓：



细菌和古细菌已经根据 CRISPR（规律成簇的间隔短回文重复，Clustered regularly interspaced short palindromic repeats）位点和多样化 CRISPR 相关（CRISPR-associated, Cas）基因，进化

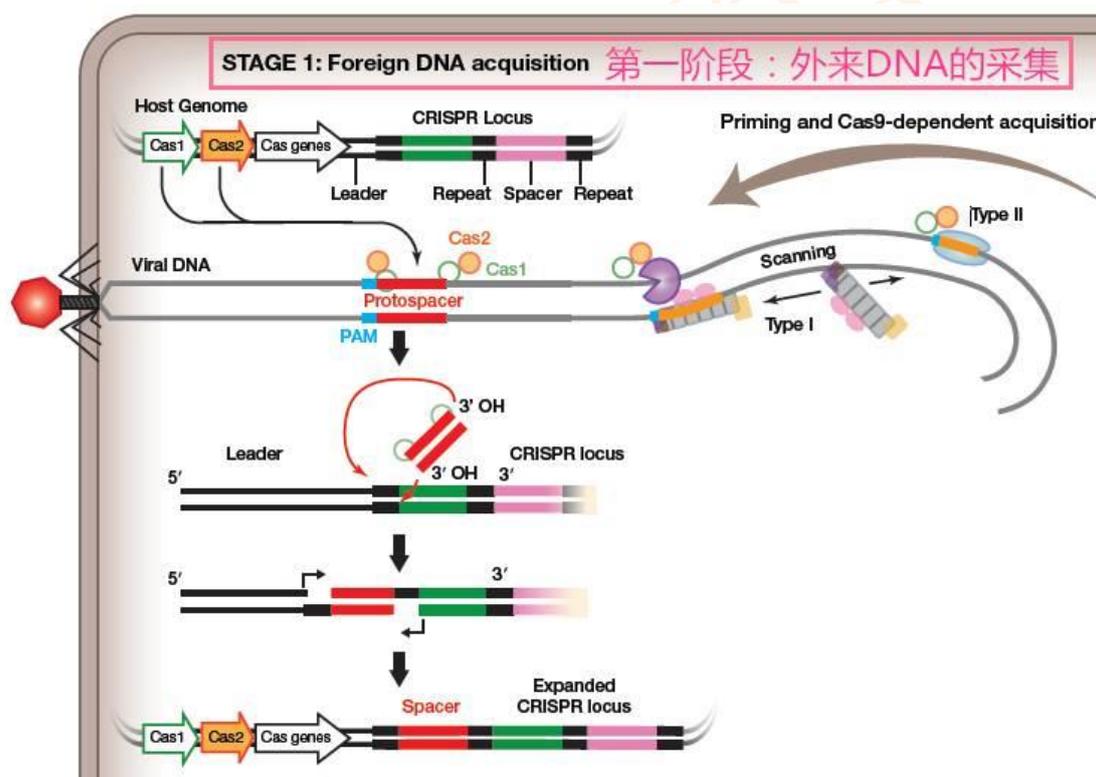
出了复杂的 **CRISPR 适应性免疫系统**。CRISPR 系统可以分为三种类型（I-III）及至少 11 种不同的亚型（I-A~I-F，II-A~II-C，III-A~III-B）。但是所有的 CRISPR-Cas 免疫系统都是通过主要的三个阶段来行使功能：

外来 DNA 的采集

CRISPR RNA 的生物合成

靶向干扰

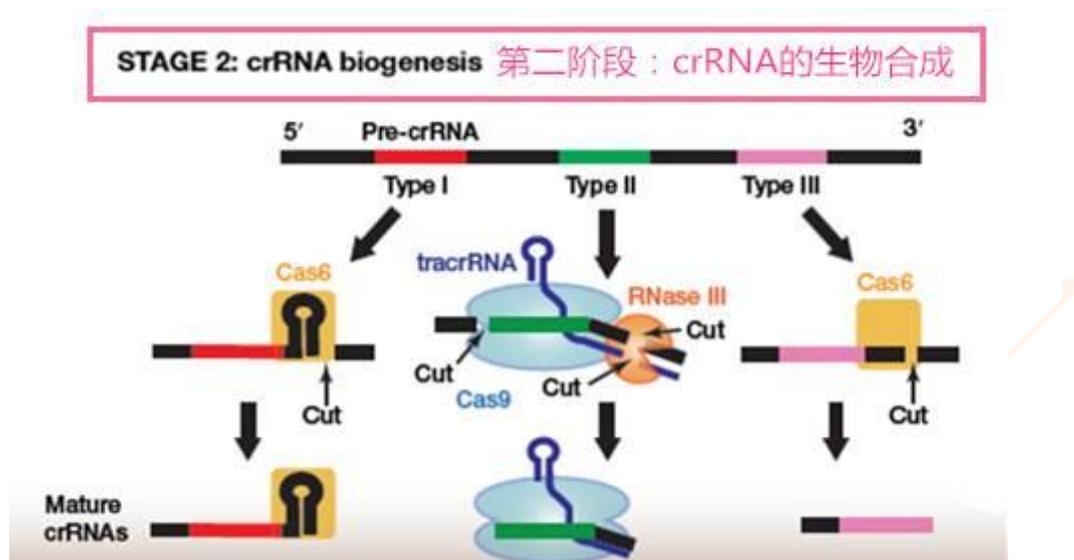
第一阶段：外来 DNA 的采集（Foreign DNA Acquisition）



宿主通过 Cas 蛋白来识别外源核苷酸，入侵细菌的短片段 DNA 称为 protospacers，它们作为间隔区序列插入到了宿主的 CRISPR 位点。在 I 和 II 型系统中，protospacers 选择自入侵 DNA 旁出现 PAM 的区域（PAM: protospacer adjacent motif, 对于 CRISPR 结合至关重要）。一般 protospacers 通过包含 Cas1、Cas2 和游离 3'-羟基等元件的机制连接在 CRISPR 位点的前导区 (Leader)。Protospacer 的整合也伴随着末端重新序列复制，这可能涉及宿主聚合酶和 DNA 修

复制机制。

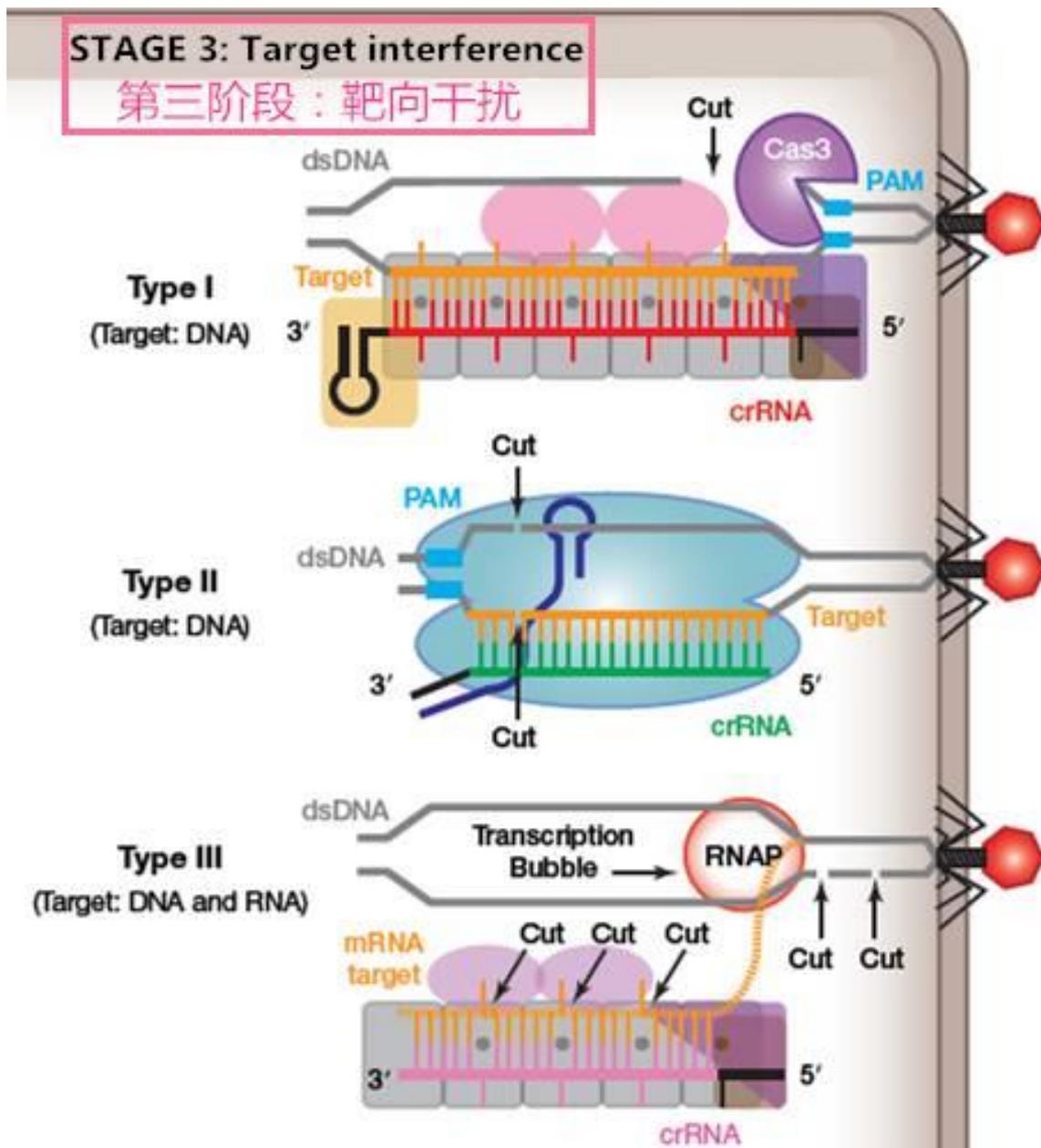
第二阶段：CRISPR RNA 的生物合成（crRNA Biogenesis）



CRISPRRNA 的生物合成从转录开始，接下来是初级转录产物 pre-crRNA 加工生成一类短的 CRISPR 衍生 RNAs (crRNAs)，每一个都包含与之前遇到的外源 DNA (Spacer 序列) 对应的互补序列。crRNA 导向序列的两侧是相邻重复序列区域。在 I 型和 III 型系统中，初始 CRISPR 转录产物会被 CRISPR 特异性核酸内切酶 (Cas6 或 Cas5d) 在重复序列位点内切割。在许多 I 型系统中，重复序列是回文结构的，Cas6 可以稳定连接在 crRNA 3'端茎环上。而在 III 型系统中，Cas6 短暂与 CRISPRRNA 连接，crRNA 的 3'端会被未知的核酸酶进一步处理。

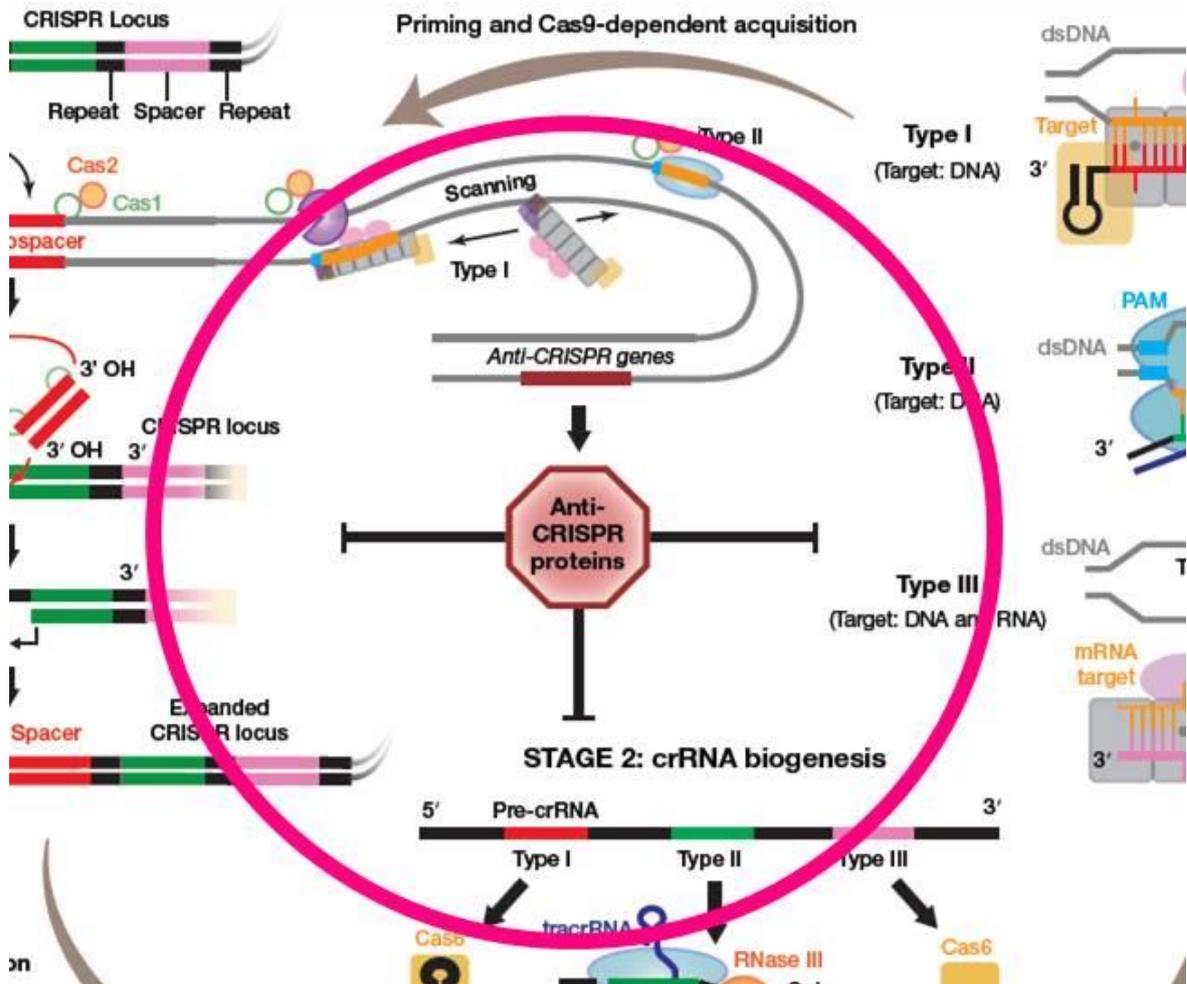
CRISPRRNA 的加工在 II 型系统中依赖于包含一个与重复序列互补序列的反式作用 crRNA (tracrRNA)。这些双链的区域在 Cas9 存在时可以被 RNaseIII 加工，靶向干扰需要 tracrRNA 和 crRNA 的同时存在。II 型系统中的这两个 RNAs 可以融合成一个 sgRNA，目前，II 型系统是我们研究的“火力”较为集中的系统，而 Cas9 已经变成了在多种细胞类型和组织中靶向基因编辑的强大工具。

第三阶段：靶向干扰 (Target Interference)



成熟的 crRNAs 指导 Cas 蛋白到互补靶标，靶序列由特异性的 Cas 核酸酶降解，但不同的 CRISPR 系统降解机制存在差异。I 型和 II 型系统都可以靶向包含 PAM 和 protospacer 互补序列的 dsDNA 底物。在 II 型系统中，靶标的降解是通过单一的蛋白 Cas9 和两个 RNAs 来实现的，而在 I 型系统中，则依赖于包含多个亚型的复合物，可以结合 dsDNA 并招募 Cas3，Cas3 是一个反式作用的核酸酶，经常融合到依赖于 ATP 的解旋酶上。类似于 I 型系统，III 型系统也同样依赖于探测目标的多亚基复合物，这些复合物展示出了内源性核酸酶活性，依赖于转录方式降解互补的 RNA、靶向 DNA，不过 III 型系统不依赖于 PAM 进行靶标位点的识别，而是通过碱基互补配对，导向序列延伸至 crRNA 信号 5'handle 的核苷酸进行识别（CRISPR 位点包含与导向序列，5'handle 互补的序列），并阻止靶向裂解。

关闭颈环

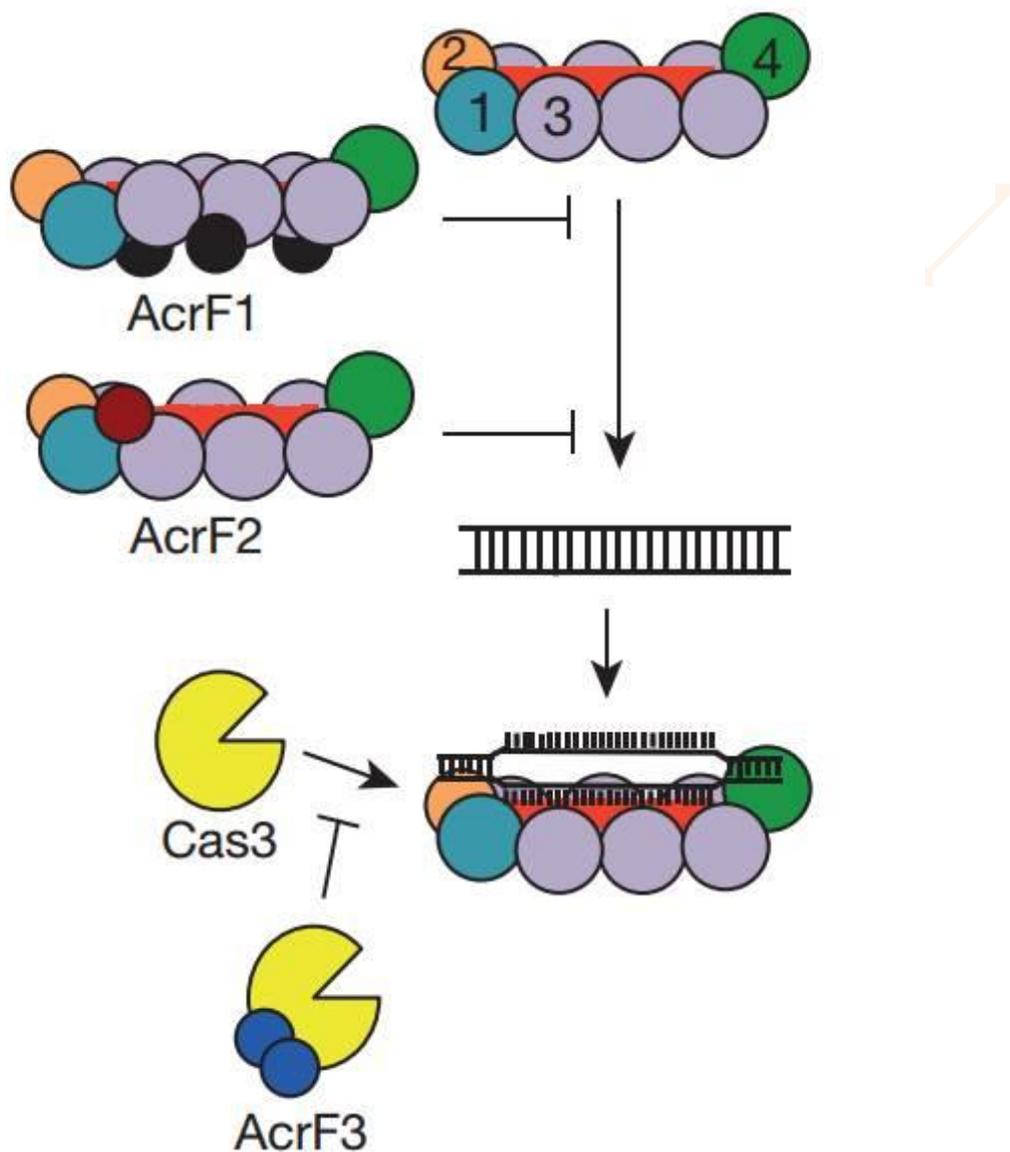


在 I 型系统中，复合物靶向结合会导致 Cas3 介导的靶向降解（直接干扰）或最初采集，这其中涉及 crRNA 导向募集 Cas3、Cas1 和 Cas2 到外源 DNA 处，引起新一轮的快速采集。II 型系统中虽然未观察到最初采集，但 Cas9 是 protospacer 正确筛选的必要元件，这表明在靶向干扰与外源 DNA 采集之间存在一种功能性联系。近期，多种可以产生 anti-CRISPRs 蛋白的病毒编码基因已经证明了可以干扰 CRISPR 的不同阶段，这将颠覆 CRISPRs 系统。

衍生阅读：anti-CRISPRs

在 9 月的 Nature 文章：“Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins”

中，研究人员确定了三种 anti-CRISPR 蛋白：AcrF1、AcrF2 和 AcrF3 的功能机制，验证了它们通过不同的机制抑制 CRISPR-Cas 的活性。AcrF1、AcrF2 可以通过与不同的蛋白质亚基互动，利用了空间或非空间抑制模式来阻断了 CRISPR-Cas 复合物的 DNA 结合活性，AcrF3 通过结合 Cas3 酶-核酸酶，阻止其招募到结合 DNA 的 CRISPR-Cas 复合物上来起作用。这是首次证实了蛋白质相互作用可以调控 CRISPR-Cas 的活性。



A model summarizing anti-CRISPR mechanisms

这些已知和有待发现的 Anti-CRISPR，将为认识和操控 CRISPR-Cas 系统提供大量有价值的

工具。我们期待研究者可以更多的给我们呈现相关机制！

信息来源：

SnapShot: CRISPR-RNA-Guided Adaptive Immune Systems

Multiple mechanisms for CRISPR–Cas inhibition by anti-CRISPR proteins

姿势 | 对你爱爱爱不完的 CRISPR/Cas9...

作者：明朝



（不要问我为什么不把郭天王的女友放上，网上图片太多，我实在是找了 N 久，都不知道哪个是！）

要说 2015 年生物医药领域最火的两个词，那绝对是 CRISPR/Cas9 和 CAR-T，并且可以预见 2016 年它们将继续吸引我们的眼球。2012 年才首次报道 CRISPR/Cas9 可用于基因编辑，到 2015 年开始风靡全球，它的发展速度令世界瞩目。

基因编辑能够对基因进行精确操作，并且以高效率，低成本的优势实现基因定点删除，突变，敲入等。目前 CRISPR/Cas9 的主要应用领域是基因敲除，在基础研究领域它已经展现了强大的优势，但是在临床应用中，它的应用仍然受到局限，一般在进行临床试验之前，医生和

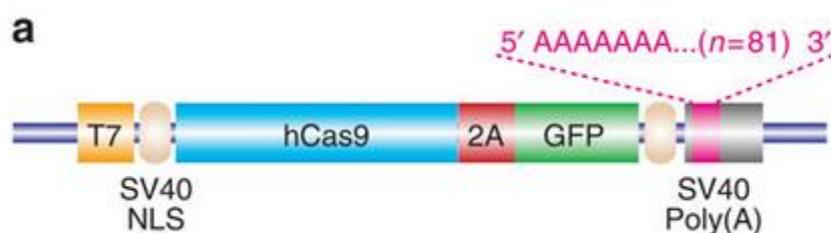
监管机构必须确保 Cas9 酶不会引起非目标基因组的损伤，即脱靶效应。

CRISPR 的脱靶效应是大家最为关注的问题，2015 年 11 月 30 日，《science》杂志上张锋团队宣布，通过改变构成化脓性链球菌 Cas9 酶的约 1400 个氨基酸中的 3 个氨基酸，将“脱靶编辑”显著减少到无法检测到的水平。他们将这个新的酶命名为 eSpCas9（“enhanced specificity” Streptococcus pyogenes Cas9），不同于其它降低 CRISPR/Cas9 系统错误率的方式，这些新酶的使用不需要改变许多研究人员现在参照的 CRISPR/Cas9 系统的 protocol。这将为 CRISPR/Cas9 的临床应用打下很好的基础。



猴赛雷!

另外 CRISPR 的强大不仅仅体现在敲除，它更可以进行基因敲入，但因为敲入技术还不是很成熟，用 CRISPR 在受精卵中靶向敲入（KI）大片段并不容易，所以应用还比较受局限。研究人员将 CRISPR-Cas 与单链寡聚脱氧核苷酸（ssODN）结合起来，在大鼠基因组中进行了基因敲入。质粒构建示意图如下图所示：



他们把引导 RNA（gRNA）、Cas9 信使 RNA 和长 ssODN 注射到大鼠受精卵，在基因组的 Thy1 位点实现了 GFP 敲入，示意图如下图所示：

d



除了以上对 CRISPR 技术进行的改进，已经有研究人员考虑将 CRISPR 技术引入农业和改造生态系统，例如：对小猪进行改造，生产抗病小麦和水稻，遗传改造去角牛、抗病山羊和富含维生素的甜橙，消灭携带病原的蚊子或虱子等。虽然以上的 CRISPR/Cas9 进展激动人心，但是最令人兴奋的莫过于 CRISPR/Cas9 技术和 CAR-T 技术的结合。正所谓双剑合璧，天下无敌！



CAR-T(Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy), 嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法, 已经接过癌症免疫治疗的大旗, 在急性白血病和非霍奇金淋巴瘤的治疗上有着显著的疗效, 被认为是最有前景的肿瘤治疗方式之一

一个典型的 CAR-T 治疗流程, 主要分为以下五个步骤。

分离：从癌症病人身上分离免疫 T 细胞。

修饰：用基因工程技术给 T 细胞加入一个能识别肿瘤细胞并且同时激活 T 细胞的嵌合抗体，也即制备 CAR-T 细胞。

扩增：体外培养，大量扩增 CAR-T 细胞。一般一个病人需要几十亿，乃至上百亿个 CAR-T 细胞（体型越大，需要细胞越多）。

回输：把扩增好的 CAR-T 细胞回输到病人体内。

监控：严密监护病人，尤其是控制前几天身体的剧烈反应。

现阶段，基因编辑技术对医疗领域的最大突破在于对 CAR-T 细胞进行编辑，从而提高 CAR-T 细胞治疗的疗效，减少副作用和降低成本，CRISPR/Cas9 可以定向整合 CAR 基因，解除 CAR-T 本身成瘤风险；同时，结合 PD1 抗体等免疫检查点药物的优势，可以在 CAR-T 细胞中敲除 PD1 等免疫检查点抑制基因，达到或超过 CAR-T+免疫检查点药物的效果；另外，免疫排斥一直都是困扰大家的难题，所以现在的 CAR-T 治疗一般都是从病人体内分离 T 细胞，然后再回输到病人自身体内，以避免免疫排斥的发生，所以我们可以考虑利用 CRISPR/Cas9 技术敲除引起免疫排斥的相关基因，大批量生产异体 CAR-T 细胞，进行大规模生产和标准化治疗。

2015 年 5 月，Juno Therapeutics 宣布与 Editas medicine 合作，致力于基因编辑在 CAR-T 和 TCR 肿瘤免疫治疗领域的应用，这也是 CRISPR 基因编辑领域规模最大的研发合同。可以预见未来的几年内，CRISPR/Cas9 将和肿瘤免疫一起，对生物医药行业产生巨大的影响。

此外，CRISPR/Cas9 不仅被细胞治疗领域相中，中科院生化所的李劲松研究员已经应用 CRISPR 打造出了“人工精子”，但是该技术目前的效率还很低，获得的受精卵只能培养出 20%的健康后代，离将其应用到人类身上还有很长的一段路要走；同时，它现在也被科学家考虑应用于人类胚胎，但是由于涉及伦理问题，所以目前进展缓慢，一旦有了规范化的流程，及严格的审核条件，那么将 CRISPR/Cas9 技术应用于纠正胚胎的遗传疾病将会对人类产生深远的影响！

综上所述，CRISPR/Cas9 基因编辑技术在基础研究，细胞治疗的基因改造，临床前的动物模型的构建，改良动植物的性状，以及农业，生态环境的改善等都有着及其广泛的应用前景。

参考阅读：Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity.

ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes。

图解 | Cell 三篇牛文详解 CRISPR 两大家族

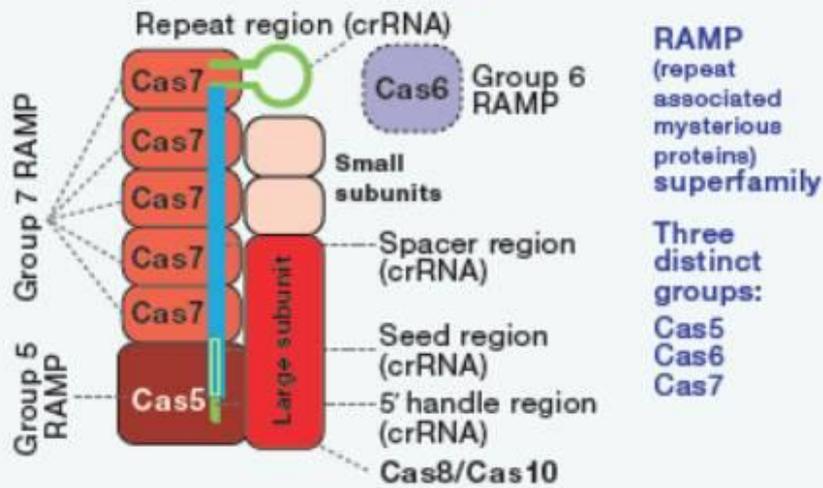
作者：子非鱼

Cell 杂志三篇牛文对 CRISPR 系统及操作进行了详细地归纳总结，可让大家真正掌握 CRISPR 基因编辑技术之精髓。

CRISPR 两大家族

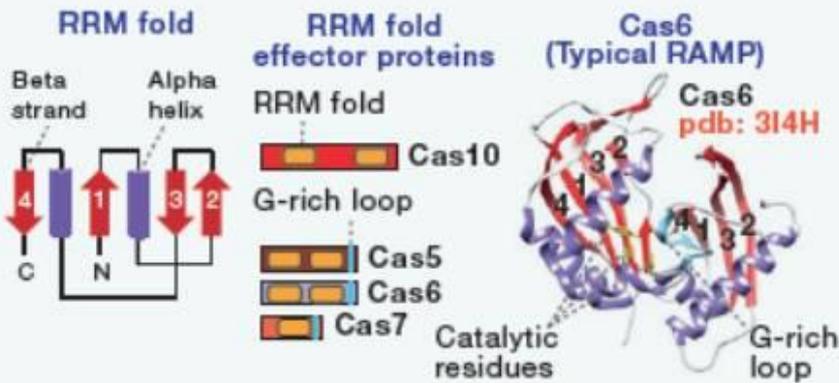
CRISPR-Cas 系统是原核生物中的适应性免疫系统，而基于效应蛋白可分为两个不同的类别：Class 1 和 Class 2。其中，Class 2 系统（尤其是基于核酸酶 Cas9 的系统）已成为最热门的基因编辑工具。

Class 1 系统 **Effector complexes**
多蛋白效应器结构 **Generalized organization**

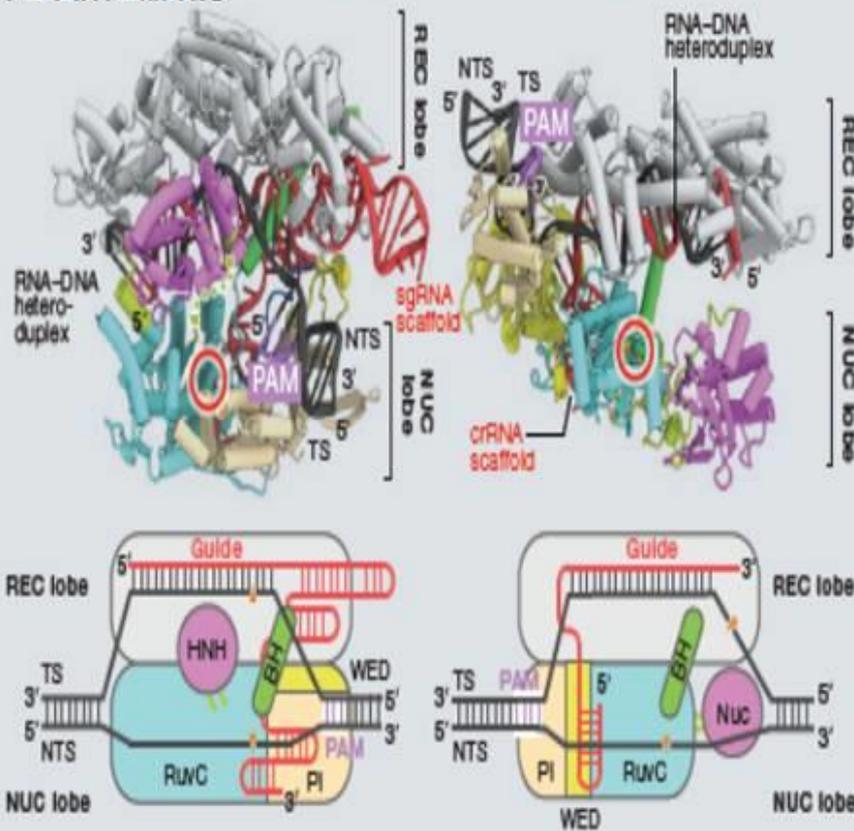


RAMP
 (repeat associated mysterious proteins) superfamily

Three distinct groups:
 Cas5
 Cas6
 Cas7

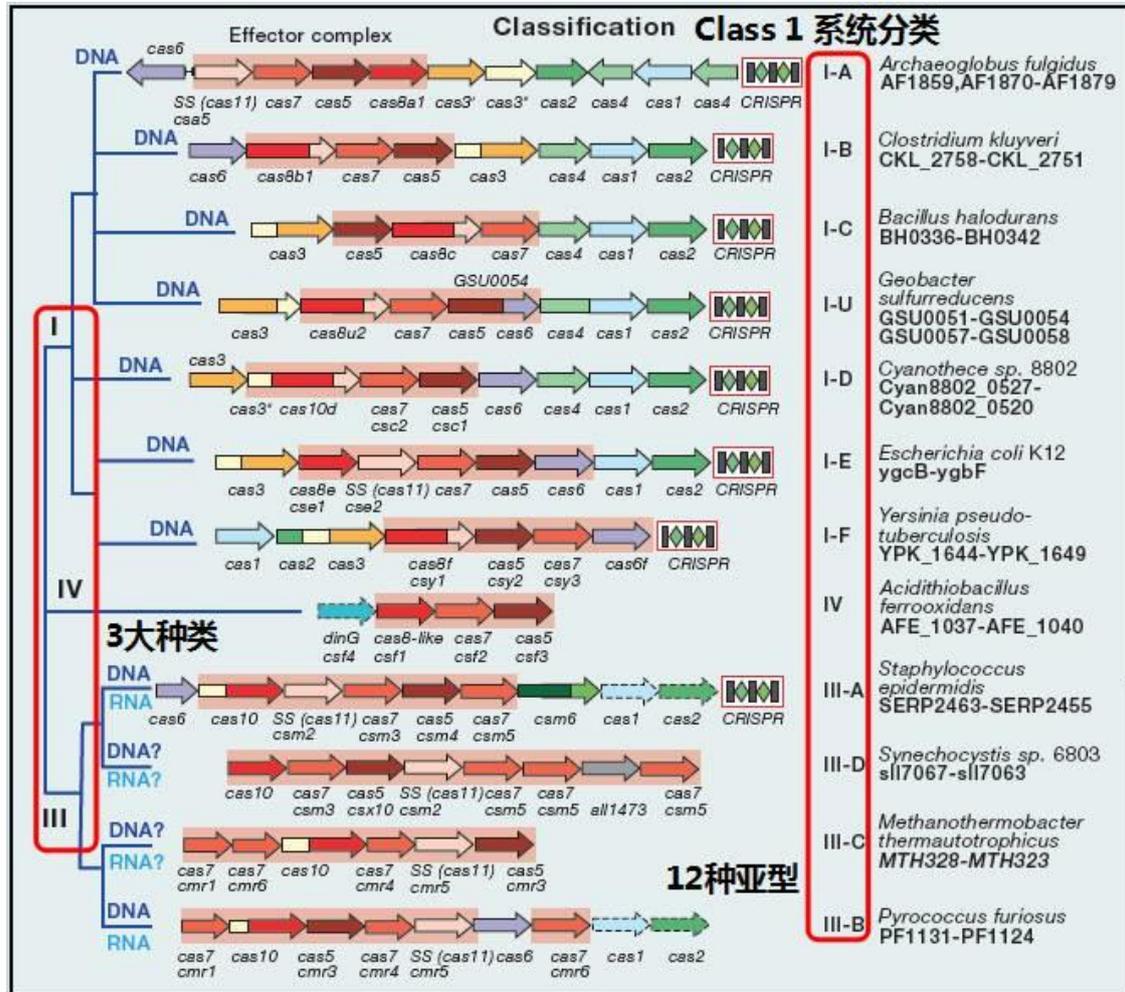


Class 2 系统 **Effector protein structures**
单蛋白效应器结构

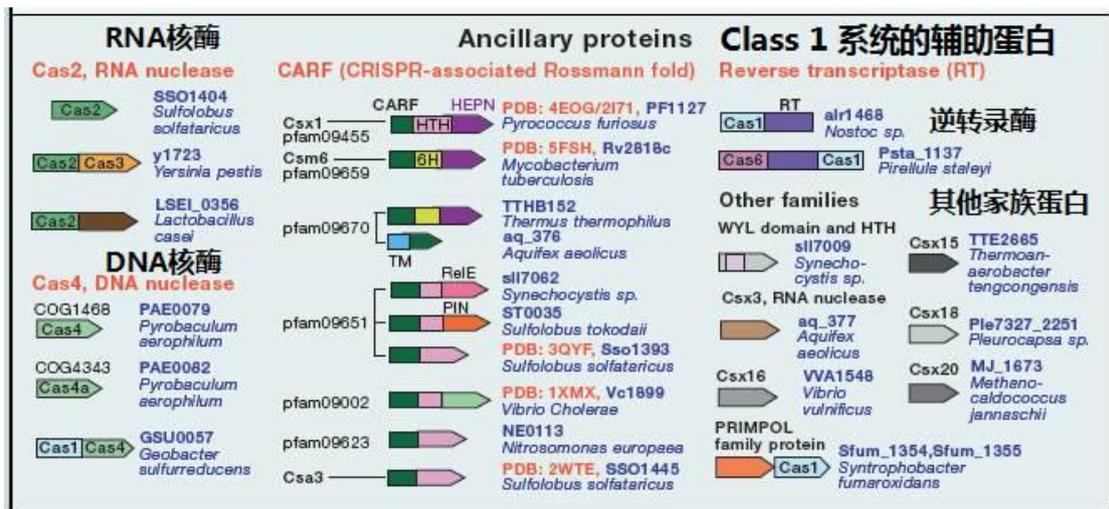


1 类 CRISPR 家族

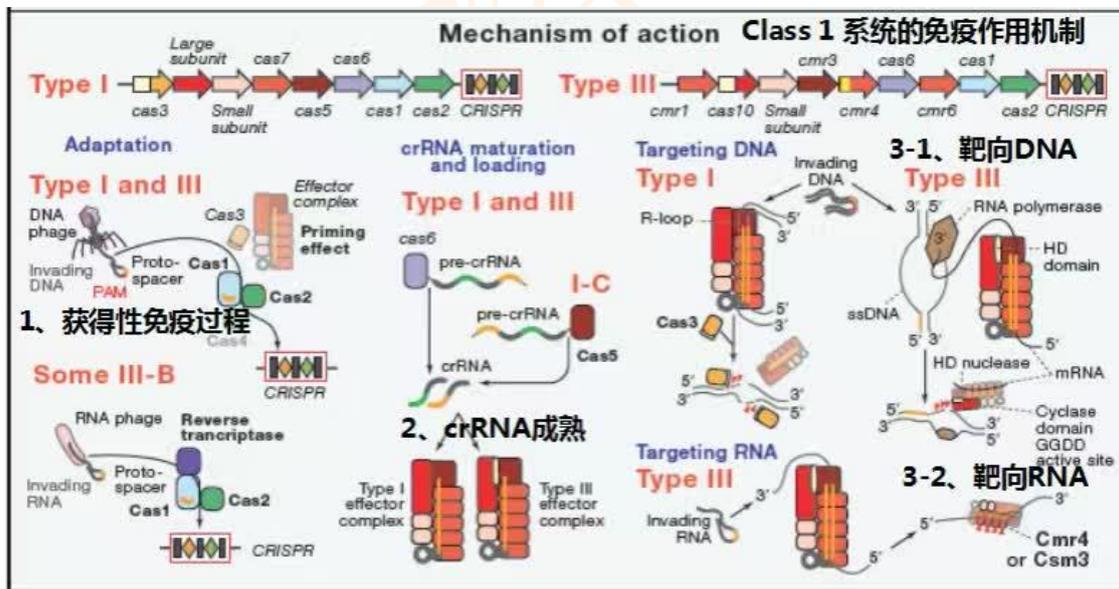
Class 1 系统被分为 3 个类型、12 个亚型（如下图）。多种细菌和古细菌中均含有该类系统，比如嗜热微生物中富含 1 类 III 型 CRISPR-Cas 系统。



除了常见的 Cas 蛋白外,1 类 CRISPR-Cas 系统中还有一些其他辅助性蛋白,如逆转录酶(RT)、CARF 蛋白家族。



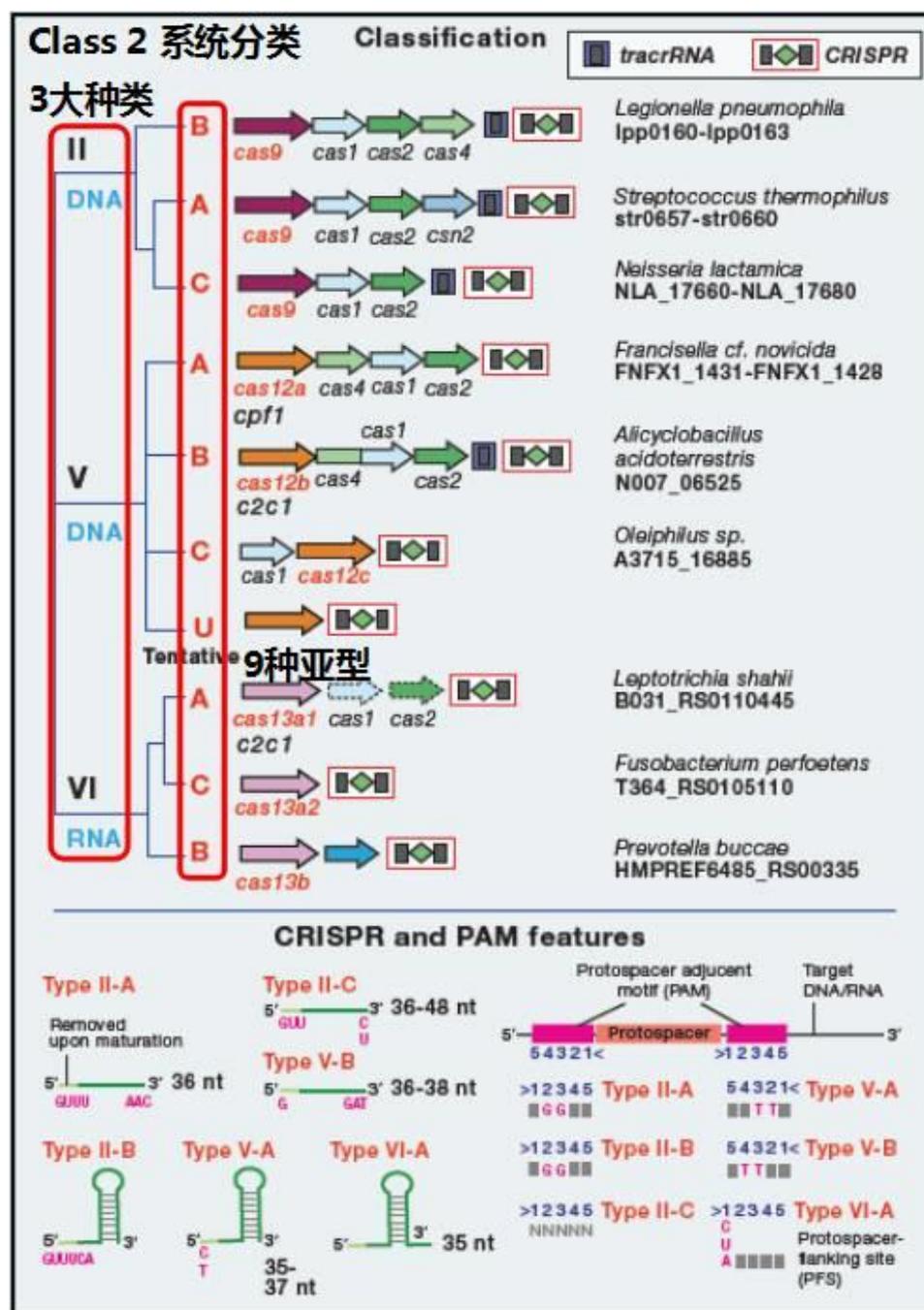
该系统在形成获得性免疫记忆时，除了一些不走寻常路的 III-B 系统（对逆转录酶情有独钟），其他的则是完全仰仗 Cas1 和 Cas2 这两个左膀右臂，尤其对 Cas1 的核酸酶活性十分依赖。通常 Pre-crRNA 会携手 Cas6/ Cas5d 进化为成熟 crRNA，并结合相应蛋白组装成复合形式；而后再在外源分子入侵时，复合物会招募御用的 Cas3 核酸酶对“侵略者”进行切割瓦解。



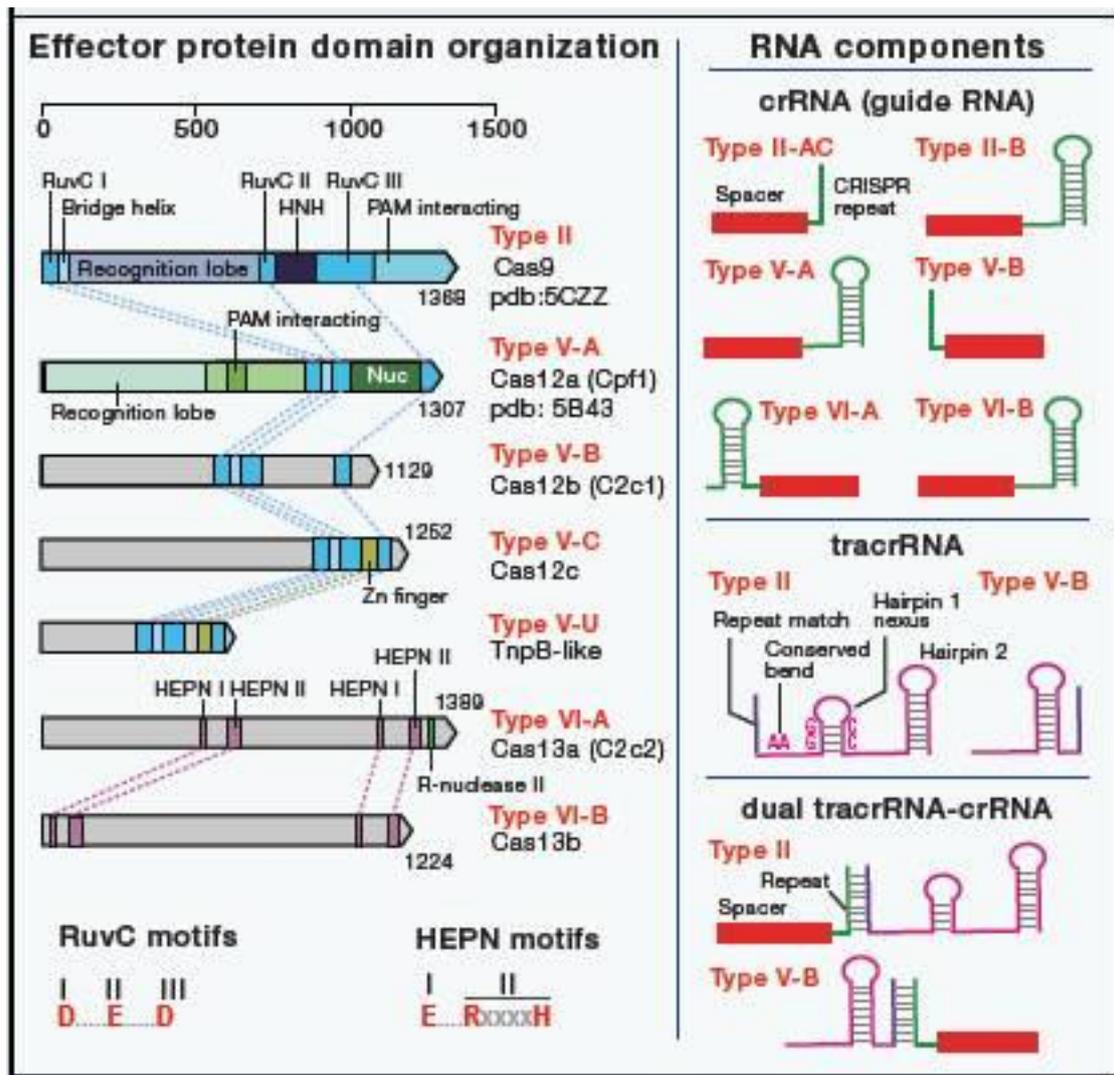
正所谓，道高一尺魔高一丈。外源“侵略者”也不是好欺负的，为了抵抗细菌的这套 CRISPR 免疫系统，已有某些噬菌体能够编码多种抗 CRISPR 蛋白（Anti-CRISPR Protein），来进行免疫逃逸。

2 类 CRISPR 家族

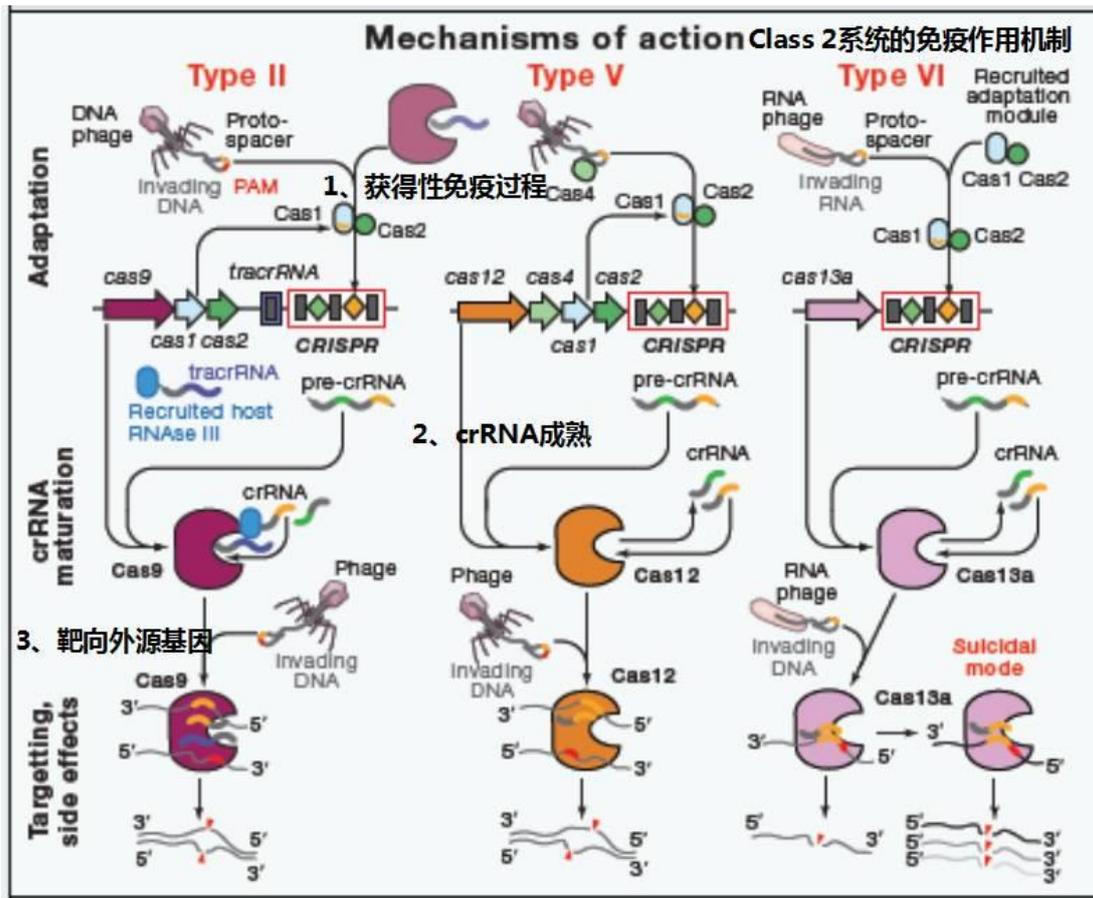
目前，2类 CRISPR-Cas 系统被分为 3 种类型、9 个亚型。该系统的大多数会编码 Cas1、Cas2 和一些辅助蛋白如 Cas4，而只有 VI 型系统独树一帜，仅由 CRISPR 阵列和效应蛋白组成。



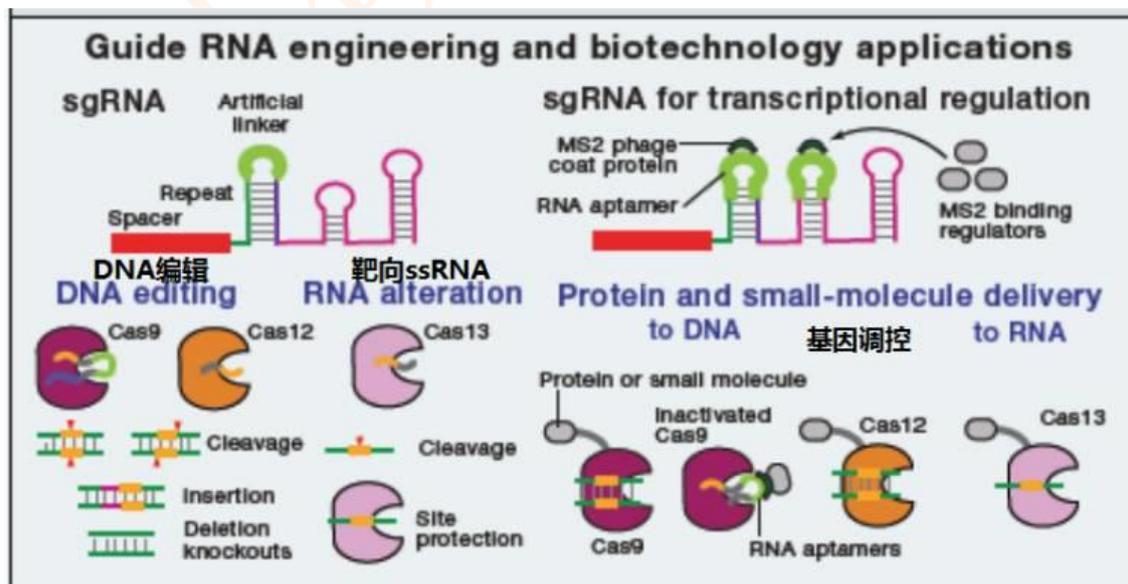
2 类系统主要有 3 类效应蛋白：RuvC 样核酸酶结构域（RNA 酶 H 折叠）、HNH 家族核酸酶和 HEPN 超家族的两个核糖核酸酶结构域。且不同于 1 类 CRISPR，CRISPR/Cas9 系统在清除外源基因的过程中有着特殊的机制：首先需要 tracrRNA，其次需要体内 RNaseIII 的参与。



另外，对外源基因常被 CRISPR/Cas9 系统 KO 的方式如下：1) tracrRNAs 和 pre-crRNA 中的重复片段区域杂交，Cas9 和 crRNA-tracrRNA 结合；2) RNase III 从 spacer 的 5' 端开始剪切，产生不同类型的成熟的 crRNA-tracrRNA-Cas9 的复合物；而后复合物通过 PAM 位点与相匹配的外源基因结合并剪切。



目前 2 类系统主要应用于以下三个方面：1) 基因编辑，包括基因敲除、基因敲入以及引发突变；2) 基因调控以及递送各种功能的部件（如转录因子）到 DNA 中特定的位置；3) 靶向 ssRNA。



参考文献：1、SnapShot: Class 1 CRISPR-Cas Systems

2、SnapShot: Class 2 CRISPR-Cas Systems

3、SnapShot: CRISPR-RNA-Guided Adaptive Immune Systems

科研老司机的套路哲学（五）

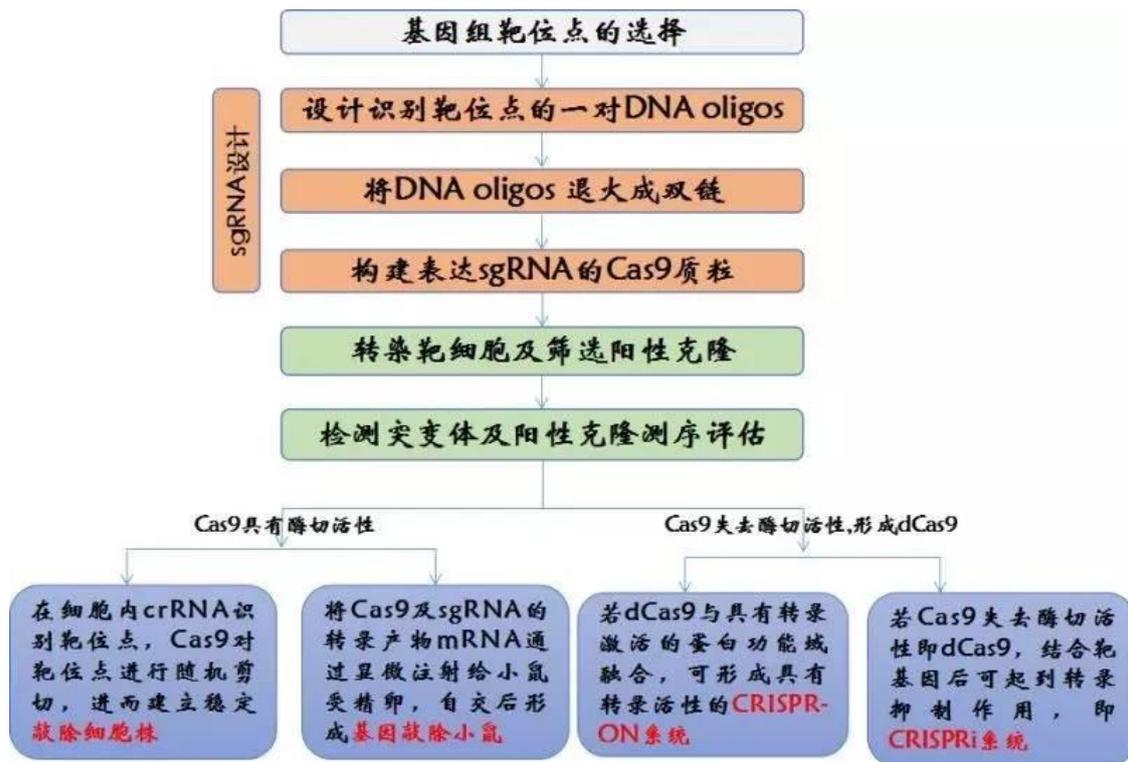
作者：子非鱼

Ngage 目前仍没有人重复出结果，所以现在的基因编辑还是要靠老司机 CRISPR 出马。今天就说说 CRISPR 的实验操作流程。

2016 年 5 月，韩春雨及其 Ngago 基因编辑技术火速刷屏了科研届的朋友圈，然而时隔两个月，因该技术的重复性差，使得韩教授再次走到风口浪尖。方舟子也借此发表了他的“高谈阔论”，一时间是非真相扑朔迷离。而近日，韩教授也全面公开了详细 protocol 以帮助其他人的重复实验工作，在此小鱼也真心期望这项技术的确真的切实有效。

既然说到 DNA 引导的基因编辑，就不得不提到其他的以 RNA 引导的基因编辑——CRISPR/Cas9。相比 Ngago，CRISPR 系统自横空出世后，便使其“前辈”——锌指核酸酶（ZNF）、TALEN 技术乏人问津；且其强大编辑功能在历经千锤百炼之后仍在不断升级进化——目前为了实现更精准的基因编辑，已由日本科学家们完成了该系统进行单个碱基编辑的进化。

那么为了让广大的科研汪们体验一把上帝造物感觉，小鱼就将 CRISPR 的实验操作流程分享给大家。



sgRNA 设计

因 CRISPR 系统的靶点由 19 个碱基构成，靶点前面为转录起始信号 G，靶点后面为 PAM 序列——NGG。因而在设计基因敲除时，可在基因的起始密码子(ATG)附近及下游查找 GN20GG 序列作为靶点。如果没有合适的序列，也选择 N20GG 序列作为靶点，构建载体时，人工加上一个 G 作为启动信号。

举个例子，以人的 MET 基因 (GeneID: 4233) 为例，可选的靶点如下：

```

      Start Codon      靶点 1
ATAAACCTCTCATAATGAAGGCCCCCGCTGTGCTTGACACTGGGCATCCTCGTGCTCCTGTTTACCTTGGTGCAGAGGAGC
靶点 2
AATGGGGAGTGTAAGAGGCACTAGCAAAGTCCGAGATGAATGTGAATATGAAGTATCAGCTTCCCAACTTCACCGCGGA
AACACCCATCCAGAATGTCATTCTACATGAGCATCACATTTTCTTGGTGCCACTAACTACATTTATGTTTTAAATGAGG
AAGACCTTCAGAAGGTTGCTGAGTACAAGACTGGGC
  
```

Note:1) 一般建议构建 2-3 个靶点的基因敲除载体，再从中选出敲减效率较佳的靶点

2) Cas9Nickase 需要挑选成对的靶点。一般在正义链和反义链上分别挑选相距 20-30bp 的

靶点配对。

其次，需要设计识别靶位点的一对 DNA oligos。将靶位点的 23 至 250bp 的外显子序列输入到以下在线设计的工具（1、麻省理工学院的 CRISPR Design: <http://crispr.mit.edu/>；2、德国癌症研究中心的 E-Crisp: www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr）的 Input 框中。而后，依据 score 的高低选取合适的 Guide 序列。根据酶切方式，选择合适接头，以 Bbs1 酶切为例：

5-CACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3
3-CNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-CAAA-5

Note:a) 合成的寡核苷酸质量对于能否成功构建载体至关重要，请务必委托值得信赖的公司进行合成。b) 必须 PAGE 纯化寡核苷酸。

构建表达 sgRNA 的 Cas9 质粒（以 pGK1.1 为例）

Oligo DNA 退火反应：用水将合成后的 2 条单链 oligoDNA 稀释成 100uM，按以下体系配制退火反应体系：

正链 Oligo(100μM)	0.5μl
负链 Oligo(100μM)	0.5μl
ddH ₂ O	18μl
Annealing Buffer(20x)	1μl
<hr/>	
	20μl

将上述体系瞬时离心后，置于 PCR 仪中，95℃ 孵育 3min，自然冷却 20min 后，链接至载体中。

pGK1.1 linear vector	2 μ l
双链 DNA	1.75 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l
10xT4 DNA Ligase Buffer	1 μ l
ddH ₂ O	4.25 μ l
	<hr/>
	10 μ l

将连接产物转染 DH5a 高效感受态细胞，因 pGK1.1 的抗性为卡那霉素抗性，筛选后的阳性克隆，需要测序验证序列的正确性。

转染靶细胞并进行阳性克隆筛选

转染前用去内毒素试剂盒进行质粒抽提，确保质粒浓度 $\geq 2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 浓度。再取 4-7 μg 进行转染靶细胞（贴壁细胞的数量为 1×10^6 — 3×10^6 ，悬浮细胞数量为 3×10^6 — 5×10^6 ）。如果细胞用脂质体转染困难，则推荐使用电转法。

然后，在转染 48h 或 72h 后提取细胞基因组 DNA，用提前设计好的检测 On-target 或 Off-target 引物（上游引物在靶位点约 100bp，下游引物在靶位点约 200bp）对目的片段进行 PCR 扩增。

检测突变体及阳性克隆测序

1) 测序评估

将 PCR 产物连接进 T 载体中，转化进 DH5a 细菌，随机挑取 15-20 个单菌落进行测序，评估目标片段被切割后碱基变化和切割效率。

```

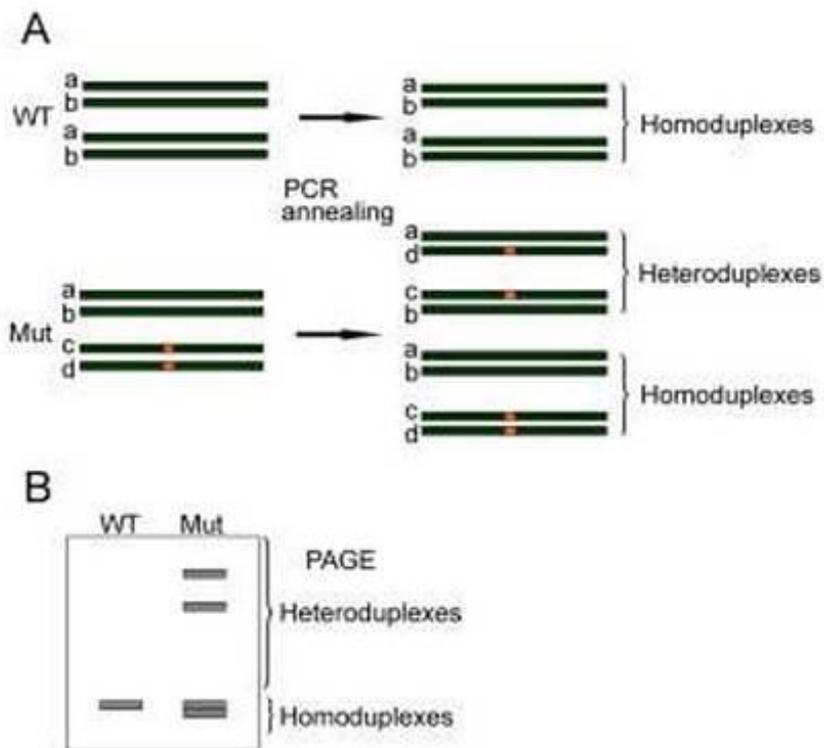
CTTGACAGCAACCTTAGTGGACAGCATCTCGACCATGGCTC WT
CTTGACAGCAACCTTAGT-----ACAGCATCTCGACCATGGCTC -2bp
CTTGACAGCAACCTT-----GGACAGCATCTCGACCATGGCTC -3bp
CTTGACAGCAACCTT-----GACAGCATCTCGACCATGGCTC -4bp
CTTGACAGCAACCTTAG-----CATCTCGACCATGGCTC -7bp
CTTGACAGCAACCTTAG-----ATCTCGACCATGGCTC -8bp
CTTGACAGCA-----TCTCGACCATGGCTC -16bp

```

单克隆测序比较

2) PAGE 胶检测突变体

制备非变性 PAGE 胶，检测 PCR 产物，检测 On-target 或预测的 Off-target sites 位点（可选方法）。

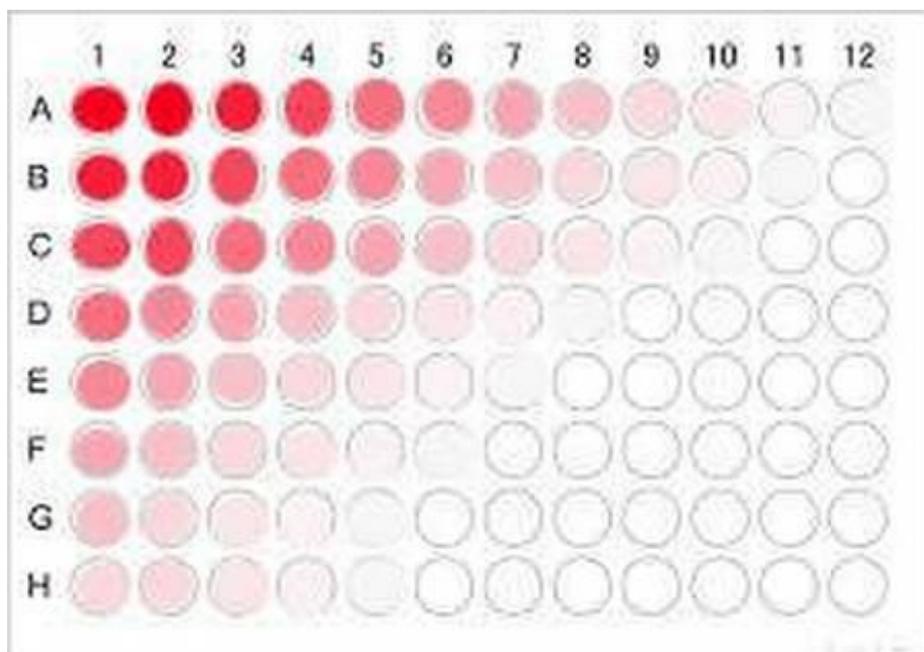


PAGE 胶检测突变体模式图

3) 稀释法筛单克隆

如果选择的质粒中含有荧光标记，可用流式细胞术直接分选带有荧光的细胞；或者也可将转

染的靶细胞从 A1 孔（细胞原液约 1000 个细胞/孔，数量根据细胞状态进行调整）至 H1 孔对半稀释，然后第一列再横向对半稀释，并用荧光显微镜观察细胞克隆生长情况，选择带有荧光的克隆，提取部分细胞的基因 DNA 进行 PCR 扩增，在琼脂糖凝胶电泳后将 PCR 产物直接送去测序。



至此，即可获得相应的基因敲除细胞。

此外，小鱼温馨提示，在做 CRISPR 实验之前，请您务必做好以下验证实验：

A、单细胞生长情况，确保单个细胞也可以正常生长形成单克隆，即低密度的细胞在培养皿中也可形成单克隆。

B、目的基因的表达情况分析，为防止因染色体缺失等情况导致靶基因缺失，首先需要 PCR 扩增靶基因，并对 PCR 结果进行测序，确保靶基因的完整存在；其次，您还可以用 RT-PCR 分析靶基因的活跃度。

Cell 子刊：无需克隆的高效 CRISPR 新技术

作者：子非鱼

当今红得发紫的具有间断重复序列的 CRISPR/Cas 系统，已经成为一种广泛使用的高效的基因编辑工具，它能以一种位点特异的方式对基因进行改造，如突变、删除和插入特定的基因。

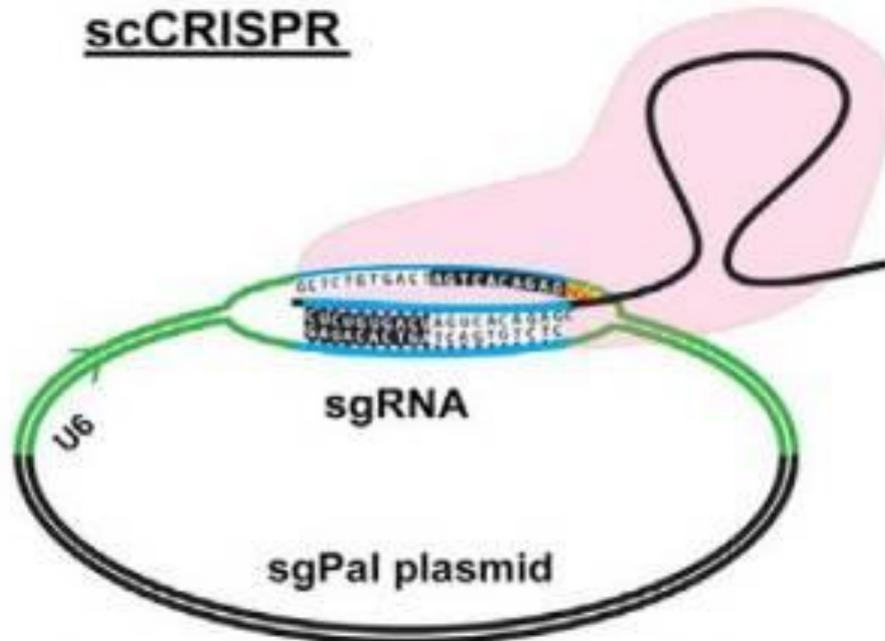
在 CRISPR 介导的基因编辑中，Cas9 蛋白先与靶向任何感兴趣基因的 sgRNA 发夹结构结合，然后“磨刀霍霍”向双链 DNA。利用 CRISPR 实现特异性位点突变和靶向转基因，无论是对于疾病和发育的研究，还是遗传和干细胞的研究，都带来巨大的便利。

目前，CRISPR/Cas9 编辑技术需要分子克隆出一个带有新的特定位点的 sgRNA，这个过程要经历质粒连接、转化、纯化和序列鉴定等耗时耗力的步骤，这至少得花上一周的时间来完成。这些繁琐的步骤影响了需要进行大规模 sgRNA 筛查的多重和高通量基因编辑应用。另外，采用 CRISPR/Cas9 敲入如 GFP 这样的基因需要耗时地构建具有 60-6000bp 同源臂的同源性载体，这一费力艰辛的过程会阻碍基因敲入细胞系的建立。这削弱了大规模基因操控革命性的潜力。

在《Stem cell reports》上发表的这篇文章中，作者提出了一种替代的 sgRNA 和同源性载体新方法，这可以避免费时费力的质粒克隆实现 CRISPR/Cas9 编辑技术工作量和成本的降低，并可维持特定位点突变和基因转入的高效率。

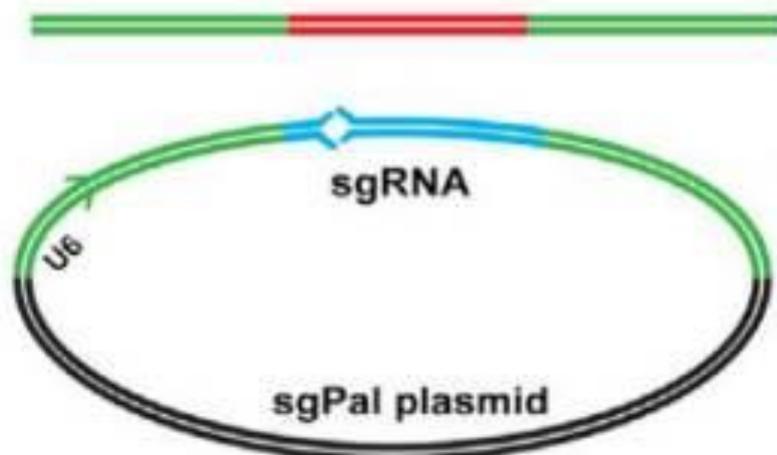
标准的 CRISPR/Cas9 编辑技术是这样的：找到具有特定位点的 sgRNA 序列，它就会被克隆到具有 Cas9 基因和能启动 sgRNA 转录的 U6 启动子的质粒中，然后重组质粒转入细胞中。因此，每一个具有新位点 sgRNA 的质粒都需要进行一次分子克隆。而文章作者提出的这种新方法，称为 scCRISPR，是利用一种能够自我切割的回文结构 sgRNA 质粒，和一条编码了所需特异性位点的 sgRNA 的双链 DNA 短序列导入到细胞中，利用同源重组组成特异性 sgRNA 质粒。相比以往需要花上一周的 sgRNA 质粒构建，利用同源重组实现的特异性 sgRNA 质粒只需要花 2 个小时。研究人员在小鼠和人类胚胎干细胞、HEK293T 细胞中验证了这种方法所能达到的基因编辑效率。

scCRISPR



Cas9-Palindromic sgRNA (sgPal)
complex cleaves complementary
sgPal plasmid

PCR amplified sgRNA Homology Template



Cleaved sgPal plasmid is repaired by
homologous recombination with a PCR-
amplified sgRNA homology template

(scCRISPR 原理)

这种新方法很大程度上简化了基因转入和基因敲除的过程，也不会影响效率，这为大规模的基因编辑和筛查应用提供了理想的平台。

Cell 子刊：无需克隆的高效 CRISPR 新技术

作者：lemon

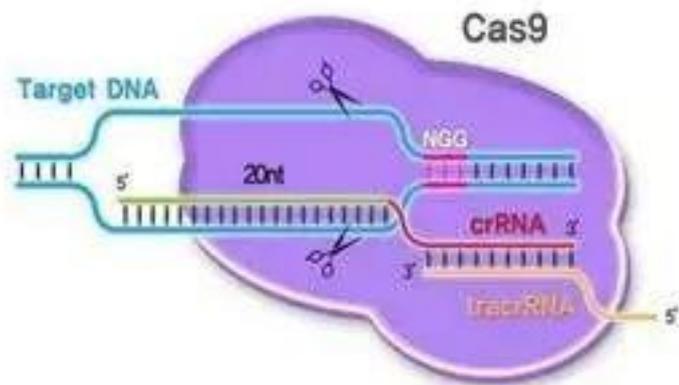
基因编辑是一种遗传工程技术，针对某个序列已知但功能未知的序列，通过改变生物的遗传基因，使其特定的基因功能丧失作用，通过研究对生物体造成的影响，进而推测出该基因的生物学功能。本文为你科普基因编辑三大技术：

基因敲除

进行 DNA 水平编辑。一般用于构建基因敲除鼠模型。

CRISPR/Cas9: CRISPR/Cas9 系统作为细菌和古细菌的获得性免疫系统,通过 RNA 介导特异性的切割外源遗传物质,用以对抗入侵的病毒和质粒。使用 Cas9 切口酶和一对 sgRNA,两个相近的切口造成 DNA 双链断裂,诱导细胞发生非同源末端连接修复,造成目的基因的突变。

CRISPR/Cas9 技术自问世以来,取代“锌指核酸内切酶 (ZFN)”、“类转录激活因子效应物核酸酶 (TALEN),成为科研、医疗等领域的有效工具”。一般通过体外转录得到 sgRNA 与 cas9 的 mRNA,通过注射到原核期受精卵内,移植到假孕母鼠体内获得基因编辑的小鼠进行基因功能研究。



构建方法:

确定待敲除基因的靶位点。

设计识别靶位点的识别的一对 sgRNA。

构建可表达 sgRNA 的 Cas9 质粒。

体外转录 sgRNA 和 Cas9 RNA。

将 sgRNA 和 Cas9 RNA 直接注射入受精卵检测 sgRNA 活性。

将有活性的 sgRNA 和 Cas9 RNA 直接注射入受精卵建立 Founder。

将 Founder 自交得到 F1 代。

适用范围:

制备敲除鼠，利用敲除鼠进行基因功能的研究；进行细胞水平敲除基因时，可以选择慢病毒载体，构建 lenticrispr-v2 质粒，通过包装病毒进行细胞水平敲除。

基因敲减

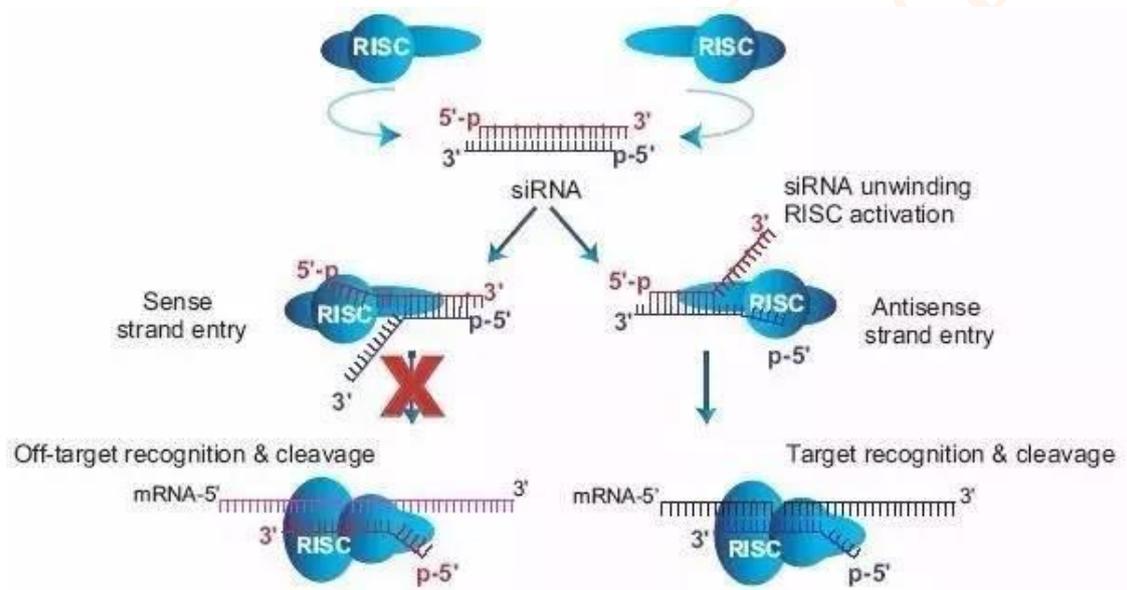
RNA 水平，是指通过降解具有同源序列靶基因的 mRNA，达到阻止基因表达的作用。一般用

于细胞水平敲减基因。

(1) RNA 干扰:

是 siRNA 双链结合一个核酶复合物从而形成所谓 RNA 诱导沉默复合物 RISC。激活的 RISC 通过碱基配对定位到同源 mRNA 转录本上，并在距离 siRNA 3' 端 12 个碱基的位置切割 mRNA，该 mRNA 发生降解而导致基因表达沉默，是一种特异性的转录后基因沉默。

一般合成针对靶基因的 siRNA,通过转染的方法使之进入细胞内，使靶基因沉默。这一方法受转染效率的影响较大。目前有不少基因的 siRNA 已经有商业产品，所以使用时买来就可以了，比较方便。



适用范围:

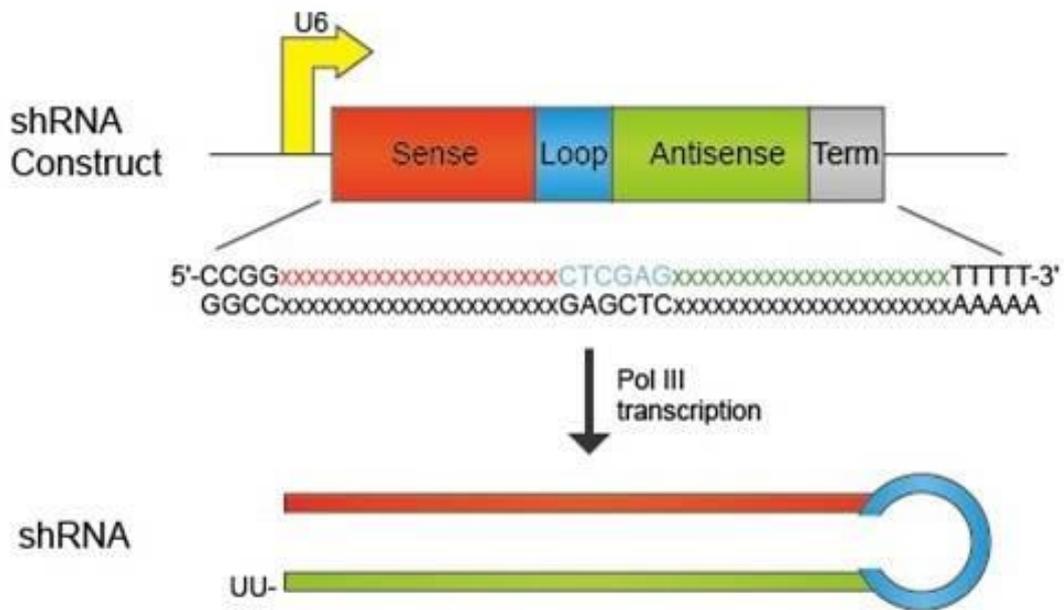
一般通过公司合成后，通过转染细胞进行细胞水平敲减。

(2) shRNA:

“短发夹 RNA”，shRNA 包括两个短反向重复序列，中间由一茎环（loop）序列分隔的，组成发夹结构，由 polIII 启动子控制。随后再连上 5-6 个 T 作为 RNA 聚合酶 III 的转录终止子。

构建 shRNA 的病毒表达载体，常用的病毒载体有腺病毒载体、腺相关病毒载体、慢病毒载体等，机制与质粒载体相似，利用了病毒感染细胞效率比较高的特点，解决了用质粒载体转染

效率低的缺陷。



构建方法:

shRNA 设计: 设计 RNA 干扰序列是 RNAi 实验的关键。

载体构建: 可根据实验需求选择慢病毒、腺病毒载体。

转染细胞: 常用的方法包括磷酸钙转染、脂质体转染、电穿孔转染等

观测 GFP 荧光和稳定表达细胞系筛选: 可用于带有 GFP 标签的质粒载体。

检测 RNA 干扰效率: 可以在蛋白水平或 mRNA 水平检测 RNA 干扰效率。

适用范围:

一般通过构建慢病毒、腺病毒等进行细胞水平敲减。

11 CAR-T 实验技术

科研老司机的套路哲学（四）

作者：子非鱼

CAR-T 研究中都有 CAR 了，老司机怎么会放过呢。

肿瘤，封印人类寿命的沉重枷锁

它以不死之身的强悍特质

突破了正常细胞的轮回

以致临床上难以找到有效根治的办法



于是，肿瘤横刀立马高声吆喝道：

谁敢杀我？！

此时，CAR-T 技术横空现身

CD19 大刀一闪，

急淋白血病的头颅翻滚马下



诚然，CAR-T 在血液肿瘤领域里

大刀阔斧，所向披靡

但抗肿瘤之路漫漫其修远兮

实体瘤凭着三大护体铠甲：

肿瘤微环境、抗原异质性、是靶向/非肿瘤毒性

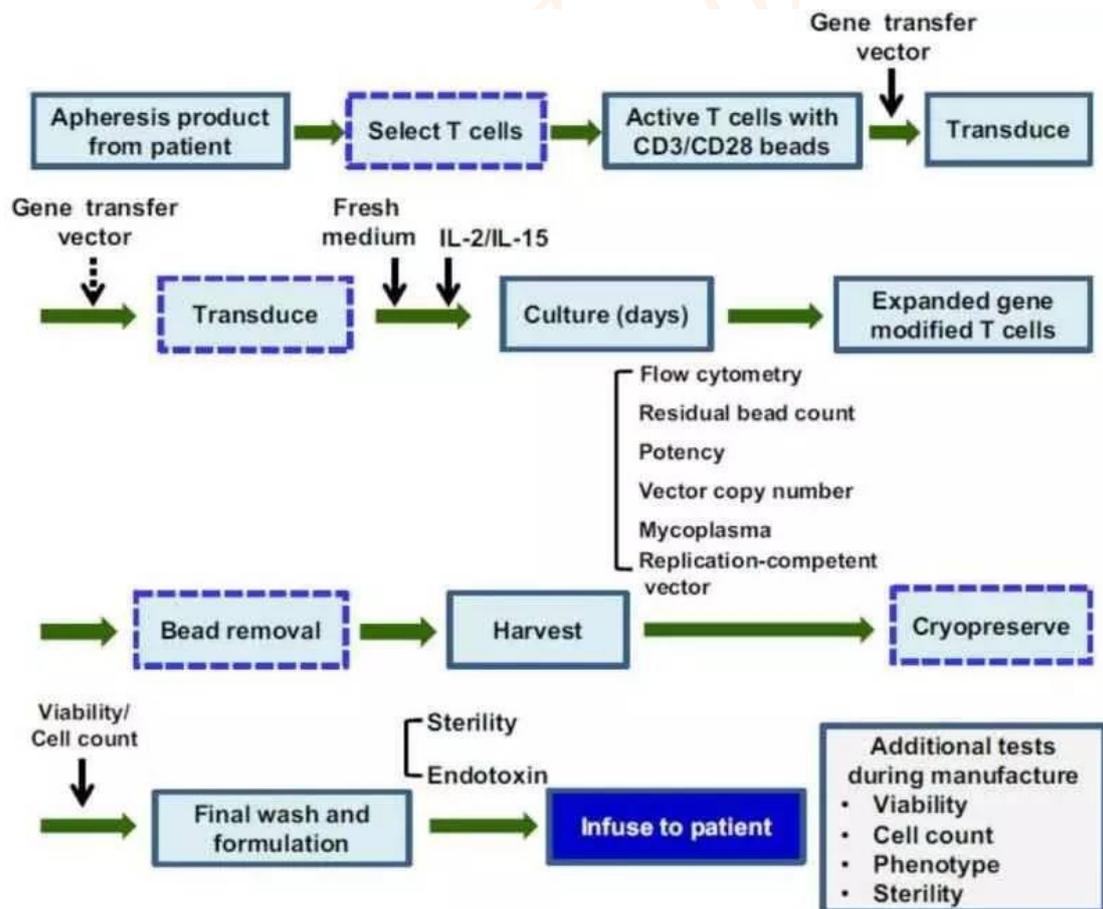
令 CART 不得不铩羽而归



为了暴揍实体瘤

科研汪们如打了鸡血一般

一头扎进 CAR-T 实体瘤研究



然而

CART 基础实验部分暗流汹涌

一旦雷区被踩中

无不被雷的外焦里嫩

科研汪们不禁感叹道

一入 CAR-T 深似海

从此节操是路人



实体瘤靶点正如一座座金矿

正等待着 CAR-T 淘金者

逐一挖掘

最佳抗原是肿瘤特异性抗原（TSA）

且其分泌量最少

多数是肿瘤相关抗原（TAA）

肿瘤细胞高表达、正常组织中低表达

目前，clinical Trail 注册在案的

CART 实体瘤临床实验主要靶点如下：

靶标	CART结构	恶性肿瘤	机构	Reference
PSMA	CD3 ζ and CD28	前列腺癌	MSKCC	NCT01140373 (REF. 76)
			Roger Williams	NCT00664196 (REF. 78)
Mesothelin	CD3 and 4-1BB	恶性胸膜间皮瘤	UPenn	NCT01355965 (REF. 81)
		胰腺癌	UPenn	NCT02465983 (REF. 156)
		转移性胰腺（导管）腺癌	UPenn	NCT02159716 (REF. 84)
	CD3 ζ and CD28	上皮性卵巢癌	MSKCC	NCT02414269 (REF. 85)
		上皮恶性胸膜间皮瘤		
CD3 ζ CD28 and 4-1BB	间皮瘤，胰腺癌和卵巢癌	NCI	NCT01583686 (REF. 86)	
FAP	CD3 ζ and CD28	间皮瘤	University of Zurich (Switzerland)	NCT01722149 (REF. 90)
EGFRvIII	CD3 ζ and 4-1BB	神经胶质瘤	UPenn	NCT02209376 (REF. 95)
	CD3 ζ , CD28 and 4-1BB	神经胶质瘤	NCI	NCT01454596 (REF. 97)
EGFR	Unknown	恶性胶质瘤	Renji Hospital (China)	NCT02331693 (REF. 98)
CEA	CD3 ζ and CD28	肝转移癌	Roger Williams	NCT02146466 (REF. 100)
	Unknown	肺，结直肠，胃，乳腺与胰腺癌	Southwest Hospital (China)	NCT02349724 (REF. 103)
CD171	CD3 ζ and 4-1BB or CD3 ζ , CD28 and 4-1BB	神经母细胞瘤	Seattle Children's	NCT02311621 (REF. 106)
GD2	CD3 ζ , OX40, CD28	成神经细胞瘤，骨肉瘤	NCI	NCT02107963 (REF. 112)
		黑色素瘤		
	成神经细胞瘤	Baylor	NCT01822652 (REF. 114)	
	CD3 ζ , OX40, CD28, virus specific	肉瘤	Baylor	NCT01953900 (REF. 115)
Glypican-3	CD3 ζ , CD28 and 4-1BB	晚期原发性肝细胞癌	Renji Hospital (China)	NCT02395250 (REF. 117)
HER2	CD3 ζ and CD28 virus specific	肉瘤	Baylor	NCT00902044 (REF. 122)
			Baylor	NCT02442297 (REF. 126)
	CD3 ζ and CD28	胶质母细胞瘤	Baylor	NCT01109095 (REF. 127)
		多形性胶质母细胞瘤		
IL-13	R α CD3 ζ and 4-1BB	胶质瘤	City of Hope	NCT02208362 (REF. 131)

正所谓：靶标易得，抗体难筛

scFv 序列浩如烟海，鱼龙混杂

要大海捞针，可真是难于上青天

好在文献、专利中已有现成的

亲和力高的抗体

作为伸手党

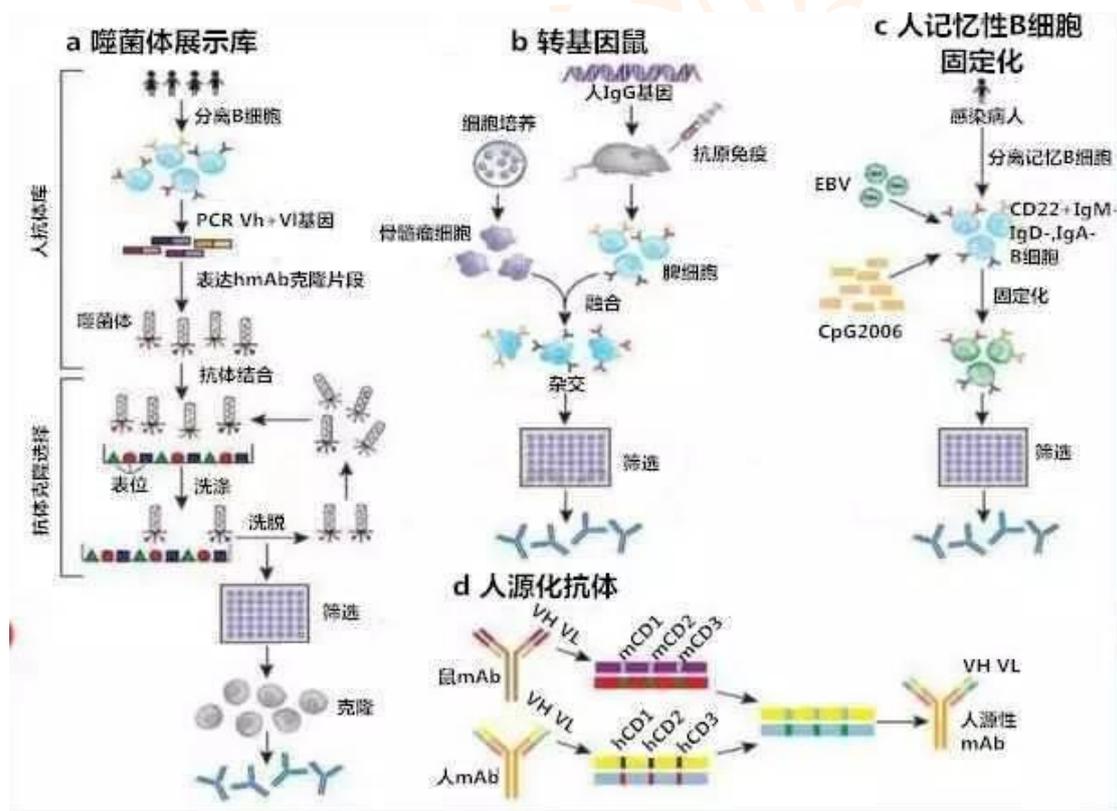
此时可将拿来主义进行到底

但小伙伴中不乏科学狂人

就是任性的要自己筛抗体

因而

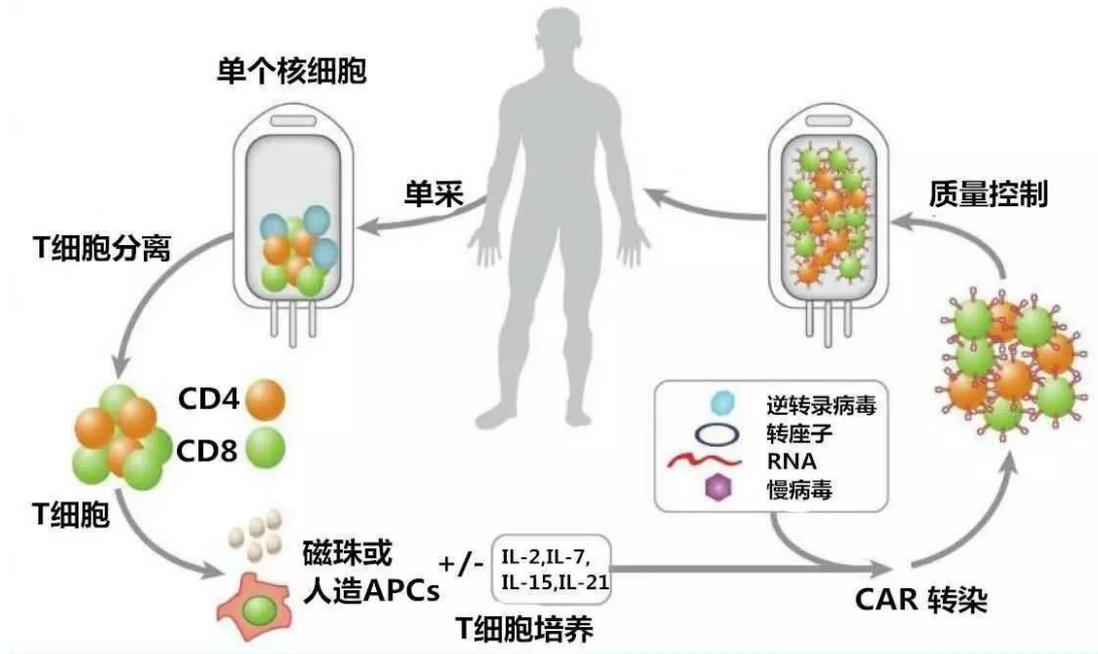
小鱼把压箱底的秘籍拱手相送



scFv 序列筛选过程

接下来，小鱼就要絮叨絮叨

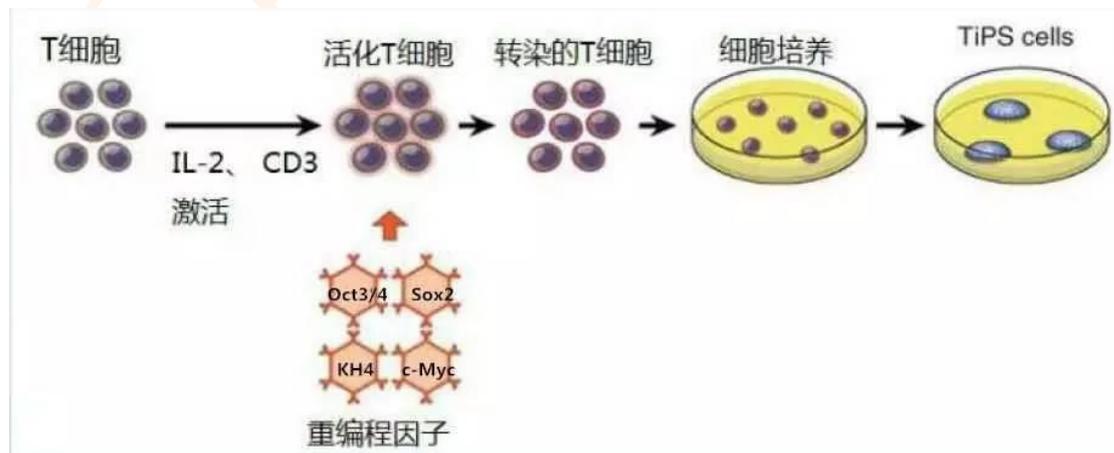
高大上 CART 分子是怎样炼成的



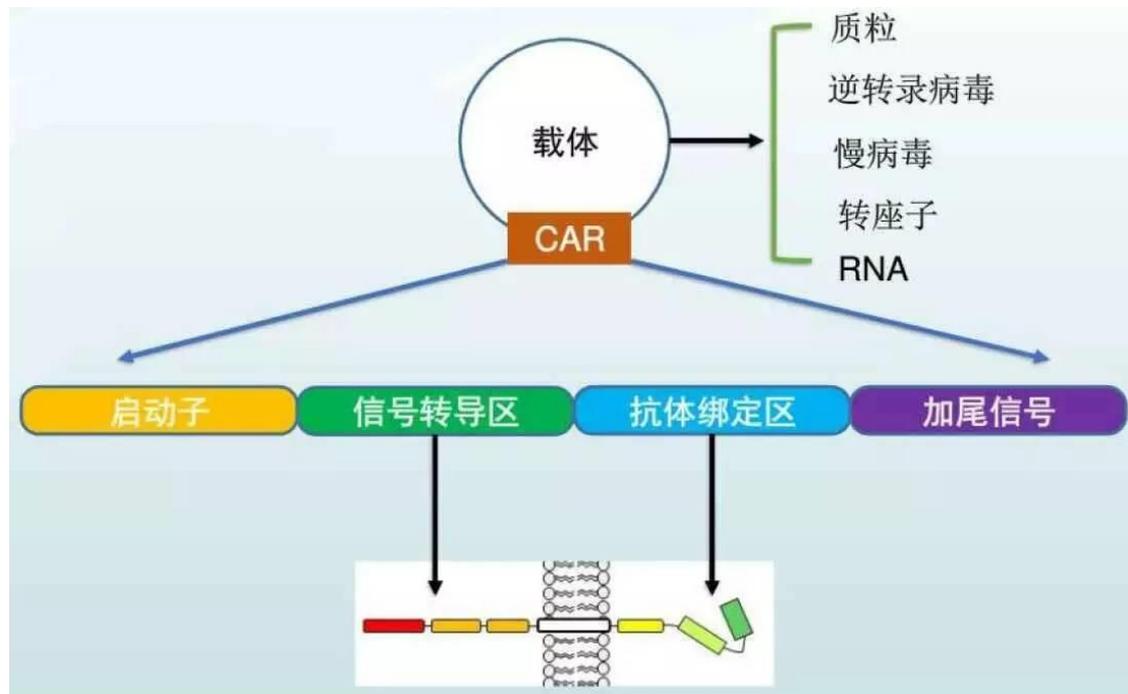
1.T 细胞培养

传统方法：IL-2、丝裂原、人造 APC 等

重编程法：类似 iPSC



2.CAR 转染



五大载体系统各有千秋

最适合的就是最好的

大家按需所求即可

载体系统	特点	优势	劣势
逆转录病毒	稳定整合	使用广泛，安全性研究充分	携带DNA片段小 某些细胞修饰率低
慢病毒	稳定整合	转导效率高 可转染静息T细胞	成本高于逆转录病毒 某些情况下有遗传毒性
DNA (转座子)	稳定整合	转基因表达高且持久 成本低	缺乏安全性研究 需要转座酶和转座子
DNA (质粒)	稳定整合	制备成本	长期体外筛选 随机插入风险
RNA	瞬时表达	安全性高	表达时间短

包装慢病毒时

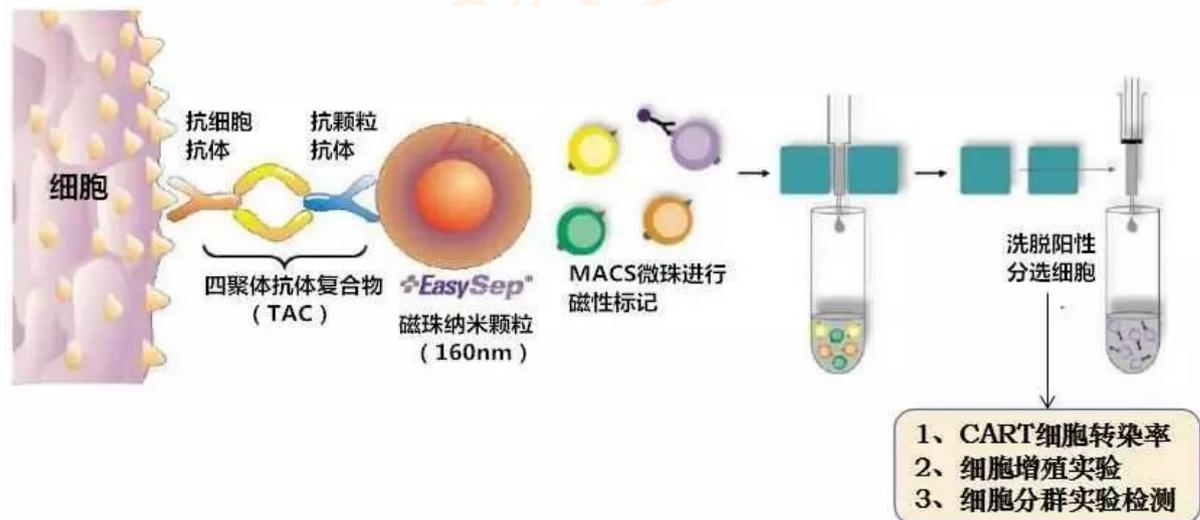
要不惜一切代价

把污染的万恶之源扼杀在摇篮里

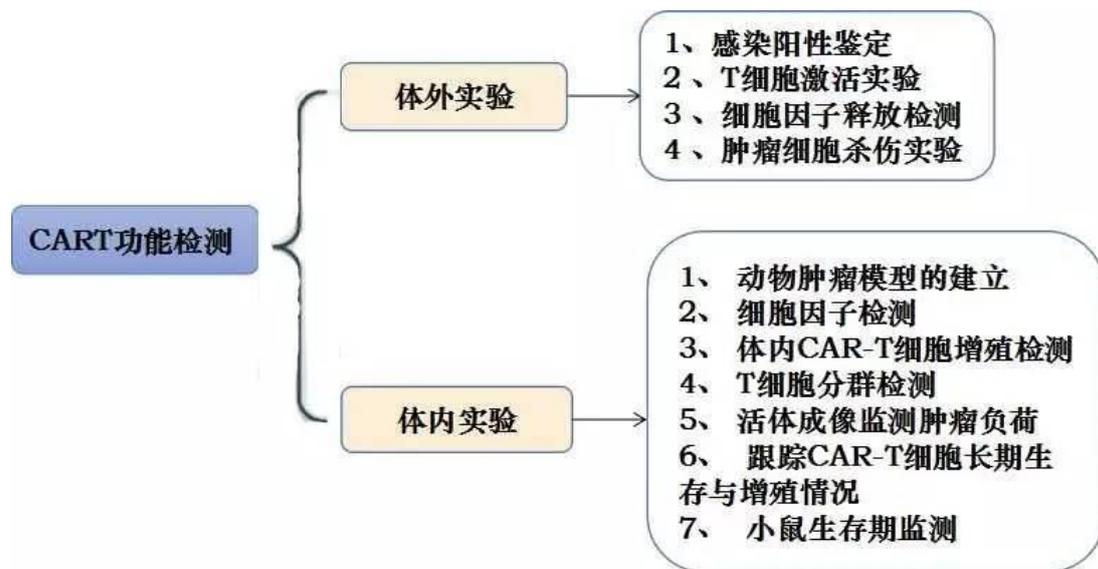
参考 FDA 对生物制剂的筛查方法

检测项目	检测方法	单位	FDA参考范围
支原体	Nest PCR	—	阴性
内毒素	LAL	EU/ml	<50
病毒毒性	LDH	—	无毒性
细菌	培养法	—	阴性
真菌	培养法	—	阴性
总DNA残留	Qubit	ng/ul	0.1-10
BSA残留	ELISA	ug/ml	0.1-30
活性滴度	绝对定量	TU/ml	$\geq 1E+8$

3. CART 细胞的获取



4. CART 功能检测



在此，小鱼良心推荐一种

免疫缺陷程度最高

最适合人源性细胞移植

平均寿命长达 1.5 年

的动物模型——NSG 小鼠

CART 的功能好不好

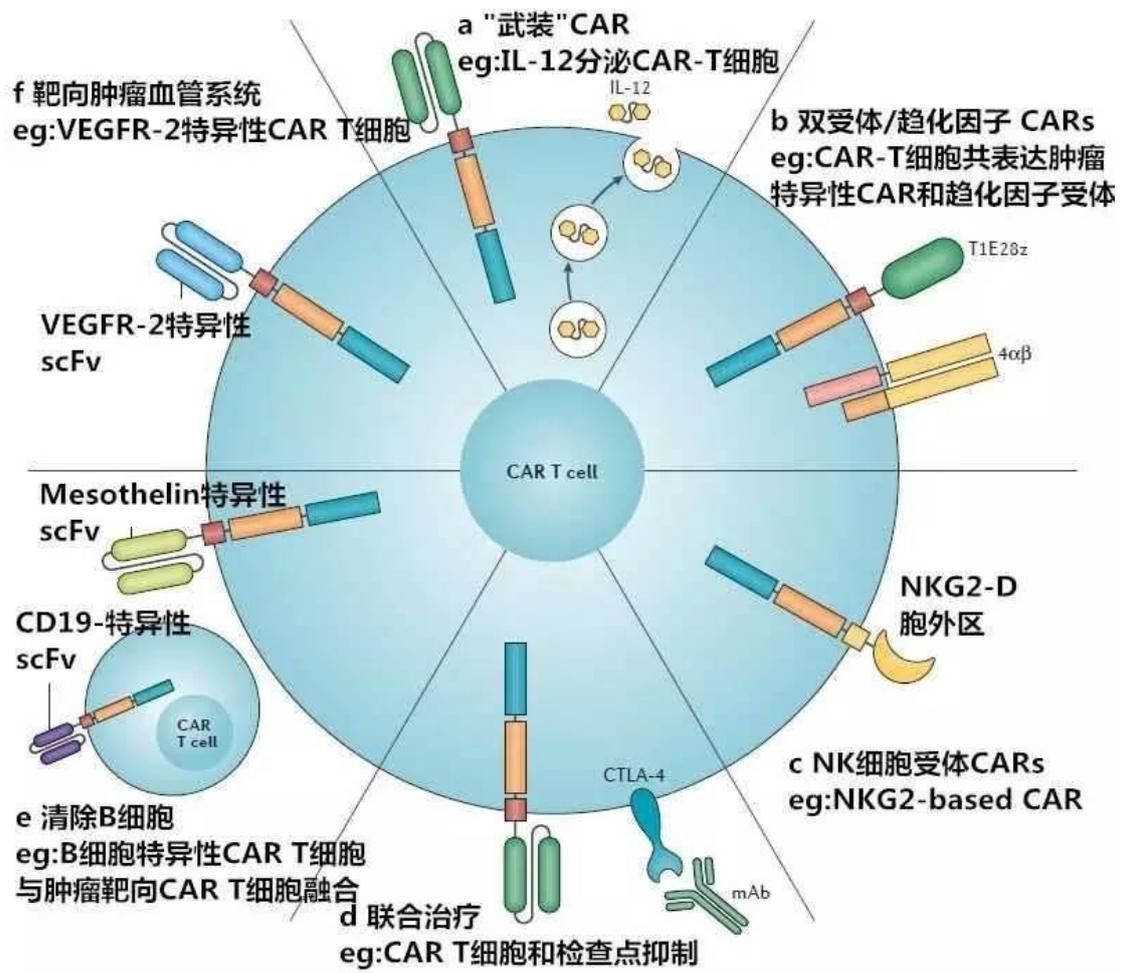
全看 NSG 小鼠行不行

如果还想为 CAR-T 实体瘤研究

来一笔锦上添花

那么以下 6 大法宝

绝对能提高 CART 研究的逼格



如此，CART 实体瘤临床实验研究

不就是分分钟的事儿么？



古人云

大树荫下好乘凉

对于零基础的童鞋而言

也许，只有背靠大树

心中的底气才够足

那么国内到底有哪些平台

拥有成熟的 CAR-T 研究技术呢？

1) 301 医院韩卫东教授领衔的 CAR-T 团队

2) 武汉科技大学张同存教授领衔的科研团队

3) 爱康得生物医学技术（苏州）有限公司

www.icartab.com.cn

4) 吉凯基因化学技术有限公司

http://www.genechem.com.cn/Pro_show.aspx?plb=840

5) 博生吉医药科技（苏州）有限公司

<http://www.persongen.com/>

6) 深圳源正细胞医疗技术有限公司

<http://yz-cell.com/car-t.html>

7) 上海细胞治疗工程技术研究中心

<http://www.shcell.com/>

参考文献:

1. Driving CAR T-cells forward

2. Current status and regulatory perspective of chimeric antigen receptor-modified T cell therapeutics

3. Engineering CAR-T Cells: Design Concepts

12 肿瘤自噬技术

实验设计策略（二）：手把手教你玩转肿瘤自噬研究！

作者：子非鱼

2016年谢幕的诺贝尔奖，捧红了自噬研究。自噬作为细胞内“清道夫”，已经广为人知。在自然界中，自噬的研究也是如火如荼。但是自噬在肿瘤领域中似乎“亦正亦邪”，有时它可启动II型程序性死亡，让肿瘤细胞“一命归西”，有时却又能提高肿瘤细胞对应激的耐受能力，使其“死中求生”。因而，自噬与肿瘤之间的“恩恩怨怨”引得科研界的一众研究者纷纷化身“娱记”，力争挖得第一手“八卦”进行爆料。

其实，自噬就是一把双刃剑，对肿瘤存在促进与抑制双重作用。而这一特性也为肿瘤防治提供了两种截然不同的思路：抑制自噬——提高抗癌治疗效果，或激活自噬——诱导肿瘤细胞发生自噬性死亡。即便如此，两种研究思路的实验研究却是相似的，可以说是殊途同归。那么以文章“Ulinastatin Reduces the Resistance of Liver Cancer Cells to Epirubicin by Inhibiting Autophagy”为栗子，小鱼这就将自噬肿瘤研究的一个入门级参考模板分享给大家。

Ulinastatin Reduces the Resistance of Liver Cancer Cells to Epirubicin by Inhibiting Autophagy

肿瘤自噬研究的一般流程

1、证明自噬参与了研究表型

2、通过抑制剂或激动剂验证自噬在研究表型功能

3、检测自噬相关信号通路，找到表型呈正相关变化的分子

4、通过挽救实验验证该分子在该表型中的作用机制

那么为了更好地玩转自噬研究，小鱼将简单介绍上述研究流程中必备基本工具及实验策略，可使你的实验研究变得事半功倍。

自噬中常涉及的信号通路

正常培养的细胞自噬活性非常低，不便于观察。此时，则可用相应试剂对细胞进行诱导，其后 8 min 内即可观察到自噬体形成，2h 后自噬溶酶体基本降解消失。通常这些试剂是自噬相

应信号通路的抑制剂或促动剂，而目前比较肯定的自噬信号通路可大致分为以下 3 类。

1.抑制类信号通路：1) 在 Class I PI3k pathway (PI—phosphatidylinositol, 磷脂酰肌醇) 中，当血糖水平高时，可接收胰岛素受体传来的信号，进而抑制自噬作用。2) 依赖 mTOR 途径的自噬，如 PI3K-AKT-mTOR 信号通路和 AMPK-TSC1/2-mTOR 信号通路。

2.激活类信号通路：在 Class III PI3K 通路中，beclin1 和 UVRAG 作为正调控子，抗凋亡因子 bcl-2 作为负调控子共同参与调控自噬。其结构上类似于 Class I PI3K，但作用却完全相反。

3.其他信号通路：GTP 结合的 G 蛋白亚基 G α i3 抑制自噬；GDP 结合的 G α i3 蛋白活化自噬。死亡相关蛋白激酶(death-associated protein kinase,DAPK)和 DAPK 相关蛋白激酶(DAPK-related protein kinase-1,DRP-1)可诱导自噬。

自噬诱导剂	
试剂名称	作用
Bredeldin A / Thapsigargin / Tunicamycin	模拟内质网应激
Carbamazepine/ L-690 , 330/ Lithium Chloride (氯化锂)	肌醇单磷酸酶抑制剂, 即 IMPase 抑制剂
Earle's 平衡盐溶液	制造饥饿
N-Acetyl-D-sphingosine (C2-ceramide)	Class I PI3K Pathway 抑制剂
Rapamycin	mTOR 抑制剂
Xestospongine B/C	IP3R 阻滞剂
自噬抑制剂	
试剂名称	作用
3-Methyladenine (3-MA)	(Class III PI3K) hVps34 抑制剂
Bafilomycin A1	质子泵抑制剂
Hydroxychloroquine (羟氯喹)	Lysosomal lumen alkalizer (溶酶体腔碱化剂)

自噬研究相关基因 (autophagy associated gene, ATG)

除此之外, 一般还需结合遗传学技术对自噬相关基因 (ATG) 进行干预: 包括反义 RNA 干扰技术 (Knockdown)、突变株筛选、外源基因导入等, 以便鉴定自噬相关蛋白。由于自噬研究的历史关系, 很多基因在酵母和哺乳动物中有不同的命名, 而 NCBI 中则介绍了一些较早发现的自噬相关基因, 如下表。

Table 1 Known mammalian autophagy genes

Mammalian Autophagy Gene	Yeast Gene Old / New Name	Reference	Function of the Gene Product
Apg3	Apg3/Aut1/Atg3	<u>70</u>	Autophagosome formation. Mediates LC3 modification and conjugation of Apg5 to Apg12.
Apg4/autophagins	Apg4/Aut2/Atg4	<u>71,72</u>	Autophagosome formation. Assists LC3 modification by cleaving the C-terminus to expose glycine.
Apg5	Apg5/Atg5	<u>59</u>	Autophagosome formation. Localises to isolation membranes that are forming new autophagosomes. Forms a complex with Apg12.
Beclin 1	Apg6/Vps30/Atg6	<u>45,47,63,64,73</u>	Autophagy induction or autophagosome formation. Forms a complex with class III PI3-kinase Vps34. A tumor suppressor gene in mammals.
Apg7	Apg7/Atg7	<u>74,75</u>	Autophagosome formation. Mediates conjugation of Apg5 to Apg12, and LC3 modification.
MAP-LC3	Aut7/Apg8/Atg8	<u>28</u>	Autophagosome formation. Localises to the limiting membranes of autophagosomes.
Apg10	Apg10/Atg10	<u>76,77</u>	Autophagosome formation. Mediates conjugation of Apg5 to Apg12 and facilitates LC3 modification.
Apg12	Apg12/Atg12	<u>78</u>	Autophagosome formation. Localises to isolation membranes that are forming new autophagosomes. Forms a complex with Apg 5.
Apg16L	Apg16/Atg16	<u>61</u>	Autophagosome formation. Links together Apg5-Apg12 complexes to form polymers.

同时，小鱼也会列出几个新近发现的 ATG 基因：

bif-1 (Endophilin B1) 和 UVRAG (ultraviolet irradiation resistance-associated gene)：蛋白 bif1 可通过 UVRAG 蛋白与 Beclin1 形成复合物，调节自噬和肿瘤形成。

2) VMP1 (Vacuole membrane protein 1) 可促使哺乳动物细胞中自噬小体的形成。

3) DRAM (damage-regulated autophagy modulator)：自噬过程中 P53 诱导的调节子，在细胞凋亡中起着重要的作用。

4) TP53INP2 (Tumour Protein 53 Induced Nuclear Protein 2) 可促使哺乳动物细胞中自噬小体的形成。

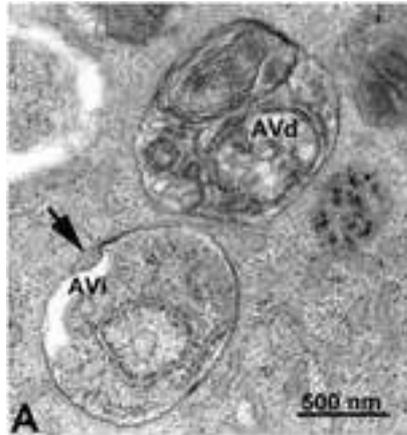
自噬的观察与检测

细胞经诱导或抑制后，需对自噬过程进行观察和检测。目前，人们对自噬的检测主要包括基

于检测自噬体的直接(观察自噬体的形态)和间接(检测自噬体表面蛋白标记)的方法。

1. 电镜下观察自噬体的形态

在电镜下可观察到呈新月状或杯状、双层或多层膜、有包绕胞浆成分的趋势的自噬囊泡 (autophagic vacuole, AV)。



自噬体 (AVi) 的特征为：双层或多层膜的液泡状结构，内含胞浆成分，如线粒体、内质网、核糖体等。

自噬溶酶体 (AVd) 的特征为：单层膜，胞浆成分已降解。

2. 在荧光显微镜下采用 GFP-LC3 融合蛋白来示踪自噬形成

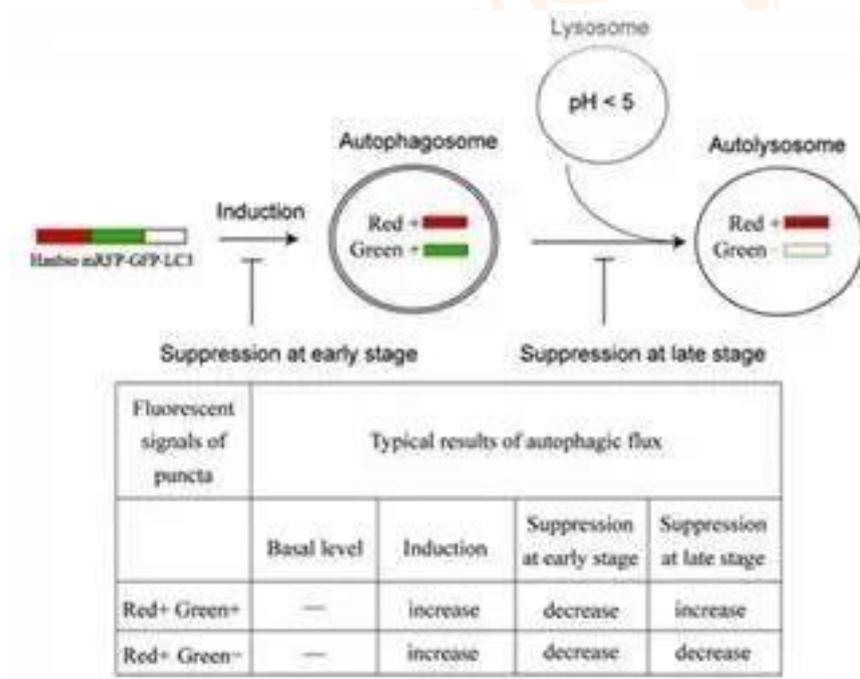
LC3 融合蛋白可分为以下两个体系。

*GFP-LC3 单荧光指示体系：利用了 LC3 在自噬形成时聚集的原理，即无自噬时，GFP-LC3 融合蛋白弥散在胞浆中；自噬形成时，GFP-LC3 融合蛋白转位至自噬体膜。在荧光显微镜下形成多个明亮的绿色荧光斑点，一个斑点相当于一个自噬体，可以通过计数来评价自噬活性的高低。



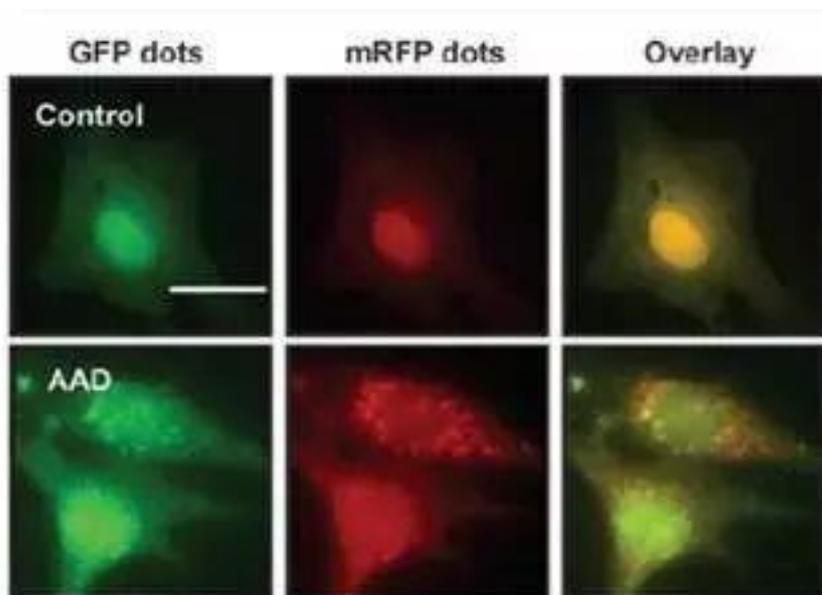
但是绿色斑点增多并不一定代表自噬活性增强，也有可能是自噬溶酶体降解途径受阻，可以通过 western blot 检测游离的 GFP、p62 来验证（P62 与 LC3 呈负相关的关系）。其中，P62 可以反映自噬的强弱。当 LC3 II 升高，P62 同时降低，表明自噬流畅通；如果 LC3 II 升高，P62 升高，表明自噬起始正常，但下游不通，吞噬体和溶酶体不能融合。

*mRFP-GFP-LC3 双荧光自噬指示体系：用于标记追踪 LC3 以及自噬流的变化。其中 GFP 是酸敏感型 GFP 蛋白，而 mRFP 是稳定的荧光表达基团。当自噬溶酶体形成后，其内部的酸性环境，可使 GFP 淬灭。

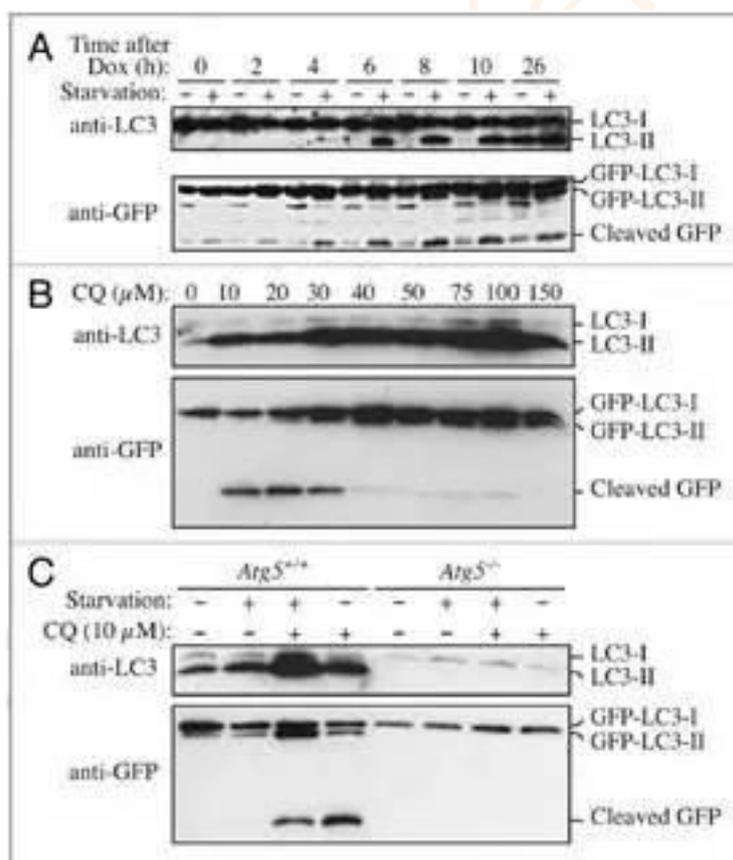


因此 GFP 的减弱可指示自噬溶酶体形成的顺利程度，则可通过 GFP 与 mRFP 的亮点比例来评价自噬流进程。其中红绿荧光 merge 后出现的黄色斑点就只是自噬体，而红色的斑点指示自噬溶酶体。如吞噬体和溶酶体能正常融合，那么红色荧光多于黄色荧光，如自噬下游阻滞，

吞噬体和溶酶体不能正常融合，则主要为黄色荧光。



3. 通过 Western blot 检测 LC3-II/I 比值的变化以评价自噬形成



在自噬 (Autophagy) 形成过程中, 胞浆中的微管相关蛋白轻链 3 (MAP-LC3) 会酶解掉一小段多肽形成 LC3-I, LC3-I 跟磷脂酰乙醇胺即脑磷脂(PE)结合转变为 (自噬体) 膜型 (即 LC3-II), 因此, LC3-II/I 比值的大小可估计自噬水平的高低。

又因 LC3 抗体对 LC3-II 有更高的亲和力, 会造成假阳性。所以方法 2 和 3 需结合使用, 同时需考虑溶酶体活性的影响。

4. MDC 染色&CellTracker™ Green 染色

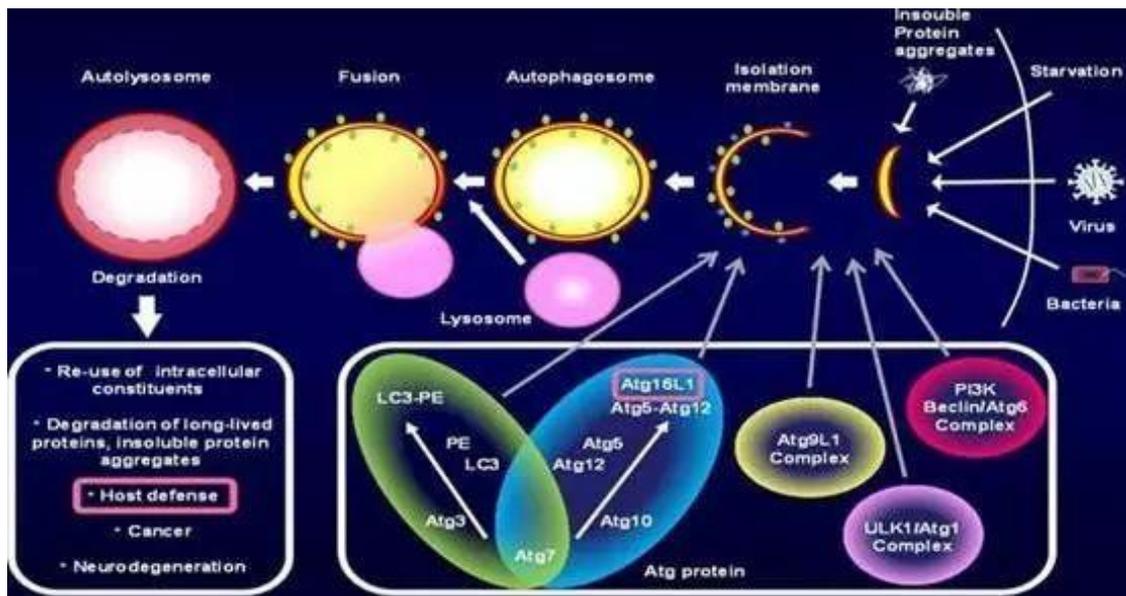
前者即单丹磺酰尸胺染色, 而后者主要用于双染色。两者均能染细胞的液泡, 均属于非特异性染色。

自噬相关蛋白定位

在研究自噬相关蛋白时, 需对其进行定位。为了区分自噬体与溶酶体、线粒体、内质网、高尔基体等细胞器, 常用一些示踪蛋白在荧光显微镜下来共定位:

共定位示踪蛋白	
蛋白名称	作用
Lamp-2 (溶酶体膜蛋白)	可用于监测自噬体与溶酶体融合
LysoTrackerTM 探针	有红或蓝色可选，显示所有酸性液泡
pDsRed2-mito载体	表达一个融合蛋白(红色荧光蛋白+线粒体基质定位信号)，用来检测线粒体被自噬掉的程度(Mitophagy)
MitoTraker 探针	特异性显示活的线粒体，荧光在经过固定后还能保留
Hsp60	定位与线粒体基质，细胞死亡时不会被释放
Calreticulin (钙网织蛋白)	内质网腔

Note: 这些蛋白均为胞浆蛋白，爬片或胰酶消化的细胞在做免疫荧光前需先透膜(permeablize)，可采用 0.1% SDS 处理。



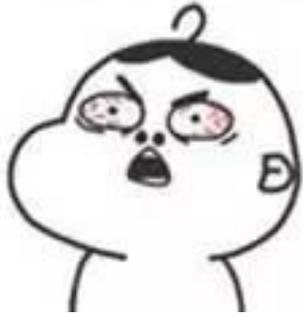
13 外泌体实验研究技术

实验新人必读（六）：外泌体实验研究的正确打开姿势！

作者：子非鱼

最近，外泌体在科研界以迅雷不及掩耳之势火了起来，国自然中标量那是翻着倍的蹭蹭往上涨。然而目前外泌体的研究仍处于初级阶段，首要原因就在于该领域里还木有统一的、简单可行且纯度很高的分离方法，其次对其他囊泡与外泌体的区别仍不能做出清楚的判断。

那咋办？

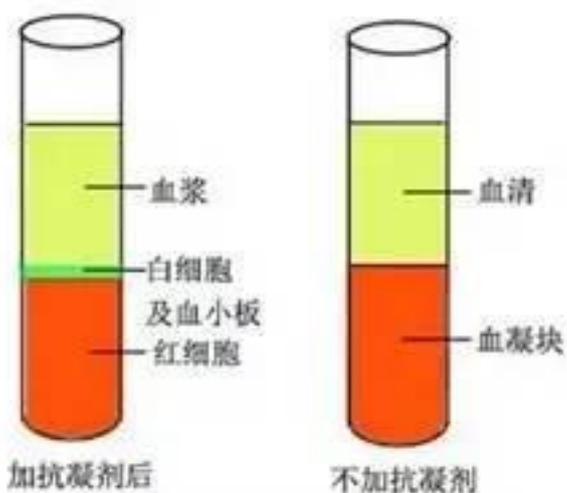


外泌体的藏身之处

正所谓高手在民间，欲一睹高人风采，就必先找到高人隐身之处。通常外泌体藏身于细胞上清、血液、尿液、脑脊液和其他体液。

血液

血液离心后有两种形式：血清和血浆，但不少小伙伴对它们傻傻分不清楚。前者是不经抗凝处理的血液会自动在一系列凝血因子的作用下发生凝集，离心后的上层液体；后者是经抗凝剂处理后，离心出去血细胞所得液体。两者虽然一母同胞，但显然血浆比血清更有内涵，其包含一些纤维蛋白原以及大量的外泌体，因而血浆也更受广大研究者的青睐。



Tips:1) 血样抗凝剂花样繁多，科研汪们一不小心就会跌的鼻青脸肿。肝素除了会抑制 PCR 外，还可与外泌体结合阻止细胞摄取外泌体；双嘧达莫 (CTAD) 则会阻止血小板的激活并抑制其释放外泌体；EDTA 可能会干扰 PCR 反应 (尽管其程度小于肝素)，但是还是优于其他选择。

2) 抽血时动作要轻柔迅速，并记录准确的抽血时间。因为外泌体在抽血后 30 分钟内是稳定的，时间过长血小板会因种种物理因素而被激活并释放外泌体，导致外泌体数量增加。

尿液

尿液中的外泌体性质稳定且 RNA 含量高于尿液中的细胞内的 RNA。而收集尿液时，应该尽量选择受试者的“新鲜”尿液，并注意避免细菌污染。受试者的亲属 (性别相同、年龄相仿) 可作为对照。同时也要注意对饮食的控制。

脑脊液

脑脊液中的外泌体含量虽然较其他体液如血液少，但可作为神经系统疾病的潜在生物标志物。采集脑脊液时避免受到血液污染，一般由于健康对照脑脊液获取困难，往往以其他神经异常的患者为对照。

外泌体的通缉之法

既然已经找到了外泌体的藏身之处，接下来就是请高手出山了。正常情况下外泌体是有侠义之风的，默默无闻的传递信号分子，以激活下游信号通路，帮助其他细胞各司其职。比如树突状细胞源性的外泌体则能够引起机体有效的抗肿瘤免疫应答。然而一旦细胞变坏了，其分泌的外泌体也就成了恐怖份子，像肿瘤细胞分泌的外泌体小哥就作恶多端，在机体中掀起了一片腥风血雨，引得科研界中的各路人马纷纷亮出自家法宝对其进行缉拿通缉。



秘笈一：超速离心法

此秘笈普遍被科研者所接受，通常与蔗糖密度梯度结合，使相对低密度的外泌体漂浮起来。



然而，此法比较耗时耗力，一般需要 8-30h，一次仅能处理 6 个样品，且产率较低，不适用于如血浆和血清等粘性生物液体。然而却可以获得高纯度的外泌体，并且这种方法在过去 10 年里已经被很多实验室成功应用于外泌体的分离。

秘笈二：按照尺寸大小分离外泌体

BioScientific 的 ExoMir 试剂盒通过两步超滤法就成功分离纯化外泌体。第一个微型过滤器基本上能去除所有细胞、血小板和细胞碎片，第二个微型过滤器可用正压力来获取所有直径大于 30nm 的囊泡。该方法以 HPLC（高效液相层析）为基础的方法有可能获得高纯度的外泌体，但是这个过程需要专用设备。

秘笈三：外泌体沉淀

聚乙二醇（PEGs）通常被用于病毒和其他小颗粒的沉淀。基于此，System Biosciences 提供的 ExoQuick 试剂在被加入体液中后，离心即可沉淀外泌体。

科研资源网



同时，Life Technologies 也开发了五种 Total Exosome Isolation 试剂，能使低溶解度的成分（如外泌体）析出，然后通过低速离心收集外泌体。

厂家	试剂盒名称	样本类型	货号
Invitrogen	Total Exosome Isolation Reagent (from cell culture media)	细胞上清	4478359
Invitrogen	Total Exosome Isolation Reagent (from serum)	血清	4478360
Invitrogen	Total Exosome Isolation Kit (from plasma)	血浆	4484450
Invitrogen	Total Exosome Isolation Reagent (from Urine)	尿液	4484452
Invitrogen	Total Exosome Isolation Reagent (from other body fluids)	其他体液	4484453

秘笈四：基于亲和力获得外泌体

外泌体相关抗原的抗体（如抗 CD63、CD9、Alix、CD81、CD82、annexin、EpCAM 和 Rab5 抗体）可以用作分离外泌体的特异性标记，用包被此类物质的磁珠与外泌体囊泡孵育后结合，可达到外泌体吸附分离的目的。

该方法可保证外泌体形态的完整性，且特异性高、操作简单，但非中性 pH 和非生理性盐浓度会影响外泌体生物活性，不利于下一步实验，且不适合大量样本。

秘笈五：qEV 法

该方法是利用 Size Exclusion Chromatography (SEC) 的原理对外泌体进行分离纯化的分离柱，在不损伤外泌体活性的情况下，有效去除样品中杂质蛋白和脂类。

如此可获得高纯度的外泌体，且快速简单，成本低廉。适合于细胞上清、血液、尿液等体液的外泌体分离。一般建议与 qNano 测量法联合使用，qNano 可利用“可控电阻脉冲传感技术”对外泌体的浓度和尺寸进行快速准确的测量，因此 qEV+qNano 被视为快速准确的分离和测定外泌体的最佳解决方案。

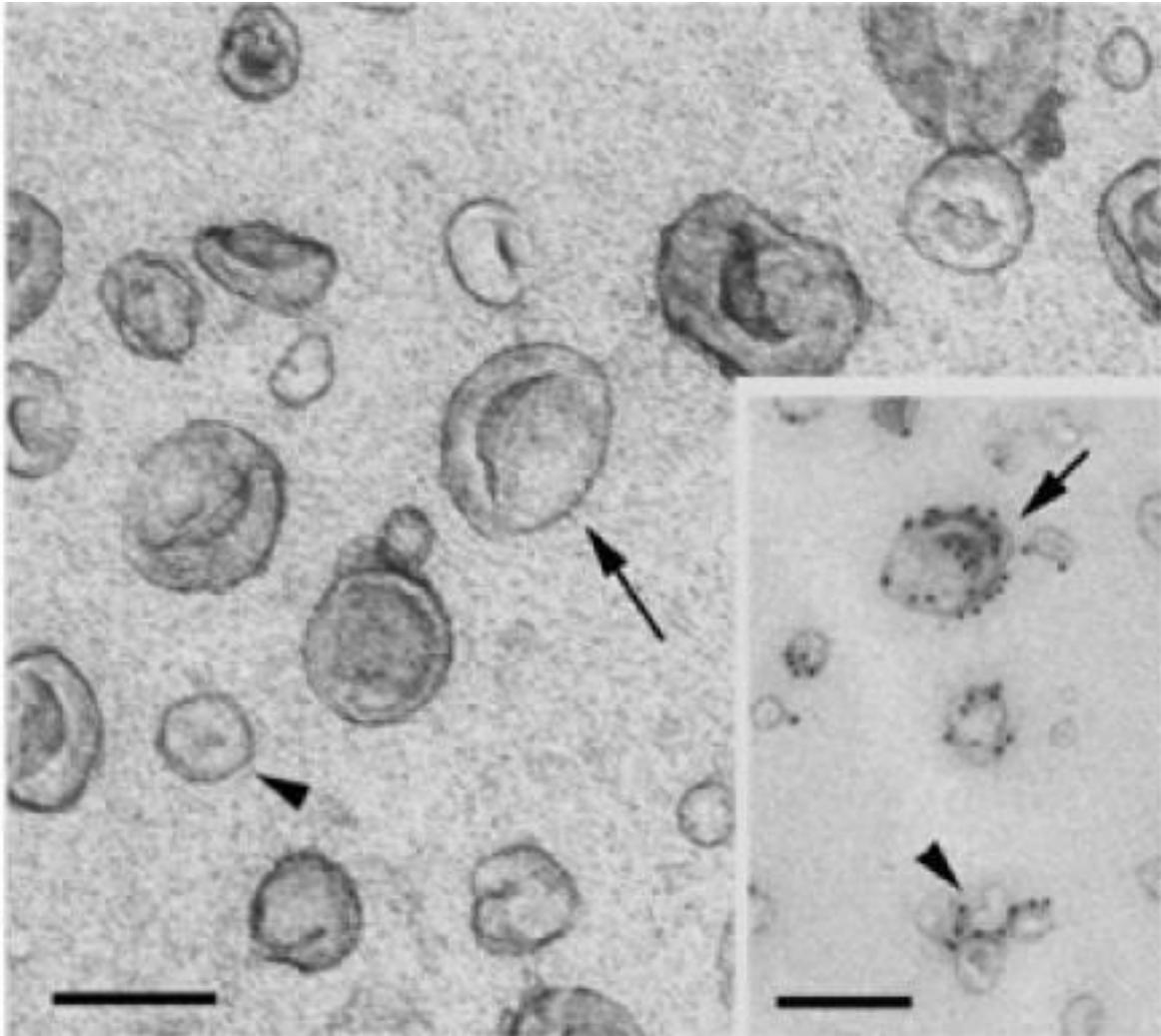
外泌体的分析研究

既然已经捕获了“做坏事”的外泌体，就该拷问它所携带的货物中哪些是与某种疾病息息相关的。一般而言，外泌体里含有蛋白质和非编码 RNA。因而，其分析研究可分为以下几类。

首先要外泌体进行鉴定，通常研究者可用透射电镜观察外泌体的结构（通常为茶托型或一侧凹陷的半球型），再结合免疫标记就可清楚的分析特定指标在外泌体表达的部位。

为了让大家对外泌体有着一个更直观的感受，先奉上一个经典的外泌体电镜图，由图中可看

到很多略小于 100nm 的具有清晰膜的茶托样结构，小图中则显示附在膜结构表面的免疫胶体金。



对外泌体验证正身之后，就可以在蛋白水平和核酸水平对其进行深入分析。

1. 蛋白水平的分析

- (1) SDS-PAGE: 通过 SDS-PAGE 电泳可以分析得到的外泌体中蛋白的含量及种类。
- (2) Western-Blot: 通过 Western-Blot 可以检测外泌体中特定的蛋白表达情况。
- (3) 2-DE 等蛋白组学分析: 可以了解外泌体中不同蛋白的表达、数量情况

2.基因水平的分析

(1) Real-Time PCR: 通过 PCR 可以分析需要研究的指标的表达量。

(2) 转录组分析: 通过测序或者芯片, 分析 Exosome 不同基因的转录水平。

(3) miRNA : 通过测序或者芯片, 检测与 Exosome 相关的 miRNA 的表达情况, 研究特定的 miRNA。

(4) lncRNA 分析: 通过测序或者芯片, 检测与 Exosome 相关的 lncRNA 的表达情况, 研究特定的 lncRNA 与 Exosome 共同调控某种疾病的关系。

项目	平台	应用
RT-PCR	ABI 7900	基因定量检测
miRNA	Affymetrix miRNA 4.0 Array	全 miRNA 检测
mRNA	Affymetrix GeneChip Human Gene 2.0 ST	全 mRNA 检测
lncRNA+mRNA	Affymetrix Clariom™ D Array	全 mRNA+lncRNA 检测

Tips:

1) 由于外泌体内含有大量小片段 RNA, 测序时会测到许多非 miRNA 的小片段 RNA, 造成有效数据不足。一般建议使用芯片的方法检测外泌体 miRNA。

2) lncRNA 表达丰度较低, 在外泌体中丰度更低, 对于低丰度基因, 芯片测准确性远远大于测序。所以建议使用基因芯片的方法检测外泌体 lncRNA。

3) 为了获取漂亮的测序或芯片结果, 外泌体的含量是关键。不同样本提取外泌体得率不同, 根据经验: 3ml 以上的血浆血清可得到约 30-50ng 的 RNA; 30ml 以上细胞上清可得到约 70-100ng 以上的 RNA; 其他类型的体液与其性质有关, 建议都以 30mL 以上。

科研老司机的套路哲学 (三)

作者：子非鱼

今天老司机来带你们看看科研界的网红，外泌体是如何被套路的。

事情是酱紫的

自从外泌体在肿瘤界红了之后

实验室的 Boss 便一直对其念念不忘

于是指派我说

去！把外泌体给我拿下！

你的毕业论文就靠它了！



可对外泌体一知半解的我

一脸懵逼了

尽管我翻看大量文献资料

仍屡不清一丝头绪

不知该如何进行课题设计



然而

文章写得好不好，全看套路深不深

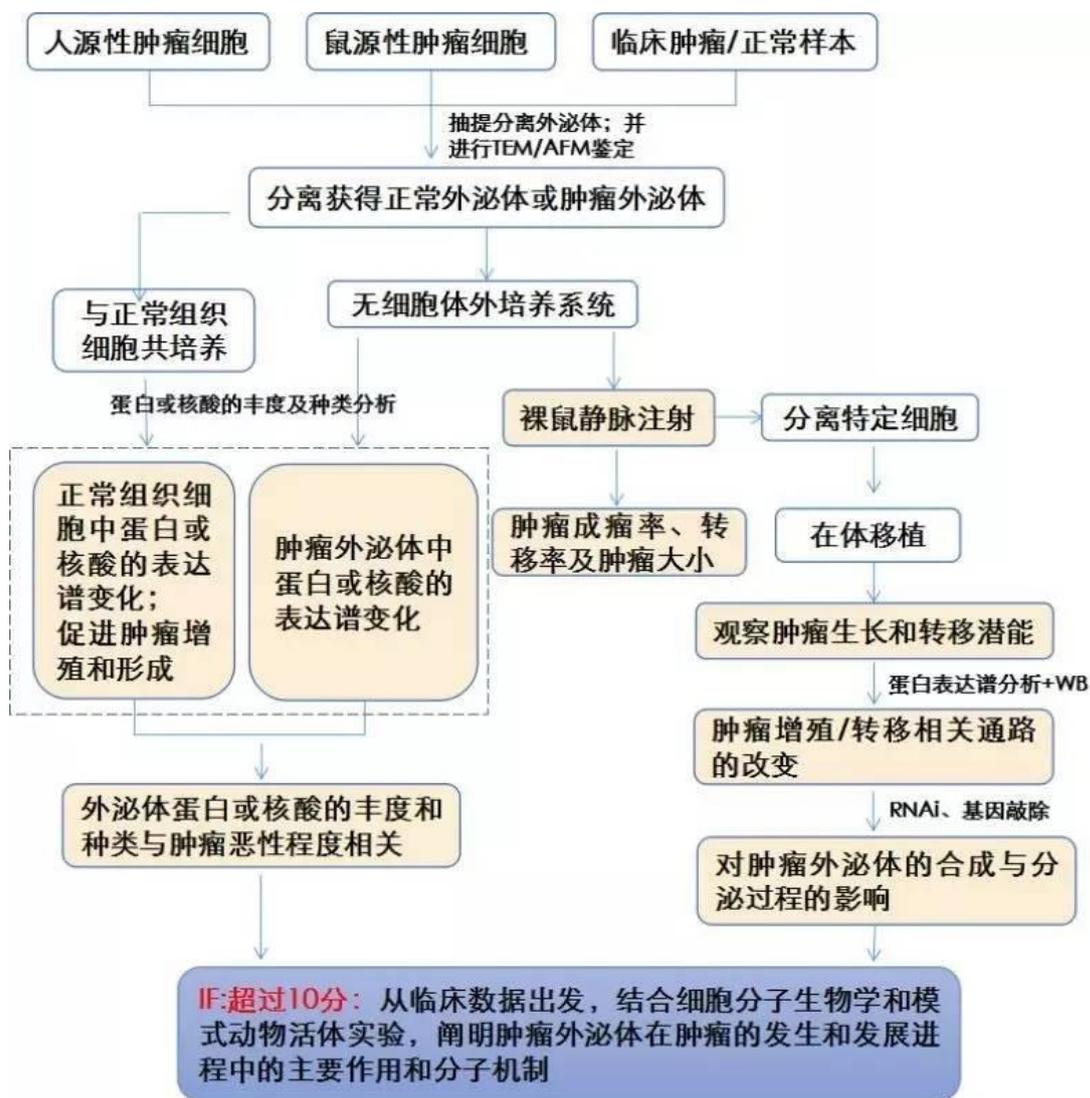
神师兄飘然而过

并扔给了我一个 10 分以上的文章套路

Cancer Cell
Article

CellPress

Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis



果然，有了这个套路

定然能发表高分文章

从此，成为肿瘤界大牛

迎娶高富帅

走向人生巅峰



奈何实验室经费有限

加之难以 hold 住高端实验

于是腆着脸问师兄，

有没有更简单的套路

神师兄不说话

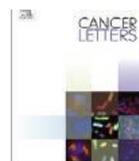
并再次扔给我一个 5-10 分的文章套路



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Cancer Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/canlet



Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells
promote tumor growth *in vivo*

这个套路简单可行，深得我心

看罢后

深感论文发表，指日可待

无奈小鱼已经懒癌晚期

汗颜道：师兄，我就是想混毕业而已.....

神师兄颌首

再次拿出 3-5 分的文章套路

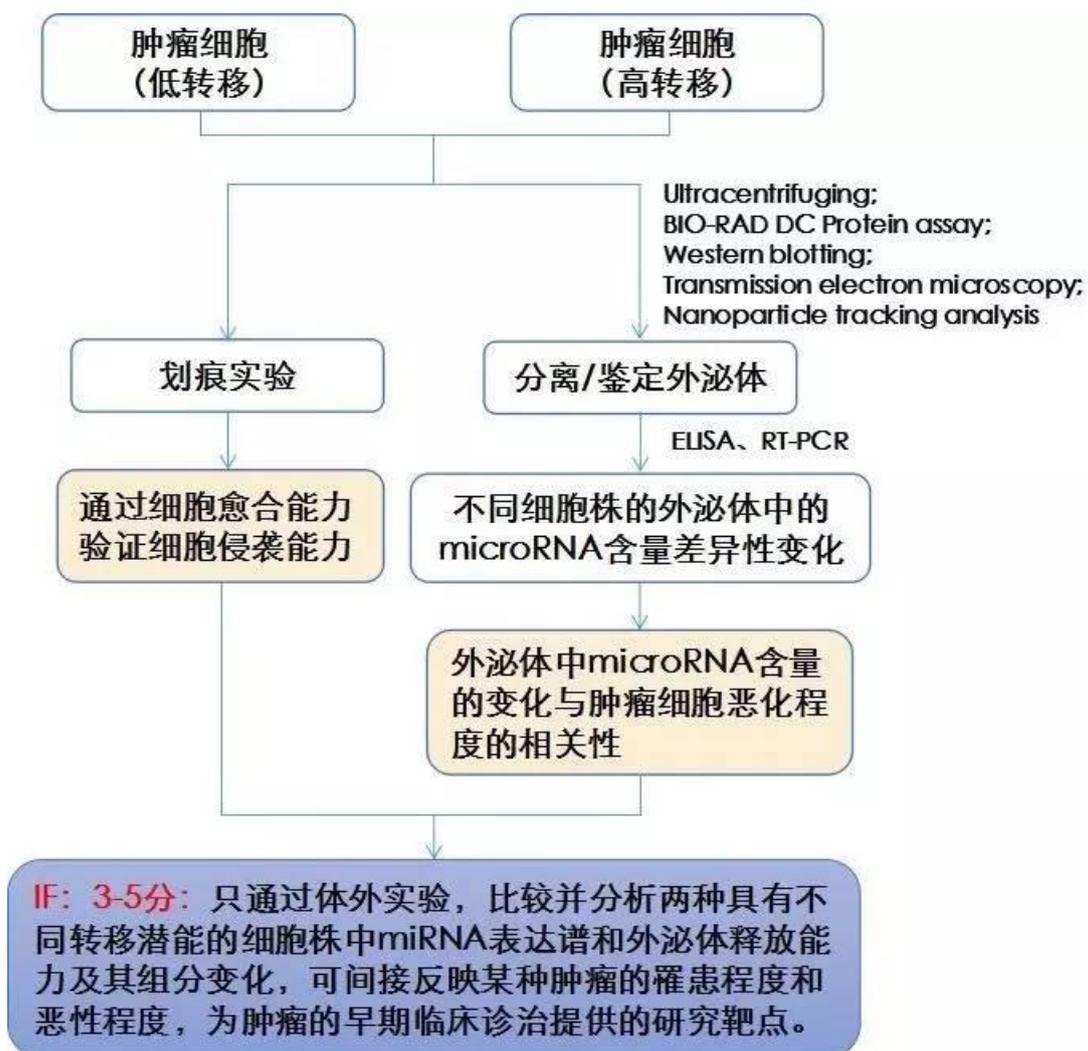
道：拿去，不谢！

RESEARCH

Open Access

Ovarian cancer cell invasiveness is associated with discordant exosomal sequestration of Let-7 miRNA and miR-200

科研资源



因此

尽管七月的酷暑让人焦躁

患有“夏日懒”的小鱼

却凭着神师兄的科研套路

在炎炎夏日中

轻松来个“葛优躺”



14 其他

技术 | 涨姿势！基于片段的新药研发新技术 FBDD

作者：毛博

新药的研发是一件耗资巨大而效率很低的工作，为了增加新药研发的效率，科学家们一直致力于寻找新的药物设计和药物筛选的方法。1990 年代，Jencks 提出了“基于片段的药物研发”(fragment-based drug discovery, FBDD)这一概念，即通过对于靶标结合的片段分子筛选和优化可以得到新颖的药物实体。Cell 一篇综述详细解释和阐述了这一最新的技术，并简单概述了 B-RAF、HSP90 和 BACE 的开发过程。

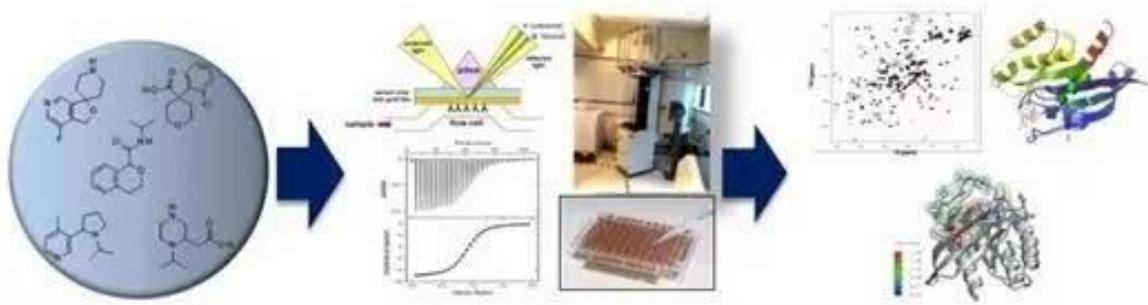
什么是 FBDD 技术？

FBDD 是最近十年来刚刚兴起的一种药物研发新技术和新方法。过去十年中很多制药公司采用高通量筛选(high-throughput screening, HTS)寻找新的药物分子, 但是巨大的投资却没有换来质量和数量都令人满意的新分子实体药物, 这种方法不是非常成功的部分原因是由于这种筛选方法自身的复杂性和被筛选的化合物数量极其巨大所造成的。

而 FBDD 却可以弥补 HTS 方法的不足。与 HTS 相比, FBDD 的优势在于:

- 1)化合物库小;
- 2)化合物结构简单, 一方面它们简单的结构却使它们与靶蛋白的热区结合, 从而使片段筛选的命中率高于 HTS; 另一方面便于筛选后的结构改造;
- 3)筛选到的化合物质量高;
- 4)高效性, 新颖性。筛选中所用的检测方法能在很短的时间内完成对标记蛋白的检测, 所以筛选一个化合物库的时间比高通量筛选要短的多。

基于这些优势, 越来越多的制药公司开始采用这种策略进行新药的发现, FBDD 的出现为药物设计提供一种新的选择。



FBDD 的过程

FBDD 的过程主要包含三个环节：1、片段库的建立；2、筛选得到可与靶点结合的片段，以及这些片段的结构构象；3、将这些片段延伸或者合理连接成为“药物分子”。在构建任何化合物库时，要求片段到达以下要求：1)高溶解度；2)高纯度；3)不能含有活性功能团。

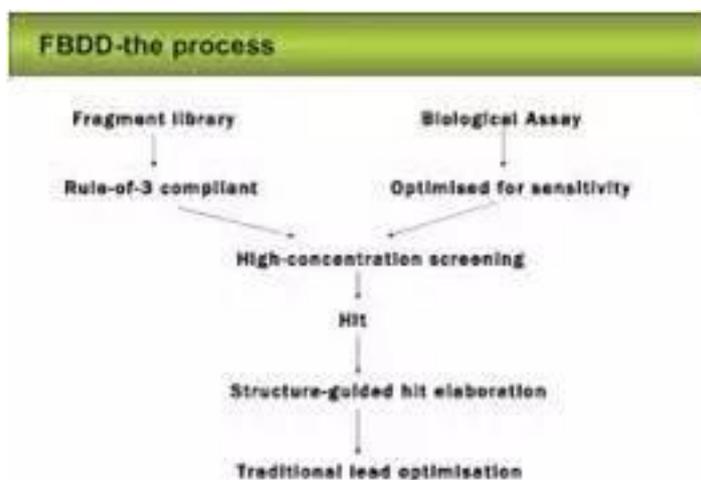
FBDD 发展的一个重要基础就是高灵敏度的筛选方法，该方法的基本点是首先筛选结合于生物靶分子亚活性位点的低亲和性配体然后通过优化和组装便得到所期望的高亲和性配体。

x-射线晶体衍射方法，能够测定配体和受体复合物的三维结构，同时提供分子间氢键、分子内氢键、成键原子间的键长、键角、扭角等准确可靠的信息，为片段分子的改造和新药设计提供合理的建议，极大地缩短为获得先导化合物和药物分子正确结构所需的时间。

表面等离子共振技术(Surface Plasmon Resonance, SPR)作为一种配体筛选技术也得到了研究者的青睐。SPR 技术因其高通量、特异性及能在天然状态下研究药物分子与靶点的相互作用而且耗费低，无需标记的蛋白，很适合用于片段分子的筛选。

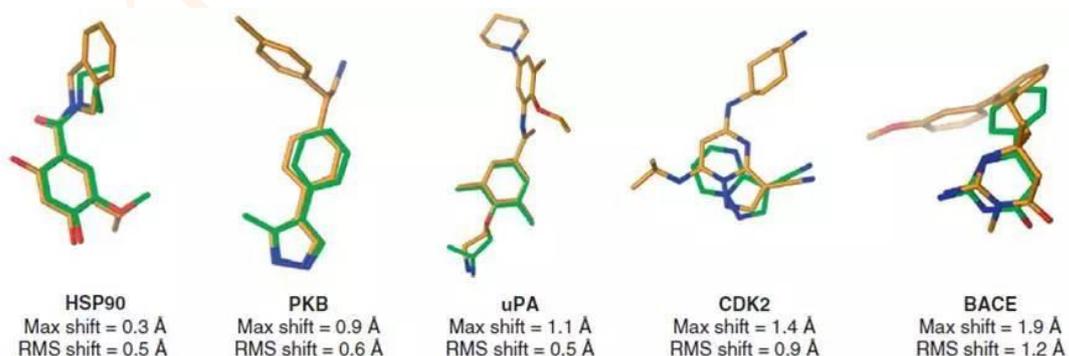
目前国际性生物制药公司几乎都有基于 SPR 原理的 Biacore 仪器用于新药的研究和筛选。通

常筛选到的初始片段活性是很低的，所以筛选后的关键就在于对其加工以提高它的活性，一般采用片段进化，片段连接和片段的自我组装这几种方式对片段进行改造。



B-RAF、HSP90 和 BACE 的开发过程

FBDD 技术的 3 个成功的例子分别为 B-RAF、HSP90 和 BACE 的开发。这 3 种药物的研发都是通过寻找合适的连接子，将两个片段连接起来，结果能得到新的化合物。在得到的新的化合物的基础上对其进行结构修饰，就得到了最终的产物。



综上所述, FBDD 技术正处于高速发展阶段, 已涌现出许多方法, 但同样也面临着很多挑战, 但已显现出其巨大潜力, 已有的这些成功的例子让我们相信 FBDD 必将成为药物设计的一个重要的、不可缺少的手段。

参考文献: Experiences in fragment-based drug discovery.

https://www.researchgate.net/publication/223987881_Experiences_in_fragment-based_drug_discovery

一文读懂 | 美女院士庄小威的新技术 smFRET

作者: 毛博

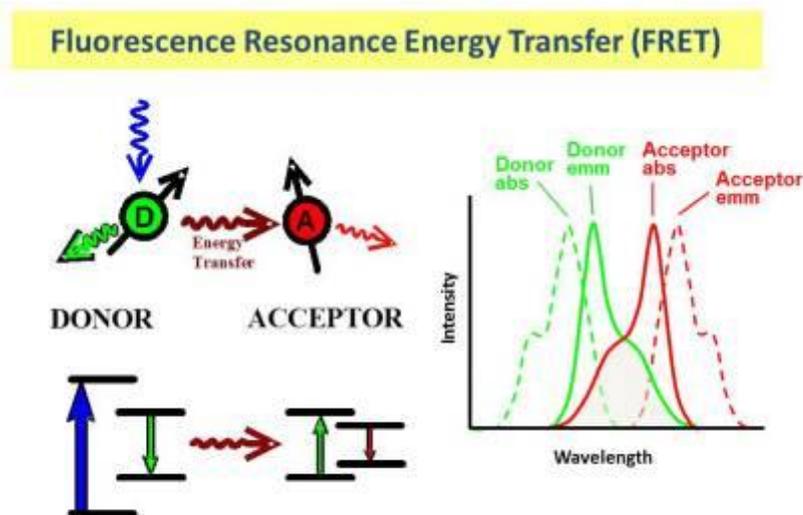
众所周知, 核小体是染色质的基本结构单位, 由 DNA 和组蛋白构成。在基础研究和临床诊治中有着非常重要的意义。例如, 在 75% 的系统性红斑狼疮的患者体内发现抗核小体抗体的存在。因此, 揭示核小体的结构动力学是阐明基因组调节机制中的重要一环。为了解决这一难题, 科学家们开发出来一种全新的技术——单分子荧光共振能量转移技术 (single molecule fluorescence resonance energy transfer, smFRET)。CELL 综述《Structural dynamics of nucleosomes at single molecule resolution》。综述详细解释和阐述了这一最新的技术。

什么是 smFRET 技术?

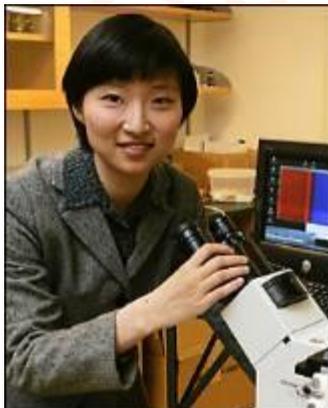
在 smFRET 技术出现之前, 分子生物学研究往往只检测特定时间内的大量分子的平均行为。例如, 我们经常做的 Western Blot, 是检测大量的氨基酸分子的表达。但是, 生物体系并不是一个均一的体系。所以, 检测单个分子的行为具有更加重要的意义。

smFRET 技术的原理就是将 2 个相互作用的分子标记上颜色不同的荧光基团, 一个是在能量

转移过程中提供能量，即供体 D(donor);另一个接受能量，即受体 A(acceptor)。这样可以运用荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术来对体系进行研究。因此，比单个荧光基团标记更具有优势，称为单分子荧光共振能量转移(single molecule fluorescence resonance energy transfer,smFRET) 技术。



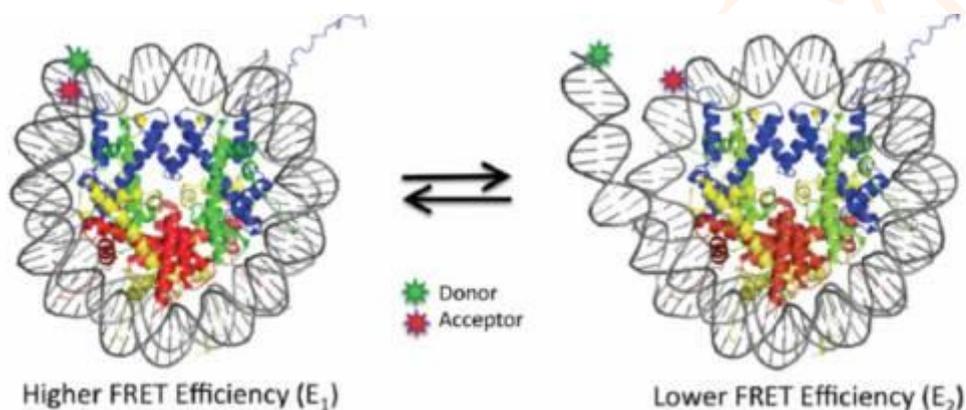
令人欣喜的是，这项技术是由华人科学家发明的，还是位美女哈。这就是大名鼎鼎的美国哈佛大学庄小威(Xiaowei Zhuang)教授。庄教授早年毕业于中国科技大学少年班，后赴美留学和工作。一路风顺水，年纪轻轻地在 34 岁的时候就成为了哈佛大学正教授，并且在 2012 年成为美国科学院院士，是目前为止最年轻的美国科学院华人院士。



smFRET 技术在核小体结构动力学研究中的应用

smFRET 技术近年来发展迅猛，在研究核小体的结构动力学方面发挥了重要的作用。当单个荧光基团 (fluorescence fluorophore) 标记到目标分子后，它能在多方面去探测目标分子。从而可以通过荧光成像技术可以了解目标分子在细胞内的空间分布。由于其能在单个分子内或分子复合物中，以纳米级别，实时追踪变化，因此可用于解答许多重要的生物学问题。

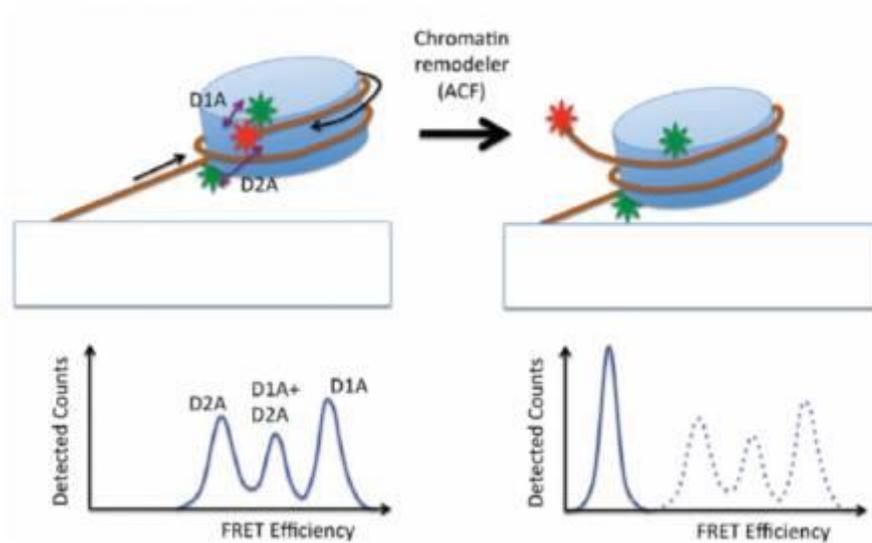
利用单分子荧光能量转移，实现了多色随机光学重建显微法(multicolor stochastic optical reconstruction microscopy)，从而对核小体进行实时监控，以获得相关的动力学数据。



smFRET 技术在 DNA 和组蛋白相互作用研究中的应用

在细胞核中，基因组 DNA 紧紧地包裹在组蛋白上面形成了八聚体结构的核小体。这样可以使 DNA 受到良好的保护，但是也影响了 DNA 作为转录模板的功能。因为，在如此严丝合缝的包装下，介导 DNA 转录的酶很难接触到 DNA，也就无法执行其正常的功能。正因为如此，科学家们设想 DNA 在某种条件下是可以局部释放出来的。

通过 smFRET 技术发现，包括组蛋白分子伴侣在内的核小体重塑因子，可以使染色质保持动态，使得 DNA 在适当的时候局部释放出来，即从核小体上面解开，从而实现基因组 DNA 作为转录模板的功能。



综上所述，随着对分子生物学研究的逐渐深入，科学家们开始解析单个分子的行为，这是因为即使是同样的遗传物质，同样的周边环境，这些分子还是会朝着不同的方向发展，有时还会生成不同的功能，而且单个分子的变化还关系到癌症，神经疾病等疾病的发生和发展。另一方面，分析单个分子的动力学就更加困难了。因为以往的研究往往是静态的，动态的研究还需要物理学，机械学，和生物学的多方配合，而 smFRET 技术很好地解决了这一问题，正在基础研究和临床诊疗领域得到越来越广泛的应用。

参考文献：Structural dynamics of nucleosomes at single molecule resolution

技术 | 太上老君的炼丹炉：GPCRs 的热稳定技术

作者：毛博

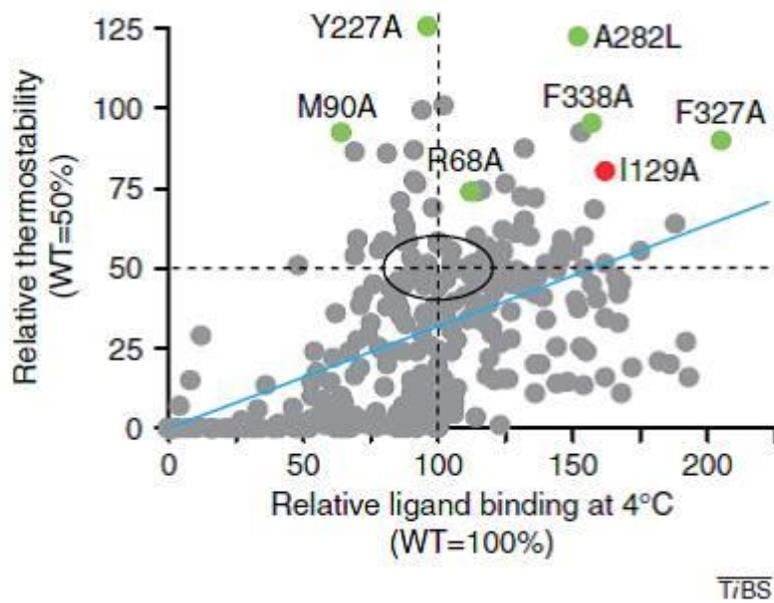
众所周知，G-蛋白偶联受体（G-protein-coupled receptors, GPCRs）是生物学和医学上非常重要的膜蛋白，目前已经有 15 种 GPCRs 的结构得以确定。但是，GPCRs 的结构非常不稳定；

GPCRs 的序列非常难以测定，这就造成了研究的困难和瓶颈。如何精确快速地测定 GPCRs 的结构及其氨基酸序列一直是该领域研究的热点和焦点。为了解决这一难题，科学家们开发出来一种全新的技术——热稳定技术(thermostabilisation)。就象太上老君的炼丹炉一样，通过测定和改变 GPCRs 的热稳定性来决定其结构和序列，调节其功能。Cell 的一篇综述《A crystal clear solution for determining G-protein-coupled receptor structures》就详细解释和阐述了这一最新的技术。

什么是 thermostabilisation 技术？

众所周知，蛋白质的热稳定性是由它的氨基酸序列所决定的。但是，即使是氨基酸序列高度相似的蛋白质，如果来自不同的有机体，它们的热稳定性也可能完全不同。例如，来自火鸡的 $\beta 1AR$ 与来自人类的 $\beta 1AR$ 的氨基酸序列有 76% 是完全一致的，但是它们的热稳定性却完全不同。甚至，DNA 的点突变也可以增加蛋白质的稳定性，比如 KcsA、M13、DGK 位置的点突变。因此，GPCRs 的 thermostabilisation 技术的原理就是通过测量 GPCRs 的热稳定性来反推其氨基酸序列。

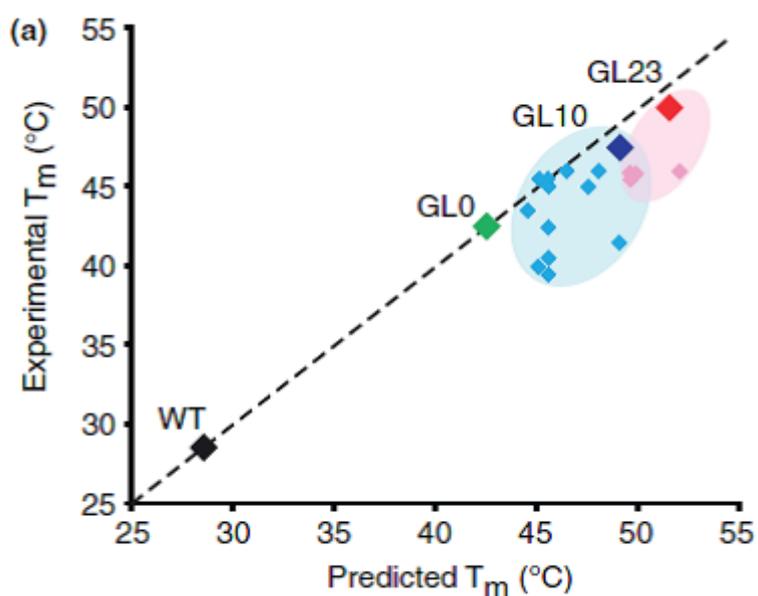
理论上，任何的热稳定性分析技术都可以使用，但是放射性配体结合试验因为其有着非常高的产量和灵敏度等显著优点，成为测量 GPCRs 的热稳定性的首选方法。目前，这一技术已经被成功地用于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表面 GPCRs 的热稳定性的测量。



Thermostabilisation 技术用于 GPCRs 结构研究

目前，thermostabilisation 技术已经成功地应用于 3 种人类 GPCPs。它们是 β 1AR, A2AR 以及神经降压素受体。通过 thermostabilisation 技术不仅能够反推蛋白质的氨基酸序列，还可以增加蛋白质的热稳定性。目前， β 1AR 和 A2AR 的热稳定性已经可以分别提高 8°C 和 14°C。这极大地增加了 β 1AR 和 A2AR 的稳定性，为研究和确定其序列和结构提供了基础。

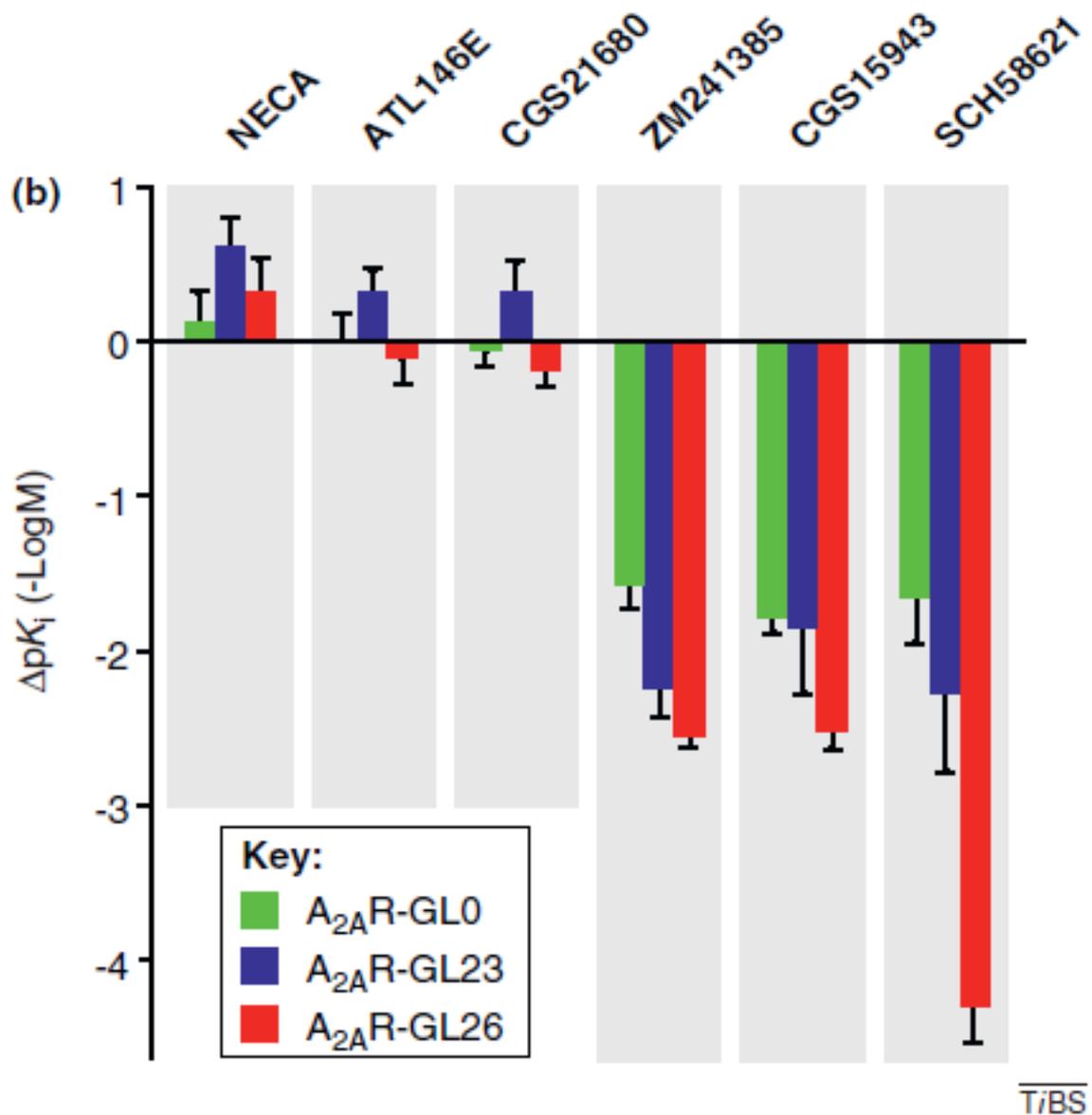
Thermostabilisation 技术还可以将 GPCPs 的热稳定性较高的突变体结合和串联起来，从而生成热稳定性更高的 GPCPs。如下图所示，A2AR 有三种热稳定性较高的突变体：GL0、GL10 以及 GL23。通过 thermostabilisation 技术将其串联起来，生成了热稳定性很高的新突变体：A2AR-GL26。其热稳定性远远高于野生型 A2AR (WT)。



Thermostabilisation 技术用于药物研发

任何改变 GPCPs 热稳定性的技术都将改变其药理学性质, thermostabilisation 技术也不例外。

在热稳定性增加之后, GPCPs 与配体的结合力将会发生改变。例如, A2AR 的热稳定性增加了之后, 其与 ZM241385、CGS15943、SCH58621 的结合力显著性增加。如下图所示, A2AR-GL26 的结合力远远大于 A2AR-GL23; 而 A2AR-GL23 又远远大于 A2AR-GL0。



因此，可以通过改变 GPCPs 的热稳定性，调节其与配体的结合能力。在需要增加结合能力的时候，有意识地增加其热稳定性；而在需要减弱其结合能力的时候，有意识地降低其热稳定性，从而达到改变其药理学性质的目的。

G-蛋白偶联受体 (G-protein-coupled receptors, GPCRs) 是生物学和医学上非常重要的膜蛋白，但是，由于其结构的不稳定性，造成了研究的困难。热稳定技术 (thermostabilisation) 一方面

通过测定 GPCRs 的热稳定性来反推其结构和序列，另一方面，可以直接改变 GPCRs 的热稳定性来改变其药理学性质。热稳定技术(thermostabilisation)在药物开发、基础研究以及临床治疗方面正在得到越来越广泛的应用。

参考文献

A crystal clear solution for determining G-protein-coupled receptor structures

姿势 | 一文读懂多基因表达系统 MultiBac 及其应用

作者：毛博

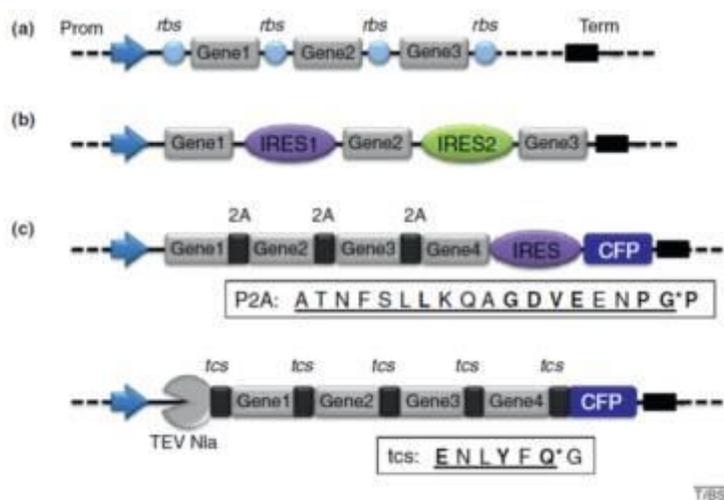
众所周知，细胞中大多数蛋白质以亚基的形式与其他蛋白质装配成蛋白质复合体而发挥其生理功能。大分子蛋白复合物的结构和功能在后基因组时代已经成为研究的焦点和热点。然而，生产出足够数量和高质量的蛋白复合物是研究它们的结构和功能的前提。这同时也是一项非常困难和极具挑战性的任务。为了克服这一难题，科学家们开发出来一种强大的多基因重组表达技术——MultiBac。CELL 里的一篇综述就详细解释和阐述了这一最新的技术。

什么是 MultiBac 技术？

MultiBac 技术是一种利用基因工程技术来实现多个蛋白亚基在同一宿主细胞内共表达，并装配成复合体，从而大量获得多蛋白复合物的有效手段。因为 MultiBac 多基因表达系统能够在短时间内大量生产出蛋白复合物，所以正在基础和临床研究中得到越来越广泛的应用。

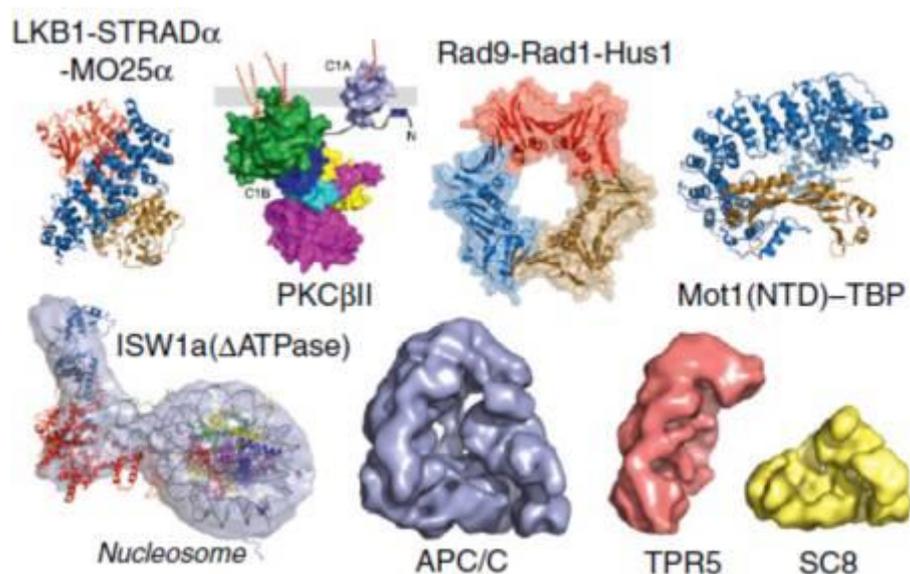
研究人员已经利用该系统在酵母，哺乳动物细胞，和昆虫细胞成功地进行重组生产真核蛋白，特别是 MultiBac 系统中的杆状病毒表达系统生产出了真核蛋白复合物与许多蛋白质亚基复合物。它由一组合成 DNA 质粒的序列，以及一组协议，引导从基因序列插入质粒的每一个步骤，以便在培养的昆虫细胞内生产蛋白复合物。合成的 DNA 重组质粒分子 (<3 KB)

被称为“受体”。受体和供体结合，可以非常容易地装入一个或几个基因，并重组成多基因结构。供体和受体含有标记，实现了灵活，高效的多基因结构，从而进一步形成质粒二聚体，三聚体和四聚体。这种多基因表达的方式被称为“串联重组工程”。如下图所示，基因 1、基因 2、基因 3、基因 4.....被串联了起来。这也暗合我国传统道家思想的“一生二，二生三，三生万物”的理念。



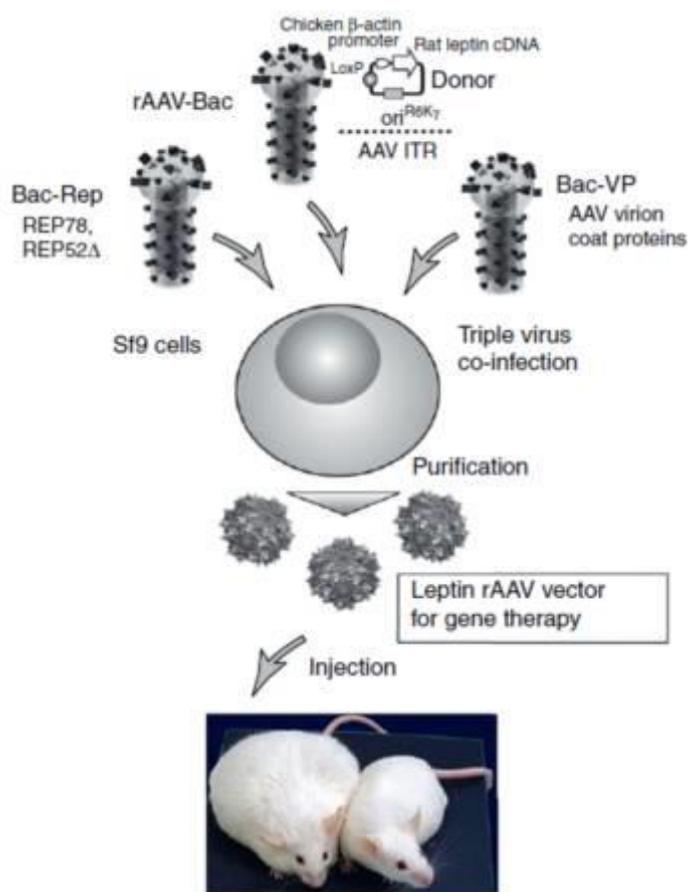
MultiBac 系统用于蛋白质结构研究

利用 MultiBac 系统还可以研究蛋白质复合物的结构。这个想法最初是由 X 射线晶体学家设计出来的，并且广泛地用于结构生物学的研究中。上文提到的基因的“串联重组工程”有助于在短时间内获得大量的高质量样品，从而为结构生物学研究提供了大量的素材。例如，APC/C 13 个亚基的蛋白复合物的生产，基因通过“串联重组工程”编码组装完整的 APC / C 然后插入两个 MultiBac 杆状病毒，编码 8 个亚单位，然后共转染昆虫细胞，从而生产出 APC/C 13 亚基蛋白复合物。这是一个通过 MultiBac 系统大量生产蛋白复合物的典型的成功案例。如下图所示，MultiBac 系统除了能够生产 APC/C 之外，还能够生产 LKB1-STRAD α -MO25 α 、PKC β II、Rad9-Rad1-Hus1、Mot1 (NTD)-TBP、ISW1a (Δ ATPase)、TPR5、SC8 等一系列蛋白复合物。



还可以减肥的 MultiBac 系统

目前，基因疗法是治疗肥胖症的一个重要的方向。研究发现，通过靶向递送一种或几种野生型基因，替换掉导致肥胖的致病基因，从而使这一种或几种野生型基因编码产生治疗性蛋白质，从而起到预防或治疗肥胖的作用。MultiBac 系统作为基因的潜在的递送载体，正在得到越来越多的关注。因为它们能够有效地递送基因进入哺乳动物细胞，而对哺乳动物细胞不具有毒性。MultiBac 系统的另一个优点是易于插入到病毒基因组中，同时又不损害病毒体的完整性，目前是最佳的有效的基因递送的载体。最近的一项研究利用 MultiBac 系统进行大鼠肥胖症模型的基因疗法。研究人员首先将用高脂肪食物喂养大鼠，使其产生肥胖症。然后将瘦素的 cDNA 作为转基因，通过 MultiBac 系统导入 Sf9 细胞中，然后经过纯化得到了瘦素 rAAV 载体，注射入大鼠体内，使大鼠成功减肥。



TiBS

综上所述， MultiBac 技术可以用于大量生产重要的真核蛋白复合物，用于蛋白质结构和功能的分析。该技术已经成功地生产出了以 APC/C 为例的蛋白复合物。可以预计在不久的将来， MultiBac 技术将被大量用于制药工业中，以确定分子的表面结构，从而可以有针对性的进行药物设计。

参考文献

MultiBac: expanding the research toolbox for multiprotein complexes

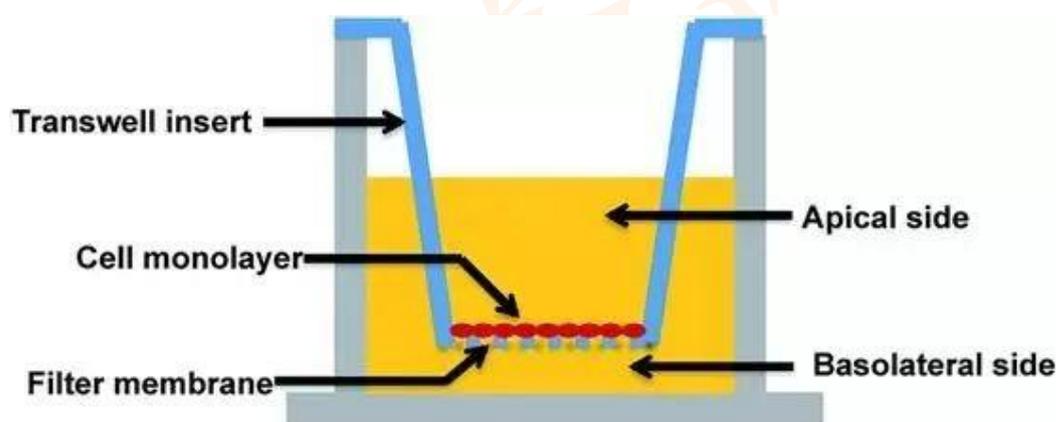
想研究药物口服吸收？ Caco-2 细胞模型来

帮你

作者：叶军

Caco-2 细胞转运模型是首个被国外制药企业以及实验室应用的模拟肠道吸收的药物筛选模型，已广泛应用于药物在小肠吸收的评价和转运机制研究中。Caco-2 细胞的结构和功能类似于人小肠上皮细胞，含有与小肠刷状边缘上皮相关的酶系。

与正常的成熟小肠上皮细胞在体外培育过程中出现的逆向分化不同，Caco-2 细胞在多孔可渗透的聚碳酸酯膜上培养 3 周后可以自发分化为肠上皮细胞，形成致密的细胞单层，进而可用作肠道转运模型（图 1）。Caco-2 细胞模型培养和验证方法简单，与体内动物实验相比更为方便、经济。



1. Caco-2 细胞培养

- 1) 采用 MEM 完全培养液（含 10%胎牛血清、1%非必须氨基酸、1%丙酮酸钠、1%谷氨酰胺和 1%青-链霉素）在 37°C 和 5% CO₂ 条件下培养 Caco-2 细胞；
- 2) 每隔一天更换一次培养液。当细胞汇合程度达 80%时，进行细胞传代。将细胞培养液吸出，用不含 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 离子的 HBSS 小心清洗 2 次，加入 0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA 混合消化液进行消化；

3) 取细胞适量接种到 75 cm^2 培养瓶继续培养或进行铺板操作。

2. Caco-2 细胞模型的构建及验证

1) 收集对数期的 Caco-2 细胞，用 MEM 完全培养液将细胞浓度调整为 2.0×10^5 cells/mL；

2) 在 Transwell 板（聚碳酸酯膜， $0.4\ \mu\text{m}$ ， $1.12\ \text{cm}^2$ ）（图 2）的基底侧（Basolateral side）加入 1.5 mL MEM 完全培养液，在顶侧（Apical side）加入细胞悬液 0.5 mL；

3) 放入细胞培养箱内培养，每两天换一次培养液，培养一周后每日换液；

4) 继续培养至 21 天；

5) 采用 Millicell ERS 电阻仪（Millipore 公司）测定跨上皮细胞电阻（大于 $500\ \Omega \cdot \text{cm}^2$ ），确定细胞单层的致密性和完整性。



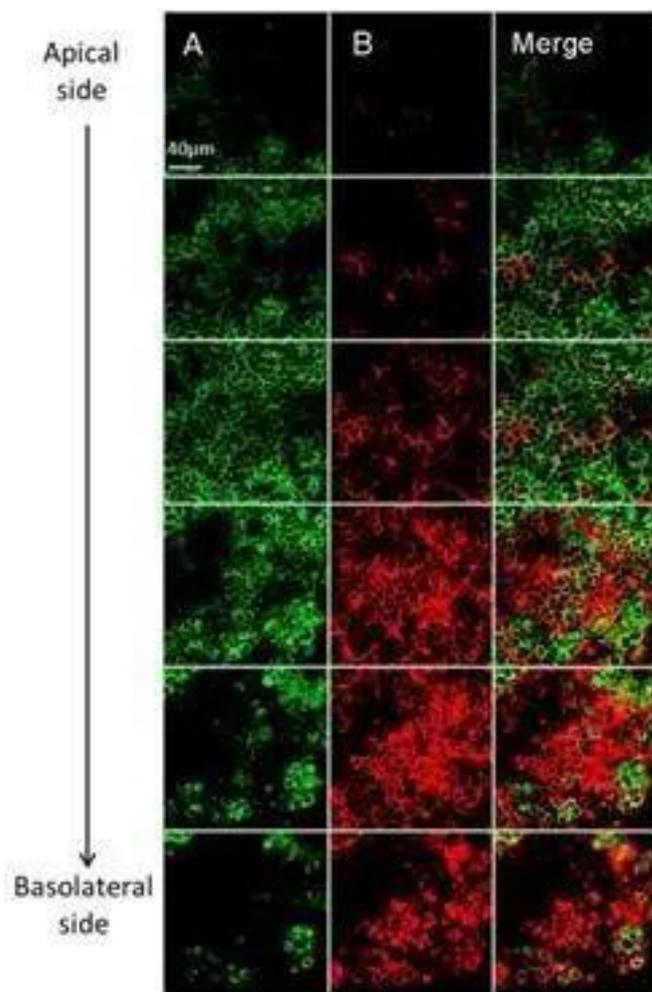
3. 转运研究

下面以荧光标记的药物为例，借助激光共聚焦显微镜来观察药物跨膜转运（图 3）。

- 1) 取出 Transwell 板进行电阻测定，选择符合转运条件的细胞孔（电阻大于 $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ）。用预热（ 37°C ）的 Hank's 缓冲液洗 2~3 遍，并置 37°C 孵育平衡 20~30 min，吸弃洗液；
- 2) 分别取 0.5 mL 荧光标记的药物溶液加入顶侧（Apical side）作为供给液，同时基底侧（Basolateral side）加入 1.5 mL 空白 Hank's 缓冲液作为接收液；
- 3) 37°C 条件下转运 2 h；
- 4) 转运结束后移除孔内荧光液，加 HBSS 小心清洗 3 次，洗去未进入细胞的荧光染料结束转运；孔内加适量 4% 多聚甲醛溶液，室温下固定 20 min；
- 5) 固定完成后用 HBSS 清洗 3 次，加 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33258 适量，室温下染核 1 h；HBSS 清洗 3 次后，加 2 滴抗荧光淬灭剂，小心将单层细胞剪下至玻底小皿中，在激光共聚焦显微镜下进行 Z 轴横切，观察荧光标记药物的跨膜过程。

由激光共聚焦显微镜拍摄的图可以看出，带绿色荧光的药物 A 与带红色荧光的药物 B 在 Caco-2 细胞模型中的跨膜转运速率不同，其中药物 A 的跨膜转运速率慢于药物 B，跨膜转运速率的不同与药物本身的理化性质密切相关。

除采用荧光标记的药物进行跨膜转运研究外，还可以采用非荧光标记的药物进行跨膜研究，此时测定药物的跨膜转运能力就需要借助其他检测方式来（如高效液相色谱）完成。



15 实验心得

来个共享电子实验记录本，小组一起做记录！

作者：麦子

做实验的时候总要带着 protocol 然后边看边做？给大鼠称完体重也要先记在草稿纸上回去再誊抄到本子上，再誊进电脑里？一会纸弄湿了或记得太潦草导致数据混乱，就可能造成大

问题。

我们讲过的一个关于实验可重复性的故事中，来自三个不同实验室的研究者为了为排查不可重复的原因，对每个细节都加以控制，还做了一个 App，使实验记录能及时记录，避免各种意外的差错。今天我们就来聊一下电子实验记录的事吧。

当然不必刻意去找那三个学者为自己做的 App 了，因为这类电子实验记录本（electronic lab notebook, ELN）还蛮多的。不限于实验的话，什么印象笔记、有道云笔记之类都可以的，还能延用到生活中，非常方便。

我还小的时候（呃+_+）跟小伙伴两个人做实验就是用印象笔记，你做的啥我做的啥，各自在手机上记好，同步到云端，这样我们就能及时知道对方干了啥、得到哪些数据（以及闯了什么祸^(oo)^）。回去用电脑整理一下，数据拿去分析，重要步骤写到 methods 里。

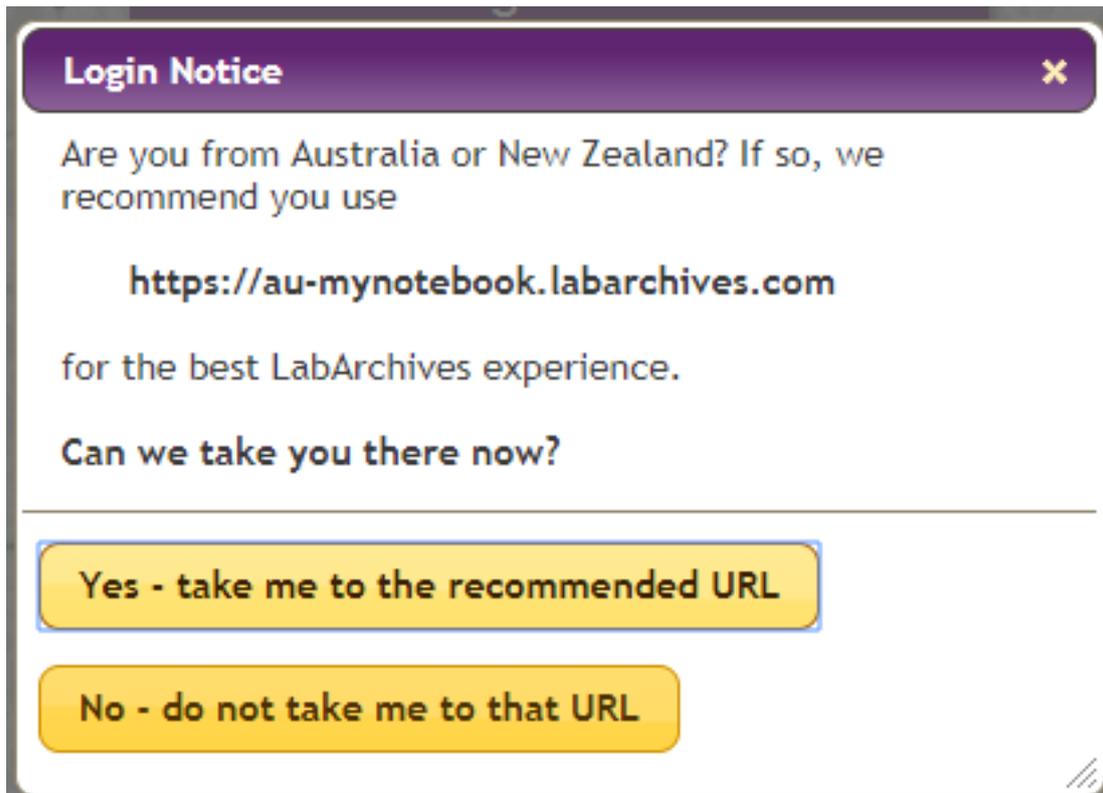
不过后来印象笔记的免费版本功能限制越来越多，就弃坑了。反正和小伙伴也各奔东西了。今天来介绍一个比印象笔记更为专业的实验室记录本：Labarchives。



注册及登录

官网：<http://www.labarchives.com/>

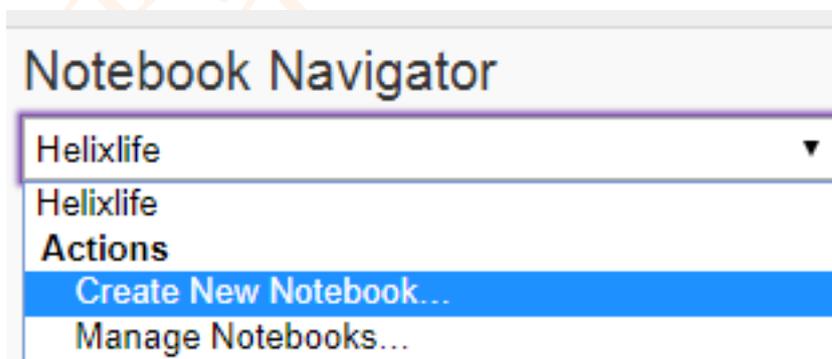
这个电脑端就在网页上用。注册的时候会有个弹窗，问你在哪个位置，如果在澳洲或新西兰，则推荐选用澳洲的服务器。



一定要记住自己选了哪个服务器，以后登录都要在同一个服务器登录。

和小伙伴一起记录实验

好了，登进来之后就可见到记录本了。左边导航栏可以新建和管理笔记本，我就随手建一个命名为 Helixlife 吧。



新建的时候可以选择几种布局，我们就选 lab 吧：

Create a New Notebook

Enter a name for your new notebook (5 to 60 characters)

Enter a notebook name

Choose a folder layout **i**

None

Lab

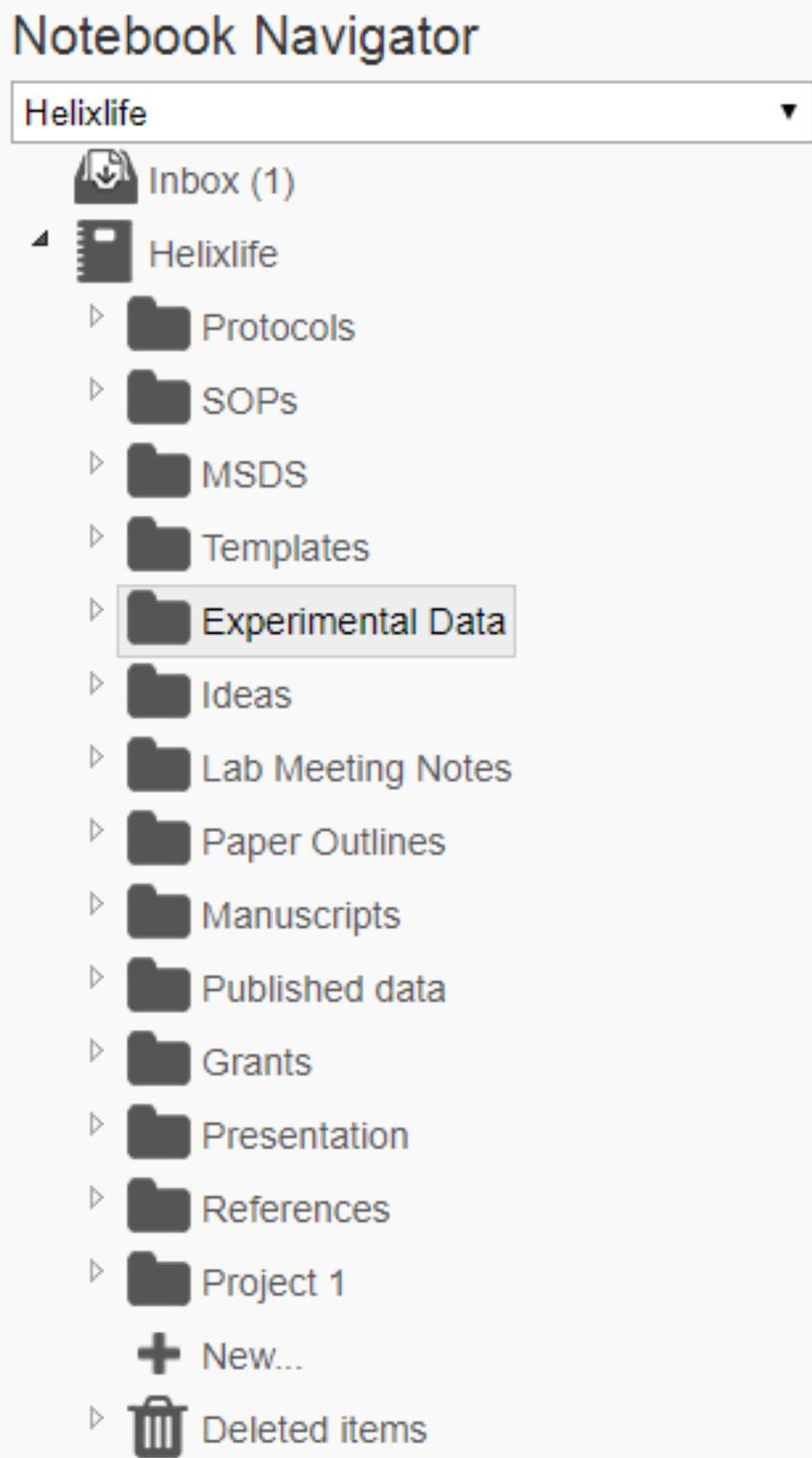
Classroom

From another notebook **i**

This notebook will be created in the account owned by

Create notebook **Cancel**

建好之后，再看导航栏，人家把实验中要涉及到的方方面面都给你把大纲列好了，包括 Protocol、标准操作程序（Standard Operating Procedure, SOP）、化学品安全技术说明书（Material Safety Data Sheet, MSDS）、实验数据、组会记录、文章框架、初稿、基金等等，不够还可以自己加。



接下来点进每个文件夹下的 **New** 按钮就可以添加子文件夹或笔记了。如下图，在某文件夹下新建页面，可选择各种笔记类型，**Plain Text** 就是纯文本，如上方那条“组会记录”~

Rich Text 表示多媒体记录，可添加表格、图片、视频、office 文档、数学公式、手写 (sketch)

等。一个页面可以像下面这样添加多个条目。



The screenshot shows a data entry interface with a purple header bar labeled "数据" and "Add Entry". Below the header, there are two entries. Each entry has a toolbar with icons for edit, download, upload, delete, and share, along with text labels: "move to page", "delete", "revisions", "share", "doi", and "print".

The first entry contains the following text:
大师兄说：师父这是妖怪！
沙师弟说：师父，大师兄说的对！
我觉得吧，哪有这么好看的妖怪，大师兄这人一定是心理扭曲。

The second entry contains a table with the following data:

ID	Value 1	Value 2
T 01	250	7.2
T 02	246	6.8

当然，实验数据和组会记录最好别在一起，我是为了省空间才贴过来.....大家还是按文件夹大纲做好归类，因为人家的广告语就是“Chance Favors the Organized Lab”~

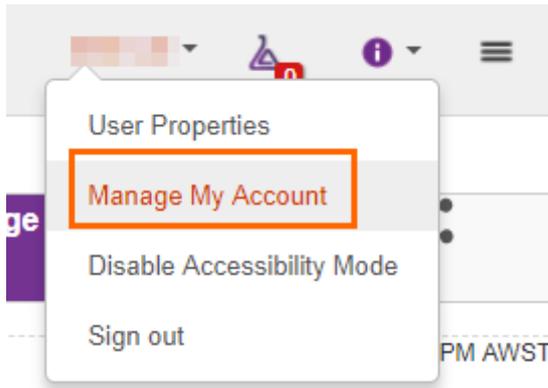


The screenshot shows a "Page Tools" toolbar with several icons. The icon for version control (a circular arrow) is highlighted with an orange box. Other icons include a pencil, a document with a checkmark, a "doi" icon, a share icon, a printer, a refresh icon, and a vertical ellipsis.

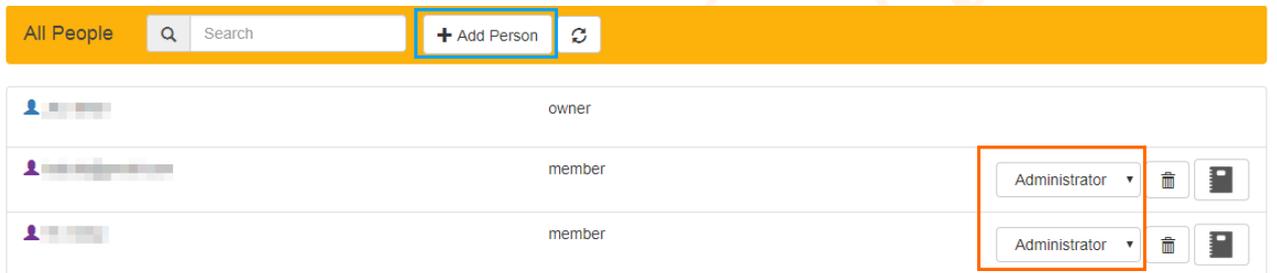
右上角这个符号是版本控制功能，点开可以看到历史修改记录，可以退回某个历史版本。

多终端协作

嗯，说了这么多，怎么把小伙伴忘了，不是说要合作的么~来吧。右上角自己账户名点开菜单，点进管理账户。



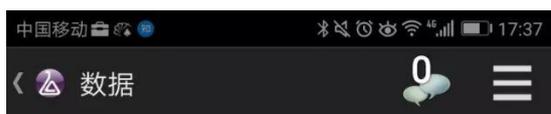
然后添加人员、设置权限，恢常 Easy。



没完，说好了在实验台边及时记录的移动端呢？官网表示支持以下两大主流移动端。



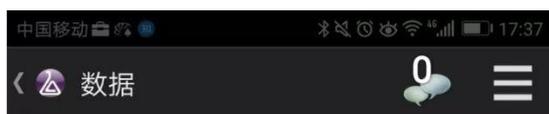
小编木有苹果手机，看下安卓是这个样子的，一个页面下的不同条目还会按图标翻页显示：



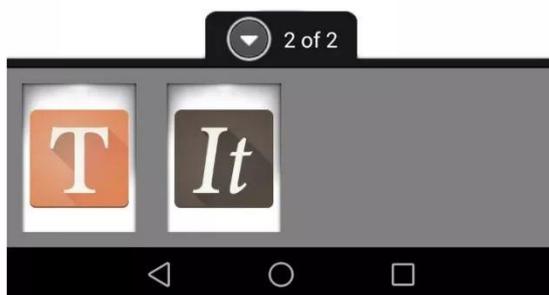
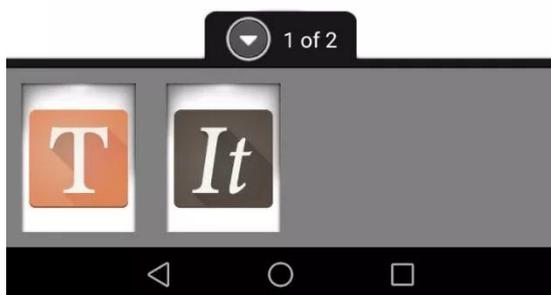
大师兄说：师父这是妖怪！

沙师弟说：师父，大师兄说的对！

我觉得吧，哪有这么好看的妖怪，大师兄这人一定是心理扭曲。



ID	Value 1	Value 2
T 01	250	7.2
T 02	246	6.8



移动端的下载嘛，当然是去各自的应用市场了。苹果就去 app store，安卓就去 play 商店。如果你是每一次安装 play 商店，好像要先安装 google service，啊我不记得了，我已安装多年。对了上 play 商店要科学上网。

盘点 | 那些被误认为是废物的细胞宝藏

作者：麦子

大家都听过诱导多功能干细胞 (iPS)，而最近一种新型干细胞、具有潜力为研究出生缺陷和其他生殖问题提供新方法的诱导性 XEN 细胞 (iXEN) 小伙伴们都知道了吗？我去，听上去老流弊了啊，而它的来源，竟然是类似细胞培养的废弃物！这种钻石级别的存在，这么些年却一直被研究人员倒进细胞房的废培养基回收瓶中，麦子想来都觉得心痛异常啊！



“有缺陷”细胞的绝地反击：

我特么是干细胞啊！

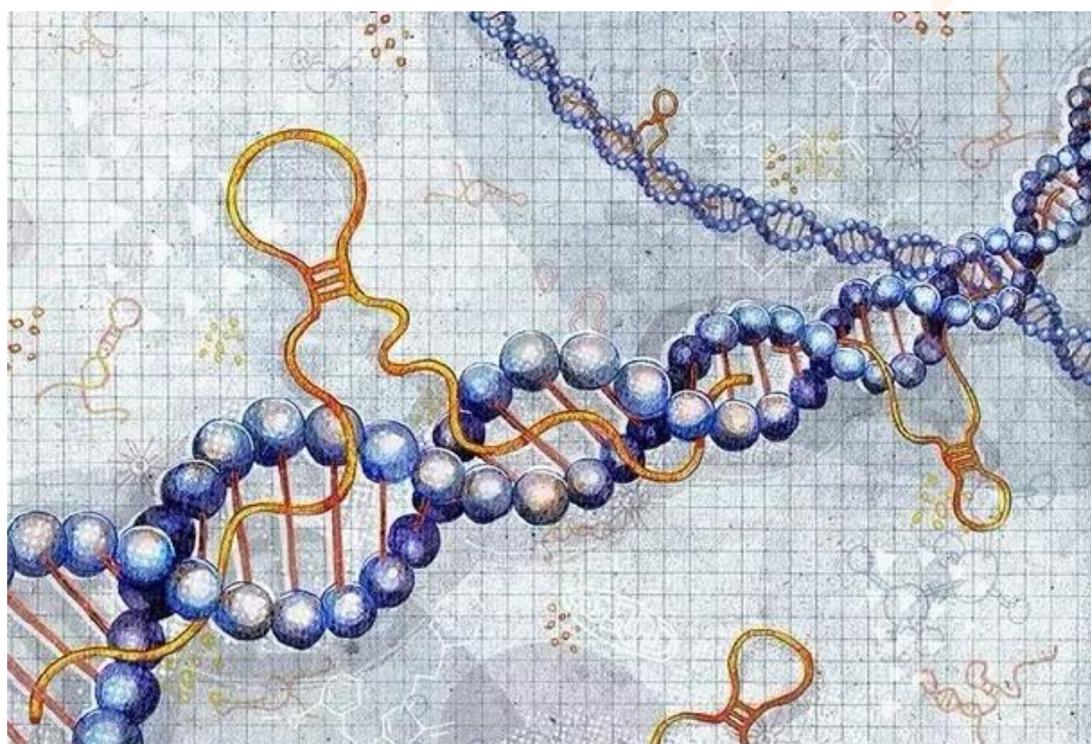
Tony Parenti 是在 iPS 细胞培养物中观察到突然像杂草一样疯长的 iXEN 细胞的，而在此之前，科学家们一直认为此类细胞是有缺陷的，或类似癌症的细胞。如果像以往的科学家那样直接宣判该细胞的死刑，估计这样的发现还不知道何时才能再次浮出水面。相反，Parenti 及其团队则花了半年时间来进行摸索，无非就是顺手多养点细胞做点实验嘛，能有多费劲呢？

iPS 细胞具有超强的可塑性从而可以演变成体内的任何细胞类型，那 iXEN 有什么拿的出手的功能呢？Parenti 及其团队利用小鼠模型发现，它们实际上是一种具有所需性能的新型干细胞，并且通过在重编程过程中抑制 XEN 基因的表达，可以减少 iXEN 细胞的量、增加 iPS 细胞。下一步研究人员的目标是在人类细胞中探索该过程能否再次呈现，也许能够帮助我们提高诱导多能干细胞的质量，并为将来研究保护和滋养人类胚胎的组织奠定基础。

除了我们上面所提的原本被当成废物倒掉的 iXEN 细胞，细胞中或其分泌物中还有曾经被当做是垃圾后来发现大有所有的物质吗？

曾经的“垃圾”变成人人争相抱之的大腿

非编码 RNA

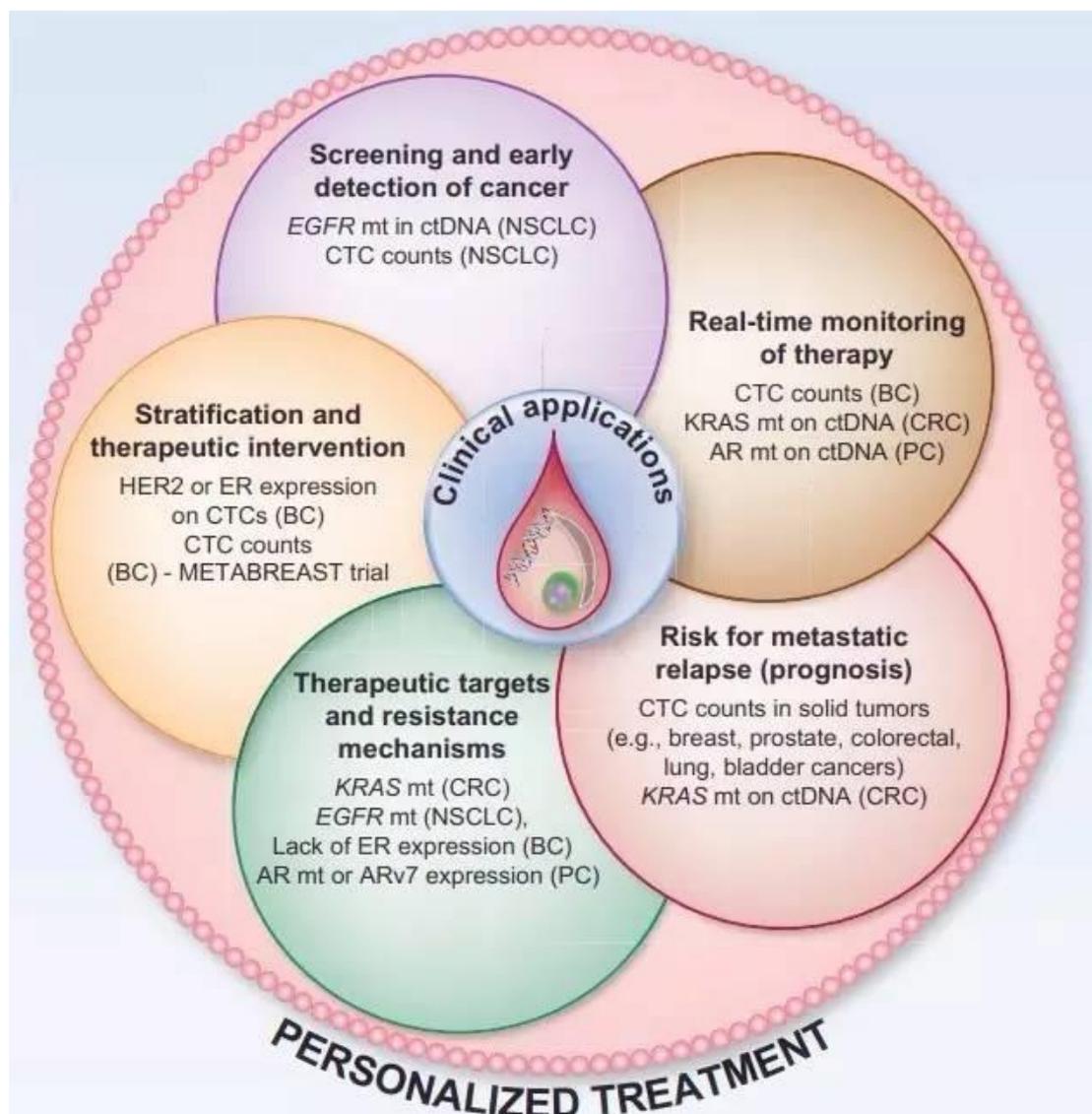


垃圾基因首先浮入脑海！它们转录的非编码 RNA 主要包括小 RNA 以及长链 RNA，因其不能编码蛋白质而被加州理工学院的大野·乾于 1972 年提出用“垃圾基因”的概念来形容它们，而从数量上来说这种“垃圾”竟占据了遗传信息的 98% 之多，可谓队伍非常壮大。

随着包括测序在内的各种实验技术的发展和对其研究的不断深入，垃圾基因的身份才得以被洗白，虽然它们不编码蛋白却是负责调控一些基因表达的“开关”，非编码 RNA 的突变或表达异常与许多疾病的发生密切相关，有关研究对了解基因调控、基因敲除、人类疾病防治及生物进化探索等都具有重要意义，所以成为了各大课题组抱紧的大腿，争相研究。该领域中，经过 miRNA 的大热之后，现在 lncRNA 也成为该领域的重点研究对象，小伙伴们也可以从越来越多的相关标书中发现端倪。

死而无憾，释放出关键信息

我叫 cfDNA



细胞都要死了还有什么用呢？所言差矣，正所谓人之将死其言也善，胞之将死亦如此。濒死细胞释放进循环血液中的 DNA 碎片（血浆游离 DNA， cfDNA），表面上看是细胞排出的垃圾，其实给我们传递了非常重要的疾病信息。在特定的生理条件或疾病过程中，有相当一部分 cfDNA 会与在健康的时候不同，因而 cfDNA 也被称为细胞的一种 DNA 指纹。基于这一点，近年来 cfDNA 已被用于无创性诊断。

PNAS 期刊上最新的一篇文章报道，研究人员根据濒死细胞释放的循环 DNA 的甲基化模式，

开发出了一种血液测试方法，无需预先猜测发生了疾病的特异器官，就可以高度敏感、特异的检测多种病理过程，包括糖尿病、癌症、外伤和神经退行性变。

干货 | 小实验里如何挖出大文章？

作者：老谈

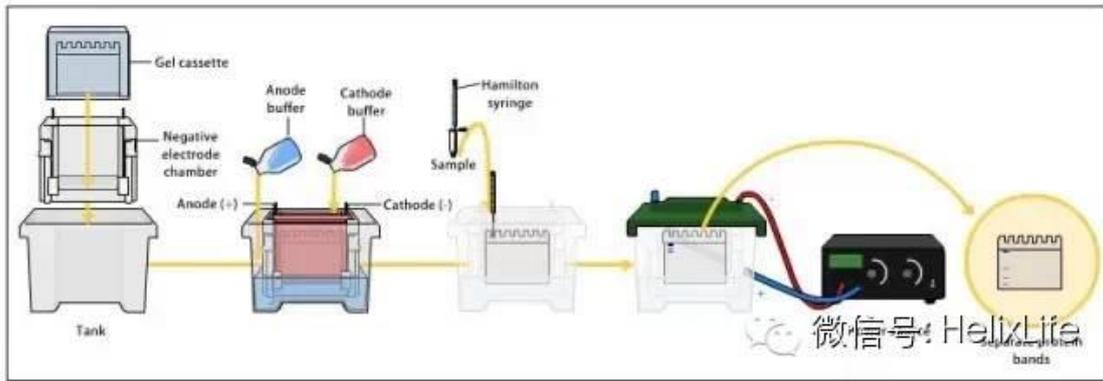
胸科大夫老乔是老谈的好基友，本来最擅长开膛剖肚，如今为了老板的国自然不得不弃医从文。最近眼瞅这国自然提交日益逼近，为解忧思，常与老谈闲来饮茶畅谈。

为什么科室会选择老乔下乡知青呢？这点还真不能怪他的老板。科室里能开刀的就三个人：李明、韩梅梅和老乔，李明明年退休，韩梅梅可能要调到其他医院，眼瞅着只剩老乔一人了，对其下手，自然没有异议。

不过咱老乔眉清目秀，聪明好学，思维活泼，年轻有为，是个不错的科主任苗子。其实老乔不老，86年的，甚至做过几台牛逼任性的手术，在江湖上小有名气。

既然老板下了死命令，不去不行了，想着以后科主任人前人后的风光，老乔满血的背着大学时学过的基本专业书，来到了我和酸菜的 HOLLY 实验室，打算好好干一番事业。

第一天，他来到实验室就看到我们平台 Western Blot 的技术专家桑美丽同学在进行 **WB 抗体孵育**。作为一个摸惯了手术刀的人，顿时被这门久仰的技术吸引过来。



科研资源网



美丽，美丽，你在做传说中的 Western Blot ？

这不是很常规的技术么



能让我玩玩吗？

这个估计不行，切惯了肉体，把我的条带切掉了老谈会赏我一丈红的，and你懂？



哇靠，谁说我不懂，原理我都知道好不，张口即来，倒背如流！

那我考考你，WB中一抗和二抗的区别，一抗和二抗是如何结合的？



一抗是先加的，二抗是后加的。怎么结合？特异性结合的呗！

呵呵



“回答的不对吗？反正就是这么个意思。哈哈



为了让我们的桑美丽同学继续干正事，我只能默默把老乔拎过来进行教育。不把各项实验技术都搞懂就来我们的大本营捣乱，我得让他在大家面前不要显露出和我很熟的样子。

“老乔，比如你要检测的蛋白为 A，它有 a, b, c, d 四个表位(epitope)，可以被抗体特异性认识。制作针对 A 的抗体是将蛋白 A 的一段，比如包含 b+c 段，打入兔子（最常见）或其他动物（山羊 goat，大鼠 rat，鸡 chicken，仓鼠 hamster），由于这是外来入侵物，动物自身的免疫系统会生产针对它的抗体来清除这个异物，而产生的抗体有些会识别 b 位点，有些则识别 c 位点。之所不用完整的蛋白，是因为全长通常会太大。然后收集被免疫了的动物的血清，这个含有针对蛋白 A 的多克隆抗体（因为是识别 c+d 的混合抗体）就称为抗血清（antiserum）。”

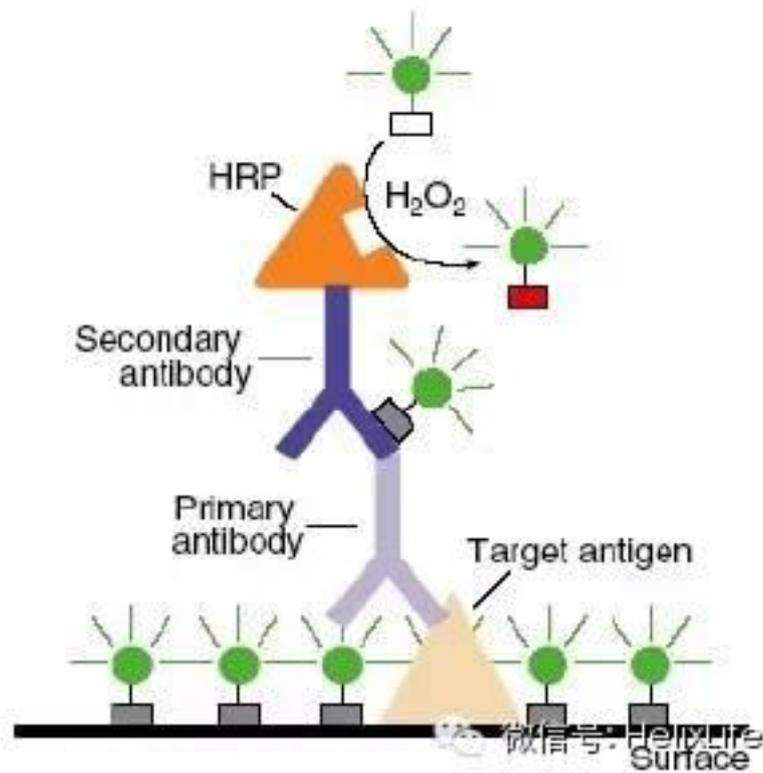
“恩，好像有的产品卖的直接就是抗血清”

“的确，有的则再一步将抗体纯化出来。这种多克隆抗体一般会便宜一些。而通过体外刺激小鼠的 B 细胞和肿瘤细胞的杂合体，分离出单克隆进行培养，可以产生出只针对一个表位 b

的单克隆抗体 (monoclonal antibody), 这种抗体的特异性更高, 但价格也更贵。但具体到用单抗还是用多抗, 则要具体情况具体分析。比如你要测的蛋白浓度很低, 用多抗检测到的可能性会比用单抗高。又或者待测蛋白会被加工切割成两段, 要想两段都检测到, 显然应该用针对两段表位的多抗。”

“由此可见, 一抗都是特异性针对你要检测的蛋白, 你要测 A, 他要测 B, 我要测 C, 所以产量就不可能太大, 因为需求量没有那么大。”老乔开窍了, “那二抗是个什么情况呢?”

“首先要了解抗体的结构。抗体结构就像一个 Y 字形, 两个 Y 的部分称为可变区 (Fab), 正是这个区域特异性地识别抗原的表位。就像一把钥匙配一把锁一样, 表位 b 只被含有 b' 可变区的抗体识别。而抗体 Y 字形下面的主干部分称为恒定区 (Fc), 所有人的抗体的 Fc 都是一样的, 不同的只是 Fab 区, 可以是 b', 可以是 c'。所有鼠的抗体 Fc 也都是一样, 所有山羊的 Fc 也都是一样。 所以制二抗, 就是用一抗的 Fc 区去免疫动物, 方法同制作一抗。”



“另外，注意如果一抗是在兔子上制作的，那么制二抗时就不能再打兔子了，因为兔子不会对兔子的 Fc 产生免疫反应。不然兔子肯定有自身免疫疾病，自己产生抗体攻击自己。有一部分不幸的人就患有自身免疫疾病。话说回来，从兔子中抽出的任意抗体，不一定要一抗（因为所有的 Fc 都一样），制作只含有 Fc 段的片段，再打到山羊中，从而获得了针对兔 Fc 的抗体。这个抗体能够识别所有来自于兔子体内的抗体，不论它们的 Fab 段是什么。也就是说二抗的适用范围远远大于一抗，因为一抗是一对一（Fab 对表位），二抗是一对多（动物 2- Fab 对动物 1-Fc）。所以不是二抗抗一抗不特异，而是二抗抗一抗的恒定区。”



老乔听完好像懂了的样子，不断感慨一个小小的 WB 实验蕴藏这么多知识！那我得让桑美丽同学给他安排任务了。

老谈杂谈

日常实验过程中，我们常见的一些方法能不能搞懂他的精髓会最终影响到你对实验结果的判断和把握。别小看了 WB 这么平常的实验，二抗抗一抗的原理不是人人都能理解透彻和说的明白的。善于琢磨细节，了解最本质的东西，才是科研人员应该具备的素质。

推荐一个可以看实验视频的好去处

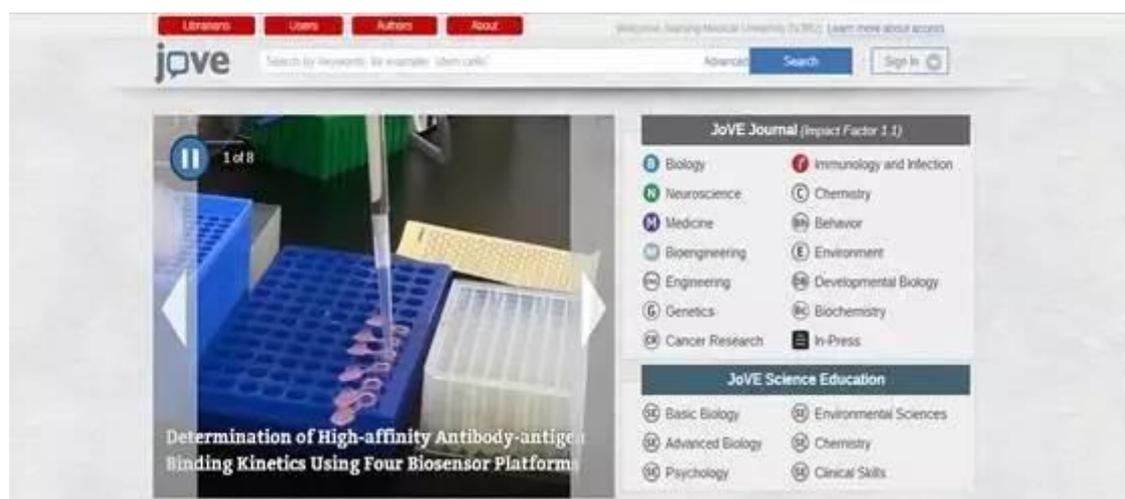
作者：江名

作为一名科研人员，从实验小白开始，就会跟师兄师姐们不断学习新实验新方法。可常在河边走，哪能不湿鞋？有一天导师突然要求你查文献查资料，做一种实验室之前从没做过的实验。但有些时候，在文献中并没有详细地描述实验过程。怎么办？下面介绍视频实验期刊——**Journal of Visualized Experiments (JoVE)**。

JoVE 是一份展示可视化实验的期刊，是世界上第一个同行评议的科技视频期刊。JoVE 的视

频出版目标是以动态的形式展示作者的方法、数据分析和结果。它侧重于出版新的方法，现有技术的创新应用，以及标准操作的科研报告，以帮助研究者克服面对当前科学研究中两方面的巨大挑战，重现性差，以及学习新实验技术所需的大量时间和密集型的工作。

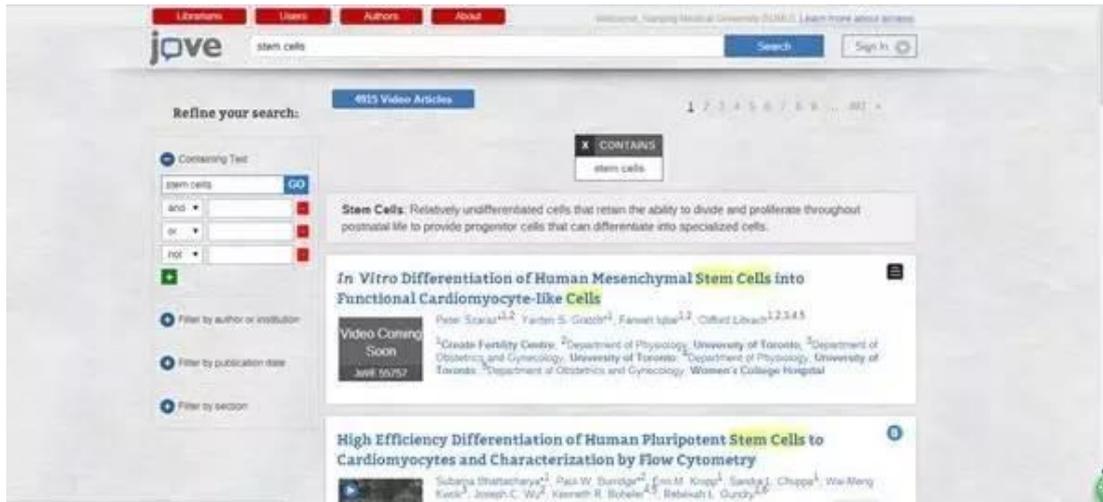
1.打开 JoVE 主页，可以看到 JoVE 主要出版生物、医学、化学、物理和环境等研究领域的实验方法。



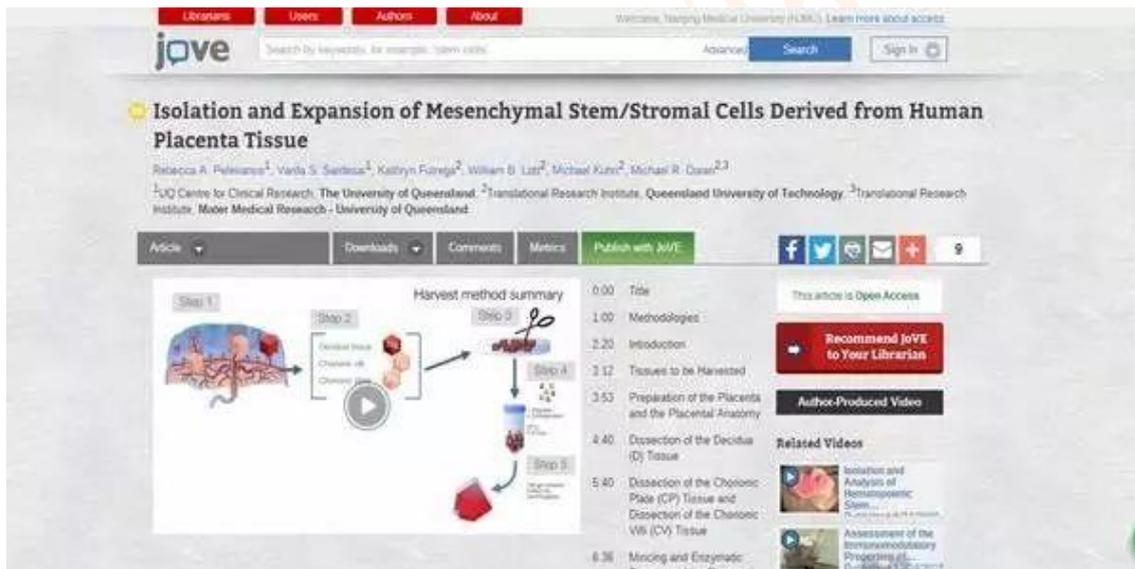
2.JoVE 还特别设立了科学教育模块，建立了 JoVE 科学教育数据库。该数据库致力于通过简单、易懂的视频演示而教给读者实验室的基本操作。点击 JoVE Science Education,可以搜索使用实验室的一些常用设备和相关实验的基本标准操作。



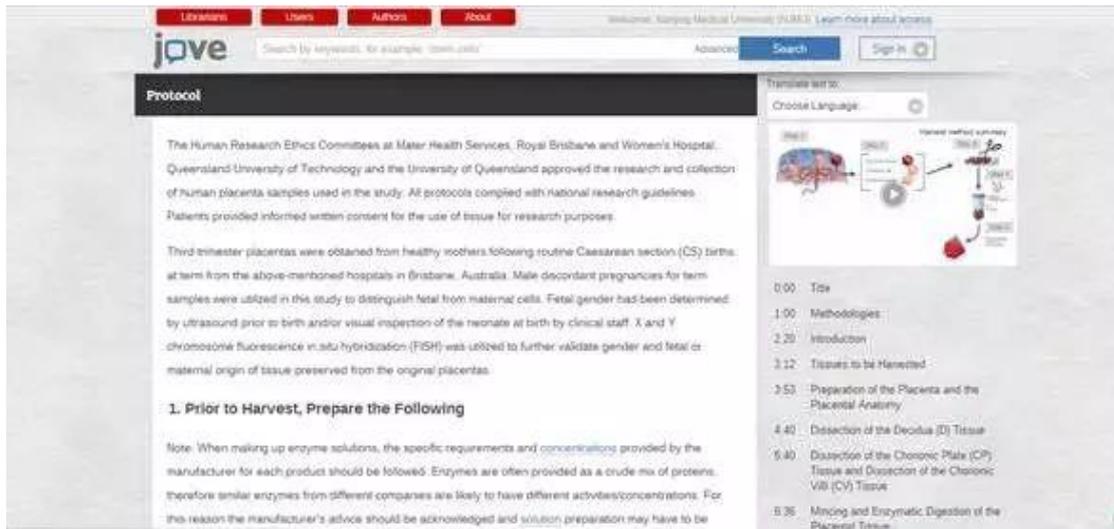
3. 在 Search 一栏中输入关键词，可以看到如下界面。在网页左侧，可以对查询结果设置筛选条件，包括作者、出版时间等。



4.点开文章，首先看到文章视频部分，可以观看视频，学习详细实验步骤以及注意事项。同时，视频支持下载，可以保存到电脑上以供学习。



5.出版的每一个实验技术视频都附有详细的文字，包括 summary, abstract, protocol 等等，里面详细记录了实验相关资料。



JoVE 实现了比传统文本文章更高效的信息传播，这种透明而直观的出版形式，对于年轻研究者实验技术能力的提升大有裨益。

干货 | “神枪手”是怎样炼成的？

作者：毛博

如果能够成为一名神枪手，该是多么威风的一件事啊，好了，想多了不是，作为实验狗，我们所说的“枪”，当然指的移液器。能把移液器用好，可不是一件容易的事哦，你知道吸液时该浸入液面以下多深吗？你能准确地移取 Tween、高浓度蛋白溶液等粘稠的液体吗？长期使用后，你的移液器还准吗？你会自检移液器吗？今天毛博就来传授几招“吸液”绝招，助你早日成为“神枪手”。

1.吸液时总有气泡，如何解决？

吸液时候出现气泡的原因很多。1) 没有将移液键按到底就插到了液面以下，然后你又向下按，排出了空气，木有气泡才怪了；2) 心太急，还没吸满就提起移液器，使吸头脱离了液面；3) 液体本身就容易起泡泡，比如表面活性剂；4) 前次排液没有按照要求将吸头靠壁排液。解决方法只要对症下药即可。

2.一点很难打出，怎么办？

残余液体出现的原因，要么是移液器密封性已经不太好了，要么是吸头对液体的粘附过大。你只要对症下药即可：

- 1) 你可以自检一下自己的移液器（方法见下）。其实很多情况下，吸头才是主要问题。
- 2) 选择高品质的吸头：超低吸附吸头。
- 3) 外置活塞移液器（“油枪”）也是一个好选择哦。



3. 移液器的自检

采用重力称重法。1). 以额定量程, 50%额定量程, 以及 10%额定量程三个点作为校准点, 每个点至少测三次; 2). 三个校准点处的称量值取平均; 3). 根据测量环境的温度, 将三个平均值各乘以水在此温度下的密度系数 (见下表), 这样就把称得的质量换算成了体积;

Excerpt from DIN EN ISO 8655, Part 6.
Table refers to 1013 hPa

Temperature °C	Factor Z ml/g	Temperature °C	Factor Z ml/g
15	1.0020	23	1.0035
15.5	1.0020	23.5	1.0036
16	1.0021	24	1.0038
16.5	1.0022	24.5	1.0039
17	1.0023	25	1.0040
17.5	1.0024	25.5	1.0041
18	1.0025	26	1.0043
18.5	1.0026	26.5	1.0044
19	1.0027	27	1.0045
19.5	1.0028	27.5	1.0047
20	1.0029	28	1.0048
20.5	1.0030	28.5	1.0050
21	1.0031	29	1.0051
21.5	1.0032	29.5	1.0052
22	1.0033	30	1.0054
22.5	1.0034		

4). 最后嘛, 当然就是和移液器自称的精准度比较。在标准以内, 那么恭喜你啦; 但如果超出精准度范围, 那么就需要校准咯。

4. 如何移取粘稠的液体?

在实验中经常需要移取 Tween、高浓度蛋白溶液等粘稠的液体。那么, 如何准确地移取呢? 这里介绍两种方式:

1). 反向吸液。移液器打在第二个停点时吸液, 排液时打到第一个停点。这样做能够补偿一部分因为粘稠而挂壁的液体。另外, 使用超低吸附吸头。2). 使用“油枪”。“油枪”是外置活塞式移液器的俗称。我们用的移液器一般是空气活塞式的, 这种外置活塞移液器的吸头更像

一支针筒，可以把内含的液体完全刮下来，不但可以准确地移取高粘度液体，还可以移取容易起泡的液体，例如表面活性剂。

5. 倒吸的问题

移液枪要注意不能有液体进入到枪内，倒吸是一大忌讳，请务必注意。如果不小心发生倒吸，一定要及时清理移液器哦，不然生锈啊，腐蚀啊什么的都会影响精准度的。有些品牌的移液器下半支很容易拆卸，那么用户就可以自己做清洁工作了，省时省力又省钱，实乃业界良心。

6. 枪的保养

1). 调节量程时请温柔一点。一般移液器内部都是通过齿轮转动的，太粗鲁的转动必然磨损齿轮，磨损就导致不准。2). 不要倒吸，倒吸后请及时清理。3). 有些品牌的移液器下半支活塞是需要涂油的，一般这样的移液器方便拆卸且包装内会附赠一小支硅油，那么你就可以拆下来涂油了。

对了，忘了回答第一个问题：吸液时，该浸入液面以下多深？这其实是一个最简单的问题。ISO 标准上指出：吸液时将吸头浸入液体中 2-3 mm 即可。

Protocol 集中营，你值得拥有！

作者：子非鱼

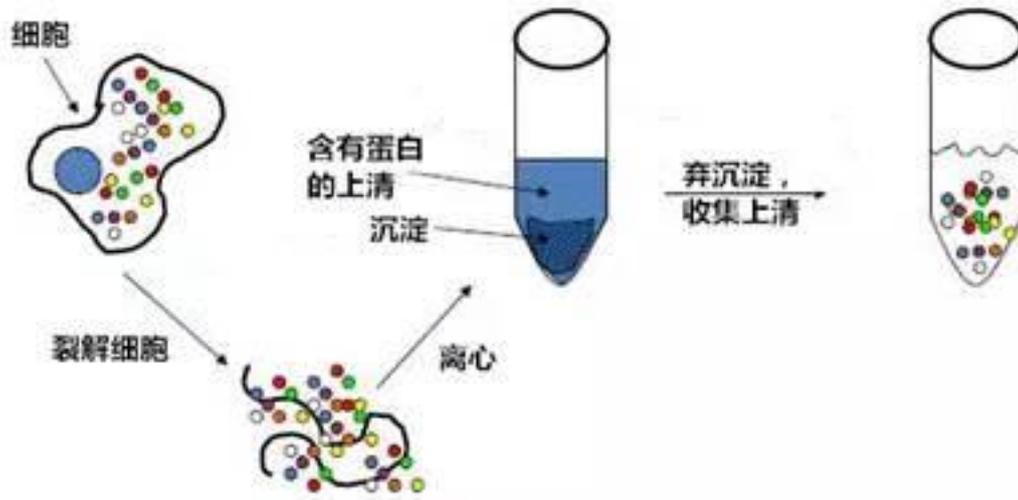
实验 protocol 往往是科研汪们行走江湖时必备的武林秘籍，且一份真正靠谱的 protocol 绝对是神兵利器。而在免疫学研究之势如火如荼的今天，其实验手段更是五花八门，让人眼花缭乱。那么现在小鱼就把免疫学上最常用的基础实验（western blot、免疫共沉淀、免疫组化及 ELISA）的 protocol 介绍给大家。

Western blot (WB)

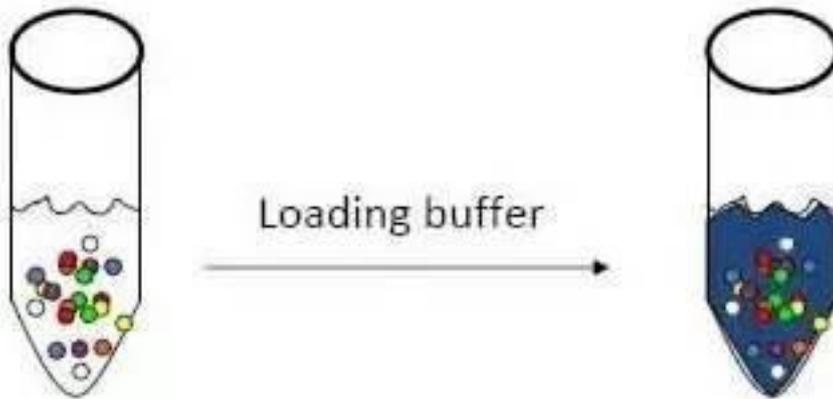
WB 是用特异性抗体对 PAGE 电泳的蛋白质样品进行着色，并通过分析着色的位置和深度来获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中表达情况的信息。

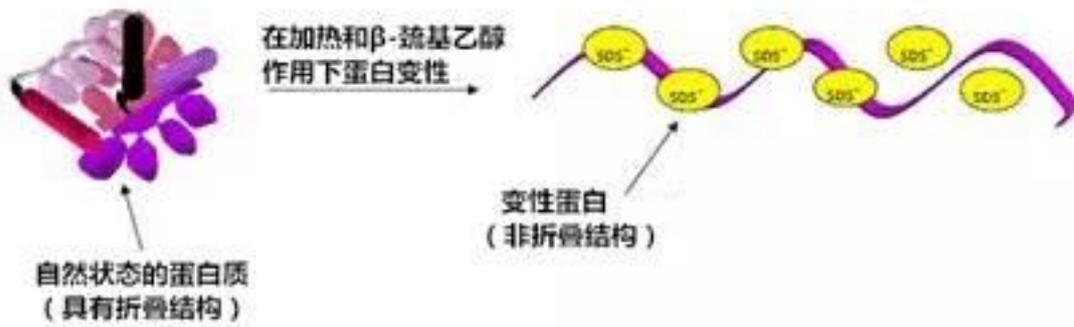
Protocol:

1 从细胞中提取蛋白，并测定蛋白浓度含量。

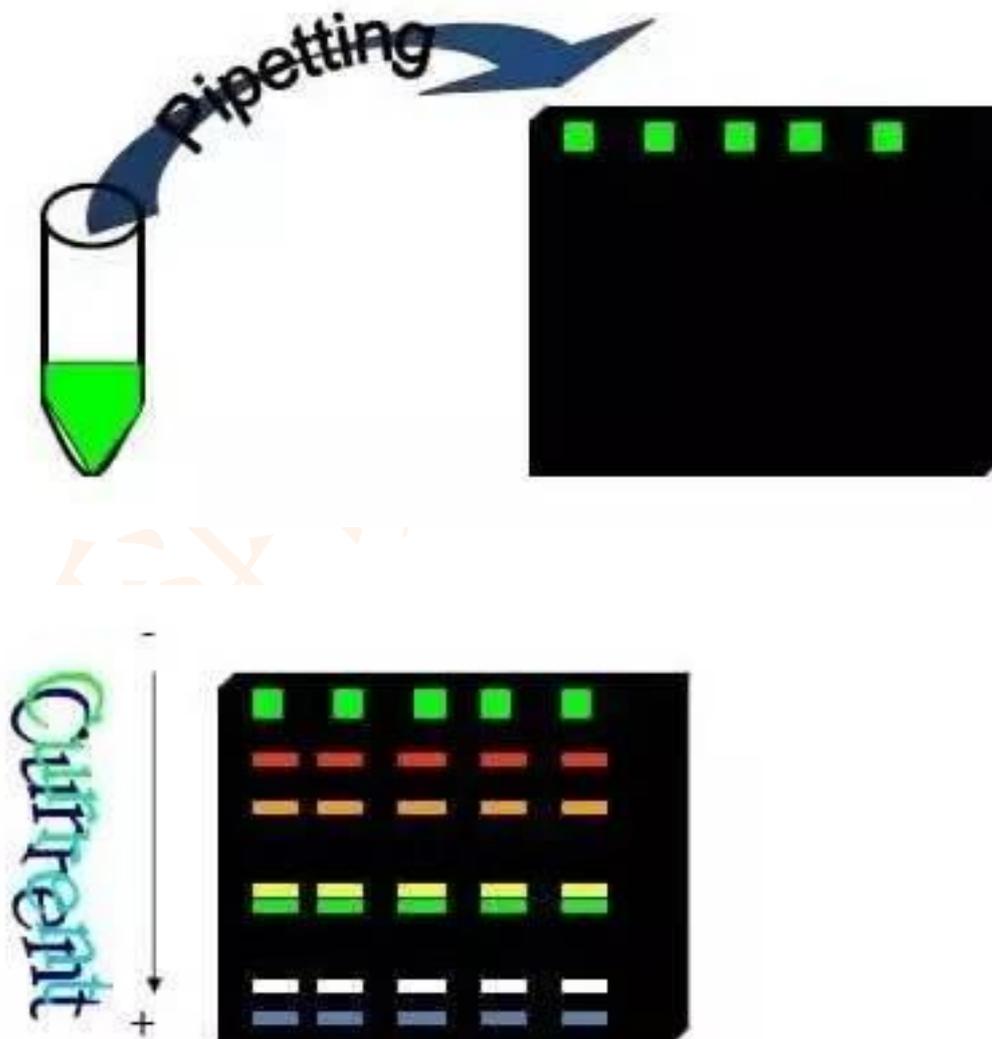


2 取适量蛋白液与 loading buffer (含有 SDS 和 β -巯基乙醇) 混合，加热煮沸 5min，使蛋白变性后与 SDS 结合携带负电。

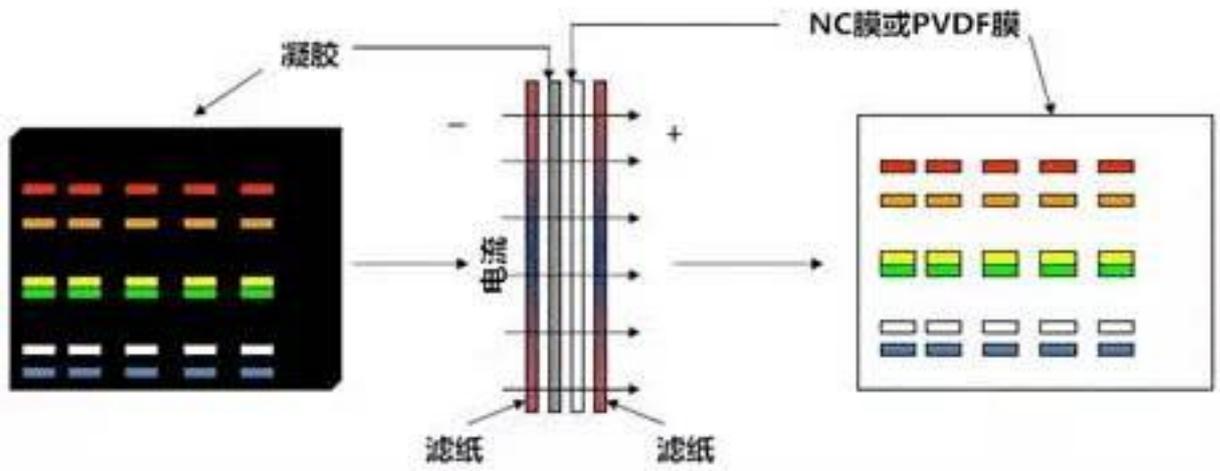




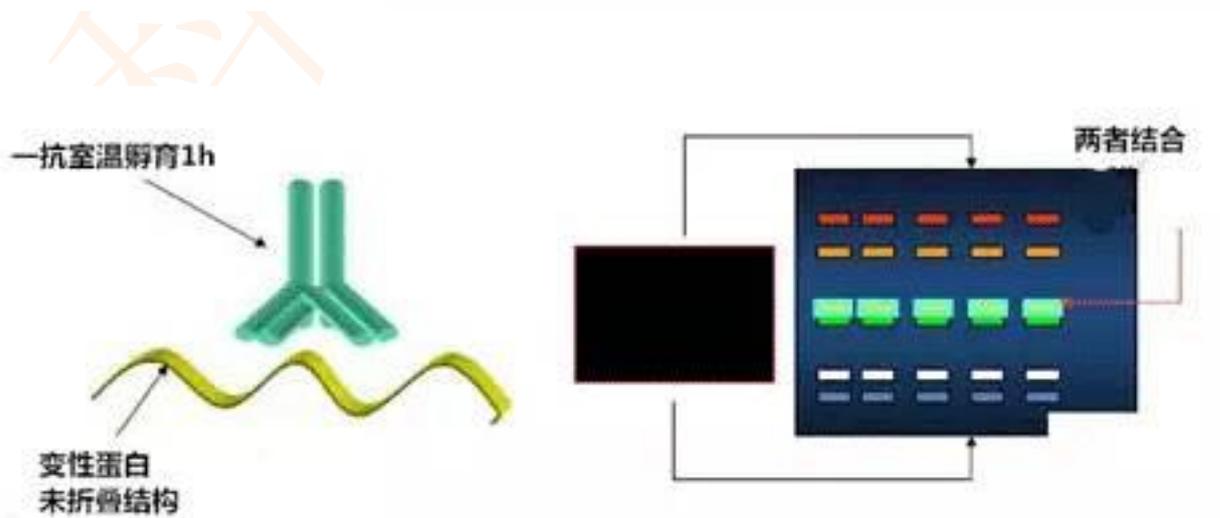
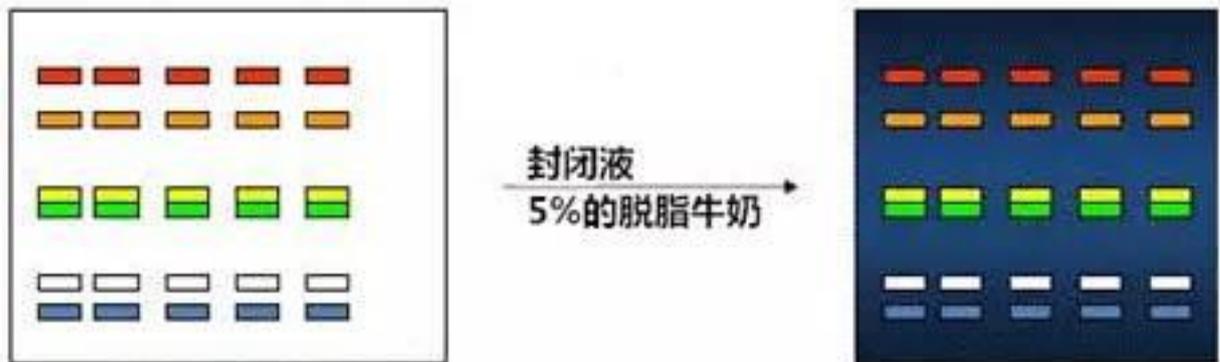
3 将变性蛋白进行 SDS-PAGE 胶电泳。在电压的作用下，带负电的蛋白质由上向下在凝胶里移动，且蛋白的分子质量越大，其迁移率越慢。

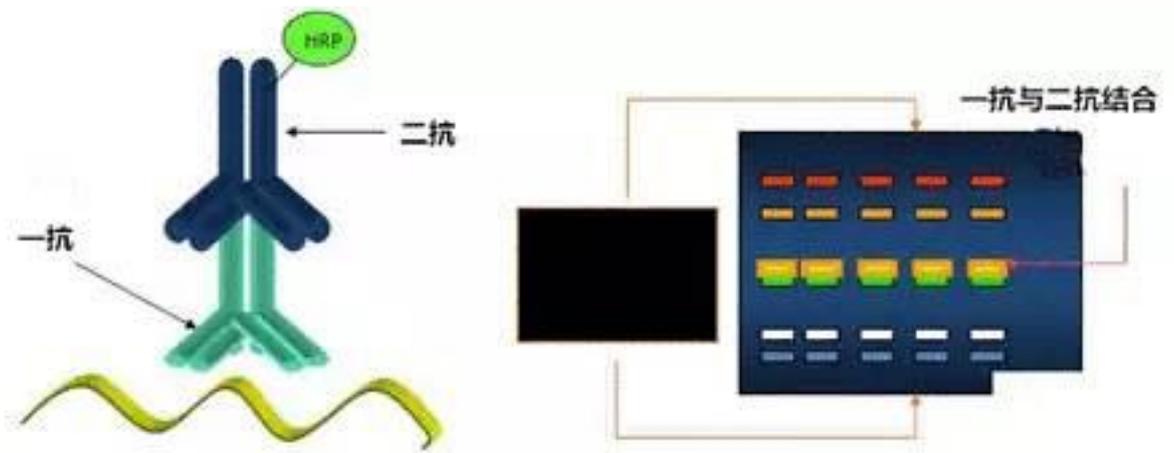


4 转膜：通过半干法或湿转法将 PAGE 胶上的蛋白转移至 NC 膜或 PVDF 膜上。

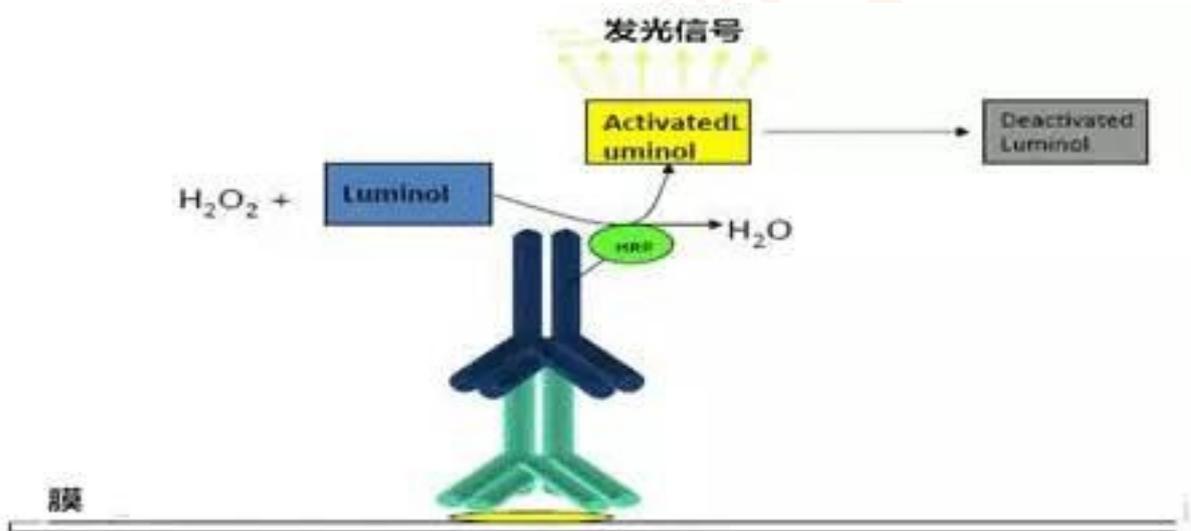


5 免疫印迹：封闭&敷抗体。





6 检测方法

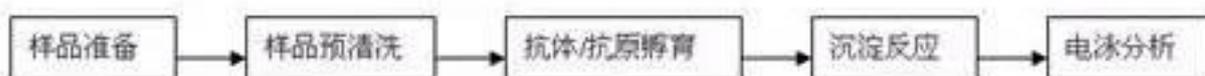
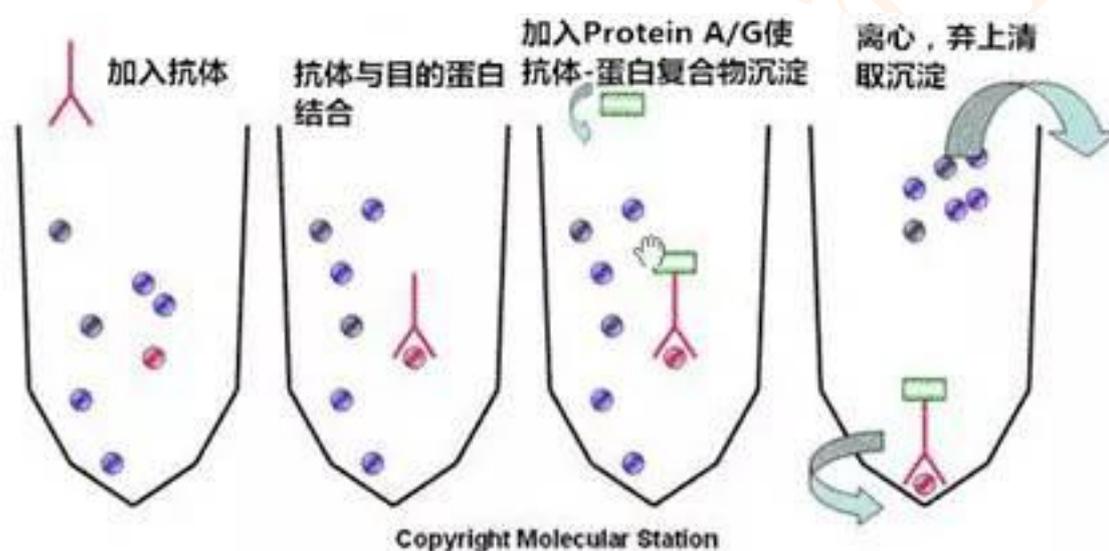


免疫共沉淀

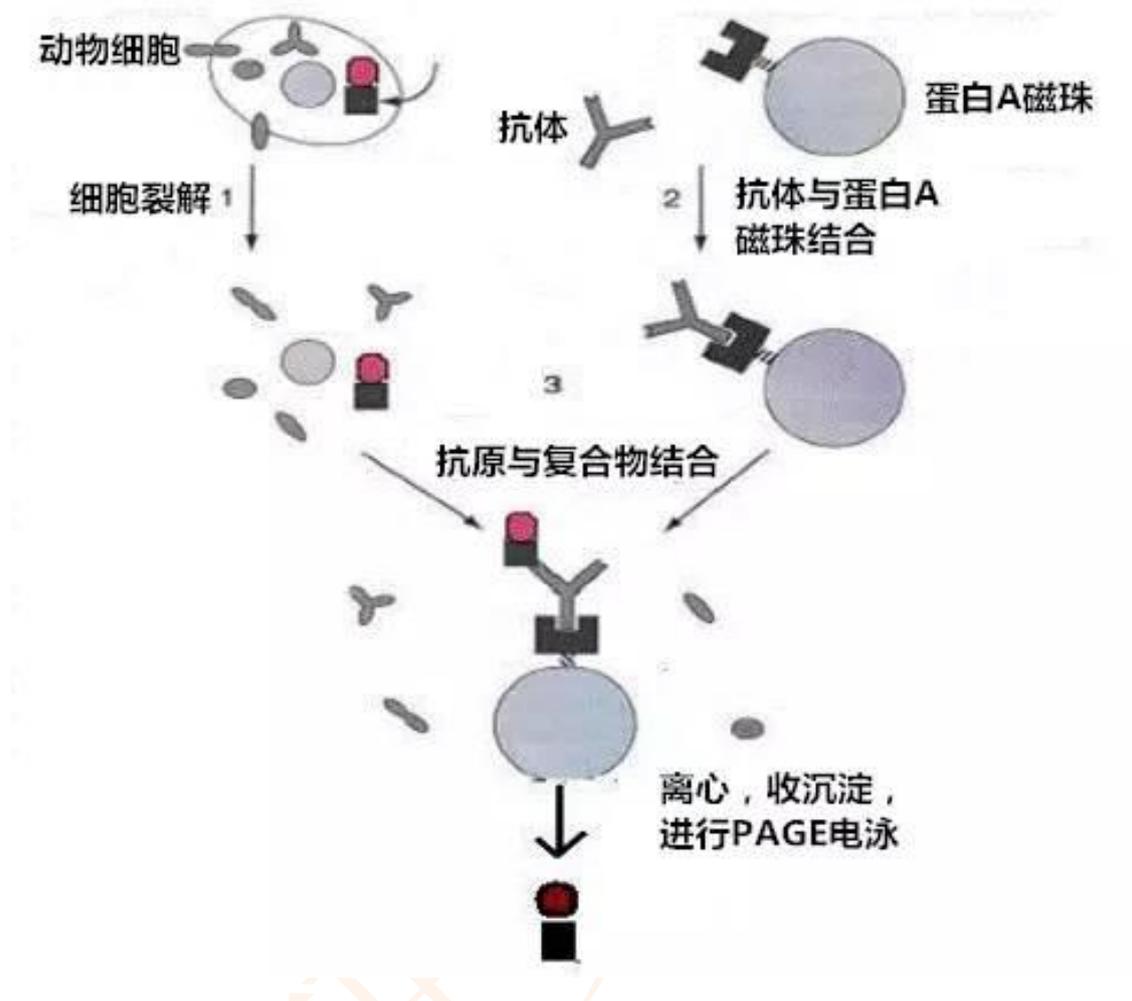
免疫共沉淀是利用抗原和抗体的特异性结合及细菌的 Protein A 或 G 特异性结合到免疫球蛋白的 Fc 片段的现象，将靶蛋白从混合体系中沉淀下来。

该实验共包括了 3 种类型：IP（如染色体免疫共沉淀 CHIP）、Co-IP 和 Pulldown

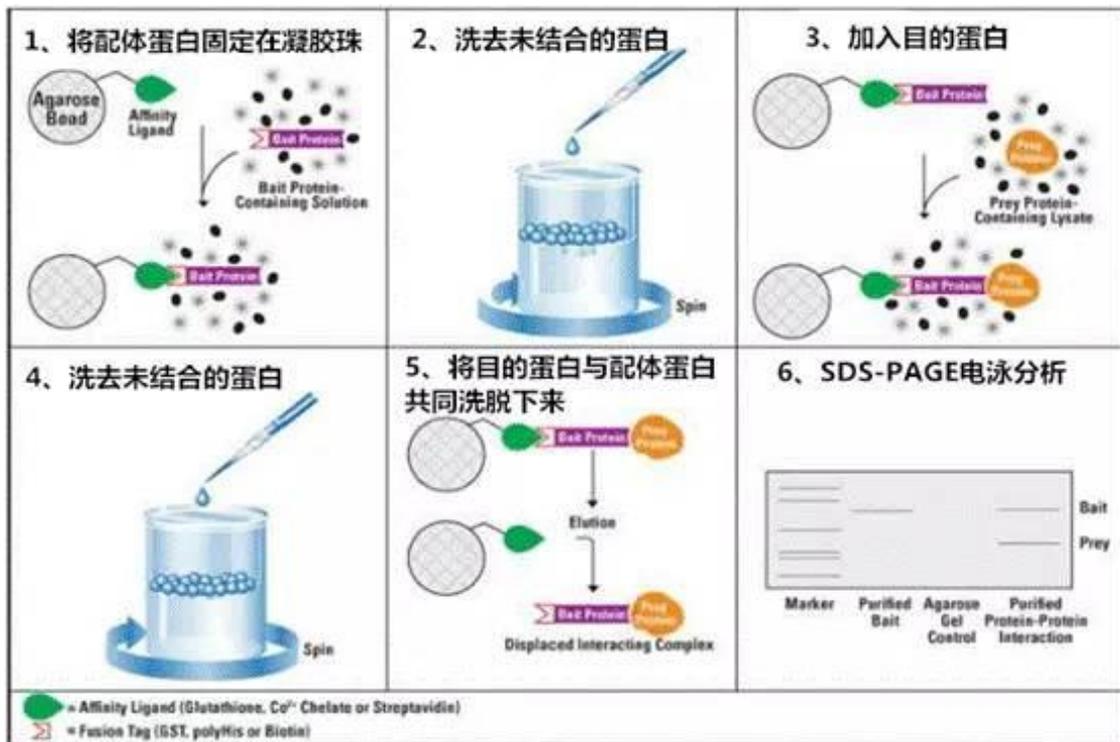
IP 是只利用抗体抗原的特异性结合即可将靶蛋白从混合体系中沉淀下来。其中，CHIP 便是由 IP 技术衍生而来。（回复关键词“CHIP”，可查看相关文章，[关键词回复正确姿势请点击这里](#)）



Co-IP 是在细胞非变性裂解时，蛋白之间的相互作用被保留下来，如果蛋白质 X 的抗体免疫沉淀 X，那么与 X 在体内结合的蛋白质 Y 也能沉淀下来。



Pull Down 是将靶蛋白的配体固化在亲和树脂上充当一种“诱饵蛋白”，当目的蛋白溶液过柱时，可捕获与之相互作用的目的蛋白，洗脱结合物后通过 SDS-PAGE 电泳分析即可。



免疫组化

免疫组化是应用免疫学及组织化学原理,对组织切片或细胞标本中的某些化学成分进行原位的定性、定位或定量研究

其具体操作流程见以下视频:

酶联免疫吸附测定 ELISA

ELISA 是将可溶性的抗原或抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上,利用抗原抗体结合专一性进行免疫反应的定性和定量检测方法。

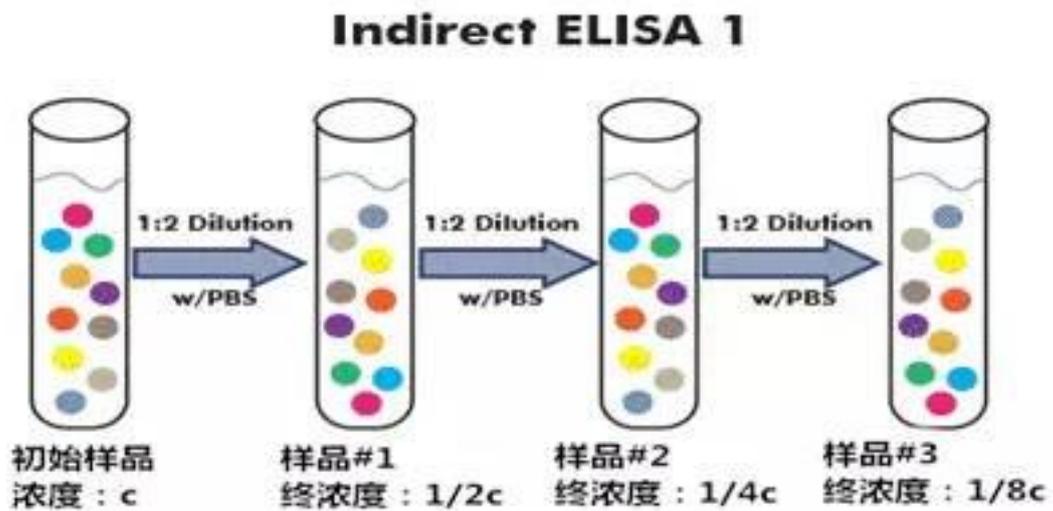
ELISA 包括三种类型: 间接法、夹心法和竞争性法

间接法 (Indirect ELISA)



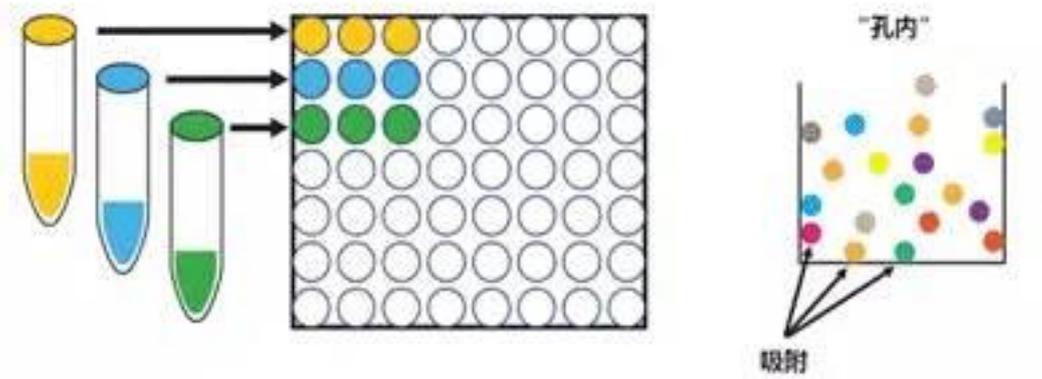
Protocol:

1 准备样品：样品来源可以是细胞裂解物或是血液中的蛋白混合物，用 PBS 进行梯度稀释。



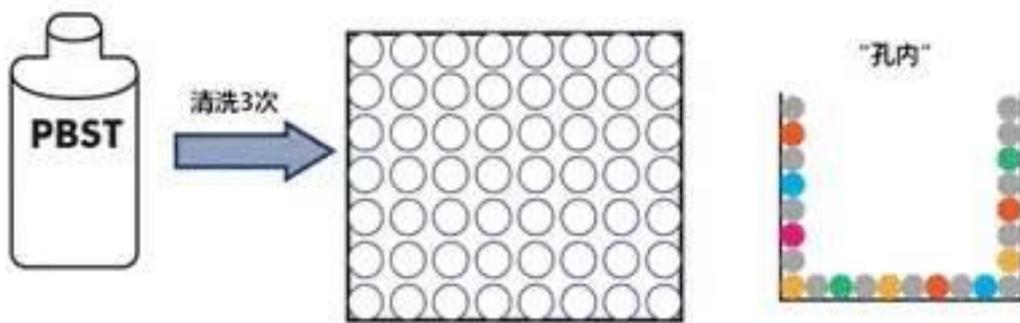
2 将稀释好的样品加入 96 孔板， 4°C 过夜孵育，进行抗原吸附。

Indirect ELISA 2

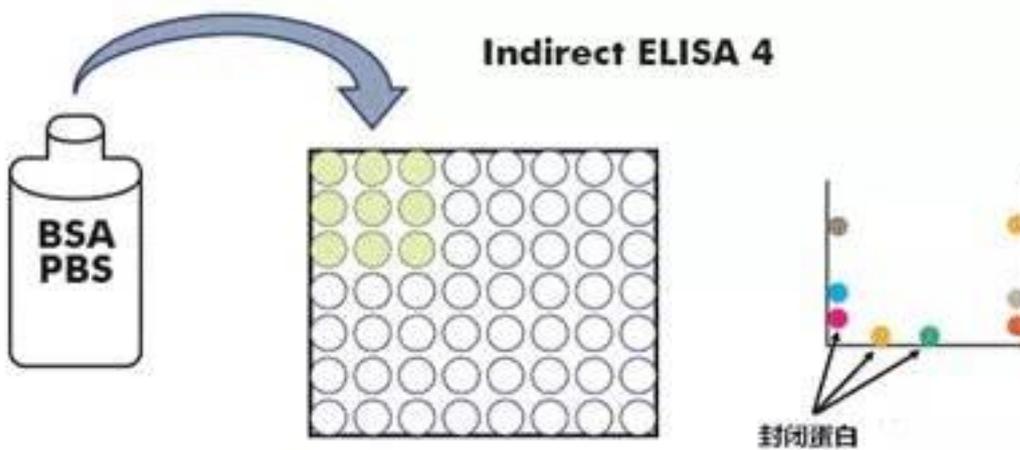


3 孵育后，用 PBST 清洗 3 次，以除去孔内没有结合或结合力弱的抗原。

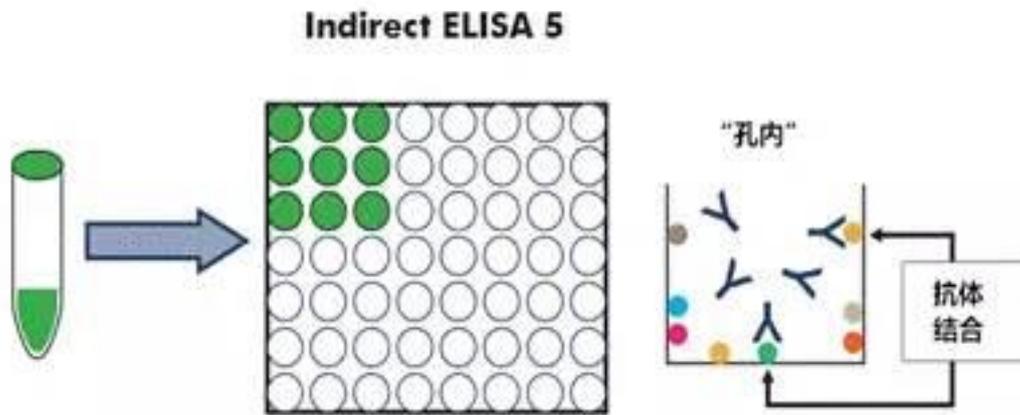
Indirect ELISA 3



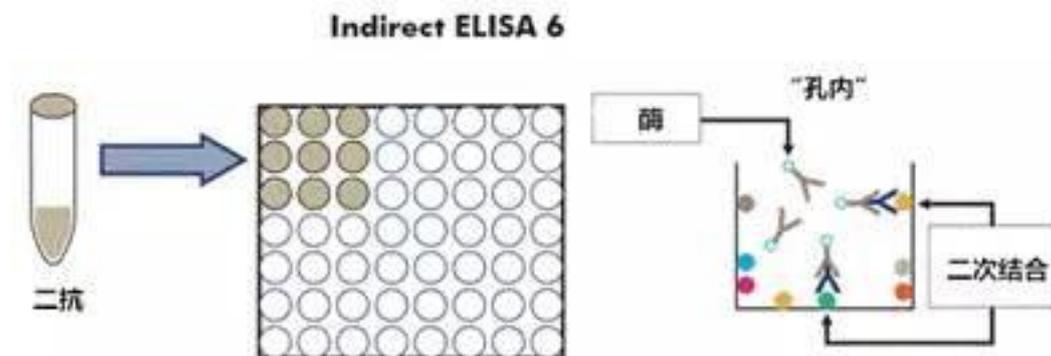
4 用封闭液覆盖没有结合蛋白的微孔表面，37°C 孵育 2h。避免一抗的非特异性结合。



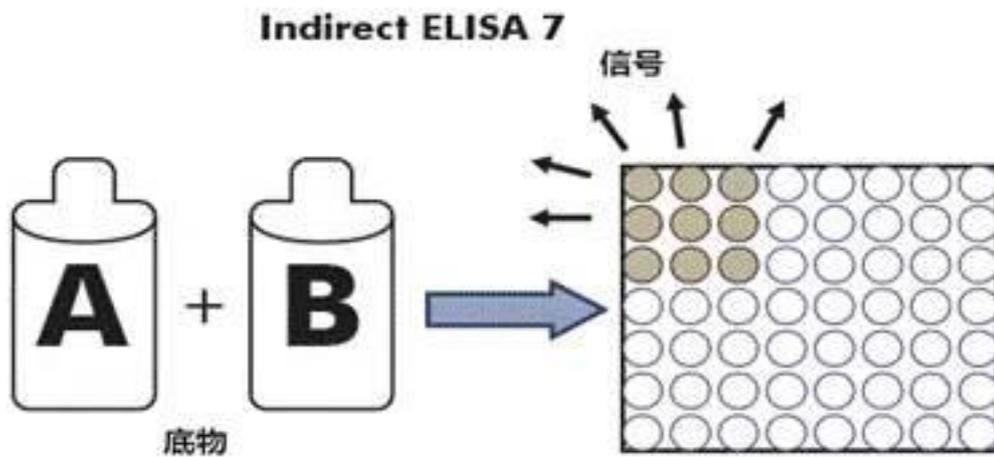
5 封闭液封闭后，用 PBST 清洗 3 次，加入稀释好的一抗（高特异性），37°C 孵育 1h。抗体可按倍数稀释，且每孔做两个或三个副孔。



6 一抗孵育后，用 PBST 清洗 3 次后，加入稀释好的连接酶的二抗，37°C 孵育 1h。



7 二抗孵育完后，用 PBST 清洗 3 次，加入底物，避光孵育 30min，用酶标仪检测 OD 值。OD 值越高，样品中目的蛋白的含量越高。



夹心法 (Sandwich ELISA)



Protocol:

- 1 准备样品：样品来源可以是细胞裂解物或是血液中的蛋白混合物，用 PBS 进行梯度稀释。

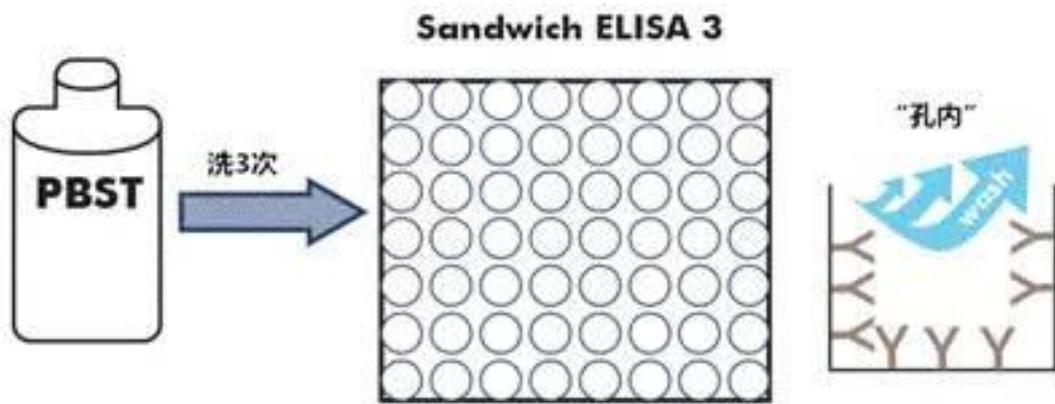
Sandwich ELISA 1



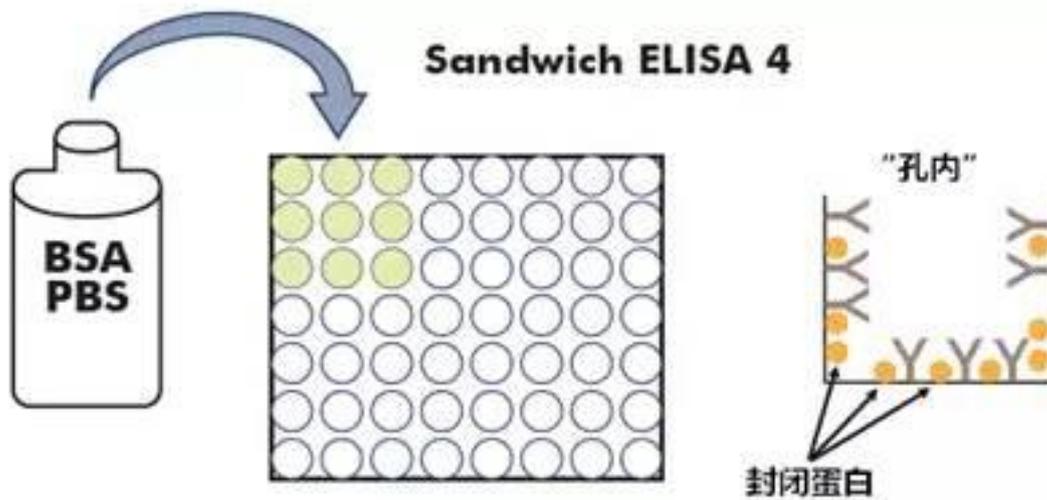
2 孵育一抗，4°C过夜，将一抗吸附在孔底表面。



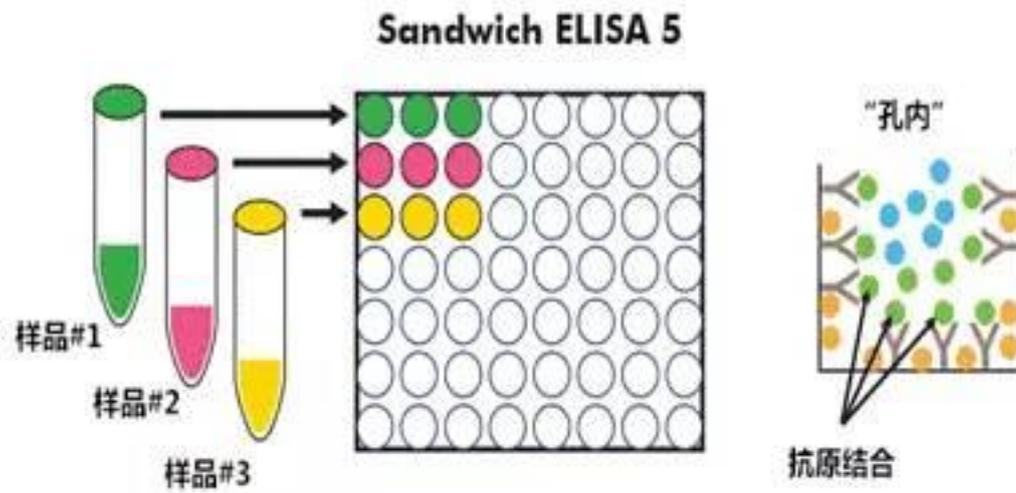
3 孵育后，用 PBST 清洗 3 次，以除去孔内没有结合或结合力弱的抗体。



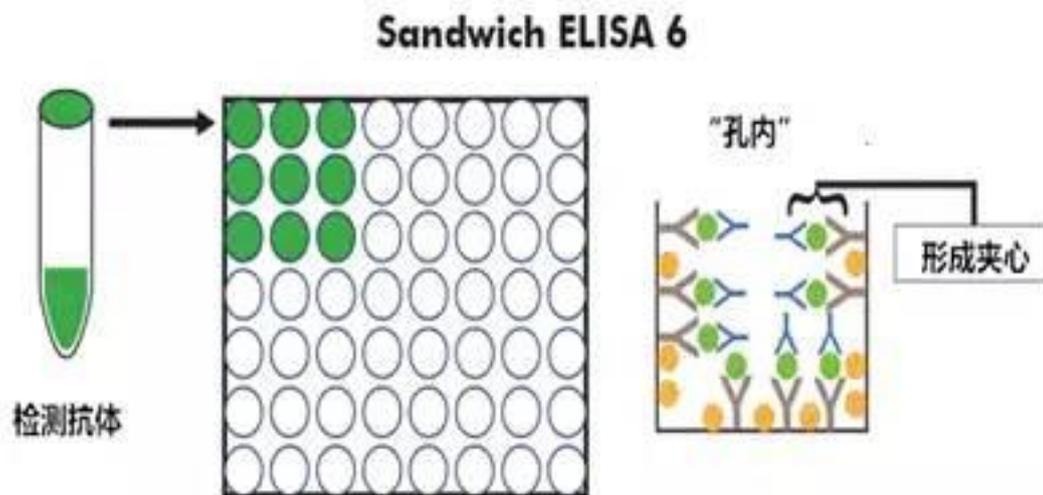
4 用封闭液覆盖没有结合抗体的微孔表面，避免抗原的非特异性结合。



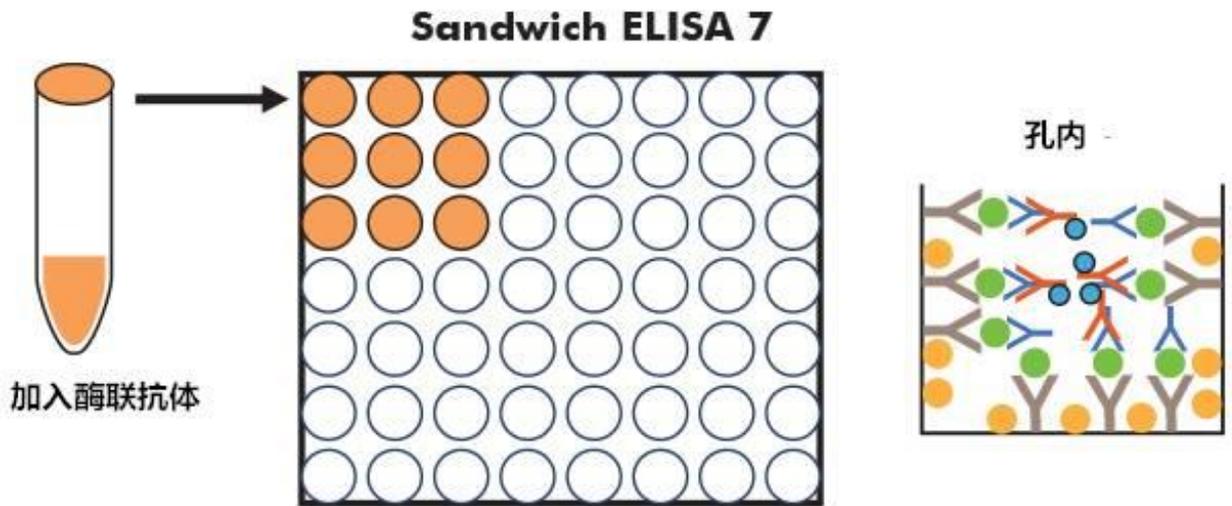
5 封闭液封闭后，用 PBST 清洗 3 次后，加入样品（抗原），37°C 孵育 1h。抗体可按倍数稀释，且每孔做两个或三个副孔。



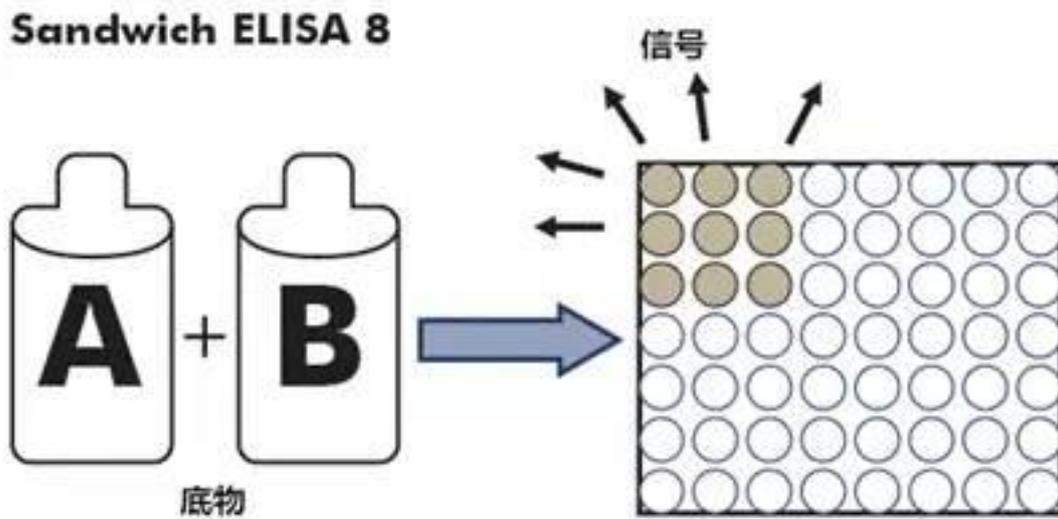
6 用 PBST 清洗 3 次后，加入检测抗体，37 孵育 1h。



7 用 PBST 清洗 3 次后，加入酶联抗体，37°C 孵育 1h。



8 用 PBST 清洗 3 次，加入底物，避光孵育 30min，用酶标仪检测 OD 值。OD 值越高，样品中目的蛋白含量越高。



竞争性 ELISA (competitive ELISA)

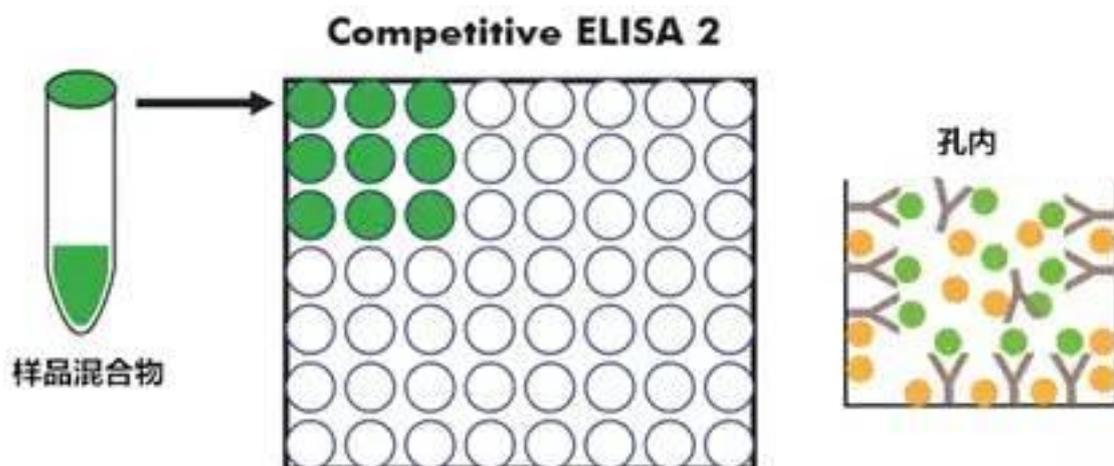


Protocol:

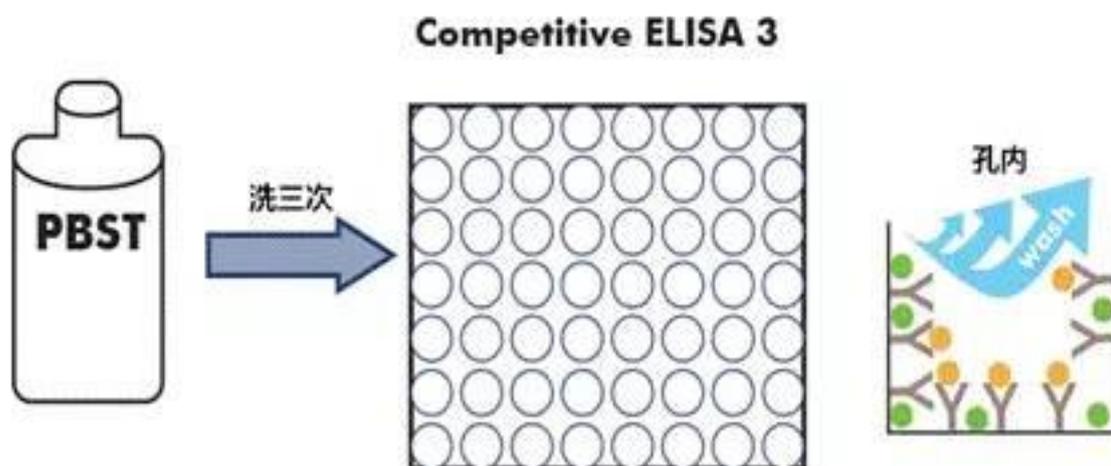
- 1 将抗体和抗原在试管里结合形成复合物。



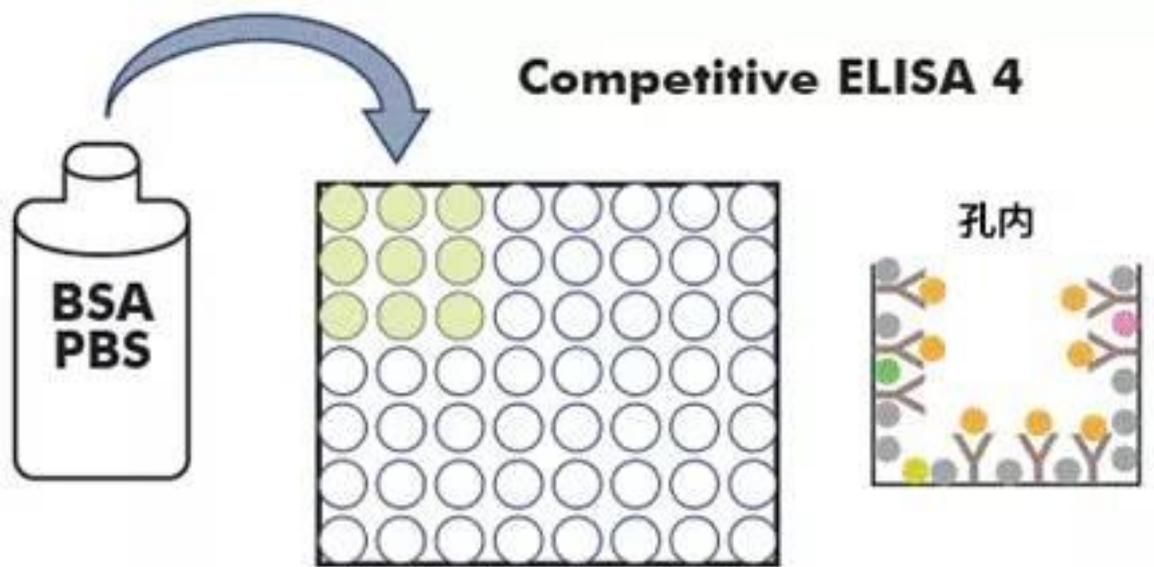
- 2 将复合物加入 96 孔板中，4℃过夜孵育，使其吸附在孔底表面。



3 用 PBST 洗 3 次，将没有吸附的蛋白或复合物洗掉。



4 用封闭液覆盖没有结合蛋白的微孔表面，37°C 孵育 1h。避免二抗的非特异性结合。

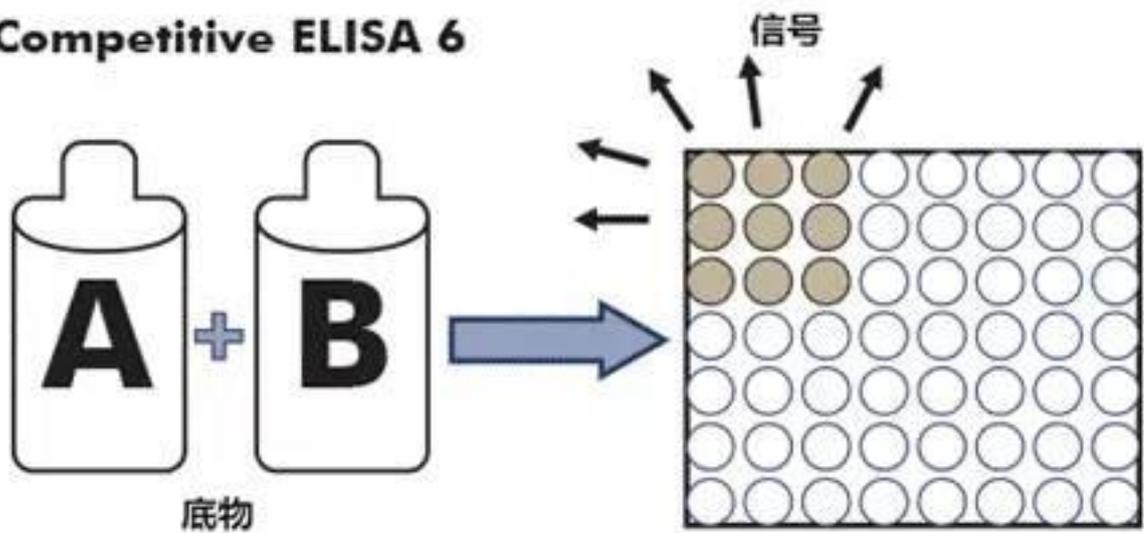


5 用 PBST 洗 3 次，加入竞争性酶联抗体（可与抗原样品竞争结合一抗），37℃ 孵育 1h。



6 用 PBST 洗 3 次，加入底物，避光孵育 30min，用酶标仪检测 OD 值。OD 值越小，说明样品中目的蛋白的含量越高。

Competitive ELISA 6



盘点 | 靠谱 protocol 哪里找？

作者：子非鱼

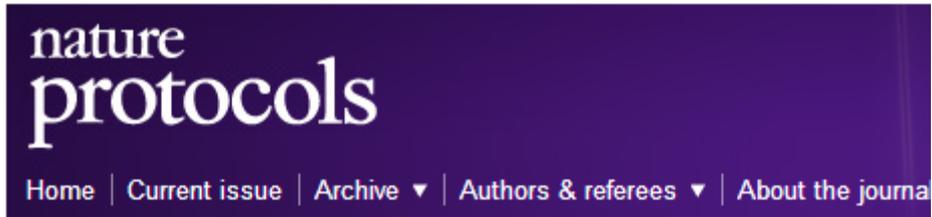
实验 protocol 问度娘？除了搜出许多商业广告以外，就是百度文库里的千年都没有更新的 protocol，实在不太靠谱啊。虽然百度结果也有来源于丁香园、生物秀、生物通等网站上的 protocol，但相关信息的质量参差不齐，遇到重要的实验时实在不敢轻易相信，小鱼建议，靠谱的 protocol 还是找大牛要吧。

提供实验方法的网站很多，比如：

1. Nature protocols

对于 Nature protocols，相信大家对她也知根知底了，查询时直接在首页搜索框输入实验技术名。

[nature.com](#) : [Publications A-Z index](#) : [Browse by subject](#)



2. Nature methods

《Nature Protocols》杂志文章则倾向于描述详细的实验步骤及注意事项，以便使读者可以快速将该实验方法应用于各自领域的研究。而《Nature Methods》杂志主要发表生命科学领域中新的研究方法或对经典方法有显著改进的相关论文。



3. Nucleic Acids Research Methods

http://www.oxfordjournals.org/our_journals/nar/new_nar_methods.html

直接登录网页，可按不同研究领域来查找具体的实验技术。

Nucleic Acids Research

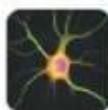
ABOUT THIS JOURNAL CONTACT THIS JOURNAL SUBSCRIPTIONS CURRENT IS

Oxford Journals > [Science & Mathematics](#) > Nucleic Acids Research > Nucleic Acids Research

NUCLEIC ACIDS RESEARCH METHODS

Each of the collections on this page is a category-specific archive of Methods published in 1999 to the present.

[Click here](#) for more information about NAR Methods, including how to cite Methods Online



Cell Biology

This category presents methods using nucleic acids to study cellular biological processes, such as intra- and inter-cellular transport, apoptosis, subcellular localization, etc. and for structural and biochemical studies of nucleic acid-c-c organelles and macromolecular, nucleoprotein particles. [View all](#)



Chromatin and Epigenetics

This category presents techniques for analyzing DNA and chromatin organization its constituents by ChIP (chromatin immunoprecipitation) and nucleosome a transcription factor mapping. Methods will also address the regulation, recombination genetic transmission of protein and DNA secondary modifications. [View all](#)



Computational Methods

Computational Methods include useful new programs, routines, metrics and with applications to Bioinformatics. This can include new sequence manipulation annotations, assemblies, but also new methods of computational analysis to facilitate data interpretation. [View all](#)



DNA-Mediated Cell Transformation and Nucleic Acids Transfer

This category describes novel methods for introducing and maintaining DNA

4. Springer 出版社的 Methods 系列

<http://link.springer.com.libaccess.lib.mcmaster.ca/>

打开 Springer 首页，在“Browse by discipline”一栏选择“Life science”，然后在“Content Type”一栏点击 protocol，出现以下页面，在搜索框输入关键词查询实验方法。



5. 冷泉港出版社的 Protocols 系列

<http://www.cshlpress.com/>

首页显示的 protocols 大分类清楚了，想查什么技术方法就直接点击，每个大类下面有更细的分类，例如点击首页“Polymerase Chain Reaction (PCR)”，可以选择具体的 PCR 技术。

Polymerase Chain Reaction (PCR), general

Amplification of DNA by PCR

Cloning By PCR

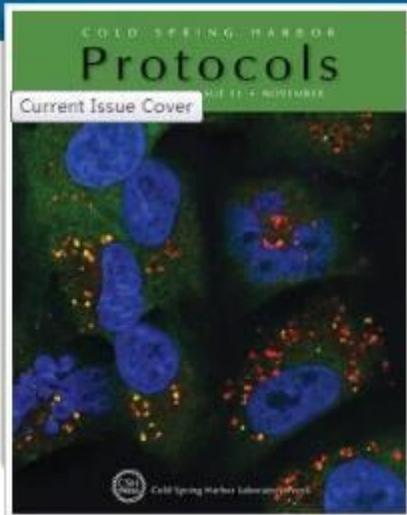
Detection of PCR Products

Differential Gene Expression

Mutagenesis by PCR

Purification for PCR

RT-PCR



Current Issue: November 2015

Archive

June 2006 - November 2015

Sign Up for Alerts and RSS Feeds

Free Featured Protocols

Explore 100s of free, essential methods here.



RNA Sequencing and Analysis



Quantification of Lysosomal Membrane Permeabilization by Cytosolic Cathepsin and β -N-Acetyl-Glucosaminidase Activity Measurements

Request a Free Trial

Cold Spring Harbor Protocols is now offering free full-access trial subscriptions.



Other Cold Spring Harbor Publications

Cold Spring Harbor Molecular Case Studies • Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine • Cold Spring Harbor Perspectives in Biology • Genes & Development • Cold Spring Harbor Symposia • Genome Research • Learning & Memory • RNA • Books and Other Media • BioRxiv

Browse Subject Categories

- | | |
|----------------------------|--|
| Antibodies | Laboratory Organisms |
| Bioinformatics/Genomics | Molecular Biology |
| Cell Biology | Neuroscience |
| Chromatography | Plant Biology |
| Computational Biology | Polymerase Chain Reaction (PCR) |
| Developmental Biology | Proteins and Proteomics |
| DNA Delivery/Gene Transfer | RNA Interference (RNAi)/siRNA |
| Electrophoresis | Stem Cells |
| Genetics | Transgenic Technology |
| High-Throughput Analysis | |
| Imaging/Microscopy | |
| Immunology | |

Protocols by Subject /

Polymerase Chain Reaction (PCR)

- Polymerase Chain Reaction (PCR), general
- Amplification of DNA by PCR
- Cloning By PCR
- Cloning of PCR Products
- Detection of PCR Products
- Differential Gene Expression
- Mutagenesis by PCR
- Purification for PCR
- RT-PCR

6. google scholar 检索

pubmed 的文献更新速度比 google scholar 快。但是 google scholar 在检索 protocol 上更显优势：一是 google scholar 检索结果里有引用次数，一般来说，引用次数高的文献，其技术方法的可重复性高；二是 scholar 可以检索到专利和书籍里面的技术方法，特别是书籍里面的，有很大的参考价值。



干货 | 一个过来人倾力推荐的 14 个实验心得

作者：子非鱼

正所谓细节决定成败。很多时候，大多数实验的失败就在于对细节的忽略。小鱼以自己多年的实验经历，总结了 14 个心得，在小鱼的实验生涯里获益颇多，今天就贡献给大家，不用谢，小鱼嘛，不仅授人以渔，也要会授人以鱼，文末有福利赠送哦。

01 Protocol 里有文章

实验前，一定先认真读 Protocol。Protocol 是前人针对该实验的经验总结的规范化流程，通过 Protocol 可以了解该实验的基本原理和大致流程，重点关注 Protocol 的关键步骤（可以用笔将其标示出来），做到心中有数。最好能做一份详尽的实验流程，贴在实验台前，特别注意的地方特别标注，可以随时参照。

其次检查该实验所需要的试剂是否齐全、所使用的仪器在实验室里是否具备及该仪器是否能够正常工作。如果试剂有缺乏，应及时订购或者依据实验原理寻找可替换的试剂，如此才可避免实验被迫中途停止的窘境。

总之，万事不打无准备之仗，在实验中只有做好万全的准备，才有可能获得成功女神的青睐。

02 设置尽量多和全的对照组（control）

没有对照组的实验，就得不到有效的实验结果。一个好的对照组（Control）既可以提高实验摸索的效率，且能够有助于找到实验失败的原因。其中最基本的 Control 包括阳性对照（Positive control）和阴性对照（Negative control）。前者既可以排除实验员个体的差异，也可以排除实验环境的差异；后者则可以评估假阳性的可能性与影响大小。

因此，无论 Control 结果如何，它都使得我们每一次实验都在知识结构上是“进步”的，可以提高下次实验的成功率和效率。

03 重质轻价格，试剂需分装

对于实验试剂而言，质量永远是第一位的，之后才是价格问题。有些试剂也许便宜，但因缺少质量控制（QC）环节，会导致不同批次产品之间性能的不稳定性，进而导致实验结果的不稳定性（这对于辛苦做实验需要发文章的研究人员来说是种灾难性的打击）。因此购买试剂时，最好去正规品牌的生物科技公司去订购（如生工、优宁维）。

谚语说：不要把所有的鸡蛋都放在同一篮子里。同样，在做实验时，也不要把所有试剂都放到同一个容器里。比如酶试剂、溶解肽等，均是价贵量少热不稳定的试剂，那为了避免出现反复冻融变质、污染、和与别人混用等问题，可将试剂分装成若干份。同时在最初分装时一定要将试剂全部溶解且充分混匀，可避免解冻时每管的浓度不均一。

04 实验流程中设置关键的检查点

实验检查点可以减少实验误差，在实验检查点没有通过之前不要进行后续的实验，除非你对通过该检查点非常有信心，否则不要着急。要知道心急吃不了热豆腐，不顾结果的赶进度经常会使实验变得更慢。

05 做好实验标记，按顺序加样

做大批量实验时，事先在实验记录本上写好样品全称和对应编号。因为如果加样时是按照字母或数字顺序加样的话，就可以很清楚加样是加到哪一管了。加大批量的样品时，先把要加的试剂写在纸上，按照从上至下，从左至右的顺序加样。对于同一试剂，加一个试管时就该试管往左、右或上、下移动一格。电泳时，不同泳道顺序为 Marker、Control、实验组。多个 Marker 或 Control 时，再按照字母或数字顺序排列。收集样品时，可先按照时间顺序，后字母、数字顺序排列样品。

而编号中除了 1、2、3...（可以的话，尽量避免同时使用 1 和 7，或者在 7 的中间加一横），A、B、C...，a、b、c... 还有①②③...，一、二、三...， α 、 β 、 γ ...等，大家可形成自己独特的标记规则，以避免和他人的样品弄混。同样的标记日期时，yy/mm/dd 或 mm/dd/yy 或 dd/mm/yy，任选其一后请固定你习惯的标记方法。

06 大批量加样时，按枪头的排列顺序使用枪头

人的注意力集中时间总是因人而异。当在处理大批量加样品的实验中你不小心走神时，不要慌张，你可通过枪头盒上的枪头排布即枪头的使用量来判断样品加到第几个了，不至于少加、多加、或者错加，节省时间。

07 实验试剂用前需要混匀

实验对很多试剂的用量都有明确要求，要确保实验的成功和可重复性，必须保证试剂用量一致。试剂用量=体积×浓度，如果试剂浓度不混匀的话，浓度就会不同，即使加样的体积一样，实际的量也可能不一样。所以，一定要保证试剂是充分混匀的，结冰的试剂必须完全溶解才可以使用。容易沉淀的试剂，使用之前必须在漩涡振荡器（vortex）混匀后才能使用。

08 并行两三个实验，充分利用实验间隙

此技巧的应用前提，是你对并行的实验十分得心应手，要了解到每个实验中的哪一步是对时间比较敏感的，哪一步需要等时间的。比如在等转化的时候顺手配个培养基，跑胶过程中去画个平板等等，整体来看还是很节约时间的。这时可以使用多个计时器，为了避免搞错 timer，可在每一个 timer 上贴上标签。

09 移液枪的注意事项

Tip 头吸完后马上从移液器上取下来，以免忙乱的时候又以同一 tip 头吸取另一种试剂。使用移液枪时，务必注意要轻轻吸液，防止液体被吸到枪里面，造成移液枪的腐蚀和后续实验的污染。当 tip 头里还有液体时，移液枪不要倒过来。移液枪使用完之后，要归到最大计量的位置，防止久而久之弹簧失去弹性。

10 实验中注意力要集中，也要注意协同合作

实验中要集中精神、不要与人海聊，以免加错样或造成实验污染。因此做实验时不要想其他事情，想其他事情的时候不要做实验。有时实验中所需要使用的仪器，可能也其他人实验者着急要用，这时需要学会谦让，因为你在让别人的同时，也在给自己争机会。做完实验后，清理实验台，将药品、仪器归位，方便自己也方便大家。

11 实验数据一定要及时记录、分析处理

俗话说的好，好记性不如烂笔头。人的记忆力有限，实验结束后，一定要及时做好实验记录。因为实验记录不仅是对实验步骤、试剂、数据的真实客观的记录，也是一份能保证你的知识产权不被侵犯的法律文档，同时也是你留给实验室的“科研财富”，也许你学术影响力就从这份实验记录上开始扩展的。因此，实验数据应及时的进行分析整理，如果做不到当天整理，最起码每周整理。

12 实验记录一定要详细整洁

实验中往往一个很小的细节就是决定实验成功与否的关键所在。如果没有对细节进行详细的

记录,实验一旦出了问题就很难找到原因。如实验中容易失效的试剂,一定要表明试剂名称、配置时间、试剂有效期、配置者及其他必要信息。实验记录要保持整洁,如果过于潦草,那么在需要寻找相关信息的时候就难以找到。

13 一定要将实验数据进行及时备份

《At the bench》的作者曾说,如果实验室发生了起火等危急情况,首先应该抢救的不是试剂,而是实验记录。因为有了实验记录才可以完成论文。因此,为了防止发生实验记录丢失的情况,将整理好的实验记录扫描为 PDF 文档以备份。对于重要的研究数据,最好整理成电子文档例如 Excel 或 Word 文档,且最好养成对自己的电脑文件定期备份的习惯。此外,质粒、转化的细菌、珍贵的细胞株等也需要备份。最好备两份以降低丢失的概率。

14 实验首先要靠自己,但也要注意沟通

千万不要埋头苦干、闭门造车。多利用 PPT 的形式来向导师和同事展示你的科研成果,因为也许在他们的点拨下,你在实验中所遇到一些问题很容易就可以迎刃而解。

从清华实验室起火,谈医学实验室常见危险品处置与自我防护

作者: 大肚腩

不久之前,清华大学何添楼 231 室实验室突然起火。现场图片及视频显示,事发当时,火苗和黑烟不断从何添楼二层窗户冒出,伴随“噼里啪啦”的响声。一名博士后当场身亡,据悉当时正在做有机催化,使用氢气做化学实验。



事发现场图

我们在为清华默哀的时候不禁感叹：化学实验室真可怕！那医学实验室就安全了么？其实在医学实验室，也存在大量安全隐患，回忆起硕士的实验生涯，还是有些后怕，在此将常见的危险品、毒物及危险操作指出，望师弟师妹警醒。

头号危险品：液氮、液氮罐



涉及操作：细胞复苏、组织冻存、换液氮等

每次轮到我去灌液氮罐简直都快哭了好吗？毕竟是零下 160 度的液氮啊，曾经取组织的时候小手被冻伤了有木有，一块青紫啊，吓得我以为手要废了啊。去年听说某附院师姐换液氮时遭遇液氮罐爆炸，击穿了一只眼球，至今失明，真是心有戚戚焉。好了，接下来说重点。

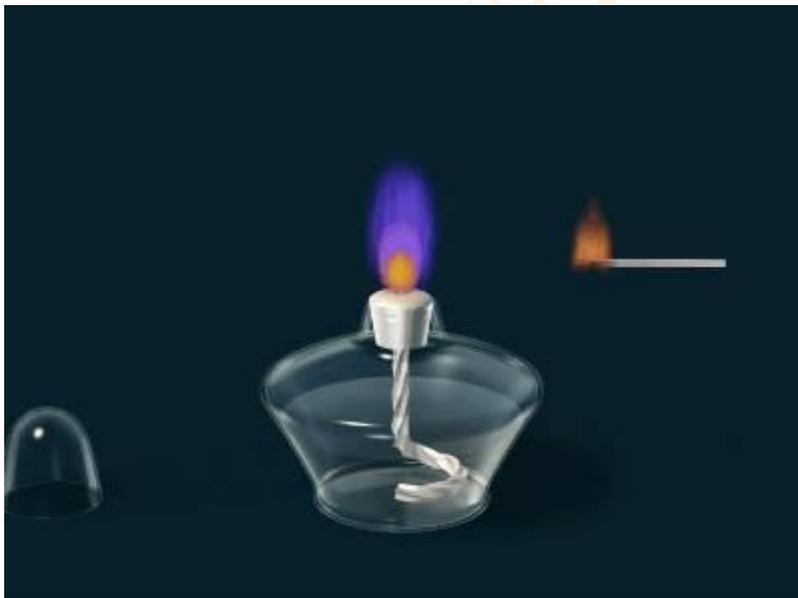
注意事项：

取组织时一定要戴手套最好多戴一层，避免长时间操作

细胞复苏时冻存管孵育的时候有时会蹦出来，咋办呢？捂住脑袋躲远点，上帝保佑你。

取液氮、换液氮的时候最好不要单人操作，不要穿拖鞋，露脚丫子，露大白腿、露手臂、露胸等，尽量全副武装，把自己包的严严实实，无可伤害。

二号危险品：酒精灯



没错，就是初中起就开始点的酒精灯哦，据说大部分人在细胞间都练成了火云掌、红焖猪蹄哦。

涉及操作：细胞相关

注意事项：因为做细胞实验间隙会往手套上喷酒精，记得近超净台时候把手晾凉，点火时离手套远点，否则分分钟先点燃的是双手了。

也许有人问：手已经点燃了咋办，没事，那是手套，手没那么快熟啦，赶紧脱手套吧。

三号危险品：有毒试剂 DMSO



涉及操作：细胞冻存

DMSO（二甲基亚砜），对皮肤有极强的渗透性，有助于药物向人体渗透。吸入：高挥发浓度可能导致头痛，晕眩和镇静。皮肤：能够灼伤皮肤并使皮肤有刺痛感，如同所见的皮疹及水泡一样。用的时候要避免其挥发，要准备 1%-5%的氨水备用，皮肤沾上之后要用大量的水洗以及稀氨水洗涤。最为常见的为恶心、呕吐、皮疹及在皮肤、和呼出的气体中发出大蒜、洋葱、牡蛎味。

注意事项：口罩、手套，细心操作，避免液体溅出来。

四号危险品：Trizol、氯仿



涉及操作：RNA 提取

没错，臭的要命的就是 Trizol，有点常识的都知道有毒害好吗？怎么办，只能戴口罩了，按量小心取用了。

友情提示：建议备孕人士让师弟、师兄代劳实验。

最后，注意实验室用电安全

曾经有师姐忘记关烤箱的电源最后烤坏了烤箱，而我自己曾经在不关电源的情况下修理过实验室显微镜，后来被公司专业人员大骂一通不怕死。请注意实验室用电安全一定记牢，避免烤箱等大功率电器持续做功。

除上述常见危险品及毒物外，Western 配胶用的很多东西都有毒性，而很多同学一直不注意防护，诸如不戴口罩手套操作、穿拖鞋操作，对着实验用药吃饭等等，想说的是，大家是祖国的未来，请注意自我保护，至少先活到当教授那天吧，避免清华博士后悲剧发生，出师未捷身先死。

在师姐们的血泪史中成长：给实验室新手的经验分享

作者：四月 23 日

最近，研一的师弟师妹们陆陆续续的进入了实验室，熟了后有时会跑来问：“师姐，老板说让看文献，去哪找啊，看什么文献呀？”“师姐，文献好难啊，看不懂...”，像前一阵有些同学最近要开题了，科研业务不熟练，不知道该怎么写。好啦好啦，懒得一个个讲，在这里和大家分享一点小经验。

1 关于怎么查找文献

首先呢，是查找文献。在以前，谷歌还可以使用的时候，我习惯于用谷歌学术直接搜索。但是现在物是人非，可能有些小伙伴使用谷歌并不方便，那也可以使用 NCBI。但是强大的 NCBI 可不是只能用来查查文献哒，还可以查基因、查序列、查样本等等。不过，也许是我的网络不好或者其他什么原因，有时 NCBI 跳转的很慢，甚至会出现打不开的现象。每个学校的图书馆都有购买很多数据库，方便大家下载文献，但是每个学校都没有办法将所有的数据库都买下(真的太贵了)，哪怕是哈佛牛津这种顶级牛校也是办不到的呀。现在有很多途径帮助大家求助文献，比方说小木虫和丁香园的论坛呀，另外还有些好心人建立的 QQ 群，集合了很多高校资源，可以互助文献。



图 1 谷歌学术的搜索界面



图 2 NCBI 的搜索界面

一般情况下，刚进实验室，老板会给大家个题目或范围，让童鞋们先去找点文献看，或者给师兄师姐打下手。刚开始的时候确实会有些手足无措，想当年，我和同学还会吐槽老板，就这样把我们打发了，然后看着老板给的题目发呆，实在是让人感到无从下手。

对于同一个老板或者是同一个实验室，一般情况下大家的课题都是一脉相承的，可以先了解了解师兄师姐做的内容，一般情况下和自己的题目是相近的。**刚来实验室一定要积极，多给师兄师姐打下手帮帮忙，早点学会操作技术**，要知道，在实验中有很多心得体会只有在实践中才能悟出来，若是前辈口头相传也许会减少以后犯错误的机率。所以你看到我的帖子得是多么的幸福，嗯，不谢！

多看看老板、师兄师姐已发表的文章和毕业论文，先补一下基础知识，用相关关键词检索相关文献，比方说我搜索 lung adenocarcinoma，搜索关键词后可以看到有很多文献陈列出来，如果你想看这个研究方向的最新进展，可以在网页左边的“一般筛选区”对发表日期再次筛选；当然，这个结果显然是粗放了一些，比方说你想看看别人研究某个基因的情况，可以到右边的“高级筛选区”填写。



图 3 搜索关键词

再比方说我们搜“KRAS”并打开一篇文章，可以看到除了基本信息(题目、作者、摘要等)，还可以现在看基因的相关信息，点击 KRAS 后，或查基因功能通路，或查相关的 miRNA、SNP、蛋白，等等，大家就可以看自己想看的了。

Lung Cancer. 2013 Jul;1-10. pii:S0169-5002(13)00124-4. doi:10.1016/j.lungcan.2013.03.019.

Prognostic value of K-RAS mutations in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis.

Meng D¹, Yuan M¹, Li X¹, Chen L¹, Yang J¹, Zhao X¹, Ma W¹, Xin J¹ [More]

Related genes: 1 **KRAS**
 PMID: 23608713 Impact Factor: 3.392 No free full-text

Abstract

K-RAS gene mutations have been found in 20-30% of non-small cell lung cancer and occur most commonly in adenocarcinoma, however, there was no definitive conclusion about the prognostic role of K-RAS mutations in NSCLC. Herein we performed a systematic review of the literatures with meta-analysis to assess K-RAS mutations' prognostic value in NSCLC. After a methodological assessment, survival data from published studies were aggregated. Combined hazard ratios (HRs) and corresponding 95% confidence intervals (CIs) were calculated in terms of overall survival. 41 trials (6939 patients) were included in the analysis, the overall HR was 1.45 (95% CI: 1.29-1.62), showing that K-RAS mutations have an unfavorable impact on survival of patients with NSCLC. Then a subgroup analysis was performed about ethnicity, the combined HR was 1.97 (95% CI: 1.58-2.44) for Asians, and 1.37 (95% CI: 1.25-1.5) for non-Asians. In subgroup analysis of histology, the HR was 1.39 (95% CI: 1.24-1.55) for adenocarcinoma, suggesting that K-RAS mutations were correlated with shortened survival for adenocarcinoma. When the subgroup analysis was conducted according to disease stage, K-RAS mutations were poor prognostic factors in early stages: stage I (1.81; 95% CI: 1.36-2.39) and stage I-IIIa (1.68; 95% CI: 1.11-2.55), but not in advanced stage (IIIb-IV) (1.3; 95% CI: 0.99-1.71). At last, in subgroup analysis about test methods, all of the four methods: PCR-MSOP (1.73; 95% CI: 1.35-2.2), PCR-DGGE (1.27; 95% CI: 1.01-1.62), PCR-RFLP (1.88; 95% CI: 1.42-2.49) and PCR-seq (1.34; 95% CI: 1.14-1.58) showed statistically significant impact on survival of NSCLC patients. In conclusion, this meta-analysis suggests that K-RAS mutations are associated with a worse overall survival in patients with NSCLC, especially in patients with adenocarcinoma and early stage.

Related Genes

Found 1 related genes:

Name Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
KRAS ID:3845	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	chr12:25205246-25250923[-]	C-K-RAS; CFC2; K-RAS2A; K-RAS2B; K-RAS4A; K-RAS4B; KI-RAS; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RASK2	190070

图 4 文献搜索结果(怎么样, 有木有感觉画风很美, 是的没错, 我学过。。)

Found 1 entries:

History

[gene]

KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog [Homo sapiens (human)]

Gene ID: 3845, updated on 2014 Feb 19

Gene type: protein-coding

Organism: [Homo sapiens (human)]

Alias: C-K-RAS; CFC2; K-RAS2A; K-RAS2B; K-RAS4A; K-RAS4B; KI-RAS; KRAS1; KRAS2; NS; NS3; RASK2

See related: [MIM:190070](#); [Ensembl:ENSG00000133703](#); [HPRD:01817](#); [Vega:OTTHUMG00000171193](#)

Summary: This gene, a Kirsten ras oncogene homolog from the mammalian ras gene family, encodes a protein that is a member of the small GTPase superfamily. A single amino acid substitution is responsible for an activating mutation. The transforming protein that results is implicated in v. [More]

Related entries in the dictionary

Gene Protein OMIM

Result:198953

mRNA 161647
 SNP 31272
 gene 6027
 miRNA 7

1. rs150310255 [Homo sapiens (human)]

Gene:DDX3X

Location:X:41335938

RefSNP Alleles:-(FWD)

2. rs58779421 [Homo sapiens (human)]

Gene:PCDH1X

Location:NotOn:0

RefSNP Alleles:-(FWD)

3. rs35431610 [Homo sapiens (human)]

Gene:PCDH1X

Location:X:92366425

RefSNP Alleles:-(FWD)

4. rs35459995 [Homo sapiens (human)]

Gene:PCDH1X

Location:X:92366417

RefSNP Alleles:-(FWD)

5. rs35350018 [Homo sapiens (human)]

[Samples] 可以点

Pathway Ontology Transcripts microRNA SNP Pubmed GeneView

Available Tracks
 filter by text
 ncbi_hg38_gene
 ncbi_hg38_protein
 ncbi_hg38_rna

Reference sequence 1
 Reference sequence

JBrowse File View Help
 0 20,000,000 40,000,000 60,000,000 80,000,000 100,000,000 120,000,000
 chr12 chr12:25205272..25250949 (45.88 kb) Go
 25,225,000 25,250,000
 ncbi_hg38_gene KRAS
 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

图 5 基因搜索结果

看文献其实不必追求看完全文，大部分文章看摘要，真正有用的再看全文。看完之后，最好将文献中重要的结论做笔记记录下来(或是在文档上直接标记，或是打印出来标注)，这样方便写论文需要引用文献，也避免看过就忘的悲剧。除了记录结论，积累文章中的好句子也是非常有用的，选择那些作者母语是英语的文章，替换句子中的词就可以使用，让自己的论文显得 native。

2 关于怎么做实验

记得当年老师曾问我：“做实验最重要的事情是什么？”**细节，请注意实验中每一个细节。**曾做一个长达一年的连续实验，观察实验中发生的任何变化是我每天最重要的任务，当时就像记日记一样，哪怕是很琐碎的事情也都记在本子上，比方说天气的变化(影响控温)。而这些都成为日后处理数据、发现问题最重要的证据。其实也不一定要用本子记，也可以用印象笔记或有道云笔记，手机和电脑云端共享也是极好哒。除此之外呢，请务必记得将实验记录在电脑上、u 盘、移动硬盘和网盘多做备份，这个真的很重要，非常重要!! 我用我血和泪的教训告诉大家，千万别用“剪切”!!

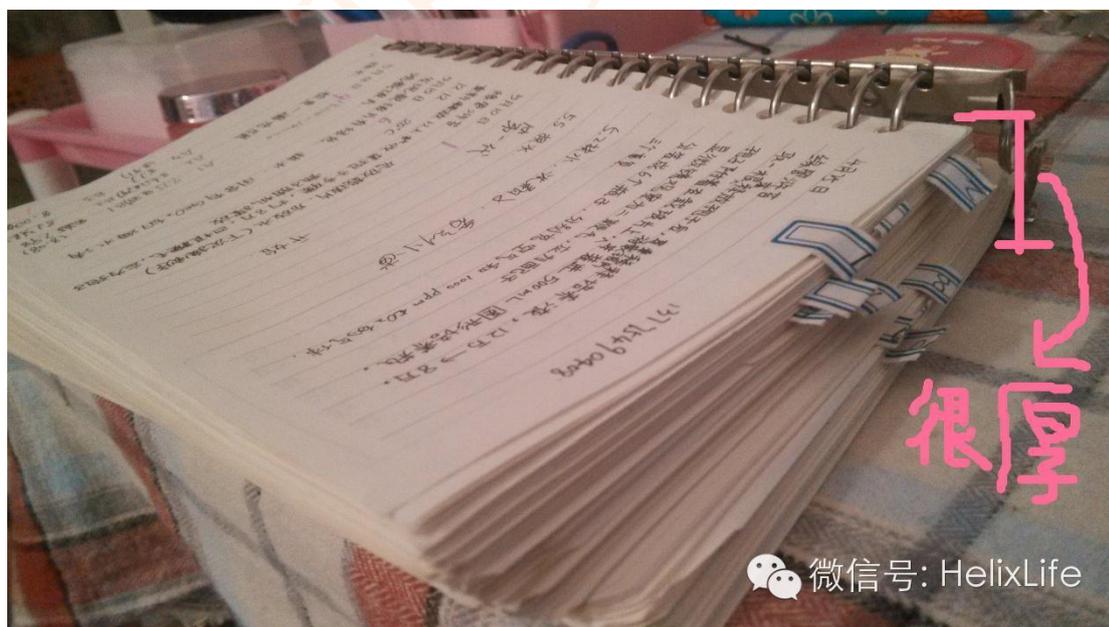


图 6 这只是我一个实验的记录本

墨菲说得好啊，如果你担心某种情况发生，那么它就更有可能发生。这里有一个我老师的故事：他老人家当年可是一位富有情怀的文艺小青年，特别喜欢用钢笔练字呀、做笔记呀什么的。那天，他偷懒心想明天再把结果备份到电脑上，恩，没错，故事的结果就是第二天他发现实验记录本不知为何泡水了，那记录本打开后跟泼墨画似的，有着一一种特别的朦胧美。。。

这个故事告诉我们以后最好不要用钢笔？额，**就是说我们做实验一定不能存侥幸心理**，一定要记住，不然真的很容易倒霉！！这里还有个悲催的故事：有一次我的样品放在冰箱里保存，当时整个实验室只有我一个人在做实验，于是我就没有在标签上写我的名字。有一天，师弟整理冰箱就问这份没有名字的样品是谁的，因为我没在所以没有人回应，结果他就倒了。。。最后知道真相的我眼泪掉下来，这直接导致我整个实验最后一个步骤的数据缺失！！啊，多么痛的领悟！！

实验中对随机和程序化的把控也是非常重要。你所做的每一个处理(取样、培养条件、检测)都要充分的考虑是否随机，否则主观想法很容易使实验结果产生偏差。实验操作的程序化是把操作步骤尽量程序化固定化，减少操作中思考的次数，这样可以减少错误发生的次数。

3 关于怎么写开题报告

开题报告主要是为了以后的工作制定计划，是由选题者把自己所选的课题的概况(即"开题报告内容")，向有关专家、学者、科技人员进行陈述。然后由他们对科研课题进行评议。其内容包括综述、关键技术、可行性分析和时间安排等四个方面，比方说题目、立论依据(毕业论文选题的目的与意义、国内外研究现状)、研究方案(研究目标、研究内容、研究方法、研究过程、拟解决的关键问题及创新点)、条件分析(仪器设备、协作单位及分工、人员配置)等。其实说白了，**开题报告就是讲下一步我们要解决什么，为什么要解决以及如何解决的问题。**

综述可以帮助我们梳理思路，看前人如何研究，已经拥有了哪些研究成果，这里需要大量文献的支持，并在其中去提炼总结自己研究的亮点。课题中的创新性和可行性会是开题报告尤其是真正汇报时老师关注的重点。

写开题报告的时候需要插入文献，尤其是到毕业论文的时候，可能需要插入上百篇文献，

文献的排序、格式、插入等都是问题。我一般是用 **Endnote**，每篇文献都是提前先编辑好(注意：这个很重要，一劳永逸呀)，插入的时候调下格式就好。**Endnote** 是一个管理文献的好工具，可以将文章命名分类管理，看过的文献归入子文件夹，最起码要把有用的和没用的分开。下载电子版文献时(caj, pdf, html)，把文章题目粘贴为文件名。注意，文件名不能有特殊符号，要把 \ / : * ? < > | 以及换行符删掉。每次按照同样的习惯设置文件名，可以防止重复下载。还有个软件是 **NoteExpress**，关于这些软件的使用小木虫里有很多大神分享经验，我就不多说了。

除了阅读大量文献，我们还可以通过借鉴别人的样本(从 **GEO** 下载)来运行一下实验方案，看看可以什么样的结果(组间的差异、趋势等等)，毕竟无论测序还是芯片都得几万块，尤其是对于马上要开始实验的童鞋们，时间和金钱同样宝贵。



最后插一句，写文章呢最好是使用 **Microsoft office word**，排版打印的时候兼容性、稳定性更好，建议打印前将 **word** 文档转为 **PDF** 再打印，避免打印时出现发生格式变动等坑爹的情况。

行了，刚才我提到各个软件公司(包括微软 **office**、美图秀秀以及腾讯 **QQ** 截图)待会来后台结算一下啊。