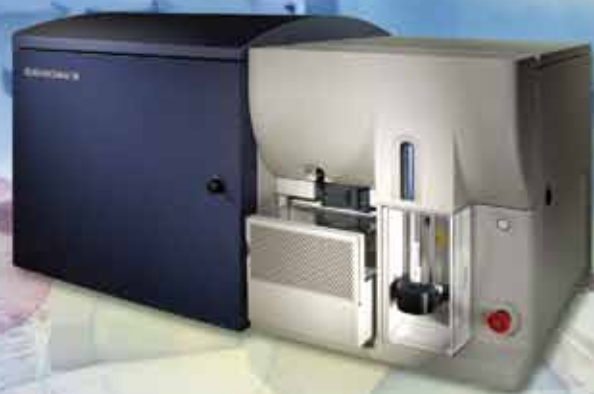


流式细胞仪在分子生物学中的应用

- 功能基因报告系统与流式技术
- microRNA 的研究与流式技术
- 流式 - 荧光原位杂交 (Flow-FISH)
- BEAMing 技术 (数字 PCR- 流式技术)
- 指数富集的配体系统进化技术 (SELEX) 与流式



帮助人类健康生活
Helping all people live healthy lives



目录

序言	1
第一章 核酸篇	1
第一节 功能基因报告系统与流式技术	1
第二节 microRNA 的研究与流式技术	8
第三节 流式 - 荧光原位杂交 (Flow-FISH)	10
第四节 BEAMing 技术 (数字 PCR- 流式技术)	13
第五节 指数富集的配体系统进化技术 (SELEX) 与流式	16
第二章 蛋白篇	18
第一节 表面展示技术与流式	18
第二节 荧光共振能量转移 (FRET)	21
第三节 双分子荧光互补技术 (BiFC)	24
第三章 流式在分子生物学研究的文献摘选	26

序 言

分子生物学主要致力于对细胞中不同系统之间相互作用的研究，包括 DNA、RNA 和蛋白质生物合成之间的关系以及了解它们之间的相互作用是如何被调控的。而流式细胞仪是测量液相中悬浮细胞或微粒的一种现代分析技术。其特点是：一、可高效对单个颗粒进行数据分析，呈现出个体的活动分布；二、流式细胞仪的分析是多参数，有能力对同一个微粒进行多方面的考量；三、流式细胞仪分析活体细胞，反映了分子在细胞中天然存在时的生物学表现；四、流式细胞仪可以对感兴趣的单个微粒进行分选，从而获得单细胞组分中的完整分子信息。

目前流式细胞仪主要是致力于细胞生物学方向的研究，但过去十年中分子生物学领域的新研究方法出现，使流式细胞仪在该领域的应用显著增加，流式细胞仪已经成为分子生物学研究中重要的研究工具。下面的文章将从核酸、蛋白及现在热点的单细胞基因组学篇章中分别阐述流式细胞仪的重要应用。

第一章 核酸篇

第一节 功能基因报告系统与流式技术

1.1 报告基因 (Reporter Gene)

报告基因是一个其表达产物非常容易被鉴定的基因。把它的编码序列和基因表达调节序列相融合形成嵌合基因，或与其它目的基因相融合，在调控序列控制下进行表达，从而利用它的表达产物来标定目的基因的表达调控，筛选得到转化体。

报告基因应用有：目前已广泛应用于启动子分析、监控转基因及其表达、细胞的信号转导与药物的筛选等多事件。报告基因种类：氯霉素乙酰基转移酶基因 (CAT)、萤光素酶基因 (Luciferase)、人生长激素基因 (hGH)、分泌型碱性磷酸酶基因 (SEAP)，其中 β - 半乳糖苷酶基因 (β -galactosidase / *lacZ*)、绿色荧光蛋白基因 (GFP) 和 β - 内酰胺酶基因 (β -lactamase) 等。

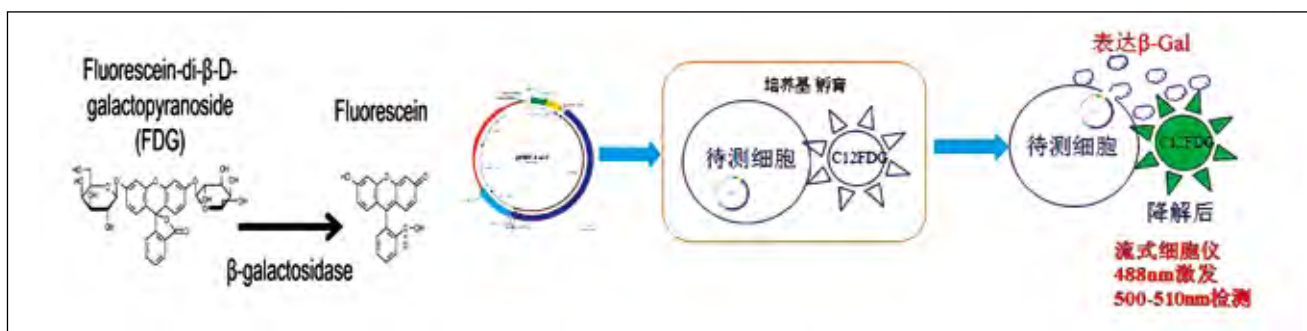
流式技术与报告基因

随着技术和检测方法的进步，荧光分析以其能够将细胞内报告基因的活性可视化和对细胞的非破坏性而越来越成为主流方法，其中流式细胞仪就可以对 β - 半乳糖苷酶基因 (β -Gal)、 β - 内酰胺酶 (β -lactamase) 和荧光蛋白基因 (如 CFP、GFP、YFP、RFP 等) 进行分析检测，并对相应的细胞进行分选。

1.1.1 β -半乳糖苷酶和 β -内酰胺酶活性流式分析

1.1.1.1 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase / *lacZ*) 活性流式分析

流式检测原理图



编码 β -galactosidase / *LacZ* 基因整合到目的细胞在加入 2-脱氧葡萄糖的氟代衍生物 -12(C12FDG) 的培养基中孵育，如果细胞表达 β -galactosidase，它可以使 C12FDG 降解发出绿色的荧光，因为 C12FDG 可以连接到细胞膜上，细胞就发出绿色的荧光，在流式细胞仪上可通过 488 激发和 500-510nm 的检测通道检测。

Flow cytometry 405nm excitation

CCF2 green fluorescence 520/10nm detection

CCF2 red fluorescence-460/50nm detection

CELL

CYTOPLASM

Cytoplasmic esterases

409 nm

FRET

515 nm

409 nm

447 nm

β -Lactamase

CCF2/AM

CCF2

2

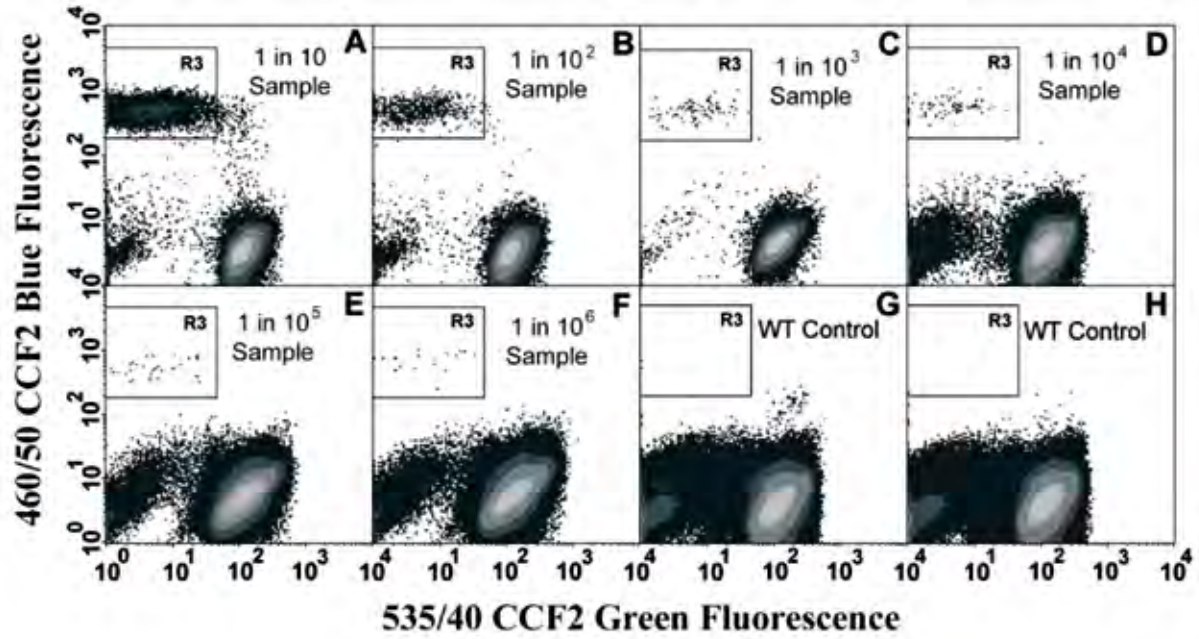


Figure 3 Detection of rare events using β -lactamase/coumarin cephalosporin fluorescein (CCF2). R3 defines positive events. A: Positive event frequency of approximately 1:10 from a 100,000 event data file. B: 1:10² from 100,000 events. C: 1:10³ from 100,000 events. D: 1:10⁴ from 1,000,000 events. E: 1:10⁵ from 5,000,000 events. F: 1:10⁶ from 20,000,000 events. G: WT control from 20,000,000 events. H: Duplicate of WT control.

图释: β -lactamase/CCF2方法灵敏度。R3显示的阳性区域。1:10⁶时依然能够检出阳性样本。

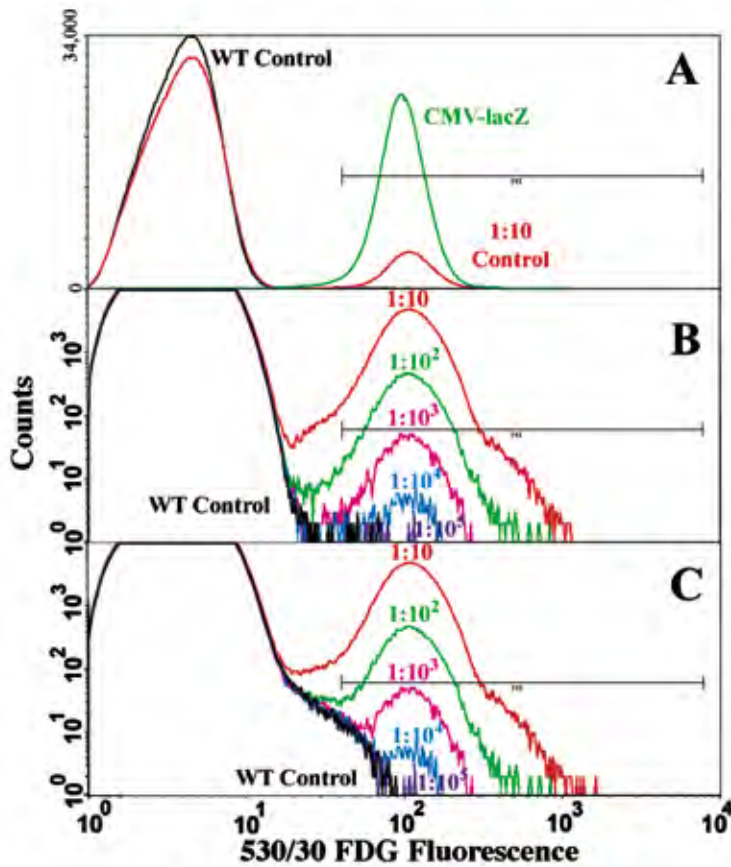


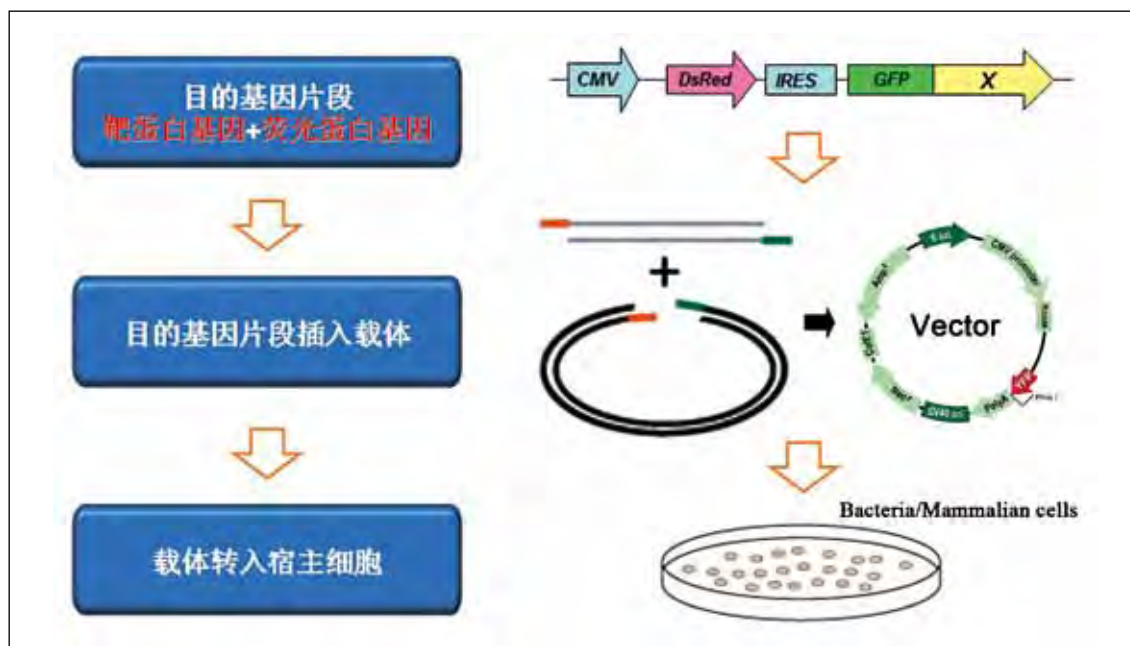
Figure 4 Detection of rare events using *lacZ*/fluorescein di-D-galactopyranoside (FDG). A: Positive event frequency of 1:10, with WT and cytomegalovirus (CMV)/*lacZ* controls (linear vertical axis for visualization of all). B: Positive event frequencies of approximately 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, and 1:10⁵ (log scale vertical axis for wide range of frequencies). Gating includes yellow fluorescence to eliminate false positives arising from FDG. C: Same as B except that gating on yellow fluorescence is not used.

图释: *lacZ*/FDG方法灵敏度, 1:10⁵时样本X轴的变化已经非常大。

结论是 *lacZ*/FDG 的检测灵敏度要高于 β -Lactamase/CCF2 10 倍以上。

1.1.2 荧光蛋白的流式分析和分选

流式检测原理图



1.1.2.1 荧光蛋白的多色标记文献：

摘自： **Multiparameter Flow Cytometry of Fluorescent Protein Reporters.**

Teresa S. Hawley, Donald J. Herbert, et al. *Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols*, 2nd ed.

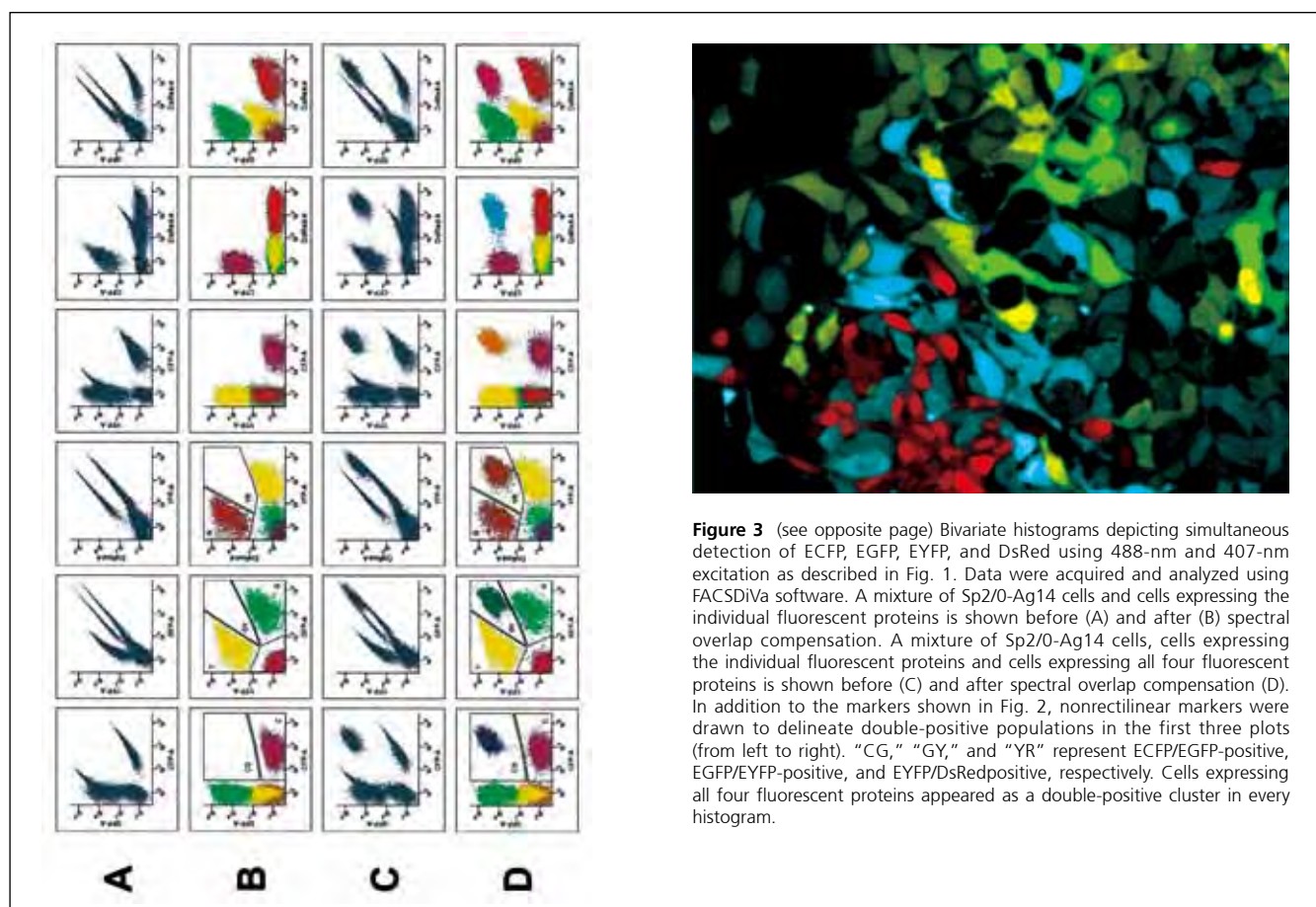


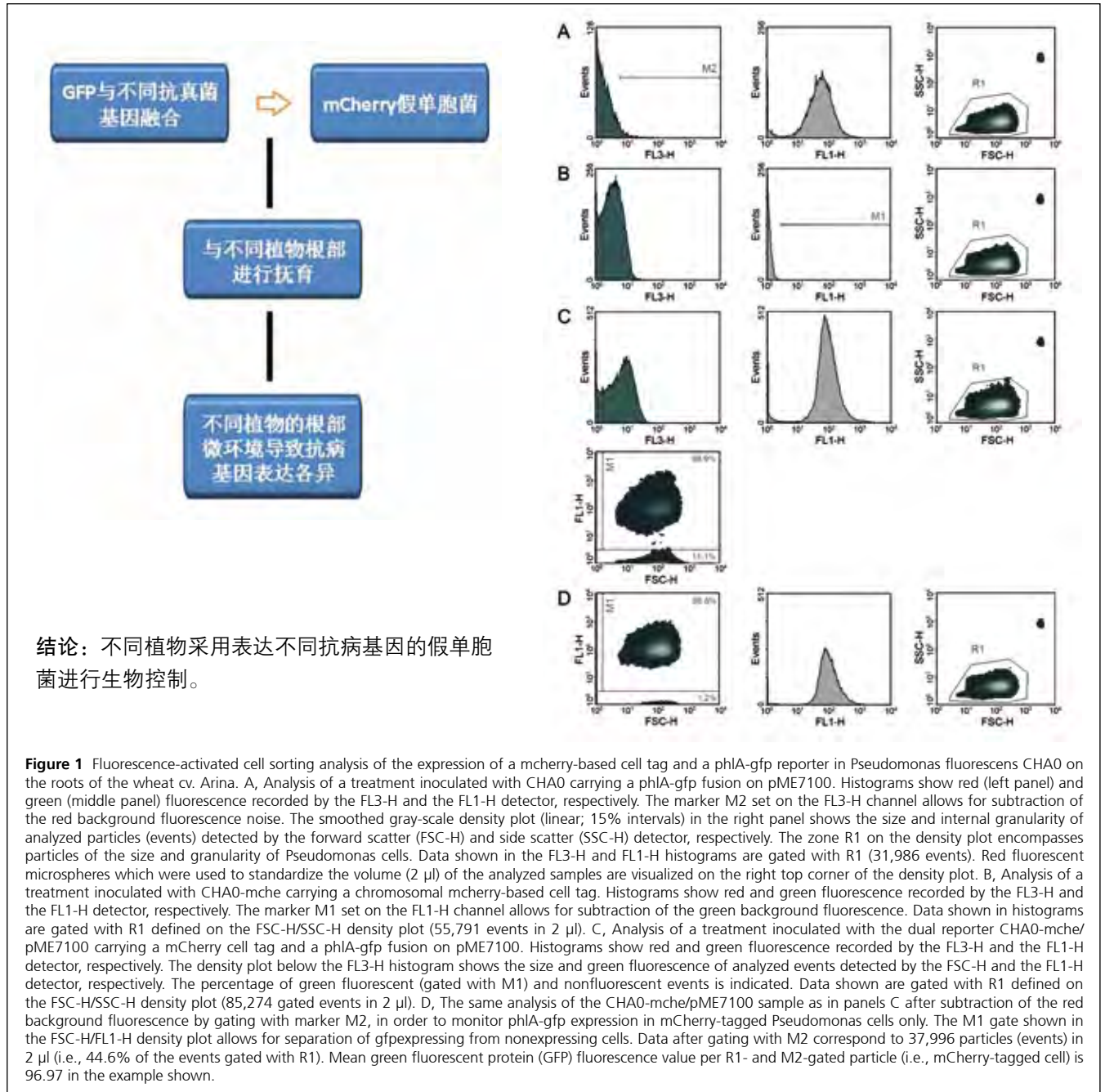
Figure 3 (see opposite page) Bivariate histograms depicting simultaneous detection of ECFP, EGFP, EYFP, and DsRed using 488-nm and 407-nm excitation as described in Fig. 1. Data were acquired and analyzed using FACSDiVa software. A mixture of Sp2/0-Ag14 cells and cells expressing the individual fluorescent proteins is shown before (A) and after (B) spectral overlap compensation. A mixture of Sp2/0-Ag14 cells, cells expressing the individual fluorescent proteins and cells expressing all four fluorescent proteins is shown before (C) and after spectral overlap compensation (D). In addition to the markers shown in Fig. 2, nonrectilinear markers were drawn to delineate double-positive populations in the first three plots (from left to right). "CG," "GY," and "YR" represent ECFP/EGFP-positive, EGFP/EYFP-positive, and EYFP/DsRed-positive, respectively. Cells expressing all four fluorescent proteins appeared as a double-positive cluster in every histogram.

图释： BD FACS Vantage 采用 488nm 和 407nm 激光器同时检测 ECFP、EGFP、EYFP 和 DsRed。A、B 分别显示 Sp2/0-Ag14 细胞只表达一种荧光蛋白混合后，补偿前及补偿后。C、D 显示 Sp2/0-Ag14 细胞只表达一种荧光蛋白及表达四种荧光蛋白混合物，补偿前及补偿后。

1.1.2.2 抗病基因检测，不同植物根部转基因假单胞菌表达分析

摘自： Combination of Fluorescent Reporters for Simultaneous Monitoring of Root Colonization and Antifungal Gene Expression by a Biocontrol *Pseudomonas* on Cereals with Flow Cytometry

Laurène Rochat, Maria Péchy-Tarr, et al. *MPMI*. 2010. Vol 23: 949–961.



图释： BD FACSCalibur检测Wheat与Arina根部环境中，mcherry标记的假单胞菌CHA0报告基因pHIA-GFP 的表达情况。A. 分析携带pHIA-GFP的CHA0，mcherry与GFP分别用FL3-H和FL1-H通道检测，能很好地区分细菌与背景噪音，FL3-H和FL1-H圈门后的细胞进一步圈为R1。B. M1圈出GFP阳性细胞群，并显示R1门的细胞。C. FSC-H/FL1-H圈门区分GFP+/−细胞。D. 在C的基础上进一步用M2分析后，96.97%的样本为细菌。

总结： 流式在细菌与植物研究中的应用优势：GFP 及 DsRed 的各种变体被广泛用于的植物种子、根、叶与细菌的相互作用，本实验的研究发现 *P. fluorescens* CHA0 中 mCherry 能与 GFP 更好的共表达，DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed.T3_S4T、mRFP1 与 GFP 作为双报告系统都不适合，说明 mCherry 与 GFP 是一种更可靠的双报告系统，该组合已被广泛应用于细胞定位、微生物基因报告的研究中。此外，文章中提及，与荧光显微镜相比，流式检测的优势在于：信息全面，可以进行单细胞水平、高通量、特异表达分子的研究；流式可以检测到阴性表达的菌，而荧光显微镜不能，因而不能检测阳性表达率，且流式的灵敏度明显提高、定量是 CFU 的 10 倍。

1.1.2.3 信号转导蛋白表达研究

摘自: Transduction of Wnt11 Promotes Mesenchymal Stem Cell Transdifferentiation into Cardiac Phenotypes

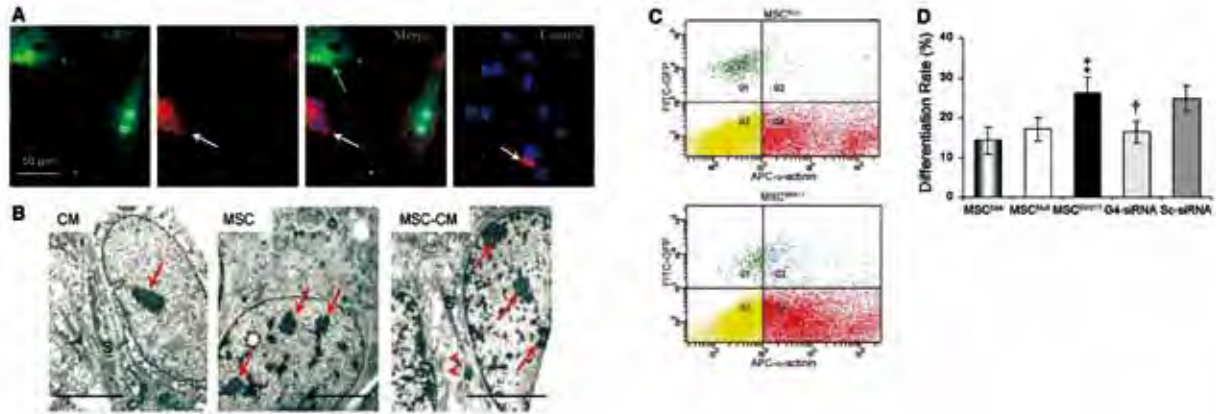
Zhisong He, Hongxia Li, et al. *Stem Cells*. 2011. Vol. 20: 1771–1778.

Figure 4 Transdifferentiation of MSCs into cardiac phenotypes. (A) Representative micrographs showing GFP, α -actinin immunolabeling, and DAPI staining after MSCs cocultured with CMs for 7 days. White stars: differentiated CM (GFP⁺/ α -actinin⁺ cell); green arrow: nontransdifferentiated MSC (GFP⁺/ α -actinin⁻ cell); white arrows: native CMs. Yellow arrow in “control” panel indicates apoptotic CMs with condensed nuclei and shrunk phenomenon, which is distinguished from normal CM (white arrow). (B) Electron microscopic images. Typical CM has myofibers with clear sarcomeres (S) and central nucleus with single nucleolus (red arrow). MSCs have no myofibers, and nucleus has multiple nucleoli (red arrows). Differentiated CMs from MSCs is confirmed by multinucleoli (red arrows) and appearance of sarcomeres (S). It had physical contacts with neighboring myocytes (red arrowheads). (C, D) Representative FACS data of α -actinin⁺/GFP⁺ cells (C) and quantitative assay in various groups (D). * $P < 0.05$, versus MSCNull; † $P < 0.05$, versus MSCWnt11; FACS, fluorescence activated cell sorting.

图释: BD FACS Aria检测wnt11-MSC分化为心肌细胞形态。(A) 荧光显微镜检测显示MSC与CMs孵育7天后, 分化的CM (GFP+/α-actinin+cell), 未分化的MSC细胞 (GFP+/α-actinin-cell)。(B) 电子显微镜检测显示, 典型的CM有明显的肌纤维、单核。MSC细胞没有肌纤维、多核(红色箭头)。由MSC分化的CM细胞既表现为多核, 也出现肌小节。(C, D) 流式检测分别转入MSCNull与MSCWnt11的细胞表现 ($P < 0.05$)。

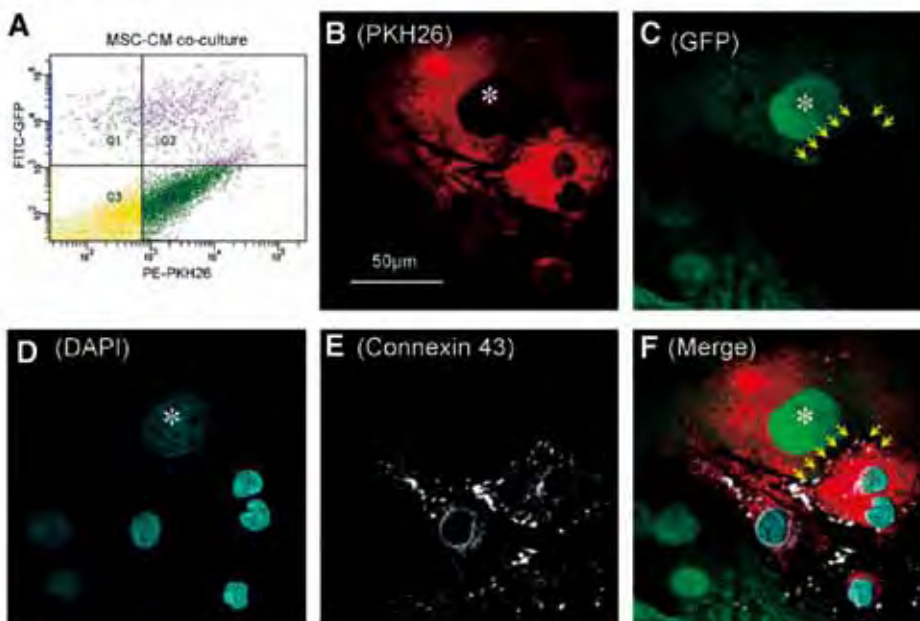


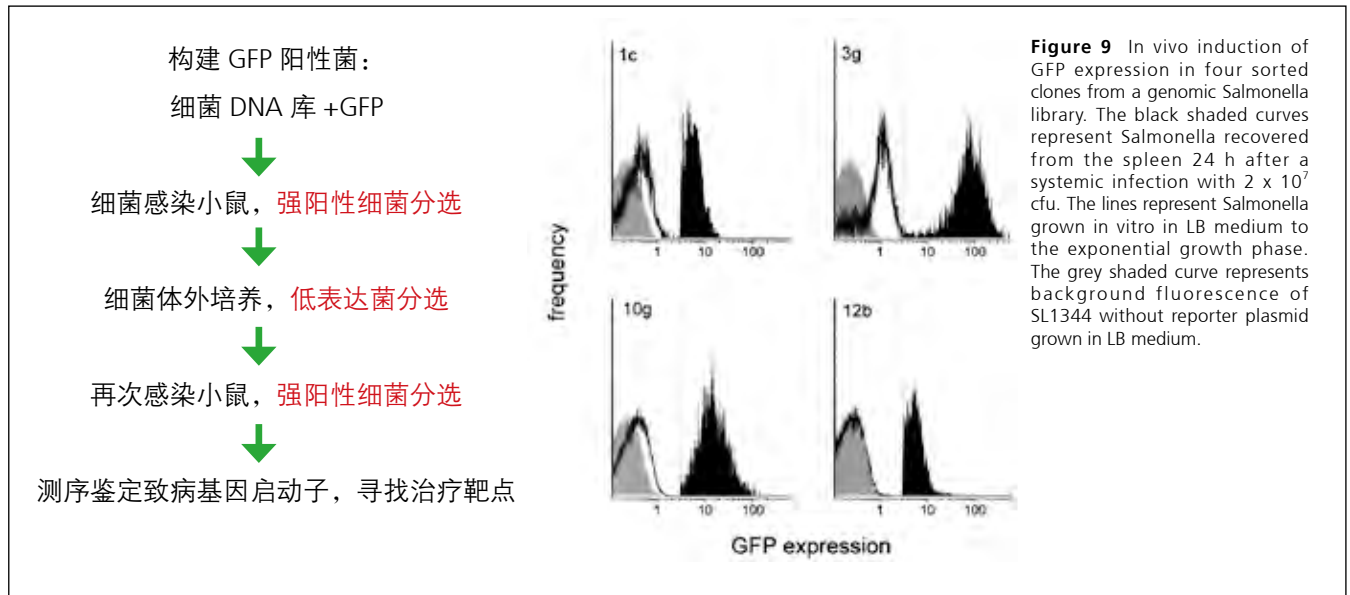
Figure 5 Myogenic transformation of MSCs may involve cell fusion or connection with native CM. (A) Representative FACS data of PKH26⁺/GFP⁺ cells. (B–F) Representative confocal images illustrate PKH26 (red, B), GFP (green, C), nucleus (blue, D), and connexin 43 (white, E) labeling. Seven days after MSCs were cocultured with PKH26-prelabeled neonatal CMs (1:20 ratio), some MSCs were positive for GFP and PKH26 (F; white star indicates double positivity for PKH26 and GFP cell). Connexin 43 was observed between MSCs and native CMs (yellow arrows). GFP, green fluorescent protein; FACS, fluorescence activated cell sorting.

图释: 肌源性转化的MSCs参与了细胞融合, 以及与CM细胞间出现Connexin 43。(A) BD FACS Aria分析PKH26+/GFP+细胞。(B–F) 代表荧光显微镜成像结果PKH26 (红色, CM细胞标记, B), GFP 绿色 (C), 细胞核 (蓝色, D) 以及Connexin 43 (白色, E)。

1.1.2.4 体内启动子筛选 - 流式分选

摘自： Examination of *Salmonella* gene expression in an infected mammalian host using the green fluorescent protein and two-colour flow cytometry

Dirk Bumann, et al. *Molecular Microbiology*. 2002. Vol. 43: 1269–1283.



图释： 采用BD FACSort从沙门氏菌的基因库中经过3次分选，筛选出4个在体外低表达、体内高表达GFP标记的克隆，黑色的为脾脏感染24小时后的水平，竖线是LB培养基的水平，灰色为SL1344在LB培养基中的GFP强度，作为背景对照。

总结： 流式的优势在于

- (1) 检测的高灵敏度：可以从大量被感染的组织细胞中（自发荧光强）区分出 GFP 阳性表达的细菌颗粒；
- (2) 通过多次流式细胞分选，保证了实验的精确性。

第二节 microRNA 的研究与流式技术

1.2 microRNA 的概念和功能

MicroRNA (miRNA) 是长约 20 ~ 24nt 的单链 RNA，它通过与靶 mRNA 完全或不完全的互补配对，促进目标 mRNA 降解或抑制蛋白翻译，在细胞增殖、分化、凋亡、基因调控及疾病的发生中扮演重要的角色。

1.2.1 流式分析 miRNA 的调控作用



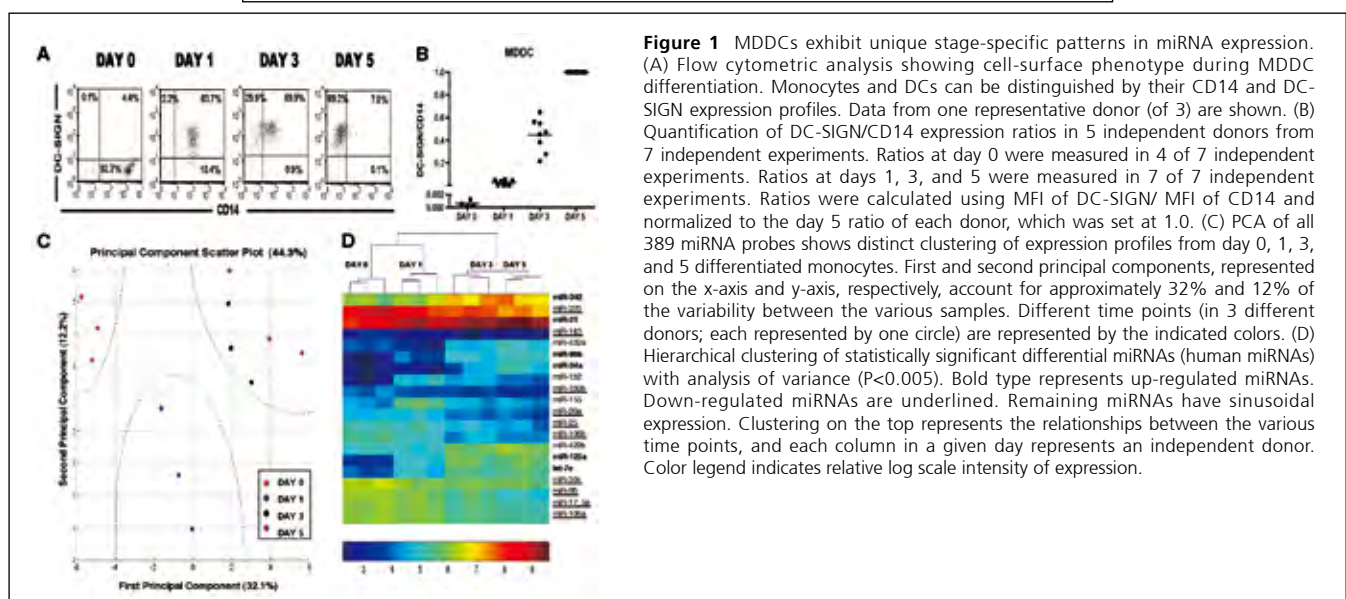
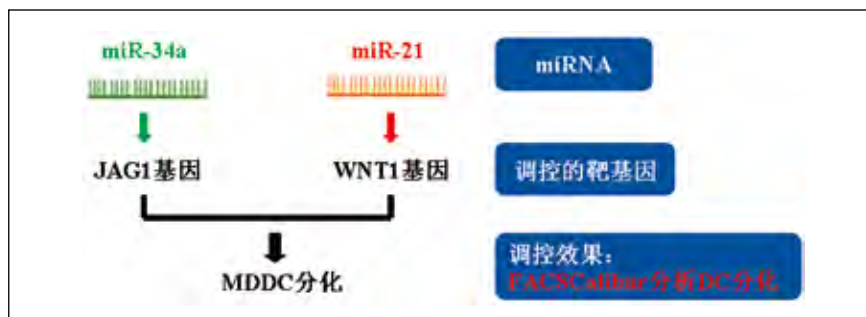
1.2.1.1 通过流式分析蛋白表达情况反映 miRNA 的调控

摘自: MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation

Sara T. Hashimi, Jennifer A. Fulcher et al. Blood. 2009. Vol. 114: 404-414.

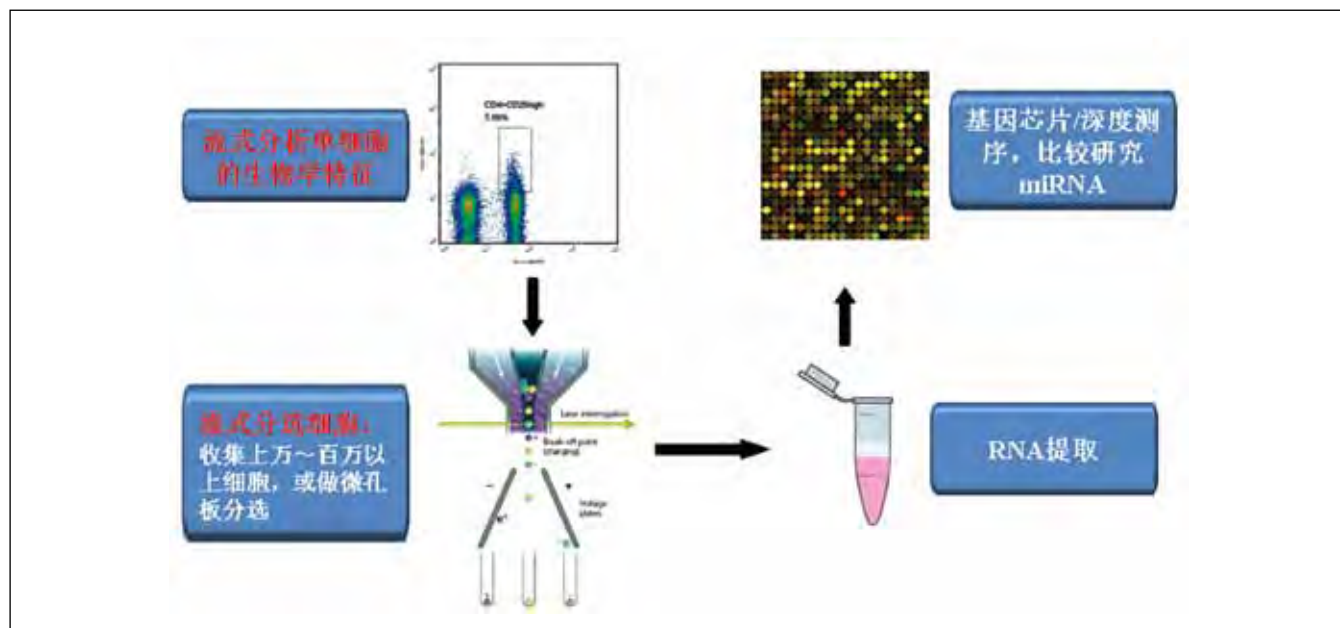
研究目的: 研究 miRNA- 蛋白网络调控人 MDDC 分化

技术路线:



图释: 使用FACSCalibur进行MDDC的分析研究, 发现MDDC的miRNA的表达有阶段特异的表现。图(a)为流式细胞仪分析结果, 显示了MDDC分化过程中的细胞表型变化。单核细胞和DC细胞用CD14和DC-SIGN的表达不同来加以区分。图示为3号供者的流式分析图。图(d)显示了细胞miRNA分析的统计学显著差异的等级图($p < 0.05$)。粗体字代表miRNA上调。下划线代表miRNA下调。其余的miRNA变化呈正弦曲线变化。顶部代表不同时间点的关系, 每一列代表一个独立供者样本在某一特定时刻的表现。颜色代表miRNA表达的对数级强度。

1.2.2 流式分选细胞后 miRNA 分析



1.2.2.1 通过流式分选出目的细胞后进行 miRNA 分析

摘自: **Downregulation of miRNA-200c Links Breast Cancer Stem Cells with Normal Stem Cells**

Yohei Shimono, Maider Zabala, et al. *Cell*. 2009. Vol. 138: 592-603.

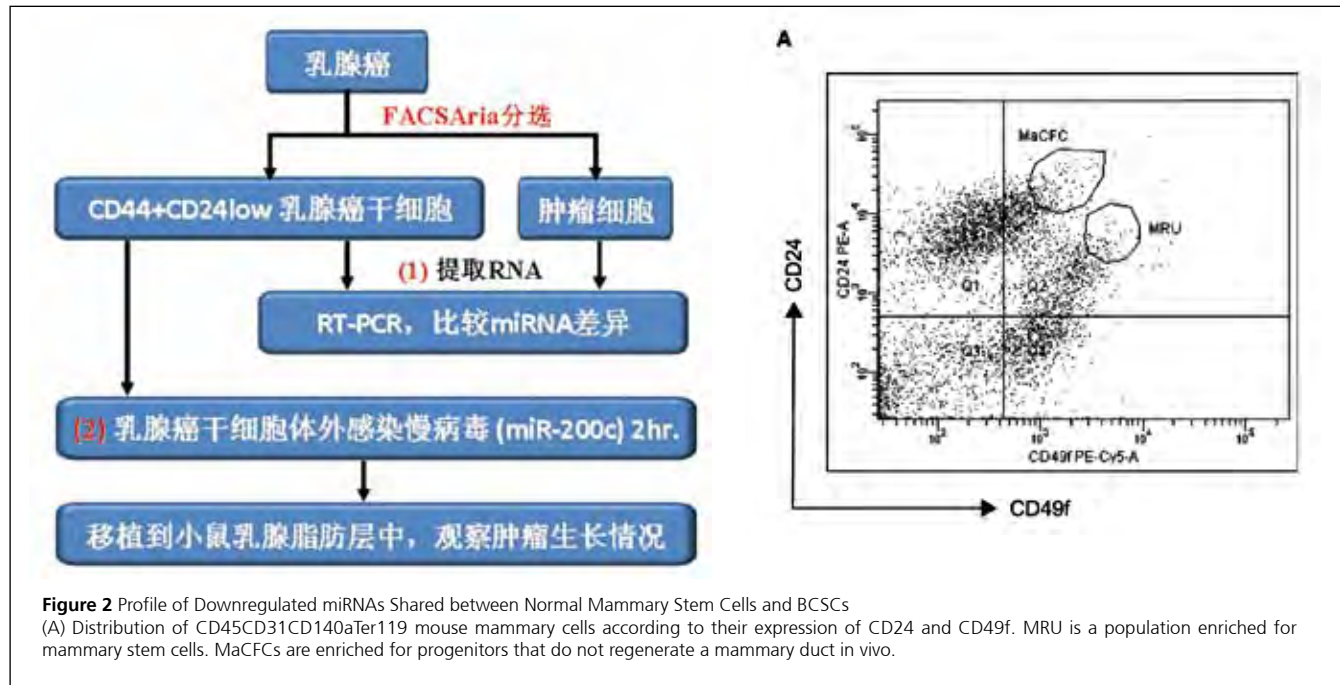


Figure 2 Profile of Downregulated miRNAs Shared between Normal Mammary Stem Cells and BCSCs

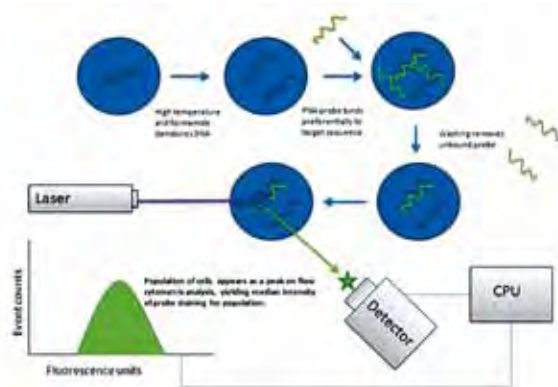
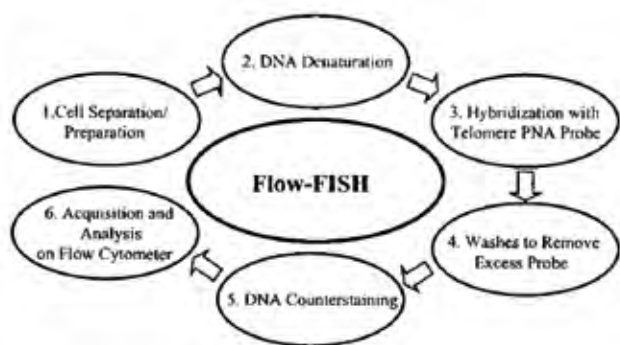
(A) Distribution of CD45CD31CD140aTer119 mouse mammary cells according to their expression of CD24 and CD49f. MRU is a population enriched for mammary stem cells. MaCFCs are enriched for progenitors that do not regenerate a mammary duct in vivo.

图释: 使用FACS Aria分析乳腺癌干细胞，分选细胞后进行miRNA的比较分析。图中显示的是CD45-CD31-CD140a-Ter119-细胞的CD24和CD49f的表达情况。MRU是乳腺癌干细胞。MaCFC是祖细胞，它们在体内实验中不能形成乳腺腺管。

第三节 流式 - 荧光原位杂交 (Flow-FISH)

1.3 流式荧光原位杂交 (Flow-FISH):

源于荧光原位杂交 (Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH) 技术, 首先对寡核苷酸探针做特殊的修饰和标记, 然后用原位杂交法与靶染色体或 DNA 上特定的序列结合, 再通过与荧光素分子相耦联的单克隆抗体来确定该 DNA 序列在染色体上的位置, 最后结合流式细胞仪来检测。



1.3.1 端粒长度检测

端粒 (Telomere) 是真核生物染色体末端的一种特殊结构, 实质上是一重复序列, 作用是保持染色体的完整性。细胞分裂一次, 由于 DNA 复制时的方向必须从 5' 方向到 3' 方向, DNA 每次复制端粒就缩短一点, 所以端粒其长度反映细胞复制史及复制潜能, 被称作细胞寿命的“有丝分裂钟”。

端粒 DNA 主要功能:

- 第一, 保护染色体不被核酸酶降解;
- 第二, 防止染色体相互融合;
- 第三, 为端粒酶提供底物, 解决 DNA 复制的末端隐缩, 保证染色体的完全复制。

主要检测方法:

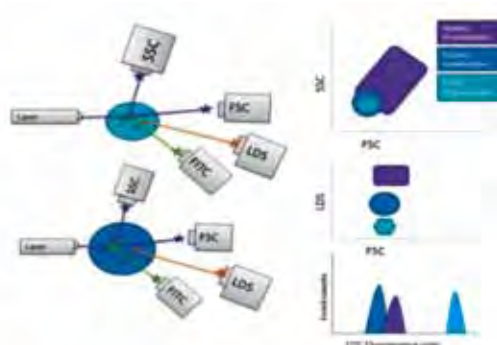
DNA 印迹法 (Southern blot, SB): 使用限制性核酸内切酶消化 DNA, 然后琼脂糖电泳分离不同大小的片段, 转移到硝酸纤维或尼龙膜上。用同位素或生物素、碱性磷酸酯酶标记的端粒特异探针与其杂交。末端限制酶切片段 (TRF) 通过光密度计定量测量。

杂交保护分析法 (Hybridization Protection Assay, HPA): 需要制备基因组 DNA、细胞或组织溶胞产物同吡啶酯 (AE) 标记端粒的探针进行杂交, 检测发光强度, 确定端粒在 Alu 序列中比例。

荧光原位杂交 (FISH): FISH 直接将寡核苷酸探针标记在端粒序列上。标准的 FISH 包括制作分裂中期的染色体以及 DNA 变性, 与 FITC 或 Cy3 标记的寡核苷酸探针杂交, 用 DAPI 或 PI 复染, 最后用荧光显微镜检测信号。

流式 - 荧光原位杂交 (Flow-FISH): 包括 6 个基本步骤: 细胞分离, DNA 变性并与 PNA 探针杂交, 洗去多余探针, 复染后用流式细胞术采集和分析。

Flow-FISH 测量端粒长度原理: 用荧光素标记的核酸 -(CCCTAA)₃ 端粒序列特异性探针进行 FISH 后经流式细胞仪检测, 其荧光强度的高低可反映端粒的长短。

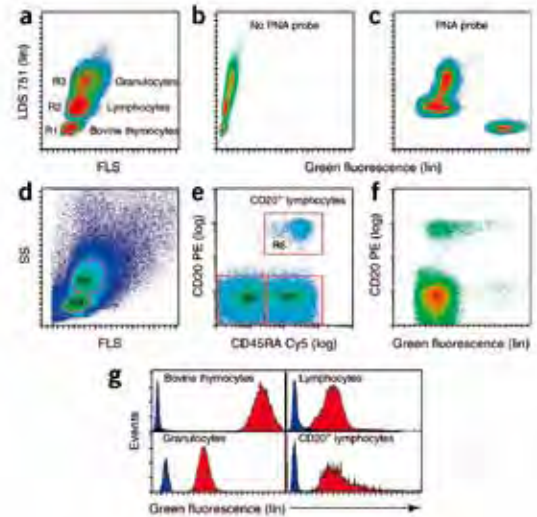


1.3.1.1 流式检测端粒长度

摘自: Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH)

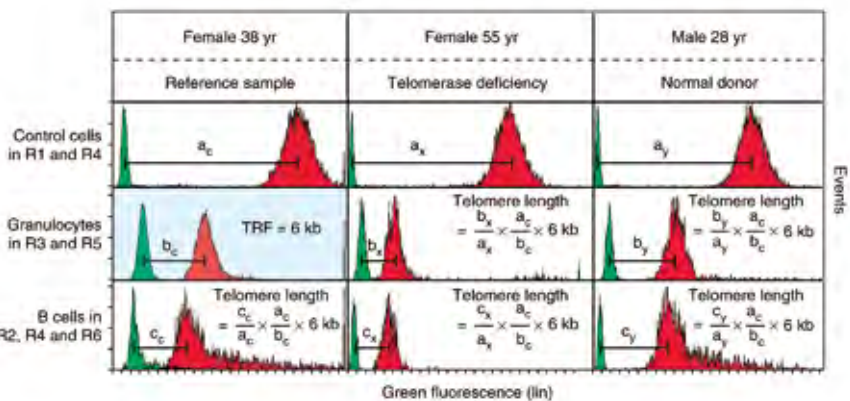
Gabriela M Baerlocher, et al. Nature Protocols. 2006. Vol. 1: 2365-2376.

Figure 1 Example of flow FISH data analysis of nucleated blood cells from a normal human donor (83 years old). For each nucleated blood sample two samples are analyzed: one in which the cells were hybridized to the peptide nucleic acid (PNA) probe (c) and one that was treated identically but without the PNA probe (b). The latter is required to measure the level of autofluorescence in cells of interest and to enable telomere length to be calculated from specific PNA hybridization (g). Cells are counterstained with non-saturating concentrations of the DNA dye LDS751 and various antibodies (CD45RA–Cy5 and CD20– phycoerythrin (PE) in this case) before the acquisition of listmode data. The first step in the subsequent analysis is to identify cells using forward light and side scatter in a bivariate dot plot (d). Within gates R4 and R5 three cell populations can be observed in a bivariate plot of forward light scatter signal versus LDS751 fluorescence (a). The mild formaldehyde fixation of the bovine thymocytes limits their staining by LDS751, which is useful to distinguish these small cells from human lymphocytes with largely overlapping forward and side light scatter properties. Granulocytes are labeled more brightly by LDS751, and can be distinguished from lymphocytes. The green fluorescence of cells gated as in (a) hybridized in the presence or absence of fluorescein-labeled PNA is shown relative to LDS751 fluorescence in the contour plots shown in (c) and (b), respectively. By combining the gates shown in (a) and (d), fluorescence histograms (g) of the indicated cell populations are obtained, which are used for subsequent calculations of telomere length. Antibodies specific for CD45RA and CD20 cells are used (e) to perform telomere length analysis of specific populations within the lymphocyte gate (R2 + R4). Note that the fluorescence histogram of granulocytes is more symmetrical than that of lymphocytes, and that cells with relatively long telomeres are readily identified among CD20+ B lymphocytes.



图释: 正常志愿者(83岁)有核血细胞的流式FISH分析。每群核细胞都分析两个样本: 一个细胞与核算探针(PNA)杂交(c), 另一个的处理方法与前者相同, 但不与PNA杂交(b)。后者是为了检测细胞的自发性荧光, 以便进行端粒长度的计算(g)。细胞与非饱和浓度的DNA染料LDS751、各种抗体 (CD45RA–Cy5和 CD20–PE) 进行抚育。分析: 首先, 在FSC/SSC (d)图中细胞圈为R4和R5, 再显示在 FSC/LDS751图中(a), 将细胞分为3群, 甲醛固定限制了小牛胸腺细胞的与LDS751的染色, 从而将它从R4的淋巴细胞群中区分出来, 绿色荧光细胞(c) 和 (b)显示的分别是(a) 和 (d)圈门后的细胞与PNA杂交和未杂交的结果, 直方图显示就是(g)。CD45RA 与 CD20 是用来圈出特异性的细胞群分析其端粒长度。

Figure 2 Calculation of telomere length from flow FISH data. Fluorescence histograms (green=no peptide nucleic acid (PNA) probe; red=telomere PNA probe) are shown for 3 different cell types (gated as shown in Fig. 1) from 3 different individuals. Two controls are included for each flow FISH experiment; internal control cells (fixed bovine thymocytes, top panels of histograms) and a human reference sample (left panels). The telomere length in purified granulocytes from the reference sample is measured by Southern blot analysis. The average terminal restriction fragment (TRF) length in the reference granulocytes (blue panel) serves to calculate the telomere length in each of the gated cell types as follows: the specific telomere fluorescence for each cell type within the selected gate is calculated by subtracting the median autofluorescence (green histograms) from the median fluorescence signal obtained in the presence of the probe (red histograms).



The resulting specific telomere fluorescence (horizontal bars in histogram plots) is used to calculate the telomere length in the cells of interest using the known TRF value of the reference granulocytes in the formula shown in the panels. The error in telomere length estimates is reduced by taking into account the specific telomere fluorescence of the control cells in each tube, as well as the specific telomere fluorescence of the reference granulocytes in each individual experiment. Note the heterogeneous telomere fluorescence in B cells (with some memory B cells having brighter fluorescence than the control bovine thymocytes) and the short telomeres and absence of B cells with long telomeres in leukocytes from a patient with telomerase deficiency resulting from a mutation in the TERT gene (middle panels).

图释: 由Flow-FISH结果计算端粒长度。直方图显示的绿色是未结合 (PNA) 探针, 红色的是标记了探针的细胞, 每个病人3群细胞。每个病人的flow FISH中采用2个对照: 内对照 (固定的小牛胸腺细胞, 最上面的直方图)和人体样本参考对照 (左侧样本的粒细胞)。参考对照纯化粒细胞的端粒长度用Southern blot分析所得, 其平均TRF长度用来计算每群细胞的端粒长度: 其特异性的荧光强度为红色部分的荧光强度减去绿色部分的自发性荧光。然后根据已知参考对照的TRF和其特异性荧光强度, 计算每群细胞的端粒长度。由于引入了对照细胞特异性端粒的荧光强度, 以及每个病人参考细胞的特异性端粒荧光, 降低了待测样本端粒长度的估计错误。

1.3.2 染色体重复序列的检测

重复序列 (Repetitive Sequence)

真核生物染色体基因组中重复出现的核苷酸序列。这些序列一般不编码多肽，在基因组内可成簇排布，也可散布于基因组中。

真核生物的基因组相当于基因的一股由只有一个复制 DNA 序列 (也称单一 DNA, unique sequence, single copy sequence, nonrepetitive sequence 等) 和具有多数反复存在的 DNA 顺序组成，后者称为重复顺序。组成基因组的 DNA 顺序，根据其重复的频度可分为三类。一是基因组只有一个复制顺序的单一 DNA，二为高度重复顺序 (highly repetitive sequence)，由较短的顺序 10^5 — 10^7 次直线连结而成，其中含随体 DNA 等。第三为中等程度的重复顺序 (moderately repetitive sequence)，为有 300—500 个核苷对的大致相同的顺序——例如在将哺乳类的 DNA 用限制酶 AluI (AG ↓ CT) 切断时所产的主要片断中所见到的高频率 (10^5) 的顺序 (Alu family)——与单一 DNA 一起分散存在的，以及像核糖体 RNA 基因或组蛋白基因群那样的多次成直线相连存在的 (多基因群) 都包含在这一类中。此外有在反方向上重复的顺序 (inverted repetitive sequence)，其变性 DNA 折叠成发夹结构 (hairpin structure, foldback structure, snapback structure)，在编码分析中可迅速再结合的类型。

染色体上存在的大量无转录活性的重复 DNA 序列。其组织形式有两种：串联重复序列和分散重复序列。前一种成簇存在于染色体的特定区域，后一种分散于染色体的各位点上。

类型

1. 高度重复序列

重复几百万次，一般是少于 10 个核苷酸残基组成的短片段。如异染色质上的卫星 DNA。它们是不翻译的片段。在鼠中约占基因组的 10%。

2. 中度重复序列

重复次数为几十次到几千次。在鼠中约占 20%。如 rRNA 基因、tRNA 基因和某些蛋白质 (如组蛋白、肌动蛋白、角蛋白等) 的基因。

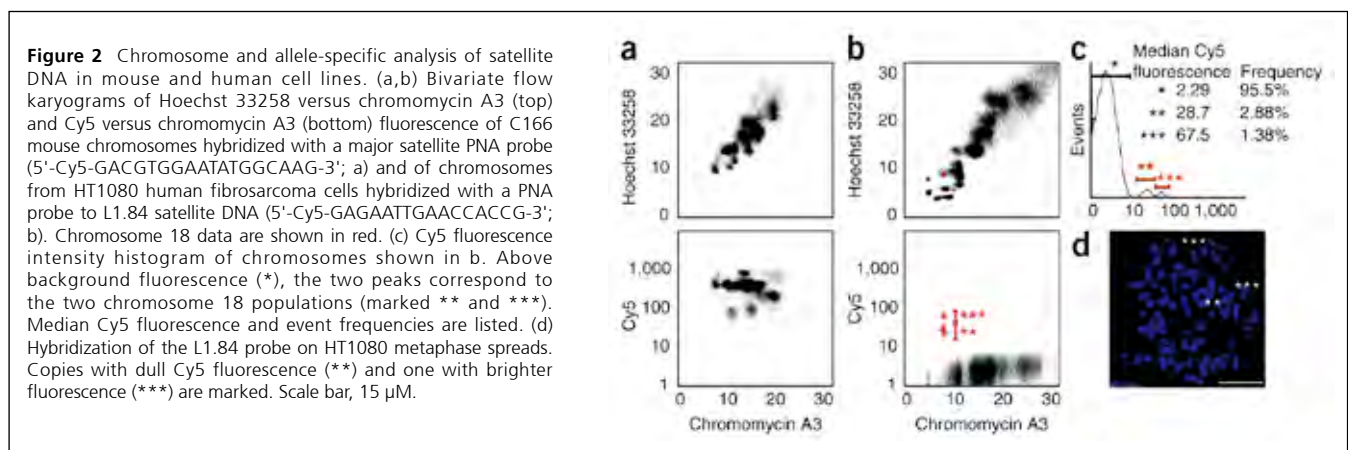
3. 单一序列

在整个基因组中只出现一次或少数几次的序列 (也称为单拷贝序列或单拷贝基因)，在鼠中约占基因组的 70%。如珠蛋白基因、卵清蛋白基因、丝心蛋白基因等。实验证明，所有真核生物染色体可能均含重复序列而原核生物一般只含单一序列。高度和中度重复序列的含量随真核生物物种的不同而变化。

Flow-FISH 检测染色体中重复序列，结合染色体信息分析不同遗传背景 DNA 的重复序列、卫星序列，分析细胞的同源性、检测卫星序列的不稳定性。

摘自：Analysis of repetitive DNA in chromosomes by flow cytometry

Julie Brind'Amour & Peter M Lansdorp. *Nature Methods*. 2011. Vol. 8: 484-486.



图释：人和小鼠细胞系的染色体和卫星DNA的等位基因特异序列的分析。(a,b) Hoechst 33258/ chromomycin A3双参数图：C166 鼠染色体与卫星PNA探针 (5'-Cy5-GACGTGGAATATGGCAAG-3')；a) 杂交，人纤维肉瘤HT1080细胞系染色体用L1.84卫星 DNA 的PNA探针 (5'-Cy5-GAGAATTGAACCACCG-3')；b)进行杂交。18号染色体的数据用红色显示；(c) 为 Cy5荧光强度直方图，背景荧光(*)，18号染色体的两个峰分别标记为**和 ***；(d) 用L1.84探针与HT1080 杂交图。

第四节 BEAMing 技术 (数字 PCR- 流式技术)

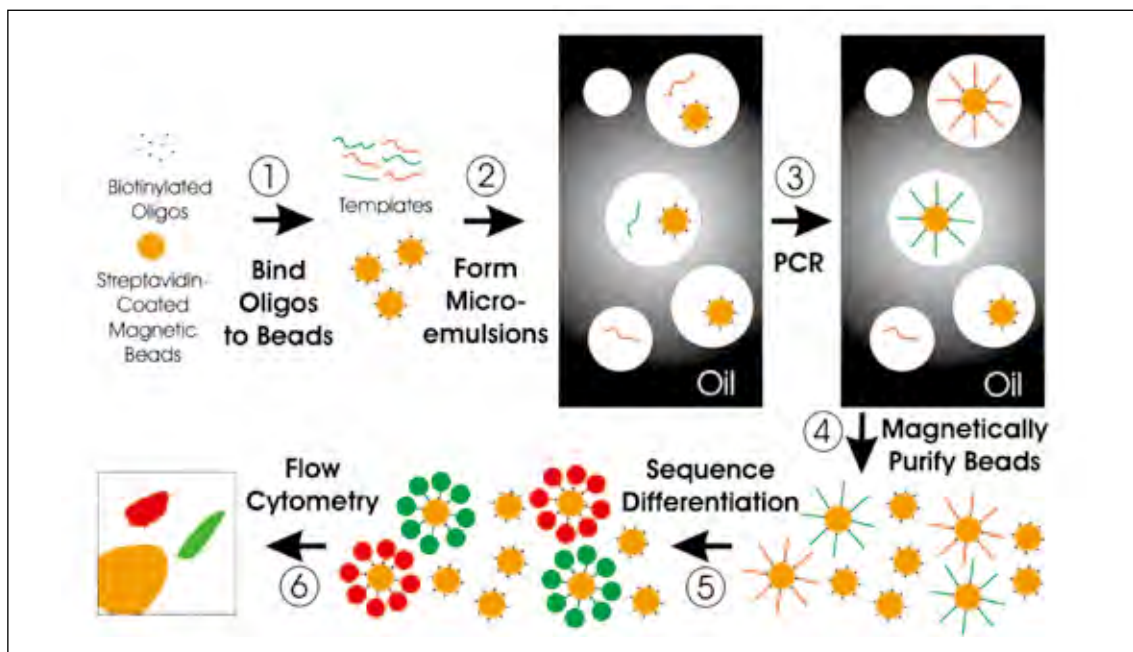
1.4 数字 PCR (Digital Polymerase Chain Reaction, dPCR)

作为 DNA 定量的新技术, 实现了单分子 DNA 绝对定量。dPCR 是将单个 DNA 样品反应液分别进行数以百计的反应, 并且每个反应分别进行扩增检测。此技术在临床诊断、转基因成分定量、单细胞基因表达、环境微生物检测和下一代测序等方面的研究发挥了重要作用。

BEAMing 技术应用优势:

- (一) 在常规实验室条件下, 数以万计的 DNA 分子可以通过该方法来进行评估;
- (二) 特异的突变可以通过流式细胞仪进行分离筛选以备进一步分析和研究;
- (三) BEAMing 技术可以用来对特定组织或者人群中罕见的突变, 以及研究一般基因序列或转录的产物的变异都可以提供相应的鉴别和定量分析。

BEAMing 技术步骤



步骤 1: 包被链霉亲和素磁珠共价键结合的生物素标记的寡核苷酸 (寡核苷酸)。

步骤 2: PCR 所需的所有成分和结合引物微球和模板 DNA 的水油溶液混合一起搅拌, 创造微乳液。(水为白色小室, 灰色为油) 包含平均小于 1 个模板分子和小于一个微球。红色和绿色的模板代表两个模板分子, 其中不同的一个或多个核苷酸的序列。

步骤 3: 微滴乳状液进行的常规 PCR 温度循环。如果 DNA 模板和微球在一个单一的水隔室中一起存在, 微球结合的寡核苷酸作为引物进行扩增。连接到微球直标红色和绿色的线代表从两个不同的种模板的延伸产物。

步骤 4: 磁性分离微球 (微球有磁性)。

步骤 5: 变性后, 将微球孵育能够区分不同种模板的序列的寡核苷酸。然后荧光标记的抗体, 用于标记绑定的杂交探针。激光激发后含有 PCR 产物的微球能够发出红色或绿色。

步骤 6: 流式细胞仪是用来计数的红色和绿色的微球。

FACS 分析实验的具体方案见文献

BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions

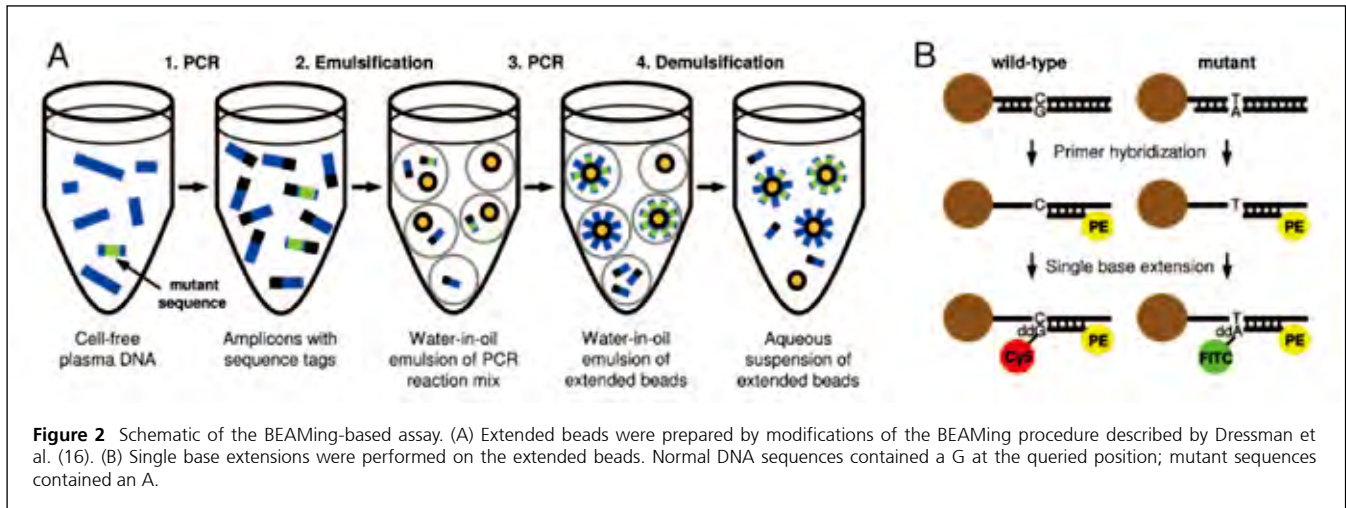
Frank Diehl, MengLi, et al. *Nature Methods*. 2006. Vol. 3: 551-559.

1.4.1 基因序列的变异检测

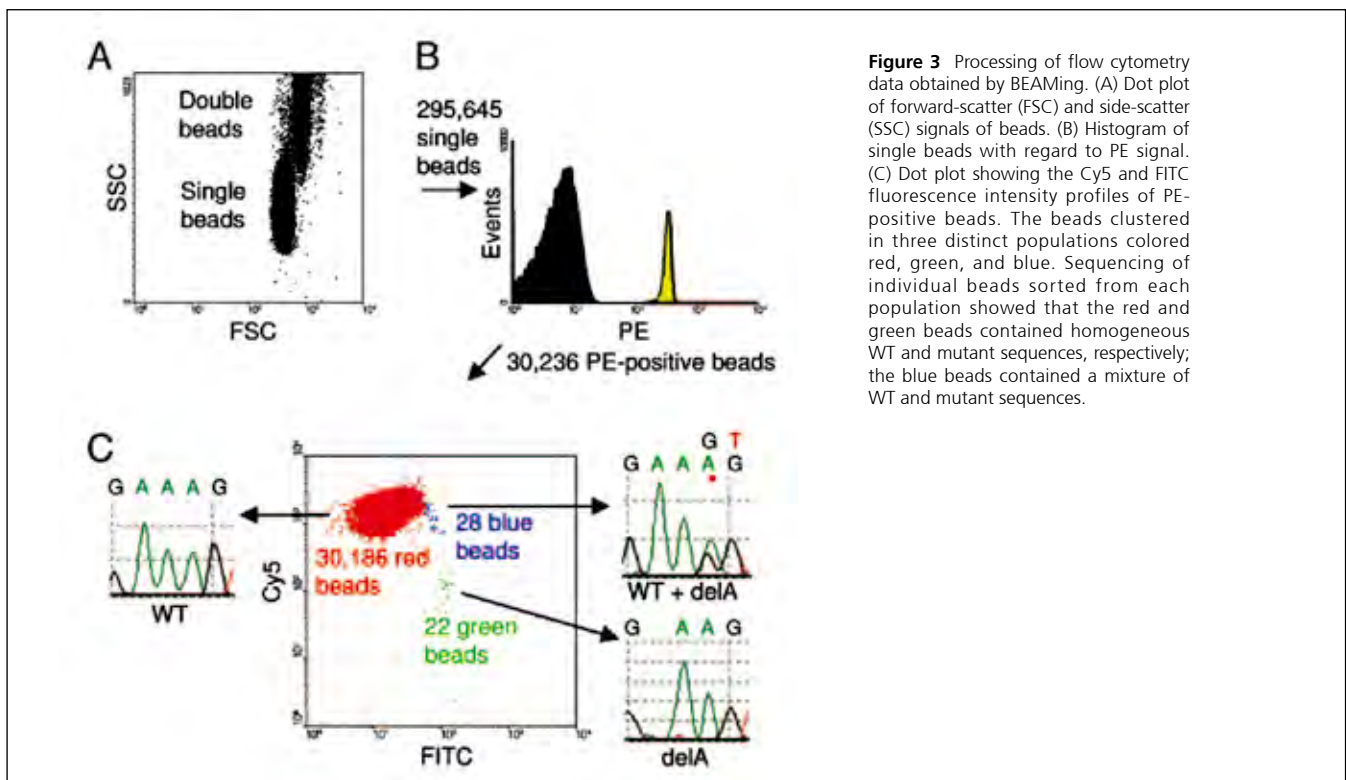
摘自: Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors

Frank Diehl, MengLi, et al. PNAS. 2005. Vol. 102: 16368-16373.

BEAMing 方法分析癌症的早期中循环 DNA 中突变数目。



图释: (A) 修改后的BEAMing的步骤; (B) 微球的扩展段单个碱基扩增。正常DNA序列在可疑位点碱基是G, 突变序列是A, 分别结合不同的荧光。

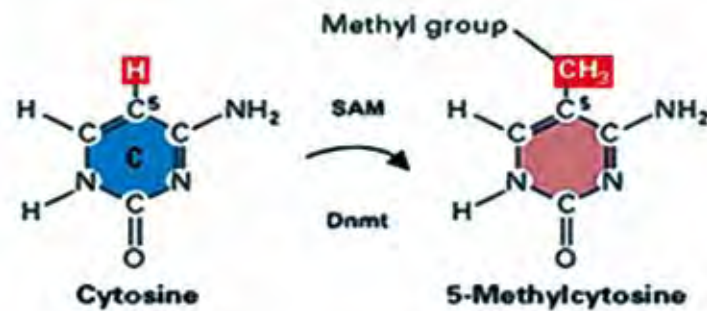


图释: 流式细胞仪分析BEAMing获得的数据。(A) 前向角和侧向角散射光点图分出单个微球群体。(B) PE信号微球直方图显示进行。(C) 点图显示PE-阳性微球门中Cy5和FITC微球, 分布在三个不同的种群红色、绿色、蓝色的微球。流式分别分选三种微球序列, 分析表明, 红色和绿色微球分别含有野生型和突变型序列, 蓝色微球中是野生型和突变型序列的混合物。

1.4.2 DNA 甲基化检测

DNA 甲基化 (DNA methylation) 是指由 DNA 甲基转移酶介导，在胞嘧啶的第 5 位碳原子上加上一甲基基团，使之变成 5 - 甲基胞嘧啶 (5-mC) 的化学修饰过程。

DNA Methylation in Vertebrates



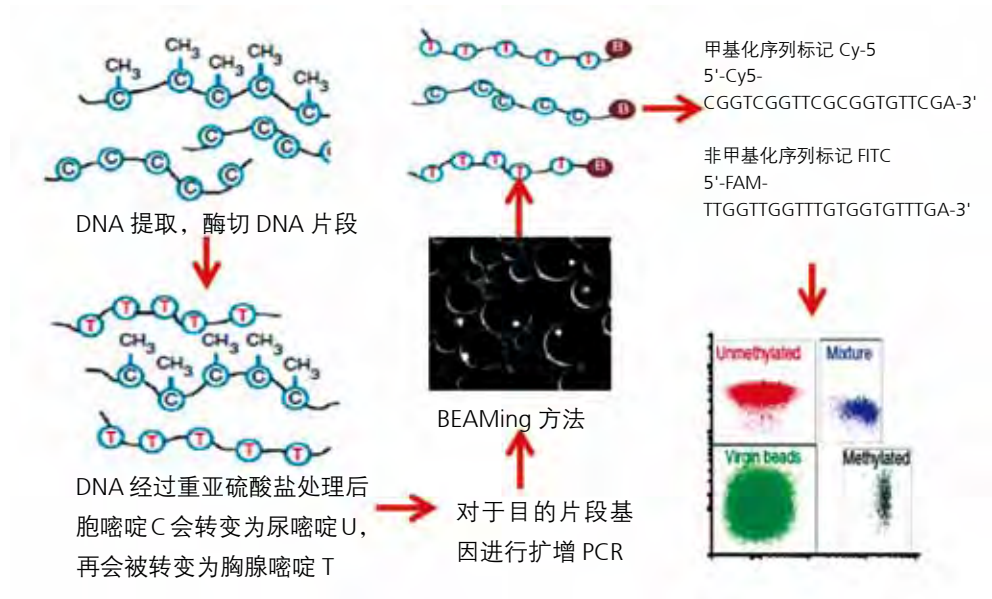
DNA 甲基化作用：DNA 甲基化能引起染色质结构、DNA 构象、DNA 稳定性及 DNA 与蛋白质相互作用方式的改变，从而控制基因表达。

检测方法

在目前有关甲基化的研究中，以亚硫酸氢钠预处理法应用最为广泛。

亚硫酸氢钠预处理法：（一）亚硫酸氢钠联合限制性内切酶分析法；（二）引物延伸反应界导的甲基化分析法（单碱基延伸，甲基化特异性 PCR 和实时 PCR）；（三）亚硫酸氢钠预处理 DNA 的 PCR 产物的测序分析和流式细胞仪的检测 (methyl-BEAMing)。

流式检测 DNA 甲基化的原理图 (methyl-BEAMing)



第五节 指数富集的配体系统进化技术 (SELEX) 与流式

1.5.1 SELEX 技术

即指数富集的配体系统进化技术 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX)。利用该技术可以从随机单链核酸序列库中筛选出特异性与靶物质高度亲和的核酸配体 (Aptamer)。

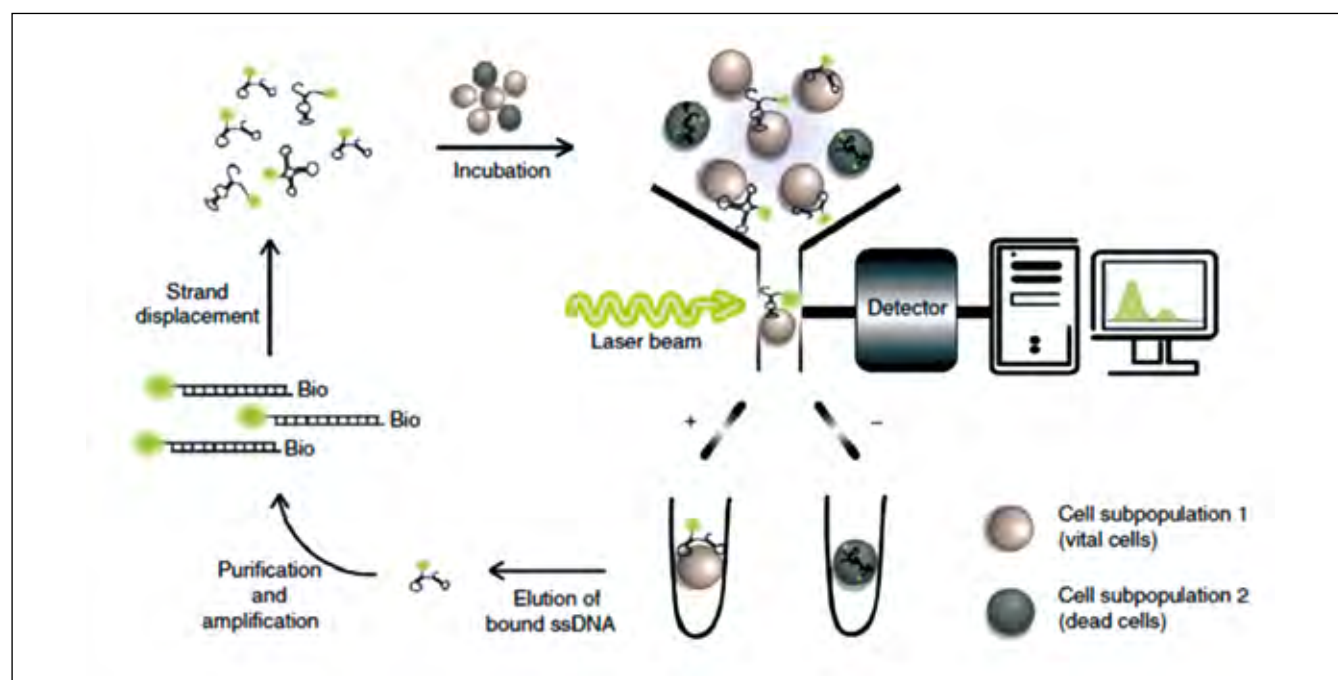
优点：库容量大、靶物质范围广、亲和力高、特异性强等。

应用：已成功应用于蛋白质、肽、病毒、细菌、有机物、金属离子等靶物质的筛选。

FACS-SELEX 技术的步骤



FACS-SELEX 的步骤原理

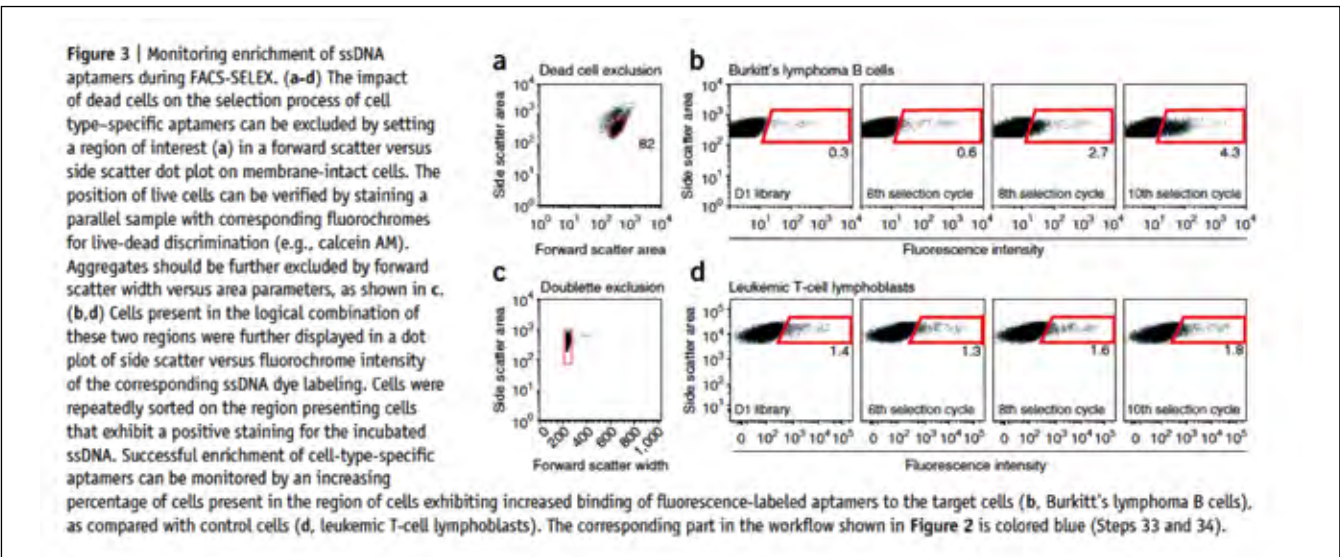


标记荧光的寡核苷酸与靶目标孵育结合，通过流式分析最强的荧光信号，即最佳配体，用流式分选出结合靶目标的活细胞，分离出寡核苷酸，纯化分离后，再次筛选。

1.5.1.1 流式分选混合细胞的核酸配体 (FACS-SELEX)

摘自: Fluorescence-activated cell sorting for aptamer SELEX with cell mixtures

Günter Mayer, Marie-Sophie L Ahmed, et al. Nature Protocols. 2010. Vol. 5: 1993-2004.



图释: 使用FACSDiVa cell sorter进行核酸配体的筛选纯化。流式技术分选活细胞, 排除死细胞干扰(a, 本实验用钙黄绿素-AM); 排除聚集细胞体的干扰 (c); CD19+ Burkitt's lymphoma cells特异性适配体的富集过程 (b); leukemic T-cell lymphoblasts 细胞为对照 (d)。

1.5.1.2 流式筛查富含 G 的寡核苷酸对肿瘤细胞增殖的作用

摘自: Cancer-selective anti proliferative activity is a general property of some G-rich oligodeoxynucleotides

Enid W. Choi, Lalitha V. Nayak et al. Nucleic Acids Research. 2010. Vol. 38: 1623-1635.

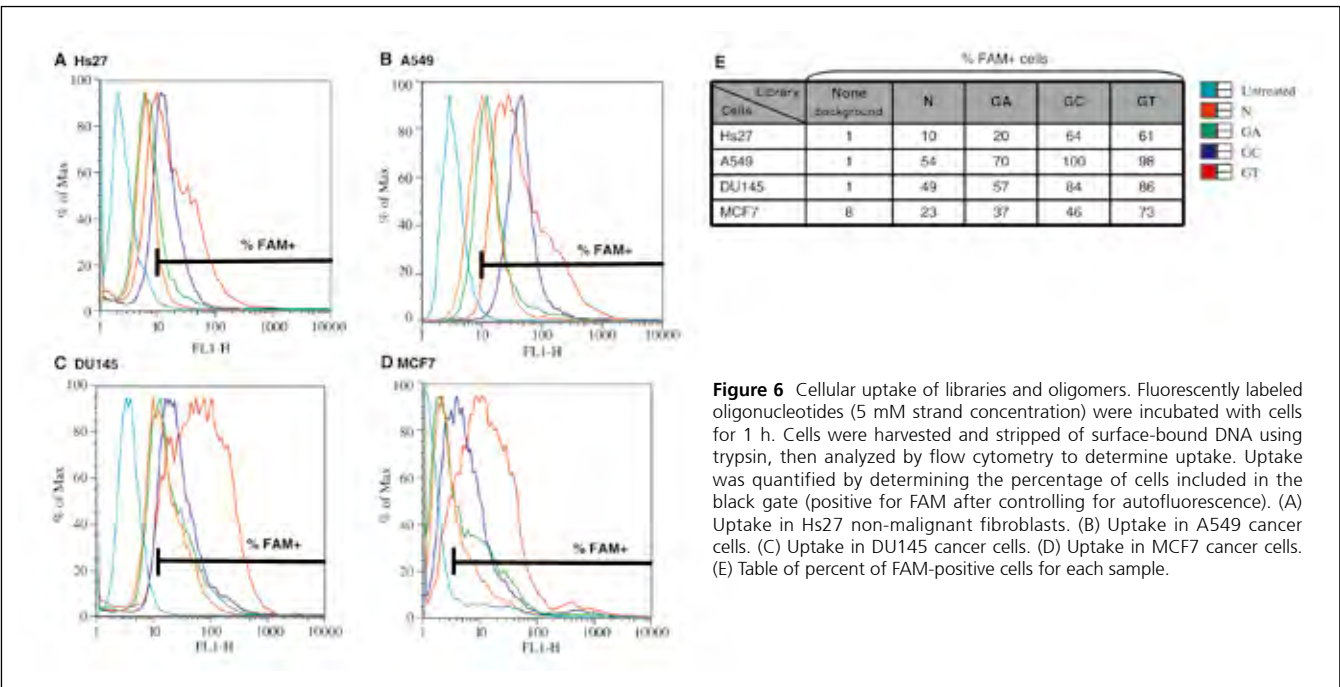


Figure 6 Cellular uptake of libraries and oligomers. Fluorescently labeled oligonucleotides (5 mM strand concentration) were incubated with cells for 1 h. Cells were harvested and stripped of surface-bound DNA using trypsin, then analyzed by flow cytometry to determine uptake. Uptake was quantified by determining the percentage of cells included in the black gate (positive for FAM after controlling for autofluorescence). (A) Uptake in Hs27 non-malignant fibroblasts. (B) Uptake in A549 cancer cells. (C) Uptake in DU145 cancer cells. (D) Uptake in MCF7 cancer cells. (E) Table of percent of FAM-positive cells for each sample.

图释: BD FACSCalibur分析细胞摄取文库和低聚物。荧光标记的寡核苷酸孵育细胞1小时。收获细胞并使用胰蛋白酶剥离表面结合的DNA, 然后通过流式细胞技术分析摄取量。摄取量的定量用黑色间隔门内细胞的百分数定量: (A) HS27非恶性的成纤维细胞吸收量; (B) A549癌细胞吸收量; (C) DU145癌症细胞吸收量; (D) MCF7癌症细胞吸收量; (E) 表内显示每个样品的FAM-阳性细胞的百分比。

第二章 蛋白篇

蛋白-蛋白相互作用 (Protein-Protein Interaction) 是分子生物学研究领域的重要分支。研究蛋白-蛋白相互作用, 不仅可以从分子水平揭示蛋白质的功能, 而且对于提示生长、发育、分化和凋亡等生命活动规律至关重要, 为探讨重大疾病的机理、疾病治疗、疾病预防和新药开发等提供重要的理论基础。

研究蛋白质相互作用的方法:

首先, 发现相互作用的蛋白质。可通过噬菌体展示技术、酵母双杂交技术、TAP 亲和纯化质谱联用技术能够高效的发现与兴趣蛋白相互作用的其他蛋白, 并对这种蛋白加以鉴定;

其次, 鉴定蛋白质相互作用发生的方式与性质。对蛋白质的结构域进行研究, 并获得蛋白质相互作用的动力学性质, 这一阶段常用免疫共沉淀、GST-Pulldown、荧光能量共振转移 (FRET) 及 biacore 等技术;

第三, 研究蛋白质相互作用的影响因素和调节机制。

以上三个阶段所使用的技术通常能够准确的获得研究者所需要的数据, 但是在其结果输出的阶段, 往往需要耗费较长时间与精力, 部分操作步骤过多的技术还可能导致结果丢失。而流式细胞术在结果输出过程中, 与传统技术相比具有很大优势, 其快速、准确等特点尤其适合高通量筛选研究工作。

第一节 表面展示技术与流式

2.1 表面展示 (Surface Display)

表面展示技术是一种新的基因操作技术, 使表达的多肽以融合蛋白形式展现在核糖体、病毒或细胞表面, 保持相对独立的空间结构和生物活性。借以研究多肽的性质、相互识别和作用, 筛选特定功能的多肽结构, 实现蛋白质的固定化和定向进化。噬菌体表面展示技术和酵母表面展示技术是应用最广泛的技术, 流式细胞仪在各种展示技术中的高效准确的筛选应用也越来越被关注和使用。

噬菌体展示技术与流式技术

噬菌体展示技术 (Phage Display Techniques, PDT) 是一种基因表达产物和亲和选择相结合的技术, 它以改构的噬菌体为载体, 把待选基因片段定向插入噬菌体外壳蛋白质基因区, 使外源多肽或蛋白质表达并展示于噬菌体表面, 进而通过亲和富集法表达有特异肽或蛋白质的噬菌体。

噬菌体展示技术应用于抗原抗体库的建立、药物设计、疫苗研究、病原检测、基因治疗、抗原表位研究及细胞信号转导研究等。

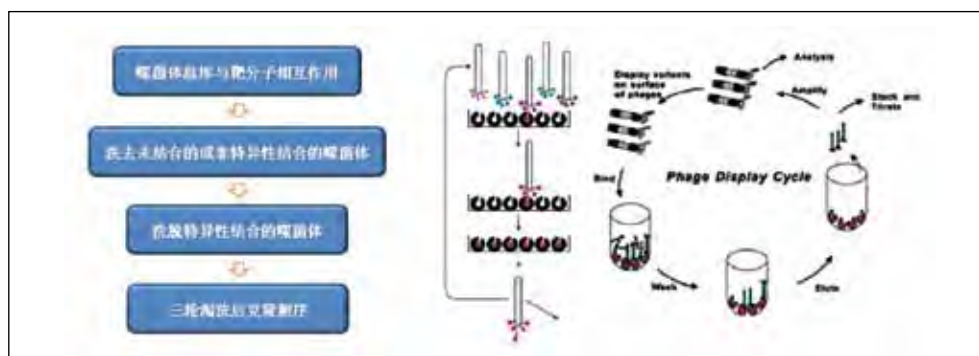
噬菌体展示技术的步骤

- (1) 不同基因分别被插入噬菌体基因组中。
- (2) 分离纯化的噬菌体只是展示一个蛋白、多肽或者抗体。
- (3) 收集所有的噬菌体就构成一个文库将噬菌体文库与靶蛋白相互作用, 淘洗 (panning) 能与靶蛋白相互作用的噬菌体。

流式细胞技术在噬菌体展示技术中淘洗步骤中的应用

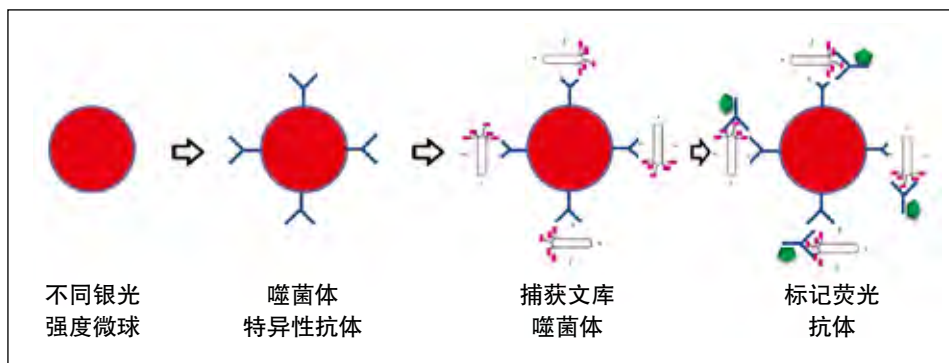
噬菌体展示文库中挑选克隆, 一般需要数轮的淘洗和扩增。(一) 初次淘洗, 以确定目标;(二) 再进行第二次特征识别, 找出与最佳亲和力和特异性的克隆;(三) 反复扩增淘洗。

普通淘洗流程



由于功能性筛选时干扰因素过多，步骤繁琐，筛选的最后经常需要通过测序识别出高亲和力的克隆，但测序只能通过识别克隆中的共同序列确定，但这样方法不是最佳方案，因为它可能会受到各种因素的干扰例如噬菌体生长率，非特异性结合和其他的选择压力而导致偏向选择。

流式淘洗流程



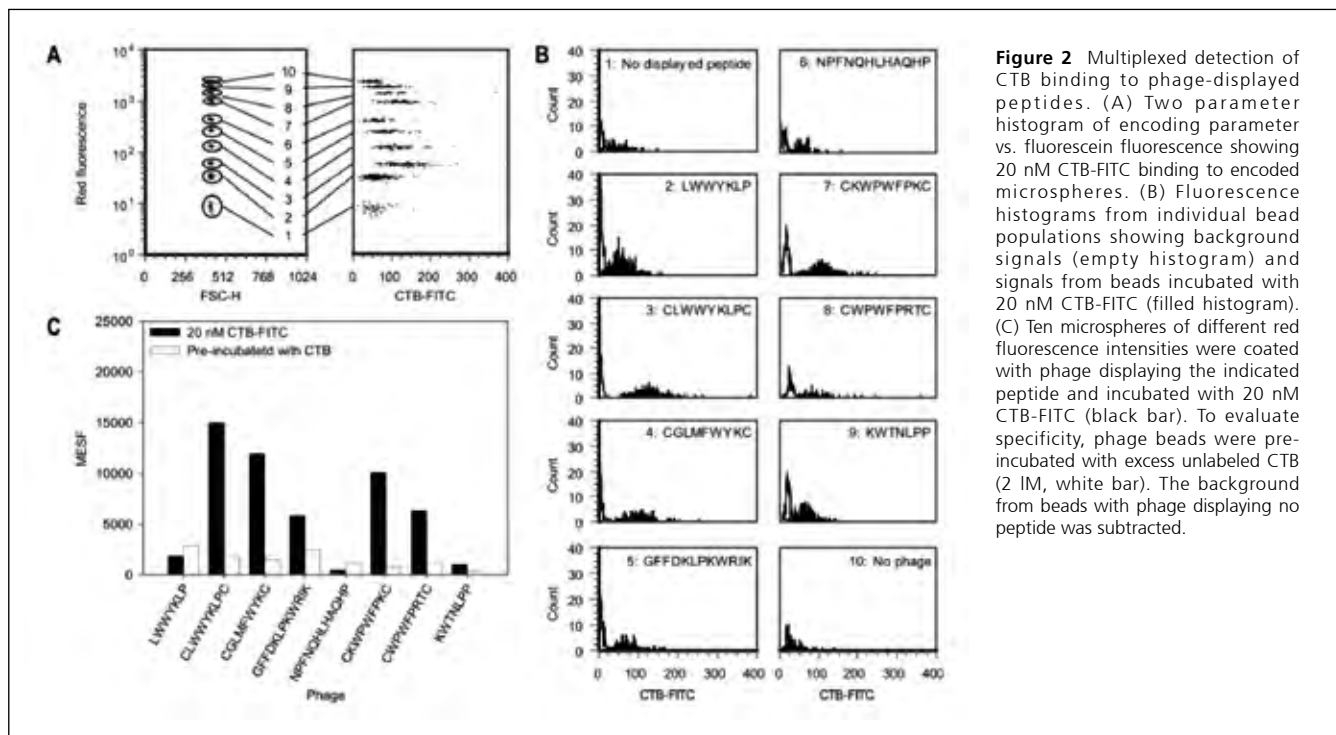
原理：微球连接上噬菌体的特异抗体，捕获文库中的噬菌体，再用荧光标记抗体与噬菌体表达蛋白特异性结合，筛选出结合的噬菌体。不同的荧光强度的微球来标记不同的展示文库。

总结：流式细胞仪运用光学编码微球阵列技术和抗体识别技术一起完成淘洗中结合活性的有效筛选和高亲和力评价，特点是高通量、节省样本、步骤简单准确。

2.1.1 流式技术高通量筛选噬菌体展示库中的克隆

摘自: High-Throughput Screening and Characterization of Clones Selected from Phage Display Libraries

Loretta Yang, John P. Nolan. *Cytometry Part A*. 2007. Vol. 71A: 625-631.



图释：多方向检测CTB结合噬菌体展示。(A) 荧光素和FSC的双参数散点图vs. 荧光素荧光20 nM和CTB-FITC结合编码微球的双参数散点图。(B) 的荧光直方图从阴性微球背景信号(空直方图)和与20 nM CTB-FITC (填充直方图) 共同孵育的信号微球。(C) 十种不同荧光的微球和CTB-FITC (黑条)以及未标记CTB (2μM, 白条)共同孵育后出现的不同的噬菌体展示。噬菌体展示的背景微球需扣除。

2.2 酵母双杂交技术与流式技术

酵母表面展示技术原理

酵母细胞表面展示技术 (Yeast Surface Display Technology) 是一种真核蛋白表达系统。其基本原理是将外源靶蛋白基因与特定的载体基因序列融合后导入酵母细胞，融合蛋白诱导表达后，信号肽引导融合蛋白向细胞外分泌。由于融合蛋白含有锚定酵母细胞壁的结构，可将融合蛋白锚定在酵母细胞壁中，从而将外源蛋白分子固定化表达在酵母细胞表面。

酵母表面展示文库筛选方法

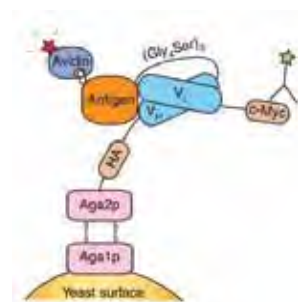
- 1) 传统的结合 - 洗脱 - 扩增筛选方法；
- 2) 流式细胞仪进行筛选，运用 FACS 技术能大大提高阳性克隆富集比率和灵敏率。

2.2.1 高效的单链抗体动力学筛选技术与快速的动力学测定方法

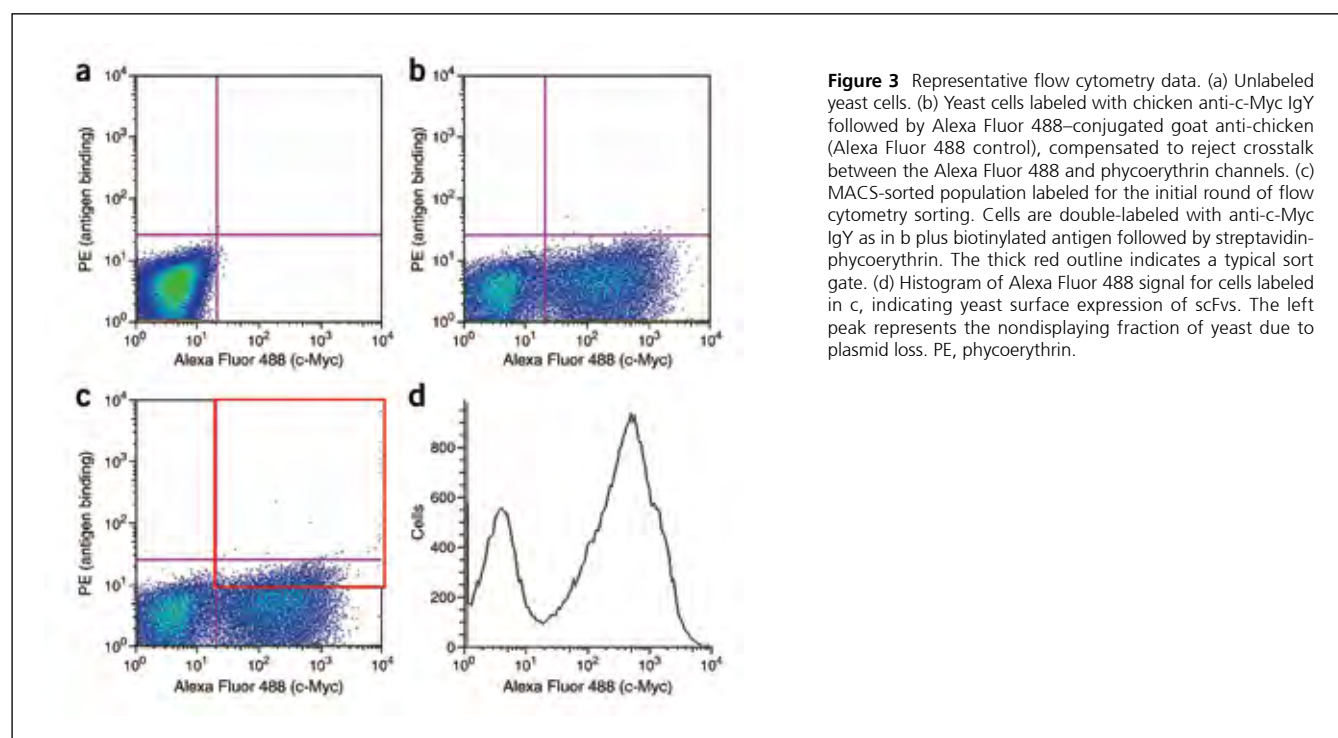
摘自：Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display

Ginger Chao, Wai L Lau, et al. Nature Protocols. 2006. Vol. 1: 755-768.

实验原理：向大库容单链抗体酵母展示库中，加入少量（红色）荧光标记的靶抗原蛋白，过量的带有（绿色）荧光的单链抗体会竞争性的与靶抗原进行结合，亲和力和较高的组合会显示双荧光，被流式细胞分选仪分选出来。通过检测事先设定好的不同抗原 / 抗体数量比样本的荧光强度值，根据解离常数公式计算解离常数。



酵母表面展示单链抗体与抗原结合示意图

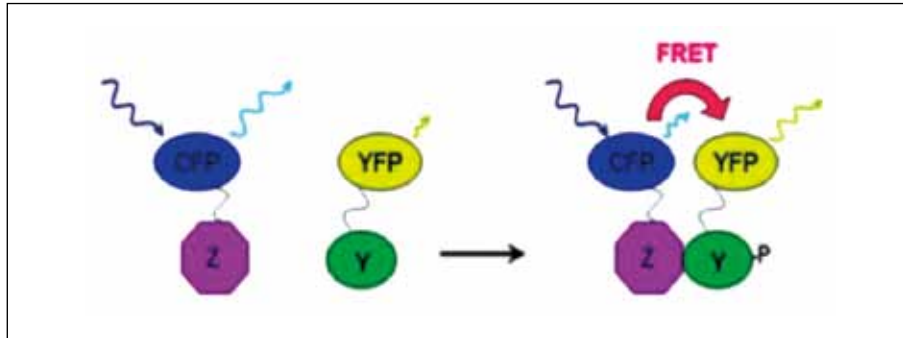


图释：本方法中，应用流式细胞分选技术对单链抗体进行动力学筛选是方法的关键环节。图所示是研究者第一次动力学筛选的过程。研究者使用未标记的酵母细胞作为阴性对照，使用Alexa Fluor 488单阳性酵母细胞调节与PE共同标记的补偿值，并将Alexa Fluor 488和PE双阳性细胞作为第一次分选的目标群。同时利用与单链抗体上的c-myc相互结合的Alexa Fluor 488荧光强度检测酵母展示的效率。为接下来的次级库富集和进一步筛选奠定了坚实的基础。

第二节 荧光共振能量转移 (FRET)

2.2 荧光共振能量转移 -FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer, FRET)

指两个荧光发色基团在足够靠近时，当供体分子吸收一定频率的光子后被激发到更高的电子能态，在该电子回到基态前，通过偶极子相互作用，实现了能量向邻近的受体分子转移。



1) FRET 发生条件:

- 能量匹配: 供体分子的发射光谱可以被受体分子吸收并产生荧光信号; 供体分子的发射光谱应与受体分子的激发光谱必须有显著重叠 (>30%);
- 作用距离: 供体分子与受体分子的作用距离为 1-10nm;

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

FRET 效率公式: 用于计算分子 / 基团间作用距离 R

$$R_0 = \text{const} \cdot \kappa^2 \cdot n^{-4} \cdot \phi_D \cdot J_{DA}$$

- 偶极 - 偶极作用: 供体分子与受体分子作用时的向量必须满足一定条件。

(2) FRET 的应用:

通过 FRET 技术可以获得有关两个蛋白分子之间相互作用的空间信息 (作用距离、作用方向、能量传递效率)。常用于解决如下问题: 蛋白分子的共定位、蛋白分子聚合体、转录机制、转化途径、分子运动、蛋白折叠等生物学问题。

(3) FRET 常见的供体 - 受体荧光分子对:

荧光蛋白类:

CFP - YFP
BFP - GFP
BFP - YFP
CFP - DsRFP
GFP - DsRFP
CFP - YFP - mCherry

染料类:

FITC - Rhodamine
Alexa488 - Cy3
Cy3 - Cy5

2.2.1 FRET 检测 HIV 附属蛋白与细胞膜 CD 分子相互作用

摘自: A Flow Cytometry-Based FRET Assay to Identify and Analyse Protein-Protein Interactions in Living Cells

Carina Banning, Jörg Votteler, et al. Plos One. 2010. Vol. 5: e9344.

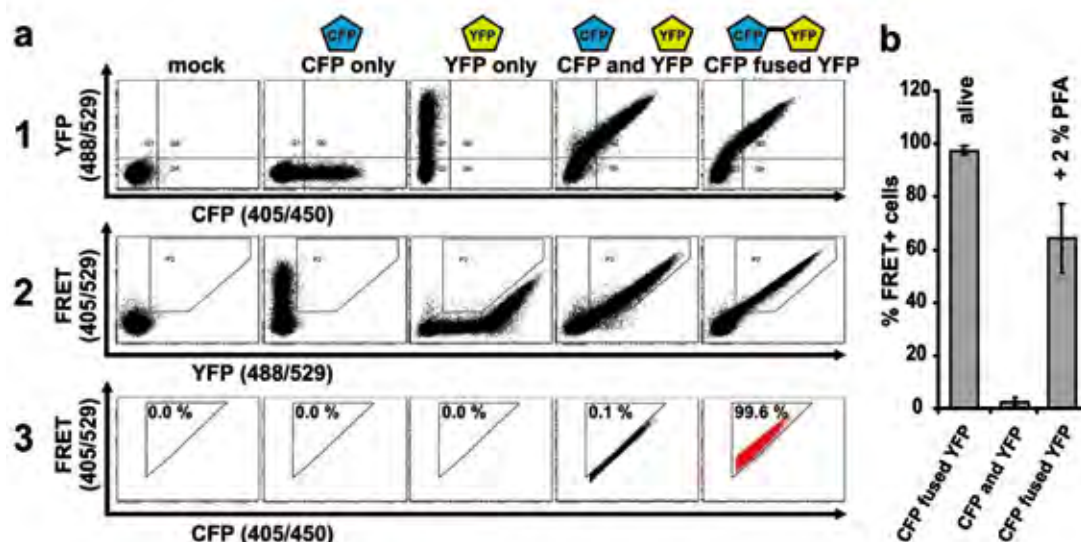


Figure 1 Setup of FRET-measurements by flow cytometry and microscopy. (a) The experimental setup and gating strategy to measure FRET by FACS. Living 293T cells transfected with the controls CFPonly, YFPonly, CFP and YFP as well as the CFP-YFP fusion proteins were analysed on a FACS Aria flow cytometer. Double positive cells were gated (panel 1) and false positive FRET signals resulting from YFP excitation by the 405 nm laser were excluded (panel 2). The remaining cells were evaluated for FRET by adjusting a gate defining to cells which are cotransfected with CFP and YFP only and should thus be FRET-negative (panel 3). (b) Living 293T cells and cells from the same transfections were treated with 2% PFA and analysed for FRET as depicted in (a). Shown are mean values \pm 2 standard deviation from seven independent transfections.

图释：流式细胞仪FACS Aria检测FRET信号。(a) 活的293T细胞分别单独转入CFP、YFP、CFP/YFP、CFP/YFP融合蛋白作为对照，确定最好的圈门方式为CFP/FRET。(b) 293T细胞经过2% PFA处理后，YFP荧光强度出现明显下降。

筛选有相互作用的未知蛋白质的流程

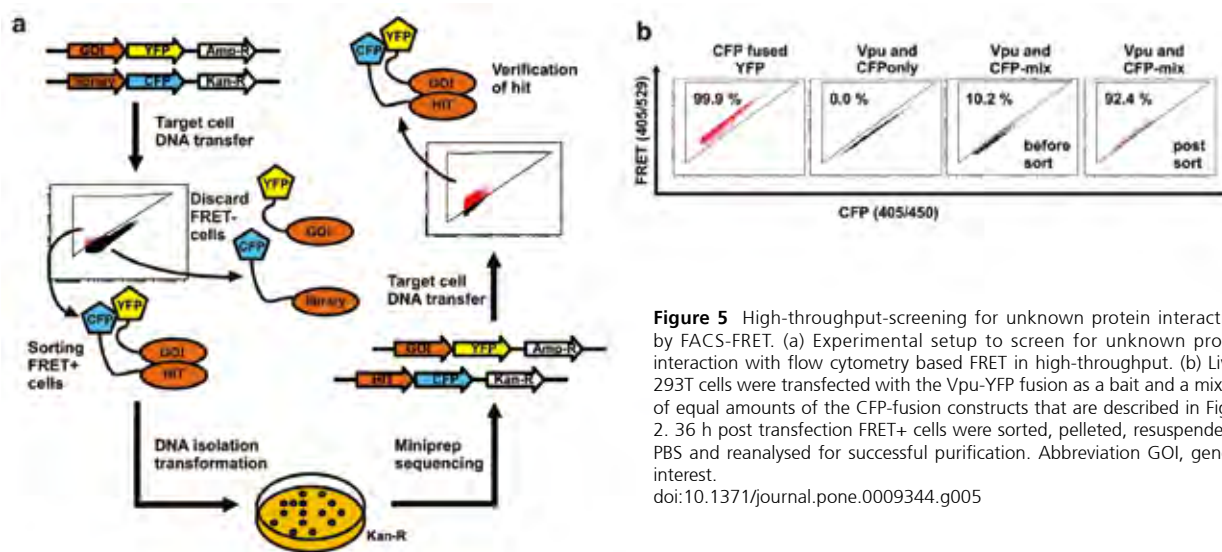


Figure 5 High-throughput-screening for unknown protein interactions by FACS-FRET. (a) Experimental setup to screen for unknown protein interaction with flow cytometry based FRET in high-throughput. (b) Living 293T cells were transfected with the Vpu-YFP fusion as a bait and a mixture of equal amounts of the CFP-fusion constructs that are described in Figure 2. 36 h post transfection FRET+ cells were sorted, pelleted, resuspended in PBS and reanalysed for successful purification. Abbreviation GOI, gene of interest.

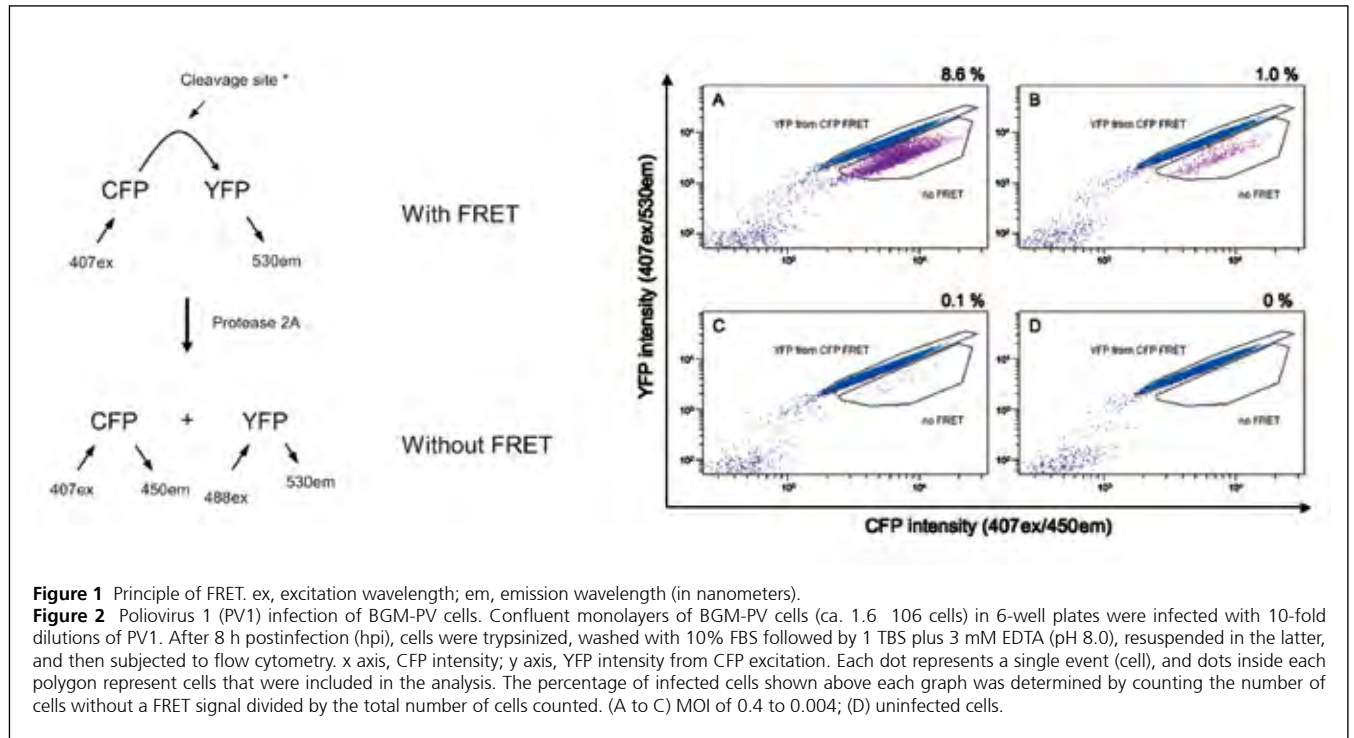
doi:10.1371/journal.pone.0009344.g005

图释：流式细胞仪FACS Aria进行FACS-FRET高通量筛选感兴趣蛋白相互作用的未知蛋白。(a) FACS-FRET筛选流程。(b) 在活的293T细胞中转入Vpu-YFP作为诱饵，与等量的CFP融合蛋白(蛋白的cDNA库)相互作用36小时后，分选FRET+细胞。

2.2.2 FRET 研究蛋白酶功能

摘自: Detection of Infective Poliovirus by a Simple, Rapid, and Sensitive Flow Cytometry Method Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer Technology

Jason L. Cantera, Wilfred Chen, et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010. Vol. 76: 584-588.

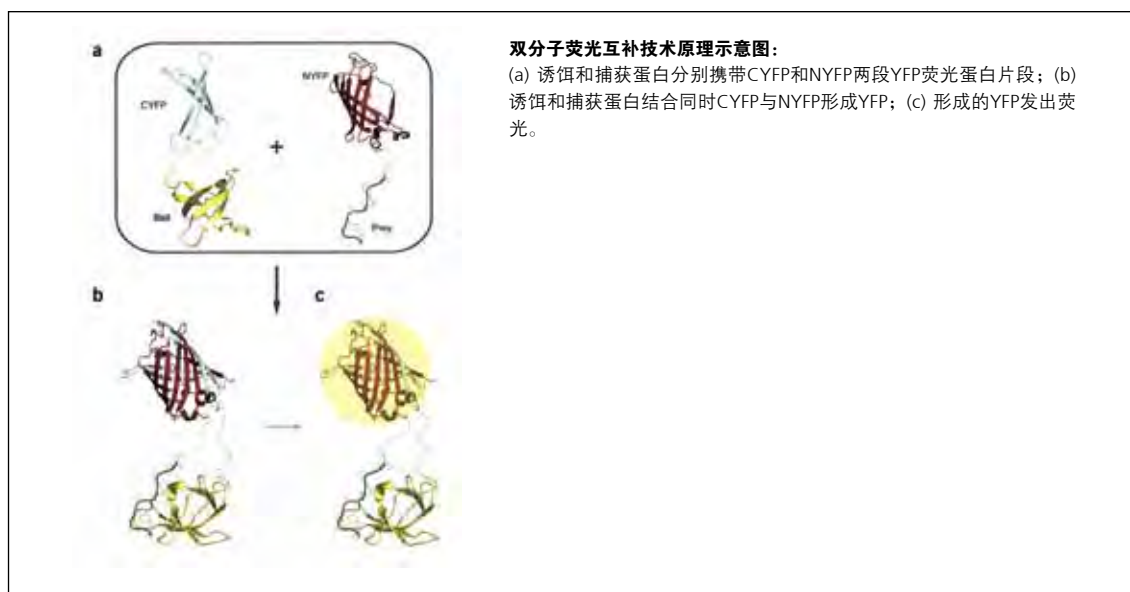


图释: 流式细胞仪 FACSria检测脊髓灰质炎病毒 (PV1) 10倍感染BGM-PV细胞, 8小时后上机检测。A~C病毒浓度分别为MOI 0.4~0.004, D为阴性对照。

第三节 双分子荧光互补技术 (BiFC)

2.3 双分子荧光互补技术 (Bimolecular Fluorescence Complementation, BiFC)

双分子荧光互补技术是将荧光报告蛋白按照规则分成没有荧光的两段，分别与诱饵蛋白和捕获蛋白融合，只有在诱饵蛋白和捕获蛋白发生相互作用的情况下，两段不完整的荧光报告蛋白才会形成完整的报告蛋白，发出荧光。活细胞收集后，在流式细胞仪中的检测是实时进行的，只要细胞中有荧光产生就会被捕捉到信号，因此，不论是亲和力和较弱的结合还是暂时性的结合都不会被遗漏。



(1) BiFC 检测的特点：

- 活细胞分析；
- 可以用于研究 2 种或 2 种以上的启动子调控之下的蛋白质相互作用；
- 具有很高的信噪比，弱蛋白相互作用也可以检测到 (>7nm)。

(2) 可用于 BiFC 的荧光蛋白：

- GFP、BFP、CFP、YFP，生理条件可用的黄色的 Venus 和 citrine，青色的 cerulean；
- 红色系统：mRFP2Q66T、mCherry；
- Venus (EYFP 的变体) 是目前用于 BiFC 分析最多的荧光蛋白，因为其荧光强且背景敏感度降低，是 BiFC 分析理想的荧光蛋白。

常见的用于双分子荧光互补技术的荧光蛋白

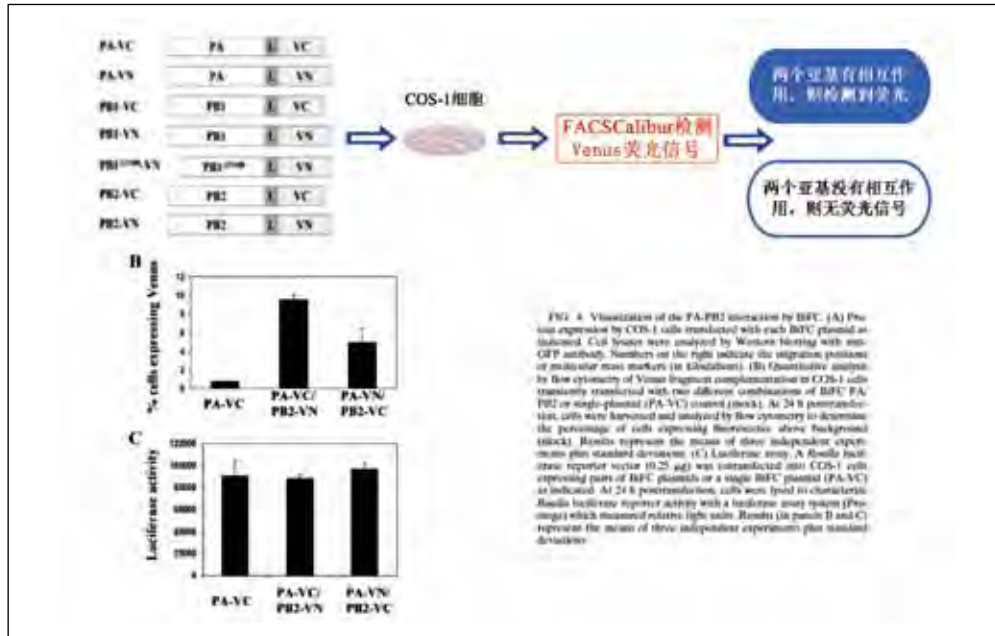
Protein	Fluorescent protein fragment			Filters ^a			
	Nomenclature	Dissection point		Excitation laser (nm)	Excitation filter (nm)	Dichromatic mirror (nm)	Suppression filter (nm)
Yellow fluorescent protein (YFP) ⁶	NYFP	(1-154)	(1-172)	Argon (488)	500/20	515	535/30
	CYFP	(155-238)	(173-238)				
Red fluorescent protein (mRFP1-Q66T) ³⁴	mRFP1-Q66T-N	(1-168)		He-Ne (594)	560/55	595	630/60
	mRFP1-Q66T-C	(168-225)					
Green fluorescent protein (GFP) ⁶	NGFP	(1-157)		Argon (488)	480/20	505	520/20
	CGFP	(158-238)					
Cyan fluorescent protein (CFP) ⁶	NCFP	(1-157)		Diode (440)	436/20	455	480/40
	CCFP	(158-238)					
Venus fluorescent protein (VFP) ³⁵	NVFP	(1-154)	(1-172)	Argon (488)	495/35	515	545/40
	CVFP	(155-238)	(173-238)				

^aOther filters that capture similar wavelengths could also be used.

2.3.1 BiFC 研究复合体中亚基间的相互作用

摘自: Detection and Characterization of Influenza A Virus PA-PB2 Interaction through a Bimolecular Fluorescence Complementation Assay

Joseph N. Hemerka, Dan Wang, et al. Journal of Virology. 2009. Vol. 83: 3944–3955.

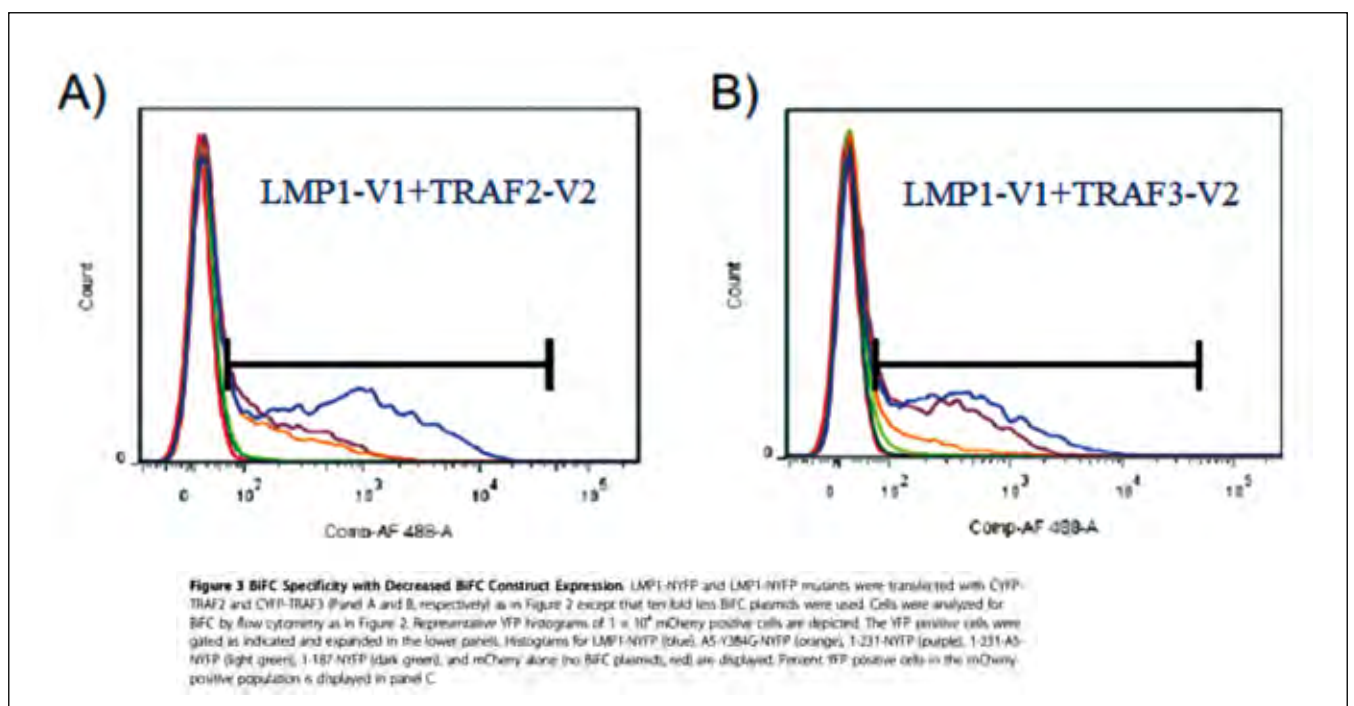


图释: 流式细胞仪 FACSCalibur 检测流感病毒复合体中亚基 PA-PB2 间的相互作用。(B) 流式检测同时转入 PA/PB2 的 COS-1 细胞及单转入 PA-VC 的细胞的 Venus 荧光信号, 显示转入 24 小时后的荧光强度。(C) 萤火虫荧光蛋白酶显示, 转入单或双质粒的细胞, 萤火虫荧光蛋白酶活性一致。

2.3.2 BiFC 研究信号传导通路中蛋白质间的相互作用

摘自: Characterization of the latent membrane protein 1 signaling complex of Epstein-Barr virus in the membrane of mammalian cells with bimolecular fluorescence complementation

Pooja Talaty, Amanda Emery, et al. Virology Journal. 2011. Vol. 8: 414.



图释: 流式细胞仪 FACSLSR II 检测 BiFC 信号。LMP1-NYFP 和 LMP1-NYFP 突变体分别与 CYFP-TRAF2、CYFP-TRAF3 转入细胞内, 检测其相互作用。曲线蓝色部分为出现 YFP 的荧光阳性表达, 表明 LMP1 与 CYFP、CYFP 均存在相互作用。

第三章 流式在分子生物学研究的文献摘选

Exploiting a natural conformational switch to engineer an interleukin-2 'superkine'

探索通过构想改变构建“超能”白介素-2

Key words: IL-2, CD25, IL-2R β , IL-2R γ

关键词: 白介素-2, CD25, 白介素-2 受体 β , 白介素-2 受体 γ

流式机型: Accuri C6 (BD Biosciences)

相关试剂: SAV-PE, PEconjugated anti-human CD25, Alexa647-conjugated anti-STAT5, pY694 (BD Biosciences)

细胞因子 IL-2 作为 T 细胞, NK 细胞等细胞的生长因子, 对 AIDS, 肿瘤等免疫缺陷性疾病的治疗有潜在的应用价值。IL-2 促进成熟 T 细胞的增殖依赖于细胞表达白介素-2 受体 IL-2R α (CD25), IL-2R β , IL-2R γ 。由于幼稚 T 细胞不表达 CD25, 因而 IL-2 与 IL-2R β , IL-2R γ 的结合能力很弱, 不足以行使促进 T 细胞增殖的作用。作者通过对 IL-2 的蛋白序列做了改造, 构建出“超能 IL-2”, “超能 IL-2”在 CD25 缺失的条件下也能与 IL-2R β , IL-2R γ 稳定结合, 促进 T 细胞增殖, 实现免疫治疗的目的。

作者用酵母表面展示的技术, 在酵母细胞表面表达野生型及各种突变型 IL-2, 通过与生物素标记的 IL-2R β , IL-2R γ 孵育, 以及 SAV-PE 偶联的亲合素处理, 通过流式细胞仪检测结合在酵母表面的 PE 荧光强度, 从而判断筛选在 CD25 缺失的状态下与 IL-2R β , IL-2R γ 相互作用最强的 IL-2 突变形式。

A regulatory role for miRNA-33* in controlling lipid metabolism gene expression

miRNA-33* 对脂代谢过程中基因表达的调节作用

Key words: miR-33, microRNA, lipid metabolism, cholesterol

关键词: miR-33, 小 RNA, 脂代谢, 胆固醇

流式机型: Accuri C6 (BD Biosciences)

相关试剂: GFP 表达质粒

已知 miR-33 在脂代谢过程中起调节作用, 作者设计实验验证 miR-33* 是否也参与脂代谢的调控。通过在 Huh7 肝脏细胞系中外源性表达前体 miR-33, 作者发现外源性表达前体 miR-33 抑制在胆固醇和脂肪代谢过程中关键酶的表达, 包括 ABCA1, NPC1, CROT, CPT1a 等, 同时抑制在脂代谢过程中起重要作用的转录因子的表达。并且抑制 miR-33* 可以阻止过表达前体 miR-33 所致的改变, 提示 miR-33* 也参与了脂代谢的调节。

作者通过在外源性表达前体 miR33 的同时表达 GFP, 利用 GFP 作为报告基因, 用流式细胞仪分析转染阳性的细胞比例, 确定转染阳性的细胞比例达到 90% 以上。

Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples

临床样本中 DNA 甲基化的数字化定量方法

Key words: digital quantification, DNA methylation

关键词: 中文 数字化定量, DNA 甲基化

流式机型: LSR II flow cytometer (BD Biosciences)

相关试剂: 荧光探针

原文作者通过结合乳液微滴中的 PCR 与后续的探针杂交, 流式检测的方法, 检测了结肠肿瘤患者的 vimentin 基因甲基化胞嘧啶的水平。

作者抽提了不同 Duke's 分期的结肠癌患者基因组 DNA, 在重亚硫酸盐的作用下将未被甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶, 设计针对 vimentin 基因的引物, PCR 扩增, 继而用相应的荧光标记的探针与 PCR 产物杂交, 利用流式细胞仪检测结合探针的信号强度, 反映 vimentin 基因的甲基化水平。作者发现, 该方法检测的 vimentin 基因甲基化水平的高低与 Duke's 分期的严重程度呈正相关。



BD中国

上海总部

中国上海市延安中路1228号
静安嘉里中心三座9楼, 10楼
电话: 021-3210 4610
传真: 021-5292 5191
邮编: 200040

北京办公室

北京市朝阳区建国路77号
华贸中心3号写字楼28层02B, 03, 05
电话: 010-58139000
传真: 010-58139193
邮编: 100025

广州办公室

广州市东风中路410-412号
时代地产中心1208室
电话: 020-8348 6363
传真: 020-8348 6377
邮编: 510030

杭州办公室

杭州市下城区庆春路136号
广利大厦709室
电话: 0571-85271413 85271415
传真: 0571-85271414
邮编: 310003

南京办公室

南京市白下区汉中路1号
国际金融中心41楼ABC单元
电话: 025-83315518
传真: 025-83313404
邮编: 210005