



上海伯豪生物技术有限公司
SHANGHAI BIOTECHNOLOGY CORPORATION

伯豪生物高通量核酸和蛋白检测服务

服务科技创新，护航人类健康！



CONTENT

目录

一、技术概览.....	1
二、基于 Luminex 200™ 的多重核酸定量分析解决方案.....	3
三、基于 Luminex 200™ 的蛋白多因子检测解决方案.....	7

上海伯豪生物技术有限公司技术服务一览

基因组层次研究服务

- ✓ SNP 芯片服务
- ✓ CNV 芯片服务
- ✓ *de novo* 测序服务
- ✓ 全基因组重测序服务
- ✓ 全外显子捕获测序服务
- ✓ DNA 序列捕获重测序服务
- ✓ 微量样本全基因组测序服务
- ✓ 微量样本外显子捕获测序服务
- ✓ 16S rDNA 分子生态测序服务
- ✓ 宏基因组测序服务

表观遗传学层次研究服务

- ✓ DNA 甲基化芯片服务
- ✓ 染色质免疫沉淀测序 (ChIP-Seq)
- ✓ 甲基化 DNA 免疫共沉淀测序 (MeDIP-Seq)
- ✓ 全基因组 Bisulfite 甲基化测序

基因分型及定量服务

- ✓ Taqman 基因分型及定量服务
- ✓ Fluidigm 基因分型及定量服务
- ✓ Panomics QGP 多基因表达定量服务
- ✓ 焦磷酸甲基化检测服务

转录组层次研究服务

- ✓ 表达谱芯片服务
- ✓ lncRNA 芯片服务
- ✓ ceRNA 芯片服务
- ✓ circRNA 芯片服务
- ✓ miRNA 芯片服务
- ✓ 全转录组测序
- ✓ mRNA 测序
- ✓ small RNA 测序服务
- ✓ 环状 RNA 测序服务
- ✓ RIP-Seq 服务
- ✓ 单细胞及微量样本转录组测序服务
- ✓ 宏转录组测序服务

蛋白层次研究服务

- ✓ Milliplex xMAP 细胞因子检测服务
- ✓ Panomics 细胞因子检测服务
- ✓ FullMoon 蛋白芯片服务

基因编辑及功能操作服务

- ✓ CRISPR-Cas9 基因编辑服务
- ✓ 高通量 siRNA 筛选服务



01

技术概览

上海伯豪生物技术有限公司于 2017 年 3 月引进 Luminex 200™ 液相悬浮芯片平台，该平台有机整合了荧光编码微球、双激光检测、应用流体学、最新的高速数字信号和计算机运算法则等多项技术，实现了真正的“高通量”检测。基于抗原 - 抗体免疫反应和碱基互补原理成就了其在蛋白和核酸检测中无与伦比的检测特异性和灵敏度，Luminex 200™ 独有的 xPONENT 操作软件系统通过 FDA-CFR21 认证，被誉为“真正的临床应用型生物芯片”，可广泛应用于抗原 - 抗体（蛋白生物标志物）免疫分析、核酸研究、酶 - 底物的酶学研究，以及受体 - 配体识别分析等研究领域。得到各权威机构和医学界高度认可，是临床诊断领域以及生命科学研究中的一大热点。



图 1. Luminex 200™ 仪器的组成

Luminex[®] 多重检测技术的核心即 xMAP 专利的编码微球系统和双激光流式检测技术。xMAP(flexible Multi-Analyte Profiling) 技术又称流式荧光技术，又称液相悬浮芯片技术，该技术的核心是将直径 6.5 μm 的微球 (聚苯乙烯微球或超顺磁微球) 用荧光染色的方法进行编码，通过调节红色和红外两种荧光染料的不同配比获得可达 100 种具有不同特征荧光光谱的微球，然后将每种编码微球共价交联上针对特定检测物的抗原、抗体或核酸探针等捕获分子，当这些预包被的微球与待检样本杂交孵育时，目标物被微球捕获后，被用生物素标记的特异性检测探针或抗体混合物识别，加入链霉亲和素-PE 荧光素底物 (SAPE) 后发光，并用 Luminex[®] 仪器进行信号读取，通过两束激光分别识别编码微球和检测微球上报告分子的荧光强度，实现在 96 孔板的每一个单孔中检测多个指标的研究。

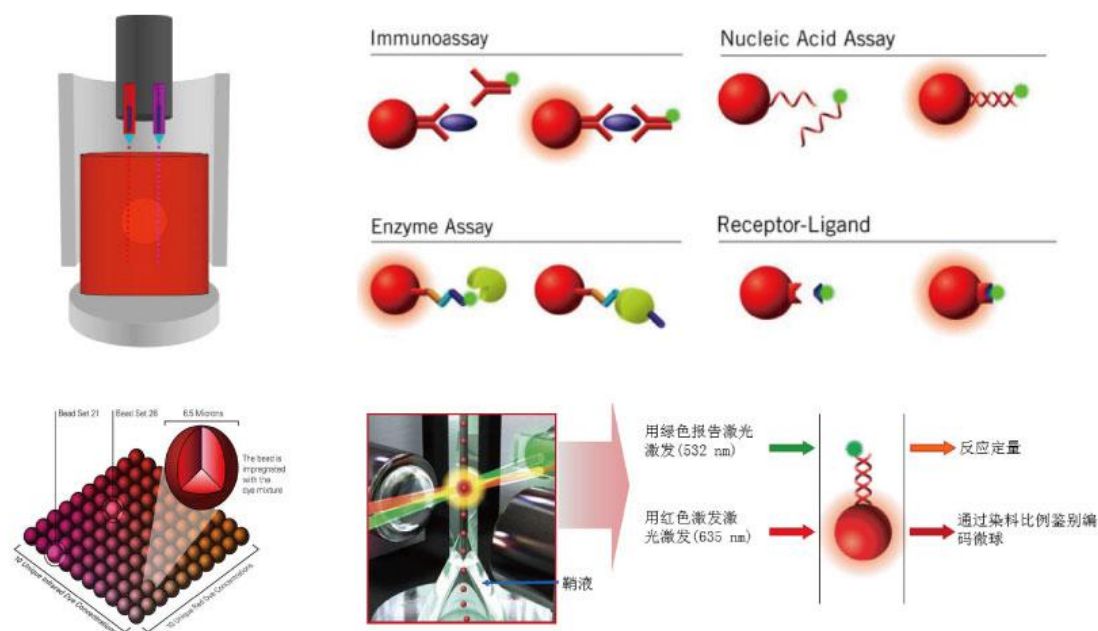


图 2. xMAP 技术的原理

技术特点

测定范围广	既能检测蛋白，又能检测核酸
检测方便	无需抽提核酸或蛋白
多重检测	单孔最多可检测 100 个指标
微量反应体系	仅需 10–50ul 的样本
高灵敏度	精密的光学设计提升检测灵敏度，区别衡量样本微小区别；
高通量检测	96 孔板，DNA 检测，88 个样本 / 板，RNA 检测，94 个样本 / 板，蛋白检测，76–80 个样本 / 板
高速度	每块 96 孔板结果的读取时间 $\leq 45\text{min}$ ；
低成本	试剂用量少，能有效降低成本
组合灵活	可个性化组合检测指标成为定制的试剂盒



02

基于 Luminex 200™ 的多重核酸定量
分析解决方案

QuantiGene® 2.0 高通量核酸定量研究系列产品是世界著名基因芯片制造商 Affymetrix 公司旗下 Panomics 的畅销产品。

QuantiGene® Plex 除了利用 xMAP 技术外，还整合了西门子独家授权并经过临床验证的 branched DNA(bDNA)技术，该技术是一种核酸探针信号放大检测技术，通过精确设计的探针捕获特定靶标，经过杂交、多层级信号放大、酶促化学发光，从而实现对待测核酸的定量检测。这种技术已经广泛应用于临床检测，包括通过 510(k) 认证的 HIV、HBV 以及 HCV 的病毒载量检测。

QuantiGene® Plex 能够直接定量 mRNA、miRNA、ncRNA、融合转录本和 DNA 拷贝数变异，无需 RNA 抽提、无需逆转录、无需 PCR，并且能在单个反应中最多定量 80 个基因，是验证表达谱芯片和二代测序数据、DNA 拷贝数检测、临床 FFPE 样本和血液样本的多基因检测、信号传导通路检测以及转化研究中生物标志物与药物靶点验证研究等的理想工具。

特点优势

- ★多重定量: DNA 检测, 88 个样本/板, RNA 检测, 94 个样本/板, 单孔同时定量检测多达 80 个目标基因;
- ★可测定不同类型的样本, 对降解样本检测效果高于 qPCR: 培养细胞、血液或组织 (新鲜、冰冻或福尔马林固定、石蜡包埋 FFPE 等);
- ★高特异性: 每个目标使用多个探针, 以核酸杂交为基础产生信号;
- ★无需抽提纯化 RNA 或 DNA, 仅需少量固体或液体样本;
- ★无需反转录 RNA, 无需 PCR 扩增, 避免引入误差;
- ★简化的工作流程。

方法比较

	Real-Time PCR	QGP
通量	低 (单孔 1 个基因)	高 (单孔 80 个基因)
样本类型	纯化后 DNA 或 RNA	培养细胞、血液或组织 (新鲜、冰冻或福尔马林固定、石蜡包埋 FFPE 等), 无需抽提纯化
样本需求量	多	少
PCR 扩增	有	无 (避免酶带入的 Bias)
技术原理	模板放大、Ct 值比较	液相探针杂交、信号放大与收集
实验流程	精细、工作量大、人为误差大、耗时长	简化、工作量少、人为误差小、耗时短
成本	较高	较低

实验流程

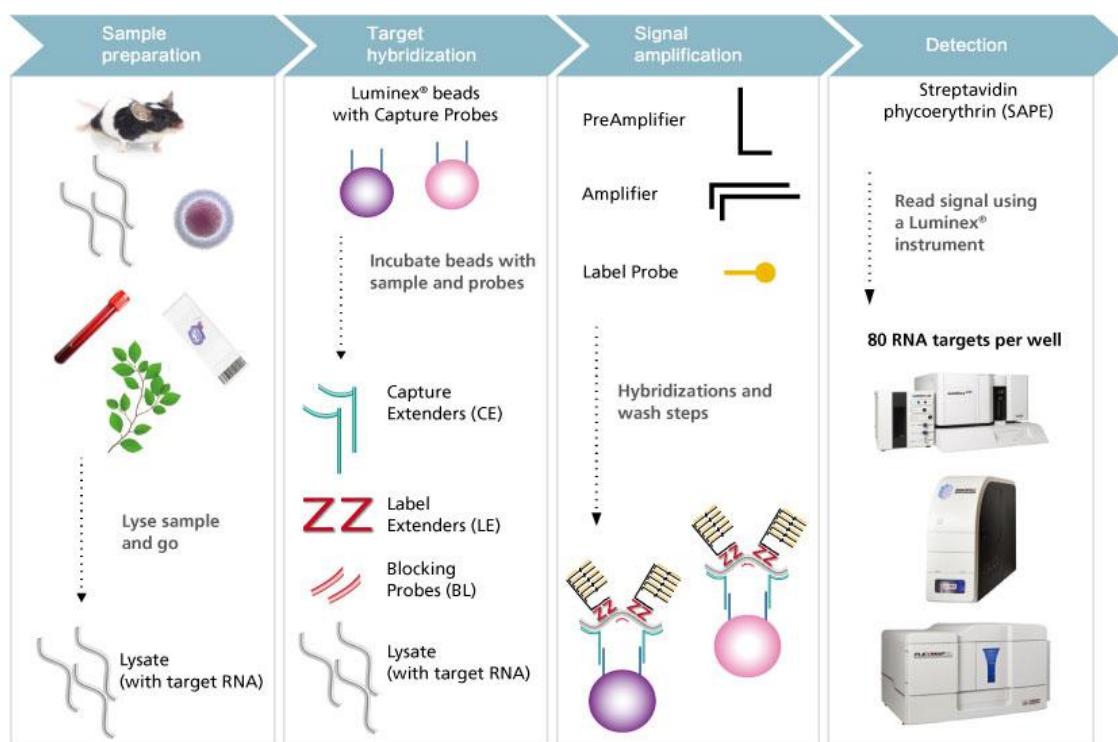


图 3. Quantigene[®] Plex 多重定量实验流程

服务推荐

- ★ 单基因表达精确定量服务: Quantigene Singleplex Gene Expression Assay & Singleplex HT Assay
- ★ 多重基因表达定量服务: Quantigene Plex Gene Expression Assay
- ★ DNA 拷贝数测定服务: Quantigene Plex DNA Assay

预设计探针组

Affymetrix 已经开发了庞大的已验证基因的探针库, 超过 1600 种探针组, 包括超过 15000 个基因。预设计探针组覆盖了广泛的物种, 包括: 人类、小鼠、大鼠、犬类、猴、猪、大豆和玉米等诸多物种, 任何现有基因的组合都可以整合设计新的探针组, 了解最新的探针组和基因信息, 请联系我们。

定制探针组

Affymetrix 可针对任何基因以及任何物种提供定制探针服务。定制分析组合为 3-80 plex (RNA) 和 3-33 plex (DNA)。客户只需提供基因列表、参考序列 ID 或者 DNA 序列, 即可在两周内完成设计。



应用案例

1、mRNA 靶标验证

使用 Affymetrix GeneChip® Arrays 对炎症通路激活的特征基因表达进行鉴定。继而通过使用 QuantiGene Plex (QGP) 和 qPCR 分析对经 LPS 处理的小鼠样本进行测试以进一步验证该特征。收集 52 只处理后和未处理的小鼠脾脏，制备组织裂解物进行 QGP 分析，同时纯化 RNA 进行 qPCR 测试。处理后，QGP 和 qPCR 分析均显示出类似的上调或下调模式。但是相比于 qPCR，QGP 分析可提供更准确和精密的结果。在本研究中，必须处理 14 块 qPCR 反应板才能获得一块 QGP 反应板相当的信息。Ebsworth K. Gene expression analysis by Quantigene Plex: validation and applications. Planet xMAP USA; 2007 March 12-14; Laguna Hills, CA.

优点：通过测试简单的裂解物，QGP 分析无需 qPCR 所需的耗时较长的 RNA 纯化以及逆转录步骤，从而可避免昂贵的开支和误差。QGP 分析具有高稳定性、高准确性及高精密度的特点，而多重定量分析又可提高效率，并节省样本。

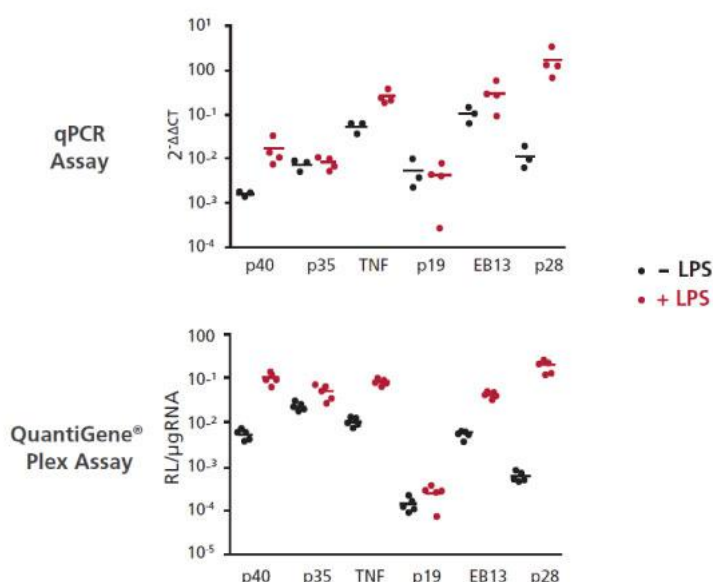


图 4. QGP 和 qPCR 的炎症相关基因验证的结果比较

2、验证 FFPE 样本的表达谱基因芯片标记结果

使用 GeneChip® Human Exon 1.0 ST 芯片，筛选 19 个宫颈鳞状细胞癌 (SCC) 和 9 个恶性腺瘤 (AC) FFPE 样本以找出区分 SCC 和 AC 的分子标记。FFPE 组织块已存储了平均 12 年 (10-16 年) 的时间。在该基因芯片的数据进行分析之后，设计了 QuantiGene 26-Plex 基因检测试剂盒，并成功验证了 19 个宫颈鳞状细胞癌和 9 个宫颈恶性腺瘤 FFPE 样本。Hall, et al. British Journal of Cancer 104:971-981 (2011).

优点：已知福尔马林可以对 RNA 进行降解和化学修饰，这可能是使用 DNA 聚合酶进行模板放大步骤的分析方法中会产生问题。QuantiGene Plex 分析 FFPE 样本不存在该问题，因为分析基于杂交原理，无需进行 RNA 纯化或放大。

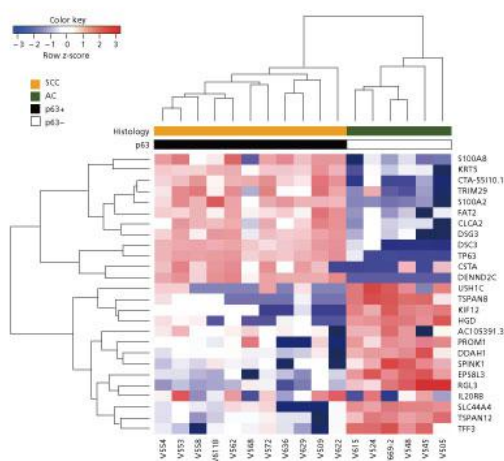


图 5. FFPE 样本的癌症基因表达分析

3、DNA 断裂点分析

QuantiGene Plex DNA Copy Number Assay 用于检测 SKBR3 乳腺癌细胞和对照细胞系（正常皮肤纤维母细胞和 MDA-231 细胞）染色体 17 上 Her2 和相邻基因的 DNA 断裂点，以及染色体 1、5 和 8 上的对照基因。正如预期的一样，检测到了 Her2 拷贝数 7 倍放大（标准比值为 6.5）。QuantiGene Plex 结果与 bDNA FISH 分析一致，其中 SKBR3 细胞中可以检测到 14 个拷贝，而在 HeLa 细胞中可以检测到 2 个拷贝，这与预期一致，同样是 7 倍放大。对 Her2 的两个相邻基因 PNMT6 和 GRB7，也可以检测到 7-8 倍的放大，而对照基因则检测到预期的单倍拷贝数。

优点：QuantiGene Plex DNA Copy Number Assay 可以检测到给定染色体上的单拷贝 DNA 变化，而进一步分析 DNA 断点变化，在 96 孔板上，该分析可以在一个加样孔中同时定量检测最多 33 个区域。

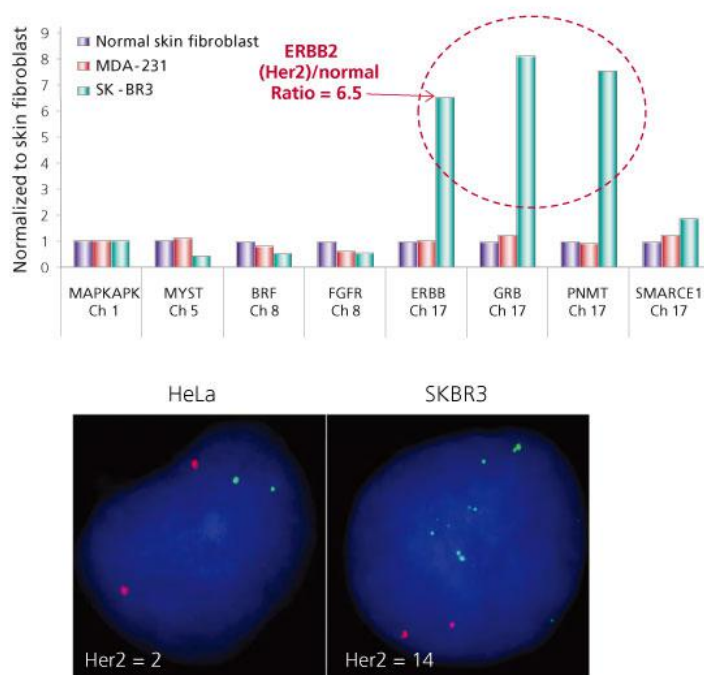


图 6. A. DNA 拷贝数分析染色体断裂点；B. bDNA FISH 验证

03

基于 Luminex 200™ 的蛋白多因子
检测解决方案

对于蛋白层面的多因子检测服务，采用 Merck Millipore 公司的 Milliplex 高通量蛋白因子检测技术，并与默克建立了“Milliplex 蛋白多因子检测服务合作实验室”。该技术又被称为“高通量 ELISA”，具有很高的临床应用价值，能够将基础研究获得的生物标志物快速实现向临床医学的转化。研究显示，Milliplex 高通量蛋白检测技术和传统的 ELISA 方法在检测结果中具有高度一致性，保证了该技术在临床检测中的准确性和可靠性。

Milliplex 技术是免疫研究、肿瘤研究、神经研究、内分泌和代谢研究、干细胞研究、心血管疾病研究、毒理和毒性评估研究、信号通路研究等的重要工具。

特点优势

多重定量	96 孔板，78 个样本 / 板，单孔同时定量检测多达 50 种因子
可测定不同类型的样本	细胞、组织、血浆、血清、细胞培养上清、泪液、唾液等其他体液
微量样本	无需抽提纯化蛋白，仅需 25–50 μ L 样本，特别适合稀有样本
选择灵活	提供 Pre-mix 试剂或自由挑选因子组成一个自选试剂盒的两种选择
All-in-one-box	一个试剂盒中提供了实验所需要的所有试剂
相比于传统的 ELISA 方法，有明显的优势，如样本用量少、通量高、耗时短等	

Serum/Plasma**Cell culture****Tissue Extract****Synovial fluid****Urine****CSF****Tear****Saliva**

图 7. 生物标志物检测的样本来源

方法比较

(以 40 个样本和 10 个蛋白因子的检测为例)

	ELISA	Milliplex
通量	低，需要做 10 块板	高，只要一块 96 孔板
定量检测	是	是
样本需求量	4mL	50 μ L
内部质控	无	有
检测时间	3 hours	10 hours
动力学范围	10–2500 pg/ml	1–10,000 pg/ml
检测下限	~1 pg/ml	~1 pg/ml
实验流程	工作量大、耗时长	简化、工作量少、耗时短
成本	较高	较低

实验流程

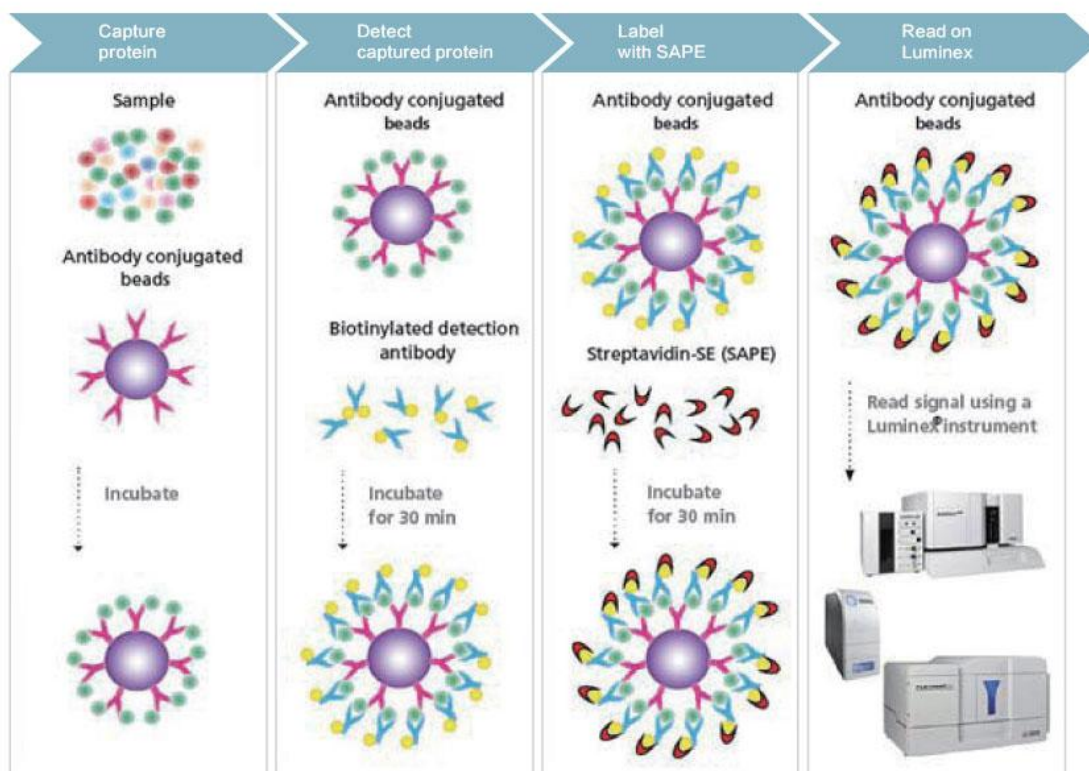
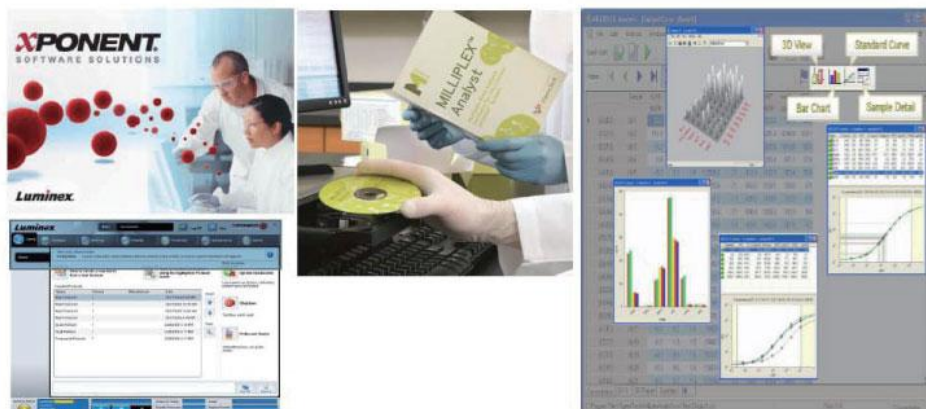


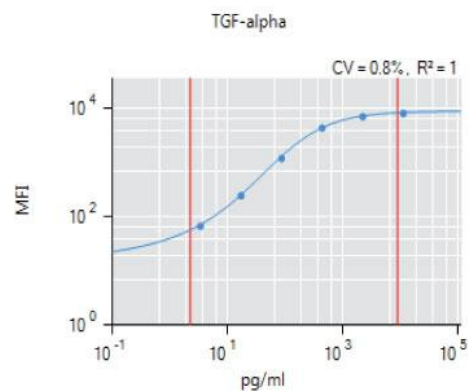
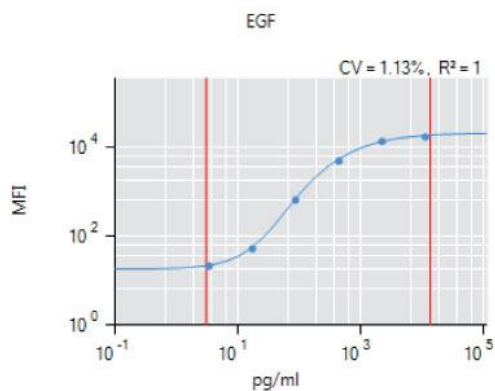
图 8. 多因子检测的实验流程



数据分析



Location	Analyte Sample	EGF	IFNgamma	IL-10	IL-12(p40)	IL-12(p70)	IL-13	IL-1ra	IL-1alpha
		pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
1G2	QC1	169.97	327.24	133.8	135.4	163.47	399.26	122.53	179.55
1A3	QC2	587.29	815.67	498.47	481.22	488.67	1136	331.45	565.48
1C3	1	54.17	3.3	4.32	<2.20 ↓	6.68	7.69	1187	42.05
1D3	2	52.19	3.14	4.94	3.63	6.26	7.4	1177	39.52
1E3	3	49.62	2.81	4.48	<2.20 ↓	6.26	6.26	964.31	31.95
1F3	4	54.17	3.47	4.01	2.59	6.26	9.12	1107	37.08
1G3	5	70.46	4.49	7.81	8.07	8.79	9.7	2772	271.9
1H3	6	10.58	13.56	6.21	2.59	12.25	10.55	900.13	74.23
1A4	7	8.49	11.33	4.32	<2.20 ↓	8.37	6.83	1001	64.62
1B4	8	3.72	13.93	5.26	<2.20 ↓	8.79	8.55	628.04	34.25
1C4	9	8.49	15.05	5.57	2.59	10.08	7.98	1193	53.18
1D4	10	49.09	3.8	4.63	2.59	7.1	7.69	3771	311.08
1E4	11	12.43	2.18	3.71	<2.20 ↓	7.1	5.69	<2.66 ↓	<2.52 ↓



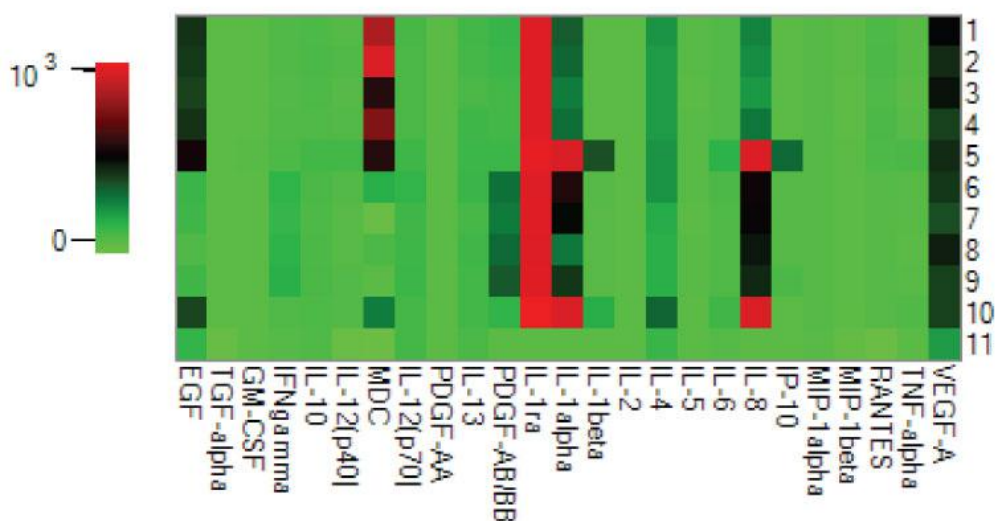


图 9. MILLIPLEX® Analyst 5.1 数据分析结果展示

服务推荐

★多因子定量检测服务：Merck Millipore-MILLIPLEX® MAP Assays

Milliplex 提供超过 8 个种属 1500 个指标的选择，涵盖肿瘤、免疫疾病、代谢疾病、心血管疾病、神经退行性疾病、肾毒性、干细胞、信号转导通路研究等十几个热门研究领域。了解最新的 Panel 信息，可访问 www.merckmillipore.com 或者联系我们。

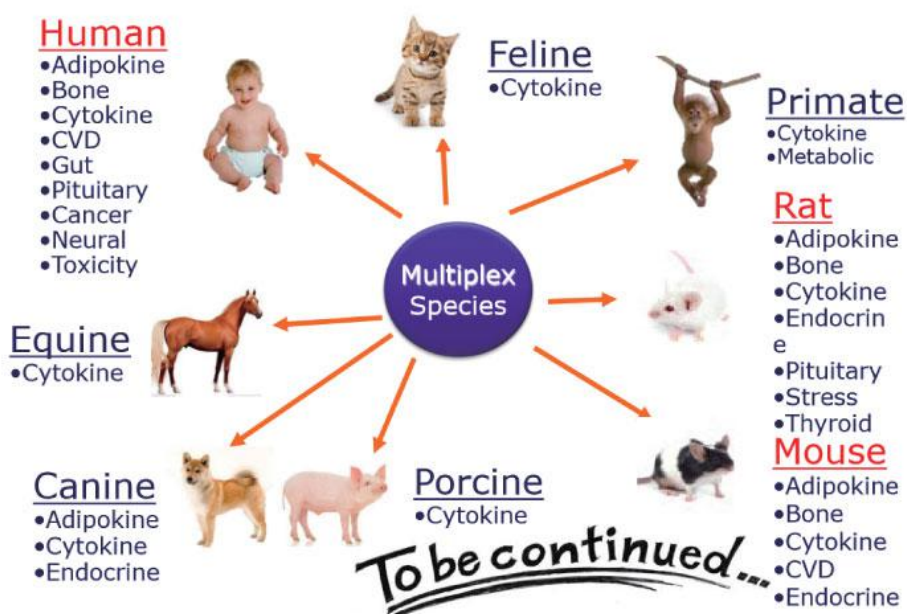
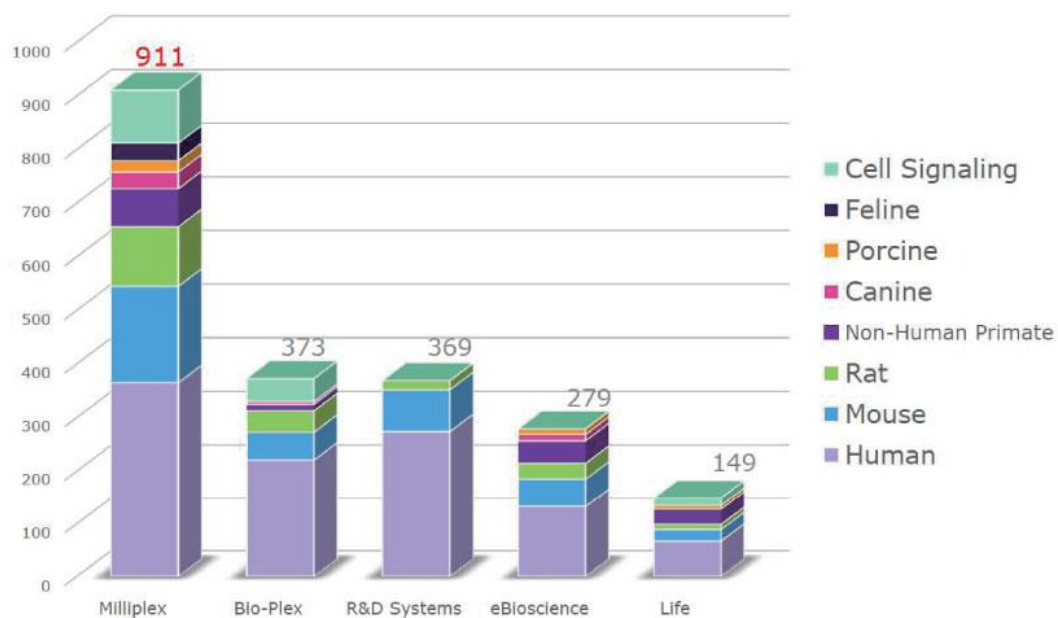


图 10. 多因子检测物种及疾病

默克 Milliplex 试剂盒有最多物种选择

	Merck Milliplex®	Bio-Rad Bio-Plex®	eBioscience Procartaplex®	R&D Systems Luminex®	Life Tech Noves®
Human	+	+	+	+	+
Mouse	+	+	+	+	+
Rat	+	+	+	+	+
NHP	+	+	+		+
Canine	+	+	+		
Porcine	+		+		+
Feline	+				
Equine	+				

默克 Milliplex 试剂盒有最全指标选择



应用案例

1、Milliplex 多因子检测平台在卵巢癌早期诊断中的应用

研究背景和方法：

卵巢癌的早期诊断能够显著降低疾病的死亡率，本研究选 362 例健康对照和 156 例确诊卵巢癌样本，分为检测组和验证组，使用 Milliplex 技术检测血清样本中 6 种蛋白因子 Leptin、Prolactin、OPN、IGF- II、MIF、CA-125 的表达水平。

结果和意义：

- 1、非侵入性方法（血清）对肿瘤进行早期诊断；
- 2、多种因子联合检测提高了检测特异性；
- 3、Milliplex 和 ELISA 在不同因子的检测上数据具有高度一致性，反映出相同的趋势；
- 4、6 种标志物联合检测的诊断价值显著高于单个因子的检测效果。

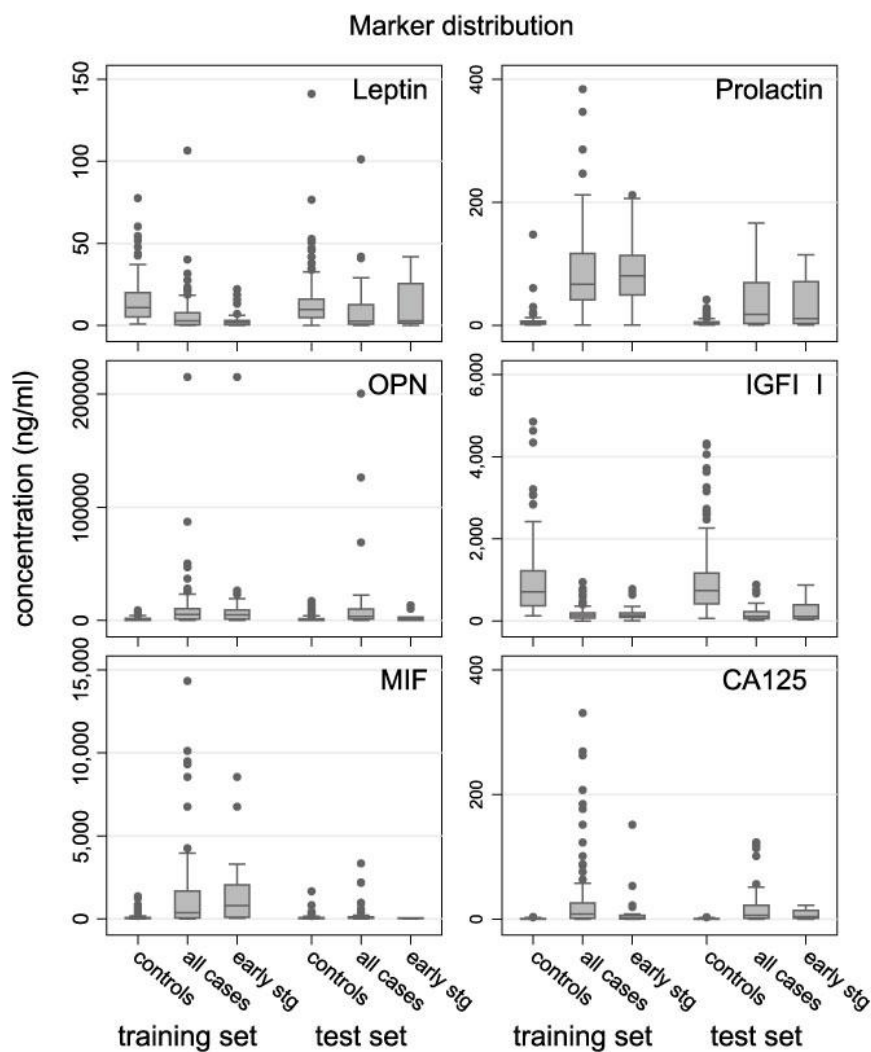


图 11.6 种血清标志物的表达水平

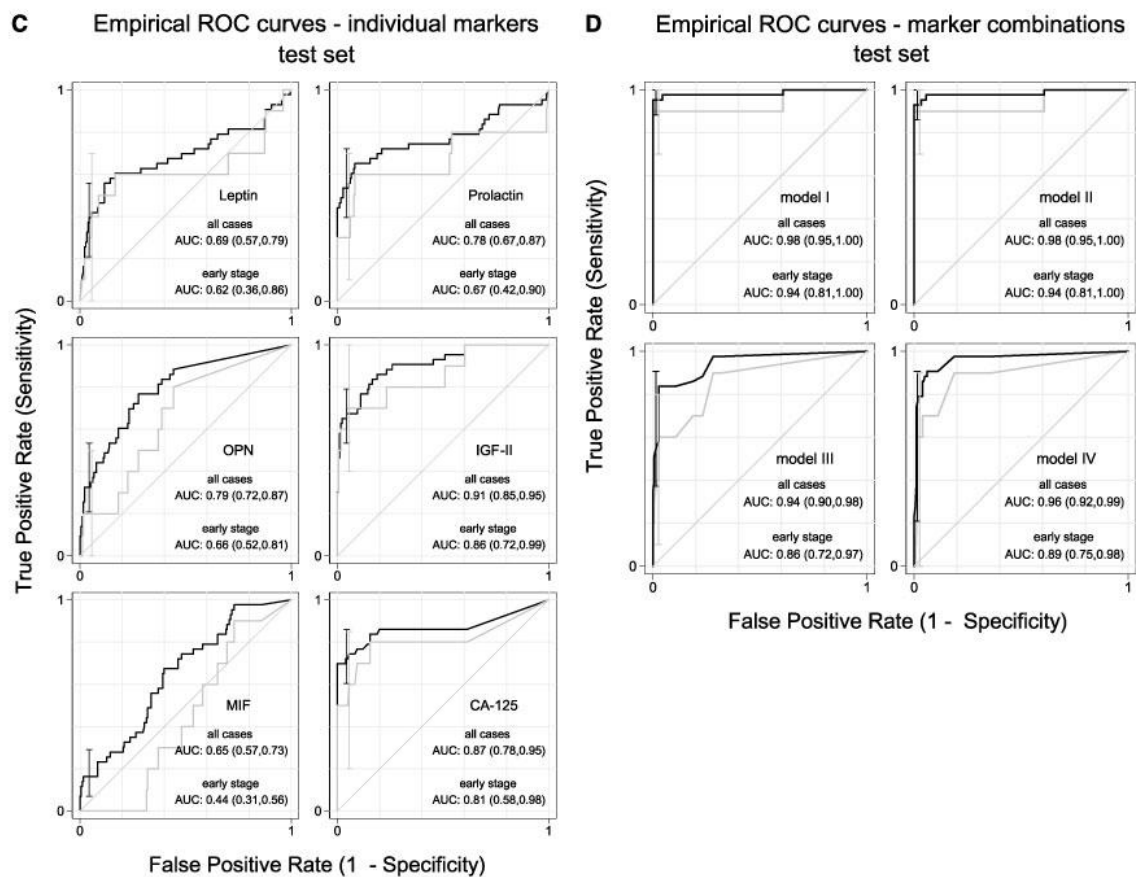


图 12.6 种标志物的 ROC 曲线（联合检测和单独检测比较）

原文出处: Irene V, Ziding F, Gary L, et al. Diagnostic Markers for Early Detection of Ovarian Cancer. Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2008, 14(4): 1065-1072.

2、G-CSF 和 G-CSFR 在胃肠癌中高表达促进肿瘤细胞增殖和迁移

研究背景和方法:

G-CSF 是刺激骨髓干细胞成熟、增殖和迁移的重要细胞因子，尽管是已知的生长因子，但 G-CSF 对实体瘤的影响尚未得到很好的验证，G-CSFR 由一些肿瘤表达，本研究的目的是在细胞水平通过 RT-PCR、流式细胞仪、信号通路因子检测、增殖和迁移实验，研究 G-CSF 和 G-CSFR 在胃肠癌肿瘤细胞中的表达以及高表达对肿瘤细胞增殖、迁移和信号的影响。

结果和意义:

1、G-CSFR 在 90% 的人胃肠肿瘤细胞中高表达，G-CSF 在基质成纤维细胞和肿瘤细胞中高表达。高表达 G-CSF 的肿瘤细胞增加增殖和迁移能力，肿瘤细胞的亚群表达“干细胞样”（stem-like）标志物，这种影响均依赖 ERK1/2 和 RSK1 磷酸化作用。

2、G-CSF/R axis 促进胃肠肿瘤的形成，是潜在的重要的肿瘤治疗靶标。

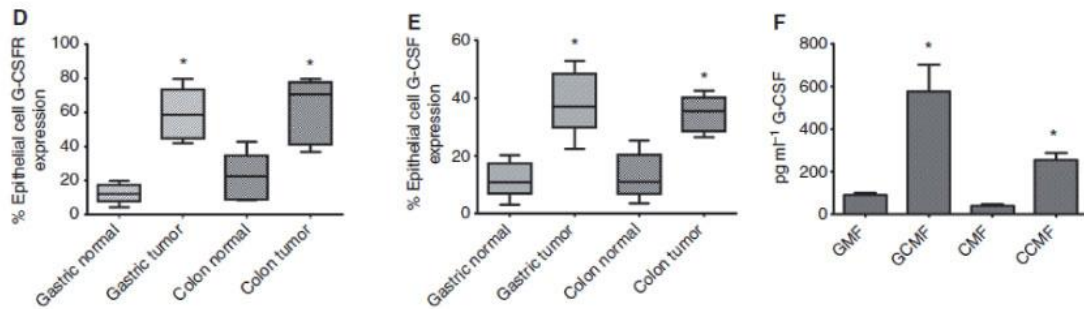


图 13. G-CSF 和 G-CSFR 在人胃肠肿瘤细胞中高表达

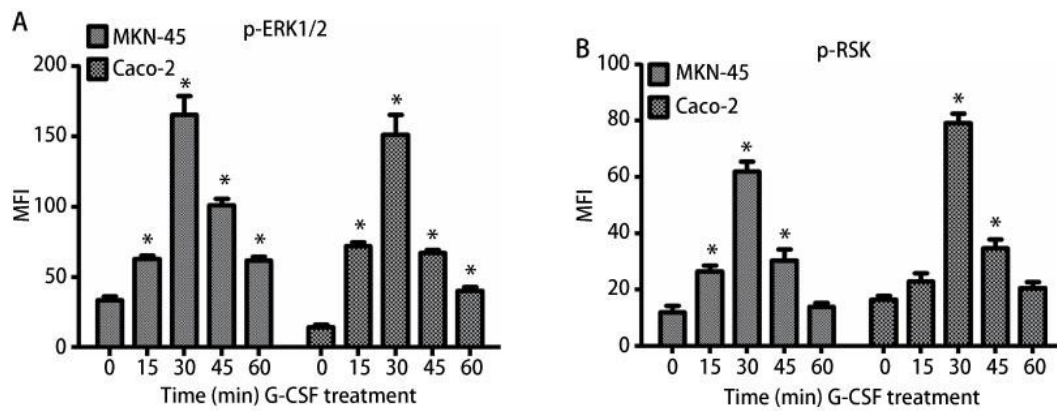


图 14. G-CSF 诱导 ERK1/2 和 RSK1 信号通路

原文出处: K T Morris, H Khan, A Ahmad, L L Weston, R A Nofchissey, I V Pinchuk and E J Beswick. G-CSF and G-CSFR are highly expressed in human gastric and colon cancers and promote carcinoma cell proliferation and migration. British Journal of Cancer (2014) 110, 1211 – 1220.

3、在血浆水平发现 CML 患者的新型生物标志物 TGF- α 和 L-6

研究背景和方法:

取伊马替尼治疗的 CML 患者和健康对照组骨髓和外周血血浆, 采用 Milliplex 试剂盒 (HCYTOMAG-60k-PX39) 和 Luminex 200 仪器, 检测 39 个细胞因子。分析健康组和 CML 患者的血浆炎症因子表达差异, 以及差异和治疗效果的关系。

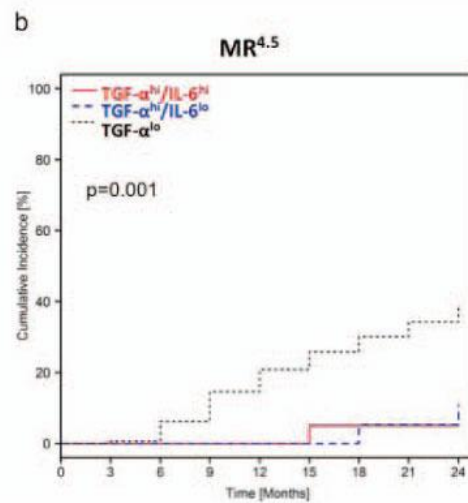
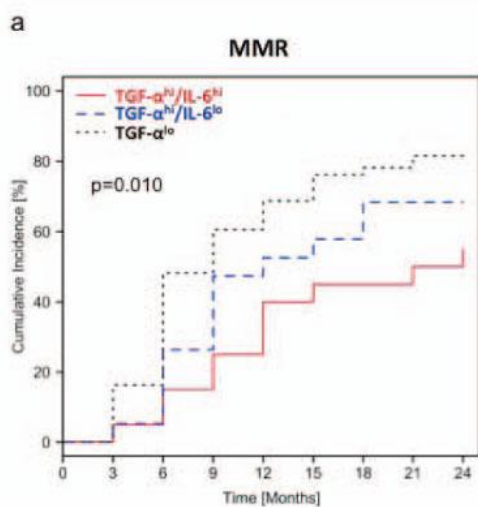
结果和意义:

1. 血浆中 TGF- α 和 IL-6 高表达的患者表现治疗无效。
2. TGF- α 单因子高表达倾向于治疗效果差。



Table1. 和健康志愿者相比，CML 患者炎症因子明显升高（13/39）

	Healthy donor (n=19)	CP-CML Dx (n=190)	CP-CML on TKI (n=17)	CP-CML vs. health	CP-CML on TKI vs. Dx	CP-CML on TKI vs. healthy
Group 1						
EGF	23.3(0-176.2)	121.7(48-3364)	35.8(0-227.4)	p<0.0001	p<0.0001	-
GRO(CXCL1)	366.1(92.4-2141)	1204(50.2-11071)	328.7(104.7-1753)	p<0.0001	p<0.0001	-
MIP1- β (CCL4)	14.7(0-45.6)	38.5(0-565.1)	18.2(0-34.7)	p<0.0001	p<0.0001	-
sCD40L	1433(174.8-18531)	26185(0-94322)	1342(0-4344)	p<0.0001	p<0.0001	-
VEGF	27.8(8.7-95.9)	108.8(0-4262)	34.4(0-928.8)	p<0.0001	p=0.0025	-
FGF-2(bFGF)	39.4(0-92.2)	57.2(2.5-1778)	38.5(0-287.9)	p=0.0002	p=0.0026	-
TGF- α	0.9(0-7)	3.6(0-768.2)	1.6(0-14.5)	p=0.0008	p=0.035	-
IL-4	0.6(0-7.8)	1.7(0-144.7)	0(0-18.9)	p=0.013	p=0.009	-
TNF- α	4.8(1.6-9.9)	8.2(0-59.5)	6.8(2.4-10.7)	p<0.0001	p=0.12	p=0.0102
Group 2						
IL-8	2.5(0-42.8)	7.6(0-795)	4.7(1.8-72.9)	p<0.0001	-	p=0.002
IL-10	1.3(0.4-11)	2.4(0-61.5)	4.2(0-42.8)	p=0.0028	p=0.0097	p=0.0003
sIL-2R α	0.1(0-16.3)	17(0-4625)	12.9(0-55.3)	p<0.0001	p=0.4	p=0.005
MCP-3(CCL7)	6.3(1.5-37.5)	4.2(0-316.7)	16.2(0-89.9)	p=0.014	p=0.054	-
IL-1 α	3.23(0-21.5)	1.8(0-1156)	12.3(0-96.5)	p=0.062	p=0.0002	p=0.014



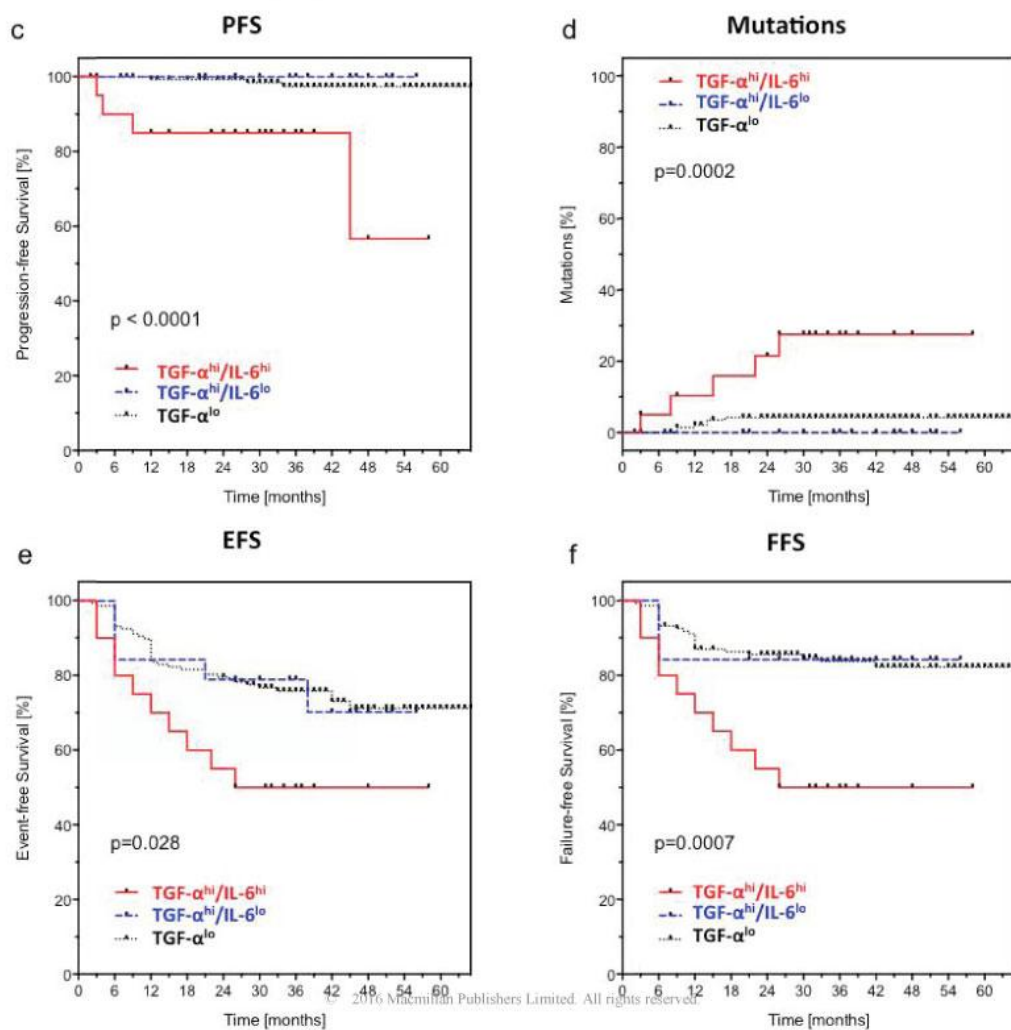
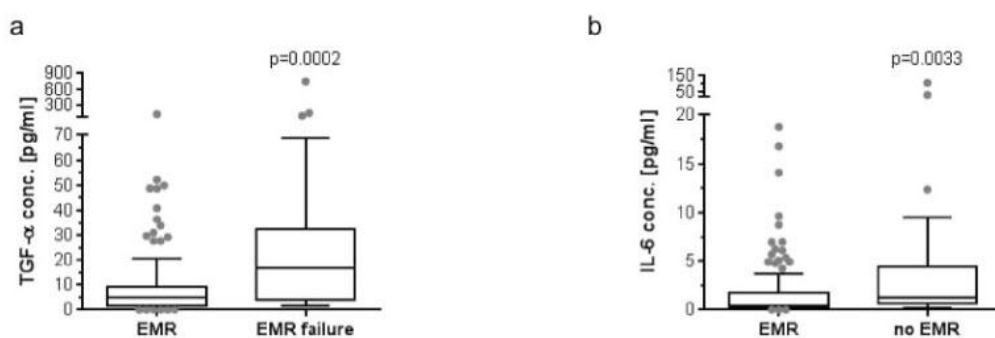


图 15. TGF- α 和 IL-6 高表达还影响 PFS(无进展生存率)、EFS(无病生存率)、FFS(无失败生存率)等临床指标的降低



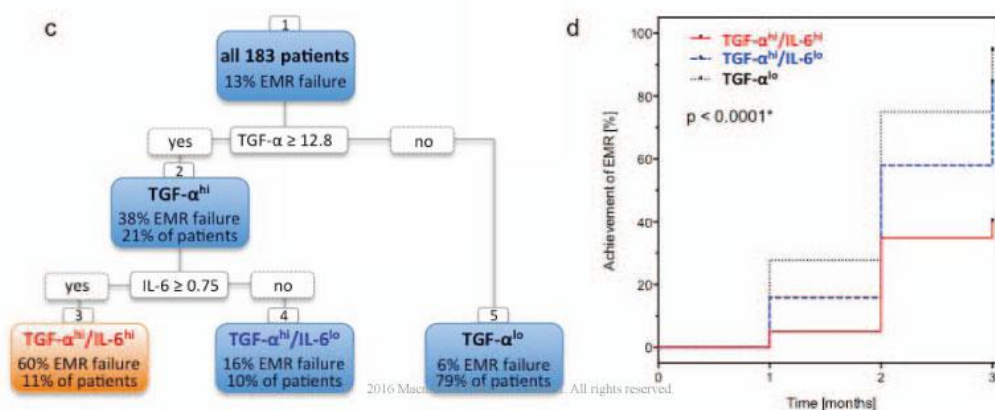


图 16. 采用 random forest analysis 方式分析数据显示，TGF- α 和 IL-6 高表达的 CML 患者经治疗 EMR 缓解率低

原文出处: Nievergall E, et al. TGF- α and IL-6 plasma levels selectively identify CML patients who fail to achieve an early molecular response or progress in the first year of therapy. Leukemia. 2016 Jun;30(6):1263–72.

MERCK



Milliplex蛋白多因子
检测服务合作实验室

THE
POWER
INSIDE
Luminex

XMAP
TECHNOLOGY
Because you want to know more



服务科技创新, 护航人类健康!

咨询热线: 800-820-5086/400-880-5086

电话: 021-58955370
网址: www.shbio.com

邮箱: market@shbio.com
地址: 上海张江高科技园李冰路151号