

生命奥秘

LifeOmics



光遗传学技术荣膺《自然-方法》
2010年度生命科学技术

- ▶ 基因组数据的明天
- ▶ 动物的“爱情三十六计”

生命世界

无奇不有

走进科学

解读生命

目录 CONTENTS

专题译述

一、光遗传学技术荣膺《自然-方法》2010年度生命科学技术

- 2 (一) 光遗传学技术简介
- 3 (二) 光遗传学技术的诞生
- 7 (三) 光遗传学控制细胞功能的基本步骤
- 11 (四) 光遗传学在细胞生物学领域的前景展望
- 19 (五) 新型光遗传学工具的开发

二、2011年值得期待的技术

- 26 (一) 锌指核酶技术
- 27 (二) 定向蛋白质组学技术
- 27 (三) 测序技术的洪流
- 27 (四) 无缝物质传输技术
- 28 (五) 单分子结构解析技术
- 28 (六) 自适应光学技术在生物成像领域里的应用
- 29 (七) 以系统的视角诠释疾病
- 29 (八) 高速三维超分辨率荧光显微镜技术

本刊文章主要由国外网站文章编译而成，如有版权问题，请版权所有人与本刊联系。

凡本刊所载文章，版权归作者本人和本刊所有，如需转载，请注明作者及出处“生命奥秘”。

本刊提供的任何信息都不能作为医疗凭证和依据，仅供科研参考。

下一期预告：破解表观基因组难题——机遇与挑战并存
表观遗传学状态的改变与正常的生理过程和疾病发生、发展过程都有着密切的联系。但是到目前为止，我们对于绝大多数细胞的整体表观遗传学状况还是不甚了解。随着基因组学研究的不断深入，尤其是大规模高通量测序技术的飞速发展，表观遗传学也终于迎来了发展的契机。更多详细介绍，请关注下一期的《生命奥秘》。

热点话题

- 31 基因组数据的明天

生命百态

动物的“爱情三十六计”

- 36 浪漫的邂逅——让蜥蜴告诉你如何在异性面前脱颖而出
- 38 难忘的约会——鸟儿如何利用“恐怖片效应”吸引异性
- 41 选出最佳伴侣——雌鸟挑到“好老公”有助于延缓衰老

专题译述

Worthy Issues

光遗传学技术荣膺《自然-方法》 2010年度生命科学技术

前言

每年年底，《自然-方法》（*Nature Methods*）都会对过去一年中推动生物学发展的技术方法做出回顾与总结，由此评选出当年最受瞩目、影响力最大的技术。2010年，光遗传学技术荣膺《自然-方法》年度生命科学技术。

2009年，当选年度技术方法的是iPS技术。它作为生物研究领域的重要工具，自问世起，就为人们所熟知。几年前，着眼于细胞重编程技术的研究人员发表了该领域最初的研究结果。自此，iPS细胞研究便一跃成为生物研究领域的“宠儿”，博得了众多研究人员的“青睐”，并以超乎预期的速度发展。而今年，《自然-方法》则将年度技术颁给了光遗传学技术。他们认为，这一技术工具在神经科学以及细胞生物学信号通路研究方面具有革命性的促进作用。

光遗传学（Optogenetics），也称光刺激基因工程（optical stimulation plus genetic engineering）。它是一种通过使用光学技术和遗传技术来实现控制细胞行为的方法。光遗传学技术克服了传统的只用光学手段控制细胞或有机体活动的许多缺点，为神经科学提供了一种变革性的研究手段。这项技术的关键之处在于：科学家们必须事前向小白鼠体内注射一种植物基因，这种基因能够对不同颜色的光的刺激作出敏感反应，还能通过自身特性感染类似的细胞。

2010年年度技术方法的评选结果已尘埃落定，光遗传学技术击败其它挑战者，拔得头筹。那么2011年，哪一项技术会胜出，勇夺年度技术方法的称号呢？锌指核酶技术（Zinc-finger nucleases）、定向蛋白质组学技术（Targeted proteomics）、单分子结构测定技术（Single-molecule structure determination）、自适应光学生物成像技术（Adaptive optics for biological imaging）等似乎都有可能。究竟那一项技术最终会脱颖而出？让我们拭目以待吧！

一、光遗传学技术荣膺《自然-方法》 2010年度生命科学技术

光遗传学技术荣膺《自然-方法》2010年度生命科学技术。所谓光遗传学（Optogenetics）是一项崭新的技术，人们可以利用这项技术对复杂的生物系统，甚至自由活动的哺乳动物体内的某些已经被研究得非常清楚的生理事件进行定向控制，而且调控速度非常迅速。这种光控调节的速度极快，能够达到毫秒级，而且定位精准，可以做到对某种特定细胞进行定向调控。这项新技术将生物学研究引领到了一个全新的领域，它能够推动生物学研究进一步发展，帮助科研人员进一步了解人体和疾病的本质，造福人类。

（一）光遗传学技术简介

光遗传学技术就是遗传学技术和光控技术结合之后产生的一项全新的技术。人们可以借助光遗传学技术对活体组织的特定细胞进行调控，开启或关闭某个已经被研究得非常清楚的细胞功能。

光遗传学技术包括的范围很广，其中最核心的技术是开发对光敏感并且可定向控制的材料或工具，而且这种材料或工具被光刺激之后还要能够展现出效应子功能（effector function）。除此之外，光学遗传学技术还包括其它一些辅助技术（图1）。

让光信号进入被研究组织的技术

让光敏材料进入被研究细胞的技术

获取输出信号的技术

分析这些数据，比如图像、电信号和或某种行为活动等的技术

图1 光学遗传学技术包含的辅助技术。

其实很早以前（最早可追溯到1971年）就有类似于光遗传学技术的雏形出现了，只不过当时还没有形成这种概念，也没能真正发展成为一项控制技术。到了2005年，才第一次出现了真正的光遗传学技术（图2）。这是因为当年在神经科学研究领域发现了单组分控制工具（single-component control tools）——微生物视蛋白基因（microbial opsin gene）。有了这种工具，科研人员就可以使用一种简便易行且定向的安全方法让神经元细胞具备感光能力，同时还获得了某种特定的高速效应子功能。

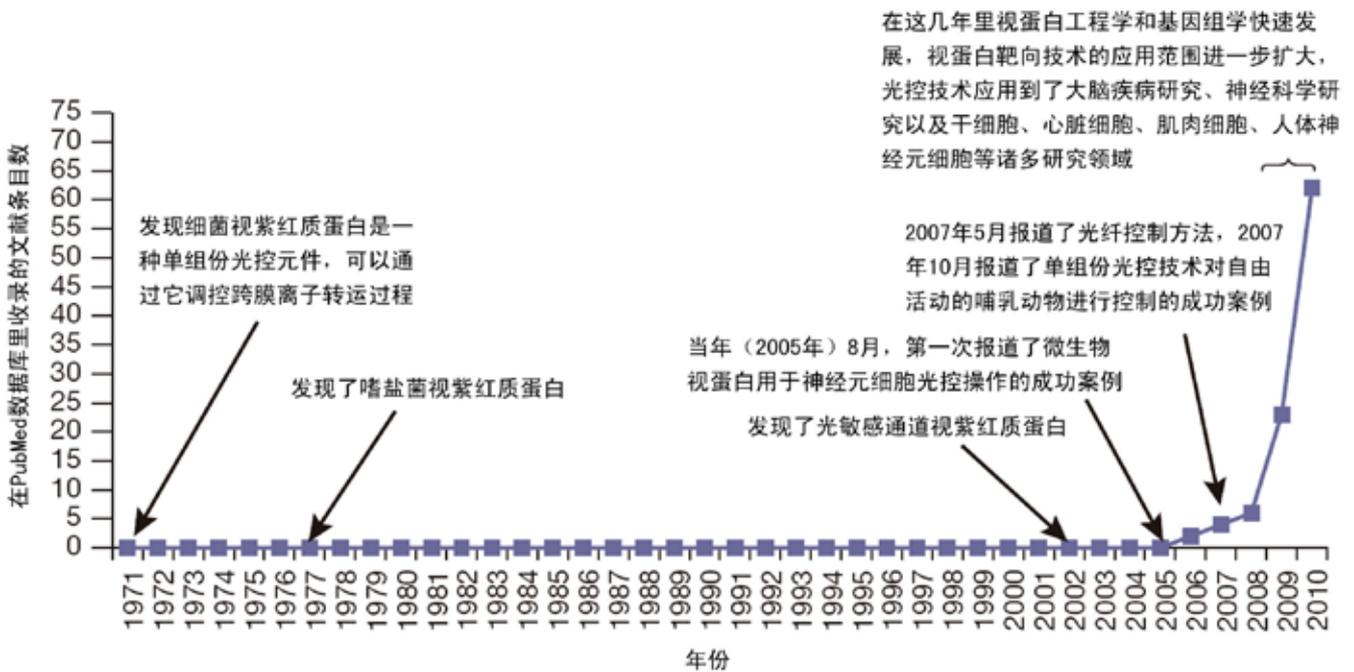


图2 图中展示了自从光遗传学技术（雏形）诞生以来，历年发表的相关文献的数量。图中标注了使用微生物视蛋白对神经元细胞进行单组份光遗传学控制的年份（2005年）。随后在2006年10月正式出现了“光遗传学”这个名词。2007年又有人利用光遗传学技术和光纤神经控制技术（fiberoptic neural interface）成功地对自由活动的哺乳动物进行了操控。图中还明确标明了细菌视紫红质蛋白、嗜盐菌视紫红质蛋白和光敏感通道视紫红质蛋白的发现时间。这三种蛋白发现之后很久才在2005至2010年间被证明可以用作单组份光控元件，对神经元细胞进行快速的调控。图中列举的在PubMed数据库里收录的文献条目数是以“光遗传学”及其衍生词为关键词于2010年12月1日对PubMed数据库进行检索之后得到的结果。

（二）光遗传学技术的诞生

1979年，Francis Crick提出，神经科学领域面临的巨大挑战是急需开发出一种控制技术，以期在不改变其它条件的情况下对大脑里的某种细胞进行操控。由于电刺激信号（electrode）无法对细胞进行精确的靶向刺激，而药物起效的速度又太慢，于是Crick考虑是否可以利用光控技术。但是，当时还没人知道如何让某种细胞对光刺激有反应。

其实，微生物学家们很早就知道有一些微生物可以表达可见光门控蛋白（visible light-gated protein）（表1）。微生物通过这些蛋白对离子跨膜转运过程进行直接调控。

神经科学家足足花了30多年的时间才将遗传学技术和光控技术结合到一起，因为人们并不相信这种结合能起什么作用。大部分科学家都比较倾向多组分控制技术（multicomponent strategy）。

多组分控制技术不需要借助任何微生物视蛋白基因，而是采用多种基因级联式组合的方式，或者采用人工合成化学制剂与多种基因组合的方式。不过，这些外源性膜蛋白同样很有可能会给娇嫩的哺乳动物神经元细胞造成毒性伤害，而且使用该技术，进入细胞的光子流也可能太弱、速度太慢，不足以发挥预期的调控作用。除此之外，科学家们也不相信仅靠发现的这几种视蛋白就能促使科研人员长期地研究单组份控制技术（这种怀疑同样也阻碍了绿色荧光蛋白的开发和应用工作），因为微生物视蛋白需要在化学辅助因子全反式视黄醛（**all-trans retinal**）的帮助下才能吸收光子信号。

不过，2005年8月发表的一篇文章彻底的改变了这一切。这篇文章宣称，神经元细胞只要表达了微生物视蛋白，完全不需要其它化学分子或任何物质的帮助就能够对光刺激做出精确的反应。这一年，真正的光遗传学技术出现了。这是因为神经科学研究领域发现了单组分控制工具（**single-component control tool**）——微生物视蛋白基因（**microbial opsin gene**）。有了这种工具，科研人员就可以使用一种简便易行且定向的安全方法让神经元细胞具备感光能力，同时还获得了某种特定的高速效应子功能。随后，在2006年又陆续出现了几篇类似的报道。

到了2010年，人们已经证实光敏感通道视紫红质蛋白、细菌视紫红质蛋白以及嗜盐菌视紫红质蛋白都可以分别对各种颜色的光刺激做出反应，快速并安全地开启或关闭神经元细胞的功能。这是因为脊椎动物组织里天然就含有全反式视黄醛。紧接着，科研人员又发现甚至可以利用这种光控技术对完好的哺乳动物大脑组织和自由活动的哺乳动物进行无损伤的操控。如今的光控技术早已经不是当初那个简陋的雏形，微生物视蛋白也完全能够承担起这种单组份技术的重担。

最近两年，随着其它辅助技术的快速发展，加上单组份光遗传学技术本身特有的方便性，它已经完全改变了神经科学的研究方式。对神经科学研究乃至生命科学研究的其它领域来说，对完整的、复杂的生物系统，比如自由活动的哺乳动物进行精确的控制非常重要。但是从历史上来看，还从未对一种大脑细胞或者某一个大脑投射区进行过短暂的、精准的控制，使其获得或失去某种功能。

现在，光遗传学技术除了能够对活体动物进行精准的时相控制之外，还能利用微生物视蛋白系统的这种单组份特性将光遗传技术推广到其它各个应用领域。利用最新的依赖Cre重组酶构建的视蛋白表达病毒载体，以及能够在特定细胞里选择性表达Cre重组酶的各种品系的小鼠资源，科研人员们已经能够利用光遗传学技术对各种各样活体小鼠体内的特定细胞进行操控了。

另外，有人提出了“点亮轴突理论（**illuminating axon**）”，即想办法让转染了视蛋白的神经元细胞能够将光敏分子输送到轴突里，这样就能够利用神经系统的投射原理来操控神经细胞，而无需对被操控细胞进行遗传学操作。这种技术如果取得了成功将是一项伟大的进步，因为有很多物种，比如大鼠和灵长类动物是很难进行遗传学操作的。不过，无论是哪种光控技术都离不开单组分特性。

虽然光遗传学技术源自神经科学，但是光遗传学技术并不局限于神经科学，它还可以广泛应用于生物学研究的各个领域。使用光遗传学技术可以对特定细胞里特定的生物事件在特定的时间给予特定的控制，而且最关键的是这种调控操作对生物体是无损伤的。这种控制技术意义重大，因为只有在整个细胞、组织乃至环境因素共同作用的大环境下研究特定的细胞事件才有意义。

表1 光遗传学是如何从最初的设想发展到今天成为一门大有潜力的新兴技术的呢？

时间	人物	事件
1971年	美国加州大学的Walther Stoeckenius 和德国慕尼黑大学Dieter Oesterhelt	发现细菌质子泵蛋白——细菌视紫红质蛋白（bacteriorhodopsin）可以被可见光子快速激活。它是一种单组份光控元件，可以利用它调控跨膜离子转运过程。
1977年	大阪大学的Akemi Matsuno-Yagi和Yasuo Mukohata	发现了嗜盐菌视紫红质蛋白（halo-rhodopsin）。
1986年	德国柏林洪堡大学的Peter Hegemann	纯化衣滴虫（Chlamydomonas）视紫红质蛋白，他认为衣滴虫的趋光性与这种蛋白有关。10多年后，他终于从衣滴虫的眼点（eyespot）里得到了纯化的视紫红质蛋白，并且成功克隆出了该蛋白的编码基因。
/	美国加利福尼亚大学圣地亚哥分校Roger Tsien（他因为在绿色荧光蛋白方面的贡献获得了2008年的诺贝尔奖）	他向Hegemann索取了这个基因。因为他一直以来都想得到一种可以被光激活的蛋白，通过这种蛋白来控制细胞的各种生理进程。这样他的荧光报告系统就更加完美了，但是一直都没能成功得到这种叫做chlamyopsin的蛋白。
	Hegemann	发现这种chlamyopsin蛋白根本就不能感光。继续进行藻类视紫红质蛋白研究，最终确认的确存在光控门控通道蛋白（light-gated channel）。
2000年	日本Kazusa DNA研究所	公布了数千条莱茵衣藻（ <i>C. reinhardtii</i> ）的新基因。
/	Hegemann的研究生Suneel Kateriya	对日本Kazusa DNA研究所公布的新基因数据库进行了搜索，发现有两个基因都含有同一个核心序列，这个核心序列与细菌编码的视紫红质蛋白非常相似。于是，他们推测这两个基因中的某一个可能就是编码门控通道蛋白的基因。
/	Hegemann的朋友、德国维尔茨堡大学的Georg Nagel	建立了一套系统，可以在青蛙卵里表达视紫红质蛋白，还能够检测出任何被光刺激诱发的离子流。 为了证明某种蛋白是不是离子通道蛋白，Nagel需要对进入和流出细胞的离子流进行检测，但是第一次的实验结果让大家都很失望。因为Hegemann给Nagel检测的是一种钙离子通道蛋白，但是没有检测到任何钙离子流。 后来在试验中无意间使用了一种酸性非常高的溶液，结果发现有大量的内向（进入细胞）离子流出现，于是Nagel对实验方案进行了修改。 Hegemann最开始计划将这种新发现的蛋白命名为chlamyopsin3蛋白，但是Nagel觉得这么有特点的蛋白就应该取一个与众不同的名字，于是他们最后决定将该蛋白命名为离子通道视紫红质蛋白1（channelrhodopsin-1）。
/	Tsien	对离子通道视紫红质蛋白1进行了一系列的验证工作，并在神经元中验证了该蛋白的功能，但是因为这种离子通道形成的离子流非常弱，还不足以刺激细胞形成动作电位。
2002年	英国牛津大学的Gero Miesenböck提出了光遗传学的方法	在体外培养的神经元细胞里转入了苍蝇的光感受器编码基因。
2002年	科研人员	发现了嗜盐菌视紫红质蛋白。
2003年	Hegemann和Nagel等人	报道了ChR2蛋白，这种蛋白形成的离子流更强，转运的主要是钠离子以及其它阳离子。
随后，科研人员又对大量的和ChR2蛋白类似的细菌蛋白进行了实验，结果也都失败了。		

续下表

接上表

时间	人物	事件
2005年1月	Karl Deisseroth的学生Feng Zhang和Ed Boyden	采用光来控制脑细胞。 当他们打开显微镜室的蓝光灯时，发现培养皿里的神经元细胞被激活了。
<p>在这些前期的实验工作取得成功之后，光遗传学研究终于进入了正常的发展轨道。 对患有帕金森氏病的小鼠大脑里经过遗传修饰的神经元细胞给予光照刺激后，小鼠恢复了正常的步态；借助该技术能观察到小鼠从睡梦中醒来时是哪些细胞活化了；借助该技术还能让小鼠对它们从未接受过的奖励刺激产生期待。光遗传学的技术早已经不再局限于神经科学研究领域，还可以用于心脏细胞研究和各种细胞信号通路的研究等。</p>		
2005年8月	Deisseroth科研小组	第一次报道了微生物视蛋白用于神经元细胞光控操作的成功案例。发表了第一篇相关论文，他们发现在体外培养的神经元细胞上表达的ChR2蛋白能够诱发动作电位。
/	日本东北大学（Tohoku University）的Hiromu Yawo	发现ChR2蛋白可以赋予活体小鼠大脑里神经元细胞光敏感性（photosensitive），用光刺激该动物大脑海马区新鲜切片后可以检测到明显的动作电位。
/	美国凯斯西储大学（Case Western University）的Stefan Herlitze等人	发现ChR2蛋白可以诱发鸡胚脊索（embryonic chick spinal cords）产生动作电位，而大鼠视紫红质蛋白4（rhodopsin-4）则可以抑制这种激发动作；
/	德国法兰克福大学（Goethe University）的Alexander Gottschalk等人	在秀丽隐杆线虫（Caenorhabditis elegans）动力感受神经元细胞（mechanosensory neurons）上表达了ChR2蛋白，结果发现如果给予线虫光刺激，那么它们就会像受到了物理刺激（比如戳一下）一样表现出退缩反应。
/	Deisseroth和 Hegemann	不能以每秒30次以上的光照频率刺激ChR2蛋白，这也就是说ChR2蛋白根本跟不上大脑运作的步伐，解决办法就是在蛋白上引入几个点突变。
/	美国加州大学伯克利分校（University of California, Berkeley）的Ehud Isacoff和德国慕尼黑大学（University of Munich）的Dirk Trauner	改造了一种谷氨酸受体通道蛋白（glutamate receptor channels），在这个蛋白上增加了一种配体的结合位点。这种配体含有一个分子接头（molecular linker），既可以将它连接在蛋白上，还可以在光刺激下改变形状。各种不同波长的光信号都能激活这种配体，使其进入或离开受体上的结合位点，让离子通道开放或关闭。有了这套系统既可以激活神经元细胞又可以抑制神经元细胞。这套系统在小鼠大脑切片、活体鱼等试验中都取得了成功，还被用于研究神经元细胞在行为调控回路（behavioral circuits）中的功能。
/	Miesenböck	改造了几种光遗传学系统，并且将这些系统用在了果蝇研究上面。Miesenböck还对果蝇进行了改造，让果蝇的大脑表达一种新的受体，可以在光反应配体的作用下激活这些细胞。
2007年5月	科研人员	报道了光纤控制方法。
2007年10月	科研人员	报道了单组份光控技术对自由活动的哺乳动物进行控制的成功案例。 2010年11月 科研人员 在小鼠心脏细胞上成功表达了ChR2蛋白，并且成功的用光刺激了心脏细胞，这相比传统的金属电极植入法伤害性要小得多，而且操作更灵活。其它细胞，比如胰岛β细胞也应该能够进行类似的操作。
/	美国加利福尼亚大学圣地亚哥分校（University of California, San Diego）的Wendell Lim 和Chris Voigt小组	利用芥子植物植物色素（phytochrome）系统的两个基因将胞质中的GTP酶“驱赶”到了细胞膜上，激活了细胞信号通路，使得细胞骨架蛋白发生重构。后来Lim他们分别在细胞的某个部分给予激活光信号，在另一部分给予抑制光信号，在数秒钟的时间里将蛋白质移动了几个微米。早前使用这个系统进行的实验表明该系统可以用来激活酵母细胞的基因转录。

续下表

接上表

时间	人物	事件
/	美国杜克大学（Duke University）的Chandra Tucker	使用了同样源自芥子植物的另一套配体和受体系统，在蓝光照射下成功的诱导出了细胞间的相互作用。他将研究蛋白分成了两个结构域，然后将每一个结构域与一种光反应蛋白融合，当光照射使得两个结构域相互聚集到一块发生重组之后就恢复了蛋白原本的功能。
/	美国北卡罗来纳大学医学院（University of North Carolina School of Medicine）的Klaus Hahn	从燕麦（oat）中提取了一种光敏感蛋白，然后将这种蛋白与好几种GTP酶融合表达。在黑暗环境中，燕麦光敏感蛋白中光敏感的光氧电压（photoreactive light oxygen voltage, LOV）结构域会紧密缠绕成螺旋状结构，从而封闭GTP酶的功能。而在蓝光照射下这个螺旋会打开，GTP酶被激活。虽然这种融合蛋白的反应速度不如芥子系统那么快，但是据Hahn介绍，在哺乳动物试验中LOV系统的操作相对简便，只需要一个基因和一种波长的光刺激即可。所有这些系统都可以用于多种蛋白质，而不仅仅是GTP酶。LOV结构域还被其他人用来构建光控DNA结合蛋白、构建光控酶以及控制蛋白质二聚化过程等等。

（三）光遗传学控制细胞功能的基本步骤

在光遗传学操作中，细胞会表达编码光敏感蛋白的外源基因，然后利用各种光来改变细胞的行为。光遗传学技术包括开发光敏感蛋白技术，将光敏感蛋白编码基因转入目的细胞技术，定向光控技术以及各种输出信号，比如细胞、组织或活体动物行为的改变等检测技术。

光学遗传学控制细胞功能的基本步骤

第一步：寻找合适的光敏感蛋白——实验工具箱（背景知识1）

可以是天然蛋白，也可以是对天然蛋白进行化学修饰之后得到的对光敏感的人工改造蛋白。



第二步：往胞内输送编码光敏感蛋白的基因

通过转染、病毒转导或构建转基因动物等方式将编码这些光敏感蛋白的基因输送进目的细胞。这些外源基因的表达可以借助特定的启动子，或Cre等重组酶系统被限定在某些目的细胞内，也可以不需要特定的启动子，仅利用病毒载体来实现这一特定表达的目的，比如利用神经细胞在拓扑学上的相互关系直接针对某些特定的神经细胞进行转基因操作。



第三步：对光刺激信号进行精确的时空操控

时间上的调控是利用持续光源搭配高速度快门、快速转换的LED或单光子激光扫描显微镜等进行宽视野照射来达到目的。在光路上，所有表达光敏感蛋白的细胞都可以同时接收到光刺激信号。对于体内试验来说，可以使用光纤或小型化LED等装置。

空间上的调控则是通过选择性的照射细胞局部的方法来实现的。比如有一种数字微镜片设备（digital micromirror-based device）就能够动态地将光照射到某个特定的细胞或者细胞里某个特定的区域。双光子扫描显微镜（Two-photon scanning microscopy）也可以用于定向激活只表达ChR2蛋白的细胞。

最近有人将双光子扫描显微镜与时间控制设备结合，进行了高选择性的激活试验，他们可以针对细胞里的某一个部分、某一个细胞或者某一群细胞进行同时激活或者单独激活。



第四步：收集输出信号，读取结果

光照刺激之后细胞、组织或者生物体究竟出现了哪些改变呢？这就需要收集输出信号进行判断。电极是一种常用的膜电位监测工具。还有人利用各种依赖荧光的生物感受器来检测输出信号。对于生物体来说监测行为改变也是一个不错的方法。

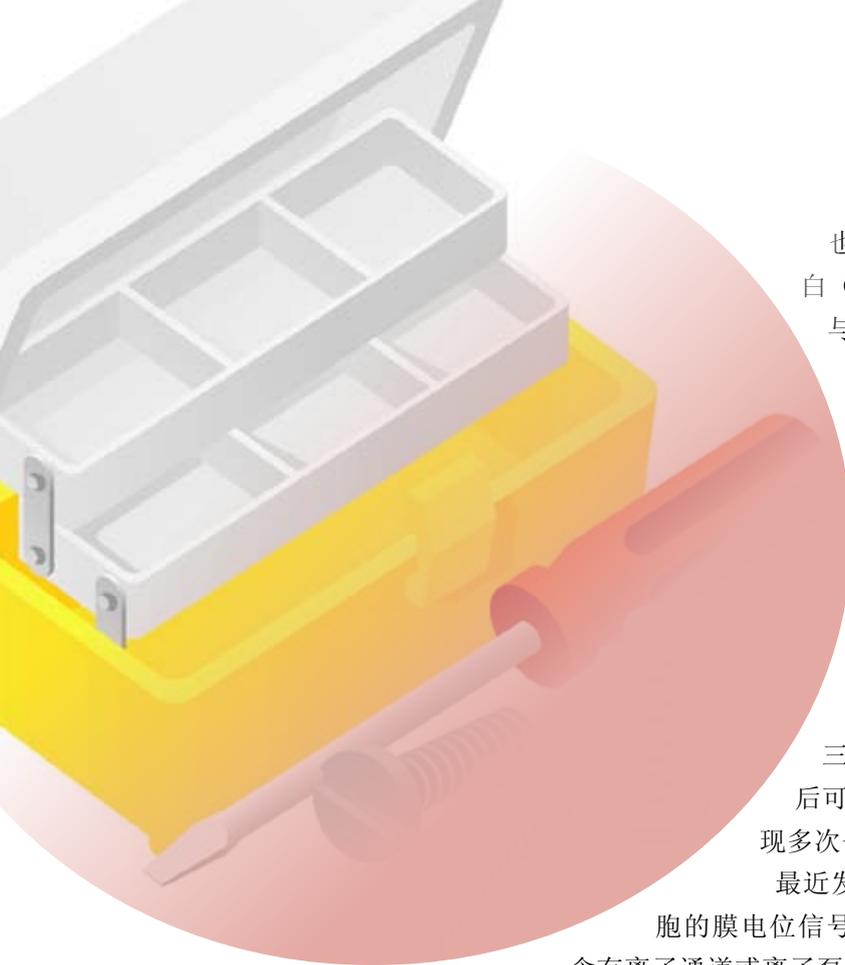


光敏感蛋白——实验工具箱

(1) 调节细胞膜电位的工具

在光遗传学里最常用的工具就是可以改变可兴奋细胞膜电位的工具。在神经元细胞中，细胞膜去极化之后会出现一个短暂的电信号（峰电位或动作电位）。这种电信号的形成是神经细胞相互交流的基础。反之，细胞膜超极化则会抑制这种峰电位的出现。如果神经科学研究人员能够掌握这种峰电位开关，那么他们研究神经细胞功能、神经细胞相互作用以及神经回路调控生物行为的机制时就方便多了。如果能在神经元细胞中表达可以改变膜电位的外源性光敏感蛋白编码基因，那么就能够通过光控操作来控制峰电位开关的开关。

要实现这个目的，方法之一是使用经过化学修饰的、名为“被束缚的”配体（‘caged ligand’）。这种配体在光照刺激之下会被激活，与细胞内的另一种外源性受体结合。这种配体还可以通过一种起到光学开关作用的光敏感复合物与受体结合。无论通过哪一种方法与受体结合，这种配体的最终目的都是让细胞或组织获得光敏感性。



也可以使用编码天然光敏感蛋白，比如视蛋白（opsins）的基因。这类光敏感跨膜蛋白都与生色基团视黄醛（retinal，视黄醛可以吸收光来激活视蛋白等光敏感蛋白）或各种视黄醛的异构体，比如反式视黄醛或顺式视黄醛等共价结合。值得一提的是，在绝大多数脊椎动物细胞中都含有大量的视黄醛，这也给我们使用天然光敏感蛋白带来了极大的便利。

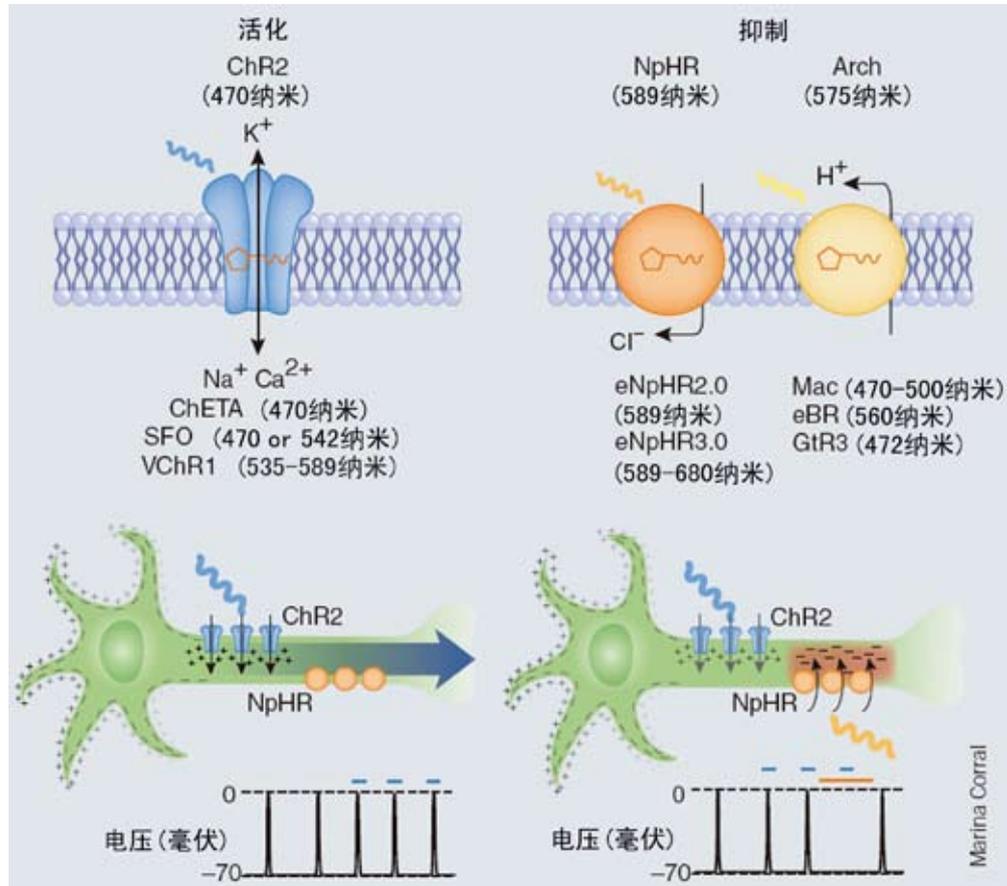
第一个基于视蛋白对哺乳动物神经细胞进行光控操作的遗传编码系统是一种源自黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）的三基因系统。神经元细胞表达了这三种基因之后可以对光刺激做出反应，在数秒钟的时间里出现多次去极化，并且形成多个峰电位。

最近发现微生物编码的视蛋白也能调控神经细胞的膜电位信号，这类蛋白除了具有光敏感结构域之外还含有离子通道或离子泵结构域。这种蛋白的发现又为科研人员们提供了一个新工具，只需要在神经元细胞中表达这一种外源基因就能够对细胞进行快速的光控操作。

这类微生物编码的视蛋白神经元细胞开关中第一个被使用的就是ChR2（channelrhodopsin-2）蛋白。在神经元细胞里表达的ChR2蛋白这种非选择性阳离子通道蛋白在蓝光的照射下会立即使神经元细胞发生去极化反应，诱发峰电位。现在人们还开发出了各种ChR2蛋白的变异体。比如ChETA突变体就是一种快反应ChR2蛋白，它可以以大于40赫兹的频率激活神经元细胞。而SFO突变体则是一种慢反应ChR2蛋白，在蓝光的照射下该蛋白可以使神经元细胞长时间处于稳定的可激活状态，而绿光照射的作用则恰恰相反。VChR1蛋白（Channelrhodopsin-1）的作用与ChR2蛋白相仿，但是VChR1蛋白主要被红光激活。

不过，科学家也不总是想要激活神经元细胞，有时他们也希望这些细胞能够“安静”下来。有一种名为NpHR的嗜盐菌视紫红质蛋白（halorhodopsin）是一种氯离子泵，它被光刺激之后会使神经元细胞发生超极化反应，抑制细胞在黄光照射下形成动作电位。eNpHR2.0和eNpHR3.0这两种NpHR蛋白的突变体对哺乳动物细胞的膜靶向性更好，因此也表现出了更好的光电流效应。Arch（archaerhodopsin-3，古细菌视紫红质蛋白3）、Mac、eBR（bacteriorhodopsin，细菌视紫红质蛋白）、GtR3（rhodopsin-3，视紫红质蛋白3）等光控质子泵（Light-driven proton pumps）蛋白也能使细胞超极化，抑制动作电位的产生。

光遗传学相关工具的发展非常迅速，因为科学家们在各种不同的生态系统中进行了大量的筛选工作，发现了很多新的光敏感蛋白，同时还对现有的蛋白进行了大量的改造工作。而且这些光敏感蛋白之间还能够进行各种重组，形成多种系统对神经细胞的活性进行调控。最近就有人使用ChR2蛋白对小鼠心脏细胞进行了光控操作，这些尝试都极大的拓展了光遗传学技术的应用范围，现在的光遗传学技术早已经不再局限于神经科学研究领域了。



图示各种调控细胞膜电位的光遗传学工具（蛋白）。

(2) 调控细胞信号通路的工具

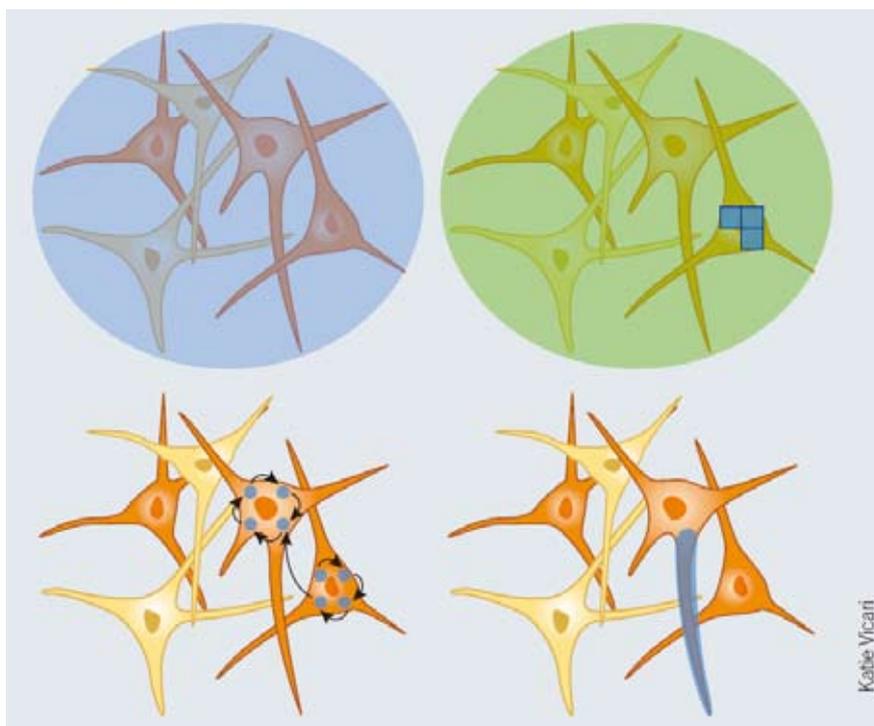
光遗传学工具除了可以对细胞进行激活或抑制操作之外，还可以控制胞内的信号级联反应通路和分子间相互作用。不过，这一类工具通常都是将光敏感蛋白的吸光结构域（light-absorbing domains）和其它蛋白的效应结构域（effector domain）融合在一起改造而成的嵌合体蛋白。比如由牛视紫红质蛋白和胞内的肾上腺素能G蛋白偶联受体组分融合而成的嵌合体蛋白——OptoXR就可以对G蛋白调节的信号通路进行光控操作。

非膜结合光敏感蛋白（Non-membrane-associated photosensitive protein），比如植物蛋白的光、氧、电压结构域（light, oxygen, voltage (LOV) domain）、植物色素蛋白（phytochrome）或隐花色素蛋白（cryptochrome）等都能够与胞内效应蛋白融合，生成新的光敏感蛋白。LOV2结构域使用的是天然核黄素（flavin）作为其生色基团。这种LOV2结构域就是LOV2-Rac等光敏感融合蛋白的结构基础。蓝光照射可以促使LOV2-Rac蛋白中LOV2结构域的构象发生改变，从而消除了对Rac结构域的变构抑制作用，促使Rac结构域与下游靶分子，如PAK1等结合，并激活这些效应分子，促进肌动蛋白丝多聚化，使细胞局部突出，最后导致细胞移动。LOV结构域还被用于构建其它的融合蛋白，比如光敏感DNA结合蛋白、光敏感蛋白二聚

化促进因子和光敏感酶等。

另一种胞质中的光遗传学系统是由光感受器（photoreceptor）PhyB及其蛋白结合辅助因子PIF构成的。红光可以促进PIF和PhyB结合，红外线则促进PIF与PhyB解离。将PIF与Rho家族GTP酶的上游激活因子融合就能够利用光照刺激将PhyB招募到细胞质膜上，在局部激活肌动蛋白细胞骨架，从而促进细胞延伸。这种系统和前面介绍的视黄醛系统或核黄素系统不同，PhyB的生色基团藻蓝素（phycocyanobilin）只能被用于非植物细胞。

最后需要提及的是，有一些天然存在的酶，比如光敏感腺苷酸环化酶（light-activated adenylyl cyclase, ePAC）可被用于调控细胞信号通路，因为这类蛋白能够直接生成第二信使。



图中分别展示的是利用宽视野、局部和扫描光源对细胞进行光照刺激。

（四）光遗传学在细胞生物学领域的前景展望

1. 未来的发展方向：不仅仅局限于神经科学

分子工程学（Molecular engineering）也能与光遗传学结合，从而可以对生物化学事件进行光控调节。

2009年初，科研人员借助哺乳动物大脑组织里的维甲酸类物质（retinoid）并利用维甲酸的信号分子在黑暗环境中活性较低的特点，对活体哺乳动物体内的G蛋白偶联受体（G protein-coupled receptor, GPCR）信号通路进行了光控操作。在这次试验中使用的是脊椎动物视紫红质蛋白——G蛋白偶联受体嵌合体蛋白（rhodopsin-GPCR chimeras, optoXR），这种嵌合体蛋

白可以恢复受异源G蛋白三聚体（heterotrimeric G-protein）信号通路G_s和G_q调控的细胞信号通路。

随后，又有好几个实验室用几种不同的新试验方法成功地对外培养细胞内的小GTP酶（GTPases）进行了光控试验，从而成功地用光控的方法改变了细胞的形状和运动活力。研究人员通过光控作用激活了蛋白间的相互作用，使GTP酶被招募到细胞膜上并被激活。这种方法今后也能成功地推广到其它生化信号传导试验当中，尤其是当这种单组份方法在活体哺乳动物组织上取得成功之后，就好像在存在核黄素生色基团（flavin chromophores）或胆绿素生色基团（biliverdin chromophores）时表现的情况一样。

Lim等人曾经专门撰文讨论了开发生化光控技术的策略问题。后来，人们又发现了在黑暗环境中活性很低的微生物腺苷酸环化酶（adenylyl cyclases），这对于光遗传学来说这也是一大进展。核黄素生色基团、optoXR等都非常适用于对神经元细胞进行单组份光控操作。所有这些科研成果都表明，光控技术时代已经到来，它几乎可以用于所有细胞和组织，这是以往的电刺激技术不可能做到的。

将来这些光控技术以及其它的技术一定会成为整个生物学领域的主流。这类技术也早就不再局限于神经元细胞，目前它已被推广到其它领域，包括神经胶质细胞、肌肉细胞、心脏细胞、胚胎干细胞等的研究领域。然而，精确的时相控制能力是光控技术取胜的关键。

对不同的组织和细胞进行光控操作所需要的速度也不尽相同。比如，对心脏细胞而言就不一定总是需要像中枢神经元细胞那么快的毫秒级的控制速度，这是因为心脏活动的节奏要慢得多。不过，更快的控制速度也可能会带来意想不到的收获，让我们有机会了解到组织的快速计算和适应过程。即便是微生物视蛋白也可以按照生化规则发挥作用，比如在中枢神经系统里，光敏感通道视紫红质蛋白介导微量的Ca²⁺流就能激活不可兴奋的（nonexcitable）神经胶质细胞。我们也可利用光敏感通道视紫红质蛋白的这种特点对其它众多受到第二信使Ca²⁺调控的活体组织细胞，比如用于分泌胰岛素的胰腺β细胞和免疫组织里的T淋巴细胞进行调控。在干细胞生物学领域和工程学领域也能在组织水平或活体水平上有选择地分别利用生化刺激信号或电刺激信号来刺激生态区位细胞（niche cell）、干细胞或干细胞子代细胞（stem cell progeny）。

总而言之，现在如果要对组织进行靶向研究，不论是从电效应功能还是生化效应功能，是从速度还是其它方面来说，光遗传学技术绝对都是一个非常不错的选择。

2. 未来的发展方向：扩充“弹药库”

最初，科研人员们注意到利用视蛋白来进行光控操作的保真度（fidelity）还不是特别理想，生物系统里偶然出现的其它动作电位或者偶然没出现的动作电位都会给试验带来噪声。于是，科研人员们开始对微生物视蛋白进行优化。

自1971年人们发现细菌视紫红质蛋白以来，世界各地的实验室不断构建出了许多细菌视紫红质蛋白突变体，最终解决了保真度问题。目前已有很多种可用于光遗传学操作的视蛋白，有快速的视蛋白也有慢速的视蛋白，有高保真度的视蛋白也有高频率的视蛋白，有双稳态的视蛋白也有高光敏性的视蛋白等等。另外，人们还通过构建嵌合体蛋白的方式提高了视蛋白的表达量，改进了视蛋白的其它一些功能。

除了定向突变技术之外，其它各种分子工具也能从好几个方面改进光遗传学工具的功能。比如，光遗传学工具的亚细胞定位问题就是一个研究热点，最新的研究进展已经可以将光控元

件（既可以是生化元件也可以是电信号元件）输送到研究得非常清楚的亚细胞区域或者胞内细胞器当中了。

现在人们还可以开发出能对蛋白间相互作用起到调控作用的光控技术，这将有助于开展和激酶及转录因子相关的研究工作。利用分子工程学技术还可以改变光遗传学工具的生色基团依赖性（**chromophore dependence**），比如可以利用胆绿素或核黄素等内源性的生色基团，当然也可以改变它们的效应功能。

除此之外，快速发展的分子基因组学同样也对光遗传学大有裨益。人们于2008年发现了红移光敏感通道视紫红质蛋白（**red-shifted channelrhodopsin**），这使得光遗传学步入了非可见光领域。虽然绝大部分微生物视蛋白基因在哺乳动物神经元细胞里都不能得到很好的表达，但这只是表面问题，最根本的问题是跨膜转运问题。要解决这个问题首先就要发现跨膜转运基序，如果将这段基序插入到微生物视蛋白上的特定区域就能够极大地提升视蛋白的表达量，这就彻底解决了微生物视蛋白或细菌视紫红质蛋白不表达或表达量低的问题。这些分子生物学技术还有助于改进光遗传学工具的光敏性问题和效应功能问题，有了分子生物学技术的帮助，自然界中数以千计的微生物视蛋白就都可以为我们所用了。

3. 未来的发展方向：反向工程学

光遗传学的另一大特点就是速度快、特异性高。这种特点使得光遗传学还可以应用于系统生物学（**systems physiology**）研究领域，因为利用光遗传学技术可以同时可对兴奋组织进行输入-输出信号检测（**input-output interrogation**）。这是电信号技术做不到的，因为我们无法在给予电刺激的同时又从被刺激处采集电输出信号。然而，光遗传学技术的出现让不可能成为可能，并让一切都变得异常简单。随着具有同步读数功能的光控系统所测量的数据变得更加丰富和复杂，生物学研究领域里的反向工程学（**reverse engineering**）概念必然会有更进一步的扩展。这需要我们对生物组织的计算功能进行推断，进行这种推断的主要根据是生物组织如何将输入信号进行转换，以及在复杂的病理条件下这种转换机制又发生了哪些改变等。这就好像在计算机芯片上开展的反向工程学工作一样，通过各种信号推测发生了哪些运算过程。

要推动光遗传学的发展还需要各种新型设备和系统。自从人们于2007年引入了光纤技术（**fiberoptic tools**）和激光二极管技术（**laser-diode tools**）之后，光遗传学控制技术就得到了进一步的发展。它得以深入大脑内部，也能够对活体动物进行操作，这一切都得益于纤维光学技术（**fiberoptics**）和电极技术（**electrodes**）结合的产物——光纤化学传感器，又称“光极（**optrodes**）”。有了这种“新式武器”，人们就可以在以非常高的速度下给予光控信号的同时接收输出信号。

在光遗传学将来的发展过程中很大一部分工作都将是增强光遗传技术的功能，比如提高输出通道数目和类型；增加输入通道的数目和类型，构建更复杂的光控系统，让时空的结合更顺畅；构建闭环的（**closed-loop**）控制模式等等。到目前为止，有关光遗传学的工作中绝大多数都是如何利用光来激发某种行为或生理学现象，很少有人报道通过某种行为或生理学现象得到了光输出信号。而闭环的控制模式就能彻底改变这一切，在闭环模式中，输入信号和输出信号可以实时地进行双向交流。

电信号记录技术（**electrical recording**）不太能够做到对特定的细胞进行记录，除非能将微电机或膜片钳（**patch clamp**）插入被记录细胞（但这种实验的应用范围并不广泛，只能

用于大脑切片或大脑表面结构)。虽然在很多情况下,电实验方法和光学实验方法的正交性(orthogonality)提示我们将这两种技术结合起来会起到一定的作用,但是就算使用了光电杂交的光极技术还是需要遗传学工具的帮助来获得输出信号,比如 Ca^{2+} 感受蛋白或电压感受蛋白等。当然,在对神经回路进行的光控操作中早就普遍使用了 Ca^{2+} 染料或电压敏感染料来获得与微生物视蛋白输入信号并存的输出信号。最近这几年,科研人员在特异性输出信号的遗传学研究方面取得了长足的进展,比如与神经表面结构光控试验相配套的输出信号系统。

4. 未来的发展方向: 在时空维度研究分子回路

光遗传学(optogenetics)工具的出现给了细胞生物学家一种史无前例的方法和思考角度对细胞展开研究。将这种精确操控工具与其它观察手段,例如荧光蛋白等相结合可以极大地提高科研人员对细胞内部事件工作机制的了解能力。

生物学一直以来都是一门非常注重观察的科学,到了现代之后,随着GFP等各种荧光蛋白的出现,生物学家们才得以深入活体细胞内部,观察到胞内发生的一切。我们现在能够对体外培养的细胞进行单独研究,也可以对完整生物体细胞进行研究,更深入的是能够观察蛋白质在胞内的定位,蛋白质的动力学及其表达水平上的细微差别。我们现在清楚地知道细胞不是一个装满了各种分子的袋子,而是一个有着复杂空间排布规律的高度各向异性的结构。我们还发现这种细胞组织结构会随着各种动态过程相应地发生各种改变,比如细胞形态发生变化、信号转导途径从质膜转移到胞核上等等。

那么究竟是什么样的机制促使细胞出现这样复杂的行为,又是什么样的机制对这些行为进行调控呢?很不幸的是,我们只能观察到这些行为,但是以我们现有的科研手段还不能够系统地操纵、研究胞内发生的这一切改变,因此也就无从知晓个中奥秘。标准的遗传学操作技术,例如基因敲除、基因过表达以及基因突变等在确认蛋白与表型之间关系方面的确非常有效,但是将这一套用于揭示细胞工作机制就显得力不从心了。因为这些遗传学的操作从时间维度上来看反应比较迟钝,产生的作用范围又比较广,除了在某些非常特殊的环境下,一般情况都只会对胞内网络化的反应系统带来某种时空维度的破坏作用,而不是起到调控作用。使用药物对细胞进行干扰也是一种常用的手段,特异性地针对某种胞内分子的小分子药物可以快速抑制某种目的蛋白的功能。但是这两种方法都不能在空间上准确控制,而且在绝大多数情况下都需要进行大量的工作,或者是碰运气才能得到高度特异性的抑制剂。

幸亏有了光门控通道蛋白(Light-gated protein),它给了我们另一种解决方式,可以对胞内的网络化工作机制有所了解。这几年,各种新型光控工具呈现出了爆炸性增长的态势,从原理上来说,它们可以对各种蛋白的功能和胞内定位进行操控。这种光遗传学工具的出现将引领我们进入一个新的生物学时代,称之为微扰生物学(perturbative biology)时代,这将会使我们对复杂生物学系统的研究模式都将彻底改变。与用作分析工具(analytical tool)的GFP蛋白相比,光门控通道蛋白就是一个任劳任怨的微扰工具(perturbative tool),它们可以互为补充,互相配合。

4.1 光遗传学工具: 光和蛋白活性之间的“中间人”

新一代的光控工具都是经过遗传修饰、具有功能、可以对胞内的各种功能进行调控的分子。这些工具几乎全都源自具备精密感光系统的生物,它们一般都是含有光异构化生色基团

(photoisomerizable chromophores) 的蛋白质，这些蛋白质在恰当波长的光照刺激下会被激活，而且构象也会发生改变。一般来说，这些光控工具都会使用两种机制将光控开关活性和蛋白功能活性联系起来。

第一种策略是将具有变构效应的光敏结构域与蛋白活性结构域融合（图1a）。比如可以将光敏的光、氧、电压（LOV）结构域掺入待研究的目的蛋白，这样就能通过空间效应封闭或者干扰蛋白的功能。LOV结构域在光刺激下通过光异构效应改变构象，可以解除对蛋白功能的抑制作用。人们利用这种方法构建出了光控的GTP酶Rac蛋白。其实这也不是什么新鲜的想法，和以前用化学方法和遗传学方法构建的光锁技术是很相似的，但是在光遗传学上应用这种技术具有一大优势，那就是可逆性。具备光异构效应的LOV结构域可以在数秒至数小时内从激活状态恢复到失活状态，反之亦然。

另一种调控细胞信号通路的方法就是利用光来控制蛋白间的相互作用。我们知道在细胞生物学里有这样一种概念，蛋白如果被招募到某个地点或者进入某种复合物通常都是与蛋白功能密切相关的。科研人员们就是利用这种规律使用化学手段控制蛋白间的二聚化过程，对很多细胞信号通路进行了调控操作。这种规律同样也可以为光遗传学所用，比如源自拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）的光敏色素蛋白（phytochrome）和PIE蛋白之间的相互作用就可以受到光照刺激的控制，借助这样一对蛋白系统可以对多种细胞功能进行调控。另外，还可以利用这一类的系统控制蛋白在细胞内的亚细胞定位情况（图1b）。比如已经有人成功地利用这种技术将Rac鸟嘌呤核苷酸交换因子（Rac guanine nucleotide exchange factor）定位到了胞膜上。这些交换因子足以激活Rac酶，导致肌动蛋白发生多聚化反应。从理论上来说，反之亦可可行得通的，即将蛋白“调离”它们正常的工作岗位，抑制蛋白功能。还有一种同样需要利用这套蛋白间相互作用系统的办法，就是将每种蛋白的功能结构域结合起来，比如光控的酵母双杂交转录开关系统（light-controlled yeast two-hybrid transcriptional switch）或分散的光控Cre重组酶系统（light-controlled activation of a split Cre recombinase）等等都属于这一类光遗传学工具。受光刺激控制的蛋白间相互作用可以将属于同一条信号通路的不同组份（比如激酶及其底物等）直接聚集到一起，它发挥的是一种类似平台的作用，最终激活了整条信号通路（图1c）。值得一提的是，最近又出现了一种新型的光控蛋白间相互作用系统，隐花色素（cryptochrome）——CIB1系统。这套系统可被不同波长的光激活，这样也许在将来的某一天，作为控制工具的光遗传学工具的光谱就能够和作为观察工具的荧光蛋白光谱相配套了。

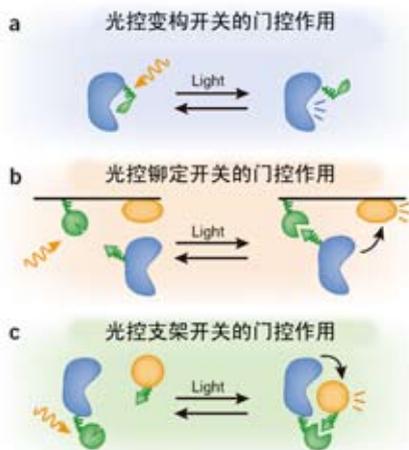


图1 各种光控生化元件的作用机制。a，如图所示，将绿色的光敏感结构域或基序与目的蛋白融合之后，蛋白活性就可以直接被光刺激信号所控制。在金色箭头所示的光照刺激作用下，光敏感结构域的变构抑制作用被解除，目的蛋白被激活。b，c，蛋白活性受到间接的控制。b，蛋白活性受到光敏感的绑定组份的控制。c，蛋白活性受到光敏感的支架组份的控制。

4.2 可变的输入信号:揭开细胞信号通路的黑匣子

在未来几年里，毫无悬念地，科研人员一定会发现更多的光控开关分子，同时肯定也会开发出更多的试验方法，从而利用这些光控分子来控制各种细胞分子功能。但我们无法确定的是，这套光遗传学技术究竟能给我们带来多大的帮助，能让细胞生物学向前推进到什么地步。接下来我们就将介绍几个光遗传学技术可能会有所建树的研究方向。

光遗传学技术和其它的新兴技术一样，我们也无法预测出它究竟能给生物学研究带来什么样的改变，同样也不能预测出生物学研究中的哪些领域会受到光遗传学技术的改变。不过，这些技术现在倒是马上就能派上用场，比如可以用于那些需要在时间或空间上给予激活之后才能发挥正常功能的系统。对于刚刚使用光遗传学技术的细胞生物学家们来说，最重要的莫过于改变思维方式，将以往那种简单的只改变一种蛋白或功能的试验思维转换成整体的、自然的试验思维。

工程学上经常会利用各种高度可控的调控工具来破解和解构诸如复杂的电子设备等仪器内部的工作原理和工作方式。在生化和生物物理设备方面的情况也比较类似，我们会用各种组分或不同的浓度来重建系统，甚至会用与活体内观察到的完全不同的东西来进行重建，这是因为任何人只要接触到了这些系统，都能从机械角度分辨出各种不同的模型。让我们以马达为例代表分子机械系统。让马达处于非自然力作用之下这是一种非常有用的方法，因为这样能够了解马达的整个物理性质和能量状态，从而也能够了解到马达的运作原理。上述所有这些方法总结成一句话就是用各种变量对被研究系统进行检测，然后根据输出信号对其内部工作原理做出推断。

细胞生物学家们会用一种比较类似的方法，充分利用光控工具对细胞内在各个空间分布的不同信号途径进行干扰和操控。这种胞内调控方法可能会各有不同，但是它们都有一个共同的特点，那就是都是从系统整体的角度进行调控的。在很多细胞生理事件或发育进程（比如细胞极化、迁移以及发育模式等等）当中，胞内各种信号在空间上的动态分布极有可能是起到关键调控作用的“幕后推手”。假设光遗传学工具能够随意的操纵各种输入信号，让这些信号任意分布在胞内的各个地方，那么光遗传学工具将给科研人员们带来不可想象的帮助，到了那时，找出信号通路背后存在什么样的分子调控将不再是难题。虽然也有人利用一些微流体系统（**microfluidic systems**）来输入各种调控干扰信号，但是这类系统只能用于输入可扩散的胞外信号，因此大大的限制了这类系统的应用范围。光遗传学工具则不同，它几乎可以在胞内网络的任何水平上以任何方式进行干扰，甚至还能用于正在发育中的生物体研究领域。

光遗传学工具还能用于体内生化实验（**in vivo biochemistry**）。荧光蛋白可以让我们对体内分子的浓度进行定量研究，也能让我们对体内分子的空间分布有所了解。但是任何一位优秀的生物化学家都知道，要想深入了解细胞内的生化反应机制，就得对胞内的各种系统参数进行系统的调控。我们用于体内信号通路研究的传统手段主要擅长发现参与信号扩增的组份以及蛋白间相互作用的信号（例如活化信号或抑制信号）等（图2a和图2b）。

但是随着研究的深入，科学家们关注的关键问题不再局限于发现某个信号路的组成分子，而是开始思考这些信号路的组成分子是如何共同发挥作用来完成某项细胞功能的。光遗传学工具的出现为科学家们提供了一种手段，可以通过调节激发光的强度来控制胞内组份的活性或者局部浓度。甚至还有可能利用类似于膜片电压钳（**voltage clamping of channels**）或位置钳（**positional clamping**）一类的光遗传学钳技术（**optical tweezer**），将胞内某种活性中间

产物的浓度固定在一个范围内。在细胞内复杂的动态系统中这类钳技术可能会给我们带来大量与细胞工作机制有关的重要信息。

在细胞信号通路研究方面大家比较关注的问题是，信号在信号网路逐级传递过程中是如何传递、改变以及被解读的。光遗传学工具的灵活性在此处就有了用武之地，可以将光控工具“插入”细胞信号通路的各个层级当中（图2c）。对胞外刺激信号进行开关操作是了解胞内信号通路的标准研究模式，但是胞内开关则一直没能出现。如果能够顺着信号通路逐级往下深入研究，在系统改变整条通路输入信号的同时逐级观察每一步的输出信号发生了什么样的改变，那么就能非常直接地了解到信号在每一步都经过了什么样的处理。这种分析模式可以被用于信号网路研究，比如反馈控制（**feedback control**）或超敏反应（**ultrasensitivity**）关键节点的研究，可以发掘出详细的信息。

光遗传学工具在反应速度和控制能力方面的优势还可以用于一项非常吸引人的研究，那就是对任何细胞信号系统从时间上进行任意的干扰，或者给予振荡式的刺激（图2d）。这一点对于研究以改变频率为信息编码方式的信号通路（比如钙离子信号通路和受频率调控的入核信号通路等）来说非常重要。但是即便对那些通常情况下不感受频率输入信号的信号系统来说，这种能够对细胞从不同时间上进行操控的方式依旧非常有价值。我们目前几乎没有任何手段能够了解细胞网络的反馈控制系统，但是我们依旧坚信反馈控制方式在细胞信号通路中一定占据了绝对地位。在电生理研究历史中，长久以来一直都在用给予不同时间电刺激的方式研究细胞回路的反馈模式。现在，我们也可以将这套研究策略用于光遗传学领域，这将有助于发现活体细胞内的反馈模式。

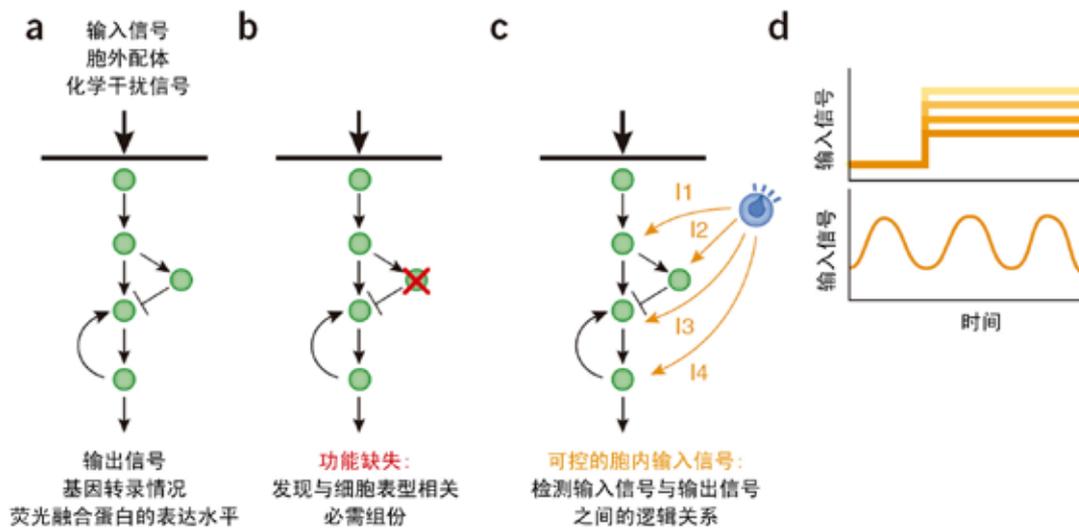


图2 体内生化实验模式图，从发现信号通路组成元件到掌握整条信号通路的工作原理。a，细胞调控网络是由各种相互之间能够逐级发生相互作用的蛋白质，以及各种反馈通路和前馈通路所组成的。通常来说，这些调控网络都是受到胞外配体或者药物分子等化学信号的刺激才会被激活，最终导致胞内蛋白表达水平出现改变或者某条信号通路（比如转录反应）被激活等效应出现。b，经典的化学或遗传学研究模型。在该模型里主要封闭或激活细胞调控网络中的某个（些）关键节点，再通过细胞表型的改变来判断它们之间的相互关系。c，d，光控输入信号（如图中I1至I4所示）可以特异性地精确作用于细胞调控网络中的某一个（些）节点。c，使用的是一系列的短暂输入信号，包括将激活信号固定在一定的范围之内的方法。d，使用的是不同频率的输入信号。

4.3 光遗传学在细胞生物学应用中遭遇的问题

为了能够让光遗传学的应用范围变得更广，操作变得更加简便，为更多的科研工作者造福，还需要对光遗传学工具的递送技术、数据分析技术以及光遗传学工具本身的特性进行进一步的优化。以荧光蛋白为例，就是因为显微镜技术的发展以及荧光蛋白本身特性的不断改进才使得荧光蛋白广受欢迎，被普遍应用的。

荧光蛋白是一种非常理想的观测工具，因为它们能够提供时间和空间上的信息，而且是一种高度模块化的工具，几乎可以与任何目的蛋白融合表达。同样的，为了充分发挥光遗传学工具的潜能，它也必须满足下列要求：首先，光遗传学工具必须是可逆的，并且反应迅速，满足模块化需求；其次，还需要能够直接反映出光诱导出的活性。如果光遗传学工具不具备可逆性，那么它就不能达到高度的空间分辨率，哪怕生物系统只是在局部接受了光照刺激（图3）。这是因为如果可移动的光遗传学工具在局部被光照射激活之后又迁移到了未被照射的它处，而且没有失活，依旧保持在活化状态，那么就无法反映出该分子活性真实的空间分布情况。同样，可逆性对于时间分辨率也非常重要，而且可以用于固定中间产物活性的试验操作当中。

最后，作为一项能够定量的技术，还需要能够对接受光遗传学输入信号刺激做出相应反应的活体细胞输出信号进行准确的检测。体内定量生化实验技术就依赖于对各种已知酶的反应（或酶活性）进行检测。不过，由于细胞之间各种细胞组份的浓度有所差异，因此，哪怕是相同的光照刺激也可能会给不同细胞造成不同的结果。幸运的是，针对不同的光遗传学技术，我们还有一些直接检测手段。比如，针对光控蛋白间相互作用系统（**light-gated protein-protein interaction**）就可以通过荧光共振能量转移（**fluorescence resonance energy transfer**）或者胞内蛋白定位的改变情况直接检测蛋白复合体的形成情况。而对于光控离子通道来说，则可以通过电压感应器来反映该离子通道是否被激活。毫无疑问，随着光遗传学技术及相关技术的不断发展，我们将会有更多的解决办法，尤其对于单分子光诱导活化光控试验（**unimolecular modes of light-induced activation**）更是如此。

其它的一些问题则显得没有这么重要，但是如果这些问题得到了解决，就会更好简化光遗传学试验操作。现有的一些光遗传学试验方法还额外需要一些外源性分子的帮助，比如生色基团（**chromophore**）等等，这些分子通常都是化学合成的物质或者取自其它物种。虽然在试验设计中通常都会用何时加入生色基团来控制光反应性，但是无论如何，额外加入生色基团都会是光遗传学操作中的一个小遗憾。尤其是在组织或器官试验中这一点会显得尤为突出，因为在这一类试验中生色基团进入组织或器官的程度通常都非常有限。而在活体试验中如何有效地将光输入信号和生色基团等辅助因子传递到目标位置就成为了影响实验成败的关键。因此，在面对每个问题时，各项相关解决技术的进展情况和重要性就一目了然了。

光遗传学技术是众多将生物学从一门被动的观察性学科（**observational discipline**）转变成主动的生产性学科（**generative discipline**）的新兴技术中的一种。最近几年，合成生物学（**synthetic biology**）在改造生物回路、创造新功能方面和重塑生物体自然反应途径方面都取得了丰硕的成绩。光遗传学技术的出现更进一步扩展了这些技术的应用范围，并且做了一些补充。光遗传学技术除了能够帮助合成生物学家发现生物体自然系统反应网络的各个层面上，如果受到干扰会做出什么样的反应，还能据此改变生物调控网络接收到的输入信号，发现生物组份，或者调节组份的浓度，优化系统的功能。甚至可以设想利用不同时间下的光照信号来激活信号通路，同时观察细胞行为改变的情况。

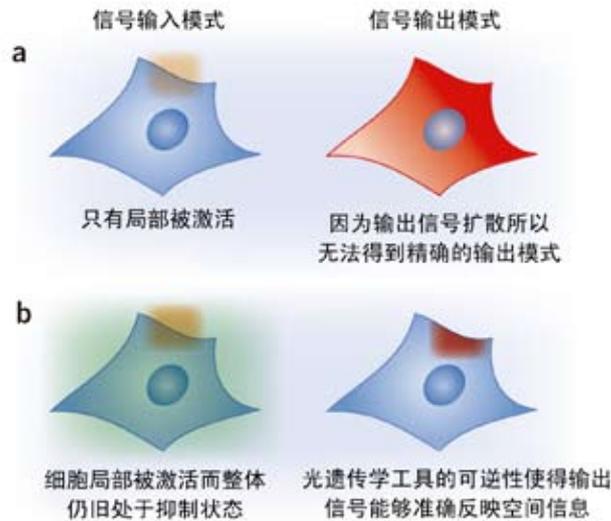


图3 光遗传学工具的可逆性及其空间分辨率的关系。a，科研工作者可以对局部空间里的光遗传学工具给予单独光照激活，如图中橙色所示。但是被激活的蛋白（红色所示）会在胞内扩散，从而破坏了光照刺激的空间信息。b，如果在细胞局部给予激发光的同时又让细胞整体处于抑制状态（可以是给予抑制光刺激或者只是给予短暂的激发光刺激），如绿色所示，那么就能很好地保持局部激活的状态。

（五）新型光遗传学工具的开发

——通道视紫红质蛋白改造与光遗传学新工具开发

源自微藻（microalgae）和真细菌生物（eubacteria）的视紫红质蛋白（Rhodopsin）是科研人员调控神经元细胞及其它细胞功能的强力“武器”，但科学家们还是不满意，因为这类工具还存在一定的缺陷。接下来介绍了几种光遗传学工具的改进方法，以及这些方法对推动光遗传学技术的进步所起的作用。

通道视紫红质蛋白（Channelrhodopsin）是一种阳离子通道蛋白，它可以在光照刺激下被激活，起到跨膜转运阳离子的作用。到目前为止，科学家已经发现了四种通道视紫红质蛋白，它们分别是源自莱茵衣藻（*Chlamydomonas reinhardtii*）的ChR1和ChR2蛋白，以及源自团藻（*Volvox carteri*）的VChR1和VChR2蛋白。

这些天然通道视紫红质蛋白的主要作用就是感受光刺激，赋予微藻趋光性（phototaxis），使它们能够进行趋光和背光运动，从而将光照条件控制在最佳范围内，帮助微藻进行光合生长

作用 (photosynthetic growth)。这种细胞反应肯定会根据不同的光照强度 (light intensity) 被分为好几个等级。而且在强光刺激下通道视紫红质蛋白的离子通道作用也必须被弱化, 否则细胞会发生完全去极化反应, 否则, 势必会花费“大价钱”将过量涌入细胞的阳离子重新泵出细胞外, 消除胞内过量阳离子带来的不良影响。因此, 每一个通道视紫红质蛋白在吸收一个光子后所能够转运的阳离子数目一定很少, 而且在过度照射时通道蛋白形成的跨膜离子流也一定会减弱并维持在一个相对较低的水平。

尽管近几年以来通道视紫红质蛋白在光遗传学领域里取得了不错的成绩, 尤其是在神经研究领域里更是表现突出, 但是它也存在自己的不足, 主要表现在形成的离子流强度偏低, 而且非常容易失活。这些特点都使得通道视紫红质蛋白不能应用于某些生物学研究领域。另外, 天然存在的通道视紫红质蛋白其吸收光波长通常都不会超过520纳米 (只有VChR1蛋白的最大吸收波长是535纳米), 这就使得通道视紫红质蛋白不能对大脑这一类具有高光散射 (light-scattering) 性质的结构进行体内研究。

不过, 近几年也有人不断在尝试通过各种方法对通道视紫红质蛋白进行改造, 希望能够获得更高性能的通道视紫红质蛋白, 拓宽它们在光遗传学领域里的应用范围。在这些改造方法中最主要的有以下四种: 定点突变技术 (site-directed mutagenesis)、不同通道视紫红质蛋白之间的结构域调换技术 (domain swapping between different channelrhodopsin species)、通道视紫红质蛋白N末端及C末端修饰技术 (modification of N and C termini) 以及发现新通道视紫红质蛋白的基因组发掘技术 (genome mining)。将上述四种技术结合使用可以进一步推动光遗传学工具的发展。

接下来将介绍利用上述技术得到了哪些成果, 为通道视紫红质蛋白开发出了哪些新特性, 还将讨论这些改造技术可能会给通道视紫红质蛋白以及其它的光遗传学工具带来哪些新特性。

1. 提高光电流强度, 改善失活性质

宿主细胞上的通道视紫红质蛋白在被光照激活后介导产生的光电流 (Photocurrent) 强度可以被进一步增强, 主要方法包括提高通道视紫红质蛋白的表达水平, 延长通道视紫红质蛋白的开放时间, 以及增强通道视紫红质蛋白对阳离子的传导效率 (conductance)。

要弄清楚通道视紫红质蛋白产生光电流的动力学特征, 包括通道视紫红质蛋白快速失活过程的动力学和在黑暗环境下完全恢复光敏感性这一缓慢复活过程的动力学特征, 至少需要知道在暗适应状态 (dark adapted state, DA) 和光照适应状态 (light adapted state, LA) 这两种黑暗环境中关闭状态下的动力学特征和O1、O2这两种开放状态下的动力学特征。有两种各不相同的光反应介导了通道视紫红质蛋白在上述状态之间进行不同的转换 (图1)。当光子激活了处于DA状态的通道视紫红质蛋白之后, 蛋白会改变成O1状态。在持续的光照刺激下通道视紫红质蛋白会处于一种介于O1和O2之间的平衡状态。由于O2状态下通道视紫红质蛋白对与Na⁺的通透性不如O1状态下高, 因此通道视紫红质蛋白从O1状态转换到O2状态之后会降低跨膜离子流的强度, 从而导致光电流也降低到一个稳定的低水平状态, 通道蛋白也进入持续性的失活状态, 即大部分的通道蛋白都处于LA状态之下。这种转换过程对PH环境高度依赖, 大家相信这主要是因为通道视紫红质蛋白上的一段质子化基序 (protonatable residue) 的作用, 不过目前还没有发现这段基序。为了得到一种不具备这种失活性质, 同时开放时间长一点的通道视紫红质蛋白, 我们必须对这段未知的基序进行突变操作, 防止蛋白在光照下发生从O1状态到O2状态的转换。

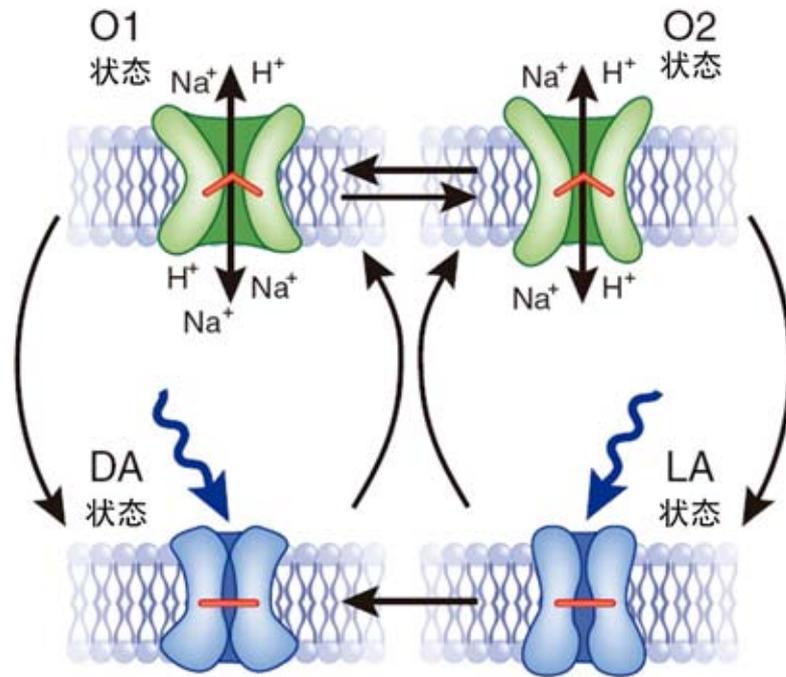


图1 通道视紫红质蛋白动力学特征简化模型示意图。

科学家还发现如果将通道视紫红质蛋白上的生色基团结合位点（chromophore-binding pocket）突变掉（图2），那么同样能改变蛋白从DA状态向开放状态转变过程的动力学特性。这种改造最成功的例子就是阶梯功能视紫红质蛋白（step-function rhodopsins）。这种蛋白的开放时间从野生蛋白的毫秒级跃升到了分钟级别，而且它是在黄光照射下被关闭的。不过，这些突变蛋白同样也存在问题，它们只有在长时间照射下才会失活，这个问题也有待妥善的解决。还有一些突变蛋白的光周期（photocycle）很快，开放时间很短，这类蛋白被称作ChETA突变蛋白（ChETA mutant）。比如，ChR2 E123T突变蛋白的动力学转换非常快，O1状态的出现和消失都不依赖电压的改变。这一点与野生型的ChR2蛋白非常不同，因此这种ChR2 E123T突变蛋白非常适合用于诱导产生快速动作电位（fast action-potential）。不过，ChR2 E123T突变蛋白开放时间短的特点决定了它不可能形成高强度的光电流，这也限制了它的使用范围，比如在光照强度有限的情况下就不太适用。要改变这种状况的唯一办法就是提高ChR2 E123T突变蛋白的离子传导效率。

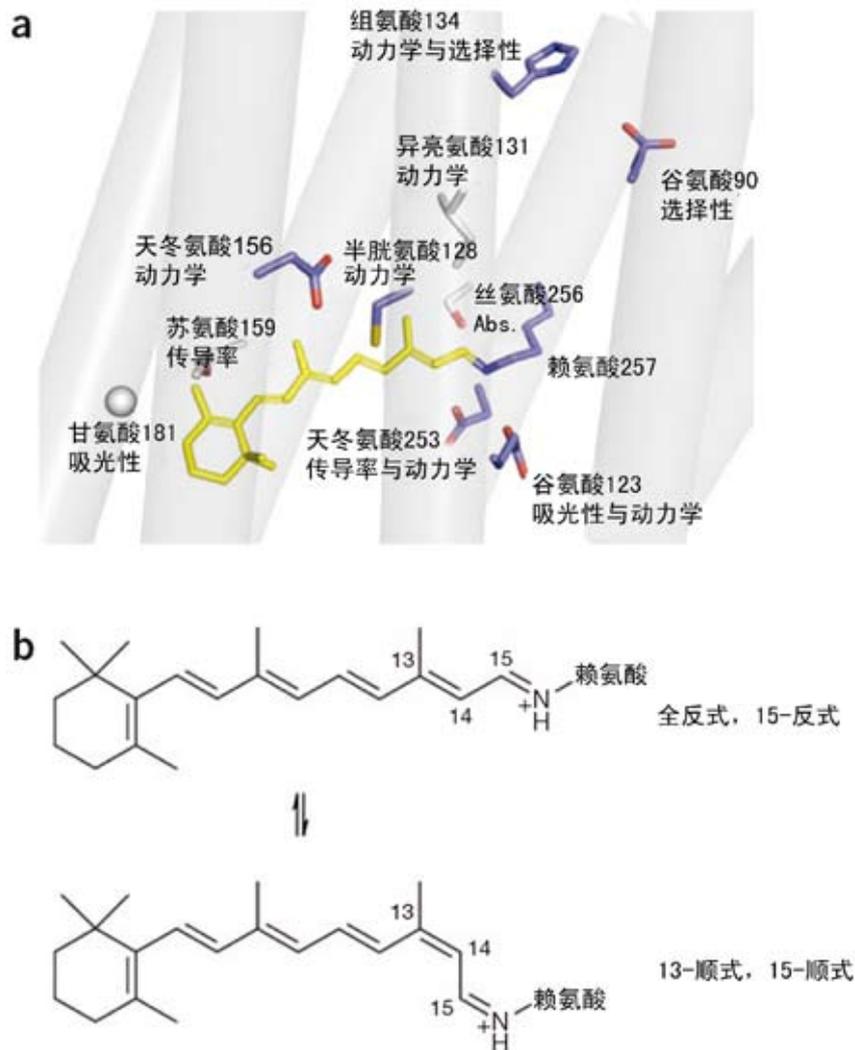


图2 通道视紫红质蛋白结构模型示意图。(a) 计算机模拟的ChR2蛋白三维结构图。将图中短棒状结构表示的氨基酸突变掉之后就能够影响到蛋白的吸光性、传导性(在不改变选择性的前提下)、动力学特征以及离子选择性等特性,正如每个突变位点下面标注的那样。图中黄色标注的是视黄醛分子,在所有四种通道视紫红质蛋白中都保守存在的氨基酸残基以蓝色表示,在各种通道视紫红质蛋白都各不相同的氨基酸残基以灰色表示。氧原子、氮原子和硫原子分别以红色、蓝色和深黄色表示。本图是Schrödinger利用Pymol软件,根据极端嗜盐古细菌(*H. salinarum*)的细菌视紫红质蛋白结构制作的。(b) 生色基团视黄醛在黑暗状态下两种同分异构体的结构图,这两种结构分别是全反式、15-反式结构和13-顺式、15-顺式结构。

提高通道视紫红质蛋白离子传导效率的方法之一，就是对蛋白上供阳离子通过的通道进行修饰，使阳离子通过的效率提高。比如，我们可以拓宽通道的孔径，使通道变得具有亲水性（admit water），创造出新的 Na^+ 离子结合位点，以便于 Na^+ 离子通过。虽然这种修饰会降低通道蛋白对所通过离子的选择性，不过可以提高更大 Na^+ 离子的通过效率。H134R和E90Q这两种突变体利用的都是这种修饰原理，在通道蛋白上创造出了新的充满水的孔道，使得离子通过效率提高了一倍，但这还远远不够。有好几个研究小组都正在开发高传导效率的通道蛋白变体，他们都有望在几年之内获得重大突破。

视紫红质蛋白的感光结构域可以通过共价键与生色基团视黄醛（retinal）相连接。视黄醛是维生素A的一种衍生物，在几乎所有脊椎动物体内都可见，其分子式见图2b。视黄醛分子在光照作用下会发生同分异构化，从顺式分子变成反式分子，反之亦然。大家普遍认为就是视黄醛分子的这种光化学同分异构反应激活了通道视紫红质蛋白，打开了离子通道。体外的（可能还包括细胞内的）通道视紫红质蛋白含有的全反式（all-trans）视黄醛分子和13-顺式（13-cis）视黄醛分子的比例是2:1。需要注意的是，在通道蛋白发生光适应（light adaptation）的过程中或者在通道蛋白接受强光照刺激时，顺式视黄醛分子和反式视黄醛分子的比并不会发生非常明显的改变。因此视黄醛分子从反式转变成顺式或者从顺式转变成反式这两种光反应是平行进行的，我们现在还不清楚这两种反应里究竟是哪一种，抑或是它们共同发挥作用，从而打开蛋白通道。为了解开这个谜题并充分了解通道视紫红质蛋白的门控工作机制，我们需要将视黄醛分子的一种构象在黑暗环境下稳定住，弄清楚这种构象分子的门控效率和动力学特点。只有将这两种构象的视黄醛分子都彻底研究清楚了我们才能从中作出选择，让它们更好地为光遗传学研究服务。

2. 改变通道视紫红质蛋白的吸收光谱

最大吸光系数（maximal extinction coefficient） ϵ 表示一个分子的通道视紫红质蛋白吸收光子的能力，大约在 $50,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。量子效率（quantum efficiency） Φ 表示的是被激活的生色基团参与反应的能力，大约在30–70%。上述这两个指标是衡量一个视紫红质蛋白最常用的两个指标。这两项指标综合起来就决定了通道视紫红质蛋白的光敏感度（light sensitivity）。这个参数很难通过分子工程学（molecular engineering）技术加以提高，这是因为光敏感度属于视黄醛分子的内在特性。幸好视黄醛结合蛋白（retinal-binding proteins）的吸收光谱非常广泛，而且这些蛋白的光吸收特性是可以通过分子工程技术加以改造的。

为了能将通道视紫红质蛋白的吸收光谱从345纳米的紫外区域拓展到超过600纳米红外区域，有一些科学家对藻类基因组进行了基因发掘工作（<http://botany.si.edu/projects/algae/index.htm>），试图找出具备各种不同吸收光谱的蛋白，还有一些人则试图对各种现有的视紫红质蛋白进行改造，主要是对蛋白中与视黄醛结合的区域进行突变（图2）。但是，要想在改变视紫红质蛋白吸收光谱的同时又不影响它的功能却比较困难。单个点突变对吸收光谱的影响通常都不会超过20纳米，因此只能采取多点突变方式。由于离子跨膜运输需要借助高度复杂的氢键网络（hydrogen bonding network）的帮助，因此多点突变很有可能会影响到通道蛋白的离子转运效率、动力学特性以及蛋白的稳定性等等。

还有一种办法就是“螺旋对换方法（helix swapping）”，即将构成一种通道蛋白跨膜孔径的螺旋结构与另一吸收光谱不同的相关通道蛋白的跨膜螺旋结构对调。Yawo研究小组就是这方面工作的先驱，他们构建了一种ChR2蛋白和ChR1蛋白的杂合体蛋白ChRGR。ChRGR蛋白

在细胞膜上的表达量很高，这一点比较象ChR2蛋白，但是它的吸收波长在505纳米，这一点又比较像ChR1蛋白，同时还具有ChR1蛋白不容易失活的动力学特点。沿着Yawo小组的思路，研究人员与Deisseroth小组展开合作，获得了ChR1蛋白和VChR1蛋白的杂合体C1V1蛋白，该蛋白也具有高表达特点，同时吸收光波长为535纳米。由于他们对于有哪些因素能够决定通道视紫红质蛋白的吸收光谱还不太了解，因此ChRGR和C1V1这两种杂合蛋白可能是进行下一轮吸收光谱改造工作的首选“教材”。

要想将通道视紫红质蛋白运用于体外培养的细胞或组织研究工作，那么通道蛋白必须具有非常宽泛的吸收光谱，这可以借助视黄醛同系物的帮助来达到。含有双键（double bonds）数目较少的视黄醛衍生物分子的吸收光谱在紫外区段，而含有甘菊环（azulene ring）的视黄醛同系物的吸收波长则超过了750纳米。但是，这些生色基团都需要化学合成才能得到，如果要想让这些物质进入细胞或组织，需要进行大量的补充，这种方法被称作化学光遗传学方法（chemooptogenetics）。

3. 通道视紫红质蛋白的晶体结构

到目前为止，人们得到的绝大多数的通道视紫红质蛋白突变体都是根据与细菌视紫红质蛋白（bacteriorhodopsin）的同源性为基础开发出来的，这是因为细菌视紫红质蛋白是目前为止最为确定，被研究得最充分的膜蛋白。但不幸的是，通道视紫红质蛋白和细菌视紫红质蛋白只有在第3~7螺旋结构上比较相近，而第1和第2螺旋结构几乎没有序列同源性可言。为了达到前面所述的改造目的，就需要得到通道视紫红质蛋白在各种不同状态下的高分辨率三维结构图。已经有人利用绿猴（green monkey）COS细胞和毕赤酵母（Pichia pastoris）细胞得到了纯化的ChR2蛋白，但是这种纯化蛋白的量很低。另外，由于通道视紫红质蛋白具有各种各样的暗适应状态，同时它们结合的视黄醛分子也具有不同的构象，加上蛋白糖基化程度也各异等等，所有这些因素都让我们很难得到一张高分辨率的通道视紫红质蛋白三维晶体结构图。

4. 对光驱动离子泵蛋白（light-driven pump）的一点补充

细菌视紫红质蛋白（bacteriorhodopsin）和嗜盐菌视紫红质蛋白（halorhodopsin）都属于光驱动离子泵蛋白（light-driven ion pumps），分别能够跨膜转运 H^+ 和 Cl^- 。它们和光门控通道蛋白（light-gated channels）完全不同，因为它们主要表现为光驱动（light driving），而不是光开关（light gating）。对于离子泵来说，跨膜转运过程永远都是“向上的”，即逆电位梯度转运，吸收光子数和转运离子数的比值小于1，而且这个比值还是固定的。离子泵的反应时间很短，开关都只在1至10个毫秒之间，不过这是针对离子浓度梯度较小的情况而已，如果离子浓度梯度较大，那么离子泵的开关速度就会变慢很多，甚至达到10倍至100倍。要对这些离子泵进行改造会比对通道蛋白进行改造困难许多。因为离子泵的光周期和光驱动力都必须保持在一定的水平，这样才能在跨膜电压存在的情况下维持离子转运工作。到目前为止，绝大多数的改造工作都没能减缓离子泵的周期或者提高离子泵的转运效率，这一点与天然的proteorhodopsin蛋白比较类似。不幸的是，科研人员对绝大部分的细菌视紫红质蛋白和嗜盐菌视紫红质蛋白开展的研究工作都是在溶液电压为0的情况下进行的，因此在将这些蛋白用于光遗传学领域之前还得重新在电压钳（voltage clamp）条件下进行一次研究。据我们所知，还从来没能通过分子改造的方法让处在高电压情况下的通道蛋白的光周期加快，但是最近有人在藻类和真菌类生物中发现了天然的快光周期，同时能在神经元细胞里高表达的离子泵蛋白。人们很难通过改造的方法得

到比天然蛋白更好的离子泵蛋白。此外，要想加快离子泵的光周期除非能够加大光照强度，让离子泵蛋白一直处于活化状态。要想让缺乏光驱动离子泵的神经元细胞在低强度光照刺激下处于超极化状态只有两种方案：从微生物基因组中找到一种高效率的 K^+ 或 Cl^- 光门控通道蛋白，或者提高现有 K^+ 或 Cl^- 光门控通道蛋白的光敏感度。

5. 新型光遗传学工具的开发方向

我们还为光激活通道蛋白未来的改造工作构思了一个全新的发展方向。改变通道视紫红质蛋白的离子选择性和转导效率比较困难，也很难用这种方法将通道视紫红质蛋白改造成一个光控的，具有高离子选择性和高转导效率的离子通道蛋白。不过，使用另一种完全不同的方法可以改变现有通道蛋白的光敏感性，而且现有的这些通道蛋白都具有非常高的离子选择性和很高的转导效率。已经有人利用化学修饰的办法，用偶氮苯（**azobenzenes**）等对光敏感的化合物对通道蛋白进行过成功的修饰，这种方法也被称作化学光遗传学方法。还有一种方法是用以核黄素（**flavin**）分子为基础构建的源自植物的、可溶性的光受体分子，比如光、氧、电压结构域（**LOV**）和以黄素腺嘌呤二核苷酸（**flavin adenine dinucleotide**）分子为基础构建的**BLUF**结构域等蓝光感受器（**sensor of blue light**）分子将不同的通道蛋白融合起来。这些感光的结构域结合到通道蛋白的分子末端、环状区域或者胞外激素结合区域上之后就能够在形成对光敏感的嵌合体蛋白分子，不需要进行化学修饰也能让通道蛋白获得光敏感性。

除了视黄醛结合蛋白之外，在细胞中还有很多使用胞内常见的核黄素（**flavin**）和四吡咯（**tetrapyrrole**）即胆绿素（**biliverdin**）作为其生色基团的光受体蛋白，这些蛋白在未来光遗传学应用中应该被重点考虑。这些蛋白与本身就具有活性的视紫红质蛋白不同，依赖核黄素和胆绿素的这些光受体蛋白需要在其他效应蛋白的配合下共同发挥作用。需要注意的是源自鞭毛小眼虫（**flagellate Euglena gracilis**）或土壤细菌**Beggiatoa sp**的光激活环化酶（**photoactivated cyclases**）能够在光控下生成第二信使**cAMP**。还有人开发出了鸟苷酸环化酶衍生物（**guanylyl cyclase derivatives**），不过，尚未在实际的研究工作中进行过验证。虽然只有很少几种微生物光受体蛋白能够从哺乳动物中发现它们的配体类似物，但是我们可以以**LOV**、**BLUF**、隐花色素（**cryptochromes**）或**Phy**等天然的受体蛋白为材料，利用遗传技术人工合成出重组的光受体蛋白。最近已经有人合成出了几种很有前途的光激活蛋白，这也为光遗传学未来的发展铺平了道路。

Lim等人撰写综述文章，详细介绍了人工光受体的设计思路以及这些蛋白在细胞生物学方面可能的应用价值。虽然只提到了几种人工合成的光激活蛋白，但是这已经足够得出以下几点结论。

结论一，有人可能会认为要想让蛋白获得光敏感性简直比登天还难，但实际情况已经证明这种担心是没有依据的。以现有的实例来看，只需要少量的突变蛋白（约**10**至**20**种）就足以制备出光激活蛋白；

结论二，即便是在不十分了解天然光受体蛋白信号机制的情况下仍然可以成功的设计出人造的光受体蛋白；

结论三，完全不同的效应蛋白，比如小**GTP**酶**Rac1**或**DNA**结合蛋白**TrpR**都能被改造成光敏感蛋白，这说明人工合成策略的应用范围非常广；

结论四，尽管不同的感光模块可能会具有同样的光化学特性，但是每一种感光模块还是会使用不同的信号机制。哪怕是同一个感光结构域也能被用于完全不同的方面，帮助调控各种效应蛋白；

结论五，人工合成的光激活蛋白同样可以诱导出生理反应，即使这些蛋白在黑暗环境和光照环境中的活性差别很小（不到10倍）也一样。

现在已经证实了人工合成手段可行，接下来就要把注意力转移到如何改进人工合成蛋白的性能、方法，以使它们更适合作为光遗传学工具上来。将来的光激活蛋白应该对光调控操作具有很宽的动态范围，同时在处于关闭状态时只能表现出很低的活性，而在开放状态时又必须具有足够高的活性。和通道视紫红质蛋白一样，人工合成的光激活蛋白也需要对光刺激和光反应具有很好的调控能力，幸好这一点通过突变操作就能很轻易地做到。与此相反，要改变感光蛋白的吸收光谱就比较困难了，比较可靠的办法是改变整个感光蛋白，比如将感受蓝光的蛋白变成感受红光的蛋白。对于人工合成蛋白的生物学功能还需要进行选择和优化，这样才能对被研究的系统进行恰到好处的控制。我们希望人工合成的光激活蛋白既能够影响细胞的基本进程，比如细胞骨架的动力学，同时也能够具备特定的效应，比如能够影响某种特定的哺乳动物激酶。

我们还需要进行进一步研究来验证是不是每一种功能都能被光控制。和作为监测分子使用的相对惰性的荧光蛋白相比，感光蛋白需要和效应蛋白发生更多的相互作用和交流才能完成最终的调控任务。因此，合成光激活蛋白都会需要更多有关感光蛋白和效应蛋白的理论知识做铺垫，这比使用荧光蛋白标签困难多了。不太可能会出现一种“万能的”方法可以用光对任何效应蛋白进行操控，只有可能具体问题具体解决。对天然感光蛋白和人工感光蛋白进行更深入的研究很有必要，这将有助于提高人工合成技术。不过还是有一些“万能”机制存在，比如光诱导的二聚化机制（light-induced dimerization）就可以通用于各种效应蛋白。

二、2011年值得期待的技术

2010年年度技术方法的评选结果已尘埃落定，光遗传学技术击败其它挑战者，拔得头筹。那么2011年，哪一项技术会胜出，勇夺年度技术方法的称号呢？锌指核酶技术（zinc-finger nucleases）、定向蛋白质组学技术（targeted proteomics）、无缝物质传输技术（seamless delivery）、单分子结构解释技术（single-molecule structure determination）、自适应光学生物成像技术（adaptive optics for biological imaging）等似乎都有可能。究竟那一项技术最终会脱颖而出？让我们拭目以待吧！

（一）锌指核酶技术

锌指核酶（zinc-finger nucleases, ZFN）可以在基因组的特定部位形成DNA双链断裂缺口，这可是一项了不起的功能。锌指核酶包含一个DNA结合部分和一个Fok1核酶结构域。基

基因组被锌指核酶打断之后，另一个外源的供体DNA就可以借助同源重组机制有效地修补这个缺口，最后将供体DNA序列置换到细胞基因组上的目的部位。目前，锌指核酶已经被成功用于好几个不同的系统，比如小鼠细胞、人类细胞、斑马鱼、植物、果蝇、大鼠等等。利用锌指核酶可以在人体细胞基因组里引入长达15 Mb的碱基对缺失突变。最近，有人利用锌指核酶在备受基因组工程学家关注的人体多能干细胞里成功地进行了细胞基因破坏操作和对基因进行标记的操作。毫无疑问，有关锌指核酶的应用研究还将继续下去。科学家们当前碰到的困难是对锌指核酶的设计问题。不过，从事技术开发的科学家们没有放弃，他们一直在进行锌指核酶设计方面的改进工作。我们有理由相信，更高效、更简便的锌指核酶构建技术将被众多研究领域广泛采用。

更多内容，请登录<http://www.lifeomics.com/?p=25879>。

(二) 定向蛋白质组学技术

定向蛋白质组学技术 (targeted proteomics) 与我们熟悉的鸟枪法技术具有本质上的区别。鸟枪法是将从一个蛋白质组样品里检出的所有质谱信号与现有的蛋白质数据库进行比对，从而对这些信号进行解析；定向蛋白质组学技术则是利用质谱仪对一组经过预筛选的蛋白质样品进行分析。这种预筛选过程是通过选择反应监控技术 (SRM) 实现的。这种监控技术主要是为三重四级杆质谱仪开发的，它专门用来探测可以代表每一个蛋白质的单一特征肽段产生的碎片离子信号。目前限制定向蛋白质组学技术被广泛应用的主要瓶颈就是缺乏高质量的SRM实验手段。过去几年，科研人员开发了特征性肽段筛选方法和可用于粗肽段样品高通量检测的SRM实验方法。随着各种SRM实验技术不断成熟，该技术也将被更多的生物研究领域所采用。

更多内容，请登录<http://www.lifeomics.com/?p=25886>。

(三) 测序技术的洪流

2010年2月，Ion Torrent公司推出了一款最新的测序仪。由于它创新性地使用了离子探测器，所以也被称作pH计式测序仪。2010年11月，Pacific Bioscience公司推出了一款最新的单分子实时测序仪——SMRT测序仪，这款测序仪的测序长度超过了1kb。2010年10月，Life Technologies公司以3.75亿美元的价格收购了Ion Torrent公司，并且继续投资支持Ion Torrent公司开发更新的测序技术。与此同时，Life Technologies公司还对自己的SOLiD测序仪进行了改进，使其获得了更高的通量。Illumina公司的HiSeq 2000测序仪据称每天的处理能力也达到了25gb，测序长度达到了大约100bp左右的水平。Roche公司则在向另一个目标冲刺，他们生产的454 GSL-FLX测序仪现在测序长度已经达到了500bp。Roche公司还计划与DNA Electronics公司合作，开发自己的半导体测序仪。现在要宣布哪一种测序技术或哪几种测序技术能够成为测序技术的主宰还为时过早，但对于那些关注测序技术发展的人们来说，2011年肯定会是不寻常的一年。

更多内容，请登录：<http://www.lifeomics.com/?p=26001>

(四) 无缝物质传输技术

科研人员数十年以来一直都在寻求一种方法，以有效地将大分子输送到活体细胞胞质中

或胞核中。科研人员为此也开发出了许多这一类技术。不过，出乎所有人意料的是，这些方法中没有一种通用于所有的大分子，只有运送DNA的效果较好。而且各种技术面临的困难也是多种多样的，比如被运送“货物”的大小会受到限制、细胞摄取的效率非常低等。科研人员对各种大分子转运技术的改进工作实际上也就是针对上述这些问题展开的攻坚工作，经过多年不懈的努力终于取得了一定的成绩。比如，成功开发出向细胞内递送被染料或量子点标记过的抗体技术，有了这种技术，科学家就能实时地对活体细胞内靶标蛋白的亚细胞定位情况开展研究工作。使用能够特异性识别组蛋白和其它染色质相关蛋白修饰情况的抗体还能够观察到染色质的修饰情况及其动态变化情况。荧光抗体输送技术的出现也是一大进步，这意味着再也不需要在胞内表达融合了荧光蛋白标签的目的蛋白了。现在，任何能够找到相应抗体的内源性蛋白都能够很好地进行胞内定位研究，哪怕是分辨率低于超高分辨率显微镜的衍射极限也无所谓。目前比较大的阻碍就是脂质双分子层，实验证明，这是用各种方法都非常难以穿透的。

更多内容，请登录：<http://www.lifeomics.com/?p=26005>

（五）单分子结构解析技术

世界上第一台X射线自由电子激光器是由美国著名的斯坦福直线加速器中心（SLAC National Accelerator Laboratory，现更名为SLAC国家加速器实验室）开发制造的直线加速器相干光源（Linac Coherent Light Source, LCLS)。该设备于2009年4月建成并投入使用。不过，LCLS设备虽然是研制成功了，但我们还需要开发设计出一系列的方法和策略才能够真的利用LCLS装置对单分子物质的结构进行解析。比如，我们需要一套可靠的方法以将单分子物质置于XFEL激光器发射的激光光路上，还需要一套最佳的拍摄方法才能利用激光衍射图谱重建出这个单分子物质高分辨率的三维结构信息。我们相信，这些问题最终一定都会得到解决的。当然对结构的分析工作也会是一大难题，还需要开发出相应的算法和软件来解决这个问题。可能我们还需要好几年的时间才能让单分子物质结构解析技术成熟起来，成为现实，不过以目前我们所取得的成绩来看，前景还是比较喜人的。我们将怀着激动的心情见证一个个奇迹的诞生。

更多内容，请登录：<http://www.lifeomics.com/?p=26040>

（六）自适应光学技术在生物成像领域里的应用

利用自适应光学技术（adaptive optics）来纠正较厚生物组织样品成像时出现的光学畸变（light distortion）现象可以极大改善组织成像质量。为了让更多的生物研究领域，尤其是活体组织成像领域都能享受到自适应光学技术带来的便利，就必须开发出一种能够间接检测到光学畸变现象的方法。这种技术终于在最近诞生了，而且已经成功地用于双光子显微镜（two-photon microscopy）对大脑皮质切片组织的观察活动中。这种方法是利用各个不同的光子孔径（subaperture）来照亮组织样品，然后在这些光线通过组织时检测每一道光线的相对位移情况，采用这种方法就足以发现并纠正光学畸变现象，获得完美的组织图像。虽然自适应光学技术在生物成像领域里的应用还只是刚刚开始，并没有得到大范围的推广，但是我们希望该技术能够在生物研究领域里大有作为，帮助科研人员们获得更清晰的组织图像，获得更深层次的组织图像。

更多内容，请登录：<http://www.lifeomics.com/?p=26043>

(七) 以系统的视角诠释疾病

越来越多人开始使用系统化的研究方法来审视人体疾病（**networking to understand disease**）。绝大多数的人体疾病都不是由单一遗传突变造成的。大部分人体疾病都是多种分子变化作用的结果，同时遗传因素、环境因素以及其它因素也会参与其中，发挥各自的作用。而且，即便是“单基因疾病”也很有可能会受到位于其它遗传位点上未发生突变的等位基因影响，或者受到其它非遗传因素的影响。因此，系统生物学（**Systems biology**）就成了大家研究疾病时必定会采用的新方法。虽然现在大家都对系统化的研究方法非常感兴趣，但是不论是发现疾病生物标志物，还是整合各种组学手段去研究病理状态下的细胞或组织，现在这些系统化研究还都处在起步阶段。我们希望在未来的几年里能看到更多系统化研究的新方法和新进展出现。

更多内容，请登录：<http://www.lifeomics.com/?p=26045>

(八) 高速三维超分辨率荧光显微镜技术

分辨率达到纳米级的高速三维荧光成像技术可以用于活体细胞观察，获得质量更高的图像，了解更多细胞的细节信息。目前，人们急需一种快速的成像手段，这样才能对一个细胞厚度的生物样品从三个维度进行纳米级分辨率的观察，也只有这样才能对活体细胞进行快速完整的观察。超高分辨率的高速三维荧光成像技术（**Fast 3D superresolution fluorescence microscopy**）弥补了这一技术空缺。有了这一新技术，我们就能以前所未有的精细程度对动态的细胞环境进行观察，这一技术无疑将成为细胞生物学家们最新最有力的实验利器。

更多内容，请登录：<http://www.lifeomics.com/?p=26046>

原文检索:

Karl Deisseroth (2010). Optogenetics. *Nature Methods*, PUBLISHED ONLINE:1-4.

Erika pastrana. (2010) Optogenetics: controlling cell function with light. *Nature Methods*, ADVANCE ONLINE PUBLICATION: 1-2.

Monya Baker. (2010) Light tools. *Nature Methods*, ADVANCE ONLINE PUBLICATION:1-4.

Peter Hegemann & Andreas Möglich.(2010) Channelrhodopsin engineering and exploration of new optogenetic tools. *Nature Methods*, PUBLISHED ONLINE: 1-4.

Jared E Toettcher, Christopher A Voigt, Orion D Weiner & Wendell A Lim.(2010) The promise of optogenetics in cell biology: interrogating molecular circuits in space and time. *Nature Methods*, PUBLISHED ONLINE: 1-4.

Saskia Schröder-Lang, Martin Schwärzel, Reinhard Seifert et al. (2007) Fast manipulation of cellular cAMP level by light in vivo. *Nature Methods*, 4:39-42.

 YORK、筱玥/编译

特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

岗位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

要求：

- 1.具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
- 2.具备良好的生命科学前沿触觉；
- 3.具备较高的外文文献翻译、编译水平；
- 4.具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
- 5.具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 editor@lifeomics.com

联系人：蔡小姐

热点话题

Hot Topics

基因组数据的明天

基因组测序技术发展到今天，面临的问题已经不再是测序技术本身，而是如何面对高通量测序技术获得的海量数据，怎么样对这些数据进行信息学储存和分析。按照现在的测序能力，一个星期里产生的数据量已经相当于几年前一个大型基因组测序中心一年的工作量。如何面对这种兆兆级字节（terabyte）的数据量已经成为了各个从事基因组研究工作实验室必须解决的问题。这么大量的数据也引发了一系列其它的问题，比如数据信息获取问题、数据安全问题、参与研究的志愿者或患者的个人隐私问题等，这些问题都需要给予足够关注，并且尽快着手解决才能促进整个基因组研究领域的快速发展。

基因组研究领域正在变成被急速扩张的海量数据淹没的领域、变成被其它各个利用基因组数据进行研究的行业所控制的领域。基因组可以小至4kb，也可以大到670Gb。有性繁殖的生物体内都会含有两个、甚至更多的基因组拷贝，即它们都是多倍体生物。人类也属于多倍体生物，在我们体内含有两个基因组拷贝，每一个拷贝中含有3.2Gb碱基对。到目前为止，科学家已经获得了数千种生物的完整基因组序列。世界上也已经有3000多人的基因组在不同程度上被测过序，这些结果都已经发表在各种各样的科技文献当中。现在，新的测序工作正以指数级别的速度迅猛发展。

新一代测序仪（next-generation sequencing, NGS）的测序能力已经达到了一台测序仪每天“生产”40Gb序列的水平，而在过去，一台测序仪每天才能获得10Mb的序列。现在，在世界上十几家主要的测序中心里，每一家都已经配备了十台以上的新一代测序仪。测序技术的发展速度如此之快，已经远远超出了信息产业里著名的摩尔定律（Moore's Law，即集成电路上

可容纳的晶体管数目，大约每隔18个月便会增加一倍，电子产品的性能也将提升一倍），也大大超出了数据储存的容量。

一般来说，如果利用一台普通的工作站对这些数据进行标准的分析需时好几个礼拜，即便利用一组服务器也得花费1至2天。于是，在基因组学研究领域里，大家开始就“原始数据（即测序结果）”的价值和定义，以及数据分享规则、如何开发能够有效界定数据信息的工具和未来几年里的数据存储等问题展开了讨论（图1）。还有一大问题，那就是如何有效地分析这些数据。在基因组研究领域里，测序技术的发展速度远远超过了生物信息学的发展速度。我们必须想办法缩小这个仍在不断拉大的差距，并且一定要在整个基因组学研究开始大跨步的向前发展、为进化以及医学等其它各个学科提供服务之前缩小这一差距。

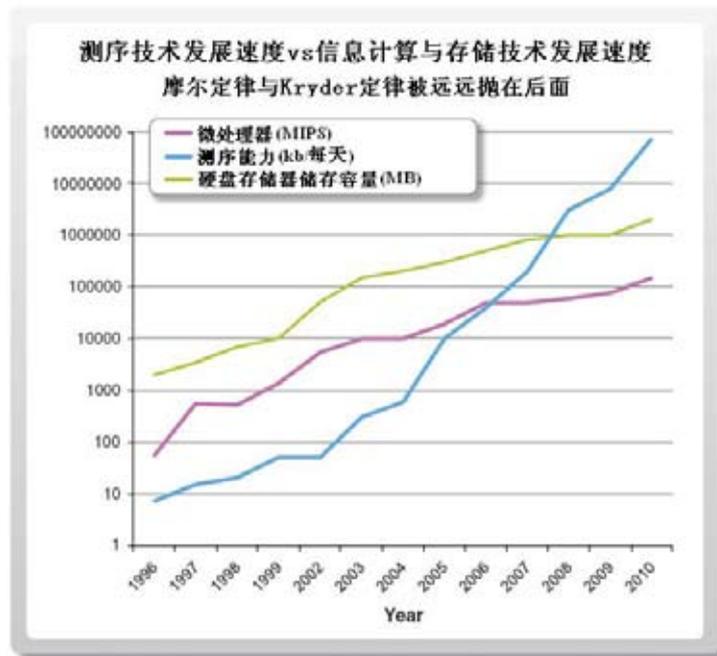


图1 测序技术的发展速度大约每9个月就提高一倍，这已经远远高过了信息产业里的摩尔定律（速度）。

而解决上述这些问题的关键就在于如何定义“原始数据”。目前，很多测序技术在对每一个碱基进行检测时都会先捕捉一些图像数据，然后对这些图像数据进行后处理，将其解析成一系列的数字信号，再根据这些信号判断出是哪一种碱基、准确性有多高，这些准确性数据又称作质量值（quality value）。这些图像信息需要的存储空间要比碱基信息占据的存储空间大得多。在很多测序实验室中，每天产生的这些图像数据都要超过5TB，如果要存储这么多图像信息显然不太实际，所以有人开发出了准实时（near real-time）图像处理工具，它可以直接获得碱基信息和质量值。

准实时处理技术的出现让测序速度得到了大幅度的提升，并摆脱了存储速度（这是制约测序速度提高的一大瓶颈）的限制。目前，虽然这种准实时处理技术还面临着一些计算方面的问

题，但是它的出现让测序数据存储需要减少了100倍。这也意味着，将来需要建档、归类和分析的数据减少了100倍。所以，现在我们对“原始数据”的定义已经出现了改变，现在认为只有碱基信息和质量值才是原始数据。

在数据格式方面也可以进行进一步的改进。正在开发当中的第三代测序技术也能得到碱基信息和质量值信息。不过，第三代测序仪得到的碱基信息和质量值信息都更加准确，以至于后续的分析工具都起不到多大的修正作用了。将来，如果有了更新的碱基信息捕捉技术、压缩技术和归档技术，那么需要的数据存储空间肯定会更小，将更有利于数据分析工作。

如果要使用测序数据进行后续的分析 and 比对工作，将测序信息转换成其它生物学信息或医学信息，那么数据的规模就成了首要关心的问题。比如，目前千人基因组项目（1000 Genomes Project, www.1000genomes.org）的数据规模大约有7.3TB，大致相当于对629个人的全基因组序列信息进行比对所需要处理的数据量。如果要从网络上获取这些信息进行操作，那么网速和数据存储能力就成了最重要的限制因素，如果要在北美的某个实验室里下载此千人基因组项目的数据，最少也需要一个星期的时间，在有的地方可能还会超过20天。就算利用云存储方式保存这些数据也不能完全解决问题，因为只有将保存在各个不同“云”里的数据整合起来，才能进行数据比对分析或者找到想要的信息。

这种分享数据方面存在的根本问题，让我们想到需要在数据格式和分享工具方面进行一些改进。如果解决不了这些问题，那么将让整个基因组学研究陷入困境。只有在信息存储处理方面取得重大突破，同时在数据定义上进行完善，才能让整个基因组学研究领域向前发展。将数据集中储存在“云”里是一个比较好的开始。

方法之一就是让数据处理向数据靠拢，而不是让数据向数据处理靠拢。能够出现这种方法还多亏服务导向架构（service-oriented architectures, SOA）。在这种架构下，所有的数据运算分析操作都被打包成了一个可移动的运算包，只要把这个运算包装到储存数据的计算机上就能进行数据分析操作。这种SOA运算包其实就像一个应用程序，它可以装在任何一台计算机上进行运算，并且完全不受地域的限制。如果不需要运算包了，可以像其它软件那样将其卸载。不过，现在又出现了一个新的问题，那就是数据处理的费用应该由谁来支付，因为实际上所有的运算工作都是由数据的存储方完成的，而不是那些真正需要对数据进行分析的研究人员完成的。计算机合作网络能够解决这个问题。

但是，值得注意的是，人类基因组数据涉及了许多问题，比如数据安全、个人隐私、数据使用时的知情同意问题等等。虽然HIPAA法案可以提供一些参考依据，帮助我们隐藏数据的来源，但是基因组数据从根本上来说都是非常容易辨别的，所以还需要制定其它的安全保障措施。美国NIH正是基于这一担心，暂时关闭了几个基因组数据库，直到人们能够评估出个人隐私信息被泄露的风险有多大，并且制定出相应的政策，以将这种风险降到最低才会重新开放。《遗传信息反歧视法案》（Genetic Information Non-discrimination Act, GINA）的通过，实际上也就是承认了基因组信息安全问题的确存在，所以才需要制定一系列的法律法规来保障基因组信息的安全，防止这些数据被人滥用。

还有一个方法可以减小基因组数据的“体积”，那就是借助基因组参考序列的帮助，将那些和参考序列不同的地方都挑出来，只对这些数据进行分析，这样就能大大地减少数据规模。这也就是说，不需要将每一个碱基全都储存下来，只需要将发生突变的碱基保存下来即可。一般来说，发生突变的位点在所有位点中占据的比例只有0.1%。如此大的“压缩比”足以解决数据发表时可能会遇到的难题，只不过到时发表的就不再是标准的序列，而是一些离散的序列片

段。不过，目前各种数据分析工具都还在开发当中，所以现在就将数据全都转换成这种“参考序列格式”还为时过早。

然而，这种参考序列格式会带来其它问题，比如如何获得整个基因组的数据质量值。在评价基因组数据衍生信息（比如基因组中哪些区域可能具有功能）时，是否了解数据的质量值就显得尤为重要。只有数据质量可靠，由此得到的其它信息才有价值。一旦数据存储问题和数据获得问题全都解决了，那么基因组数据衍生信息的质量问题和来源问题就会凸显出来。如果这些衍生信息自身在来源数据中的含义都会随着时间而改变，那么这个问题在论文发表和衍生数据搜集整理合并工作中就会显得尤为突出，因为目前还没有形成一种自动编辑、修订衍生信息的机制。

尽管人类DNA测序工作以及它在改善临床医疗质量方面的作用受到了普遍的关注，人类基因组数据本身还是可以更加丰富，有进一步提升空间的。另一个问题就是，由于很多测序数据的收集工作都是动态的，在很多时间点都可以开展收集工作，可以收集来自多种组织的数据，可以从好几个不同的地点收集数据，所以就存在一个数据质量标准不统一或者标准发生变动的问题。很多序列数据，不论是否与人类有关，都不是来源于人类的，比如病毒、细菌等物种的基因组数据就属于这种情况。因此，如何对这些源自不同物种的数据进行分析和比对也是一大问题。宏基因组学（metagenomics）等研究领域就是专门研究数据的学科，关于这些问题的元数据（metadata，所谓元数据就是关于数据的数据，包含描述数据的一系列信息就被称作元数据）要求正在制定之中，不过相关人士在具体标准事宜方面还没能达成一致意见。现在，对表观遗传学数据信息的需求更为庞大，这是由基因调控的动态特性所决定的。如前文所述，虽然我们可以借助参考序列来压缩DNA数据，但是我们却无法对表观遗传学数据和宏基因组学数据进行压缩，因为压根就不存在这方面的参考序列。

参考数据和数据标准在基因组学研究中的地位如此重要，但是目前它们却没有受到重视，这完全是不应该的。幸好已经开始有大型的业界协会着手准备从事标准参考数据和实验流程的制定工作。但是，要达成这一目标（比如开发数据标准或者临床用的突变等级对照表）还需整个研究领域全都参与进来才行。这种工作对整个信息研究领域都是很有益处的，已经有好几个跨学科的合作小组和学术会议正在筹建之中了。这一类合作工作已经取得了一定的成绩，发现了一些解决问题的关键所在。比如，电子医疗档案（electronic medical records, EMR）就是一个很好的案例，虽然一直在努力想利用基因组数据来指导临床诊断和治疗工作，但是现有的EMR系统却无法以一种有意义的方式存储基因组数据。那些临床工作者既缺乏信息学工具又缺乏相应的知识，当然捕捉不到需要的信息，无法构建出相应的数据库了。有关个性化医疗的讨论很少会关注到数据问题和信息问题，但这些问题都是实实在在的，事关技术、学术和文化等多个方面。现在就讨论新一代测序仪对医学实践工作的影响意义还显得太早。即便如此，现在就制定一个全面的、通用的、可操作的信息标准和 workflows 却正是时候。

展望



不久的将来，基因组数据还会迎来无数的机遇与挑战。缩小数据体积的工作正在进之中，应该没什么问题。不过，有关数据发表的问题一时半会儿还解决不了，除非数据质量和最基础的分析工作得到了解决。

不久的将来，数据的规模将借助参考序列来压缩，不过这需要对现有的数据分析工具进行升级，让它们能够识别新的参考数据格式。

不久的将来，对基因组数据衍生信息的保存和使用工作将成为更大的困难。这些用于临床工作的衍生信息自身所具有的特性将会带来阳性对照和阴性对照的问题，而且就应该在医疗档案中保存哪些衍生信息也会成为一大问题。同样，EMR之类的信息架构的发展以及SOA一类可扩展信息工具的升级都是推动生物研究和医学研究发展的前提条件，这是因为这些信息研究领域的进步首先能够推动测序技术的进步。

原文检索：

Scott D. Kahn. (2011) On the Future of Genomic Data. *Science*, 331:728-729.



生命世界 无奇不有

www.LifeOmics.com



生命百态

A **mazing Lives**

编者按：现代都市，为了“守护”自己的爱情，男男女女们各出奇招，使尽浑身解数，那么，大自然中的小动物们的爱情三十六计又是怎样的呢？请看下文。

动物的爱情三十六计

浪漫的邂逅

——让蜥蜴告诉你如何在异性面前脱颖而出

如果你曾经试过在熙熙攘攘的人群中向远处的某人打招呼，那么多少也会理解身处热带雨林的小动物们相互联系的艰难处境。身处事物繁多，极容易分心的环境下，它们又该如何吸引异性的眼球呢？

对于加勒比安乐蜥（Caribbean Anolis lizard）而言，横亘在它们面前的是一道难以逾越的鸿沟。这种蜥蜴生活在热带植物之间，那儿的风只能制造出几乎无法撼动植物的绵薄之力。尽管如此，周边的环境却并不如风一样平静，为了安乐，它们似乎已经自顾不暇，更何况还要讨某位“美女”蜥蜴的欢心呢？不过，山人自有妙计，一项新的研究表明：安乐蜥能够依靠细微的身体动作吸引伴侣，同时警告竞争对手离开。

另一方面，新南威尔士大学进化和生态研究中心（UNSW Evolution and Ecology Research Centre）的Terry Ord等人对八种来自牙买加和波多黎各岛屿的蜥蜴进行了研究，由此发现它们都通过进化拥有了独特的方法，使它们能从周遭的视觉“噪音”中脱颖而出。相关结果发表在《美国博物学家》（*The American Naturalist*）杂志上。

专攻社交行为和动物通信进化的Ord博士介绍说，雄性的安乐蜥会在检验它们魅力的追求行动中卖弄自己的拿手好戏，其中包含了它们精心准备的丰富多样的摇头晃脑动作。比如，它们能作出连续伏地挺身的动作，或者喷出垂肉（dewlap）——一块有色的喉扇——来宣告归属它们管辖的地盘。

Ord博士表示，蜥蜴们通过改变这些动作的速度、持续时间和尺度来向其所在环境作出反应。目前，每一种安乐蜥都已经逐渐形成了独有的信号“语言”，而且似乎还出现了地域性的“方言”。“来自不同岛屿的各种蜥蜴在对付如此繁多的视觉噪音时，到底存在多少差异，这个问题很令人关注。而在雨林中，低度的光线水平却只会使这项工作变得更加困难。”

尽管如此，研究团队还是从现实生活中找到了突破口。Ord博士解释说：“不管是喧闹的宴会现场，还是街上的一辆卡车呼啸而过，我们恐怕都经历过在嘈杂的环境中试图与别人交流的困境。在这样的环境中，我们会改变自己谈话的方式，以抵御分贝增加的背景噪音：比如提高音量或者重复自己的话，以确认别人听明白了我们要表达的信息。而这些正是那些蜥蜴实施的策略。”

“在早期的研究中，我们认为，安乐蜥可能用来抵御视觉噪音和光线不足的一个方式就是加快（扩大）自己的身体动作。于是，我们制造了一只逼真的机器安乐蜥，给它编了一套程序，使它能完成一系列速度不同的展示动作，然后记录下它用多长时间使一只真正的蜥蜴看到它的展示。研究显示，蜥蜴快速的显示动作会使结果产生明显差别，在雨林昏暗的地方尤甚。”这证实了研究者开始的想法。

而在最近的研究中，研究小组发现，不同地域的蜥蜴在吸引异性方面确实存在差异，而蜥蜴让自己引人注目的策略方式很大程度上依赖于它们起源的岛屿所在。在环境视觉噪音低的时候，波多黎各蜥蜴只是间或地显示自己的地盘所有权，以最大程度地探知周遭情况。而牙买加蜥蜴则运用包含快速伸展垂肉在内的动作进行展示，这套以不变应万变的动作使它们在各种环境条件下，都能有效地引起其领地范围内所有邻居的注意。

最后，Ord博士表示：“这项研究为不同的进化起点能导致不同的进化结果这一观点提供了极好的例证。但这仅仅表明，即使我们知道是哪种特殊的选择可能会在生物进化上起作用，也无法肯定地预知生物将会出现何等样的演变。”

原文检索：

<http://www.physorg.com/news/2011-01-lizard-style.html>

 文佳/编译



安乐蜥：学名Anolis carolinensis，鬣鳞科安乐蜥属，大型树栖性蜥蜴，主要分布在北美洲和南美洲以及西印度群岛气候温暖的地区。这种蜥蜴身体可变色，雄性的喉部有一块红色或黄色可膨胀的大垂肉，称为喉扇。

难忘的约会

——鸟儿如何利用“恐怖片效应”吸引异性

用恐怖电影来使你们的约会亲密度上升，这在青春偶像剧中是一个经典的招儿。现在，有一项关于澳大利亚鸟类的研究发现，除了人类之外，居然还有别的动物也会用同样的“恐怖片效应”来吸引雌性的注意力：它们在自己的天敌鸣叫时也顺便发出求偶信号，这种追求可真够刺激的！

我们要说的男主角就是雄性辉蓝细尾鹩莺（splendid fairy-wren），这是原产于澳洲的一种喜好性滥交的小鸟。每当听到自己的天敌伯劳鸟鸣叫时，它们不但不退避三舍，反而还堂而皇之地迎头唱上一段特别的歌儿，由此而声名在外。这种超酷的举动引起了芝加哥大学（University of Chicago）的科学家们的注意。他们为此搞了一项新研究，结果发现辉蓝细尾鹩莺这种看似不要命的行为实际上起到了呼唤未来情侣的作用——简而言之，就是利用它们的恐惧来调情。

这项研究发表在《行为生态学》杂志（*Behavioral Ecology*）上，其内容包括了科学家艰辛的野外研究。他们在南澳大利亚的一个保护区中心播放声音剪辑录音给辉蓝细尾鹩莺听。结果，实验表明：这种雄性鸟儿的“借光唱歌”行为是一种利用天敌的叫声抓住雌性鸟儿注意力的交际行为。



图2 南澳大利亚一对辉蓝细尾鸫正在它们的地盘里谈情说爱。（图片来源：Mitchell Rogers/芝加哥大学）

研究的第一作者，目前在康奈尔大学（Cornell University）读博士后的Emma Greig博士介绍说：“研究表明，雌性辉蓝细尾鸫在听到伯劳鸟（butcherbird）的鸣叫声后，确实变得特别留心。因此，我们似乎可以认为，如果雄性细尾鸫知道它们将会拥有一位特别留心的异性听众，就可能会冒着风险去唱情歌。而且，根据雌性鸟儿的反应，这个策略很可能奏效。”

研究的主要作者——生态学和进化学副教授Stephen Pruett-Jones博士进一步表示，辉蓝细尾鸫由于其特殊的社会结构，也引起了研究进化和交配方式的科学家的兴趣。尽管这种鸟儿在它们的社会圈子里是一夫一妻制，并终其一生都保持着一雄一雌的组合，但它们在性方面却很滥交，常和结发配偶之外的异性鸟儿交配。

研究者在对这种鸟儿及其近亲壮丽细尾鸫进行了数年的研究之后，注意到了伯劳鸟和特立独行的辉蓝细尾鸫这种独特而步调一致的对唱行为，这种现象被人们称之为细尾鸫的第二类鸣叫。

Pruett-Jones解释说：“伯劳鸟一开始啼鸣，雄性辉蓝细尾鸫就紧随其后开始了第二类鸣叫。这一唱一和基本上相互合拍，听起来就像是二重唱。”

不过，随着新问题的提出，研究者的推论又起了变化。为什么细尾鸫会用唱歌的方法冒险向它们的天敌暴露自己的位置所在呢？这会不会是一种对它所在领地范围内的其它细尾鸫的警告？还是一种对自身的大无畏精神和矫健体魄的显摆，以吸引异性的目光？又或者，这是博爱的它用于吸引周遭所有雌性动物注意力的高效方法？

为了解答这些问题，Greig向在野外栖居的细尾鸫先生和女士们播放了她的iPod中储存的不同组合的“歌曲”：曲目1是鸫用于宣告其领地范围的第一类鸣叫，曲目2是鸫紧随伯劳鸟啼鸣之后发出的第二类鸣叫，曲目3是鸫单独发出的第二类鸣叫。结果，实验发现，雌性鸫在播放曲目2——雄性鸫紧随伯劳鸟啼鸣之后发出的第二类鸣叫——时最为留心。这可不是随便得出的结论，而是根据雌鸟是否向鸣叫声发出的方向张望，并用它们独有的歌声回应而衡量出来的。

Pruett-Jones说，结果表明，雄性细尾鸫利用其天敌的鸣叫声作为“警报信号”来设法引起异性的注意。这就如同人类通过“嗨！”来作为开场白引起他人注意一样。不过，对于雌性细尾鸫而言，这个信号还可能包含有更多的含义，Greig如是说，比如，告知位于邻近地域

的未来情侣自己的准确方位，而且还可能悄然地为它们的交配推波助澜。

Greig进一步表示：“最激动人心的可能性就是鸚鸚的第二类鸣叫具有性功能，这种功能可使雌性鸚鸚在接收到其天敌的警报后，更易产生兴奋的感觉，或更易接受雄性的展示。这样，雄性细尾鸚鸚的歌声也就格外诱人了。”

目前还在进行的研究是测量雄性辉蓝细尾鸚鸚及其后代的身体和基因特征，以观察它们的第二类鸣叫是否与交配成功率有关联。但到目前为止，人们还未曾发现这种行为和鸟儿的健康状况有什么联系，说明第二类鸣叫并非是雄性细尾鸚鸚给自己强加的行为，从而特意用以显示自己的性感迷人以及对雌性的吸引力。

Greig说：“所有的雄性细尾鸚鸚，不论其年龄、体色还是其它个体‘素质’的标准如何，都用同样的频率献上它们的第二类鸣叫之歌。这表明，在天敌开声之后唱歌这种行为可能并不如你原先想象的那样冒险。相反，跟在它们后面鸣叫其实可能很安全。因为雄性细尾鸚鸚能够由此而知道它们对头的方位所在，并且还知道此时的对头并不热心狩猎，只是打算唱支小曲儿来散心。”

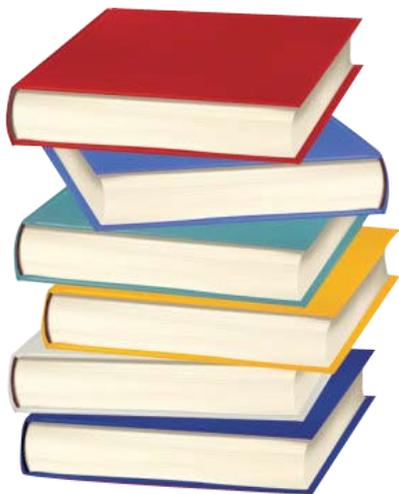
目前，Greig还在做更大范围的测试，看看除了辉蓝细尾鸚鸚和壮丽细尾鸚鸚之外，这种“恐怖片效应”在动物界的普遍程度如何。结果，他们目前只发现另外两种鸟类——仙噪刺鸚和白喉鸚鸚——被认为确实运用了类似的天敌引诱法来吸引异性。不过，研究者们相信，这种行为也可能会出现在别的物种中，只是人们尚未发现罢了。

最后，Pruett-Jones说：“我们猜想，这种行为可能会比我们原先意识到的还要平常得多。当然，现在看来，这肯定是罕见的，只是人们没有继续研究有这类行为的其它物种，并去做这类实验罢了。”这样看来，“恐怖片效应”有望荣升为动物界情人节的终极经典。

原文检索：

<http://www.physorg.com/news/2011-01-australian-birds-scary-movie-effect.html>

 文佳/编译



小词典

辉蓝细尾鸚鸚：辉蓝细尾鸚鸚（学名：*Malurus splendens*）为细尾鸚鸚科细尾鸚鸚属，主要分布于澳大利亚东南部。它们在社交上属于一夫一妻制，但双方均会进行婚外交配。繁殖期的雄鸟羽毛鲜丽，会利用鸣叫声与同类或其它鸟类进行交流，如社交、聚集和保卫地盘等。它们用于宣示其地盘的鸣叫称为第一类叫声，除此之外，雄鸟还能掌握另一种独特的鸣叫声，常在面临天敌或其它掠食鸟类时使用，被称为第二类叫声，其目的不明，但并非一种警告。

选出最佳伴侣

——雌鸟挑到“好老公” 有助于延缓衰老

和人类有共通之处的是，鸟儿们随着年岁的增大，生育能力会相应下降。不过，有一项新研究却显示：某些种类的雌鸟能通过挑到合适的配偶来减缓自身生物钟的脚步。



图4 蓝山雀夫妇（图片来源：百度百科）。

据在北卡罗莱纳州杜伦市国家进化综合中心（National Evolutionary Synthesis Center）工作的Jash Auld（本项研究的合作作者）介绍，随着岁月的悄然流逝，雌鸟的生育能力也逐渐下降。他还解释说，年龄较大的雌鸟产卵量减少，同时在缺乏食物，不利于幼鸟生长发育的季节里会推迟产卵。

不过，尽管目前有大量的证据表明雌性的生育能力随年龄增长会逐渐消逝，但神奇的生命总暗藏着不为人知的一面。比如，科学家就不太了解雌鸟的配偶对它们所起的作用，正如Auld所说：“他们原以为这跟雄性没什么关系。”

现在，研究者们就打算确认一下雄性因素是否对雌性的生育能力有影响。为此，他们利用了一套有关蓝山雀（blue tit）的长期研究数据。这套数据的研究始自20世纪70年代末，迄今为止已囊括了法国科西嘉岛上数千只这种蓝黄相间的林鸟的研究记录。

蓝山雀是生长在林地的山雀科鸟类，它们每年繁育一次，却常常在每个季节换一个伴侣。于是，科学家们在鸟儿们的脚踝上缚上一条用以识别其身份的带子，然后监测它们的窝巢。这样，他们就能追踪观察鸟儿的配对对象、产卵数量，以及它们是如何含辛茹苦地喂养幼鸟的了。

研究者们分析了1979年至2007年间大约600对雌性和雄性蓝山雀的生活史数据，发现了一个出人意料的结果：随着年岁的增长，雌性蓝山雀生育能力的消逝速度部分依赖于其配偶。

研究者们发现：对于雌性而言，最重要的东西不是年龄，也不是配偶的身份，而是配偶过去做父亲的经历。“即雄性发生关系的‘经历’。”一位合作作者Anne Charmantier说，她在法国国家科学研究中心（France's National Center for Scientific Research）——在当地简称为‘CNRS’工作。

对于雌性蓝山雀而言，如果它们与第一次做爸爸的年轻雄鸟配对，自己的生育能力就会衰

退得慢一些。Auld表示：“雌性要是一而再地与较早繁殖的雄鸟配对，就会受益无穷。因为它们不会衰老得那么快。”

提早做父亲的雄性——指在它们一岁以内——可能会更为强健，也会比推迟做父亲的同性拥有更多的交配经验。Charmantier解释说：“较早开始哺育后代的雄性可能拥有更好的条件，或者拥有较少的依赖负担。”

另外，更强健或经验较为丰富的雄鸟在抚养后代时也可能成为更好的伴侣；如此这样，时光就会较少地给母亲留下岁月的印记。Auld表示：“雄鸟能帮助雌鸟筑窝，当雌鸟产卵和孵育时，雄鸟还会为它衔来食物；当雌鸟孵出幼鸟时，雄鸟也会帮它照顾小鸟。”

最后，他补充道，其实雌性的全盛时期流逝得快慢与否，与雄性有很大的关系。可以说，雄性在这方面所起的作用比人们先前认为的要重要得多。目前，这项研究发表在*Oikos*（北欧生态学会出版的一份专业性期刊，是生态学领域中的主要学术期刊之一）今年1月份第12期的在线杂志上。

原文检索：

<http://www.sciencedaily.com/releases/2011/01/110118101515.htm>

 文佳/编译

研究前沿

www.LifeOmic.com



A group of people are performing a human pyramid against a cloudy sky with a bright sun. The pyramid consists of four people standing on the ground, two on their shoulders, and one on top. The text is overlaid on the center of the image.

合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广

请致电 (020) 32051255



www.LifeOmics.com

www.LifeOmics.cn