



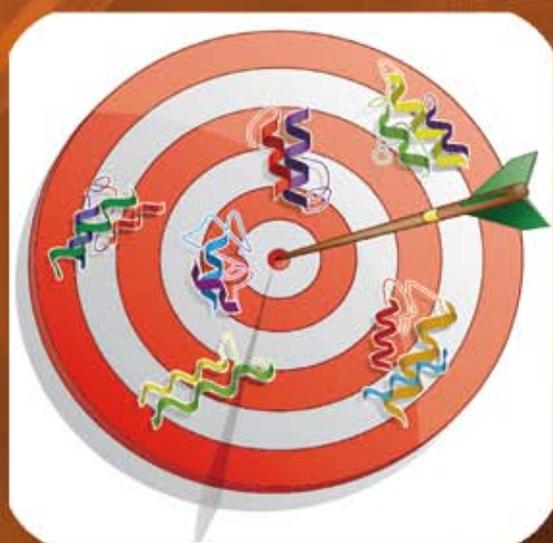
www.LifeOmics.com

www.LifeOmics.com

生命奥秘

2013年 4月刊
总第54期

LifeOmics



定向蛋白质组学技术

探究有“前途”的组学

生于忧患，死于安乐——海洋保护区对周边渔场的促进作用



无奇不有

生命世界

解读生命

走进科学

目录 | CONTENTS

专题

定向蛋白质组学技术

前言

一、定向蛋白质组学技术	02
1. 定向蛋白质组学技术	02
2. 基于定向蛋白质组学的质谱检测技术	09
3. 符合科研规范的蛋白质组学研究工作	11
4. 定向质谱分析技术在生物医药领域里的定量分析作用	17
二、值得关注的重要技术与方法学领域的发展	26
1. 颠覆性的纳米孔技术	26
2. 探索微生物组功能	26
3. 近红外观测技术	27
4. 不完美但是很有用的钻石	27
5. 在体外重建干细胞生存的微环境	28
6. 快速容积成像新技术	28
7. 蛋白复合体无损质谱鉴定新方法	29
8. 可以自动分辨表型的机器	29

下一期（2013年5月刊）预告：炎症的“阴”与“阳”

炎症虽然对感染过程非常有益，但是它实质上却会促成几种年龄相关的慢性疾病，例如代谢性疾病/2型糖尿病、心血管疾病以及退行性疾病的发生。下一期生命奥秘将会以《炎症的“阴”与“阳”》为题，概述炎症在慢性疾病中的有害作用（当然，某些情况下，炎症倒是起着有益作用的）。

热点

一专多能的视蛋白	31
探究有“前途”的组学	37

百态

生于忧患，死于安乐——海洋保护区对周边渔场的促进作用	47
----------------------------------	----

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。



专题

Worthy Issues

定向蛋白质组学技术

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进行回顾与总结，由此评选出当年最受瞩目、影响力最大的技术。2012年，定向蛋白质组学技术（targeted proteomics）荣膺《自然-方法》年度生命科学技术。

本期《自然-方法》使用较多篇幅向我们介绍了质谱技术是如何逐步发展起来的，并概述了它是如何与定向蛋白质组学技术联用，以研究基础及转化医学研究的。

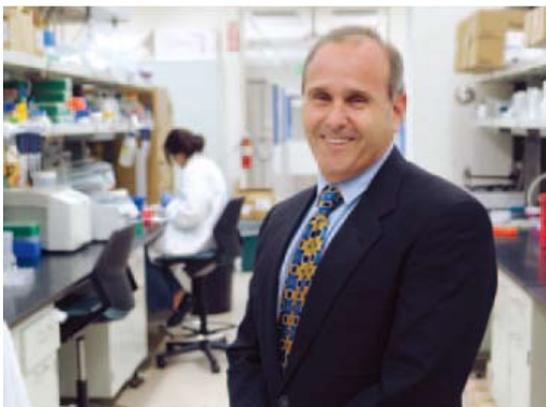
此外，本期《自然-方法》还向我们展示了一系列精心挑选的、在未来几年内值得关注的重要技术与方法学领域的发展，包括颠覆性的纳米孔技术、探索微生物组功能、近红外观测技术、不完美但是很有用的钻石、在体外重建干细胞生存的微环境、快速容积成像新技术、蛋白复合体无损质谱鉴定新方法以及可以自动分辨表型的机器。

一、定向蛋白质组学技术

1. 定向蛋白质组学技术

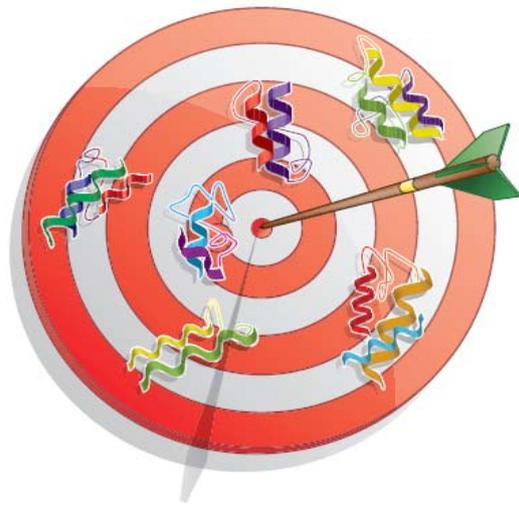
有针对性地，对预先选定的蛋白质进行分析可以为更多的生物学家们提供更准确的定量结果，而且这种试验的敏感性也更高，这就是所谓的定向蛋白质组学（Targeted proteomics）技术。

虽然科学家们已经将人类以及其它很多种生物基因组中的蛋白质编码基因“搜刮”得差不多了，但是现在还没人知道这些基因究竟编码生成了多少种蛋白质。再加上存在可变剪接机制（splice form）和翻译后修饰机制（post-translational modification, PTM），情况就变得更加复杂，所以美国亚利桑那州立大学的Josh LaBaer用“令人震惊的”这个词来形容蛋白质种类的数量。LaBaer现在是美国人类蛋白质组织（US Human Proteome Organization）的主席。他指出，蛋白质也是动态的，它们不停地改变，可能这一分钟还处于磷酸化状态，但是下一分钟就会被去磷酸化。研究蛋白质的科学是一门非常神奇的科学，然而蛋白质的这些特性却让科学家们很难对其进行精准的检测和研究。



定向蛋白质组学技术就是为高通量生物研究应用（high-throughput biology）而生的。

——Josh LaBaer



定向蛋白质组学试验只针对目标蛋白质，所以具有更高的敏感性、定量更准确，同时试验的重复性也更高。

比如科学家们在研究患病时体内蛋白质发生了哪些变化的时候，就非常需要一种可靠的、可定量的研究手段来对体内蛋白质的水平进行检测，此时质谱技术（mass spectrometers）就是最好的选择。但是通常来说，根据所谓的“发现蛋白质组学试验（discovery proteomics experiments，在这种实验中主要利用质谱仪对被检测样品中含有的蛋白质进行鉴定，其主要目的就是发现被检测样品中都含有哪些蛋白质）”得来的数据对生物学家们的价值和帮助都不太大。不过在定向蛋白质组学研究工作中只会针对某些特定的

目标蛋白进行检测和分析，这就可以为生物学家们提供更准确的定量试验结果，而且这种试验的敏感性也更高，所以这种研究策略在近几年里得到了越来越多的科研人员的追捧。

“我个人非常不愿意听到有人说他们通过质谱鉴定试验又发现了多少种蛋白质、肽段或者磷酸化蛋白这样的消息。从事蛋白质组学研究的科研人员只会互相攀比谁发现的蛋白质更多，这种现象已经持续得太久了，可发现一个有用的蛋白质要比发现1万个没用的蛋白质有价值得多。”一位不愿意透露姓名的科研人员这样说道，他对发现蛋白质组学研究一直持批评态度。

科研人员在开展科研工作时都喜欢追踪研究热点，对那几十或者上百个更容易获得科研经费的蛋白质开展研究，大家都希望能够在自己的实验室里围绕整个蛋白质组里的这么几个蛋白做出一点可重复的、量化的研究成果。DNA测序（DNA sequencing）、全基因组分析（genome analysis）以及基因表达谱分析（gene expression analysis）等高通量的生物学试验已经产生了海量的数据，这些数据已经表明某些基因和细胞通路的活化与某些疾病或者信号通路相关。对此，LaBaer认为，如今正在开展的蛋白质组学研究则更进一步，而且也告诉我们下一步该往哪走。定向蛋白质组学研究可以帮助科研人员找到研究方向，集中火力，更精准地针对某一些重要的目标蛋白开展研究，早日取得研究成果。

定向质谱技术同样需要使用质谱仪，不过却可以解决特定的生物学问题，这与以往以发现蛋白质为主要目的的蛋白质发现组学研究可完全不一样，两者有着本质的区别。

使用蛋白质发现组学研究策略对蛋白样品进行分析时会碰到很多障碍。瑞士苏黎士瑞士联邦理工学院系统分子生物学研究所（Institute of Molecular Systems Biology at the Swiss Federal Institute of Technology in Zurich）的Ruedi Aebersold就如此介绍。比如可能会有两个课题组同时在做同样的试验，但

是他们的试验结果却各不相同。可能谁都没有错，只不过是因为大家检测的样品有所差异而已。

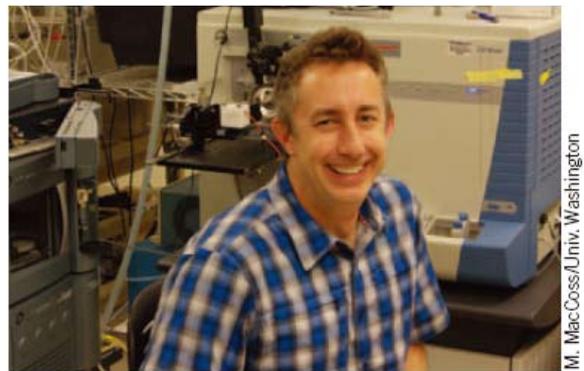
“由于采样的空间比较大，再加上质谱仪方面存在误差，所以每一次试验都会有所不同。” Aebersold解释说。

美国华盛顿大学（University of Washington）的Michael MacCoss接着指出，关于定向蛋白质组学研究，他个人最看重的一点就是人们可以通过这种研究回答自身感兴趣的科学问题。他认为这项技术已经让整个蛋白质组学研究的思维方式发生了根本性的变化。现在的蛋白质组学研究已经不再是过去那种发现式的研究方式（即看重从样品中发现了多少蛋白质），而是变成了定向式的研究方式，即根据提出的科学假说设计定量检测试验，有针对性地回答这些科学问题。

美国加利福尼亚州Buck老龄化研究所（Buck Institute for Research on Aging in Novato, California）的Brad Gibson也认为科



Ruedi Aebersold希望有更多的实验室采用定向蛋白质组学研究策略。



定向蛋白质组学技术最让我中意的一点就是我可以用来回答自己感兴趣的科学问题。

——Michael MacCoss

研究人员在对多种条件下的复杂蛋白质组进行探索、检测、发现乃至定量研究时，《自然》评出的2012年度技术（2012 Method of the Year）——定向蛋白质组学技术会给他们“提一个醒”。比如了解一个样品中某些蛋白的信息及其浓度有助于生物学家了解某条信号通路是否被激活了，还可以为生物学家提供线索，帮助他们发现在生物学功能方面出现了哪些改变。再比如在临床工作中，如果对动物模型血液里某些蛋白质的水平进行监测，就可以发现某种药物是否对动物体内的肿瘤发生了作用，使用这种方法就可以筛选出有效的抗癌药物。

1.1 站在巨人的肩上

虽然在定向蛋白质组学研究工作中使用质谱技术只是在近期才刚刚兴起的，但是该技术从一开始就已经站在了巨人的肩上，因为其发展离不开在20世纪70年代末才开发出来的三重四极杆质谱仪（triple quadrupole mass spectrometer）。

作为一款主要用于化学分析的仪器，三重四极杆质谱仪主要还是应用于制药研究领域。使用这种技术可以对血液里的药物代谢产物进行精确的定量研究，这已经成为了一个标准化的分析手段，具有非常高的可重复性，已经被业界广泛采用。Aebersold的合作者，美国西雅图系统生物学研究所（Institute for Systems Biology in Seattle）的Rob Moritz介绍说，这



定向质谱技术是带领我们走出蛋白质组学数据泥潭的好帮手。

——Rob Moritz

种高精确性的三重四极杆质谱仪已经成为制药公司必不可少的一项设备，为了通过美国食品与药品监督管理局（FDA）的严格检验，制药公司们也 and 质谱仪生产厂家展开了长期的合作，以便获得精确的、可重复的检测结果。

负责美国麻省理工学院博大研究院（Broad Institute of MIT）和哈佛大学（Harvard）蛋白质组学平台的Steven Carr也赞同道：“从事质谱工作的前辈们当年的主要研究对象都是小分子物质。”



从事质谱工作的前辈们当年的主要研究对象都是小分子物质。

——Steven Carr

过去的化学家们为

了使被检样品没那么复杂，往往都会先将其中的蛋白质给去除掉。从事定向蛋白质组学研究的科研人员也希望他们的样品能够尽可能地简单，但是他们恰好需要其中的蛋白质，不过幸运的是，他们可以利用质谱仪做到这一点。

正如Carr所说的，使用定向质谱检测技术对肽段进行分析的历史可以追溯到20世纪80年代，当时美国田纳西大学（University of Tennessee）的Dominic Desiderio就曾经使用这种技术对大脑里发现的肽段进行过有选择性的研究。

除了三重四极杆质谱技术之外，用于产生气态离子的电喷射离子化技术（electrospray ionization）以及其它一些更新的质谱检测技术也都为定向质谱鉴定技术的发展和铺平了道路。

在三重四极杆质谱仪中还可以用到选择反应监测技术（selected reaction monitoring, SRM），这样就能够确保质谱仪只对某些预先确定的、特定的蛋白质和肽段进行分析。这种SRM技术有时也被称作多重反应监测技术（multiple reaction monitoring, MRM），其原理其实和利用抗体对蛋白质进行特异性识别

和鉴定的免疫检测方法的原理差不多。很多科研人员都认为免疫检测技术的灵敏度要比质谱鉴定技术高得多，不过也有人不这么看，每种技术都有自己的拥护者（详见背景知识框1）。但是这种依赖抗体的免疫检测技术很难大面积、大批量地操作。另外，抗体质量的不稳定，以及不易获得等原因也在一定程度上限制了这种免疫技术的应用。MacCoss认为大家一定会选择质谱技术而不是免疫方法，因为这样就可以彻底摆脱抗体的束缚。

荷兰乌德勒支大学（Utrecht University in The Netherlands）的质谱专家Albert Heck也认为，如果使用免疫技术从1万个蛋白质中挑选出一个目的蛋白还是不太现实。Heck表示，如果要在一次实验里发现1万个蛋白最合适的方法还是发现质谱策略，而SRM技术刚好弥补了免疫检测技术和发现质谱技术之间的空档。而且Heck认为这种技术组合最适合用于检测每1000个病人或者疾病中才会出现100次的那种蛋白。

背景知识1：依赖抗体的定向技术

一直以来，科研人员在对蛋白质和肽段进行定量检测时主要依靠的都是抗体或者其它亲和试剂。但问题是，并不是每一种蛋白都会找到对应的抗体，即便能找到相应的抗体，质量也得不到保证。现在已经有一些组织和机构开始着手解决这个问题，比如Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>) 组织就计划为人类基因组中的每一个编码蛋白开发至少两种可靠的抗体；《自然》杂志社参与组建的Antibodypedia (<http://www.antibodypedia.com/>) 数据库则主要提供现有的抗体资源信息；由美国国立健康研究院发起的蛋白质捕获试剂项目（Us National Institutes of Health Protein Capture Reagents program, <http://commonfund.nih.gov/proteincapture/>）则主要致力于开发可更新的亲和试剂。

LaBaer使用的蛋白质芯片也是一种研究蛋白质的定向工具，不过它不能对样品中的目标蛋白质进行定量检测，只能进行定性检测，这也是一种免疫检测技术。我们可以使用这种芯片对自身免疫病、糖尿病或者肿瘤等疾病进行检测。

LaBaer非常看好将免疫技术与定向质谱技术相结合的发展方向。他认为肽段的离子化处理存在效率差异问题，这样就会导致质谱分析过程中丢失数据。即便是像SRM这样的高灵敏度质谱仪也无法完全避免这个问题，而使用抗体的免疫技术在这方面的表现就要好得多。

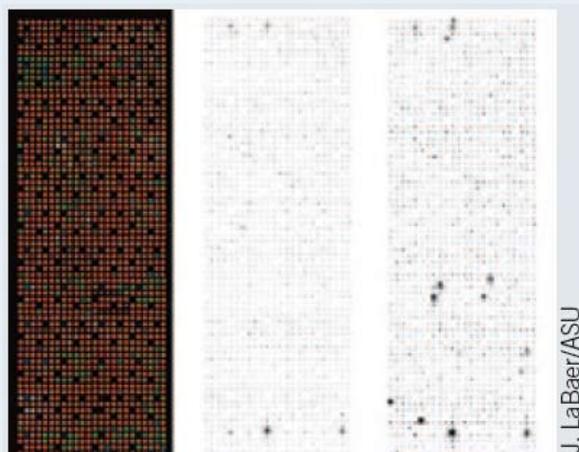
“不过如果你的试验不太容易出现这种问题，那么你可以忽视它。” LaBaer也这样说道。

由美国华盛顿Plasma蛋白质组学研究所（Plasma

Proteome Institute）所长Leigh Anderson开发的SISCAPA技术就是这样一种杂交技术。他们首先会使用抗体将目标蛋白质富集起来，然后进行分析。Fred Hutchinson癌症研究中心（Fred Hutchinson Cancer Research Center）的Amanda Paulovich和Broad研究院（Broad Institute）的Steven Carr都在使用这项技术。

SISCAPA技术不仅可以进行多路操作，而且也可以进行深入分析。据Carr介绍，在一步试验过程中，可以检测到血液里低至ng/ml水平的蛋白。这是普通生物检测技术很难做到的。

Carr还指出，抗体检测技术有其敏感性和特异性方面的优势，可是在质谱试验中我们还得先进行分析准备工作，只有这样才能检测到水平很低的蛋白质。



蛋白质芯片使用免疫检测技术发现与疾病相关的蛋白。图中左侧的是阳性质控，中间是健康妇女血样检测结果，右侧是乳腺癌患者血样检测结果。

1.2 走出数据的泥潭

据Moritz介绍，在发现蛋白质组学研究策略中，科研人员必须与数据库进行比对，从中找出与实验结果相匹配的序列，通过这种方式确定被检出的是哪种蛋白。

所以Moritz将这种工作称作“泥塘式的（quagmire）”蛋白质组学研究方式。这种方式可以直接发现高丰度的蛋白，但是几乎永远不可能发现低丰度的蛋白，可这些蛋白却往往是最重要、最具生物学意义的蛋白。

而且这种复杂的数据分析工作将很多人都挡在了门外。据Aebersold介绍，只有很少几个实验室在从事这方面的工作，所以他认为这种情况应该被改变。最近取得长足进步，而且被更多人关注的定向质谱技术有望改变这一现状，让更多的科研人员有机会使用到质谱技术，并且利用质谱技术对自己感兴趣的蛋白开展研究工作。定向蛋白质组学策略与发现蛋白质组学策略的不同之处在于它可以简化后续的分析工作，不再需要复杂的生物信息学处理流程。所以Aebersold相信绝大部分都可以开展这方面的工作。

Aebersold对定向蛋白质组学技术寄予了厚望。他的梦想就是让这项技术进入每一个实验室。这些实验室现在可能还在用western blot技术开展研究。他希望定向质谱技术可以彻底改变这一切。定向质谱技术的另外一个应用热点就是系统生物学（systems biology）领域，这方面的工作需要对多种条件下的蛋白质作用网络进行研究，所以对复杂样品处理技术的敏感性要求特别高，而且需要开展连续性的研究，质谱技术刚好就能满足他们的需求。

不过不论采用哪种蛋白质组学研究策略，其中的试验分析工作都是差不多的，即首先将蛋白质分解成更小的肽段（peptide），然后对肽段进行离子化处理（ionized），再根据肽段离子的质荷比进行分离和分析，得出最终的质谱检测结果。

不过在使用SRM技术时，科研人员会先确定待检样品中有哪一些蛋白是他们感兴

趣的、需要对其进行研究的靶标，然后在三重四连杆质谱仪上设定一套程序，进行SRM试验，这样在试验过程中就只会对目标肽段（proteotypic peptide）进行检测和分析了。这些肽段不仅可以代表目标蛋白，而且还具有独特的生物化学特性，这样质谱仪就更容易发现它们，所以根据我们设定的程序质谱仪就可以自动对目标蛋白完成检测。

1.3 更高的灵敏度

与发现质谱技术相比，高灵敏度是SRM技术的一大优势。正如Moritz介绍的那样，如果我们告诉质谱仪只对样品中的某些片段进行检测，那么就可以充分利用质谱仪的动态范围，找出样品中极微量的那些蛋白（这些蛋白可能在一个细胞中只有不到10个），并对其进行分析。所以Heck也认为目标肽段选择以及试验技术开发工作是决定质谱技术灵敏度的关键，也是决定广大科研人员从事科研工作时是否选择该技术的关键。

可重复性也是定向质谱技术让众多科研工作者非常关注的一大优势。据Moritz介绍，SRM试验完全可以在任意一个实验室里，任意一台质谱仪上进行重复，所以完全不需要回到自己的实验室里重复实验。而且每一个实验室都可以使用同样的程序，这样也有利于不同实验室之间进行比较。

Carr等人在美国选择了8个实验室进行了血样分析试验，结果发现在这些使用不同质谱仪的实验室里，SRM试验的可重复性还是非常高的。Gibson是Carr的合作者之一，据他介绍他们以前也非常关注试验的可重复性，不过还没有人专门做过这方面的比较研究。Carr认为，他们的这项研究表明，质谱技术不再是某个实验室的专利，其实随便哪个实验室都可以开展这方面的工作，而SRM技术就完全可以满足试验对定向特异性和可重复性的诸多要求。

SRM技术的另外一大优势就是“快”。只要设定好了程序，试验速度要比普通的发现式质谱技术快很多，而且还具备多路处理能

力，可以在一次试验中对成百上千种蛋白进行检测。近几年来开发的新技术都已经具备了目标肽段快速选择功能，同时还可以使用SRM试验对新蛋白以及新的蛋白剪接体进行分析。

Aebersold认为，定向蛋白质组学技术的定向和定量优势更加适合开展生物学研究中常用的假说验证类（即先提出假说，再用试验加以证明）研究工作。比如在研究某一条信号通路时可以观察某些蛋白的表达量是上调了还是下调了，是被磷酸化修饰了还是发生了去磷酸化修饰等。科研人员还可以使用SRM技术获得准确、可靠，并且可重复的试验结果。“虽然你不需要去发现一个新蛋白。可如果科研人员对某条信号通路一无所知，那么最好就不要选择这种方法自讨苦吃了。” Aebersold说道。

1.4 为迎接定向蛋白质组学技术做好准备吧

多年以来，质谱仪制造厂商已经为提高质谱技术的灵敏度、动态范围、特异性、分辨率以及准确性做了大量的工作。不过这一切还是没能完全满足定向蛋白质组学研究工作的要求，所以MacCoss和软件工程师Brendan MacLean等人又开发出了开源软件Skyline。该软件可以在多种质谱平台上使用，科研人员可以使用这种软件自己定义检测程序，同时也



Brendan MacLean是MacCoss实验室的软件工程师，他主要负责开发的Skyline软件正在被很多人使用。

可以对试验数据进行分析。这样生物学家们就可以专注于生物学问题，而无需考虑质谱技术问题。

据Heck介绍，目前Skyline软件的装机量已经达到了1.3万台次，在从事蛋白质组学研究的科研人员中几乎已经成为了人人必备的专用软件。Gibson也介绍说这款软件俨然已经成为了业界的金标准。随着定向蛋白质组学技术的不断发展，将来一定会出现新的问题和瓶颈，所以也需要不断的开发新的技术和软件。

还有一些与定向蛋白质组学研究相关的资源，比如SRM Atlas (<http://www.srmatlas.org/>)等。据Moritz介绍，他和Aebersold等蛋白质组学研究人员在近几年里已经针对人类蛋白、小鼠蛋白和酵母蛋白开发、设计出了17万种SRM试验方案，而且全都经过了试验验证。下一步他们很快就会把这些资料公布到网上。

1.5 多一种选择

在去年还出现了一种新技术，那就是由Aebersold和质谱仪制造商AB SCIEX公司共同开发的SWATH质谱技术。据Gibson介绍，他们一直都知道动态范围是个大问题。在传统的依赖数据采集的发现式研究策略中，质谱仪只会挑选出信号最强的峰进行分析，而SWATH技术是不依赖数据采集的（data-independent acquisition, DIA）。这种DIA策略最开始是由美国Scripps研究所（Scripps Research Institute）的John Yates实验室提出的。随着技术的进步，这种概念也逐步得到了应用，因为更新的技术处理速度更快，可以在一秒内扫描更多次，而且敏感度也更高。有了DIA技术，所有位于预先选定的质量窗（mass window）内的肽段都会被选定并进行碎片化处理，这样就可以做到更有选择的质谱分析。

“我认为这种DIA技术有助于我们更好地处理数据。” MacCoss这样说道，同时他也相信DIA技术在不久的将来一定会成为蛋白质组学研究工作中的一项重要技术。有了SWATH技术，定向质谱技术也进入到了一个更高层次

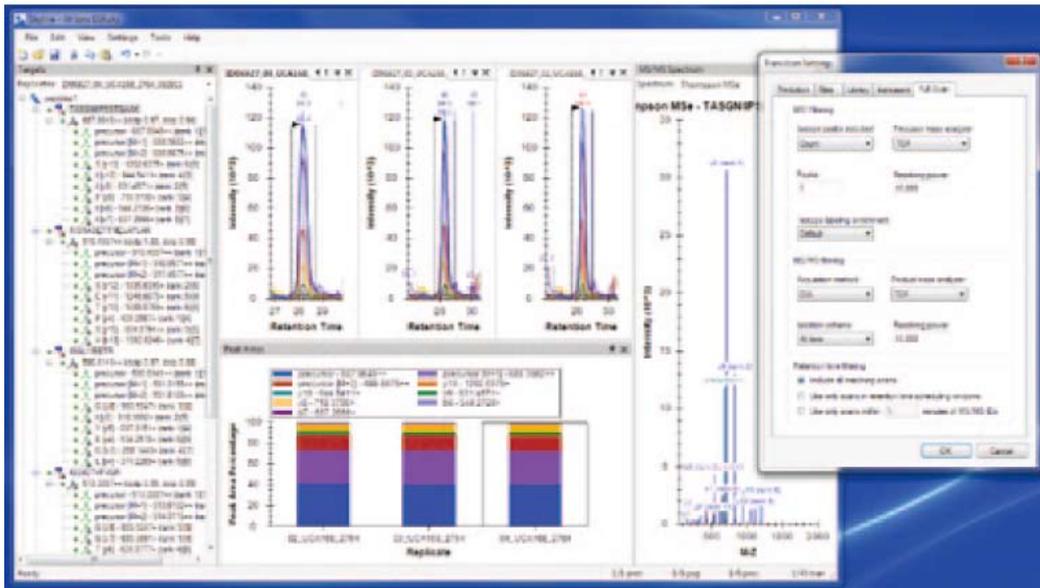
的高通量阶段，处理能力要比SRM时代更强大。MacCoss等人还在继续为DIA技术开发相应的软件，同时也在对Skyline软件进行升级，使其能够更好地适应技术的进步。

与此同时，Gibson等人也在想办法提高SRM技术的处理能力。据他介绍，目前的质谱仪每秒都会对样品中的所有肽段扫描一次，可以这样连续扫描1个小时。基于能够在特定时间对特定肽段进行离子化处理的技术，Gibson等人专门设定了一个时间窗，用这种方法捕捉特定的肽段加以分析。Gibson表示，这种方法可以使肽段定向处理能力提高四倍。

Carr则提出了另外一种构想，他将碎片化处理技术与质谱技术结合在一起。据Carr介

绍，他们的想法就是想办法让更少的样品进入质谱仪。通常情况下，在进行质谱分析时最主要的结果都是那些丰度最高的蛋白质，它们将低丰度的蛋白完全给遮盖起来了；而碎片化处理技术可以让科研人员进入蛋白质组的内部，揪出那些老是被我们忽略的，一直无法检出的蛋白。

Carr相信，随着技术的不断进步和成熟，敏感性、特异性、可信度和定量处理能力都会有进一步的提升，这也会使定向蛋白质组学研究更进一步。Carr充满信心的指出，这会是一场持久战，但是这个过程一定会充满乐趣，而且一定会取得更好的结果。



M. MacCoss/Univ. Washington

Skyline是一款开源软件，可以在多种质谱平台上使用，科研人员可以使用这种软件自己定义检测程序，同时也可以对试验数据进行分析。



2. 基于定向蛋白质组学的质谱检测技术

本文简要介绍了一种专门为定向蛋白质组学（targeted proteomics）应用而开发的质谱检测技术（mass spectrometry technology）。

现在有很多种试验技术都可以应用于蛋白质组学研究工作中，但是质谱检测技术无疑是其中最为重要的一项技术，这一点毋庸置疑。但是在蛋白质组学质谱鉴定方面却存在两种截然不同的研究策略，它们分别是先发现再鉴定的研究策略（discovery-based identification）和定向鉴定的研究策略（targeted quantification）。

2.1 先发现还是先鉴定？

如果使用先发现再鉴定的研究策略，那么科研人员就应该尽可能地发现更多的蛋白质。可是如果使用定向鉴定的研究策略，那么研究人员只需要关注那几个他们感兴趣的蛋白质就可以了，不过此时需要重点考虑的是试验手段的高灵敏度、定量高精确性以及试验结果的可重复性。

不过不论采取上面哪种策略，基本的试验流程都是差不多的，都需要先使用各种生物化学技术将蛋白质从生物样本中提取出来，然后使用蛋白酶在特定的位点对蛋白质进行降解，将蛋白质进一步分解成各种肽段。这些肽段再经液相色谱操作（liquid chromatography）进行分离，最后每一个肽段再经过电喷雾离子化步骤（electrospray ionization）处理完成质谱鉴定，最终得到每一个肽段离子（peptide ion）的质荷比（mass-to-charge ratio, m/z ratio）。

在一个典型的先发现再鉴定的试验中，质谱仪会根据每一个肽段离子的信号强度自动对其进行选择。组成蛋白质的每一条肽段经过这种裂解操作之后都会生成一连串复杂而且信息含量非常丰富的连续质谱信号。将试验操作所得的质谱信号与数据库中的质谱信号进行比对就可以得出原始肽段的信息，进而经过生物信

息学处理和精心的分析就可以得出原始蛋白质的整体信息。

不过在一个典型的定向鉴定的试验中，质谱仪只会搜集来自目标蛋白的特定肽段离子（peptide ion）。相比先发现再鉴定的工作，这种工作策略需要在前期做更多的准备，但是只要得到了目标蛋白，后期的质谱分析工作就会更有针对性，也更容易很多。

2.2 老当益壮的质谱检测技术

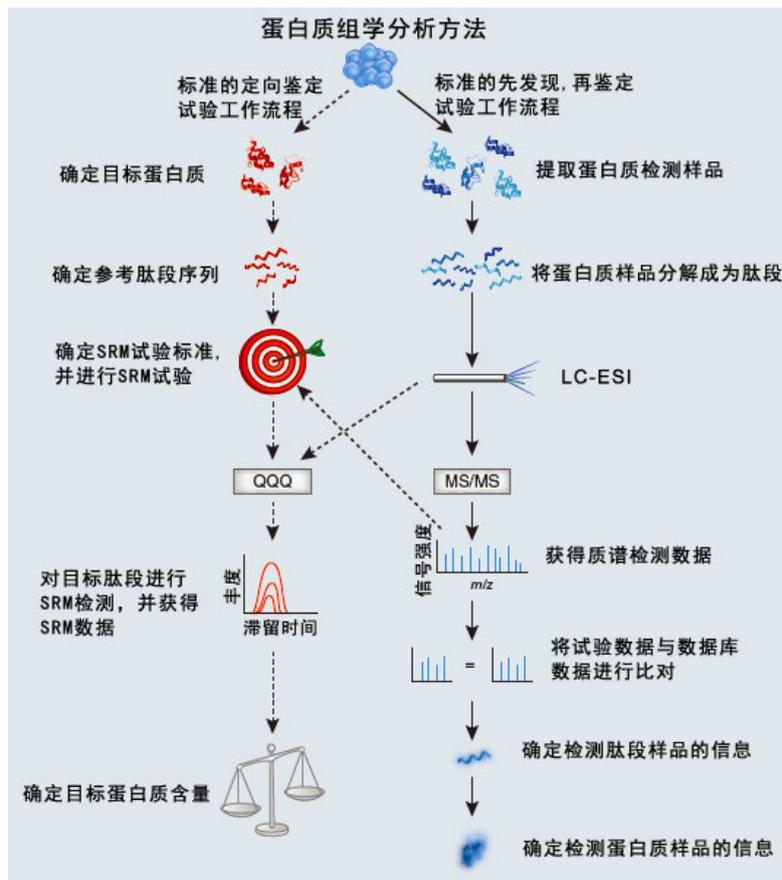
早在30多年以前科研人员就专门为了满足对小分子物质分析的需求开发出了三重四极杆质谱仪（triple quadrupole mass spectrometer, QQQ）。这种三重四极杆质谱仪由两个四极杆质量分析筛选器（dual mass filter）以及串接在中间的惰性气体碰撞室组成。这两个质量分析筛选器能够对预设质量的离子片段进行分选和收集。近几年来，这种使用三重四极杆质谱仪进行定向蛋白质组学分析的技术又得到了进一步的发展，并且该技术的应用范围也得到了进一步的拓展。

在定向蛋白质组学分析工作中，肽段离子首先会进入第一个QQQ质量筛选器，工作人员可以预先设定一个标准，并根据质荷比选择出特定的“前体”离子（‘precursor’ ion），再由第二个QQQ质量筛选器进一步筛选出我们感兴趣的特定的“产物”离子（‘product’ ion），并将其移交给质谱仪进行分析，最终每一个“前体”离子和“产物”离子都会产生一个由信号强度和与之对应的滞留时间（retention time）组成的曲线结果。这种检测手段就是选择反应监测技术（selected reaction monitoring, SRM），也被称作多重反应监测技术（multiple reaction monitoring, MRM）。

在SRM实验中首先会对目标肽段信号做一个定义。被质谱仪检测到的“前体”离子和“产物”离子组（precursor ion-product ion pair）也被定义作“转换信号（transition）”，这样一连串的转变信号就可以形成一个SRM检测指标，可以对特定的肽段进行定量检测和分析，当然对多个肽段完成分析之后也就可以得出目标蛋白质的检测报告。如果在检测样品中掺入同位素标记的参考肽段（reference peptide），我们还可以对待检测目标肽段出具绝对定量检测报告。这种SRM检测技术尤其适合于同时对50至100个蛋白样品进行分析的试验操作。

目前最大的瓶颈是如何开发出更强大的SRM检测手段，对蛋白质进行更可靠的检测和定量分析。因为在质谱仪的工作过程中，每

一条待分析肽段并没有得到平等的对待，由于自身理化性质等原因，其中有一部分肽段的分离效果和离子化处理效果会更好，所以检测效果也要优于其它肽段。同时在选择数据库肽段序列时也要费一番功夫，以确保这些参考序列的特异性，即可以唯一地、明确地指向一种蛋白质。最近又陆续出现了好几种预测工具和方法，可以帮助科研人员更好地为数据库确定参考肽段序列（proteotypic peptide）。选定了参考肽段序列之后，就需要确定最佳的SRM转换信号，同时也要对其进行非常严格的验证。因此，这些前期准备工作完成之后就可以将整个试验标准确定下来，可以在各个实验室里对各种不同的样品进行分析，所以前期的投入还是非常值得的。



定向鉴定以及先发现再鉴定的蛋白质组学分析试验流程图。LC-ESI：经高效液相色谱-电喷雾处理；MS/MS：串联质谱仪。

2.3 新一代定向蛋白质组学分析技术

SRM技术可谓是目前最成熟的定向蛋白质组学质谱分析技术，但是最近又新出现了一些更好的技术，可以解决SRM技术在前期准备阶段费时费力的问题。比如SWATH技术就是其中的代表，这是一种不依赖数据采集的质谱分析技术，质谱仪在不需要考虑信号强度的情况下也可以对复杂的肽段离子进行分选，然后

再与数据库中已有的肽段数据进行比对就可以得出特定肽段的信息。另外一种并行反应监测技术（parallel reaction monitoring）则可以同时对所有的转换信号进行监测。相信不断涌现的新技术和新方法会让定向蛋白质组学分析技术更加成熟、强大，也可以让更多的生物学家有机会将这种技术运用到自己的科学研究工作中。

3. 符合科研规范的蛋白质组学研究工作

采用定向蛋白质组学技术（targeted proteomics approach）可以让科研人员对生物样品中他们感兴趣的目标蛋白质进行特异性研究，得到准确、可重复的试验结果，这样科研人员就可以使用质谱技术（mass spectrometry）开展符合科研规范的蛋白质组学研究工作了。

今天我们取得的众多科研成果都是按照所谓的“科研方法（scientific method）”进行科学研究得来的。按照牛津大辞典的定义，所谓的科研方法指的是自然科学研究（natural science）自17世纪以来一路沿袭下来的一整套科研思路和科研流程，即对自然界里的被研究对象进行系统性的观察、检测、开展一系列的试验，并进行抽象化、得出其中的规律，再对规律进行验证，并且最终根据试验结果验证之前提出的假说，或者对假说进行进一步的修正等，这样一整套的工作流程就被称作科研方法。这种科研方法的本质和精髓就在于根据之前掌握的信息，甚至是直觉，提出一个科学假设，然后通过精确的、可重复的科学试验对这个假说进行严格的检验，最终根据实验结果对假说进行修正，并进行归纳总结，得出科学结论。

到了分子生物学时代，这套科研方法也同样适用，不过检测的对象从之前比较具体的物质变成了看不见摸不着的分子，需要对各种科学假说中相关的分子进行精确的、可重复的定

量检测。在各种不同的生物分子当中，蛋白质尤其惹人注意，这是因为蛋白质是行使生物功能的主力军。蛋白质有多种功能，比如蛋白质是构成细胞结构的必需分子；酶蛋白能够催化完成多种细胞反应；受体（receptor）、激酶（kinase）、磷酸酶（phosphatase）以及这些酶的底物等分子都是蛋白质，它们形成了各种细胞信号通路，并在细胞信息处理过程中发挥着主要作用；转录因子蛋白还决定了基因的表达。所以，近几十年来，生命科学研究中最主要的工作其实都集中在对蛋白质的研究上，科学家们感兴趣的问题是蛋白质的功能，蛋白质之间的相互作用以及在细胞内外环境发生变化时蛋白质的表达量会相应的出现哪些改变等。

虽然每一个蛋白都是由一个基因编码的，但是我们还不能够根据基因组或者基因的表达数据准确地预测出蛋白质的丰度和活性。变构调控作用（allosteric regulation）、翻译后修饰机制（post-translational modification）、可变剪接机制（alternative

splicing) 以及蛋白质之间动态的相互作用 (protein-protein interaction) 等转录后调控机制 (post-transcriptional mechanism) 在各个方面都对mRNA的翻译产物——蛋白质的丰度、活性及其最终的化学组成情况。所以对蛋白质进行直接的检测, 比如对其进行定性判断和定量分析的研究工作就要比根据核酸 (基因) 信息对蛋白质的相关情况进行预测和判断要更合适, 也更准确一些。因此, 当科学家们在90年以前发现蛋白质功能的重要性之后, 全世界的科研人员才会费尽力气、想尽各种办法对蛋白质进行检测和定量分析。期间诞生了各种蛋白质检测和定量、定性以及对蛋白质活性进行检测的技术。大部分定量和定性检测手段采用的都是基于亲和试剂 (affinity reagent) 的方法, 这些亲和试剂能够特异性地识别某种特定的蛋白质; 而对蛋白酶活性进行检测的技术则主要采用的是荧光检测方法 (fluorescence detection method), 该方法可以对酶产物进行定量分析。Western blotting、ELISA、抗体芯片 (antibody array method) 以及最近出现的流式细胞技术 (flow cytometry) 都属于基于亲和试剂的蛋白质定量检测技术。

在20世纪90年代, 人类基因组计划 (human genome project) 主要通过以下三条途径彻底改变了生物医药研究领域。首先, 科学家们有史以来第一次从理论上具备了定义基因组及其产物编码的所有生物分子的能力, 进而确定了生物化学反应的界限。其次, 人类基因组计划促进了芯片技术的发展, 使得科学研究进入了高通量时代。第三, 人类基因组计划让我们了解到绝大部分的生物反应都是一种系统式的反应, 其中会涉及到许多生物分子, 这些分子彼此之间发生着各种各样的相互作用, 于是催生出了系统生物学 (systems biology) 这样一个新兴学科。

质谱技术 (mass spectrometry), 更专业一点来说应该叫做液相色谱串联质谱技

术 (liquid chromatography–tandem mass spectrometry) 该技术是目前对蛋白质进行大规模分析的主要手段。在以发现蛋白质为主要目的的科研工作中, 质谱试验主要采用“鸟枪 (shot-gun)”策略。一个典型的鸟枪质谱试验一般都会按照以下的流程来开展: 首先, 待分析的蛋白质会在特定的蛋白酶 (protease) 的作用下被消化、降解成更小的肽段 (peptide); 然后再使用液相色谱仪对这些肽段进行分离, 经过液相色谱仪分离之后的肽段会被离子化处理 (ionized), 而后直接注入质谱仪, 质谱仪会检测出每一个离子的质荷比 (mass-to-charge ratios, m/z ratios)。最后, 这些肽段离子会根据各自的丰度自发地进一步碎片化。每一个肽段, 也经常被称作前体 (precursor) 的质量以及这些肽段的离子片段信息会被收集起来, 然后与数据库中的数据进行比对, 找出数据库中与检测结果最相似的肽段序列, 我们认为这就是待测蛋白肽段的序列。在不同样本之间蛋白质的丰度会有所差异, 再进行一次质谱分析, 对不同离子的丰度进行比较就可以定量地检测出这种差异。我们还可以采用另外一种方法检测出蛋白质之间的差异, 而且只需要做一次质谱试验, 这就是所谓的同位素稀释策略 (isotope dilution strategy)。我们先使用不一样的同位素对来自不同样品的蛋白质或肽段进行标记, 然后将它们混合在一起, 再进行质谱分析。在质谱分析时只需要对其中不同同位素的丰度进行比较就可以知道蛋白质之间的差异。

采用这种方法仅能计算出一种未知样品里不同蛋白质的相对含量。而将质谱技术与其它特异性富集技术 (specific enrichment step) 结合, 还可以对蛋白质的翻译后修饰 (post-translational modification) 情况进行大规模的检测。随着科学技术的进步, 我们现在可以将复杂的蛋白质组先进行裂解处理, 然后对裂解片段进行深度测序, 这样即便是复杂的蛋白质组也可以完成测序研究了。

虽然鸟枪研究方法可以在蛋白质组发现工作中发挥重要的作用，但是目前还是不太符合所谓的科研方法的要求，这主要是因为以下四点原因。首先，在质谱分析工作中，质谱仪对前体离子的选择是随机的，所以当待测样品中的肽段数目大大超过了质谱仪的检测循环（sequencing cycle）上限的时候，这种试验的重复性就会变得非常差。第二，这种质谱分析工作对技术有一定的要求，只能在专业的质谱检测实验室里开展，不是每一个实验室都能够进行质谱分析工作的。第三，在这种以发现蛋白质为目的的试验过程中没有任何前人的数据可以借鉴和参考。第四，科学家们只有在获得了试验数据之后才能对假说进行验证，可是由于目前不能对蛋白质组进行完整的测序，所以也妨碍了对假说的验证工作。基于以上四点原因，蛋白质组学研究工作目前还处于一个比较尴尬的境地，一方面越来越多的质谱实验室里装备的质谱仪正变得越来越高级，他们也在不断地、不厌其烦地对蛋白质组进行发现式的研究工作；另外一方面，更多的普通实验室还在使用western blotting等技术，依靠那几个有限的抗体开展着常规的蛋白质定量研究。Edwards等人最近就对科研界目前这种奇怪现状导致的后果进行了研究和报道。他们对人类基因组项目完成之前和之后一段时间之内发表的发现了某种人体蛋白的论文进行了汇总和研究，结果发现了两个现象。第一，其实绝大部分论文关注的只是那少数的几个蛋白质，更多的蛋白质根本就无人问津。第二，基因组测序和之后催生出的蛋白质组测序等技术并没有对科学研究带来根本性的改变。Edwards等人推测，目前绝大多数的蛋白质研究还是集中在过去已经建立的非常成熟的试验检测方法的那几个蛋白质上，科学家们可以对这些蛋白质进行非常精确的检测，而且试验方法简单，可重复性高。

我们确信定向蛋白质组学技术（targeted proteomics approach）能够从根本上解决上述问题。定向策略最主要的目标就是对任何生

物样品里的任何蛋白质或者蛋白质组进行精确的、可重复的定量检测。按照科学研究策略的定义，定向蛋白质组学研究应该采用如图1所示的研究工作流程，先针对某种待研究蛋白设计一个定量检测试验，然后用这种试验方法对待测样品进行定量检测。到目前为止，定向蛋白质组学研究主要采用的是一种叫做选择反应监测（selected reaction monitoring, SRM）的质谱检测技术，这种技术也经常被称为多重反应监测技术（multiple reaction monitoring）。使用三重四连杆质谱仪（triple quadrupole mass spectrometer）进行两次质谱分析就可以得到SRM试验数据，使用这种质谱仪是因为它可以对符合预先设定的质荷比数值的离子进行定向分析（稳定这些离子的轨道）。并且在对蛋白质进行质谱分析时，只有由特定蛋白质肽段离子化产生的离子才会被质谱仪监测并分析。SRM技术具备的这种双重质量过滤方式极大地提高了试验的选择性，而且这种非扫描式的工作方式使得SRM技术还具备了高信噪比（signal-to-noise ratio）的优势。所以有人也将SRM技术称作质谱界的ELISA反应。

采用一套预设的程序就可以通过SRM试验对特定的蛋白进行高敏感、高选择性的检测，而且不需要借助免疫试验方法。与免疫检测技术相比，SRM技术还有几大优势，那就是可以实现高通量检测（一次可以同时检测100个蛋白质），试验操作更快速（一天可以检测250个蛋白），成本更低等。SRM技术另外一个比较吸引人的特点就是从理论上说可以对任何样品中的某一些蛋白质进行定量检测（只要这些待测蛋白质的质量和其它蛋白质有所区别就可以），哪怕是无法用抗体进行区分的蛋白质，比如不同亚型（isoform）的蛋白质、翻译后修饰情况不同的蛋白质、蛋白质可变剪接体以及突变体都没有问题。另外，SRM试验还可以解决鸟枪法的随机性问题，所以利用SRM试验可以对多个样品中的待测蛋白进行连续定量检测。最近，有人在不同实验室之间

也对SRM试验在蛋白检测工作中的高精确性和可重复性进行了检验。SRM技术的高敏感性使得每个酵母细胞里含量少于100个拷贝的蛋白质（未被碎片化处理的蛋白质组样品）都难以逃过实验人员的法眼，而且对于人体蛋白质组（未被碎片化处理的蛋白质组样品）的检测下限也达到了7500个拷贝/细胞，同时以人体血浆为检测样品时SRM技术的灵敏度可以达到数百ng/ml。科研人员还可以充分发挥SRM技术高兼容性的特点，使用各种常用的样品裂解方法进一步提高SRM技术的灵敏度。

综上所述，如果使用全蛋白质组范围内的定向SRM试验（**proteome-wide set of definitive SRM assay**），科学家们就可以以高通量的方式对任意生物样品里的任意蛋白质进行定量检测，帮助科学家们验证各种科学假设。所以我们认为定向蛋白质组技术至少会从以下两个方面进一步拓宽蛋白质相关研究工作的范畴。首先，定向蛋白质组技术会使蛋白质组中更多的蛋白符合科学研究方法的要求，让科研人员可以用科学研究的方法对它们进行研究。其次，定向蛋白质组技术能够让大量的实验室和科研人员参与到蛋白质组学研究工作中，并且获得高质量的蛋白质组学研究成果。

目前，最适合开展SRM试验的科研工作就是对数量较少（大约100个左右）的蛋白质、亚型或者各种翻译后修饰蛋白进行定量检测。在转化研究工作（**translational research**）中最常用到SRM技术，因为需要对大量临床样本中的各种候选生物标志物

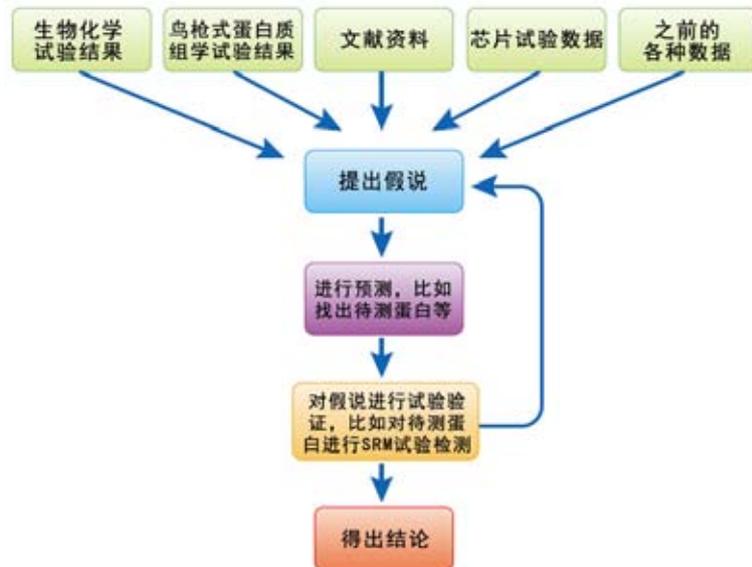


图1 科研方法和蛋白质组学分析实例。科学家们会根据生物化学试验结果和数据、鸟枪法蛋白质组学筛选结果、芯片结果、文献检索信息或者其它各种信息提出一个科学假设，比如某些蛋白会对某种信号或干扰产生反应。然后他们会根据这一假设设计出相应的试验，比如使用SRM方法对这些蛋白进行检测，最后根据试验结果就能知道假设是否正确。

（**biomarker**）分子进行大批量的筛选，从中挑选出真正具有临床意义的生物标志物。尤其令人激动的是，SRM技术还可以对高度相似的两个蛋白质序列进行区分。这就非常适合对疾病相关的蛋白质进行分析，比如致癌的体细胞突变蛋白（**somatically mutated protein**）、融合蛋白（**fusion protein**）或者异常修饰蛋白等。同样，在系统生物学研究工作中，SRM试验还可以在不同的条件下，对与某个特定生物过程相关的所有蛋白同时进行检测，比如在不同的用药剂量下、或者不同的作用时间里、或是在缺失了某个基因的情况下，或者是在某些化学物质存在的情况下等，观察整个生物系统对这些外部干扰会做出什么样的反应。最近SRM技术又有了一个新的应用途径，那就是数量性状位点分析工作（**quantitative trait locus analysis, QTL analysis**）。数量性状位点分析研究工作主要关注的是遗传突变与蛋白质丰度之间的关系，希望通过研究这种关系最终确定能够控制某种蛋白表达量多少的遗传位点。了解这些对应关系对于解释各种复杂性状背后的

分子机制大有裨益，这有助于我们更好地认识心血管疾病、神经变性疾病、糖尿病、癌症等多种常见疾病的发病机制。但是在过去进行这种系统性的研究还是非常困难的，因为我们无法对大量生物样品里的特定蛋白质进行精确的定量检测。SRM技术的出现及时弥补了这个技术空缺。

虽然SRM技术开始在越来越多的领域里有所建树，但是该技术同样也存在种种问题和限制。比如我们在前面提到的，在对哺乳动物或者复杂程度类似的蛋白质组里的低丰度蛋白进行检测时还存在一些困难，所以需要预先对样品进行一些分离或者富集的操作，这样就降低了SRM技术的处理速度和处理容量。另外，SRM技术目前还无法用于超高通量的多路处理试验，而这正是ELISA技术的优势。由于SRM技术还属于比较新的技术，所以接受这项技术的人还不多。虽然多个研究已经证实SRM试验取得的定量检测结果和免疫检测结果是相符的，但是还是有一些人对SRM技术持一种怀疑的态度。最后一点，也是最重要的一点就是，在未来的几年里如何推广SRM技术，让更多的非专业实验室开始进行蛋白质组学方面的研究工作。虽然SRM技术在自动化和试验操作方面有了很多的改善和进步，比如已经出现了自动进行试验和数据分析的SRM设备，但是到目前为止还是没有开发出一款针对非质谱分析专业实验室的SRM质谱检测设备。科研单位和质谱仪生产厂家之间还需要进一步合作，解决这些问题，让SRM质谱仪早日走进更多的实验室，甚至进入临床检测机构。如果建设面向所有人的公共SRM试验技术数据库也会推动SRM研究的开展，目前已经有人在针对几个不同的生物物种建设SRM试验技术数据库，我们希望今后可以有针对所有蛋白质组的SRM试验技术数据库出现。

那么定向质谱技术未来会走向何方呢？我们相信该技术在很多方面都会取代western blot等免疫检测技术，科研人员们可以使用定向质谱技术对多个生物样品里的各种蛋白质及

其不同的修饰物同时进行定量检测。其中的关键就在于基于高分辨率、高准确率质谱仪的定向式研究策略。SWATH-MS就是其中的一种研究策略，这是一种不需要采取数据的研究方式，而是根据质谱仪采集到的待测蛋白的碎片——离子图谱（fragment-ion map），以及根据对待测蛋白开展的SRM式的定向分析做出判断的研究方法。现在还有一种方法可以减少预先试验的步骤，那就是使用四极杆Orbitrap质谱仪（quadrupole-Orbitrap mass spectrometer）对某个目标肽段产生的所有离子产物同时进行检测，然后对试验得到的色谱图谱（chromatographic profile）进行重建，得出分析结论，这种方法也被称作平行反应监测技术（parallel reaction monitoring）。

至于样品处理通量方面，如果改善色谱处理方法应该可以缩短样品的处理时间，这会极大地提高SRM试验的处理通量，使其能够胜任对数千种样品进行分析的高通量处理工作。另外，SRM技术的定向分析能力还有助于科研人员对与某些蛋白质活性相关的特定肽段或者化学探针（chemical probe）进行精确的定量检测，比如对激酶或者磷酸酶的活性进行检测等。SRM技术还有助于依靠质谱技术的组织成像（mass spectrometry-based tissue imaging）研究。在这些研究当中通常使用的都是基质辅助的激光解吸作用和（或）离子化作用（matrix-assisted laser desorption/ionization），通过这些方法使细胞分子或者经过胰酶消化的肽段离子化，然后再通过探测到的质荷比得出最终的检测结果。目前这种技术的灵敏度和动态范围都相当低，这是因为无法使用色谱仪对这些组织上的样品进行分离，所以在试验过程中会观察到非常强的基质干扰信号。但是有了高灵敏度的SRM技术，这一切就不再是问题了，因为我们可以使用SRM技术对组织里的各种特定蛋白进行定向的、精确的及可重复的检测。最近，又诞生了一种新的定向检测技术，那就是质量细胞计量技术（mass cytometry），这是一种将流式细胞技

术与质谱技术结合在一起而产生的新技术，可以对一个细胞里的100种蛋白质以及磷酸化的蛋白质（磷酸化修饰位点）进行定量检测，而且具有极高的灵敏度和高通量处理能力。有了这种质量细胞计量技术，纯金属同位素也能与可以特异性识别并结合目的蛋白的抗体一起使用。被同位素-抗体标记的细胞经过电感耦合等离子体质谱仪（inductively coupled plasma mass spectrometer）的分析，计算出细胞上金属同位素的总量以及每一个细胞的组成情况，这样就可以确定每一个细胞里被抗体结合

的目标蛋白的含量。

近十年来，以发现蛋白质为目的的蛋白质组学研究以前所未有的惊人速度在各种生物样品中发现了大量的蛋白质。而后来出现的定向蛋白质组学研究也按照科学研究方法的流程对一个个科学假设进行了验证。现在定向蛋白质组学技术已经不再局限于对蛋白质组里的某些蛋白进行可重复的定量研究工作，开始进入单细胞层面，正在尝试对一个细胞里的特定蛋白质进行检测。



资讯 · 频道

www.LifeOmics.com

4. 定向质谱分析技术在生物医药领域里的定量分析作用

越来越多的学术科研单位、制药企业以及生物技术公司开始使用定向质谱分析技术（targeted mass spectrometry, targeted ms）对极微量的蛋白质、肽段以及蛋白质的翻译后修饰情况（post-translational modification）进行定量研究。本文将为大家介绍定向质谱分析技术在临床蛋白质组学（clinical proteomics）领域里的应用价值及其重要意义，同时还会进一步探讨定向质谱分析技术在衔接基础生物医药研究与临床应用这两大领域之间的潜在意义。

蛋白质组学（Proteomics）研究工作主要指对蛋白质的结构和功能进行大规模、系统性的研究，通常都需要对某一个群体（集合）蛋白质进行鉴定，比如与某条信号通路相关的所有蛋白质，某个细胞器、细胞、组织或者器官里的所有蛋白质等。但是还没有任何一项大规模、系统化的蛋白质鉴定技术或者方法可以被视作能够满足上述要求的“蛋白质组学”研究方法。不过现在越来越多的人正倾向于将以质谱技术为核心技术的研究方法看作是“蛋白质组学”研究方法。临床蛋白质组学（Clinical proteomics）的概念非常宽泛，所有以转化（translational）为目的的蛋白质组学都可以叫做临床蛋白质组学，所以临床蛋白质组学也可以被理解为，为促进基础科研成果转化为临床应用的蛋白质组学研究工作。临床蛋白质组学试验通常都需要对正常组织、病理组织或者体液的蛋白质组成情况进行分析和鉴定，在蛋白质层面上详细发掘与疾病相关的各种信息，找出正常和病理状态下蛋白质层面的差异，并且对其进行定量分析，阐明疾病的发病机制，加深对疾病的认识（比如对疾病的分类进行修正等），以期找到新的治疗靶点。发现蛋白质组生物标志物（Proteomic biomarker）是临床蛋白质组学研究最常见的目的，通常都会借助质谱分析手段寻找可以在疾病发展早期用于病情诊断的肽段、蛋白质或者蛋白质翻译后修饰方面的异常情况。这些信息可用于帮助临床医生进行早期诊断，或者进行预后判断、指导临床治疗以及病情进展监测等。任何转化工作的最终目的都是为了临床应用，之前所有的研

究发现都可以用于指导临床诊疗工作。只要在这类转化研究工作中用到了蛋白质质谱检测技术，我们就可以称之为临床蛋白质组学研究工作。

蛋白质质谱检测技术具有一项非常明显的优势，所以尤其适合临床蛋白质组学研究工作。这项优势就是可以在不需要进行预分析的情况下，对复杂生物样本里成千上万的蛋白质组份进行准确无误的鉴定和分析。不过与这种优势相伴的是敏感度不够高以及结果的随机性太大等缺陷。在转化研究工作当中，所有的质谱检测结果以及试验假说都必须用试验进行进一步的验证，此时就需要用到高灵敏的定量蛋白质检测技术，进行精确、且可靠的蛋白质鉴定，而定向质谱分析技术在这个方面的应用价值正得到越来越多科研工作者的肯定。

4.1 众多质谱检测技术中的宠儿——定向质谱检测技术

四十多年来，定向质谱检测技术主要用于对生物分子进行快速、灵敏和精确的分析和鉴定工作当中。在很大程度上这种技术的作用都是在如图1所示的先发现、再鉴定的蛋白质鉴定工作中对传统的，依赖数据的质谱扫描分析技术（data-dependent scanning MS analysis）敏感度不足的缺陷加以弥补。不论采用哪种分析手段，待检分子（包括各种小分子、代谢产物或肽段）都会经由反相柱—液相色谱设备处理，再在电喷射离子化作用（electrospray ionization）下转变为气态离子（gas phase ion）。这些气态离子在质谱仪

(mass spectrometer, 通常采用的都是串联质谱, 即MS/MS) 里会进一步被打成更小的片段, 最后根据这些片段和原始气态离子的信息就可以对原始分子做出准确的鉴定。在依赖数据采集 (data-dependent acquisition) 的研究策略中, 串联质谱仪会根据气态离子在前期全扫描时的信号强度对它们进行自动选择; 随之对这些串联质谱仪采集的信号进行分析就可以得出被选择肽段离子的氨基酸序列信息, 然后再与数据库中的数据进行比对就可以确定待检测肽段的准确信息。这样一套数据采集操作的周期大约是2至3秒, 在整个液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 分析过程中会不断地重复这个过程, 直至得出最终的结论。另外一种定向鉴定技术采用的分析策略则相对要简单一些。在这种情况下首先会对参考序列数据库进行分析, 然后在分析结果的指导之下从众多待测样品之中挑选出数量不多的几个目标片段离子进行分析, 这样就不用对成分复杂的所有片段进行分析了。

在定向质谱分析工作开展的最初阶段, 人们主要采用的方法是对离子信号进行多重监测 (multiple ion monitoring), 从众多前期得到的全质谱数据中挑选出目标离子片段的信号进行分析。随着三重四极杆质谱仪 (triple quadrupole mass spectrometer analyzer) 的不断发展和完善, 这种研究手段也更加容易实现了。科研人员可以如图1b所示的那样在质谱分析操作过程中根据预设片段离子的

信息快速挑选出感兴趣的前体 (precursor) 片段对其进行离子化处理, 然后检测相应的信号, 得出结论。在现在的多重反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM), 也经常被称作选择性反应监测 (selected reaction monitoring) 试验过程中, 对来自待检样品的每一个片段离子的处理时间只有几毫秒, 但是就是在这么短的时间里采集得到的数据就足以得出试验结论。这样在一个MRM试验中, 每一秒钟时间内就可以收集到100多个前体—产物离子对 (precursor-product ion pair) 的数据, 这些数据也被称作“转换信号 (transition)”。这样就可以在一个很短的时间内对成千上万的待检样品进行定向质谱分析, 这个时间段甚至比色谱仪洗脱峰的宽度 (时间) 都要短。可是在早期的MRM设备中, 这个过程要耗费很长的时间。使用最近新开发的软件和仪器甚至还可以预先设定一个滞留时间 (即待检样品在色谱仪中处理的时间), 然后根据这个滞留时间自动进行检测, 这样就可以在一次MRM操作中同时对成百上千个不同的待测样品进行定向分析。在一个设计得非常合理的MRM试验中, 会不断地对待检样品产生的特异性转换信号进行检测, 如果没能检测到信号只能意味着待检样品的浓度非常低, 已经超出了质谱仪的检测范围。相比之下, 如果在图1a所示的依赖数据的质谱分析工作中没能检测到信号, 则还可能意味着采样步骤出现了问题。



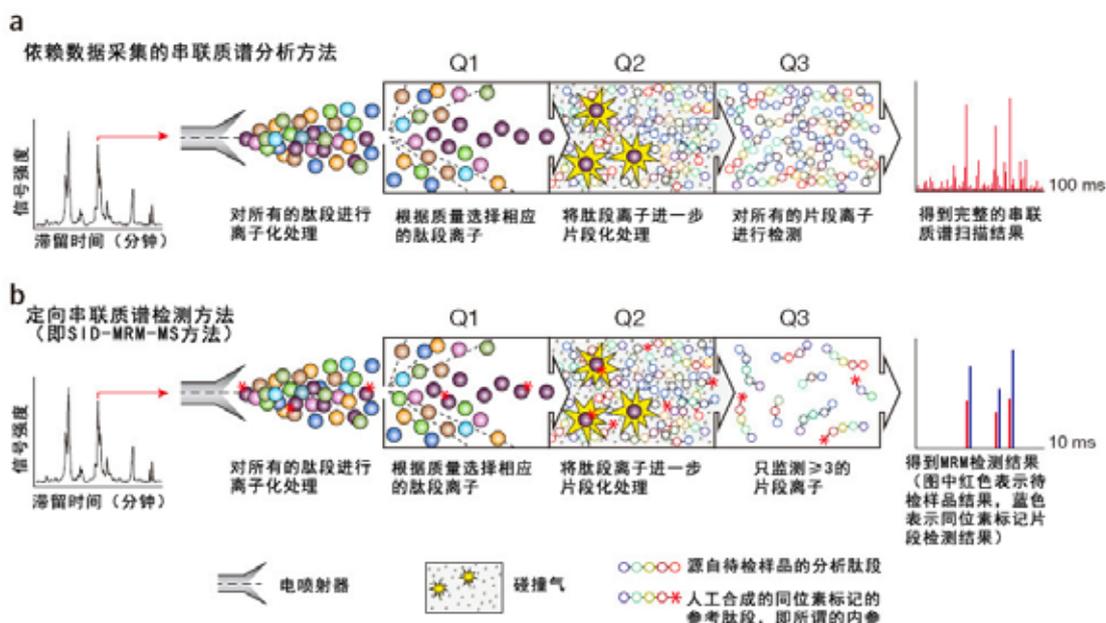


图1 传统依赖数据采集方式的质谱分析技术与使用三重四极杆质谱仪开展的定向MRM质谱分析技术的比较。(a)在传统的依赖数据采集的质谱分析工作中,被降解的蛋白质样品首先会被加入一个连接了色谱仪的反向柱,然后在电喷射器的作用下形成气态的离子片段。在色谱分离过程的任何阶段几乎都会同时产生大量的肽段离子。这样就可以得到一个涵盖所有离子信息的所谓全谱质谱结果。之后的串联质谱再根据这个全谱信息以及Q1中的信号强度从中自动筛选出4~10个离子,进入Q2与惰性气体碰撞,进一步碎片化。最后在Q3中完成检测,得到右边所示的全扫描串联质谱分析结果。(b)在SID-MRM-MS分析工作中,会首先定义出能够特异性代表目标蛋白质的参考肽段序列,以及相应的片段离子信息。待检肽段在Q1和Q2中被有选择的碎片化之后再根据预先设定的转换信号挑选出最终的片段离子进入Q3进行检测。在试验操作过程中还可以加入用同位素标记的人工合成肽段作为内参,通过与这些内参的比对就可以得出待检样品的准确相对定量结果。Q1:第一质量选择器;Q2:碰撞池;Q3:第二质量选择器。

使用MRM对蛋白质和翻译后修饰情况进行分析也需要对蛋白质进行降解之后再对肽段进行检测才能得出最终的结果(图2)。目前对复杂样品肽段进行检测,可信度和准确度所能达到的最高水平就是由SID-MRM技术创下的记录。所谓SID指的是稳定同位素稀释(stable isotope dilution, SID)方法,这是一种化学分析技术,在分析之前往待检样品中加入浓度已知的用同位素标记的化合物就可以得出待检样品的相对浓度。科研人员利用这种方法人工合成了含有 ^{15}N 或 ^{13}C 的人工肽段内参。在SID-MRM试验操作过程中,通过检测这些浓度已知的内参的信号就可以确保试验的可信度,同时也可以准确得出待检样品的浓度。这种MRM质谱分析方法的灵敏度要大

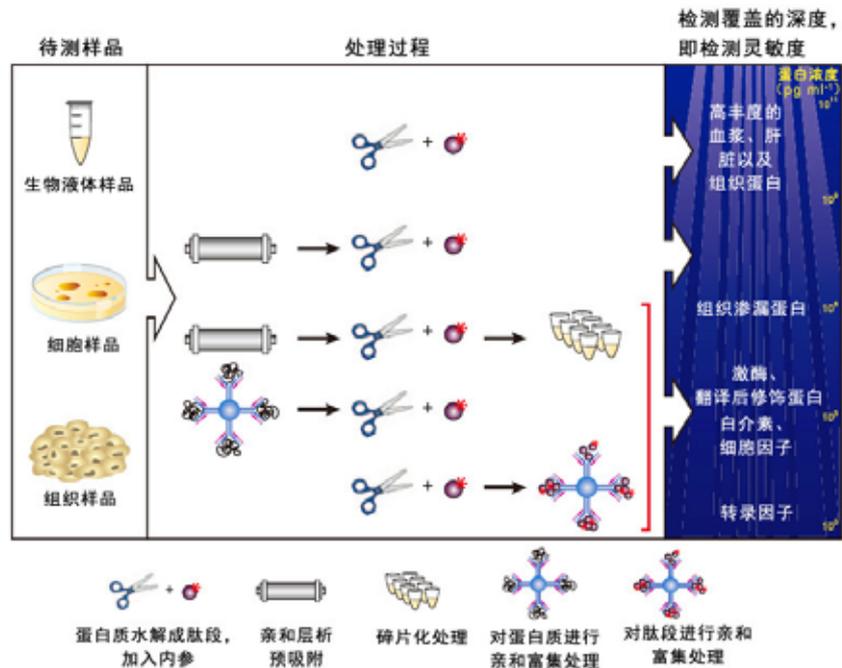
大超过发现蛋白质组学研究方法(discovery proteomics method),这是因为定向质谱分析时我们感兴趣的目标离子的信号在质谱仪中的累积时间会更长。

如图1b所示,我们可以通过对每一个内参和待测样品信号峰下面积的比值计算出待测肽段或蛋白质的准确浓度。通常来说这种方法的准确度非常高,但是有时候可能会因为蛋白质在水解时释放出肽段的效率问题牺牲一部分准确性。这种情况与蛋白质序列有关,变异程度非常大,而且由于在试验操作过程中并不是每一个步骤都会添加人工内参,所以这也一定程度上影响结果的准确性。不过如今绝大部分的MRM试验都还是非常精确的,而且通常的做法都是观察某一个蛋白的浓度在不同样品里

发生了哪些变化，即关注的都是相对浓度，而不是绝对浓度，所以试验的精确性不是问题。在临床检测等需要得到精确的绝对浓度的试验分析工作中，我们会使用稳定的同位素标记的

蛋白质或者蛋白质替代物作为内参，与带分析样品经胰蛋白酶消化之后得到的肽段混合在一起，并且在试验的一开始就加入这些内参，以确保定量结果的精确性。

图2 使用蛋白质和肽段富集方法增加SID-MRM-MS检测试验的灵敏度和特异性。图中最左侧所示的细胞或生物液体样品从组织中分离出来之后会先对其中的蛋白质进行降解，使其分解成肽段。在分析这种复杂样品时为了达到最大的检测可信度和精确度，我们通常还会在样品中加入人工合成的含有同位素标记元素（比如 ^{15}N 或 ^{13}C 等）的内参片段（这些内参都是根据待测肽段的序列合成的）。为了达到所需的检测灵敏度可能还会使用其它的一些方法，比如在检测血浆蛋白时会先用免



疫亲和预吸附柱去除掉12~70种常见的高丰度血浆蛋白，经过这样处理之后可以使检测灵敏度达到100纳克/毫升，这相当于中等检测深度，如图右侧所示。肿瘤和心血管疾病生物标志物的浓度都非常低，每毫升中只有几个纳克，不过再经过图中第三行所示的预吸附和碎片化处理之后可以将检测灵敏度大大提高，足以检测出这些生物标志物。不过这样会牺牲一部分高通量处理能力，同时也会增加试验的复杂性和不可重复性。另外一种能够提高检测灵敏度的方法是免疫亲和技术，可以用这种方法先将目标待检样品富集起来。比如图中第四行所示的那样，先使用目标蛋白特异性的抗体对蛋白进行富集操作，然后再进行降解处理，也可以使用最后一行所示的那种富集。

4.2 定向质谱分析技术在生物医药以及蛋白质组学研究领域里的应用价值

最近，定向质谱分析技术在临床医学和转化医学研究领域里比较火爆，大家主要使用这项技术对肽段和蛋白质进行检测。这一切全都源自几十年前的那场技术革命。在20世纪60年代，免疫技术已经成为了检测血液、尿液和其它体液中的代谢产物、激素以及药物等小分子物质的常规技术。由于当时新出现的定向质谱检测技术具有决定性的检测优势，所以即便需

要投入大量的经费购置检测设备，培训试验操作人员和数据分析人员，但还是很快就被大家接受，在临床科研实验室里逐渐取代了免疫检测技术。与以免疫技术为平台开发检测技术不同，以质谱技术为平台开发新的检测手段要更加简便、快捷，而且使用一台LC-MS/MS质谱仪可以同时检测很多种小分子进行检测，这是一次只能检测一种分子的免疫检测技术无法办到的。今天，遍布世界各地的临床检测实验室每年都会开展数百万次LC-MS/MS检测，其中绝

大部分人采用的都是MRM策略。

由于质谱检测技术在小分子检测工作中的表现非常优异，所以也推动了定向质谱技术在肽段和蛋白质鉴定方面的应用。Desiderio等人在20世纪80年代就首次证实了定向质谱检测技术在分析生物活性肽段（bioactive peptide）工作中的应用价值。自从上世纪90年代末开始，使用定向质谱检测技术对蛋白质以及蛋白质翻译后的修饰情况进行研究的工作也逐渐多了起来，并且在这十年来取得了长足的发展，这其中也离不开LC-MS设备的改善以及质谱分析组织样品和生物液体样本（biofluid sample）制备方法的进步。

4.3 试验工作中存在的问题

在临床蛋白质组学研究工作中，使用MRM-MS方法进行定向质谱鉴定碰到的最大困难就是来自样品周围组织中其它蛋白质、肽段以及小分子物质的干扰。虽然在以前分析小分子物质时就对这个问题进行过大量的研究，但是到目前为止还是没能很好地认清这个问题，同时也没能解决这个问题，这主要是因为临床MRM分析工作中一般都会对血液或者组织里的数十万个（这还不包括各种修饰产物）蛋白质进行水解，然后对水解产生的成百上千，甚至数百万个肽段进行分析。这种干扰主要来自两个方面，即离子抑制（ion suppression）和转换干扰（transition interference）。离子抑制会以我们无法预测的方式降低待测样品的离子反应，而且这种抑制作用千变万化，毫无规律可循。而且这种离子抑制作用更进一步增加了生物样品的复杂程度。转换干扰则主要是由于干扰肽段或其它样品组份也具有和目标检测物质相同或相近的前体质量（precursor mass）或者一个或多个片段离子质量而导致的。已经有软件可以帮助我们发现并且确定这些干扰物质，或者不可靠的转换信号。这些软件都使用了待测样品的其它特征信息，以增加鉴定工作的可信度，这些信息包括共洗脱信息（co-elution），根据各自转换信号同时出现

情况制定的标准，目标片段离子与内参各自之间的相对比例以及对试验精准度进行统计分析以及其它一些独立的计分方法等。

虽然也可以对试验方法加以改造，不使用内参，但是此时试验的精准度以及可信度都会受到影响，尤其在分析复杂的血液样品和组织样品时这个问题会表现得更加突出。不过使用同位素内参会使试验成本增加，现在一两个毫克的纯化内参价格一般在250至500美元之间。不过这些内参至少可以供1万次试验操作使用，这样算下来每一个肽段分析试验的成本也就增加了几美分。现在很多公司也开始提供未加纯化的同位素标记内参，这会使试验成本进一步降低。不过，如果非常看重生物实验，尤其是临床试验结果的准确性，同位素内参的价格因素就不再会那么重要，也会被大家所接受。另外，目前如果想让各个实验室相互认可彼此之间出具的血浆蛋白检测报告，那么也必须使用内参。而且使用MRM试验方法的临床试验也应该使用内参，这样才能避免干扰，同时保证是对目标蛋白进行检测。预计使用同位素内参的需求将会进一步增加，这会促进同位素内参合成的价格更进一步下降。

4.4 探究血浆和组织蛋白质组的奥秘

一旦开展了MRM试验，那么就很有可能将其运用到各个需要对蛋白质进行分析的检测工作当中。这也促进了各种设置了MRM检测项目的公共检测机构的发展。不过虽然MRM试验几乎可以对任何蛋白质的肽段或者肽段的修饰情况进行分析，但是我们还是无法保证可以开发出满足临床检测灵敏度需要的临床蛋白质组学应用项目。主要问题并不是检测设备的灵敏度达不到要求，而是复杂的样品所造成的信噪比（signal-to-biological-noise ratio）问题，以及血浆或组织样品中蛋白质丰度的动态范围（dynamic range）太大。所以科研人员也设计了好几种方案来解决这个问题，提高对复杂样品检测的灵敏度和特异性，同时也需要解决定量问题（图2）。

在分析血浆和实体组织（这些组织通常也都会含有血浆成份）样品时，一般都会先用免疫亲和柱（immunoaffinity depletion column）去除掉12至70种常见的、高丰度血浆蛋白，虽然这么做可能会失去一些信息，甚至会失去一些与目标蛋白结合的低丰度蛋白。然后再使用两种或更多种色谱分离技术就可以更进一步增加试验检测的深度。将这些前期的样品处理方法与MRM技术相结合就可以对血液蛋白进行定量分析，检测灵敏度可以达到皮克/毫升至纳克/毫升。如果使用更有针对性的色谱分离技术还可以更进一步提高检测的灵敏度，不过这种方法的普遍性还有待试验证实。

对目标待测样品先进行免疫亲和富集操作可以简化样品预处理步骤以及在SID-MRM-MS分析之前的碎片化处理操作。如图2所示，不论是完整的目标蛋白还是其中的某一个肽段，都可以利用特异性的抗体对它们进行富集。在任何一种情况下都只需要用到一种特异性的捕获（富集）抗体，因为质谱仪可以起到二级检测抗体（二抗）的作用，这种方法具有极高的特异性。不过这种方法也会受到抗体的限制，只有能够满足检测灵敏度和特异性的抗体才能够用于这种试验，从而将血浆和组织中的特定蛋白质给钓出来。而且还需要针对每一个待测蛋白预先制备特异性的富集抗体。虽然这是一个费时费力的工作，而且成本也很高，但是这种预处理方法搭配MRM策略的检测手段还是非常实用的。同位素标记的内参序列和待测样品肽段都会被同一个抗体所富集，这就是所谓的SISCAPA方法，这些被富集的片段被洗脱之后就会经过SID-MRM分析，得出最终的相对定量结果。这些被捕获的抗体需要有很高的亲和力，不过不需要有太高的特异性，这是因为质谱仪可以很好地弥补这方面的不足。SISCAPA试验可以多路并行处理，如果再搭配磁珠处理机器人就可以自动完成肽段捕获、洗涤以及洗脱的工作，大大提高处理能力。实践证明，这种分析技术的处理能力非常强大，而且可重复性非常高，对血浆的检

测灵敏度也可以达到1ng/ml，同时这种技术的变异系数（coefficient of variation）还不到15%。值得注意的是，飞行质谱技术（flight MS method）的免疫富集——电离飞行时间质谱（immuno-MALDI - time）优势更加强大，因为它集免疫富集和MALDI质谱，即基质辅助激光解析电离飞行质谱技术的优点于一身。

4.5 定向质谱检测技术在验证生物标志物方面的应用

近年来，定向质谱检测技术在转化科学（translational science）领域里也有广泛应用。比如有越来越多的人会使用这项技术对信号通路、经典的致癌信号通路或其它比较重要的生物网络进行分析，并且对其中重要的信号节点进行监测等。一般对每一个节点都会进行三种检测（一种是对传统的、能够控制蛋白总体表达水平的肽段进行分析，并且另外还会对磷酸化和非磷酸化修饰的肽段进行分析，以了解磷酸化修饰方面的情况），这样就可以对整个信号通路的活性有一个精确的、定量的了解。虽然定向质谱检测技术可以在众多领域里发挥重要的作用，但是在临床蛋白质组学研究工作中最常用到这项技术的还是对生物标志物候选分子进行验证。

近十年来出现的绝大部分生物标志物都来自基因组学或蛋白质组学试验研究的结果，科研人员在这些试验工作中都需要对很少样品里的大量转录因子或者其它蛋白质进行分析，从中筛选出与某种疾病真正有联系的生物标志物。其中寻找肿瘤标志物又是一大热点，可是在寻找肿瘤标志物的工作中经常会碰到采样不足（undersampling）的问题，这主要是因为肿瘤组织的异质性非常高——在某一些肿瘤组织中高表达的生物标志物可能在另外一些肿瘤组织里完全不表达。这些问题会让使用质谱技术的蛋白质组发现试验（MS-based proteomics discovery experiment）变得更加复杂，因为对复杂的蛋白质组进行随机采样本来就会碰到样本不连续的情况，当发

现这些标志物之后又会因为内参不一致而使定量结果变得不够准确。对转录水平进行检测可以避免这个问题，但是这属于蛋白质上游的检测手段，不能检测到蛋白质翻译水平的信号。所以现在大家不管如何，把通过组学研究发现的各种分子（它们的表达量可能差异非常大）全都看作是潜在的生物标志物候选分子，然后再通过更加精确的定量分析手段从中找出真正的生物标志物，我们将这个过程称作验证（verification）。

这是一场淘汰率很高的竞赛，只有少部分候选标志物可以脱颖而出成为真正的生物标志物，这就意味着我们必须对大量的，甚至是全部的候选分子进行验证。这就凸显出技术手段的落后和不适应了，因为目前最主要的验证手段还是传统的免疫验证方法，即依赖抗体的检测方法。虽然酶联免疫吸附法（enzyme-linked immunosorbent assay）等免疫检测方法的确非常适合验证工作，但是要为新的候选分子找到合适的抗体可不那么容易，而且由于制备新抗体的周期很长，价格也比较贵，所以这基本上是不太可能的，因此大量的候选标志物都没能得到及时的验证。反向蛋白质芯片（Reversed-phase protein array）可能会成为下一个验证利器，但是目前该技术同样受到了抗体的限制，还只能对几百个分子进行验证。包括微珠重悬（microbead suspension）和搭载了微升甚至纳升级微流体芯片（planar array）技术在内的各种技术也都可以提升免疫验证技术的多路处理能力，同时还可以减少验证样品的用量，但是这都不能解决缺乏特异性的高亲和力抗体这个基本问题，所以这类技术最好还是应用于多重检测或者实时检测工作当中，而不太适合用于验证工作。以配体为基础的方法（Aptamer-based approach）从理论上来说也具有特异性方面的优势，因为这种结合也是高度特异性的，理论上不应该存在交叉反应，所以也具有极大的应用潜力。不过这类技术在生物标志物验证方面的应用价值目前还没能得到充分的表现和证实。

相比之下，使用了MRM-MS技术的质谱检测技术在很多方面都更理想，更加适合生物标志物的验证工作。使用了内参的MRM分析验证试验稍加调整之后一个月内就可以对数十个蛋白质分子进行验证，这个速度要比使用免疫验证方法快很多，不过这也需要样品富集技术的配合。多路并行处理能力（multiplexing）则不是问题，一次LC-MRM-MS实验就可以对数百个待检样品进行定量检测，使用免疫-MRM方法（immuno-MRM）也可以对50个肽段进行分析。处理能力以及整体分析能力还可以进一步提高，使用超高速液相色谱仪（ultra-high-performance liquid chromatography）而不是每分钟流速不到300nl的纳米级液相色谱仪（nanoflow chromatography），加快液体的流速（比如达到每分钟0.5ml）就可以达到这个目的。虽然这样做会牺牲一部分检测敏感性，但是可以通过增加上样量的方法加以补偿。这项技术有利于生物标志物的验证工作，以及今后在临床工作中会碰到的验证及实验工作。

在先发现候选标志物再对其进行验证的工作当中，好几项研究已经证实MRM-MS技术是一项非常重要，而且很有效的验证手段。比如Whiteaker等人对乳腺癌小鼠动物模型的研究工作中就使用传统的MRM试验方法对56个蛋白靶标进行过验证，其中就包括49种非常有希望的候选生物标志物。对定量限度（limits of quantification, LOQ）进行分析之后发现整个试验的平均变异系数为5.7%。科研人员对长出了明显肿瘤组织的小鼠血浆样品进行分析（在其中超过一半的血浆中有46种候选分子的浓度都超过了LOQ），使用多重处理技术发现，有30种候选蛋白分子的表达水平在患有乳腺癌的小鼠体内明显增高，这与之前的研究结果是相吻合的。Addona等人也是用MRM技术对四种新发现的心血管疾病标志物分子和其它几种已经被确认的心血管疾病标志物分子进行了验证性研究，他们采集的样品是心肌梗死患者的冠状窦血样（short-term longitudinal

coronary sinus) 和外周血样。最开始他们选择了52种候选分子,可是其中只有3种分子有相应的抗体可以进行免疫验证分析。MRM-MS的检测灵敏度很高,可以对每毫升血浆中只有数纳克的蛋白分子进行检测。

还有好几个科研机构也使用MRM方法对之前已经发现、但是尚未得到验证的心血管疾病及癌症标志物候选分子进行了鉴定。比如Wang等人就使用抗目标蛋白抗体富集技术和MRM-MS技术联用的方法对肿瘤特异性突变蛋白进行了验证,填补了这方面的空白,因为用其它方法都无法完成这个工作。Hüttenhain等人则正在进行目前为止规模最大的一次验证工作,他们计划使用MRM方法对1157种癌症候选蛋白分子进行验证,已经以血浆初步消化产物为原料对其中的73种候选分子进行了分析,还分别以预吸附的血浆和尿液为原料对182种候选分子和408种候选分子进行了分析。Hüttenhain等人还使用MRM方法对美国食品与药品监督管理局(FDA)批准的、以免疫检测方法为检测手段的OVA1卵巢癌肿瘤标志物检测试剂盒(用于预测罹患卵巢癌的风险)的5种检测项目中的4个进行了检测,他们选择了67名卵巢癌患者和16名良性卵巢肿瘤患者作为受检对象,对这83名妇女的血样进行了分析,结果发现这4种标志物在这两组人群中的表达具有非常明显的差异, $p < 0.01$ 。他们同时也对其它30种与卵巢癌有关系的蛋白质进行了分析,结果发现其中有19种分子都与卵巢癌有非常明显的联系($p < 0.01$)。这个工作表明MRM技术在验证生物标志物方面具有和免疫验证技术同样确切的功效。

4.6 定向质谱技术在临床方面的应用价值

在蛋白质组学研究工作中,最关键的一个问题并不是定向质谱技术是否可以应用于临床,而是这项技术什么时候才能够大面积应用于临床,对蛋白质进行检测和分析,以弥补目前使用的免疫检测技术的不足,当然不是完全取代现有的免疫技术。也就是说我们现在已经

不需要再像十几年前那样讨论这项技术在检测小分子物质方面是否实用的问题了,该技术的检测能力已经毋庸置疑。而且目前在临床检测实验室中推广质谱检测技术也不存在技术方面的难度。数据显示,低程度并行处理变异系数、实验结果在各实验室间的可重复性以及检测的准确性等重要的检测指标都已经过关。所以这项技术目前从原理上来说已经不成问题,只不过还需要工程师们想办法尽快开发出一套可用于临床实验室的操作设备。

首先遇到的问题就是开发思路的问题,即应该先解决临床上面临的困难(使用其它方法都解决不了,等着新技术来解决这个问题)还是先建立参考实验室(即建立一套标准)的问题。最有代表性的例子就是为检测甲状腺球蛋白而开发的免疫亲和MRM-MS技术。这项技术在临床上会监测甲状腺球蛋白的水平,以了解某些甲状腺肿瘤的病情进展情况。可是大约有20%的患者体内存在循环抗甲状腺球蛋白抗体,这就会干扰免疫诊断,带来错误的诊断结果。由于使用质谱检测技术会对所有的蛋白质进行水解处理,然后再使用针对其中某一个肽段的抗体对目标肽段进行富集,所以就可以很好地解决抗甲状腺球蛋白抗体干扰的问题。这种免疫亲和MRM技术是由ARUP Laboratories和Quest Diagnostics共同开发的,这两家都是大型的临床诊断技术开发公司,目前也已经开发出了检测血液甲状旁腺激素(parathyroid hormone)、唾液中总胃蛋白酶(total pepsin)和胃蛋白酶(pepsinogen)的方法。

今后的技术开发工作应该还会利用定向质谱技术开发诊断技术或临床疗效或预后预测技术,这些技术主要的目的是解决使用目前的免疫诊断技术无法检测到某些蛋白质,或者可以检测,但是成本太高的问题。不过这些新技术在应用到临床之前也都需要像其它诊断技术一样接受严格的验证,证明其可靠性和准确性。同时可能还会增加一些新的检测指标,比如样品水解效率等。除了开发这些定量检测技术之外,也需要开发一些一条龙辅助技术,包括数

据分析软件等。这就需要质谱技术提供商提早做出准备。其它相关的人员和机构也都需要积极地参与其中，提出自己的意见和建议。

随着高效色谱和更快、更敏感、更精确的样品处理方法的不断出现，蛋白质组学技术也在飞快的发展着。这些技术进步一方面增加了样品的处理能力，同时也部分解决了采样不足的问题，使肽段分析更连贯、重复性更高。随着质谱技术的不断发展，“发现”和“验证”之间的界限也会变得越来越模糊，最终会融为

一体，这就是所谓的平台融合趋势。过去只被用于依赖数据的发现工作中的高分辨率、高质量准确度的质谱分析系统因为其高特异性和假阳性低等优势也正在被越来越多的定向质谱分析工作所采用。所有这些进步都对定向质谱技术在临床工作中的应用起到了决定性的作用。按照我们的乐观预计，将来随着LC-MS/MS质谱仪的推广，发现和验证工作终将合二为一。这一天的到来也会预示着定向质谱技术走向成熟。



百态 · 频道

www.LifeOmic.com

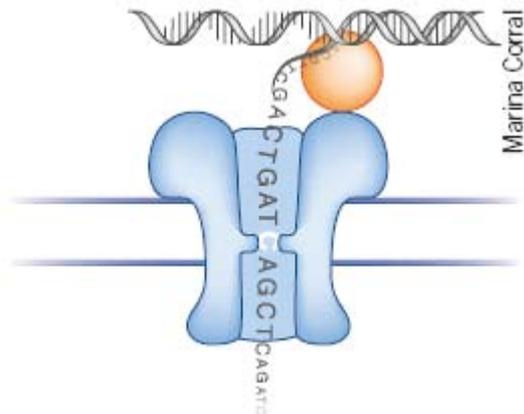
二、值得关注的重要技术与方法学领域的发展

下文向我们展示了一系列精心挑选的、在未来几年内值得关注的重要技术与方法学领域的发展。

1. 颠覆性的纳米孔技术

第一台商品化的纳米孔测序仪将于2013年横空出世。在即将商品化的测序仪器中，DNA单链将蜿蜒穿过由蛋白质组成的孔道，其穿过的速度由附着在孔道上的另一种蛋白质所控制。碱基在穿过纳米孔道时，会通过特定的碱基对组合来改变纳米孔的电流。在理想情况下，人们会看到每个碱基的典型配对模式，但是这一款测序仪器将形成碱基三联体所特有的配对模式，并需要通过计算机将其去卷积。这些特有模式不仅仅局限于四种DNA碱基：纳米孔也能够检测甲基化碱基与羟甲基化碱基，并且从理论上而言还能直接对RNA进行测序。

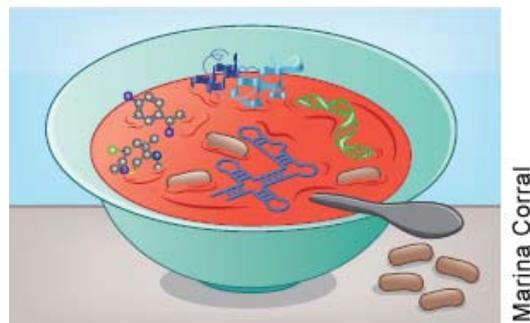
更多阅读请登录：<http://www.lifeomics.com/?p=31796>



2. 探索微生物组功能

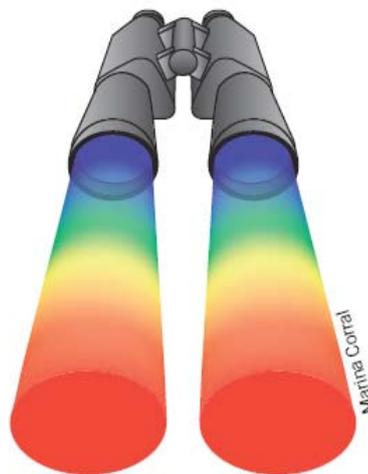
在微生物组功能学研究中，标记物测序方法将与多种图谱分析方法结合使用。大约在数年前，研究人员开始争相对环境中的微生物进行大规模测序。随着人们对每个可能的微生物栖息地的宏基因组序列的相继确定，微生物生态学的新探索领域将会在哪里呢？分子图谱分析技术与DNA测序技术互补，有望让我们更深入地了解那些看不见的生物群落的功能。

更多阅读请登录：<http://www.lifeomics.com/?p=31802>



3. 近红外观测技术

经过科学家们多年不懈的努力，遗传工程技术终于发展到近红外光谱（near infrared, NIR）的区域了。为了开发近红外观察工具，科研人员除了对荧光蛋白进行改造之外也进行了很多其它的尝试，其中就包括了植物和细菌用来感受光线的光敏色素蛋白（phytochrome）。其中源自细菌的光敏色素蛋白最具潜力，因为这些蛋白本来就能够吸收红色和近红外光线，而且因为这些蛋白以胆绿素（biliverdin）作为生色基团，所以哺乳动物细胞也能够很好地生成这种蛋白。新近以光敏色素蛋白为基础开发成功的近红外荧光蛋白IFP1.4、iRFP和Wi-Phy等遗传学工具的最大激发光和发射光波长都已经达到了近700nm，这几种蛋白未来在活体动物成像方面将大有作为。



更多阅读请登录：<http://www.lifeomics.com/?p=31807>

4. 不完美但是很有用的钻石

钻石中存在的氮空泡中心（Nitrogen vacancy center）一方面会让钻石变得不那么完美，可是另一方面却又赋予了钻石更多更有用的特性。我们现在还不清楚这种缺陷钻石到底能在哪里发挥它们最大的能量，但是其巨大的应用潜力却能够让生物学家们疯狂，这些有缺陷的钻石在生物学家们的眼中和女孩眼中完美的钻石没什么区别。

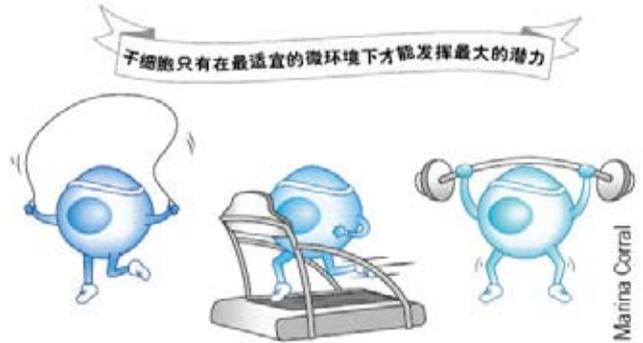
更多阅读请登录：<http://www.lifeomics.com/?p=31812>



5. 在体外重建干细胞生存的微环境

科学家们还在继续尝试在体外细胞培养环境中复制适合干细胞生存的微环境。在体外复制这样一套微生态系统不仅仅需要我们对生物学有非常深入和透彻的理解（可惜的是目前对于大部分干细胞的生物学认识还相当不够），还得打造出一套符合我们意愿的能够行使恰当生物化学和生理学功能的立体生态结构的能力，而材料科学专业知识和技能就是其中不可或缺的一个必备条件。随着干细胞和材料科学研究的不断深入，相信在不远的将来科学家们一定可以在体外复制出一套和体内一模一样的干细胞生活的微生态系统。

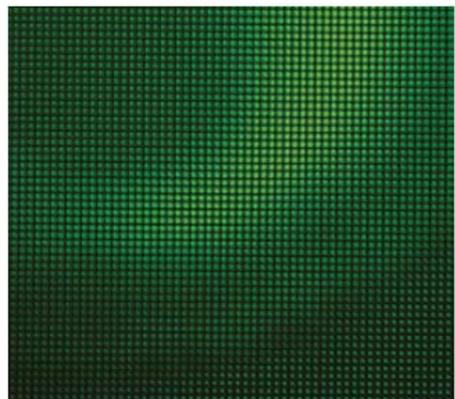
更多阅读请登录：<http://www.lifeomics.com/?p=31817>



6. 快速容积成像新技术

一次拍摄就能够得到三维立体容积图像的显微镜已经被应用于生物学研究工作当中了。光场显微镜技术和多重聚焦荧光显微镜技术都是非常具有潜力的新技术，这些技术帮助我们快速获得生物样品的三维立体图像。

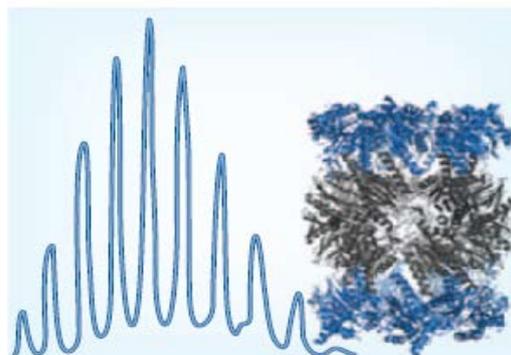
更多阅读请登录：<http://www.lifeomics.com/?p=31821>



R. Portugues

7. 蛋白复合体无损质谱鉴定新方法

能够对完整的大型蛋白复合体进行质谱鉴定 (Mass spectrometry technology) 的新技术正在日渐成熟。最近新开发的一项质谱检测技术可以对蛋白质或者蛋白复合体进行无损鉴定, 今后这些重要的蛋白质功能信息就再也不会被遗漏了。在这种新技术下, 蛋白质首先会经过比较轻柔的离子化处理 (ionized), 使其变为气态, 此时蛋白质还会保留原有的三维立体结构, 而且如果在合适的条件下, 即便是更大的、以非离子键结合的、可溶性的膜蛋白复合体都可以保持原本的状态。

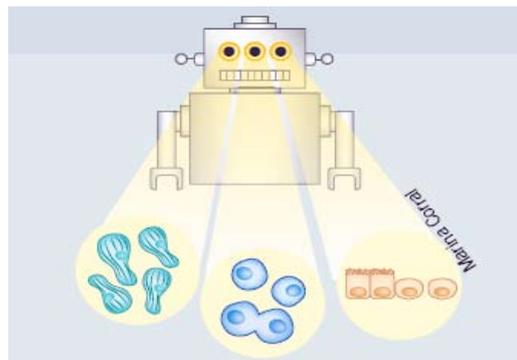


更多阅读请登录: <http://www.lifeomics.com/?p=31824>

8. 可以自动分辨表型的机器

可以自动分辨表型的机器能够加快生物表型研究工作的进度。虽然这种自动表型鉴别技术的实用价值非常大, 但是要教会机器对各种表型进行识别可不容易。不过随着相关技术的不断进步, 构建不同的表型反倒可能会成为今后研究工作中的瓶颈。

更多阅读请登录: <http://www.lifeomics.com/?p=31828>



原文检索

1. Vivien Marx. (2013) Targeted proteomics. *Nature Methods*, 10:19-22.
2. Allison doerr. (2013) Mass spectrometry-based targeted proteomics. *Nature Methods*, 10:23.
3. Paola Picotti, Bernd Bodenmiller & Ruedi Aebersold. (2013) Proteomics meets the scientific method. *Nature methods*, 10:24-27.
4. Michael A Gillette & Steven A Carr. (2013) Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. *Nature Methods*, 10:28-34.
5. Nicole Rusk. (2013) Disruptive nanopores. *Nature Methods*, 10(1): 35.
6. Tal Nawy. (2013) Probing microbiome function. *Nature Methods*, 10(1): 35.
7. Erika Pastrana. (2013) Near-infrared probes. *Nature methods*, 10:36.
8. Daniel Evanko. (2013) Defective (but useful) diamonds. *Nature methods*, 10:36.
9. Natalie de Souza. (2013) In vitro niches. *Nature Methods*, 10:37.
10. Erika Pastrana. (2013) Volumetric imaging in a snapshot. *Nature Methods*, 10:37.
11. Allison Doerr. (2013) Mass spectrometry of intact protein complexes. *Nature Methods*, 10:38.
12. Natalie de Souza. (2013) Machines learn phenotypes. *Nature Methods*, 10:38.

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

Hot Topics

一专多能的视蛋白

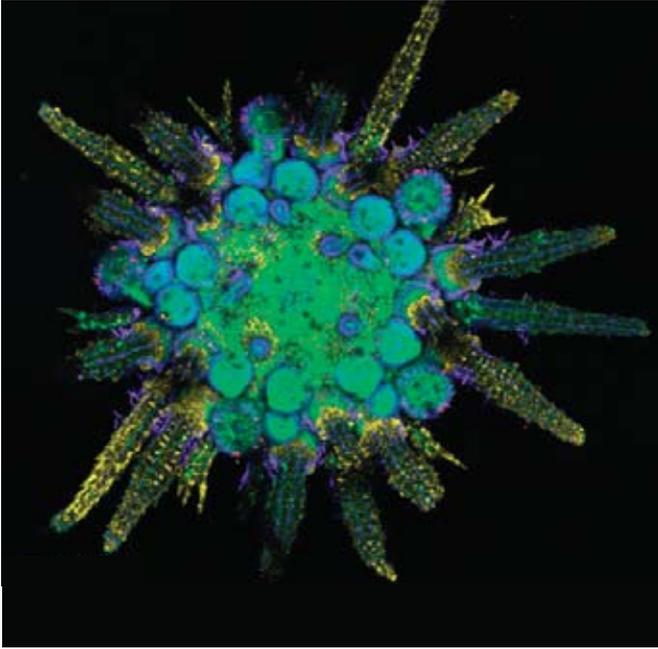
对无脊椎动物（invertebrate）的研究让我们对视蛋白这种对光线极为敏感的蛋白又有了许多新的认识，发现了它的一些其它功能，也认识到了这种蛋白的历史有多么的久远。

当科研人员在2006年第一次审视海胆（sea urchin）的基因组序列的时候，他们惊讶地发现在这种生活在海洋里的棘皮动物体内居然也存在视蛋白（opsins）的编码基因。我们都知道视蛋白是一种对光线敏感的蛋白，如果没有视蛋白，那视觉就无从谈起了。可事实上活动范围有限的海胆不仅没有眼睛，连头也没有，当然也就没有我们传统意义上的大脑了。所以科研人员们无法想象视蛋白能够呆在海胆体内的什么地方，我们知道在其它动物体内，视蛋白都存在于眼球的感光细胞里。世界上最古老的海洋实验室之一——意大利那不勒斯Anton Dohrn动物研究所（Stazione Zoologica Anton Dohrn in Naples, Italy）的发育生物学家Maria Ina Arnone长期从事海胆

研究，据她回忆，她们当时没人能猜得出海胆表达这些视蛋白有什么用。

Arnone经过分析之后认为，这些视蛋白基因主要在海胆的管足（tube feet）底部活化并表达。海胆的管足就是位于海胆刺上及其周边的细小黏性器官。2011年，Arnone的研究团队又在这些管足上发现了感光细胞（photoreceptor cell），由于这些感光细胞中缺少常见的视蛋白色素（pigment），所以Arnone等人之前没注意到它们。

这些发现以及最近取得的其它一些科研成果逐渐向我们揭示了这样一幅场景，其实有很多种动物并不需要传统意义上的视觉器官——眼睛，同样也能够利用视蛋白，而且视蛋白在这些物种身上可能并不仅仅起到感光的



►图中红绿色的就是表达有视蛋白的海胆感光细胞，它们能够让海胆对光线做出反应。

作用。近日在美国旧金山召开了一年一度的整合与比较生物学协会（Society for Integrative and Comparative Biology, SICB）年会，Arnone和其他一些与会者在会上介绍了视蛋白各种出人意料的功用，以及它悠久的历史。比如有人就发现在果蝇体内的视蛋白居然与果蝇的听力有关。据Arnone介绍，视蛋白可以广泛地表达在眼球之外的多种器官里。

表达在眼球之外的视蛋白

其实早在25年之前就有人提出在眼球之外的器官中也可能存在视蛋白的想法了，当时认为在鱼的皮肤和鸽子的大脑中可能会表达视蛋白分子。而首先证实这一想法的是美国马里兰州贝塞斯达美国国防医科大学（Uniformed Services University of the Health Sciences in Bethesda, Maryland）的Ignacio Provencio和Mark Rollag等人。Provencio等人观察到两栖动物（amphibian）皮肤里的色素细胞（pigment cell）能够对光线起反应，于是他们就着手对此现象开展研究，最终于1998年从青蛙的皮肤中分离到了视蛋白，他们将其命名为黑视蛋白（melanopsin）。在那之前科学家们都认为世界上只存在两种视蛋白，那就是脊椎动物（vertebrate）体内的睫状视蛋白（ciliary opsin）和更为古老的、存在于无脊椎动物体内的弹状视蛋白（rhabdomeric opsin）。不过，虽然黑视蛋白是从有脊椎的青蛙体内分离到的，但是它们看起来和弹状视

蛋白更为接近。

Provencio和Rollag后来又在青蛙的眼睛和大脑里发现了黑视蛋白，几年之后，又有一大批论文报道在其它脊椎动物体内也发现了这种视蛋白，这些研究成果也为研究黑视蛋白的功能提供了大量的线索。比如科研人员们发现，在小鼠和人类的神经组织中也存在这种黑视蛋白，还有人发现这种黑视蛋白可以帮助某些动物建立昼夜节律（circadian rhythm），详见*Science*, 20 December 2002, p. 2297。

黑视蛋白的出现表明我们大大低估了视蛋白的复杂程度。位于德国海德堡的欧洲分子生物学实验室（European Molecular Biology Laboratory in Heidelberg, Germany）的Detlev Arendt在2003年曾经对各种动物的视蛋白进行了一次彻底的排查，最后他认为弹状视蛋白和睫状视蛋白都具有非常悠久的历史，而且我们不能简单地根据动物体内表达了哪种视蛋白来区分它们是脊椎动物还是无脊椎

动物。可是在脊椎动物和昆虫之外的其它物种中寻找视蛋白，以及在视觉器官之外的其它器官中寻找视蛋白的工作一直没有真正地开展起来，直到随着DNA测序技术的进步，我们拥有了各种物种的基因组序列图谱，这一状况才得以改善，科学家们才能够知道海胆这样的动物是否也能够表达视蛋白。

Arnone用了很长的时间才慢慢了解视蛋白是如何帮助海胆这种简单的生物利用光线“看见”外面的世界的。海胆这种浑身长满刺的棘皮动物都会避免被阳光直射，它们会把自己埋在石头堆里或者躲在阴影里，这些都说明海胆应该能够“看见”光亮。科学家们还发现海胆甚至能够区分不同形状的物体。Arnone在上个月召开的SICB年会上就提出，她们认为海胆的感光细胞（其中就存在视蛋白）位于海胆管足的底部，由于这些管足有一部分位于海胆坚硬外壳的阴影之下，所以这些外壳也就起到了普通眼球里色素的作用，帮助视蛋白区分光线照射的方向（这也是视蛋白最主要的作用方式，因为色素会部分遮盖感光细胞，这样就可以辨别光线照射的方向了）。Arnone还提出

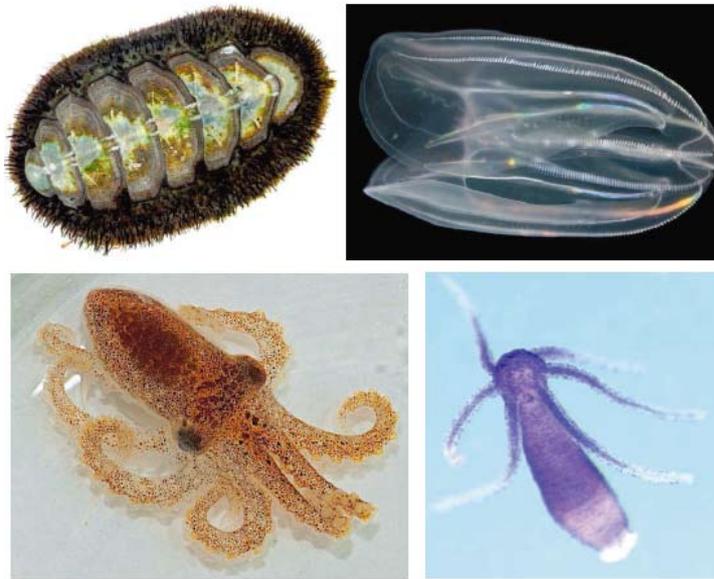
海胆的感光细胞与5种基础神经有联系，所以海胆就可以将来自不同管足的视蛋白信息整合起来，就好像昆虫的复眼（compound eye）那样。

在棘皮动物界，视蛋白的故事更加复杂。位于管足底部的视蛋白属于弹状（rhabdomeric）视蛋白，Arnone用显微镜在海星（starfish）腕（arms）末端找到的对光线敏感的海星“眼睛”里发现的视蛋白也同样属于弹状视蛋白。不过Arnone在这次SICB年会上又介绍了她们的一大新发现，她们在海胆管足末端和海胆皮里又发现了睫状视蛋白，甚至可能在海胆的肌肉组织中也存在这种视蛋白，在幼小的海胆体内也能发现这种蛋白。Arnone现在还不能确定这些睫状视蛋白的功能，但是由于海胆、海星这些棘皮动物都属于后口动物（deuterostomes，不过是最低等的后口动物），而后口动物中也包括脊椎动物，所以弹状视蛋白和睫状视蛋白这两种视蛋白很有可能都见于最早的后口动物体内。不过这些视蛋白后来是如何分化并形成具体的功能的现在还不得而知。

无处不在的视蛋白

就在海胆视蛋白被发现之后，美国加州大学圣芭芭拉分校（University of California, Santa Barbara）的进化生物学家Todd Oakley也对这种蛋白产生了兴趣，他想知道在其它的动物体内是否也能找到这种蛋白。于是Oakley等人开展了大规模的搜索行动，他们的搜索范围甚至涵盖了动物进化树最底部的那几个物种。据Oakley回忆，2007年，他们终于找到了腔肠动物（Cnidaria）。水螅（hydra）和水母（jellyfish）都是腔肠动物的代表，它们最大的特征就是长着有毒的倒刺，可以螫伤、

螫死猎物，或者帮助它们发现捕食者。Oakley等人在这些腔肠动物的毒刺细胞里发现了他们寻觅已久的视蛋白，而且他们还发现这些毒刺细胞在光亮的环境下活性会降低，详见他们于2012年3月5日发表在生物医学中心出版的《生物学》（*BMC Biology*）杂志上的文章。据Oakley介绍，虽然科学家们对这些毒刺细胞已经研究了好几十年，可是之前还从来没有报道过这些细胞和光线有什么关系，大家普遍认为水里的化学物质才是影响它们的关键。不过我们发现视蛋白的感光能力在其中也起到



▶ 无处不在的视蛋白。在没有眼睛的石鳖（chitons）、栉水母（comb jelly）和水螅（hydra）中都发现了视蛋白，甚至在章鱼（octopus）的皮肤里都能找到它们的踪迹。

在另外一种多重感知机制（multimodal sensation）。Oakley的博士后Daniel Speiser也在石鳖（chitons）这种软体动物（mollusks）外壳上伸出的触角（tentacles）里发现了视蛋白。可是现在还不清楚这些视蛋白是用来感知机械刺激信号的还是感知光刺

了作用，但是这一切都与成像作用或者视觉无关。

Oakley的研究小组又在其它几种腔肠动物里发现了这种视蛋白作用，其中就包括两种海葵（anemone）和一种月亮水母（moon jelly polyp），这说明视蛋白的这种非视觉功用很早以前就有了。最近刚刚来到加州大学圣芭芭拉分校工作的神经生物学家Craig Montell猜测道，视蛋白可能是在此之后才慢慢发展出了视觉功能。

美国加州大学戴维斯分校（UC Davis）的David Plachetzki也在这次年会上做了报告，他们发现水螅上靠近毒刺细胞的视蛋白细胞中还含有味觉（taste）受体。所以Plachetzki认为感光细胞的祖先应该是可以同时感知多种刺激信号的全能感知细胞。

其它一些研究成果也都支持上面这些观点。比如来自Oakley试验室的Desmond Ramirez就在章鱼（octopus）皮肤的纤毛（cilia）中发现了视蛋白，而我们都知道这些纤毛还可以感知机械刺激信号（mechanical stimuli）。所以Oakley认为很有可能会存

激信号的。

来自美国马里兰州贝塞斯达美国人类基因组研究院（National Human Genome Research Institute in Bethesda）的Christine Schnitzler则更进一步，他把目光投向了动物进化树的最底部，他在最近完成的淡海栉水母（*Mnemiopsis leidyi*）基因组序列中又发现了三种看起来比较奇怪的视蛋白编码基因。很多人都认为栉水母（Comb jelly）是最早出现的多细胞动物。Schnitzler在这次年会上报告说他们发现在栉水母体内有两种视蛋白与睫状视蛋白和弹状视蛋白有一点类似，还有一种视蛋白则和这两种视蛋白完全不一样。在栉水母体内的两个位置都能发现这些视蛋白，其中一个部位是正对着栉水母嘴巴的感觉器官，该器官可以帮助栉水母在水中保持正确的方向，发现视蛋白的另外一个位置就是栉水母体内的发光细胞。Schnitzler认为由于这些发光细胞里的视蛋白最为敏感的波长正是这些细胞发射光的波长，所以这些视蛋白可能能够帮助栉水母控制发光的亮度。

视蛋白的其它作用

即便在长有眼睛的动物里，科学家们也发现了很多视蛋白的其它非视觉功能。虽然科研人员长期以来对黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）眼睛里的视蛋白开展了大量的研究工作，但是德国哥廷根大学（University of Göttingen in Germany）的Martin Göpfert最近却在黑腹果蝇的听觉器官——触角（antennal ear）里找到了视蛋白。Göpfert的课题组对黑腹果蝇的触角听觉基因进行了排查，他们本来是想看看能不能从中发现与人类失聪有关的线索。他们选择了正常的果蝇和因为突变而缺失了触角的果蝇作为试验材料，想看看有哪些基因在正常果蝇体内的活性更高。结果找到了275个这样的基因，可是其中有4个都是视蛋白基因，之前只在果蝇的眼睛中见过它们有表达。

经过深入的研究之后，Göpfert等人于2012年8月31日在《细胞》（*Cell*）杂志上发表了一篇文章，文章中指出发现这4个视蛋白基因在触角中感受机械信号的细胞里也有表达，并且它们都与黑腹果蝇的听觉相关。据Göpfert介绍，他们发现这些听觉细胞利用视蛋白来感受机械刺激信号，这说明早在感光器官出现之前，这些视蛋白就已经在其它类型的感受器中承担了相应的作用。比如在听觉器官中就承担了一定的作用，但是这种作用与光线

感知能力无关。

Montell的研究小组也发现了另外一种视蛋白的非视觉作用，那就是感受温度变化的能力。果蝇幼虫最适宜的生长温度是18℃，它们能在19~24℃的范围内找到最适宜的18℃的位置。所以Montell等人就决心找出果蝇的温度感受器。据他回忆，他们当时可没想到视蛋白会在其中起到如此重要的作用。不过Montell等人在2011年发现，如果果蝇因为突变缺失了视蛋白ninaE，那它们就会丧失对这种温度感知能力。可是当他们在突变果蝇体内重新表达来自小鼠的黑色视蛋白之后，这些突变果蝇又神奇的恢复正常了，它们又能够找到最适合它们生活的18℃环境了，详见*Science*, 11 March 2011, p. 1333。在果蝇体内一共有7种视蛋白，Montell等人发现其中至少有5种视蛋白具有感知光线以外的能力，不过这些研究成果目前还没有发表。

Montell估计整个科研界可能才刚刚开始认识到视蛋白的非视觉作用。当她在6年前刚开始从事视蛋白研究时这类课题还处于一个非常边缘、非常冷门的状态。但是最近Montell又为视蛋白研究拿到了一个新的基金，她们实验室将会有一半的工作与视蛋白有关。Montell表示她们明年会有更多的成果展现给大家。

参考文献

1. ELIZABETH PENNISI. (2013) Opsins: Not Just for Eyes. *Science*, 339:754-755.

 筱玥/编译

OmicLink™ 即用型 ORF 表达克隆

4套已构建表达克隆即订即得

助您迈出基因功能研究第一步



ORF 表达克隆的优势

- ◆ 将约20,000条人源基因插入到慢病毒载体（Lv105）、哺乳动物载体（M02）、穿梭克隆等4套载体中构成的现货ORF表达克隆，即订即得；
- ◆ 45,000条人源、小鼠、斑马鱼基因；
- ◆ 100多种适用于不同表达系统的表达载体；
- ◆ 50多种不同功能的蛋白标签；
- ◆ 保证表达框序列正确性。

ORF 表达克隆的应用

- ◆ 蛋白的表达纯化、细胞定位，用于对目的基因或蛋白的功能研究与分析。
- ◆ 原位杂交探针的制作，用于检测组织或器官的基因表达谱。
- ◆ 在蛋白功能研究过程中，用于shRNA和miRNA抑制基因的功能拯救实验。
- ◆ 高通量筛选，可用于功能基因组学、蛋白组学和系统生物学的前沿领域。



探究有“前途”的组学

十年前我们也就听说过一个组学（omics）——基因组学（genome），可现在一下子又冒出了千千万万个组学，比如蛋白质组学、转录组学、表观遗传学组学等，这么多组学是不是都值得我们去研究呢？接下来《自然》（*Nature*）杂志给您做一番梳理，帮助大家了解哪些组学才是真正重要、值得我们下大力气去研究的、有前途的科研方向。

现在，不做一些组学研究都不好意思跟人打招呼了，我们都数不清有多少科技词汇是以‘组学’这词做结尾的了，说不定已有数万个这样的单词了。去年，美国《纽约时报》（*The New York Times*）和《华尔街日报》（*The Wall Street Journal*）都曾经发表过多篇文章，对这一现象进行调侃和

讽刺。有一位科学家甚至设计了一款“组学发生器”软件。该软件可以随意创造出一种新的“组学”，只需要在某个生物词汇的后面加一个“组学”后缀就可以了。这种软件甚至还可以再编造一个大得能够唬死人的科研论文的题目，比如《抗菌组学测序结果发现了细菌进化与环境的关系》(Sequencing the bacteriostaticome reveals insights into evolution and the environment)等，当然这样只能制造出“坏”的组学(badomics)。美国加州大学戴维斯分校(University of California, Davis)的微生物学家Jonathan Eisen就经常在他的个人博客上发表以上言论，对各种完全没有诞生意义的组学进行嘲讽，最近不幸被他瞄上的就是“昼夜节律组学(CircadiOmics)”。有人认为应该将所有与昼夜节律(circadian rhythm)相关的基因看成一个集合，将它们命名为昼夜节律组学。真担心再这样下去总有一天会有更为奇葩的组学，比如“放屁组学”等稀奇古怪的组学诞生。

植物学家Hans Winkler可能不知晓他于1920年提出的想法对后世带来了多么大的影响。“基因组(genome)”这个概念就是Winkler提出的。他当时用“基因组”这个词来描述所有染色体的集合。其实当时在科学界也存在其它的组学概念，比如用来描述所有生命体集合的生物组学(biome)和囊括所有根系(root)的根组学(rhizome)等。这些单词不约而同地都以“ome”这

个希腊语后缀做结尾，就是取其具有某种性质的意思——一大群具有同样性质的个体的集合。随后，人类基因组计划(Human Genome Project)等重大科研项目的巨大影响力使得“基因组”这词火了起来。美国马萨诸塞州波士顿市哈佛大学医学院(Harvard Medical School in Boston, Massachusetts)语言学家及医学信息学家Alexa McCray认为，单从‘组学’这个后缀的本意来看，如果我们提到某种组学，那么指的应该是一个全新的科学领域，而不是某些既有元素的重新排列组合而已。

Eisen也承认，科研人员都非常清楚“组学”这个非常悬乎的词具有巨大的潜在市场价值。他指出，大家都在说某种组学是自己的原创和新发现，非常值得深入研究下去，所以希望能有更多经费上的支持。虽然有一些组学的确能够让人有眼前一亮的感觉，但是更多时候我们看到的只是一些毫无新意的炒作而已，比如“博物馆组学(museomics，对博物馆藏书

上的微生物进行测序)”和有点搞笑式的纤毛组学(ciliomics，即研究细胞上的纤毛)等。美国华盛顿州西雅图儿童医院(Seattle Children’s Hospital in Washington)的首席资料官，同时也是《组学》(Omics)杂志创刊编辑的Eugene Kolker对此现象评论道：“的确，有一些组学非常无聊，但是其中也不乏非常靠谱的项目，所以我们应该



认真地进行取舍和平衡。如果我们只知道一味地取笑，这也不是一个正确的态度。”

在最理想的状态下，提出一个新的“组学”概念应该有助于科学的发展，可以提出很多有价值的科学问题，激励科研人员去解决它们，例如后面在“最有潜力和前途的几种组学”中介绍的那些热门的组学研究领域。美国康涅狄格州耶鲁大学（Yale University in

New Haven, Connecticut）的计算生物学家（computational biologist）Mark Gerstein就曾表示，他认为“组学”这个词绝对是一个非常重要的后缀，基因组学研究工作就是一个最好的例子。基因组学也给我们树立了一个非常好的榜样和标准，激励我们在科学研究的道路上继续前进。接下来，我们就将为读者介绍5个最有希望的组学新项目。

偶然发现组学（INCIDENTALOME）

多年前，高通量测序技术还不够强大，不能进行个体基因组测序，可是美国波士顿儿童医院专门研究医学信息的Isaac Kohane在那时就发明了“偶然发现组学（INCIDENTALOME）”这个词，提醒大家一定要小心基因组测序技术。他曾于2006年发表过一篇论文，认为不断涌现的遗传学数据终将在未来某天给现代医学带来大麻烦。

INCIDENTALOME这个词源自“偶发瘤（incidentaloma）”。放射医生们常常用“偶发瘤”这个词来表示并没有引起临床症状，只是被他们无意间发现的肿瘤。所以Kohane借用了这个意思，用“偶然发现组学（INCIDENTALOME）”表示在进行人类基因组学研究工作时获得的意外发现，即那些并非我们想知道的遗传学信息。比如在寻找与儿童失聪相关的遗传学致病原因的科研工作中，我们可能会意外地发现这个孩子将来还会患上心脏疾病或者肿瘤。但是临床医生们应不应该把这个坏消息告诉患儿和他们的家长呢？如果应该告诉他们，那么应该在什么时候告诉他们才比较合适呢？又应该告诉谁呢？是孩子还是他们的家长？现在，进行个人基因组测序已经变得更加容易了，所以美国马里兰州贝塞斯达的美国国立人类基因组研究院（US

National Human Genome Research Institute in Bethesda, Maryland）就向从事基因组学研究的科研人员提出了这样一个颇为棘手的伦理学问题——我们该如何向患者介绍他们的遗传学检测结果？

去年进行的一项研究揭示了从事基因组学研究的科研人员目前正遭遇的尴尬境遇。这项研究选择了16位遗传学专家进行了问卷调查，询问了一些与99种常见遗传疾病有关的遗传突变位点相关的问题，主要了解的就是临床医生们会不会在大规模测序检测项目中重点关注这些突变信息。对于其中的21种疾病（也可以称作突变基因），其中还包括众所周知的、与某种癌症或心律失常相关的突变，16位专家一致认为应该将检测结果告知成年的被检测者。但是如果涉及到不可治的、致命的亨廷顿氏病（Huntington's disease），则只有10位受访专家认为应该将检测结果如实地告知患者。至于其它目前意义更加不明确的突变，这些专家们的意见就更难达成统一了。对于是否应该将儿童的测序结果告知他们的家长这个问题，各位专家们也没能达成一致的意见。

关于偶然发现组学，最大的问题就是没人确切地知道哪些突变与我们人类的健康真正相关，更何况是人体内还存在300多万个突变位

点。Wendy Chung是美国纽约哥伦比亚大学（Columbia University in New York）的一名临床遗传学家，她正在寻找一些方法，帮助科研人员 and 患者选择出哪些遗传学检测结果才是应该让他们知道的，哪些应该保密。Chung还对各种信息对患者的行为和心理产生哪些影响的课题进行了研究。她表示，如果你问患者，他们想了解哪些DNA测序结果，一般在最开始的时候会得到两种答案，有的人想知道最完整的测序结果，有的人可能对结果完全不感兴趣。可是等他们想过一阵之后，他们就有可能

会说只想了解部分检测结果。

随着测序检测在临床工作中变得越来越普及，有关偶然发现组学的定义，以及它的边界也正变得越来越模糊。美国西雅图儿童医院的生物伦理学家Holly Tabor就认为，遗传学家们应该对这些棘手的问题做好充分的准备，他认为‘偶然发现组学’根本就是一个让人产生误解的概念，本来在基因组学研究工作中就是会得到一些意外的发现，这是常有的事，这个根本就不值得如此大惊小怪，更加不应该进行过度的宣传和渲染。

表型组学（PHENOME）

现在进行一次人体基因组测序已不再是一件多么了不起的事了。真正的困难是，表型组学（PHENOME）研究，即对某一个人的生理和行为特征进行全面的、彻底的描述的工作。其中科研人员们最想了解的部分就是与面部缺陷（facial abnormalities）或者肢体畸形（limb deformities）等疾病相关的生理和行为特征，以及有助于诊断抑郁症等疾病的生理和行为特征等。而且大家还希望可以用计算机识别的语言对这些表型组学信息进行描述和记录，同时也要求能够尽可能地将表型组学信息与基因组学信息一一对应起来。德国柏林博爱大学医院（Charity University Hospital in Berlin）的计算生物学家Peter Robinson现在就正在从事这方面的工作，对这些表型组学信息进行标准化处理，他表示，他实在是想不出还有什么词比‘表型组学’更合适、更贴切了。

其实早就已经有人利用小鼠、大鼠、酵母、斑马鱼和拟南芥等物种进行过表型组学的研究工作了。其中最系统化的科研工作就是先对基因进行逐个敲除，然后对敲除动物进行细致的电生理、代谢和行为学方面的研究工作。

但是我们不能用这种方法进行人体试验，不过有一些临床科研工作者希望可以用临床患者的数据来填补这方面的空缺。

不过即便是针对因为单突变基因导致的孟德尔式遗传疾病（Mendelian diseases）进行这种填空式的补充，要将遗传疾病与突变位点一一对应起来也是非常困难的，因为我们目前至少已经发现了6000多种少见的遗传疾病，可是其中有一大半疾病的遗传致病因素到现在还没被确定。另外，可能也是最困难的一点就是，我们根本无法为某一种遗传病搜集到足够多的患者的数据，因为这些疾病的发病率通常连百万分之一都不到。据美国西雅图市华盛顿大学（University of Washington in Seattle）的遗传学家Michael Bamshad介绍，如果我们能够找到足够的、非常确定的表型数据，那么还有可能为大部分病因不明的孟德尔式遗传疾病找到遗传致病原因，但是如果这些数据的支持，这基本上就是一个不可能完成的任务。

可是如何才能收集到这么多的表型信息呢？有很多科研人员和患者互助组织已经在这方面开展了部分工作，他们已经进行了

很长时间的信息储备工作，开发了一些信息工具和词汇来描述与某些特定疾病相关的一些表型特征。目前最大的困难是如何将这些零散的信息整合到一起。澳大利亚墨尔本大学（University of Melbourne in Australia）的遗传学家Richard Cotton对此进行了一番解释，他说道，比如，在描述肚子痛这种症状时某位临床医生用的是“胃痛”这个词，可是另外一位医生用的却是“肠胃炎（gastroenteritis）”这个词，那么肚子痛的患者可能就会被分成两组，但他们本来应该是属于同一个大类的。

在去年的11月，Cotton和其它几个团体参加了在美国加利福尼亚州旧金山市举行的名为“为人类基因组项目做好准备（Getting ready for the Human Phenome Project）”的大会。召开这次大会的主要目的就是方便大家交流、交换表型组学信息以及数据。有一个名为Orphanet的组织主要关注的都是罕见疾病，他们就在积极开展表型组学名词标准化方面的工作。他们组织了大量的临床医生和科研人员

从事这项工作，目前已经对一到两千个表型组学名词进行了定义，比如他们对身材矮小就做了规定，应该使用“short stature”一词，之前大家对身材矮小的定义可谓是五花八门，有人用“身高不及正常水平”来形容，还有人会使用“个子小（small stature）”或者“身高不及人群中3%的个体（height less than 3rd percentile）”等非标准词汇。据美国马里兰州巴尔的摩约翰霍普金斯大学医学院（Johns Hopkins University School of Medicine in Baltimore, Maryland）的临床遗传学家Ada Hamosh介绍，只要大家能够就表型组学的标准规范用语达成一致，那么谁都能清楚地知道其他人的意思。

还有一部分科研人员正在积极地发掘电子医疗档案里的特异信息，以便让计算机能够对这些信息进行梳理，从而实现自动将常见的表型组学资料进行分类的目的。据Kohane介绍，这些病历里记载的信息虽然有一些非常有价值，但它们全是杂乱无章的，我们正在做的就是点石成金的工作。

相互作用组学（INTERACTOME）

如果仔细审视生物学的中心法则，我们会发现生物其实就是一大堆零件的组合物。DNA编码RNA，RNA再编码蛋白质。从这里我们至少可以发现三个组学——基因组学（genome）、转录组学（transcriptome）和蛋白质组学（proteome）。但是只有将这三个组全部组合在一起才能形成一个完整的生命。神经活动、细胞分裂或者细胞死亡，这些活动和过程全都依赖分子间的相互作用。所以又诞生了相互作用组学（INTERACTOME）的概念，用来描述生命体内部所有分子间的相

互作用。而且就复杂程度来说，相互作用组学研究绝对是各种组学研究工作中最为复杂的一个。想象一下，人体里大约含有3万个基因，如果只编码2万个蛋白，并且这些蛋白之间只会发生两两相互作用，这也会产生2亿种相互作用，这还不算其它分子之间的相互作用，如果都算上那简直就是一个天文数字。

不过这可没有吓住广大无所畏惧的科研人员，Marc Vidal就是其中的一位。这位就职于美国波士顿Dana-Farber癌症研究所（Dana-Farber Cancer Institute in Boston）的50岁的

系统生物学家希望能够在退休之前看到一份相互作用组草图。实际上他应该可以提前看到一个蛋白质间相互作用的图谱。Vidal充满信心地说道：“我们从事这方面的工作已经二十多年了，现在终于快要完成了。”

不过Vidal所谓的“快要完成”实际上也就只涵盖了人体内10~15%的蛋白质间相互作用，他们实验室和其他几家实验室主要根据酵母双杂交等蛋白质间相互作用的细胞学试验结果绘制了这幅图谱。另外一部分科研人员则主要利用免疫共沉淀试验、文献资料或者计算机模拟（主要根据蛋白质的形状和行为进行模拟）等方式来发现蛋白质间的相互作用。

首轮大规模的相互作用组学研究已经开展了十几年，经过不懈的努力，科研人员终于开始掌握了一些真正的相互作用信息，能够辨别哪些相互作用是真实的，哪些其实只是假象。如果要下一个定论，就得通过多种不同的方法对同一个相互作用进行验证。虽然这份相互作用图谱还没有完工，但是它已经开始为科研工作发光发热了，已经有生物学家开始咨询相互作用组学方面的信息和研究成果，希望这些信息可以帮助他们更好地开展自己的工作。

Haiyuan Yu是美国纽约康奈尔大学（Cornell University in Ithaca, New York）的一名系统生物学家，他对大约1800万对蛋白间相互作用进行了检测，同时还对现有的几个相互作用组学数据库进行了一番梳理，最终确定了20614个相互作用，其中涉及7401种人体

蛋白。Yu的科研团队还为其中大约1/5的相互作用确定了蛋白质相互作用位点。Yu等人发现，在蛋白质相互作用位点上通常都更容易出现能够导致疾病的致病突变。比如，Wiskott-Aldrich综合症（Wiskott-Aldrich syndrome）这种血液病就是由WASP蛋白的突变引起的，但是只有当WASP蛋白上与VASP蛋白发生相互作用的位点出现突变时才会致病，单单考虑WASP基因是否突变是没有意义的，只有参考相互作用信息才能确定基因突变是否是致病突变。

Vidal相信未来的相互作用组学信息会更加精细和准确，最开始得到的肯定是基本的相互作用网络的骨架信息，其中包括相关的蛋白质及其发生相互作用的配体分子，当然最好是能够有相关细胞种类的信息；然后就会得到更加更具体、更深层次的内容，比如相互作用可以维持多长时间，需要哪些条件才能发生相互作用，相互作用位点是什么等。

Vidal希望在将来的某一天，临床医生们在诊断时不仅需要参考患者的个体基因组的信息，还要参考相互作用组的信息，这是因为相互作用组也会对表型组产生影响。美国加州大学圣地亚哥分校（University of California, San Diego）的系统生物学家Trey Ideker认为基因组是一个相对静止的概念，DNA序列不会受到药物、组织或者其它条件的影响，可是相互作用组就不同了，这是一个动态的概念，会受到很多条件和因素的影响，进而做出相应的调整和改变。



毒物组学 (TOXOME)

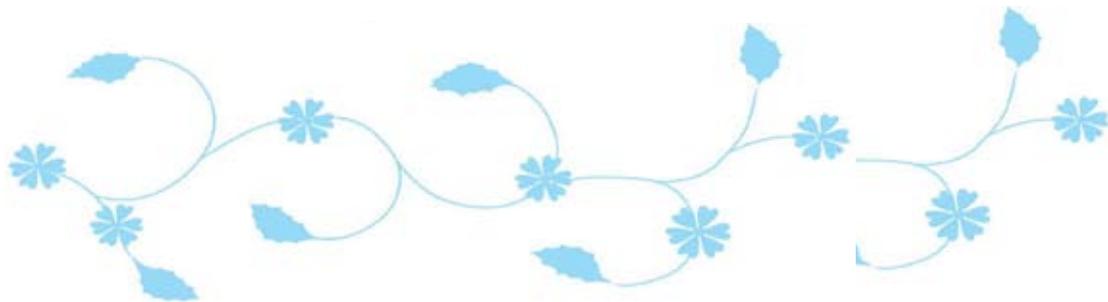
美国约翰霍普金斯大学彭博公共卫生学院 (Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health in Baltimore) 毒理学家 Thomas Hartung 想出了毒物组学 (TOXOME) 的概念, 因为他想知道所有小分子毒物伤害人体的机制。他利用美国国立健康研究院 (NIH) 提供的 600 万美元, 加上美国环境保护局 (Environmental Protection Agency) 以及美国食品与药品监督管理局 (FDA) 的资助, 在过去的 5 年时间里开展了一项名为 “人类毒物组学 (Human Toxome Project)” 的科研项目。Hartung 表示, 之所以选用组学这个概念是因为与他的研究目标非常贴合, 他就是想掌握细胞内所有与毒性相关的细胞反应活动。据 Hartung 介绍, 他们这个项目与人类基因组项目非常相似, 因为他们也和人类基因组项目一样为大家提供了一个参考的标准。

针对一种化合物, 如果需要进入人体临床试验, 那么首先需要花费数百万美元进行动物毒理测试, 可是即便如此, 我们也不能保证动物测试的结果可以完全反映药物对人体的毒性作用。大约有 1/6 的药物都会因为在人体试验时发现安全问题而被迫终止试验。Hartung 相信毒物组学数据有助于解决这个问题, 因为使用这些数据可以进行正向的细胞学试验, 代替费时、费力的动物实验, 而且还有可能改善动物试验带来的一些问题。知道某种药物能够引发哪种毒性反应有助于科学家们对某种非常有潜力的新药进行改造, 降低它们的毒性, 让它们更好地造福人类。

Hartung 最开始想知道的是细胞在接

触了各种有毒物质之后, 细胞内的代谢组 (metabolomes, 即细胞内所有小分子物质的集合) 和转录组会发生哪些改变。他希望能够将各种细胞内的各种生理反应过程全都整合起来, 看看在毒物的作用下都有哪些激素信号通路被破坏了、肝脏细胞中毒之后有什么变化、正常的心脏节律是否被打破以及是否会危机人体的生命等。Hartung 相信将所有这些信息 (可能包括数百条信息, 但这个数量还在我们能够承受的范围之内) 汇集到一起就可以检测出某种物质的毒性。

目前 Hartung 的工作还处于起步阶段, 他们现在正在各个实验室里进行重复试验, 确保实验结论的正确性和可重复性。最终, 这些生理反应过程和信号通路的相关信息都会用来开发用于检测药物毒性的细胞学检测手段和技术。在 FDA 里专门负责毒性评估工作的 David Jacobson-Kram 评价道: “我们需要知道如果激活了某条信号通路或者生理反应进程, 是否会给人体带来不好的影响, 我们还需要知道最坏的结果会是什么。” 不过 Jacobson-Kram 提醒, 即便在细胞学实验上被证明是无毒的物质, 被应用到人体之后同样有可能会带来危害, 比如肝脏就有可能将无毒的物质转化为有毒的物质。但是无论如何, 这些毒物组学知识都可以给我们节省大量的时间和经费, 同时也可以挽救大量实验动物的生命。“如果你问我对毒物组学研究有什么看法, 我的答案是我对这个研究领域充满了信心。” Jacobson-Kram 在最后这样说道。



组学之组学 (INTEGROME)

Kolker认为，在探索生命的奥秘时，最为关键的是不要一味地追求开创新的组学，要注重对现有这些组学的整合工作。他认为，单靠一个方法是无法解决所有问题的。所以现在又有人提出了组学之组学 (INTEGROME) 的概念，他们希望能够将所有组学的研究成果整合在一起，进行总体分析，高屋建瓴地看待问题、解决问题。Kolker认为这才是一个行得通的办法，而且随着各个组学的不断发展，组学之组学的地位也会变得更加重要。

只要查看谷歌地图，你就会明白组学之组学的重要性。如果只告诉你各个加油站、餐馆和街道的名字，你肯定会一头雾水，可是如果给你一张地图，告诉你某个加油站就在某条街道上的某个餐馆的旁边，相信你肯定很快就会找到那家加油站。目前，大量的组学研究还都停留在告诉我们各个加油站、餐馆和街道的名字的水平，通过这些组学研究我们也只能知道一些基因、蛋白或者RNA转录体的名字而已，它们根本不能构成一个整体，所以我们也无法根据这些信息了解哪些基因其实是在同一条信号通路上的，就好像我们不能根据这些信息了解哪些加油站和餐馆位于同一条街道上。

Ideker已经证明可以对各个组学的研究数据进行自动的分析，他开发了一套软件，可以将四套不同的数据

集整合到一起，然后独立地利用得到的最终结果分析出哪些基因是协同作用的。这些软件除了可以整合现有的基因组数据资源之外（比如可以发现细胞内与细胞处置“废旧”蛋白功能相关的组份），还可以通过寻找基因组组合方式上的异同点来推测未知基因的功能。据Ideker介绍，他们综合了转录组和相互作用组的数据，推测出了细胞里所有组成成分形成的立体结构的整体网络架构模型。经过了这么长时间的研究Ideker一直一无所获，现在终于有了结果，不过他对此并不感到非常满意。而让Ideker更为兴奋的是，他终于掌握了这项信息整合的技术。虽然这套软件并不能取代人工数据收集、整理和注释的工作，但是这套软件却可以被应用于论文分析、发现论文间引用关系的工作当中，发现被人工或者文本发掘软件 (text-mining software) 遗漏的信息。Ideker最后总结道：“细胞并不会说英语，可是它们却可以向我们展示数据和信息。”

美国加州斯坦福大学 (Stanford University in California) 的遗传学家 Michael Snyder 在去年公布了他本人的个体组学集合信息，其中包括他的基因组、转录组、蛋白质组和代谢组学信息，他将其称作“个体组学信息汇总 (integrative personal omics profile)”，不过其他人更愿意称之为

好、坏组学的标准

你提出的组学概念达到了下列哪些标准，是属于“好”的组学还是“坏”的组学呢？

“好”组学的特征

关注一个新的研究领域
(比如相互作用组学: 生物分子间所有相互作用的集合)

是一个完整群体的集合 (所有由DNA转录生成的RNA的集合)

发音容易 (表型组学-Phenome: 某个物种所有生理特征的集合)

容易理解 (脂质组学: 某个物种所有脂质分子的集合)

“坏”组学的特征

只不过是将一个已有的概念改换了一个名字 (营养组学: 对所有营养物质的研究)

涵盖面有限 (博物馆组学: 对馆藏文件上的所有微生物进行DNA测序)

不易发音 (tRNA组学-tRNome: 所有tRNA的集合)

含义模糊不清 (捕食组学: 捕食性变形杆菌吞食其它细菌时活化)

为“水仙组（narcissome）”，详见*Nature* <http://doi.org/hrq>; 2012。根据基因组信息可以发现Snyder属于糖尿病高危人群，他在上学期间也的确被确诊患上了糖尿病，甚至还为此经受了两次致命的病毒感染，这些情况也在转录组数据中得到了反映，有一些与炎症相关的基因当时被激活了。据Snyder介绍，通过他的这些组学信息还发现了几条新的与糖尿病或感染有关的信号通路。Snyder表示，如果你只关注转录组或蛋白质组信息，那么你充其量也就只能看到冰山的一角。

Gerstein也认为组学之组学才是未来的发展方向。他指出，未来一定会将各个分散的组学研究整合到一起，用整体的观念来看待个体基因组。不过他现在还没有完全支持“组学之组学”的提法，对此他解释道：“什么是组学之组学？是所有组学的集合吗？我不这么认

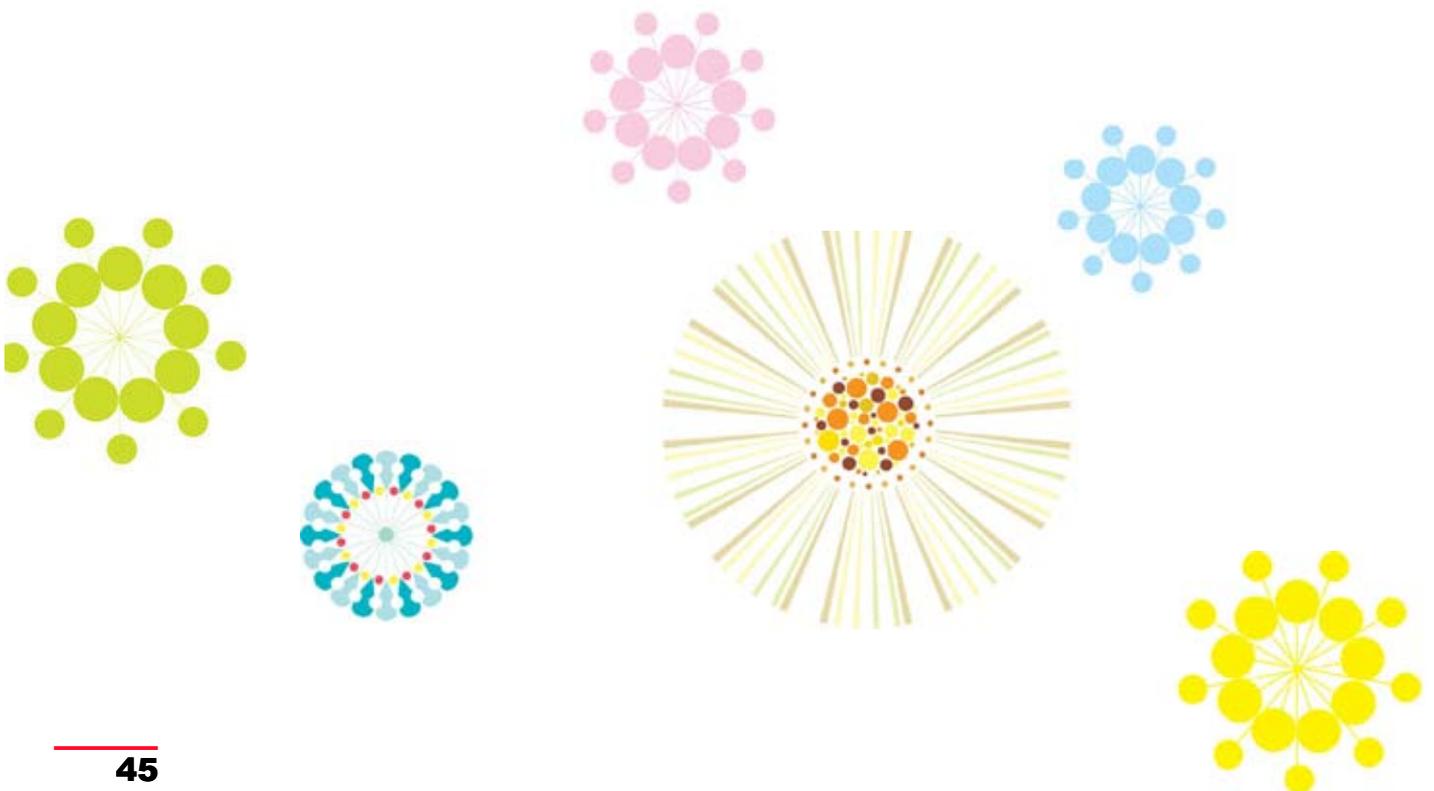
为。组合是一个动词，是一个动作，而将所有的组学集合到一起形成的组学之组学只是一个名词。”

McCray对于什么是“好”的组学（单词）有他自己的一套看法，他认为“好”的组学的名称首先必须有意义、听起来顺耳，并且容易理解，详见“好、坏组学的标准”。但是很多科研人员并没有注意到这些问题。McCray认为，大量出现的各种组学单词只简单地反映了科学领域的进展，但是相比之下在语言上的创新就显得落后多了。不过组学这个后缀只在近十年的时间里就火了起来，这非常不容易。通常来说，这个过程都需要半个世纪左右。不过这也说明大家对组学研究抱有浓厚的兴趣，而且这些个研究领域也的确非常火爆。

参考文献

1. Monya Baker. (2013) THE 'OMES PUZZLE. *Nature*, 494:416-419.

 YORK/编译



miRNA / 基因筛查阵列 及定制服务



帮您找准靶点， 正中红心

阵列采用基于SYBR Green的qPCR检测方法，与杂交探针阵列相比，具有假阳性低、灵敏度高、操作简便等特点。主要应用于基因表达量差异筛查、miRNA筛查及iPS、癌症和信号通路等中的相关生物靶点的筛查和研究。

名称	描述
人源全基因组 miRNA筛查阵列	将已验证的1126条特异引物固定在96孔反应板上制备的特异表达量miRNA筛查阵列
基因筛查阵列	采用qPCR检测方法，避免假阳性 覆盖多种癌症、信号通路等生物功能研究领域
miRNA筛查阵列	采用qPCR检测方法，避免假阳性 覆盖多种癌症、信号通路等生物功能研究领域
iPS筛查阵列	包含有保守区域DLK1-Dio3内65个iPS相关miRNA，可用于检测干细胞的分化程度或诱导性iPS细胞的全能性水平，同时也可筛选特异miRNA用于细胞多能性功能研究。
阵列定制服务	可根据客户需要定制个性化的筛查阵列。

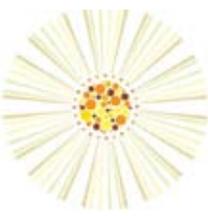


百态

Amazing Lives

生于忧患，死于安乐

——海洋保护区对周边渔场的促进作用



我们知道，大多数生活在海洋保护区里的鱼儿都会比保护区之外的同类长寿、身形硕大且生育力旺盛，但它们在面临危险时，动作也会迟缓些。具有这种潜质的“外流鱼类”若是流入渔场，很可能反过来会给保护区带来支持性的促进作用。这是为什么呢？

我们知道，设置海洋保护区的目的是为了保护其范围内的水生生物。它为鱼儿提供了生长和繁殖的空间，因此也仿佛可能惠及周边渔场的生物。不过，Januchowski-Hartley 等人在《生态学通讯》（*Ecology Letters*）上发表的文章却为这个观点提出了发展性的新看法。他们证实，在保护区内安然度日的鱼类若是游荡到渔场水域，就会比一直生活在捕捞威胁中的鱼儿更容易遭受被捕的厄运。

这就是所谓的“生于忧患，死于安乐”。在保护区里，捕鱼是受到禁止的行为，因此生活在里面的鱼儿顺理成章地会比未受此种保护待遇的同类活得更长，长得更壮，拥有更多的子孙后代。然而，它们总有一些后代会以卵或者幼虫的状态自然地扩散到保护区之外的地方，这是一个被称为“补充性补偿”（*recruitment subsidy*）的过程。而留守的后代则在保护区里繁殖数量更多的鱼儿。这样，就会反过来导

致“鱼类外流”（spillover）——不断进行净流出运动的幼鱼和成鱼个体跨越保护区的界限。这两种方式是有差别的。人们一般认为，补充性补偿产生的影响巨大而深远，原因是大多数鱼类的幼体都生活于海洋中（意思是它们通常生活在水体中而非靠近海底的地方），因而能够轻而易举地扩散开来。与此相反，人们认为鱼类的外流效应只限于接近保护区界限的地方。

但是，这个著名的逻辑理论只是依赖于从未被阐明的假说。若要支持这一理论所描述的模型，那么保护区水域对于减轻了被捕压力的鱼儿而言就必须足够大（或者在里面固定生活下来的时间足够长）——否则，四处游荡的鱼儿在某个保护区内出入时，就没什么受益可言了。同时，保护区必须处于管理良好的状态，这样就能保证其界限范围内的被捕压力确实低于外界。另外，鱼儿所繁殖的后代必须在初生阶段就扩散开来。如果符合以上要求，那么海洋保护区通过补充性补偿和鱼类外流两种方式，应该就会增加渔业产量。但是，这依然只是一种期望而已。可是，这种依托于假说的期望却已经成为了一个常用的论据，试图来解释鱼群放弃自己的部分狩猎地盘，转投海洋保护区麾下的原因。

目前，保护组织对海洋保护区的热忱使得人们大力支持将保护区作为某种渔业管理工具——这种支持产生的成果已然跑在了证据的前面。也就是说，若真的扩大渔业，实际上将会带来什么结果，其实人们并不清楚。不过，尽管这种越界的事情已经被数次提到，但现有的数据仍然显示：某些保护区似乎并未促进渔业增长的事实一直被掩盖了，而某些结果没有经过正面的报道——比如一篇显示世界性海洋保护区域的增加对全球生物多样性缺失并未产生任何影响的报道——却在出版时屡遭碰壁。然而，尽管有诸多的吹捧和渲染混淆我们的视听，但是现在仍然有大量证据表明，对于在各

种环境中固定生活的相当一部分生物种群而言，理论上海洋保护区会拥有数量更丰富、年岁更大的鱼类。同时，目前出现了越来越多有关鱼类外流（特别是从珊瑚礁生态系统中外流）的证据，还有一些证据与补充性补偿有关，特别是最近在澳大利亚大堡礁海洋公园做的一项有关海洋保护区幼鱼向外扩散的研究。这项研究发现，在所有出生在保护区内的相应幼鱼中，55%的胸斑笛鲷（striped snapper, *Lutjanus carponotatus*）和83%的斑腮棘鲷（coral trout, *Plectropomus maculatus*）均以补充性补偿的方式扩散到周边的渔场区域。

而今，Januchowski-Hartley等人对鱼类外流的相关证据取得了更多的进展。据他们报道，在菲律宾的三个研究选定点中，生活在保护区安全庇护下的鱼类警惕性比游离于保护区之外的低，而且在它们穿越了保护区的界限之后，也依然带有警惕性较低的行为。

在这项研究中，研究者观察了来自三种不同家族的珊瑚鱼的行为，它们分别是不属于渔业目标的蝴蝶鱼科（*Chaetodontidae*），以及属于渔业目标的刺尾鱼科（*Acanthuridae*）和鹦嘴鱼科（*Scaridae*）（图1）。这项研究的设计包括测定有喂养或游动行为的个体鱼的定点位置（注意：上述行为均非社会性活动）。接着，戴着水下呼吸管的潜水员（就是Januchowski-Hartley本人）下潜到距一条鱼大约8-10米远的距离，并以恒定的缓慢速度向它游去。当鱼儿出现逃离行为并在珊瑚中寻觅避难处时，这位兼职的潜水员就会抢在鱼儿发生逃避行为之前记录下他和鱼儿之间的直线距离——逃跑起始距离（FID）。同时研究人员也记录下了鱼体的大概总长度，以便精确计算FID的值。就这样，他们从八个50米宽，横跨保护区界限内外200米的水域中选取其一，将其中碰到的每一条鱼进行归类。最后，再在渔区中的控制性区域“界限”周边以及远离海洋保护区的地方分别重复同样的实验步骤。



► 图1 穿越界限. Januchowski-Hartley等人比较了属于渔业目标的鱼类行为, 其中包括刺尾鱼科 (surgeonfish) (如图片所示的高鼻鱼 (*Naso vlamingii*)) 和鹦嘴鱼科 (parrotfish), 以及属于非渔业目标的蝴蝶鱼科 (butterflyfish)。他们证实, 在海洋保护区中, 渔业目标鱼类的逃跑起始距离——在鱼儿逃跑时, 鱼儿与逼近它们的潜水员之间的距离——比渔场中的同类小。而且, 距保护区的界限越远, 这个逃跑起始距离也会随之增加。而非渔业目标鱼类种群的逃跑行为则未观察到明显差异。

研究者得出的主要结果非常明确, 在全部三个保护区选定点中, 经过他们对碰到的从保护区内向外出游的鱼儿的定位测试, 发现两种属于渔业目标的鱼类家族的FID值均有所增加。但是, 在控制性区域界限周边活动的鱼儿却没有这种趋势, 不属于渔业目标的蝴蝶鱼科也同样没有这种趋势。我们知道, 如果鱼类的FID值较短, 那就表示它们比较容易捕获。所以上述结果意味着, 恰好在海洋保护区界限之外出没的鱼类会比离界限较远的鱼类更容易捕获 (至少是更容易在深海捕鱼中被捕获)。

显然, 我们可以这么解释, 鱼儿懂得根据风险的程度调整自己的FID值, 即在保护区范围内时 (那儿风险低), 它们的FID会比较短; 而当它们外流到渔区时, 就需要一定时间来增加其FID值。这些研究发现意味着, 海洋保护区的存在对于渔业的益处比人们之前预期的还要多——不仅确实使鱼儿外流, 而且流出的鱼儿还挺蠢, 更容易被抓到。听到这个结论, 那些鼓吹海洋保护区的人们一定会欣喜不

己的。

既然这样, 那么这些研究结果还是令人意外的吗? 还很重要吗? 是的, 答案仍然都是肯定的。据本文作者推测, 这些结论会叫那些利用捕获数据来取得第一手资料的渔业科学家们惊讶万分, 也会让那些以为鱼儿是徘徊游动等待被捕获的傻瓜的人们大跌眼镜, 尽管他们对生物学家在鱼儿被捕之前观察一下它们见怪不怪。其实, 鱼类是行为性生物, 它们对特定的环境具有高度的自我行为调节能力。以鱼苗为例, 它们的行为为其扩散提供了神奇的控制性作用; 而对于幼鱼和成鱼来说, 它们的行为既增加了鱼类社会结构建立的复杂度, 也带来了某些渔业管理工作的各种挑战性。简而言之, 它对渔业的影响是机遇与挑战并存的。此外, 我们可以肯定的是, Januchowski-Hartley等人的研究结论直接证实了鱼类的适应性行为, 这个结果出乎了人们的意料, 也必将与所有探求海洋保护区对渔场产生的量化性影响的人们息息相关。

参考文献

1. Peter F. Sale. (2013). Older but less wise. *Nature*, 493, 167-168.

文佳/编译

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 people standing on their shoulders, and one person standing on the shoulders of the two people in the middle. The text is overlaid on the image in a bold, red font with a white outline.

合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广

请致电 (020) 32051255