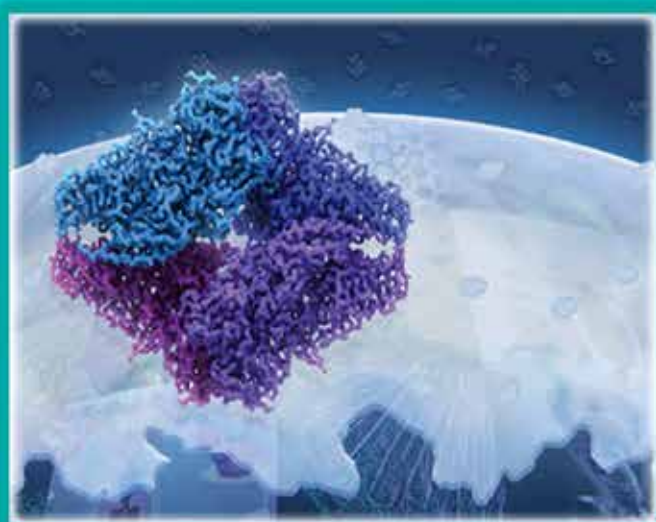


生命奥秘 LifeOmics

2016年 4月刊 总第84期



单颗粒冷冻电镜技术

- 漫漫投稿路
- 倒挂行走的狐猴重心前移



无奇不有
生命世界

解读生命
走进科学



目录 CONTENTS

专题

单颗粒冷冻电镜技术

前言	01
一、单颗粒cryo-EM	02
1. 单颗粒cryo-EM实验流程简介	02
2. 单颗粒cryo-EM的发展历程	04
3. 单颗粒cryo-EM成为主流结构生物学技术的标志性事件回顾	14
4. 论单颗粒cryo-EM发展的无限可能性	18
二、2016年值得关注的重要技术与方法学领域的发展	25
1. 细胞内蛋白标记 (Protein labeling in cells)	25
2. 解析细胞核结构 (Unraveling nuclear architecture)	25
3. 蛋白结构动态变化 (Protein structure through time)	25
4. 精准光遗传学 (Precision optogenetics)	25
5. 高度多重成像 (Highly multiplexed imaging)	25
6. 深度学习 (Deep learning)	25
7. 亚细胞图谱 (Subcellular maps)	26
8. 综合单细胞图谱 (Integrated single-cell profiles)	26

下一期 (2016年5月刊) 预告: 单克隆抗体癌症免疫疗法汇总

过去20年里, 单克隆抗体 (单抗, mAb) 已成为癌症治疗的主要手段之一。但科学家们不满足于此, 仍不断探索改进, 以求发展更好的基于单抗的癌症疗法。下一期《生命奥秘》将会介绍各种基于单抗的癌症疗法的特点、使用策略以及现有案例。

热点

漫漫投稿路	29
-------------	----

百态

倒挂行走的狐猴重心前移	36
厌食肽Nesfatin-1能增加金鱼的心脏每搏输出量	38

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

单颗粒冷冻电镜技术

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。2015年，单颗粒冷冻电镜技术（Single-particle cryo-electron microscopy, Single-particle cryo-EM）荣膺《自然-方法》年度生命科学技术。这一期专题将会详细介绍单颗粒冷冻电镜技术最近的技术进展（特别是相关的直接检测摄像头的发展情况）；这些技术进步使结构生物学技术在成像分辨率上取得了令人印象深刻的飞跃性突破，帮助人们进一步了解了蛋白功能。

一、单颗粒cryo-EM

1. 单颗粒cryo-EM实验流程简介

本文简要概述如何利用单颗粒cryo-EM解析大分子结构。



完整的单颗粒cryo-EM工作流，其中包括从蛋白样品到3D模型的所有步骤。

几十年来，X-射线晶体衍射技术（X-ray crystallography）一直都是获取高分辨率的大分子结构信息的首选技术。与X-射线晶体衍射技术相比，单颗粒cryo-EM的优势就是无需结晶便可观察大蛋白复合体的形态，但是它的分辨率不如前者。虽然这些年来，单颗粒cryo-EM总体上没有什么改进，但最近它在样品制备、算法，特别是仪器设备方面的技术进步使研究人员得以以近原子分辨率确定大分子结构。

第一步：样品制备

在cryo-EM实验过程中，研究人员将一份纯化的蛋白样品倒在一个特制的载网上。这个载网由一张布满小孔的非晶碳薄膜以及支撑这张薄膜的金属框架组成。理想情况下，这些蛋白颗粒能够均匀分布在各个不同取向的载网小孔上。随后，研究人员在这份载网上注入冷冻剂，例如液态乙烷中，使其急速冷冻，从而将这些蛋白颗粒冻结在一块很薄的玻璃化冰膜上。冻结的作用除了捕获蛋白颗粒外，还能在一定程度上保护样品免受辐射损伤，以及防止缓冲液在透射型电子显微镜的高真空环境下蒸发。

研究人员为了提高样品制备技术尝试了各种不同的方法，包括优化脆性蛋白复合物的纯化技术、实现采样载网自动化制备，以及改进了载网。这些改进不断积累，对cryo-EM实验的成功起到了极大的促进作用。

从2D图像到3D模型

之所以名为“单颗粒”cryo-EM，是因为该技术对采样载网中的每一个蛋白颗粒都会进行2D电子显微拍摄，故得此名。考虑到可能会对非常敏感的样品造成辐射损伤，所以单颗粒cryo-EM只能采用非常低的电子量，而这种2D投影会产生非常大的背景噪声，导致研究人员无法在原子水平上确定分子结构。幸运的是，我们可以通过对大量单个蛋白颗粒取平均

值的方法来改进这些干扰信号。

通常采样载网上被冻结的蛋白颗粒都是随机分布的，因此平均化并不是一个直截了当的解决方法。然而随机有随机的好处，蛋白的多个不同的2D视图是构成3D结构的基础。随后，我们需要采用精妙的图像处理方法来比对图像，同时将数据集中起来。接下来，一个最初步的3D图像就诞生了。不过往下的步骤还包括反复修正这个图像，并采用专门的软件工具验证它。最终，将3D图像与蛋白序列匹配起来，便可构建出蛋白3D模型。

以往，想要解析一个高分辨率结构，就必须配备数以百万计的单颗粒图像。现在，有了高灵敏度、可直接检测的摄像头的帮助，仅需较少的颗粒图像便可解析分子结构，这不仅节省了时间和珍贵的样品，还能提高分辨率。

直接探测器的曙光

早期的cryo-EM技术用照相感光胶片记录2D颗粒图像。虽然胶片有助于获得高分辨率图像，但是操作起来非常繁琐。相关领域的多位研究人员为了简化数字读取工作，开始应用电荷耦合器件（charge-coupled device, CCD）摄像机来工作，但是这种摄像机获得的图像的分辨率非常低。

最近直接检测摄像机的发展及其商品化令cryo-EM取得了重大进展。CCD摄像机通过将电子转换成光子来记录图像，而直接检测器则正如它的名字一样，可以直接检测电子。相比CCD摄像机，直接检测摄像机能以更高的灵敏度获取颗粒图像。

此外，直接检测器速度非常快，它简直是以“电影”模式来收录颗粒图像。为了更好地利用直接检测摄像机的这一优势，研究人员制定了一系列方法来修正成像过程中样品的微小电子束诱导的运动导致的图像模糊。这种新型的数据收集模式对于获取近原子分辨率信息非常关键。

异质性：祝福和诅咒并存

结晶通常就是将蛋白锁定在一个更为稳定的取向，而cryo-EM样品中的蛋白可以自由移动，直到它们被急速冻结起来。鉴于cryo-EM是一款单颗粒技术，所以我们可以捕获并研究这种构象的转变过程，从而最终更深入地了解

蛋白的功能和机制。

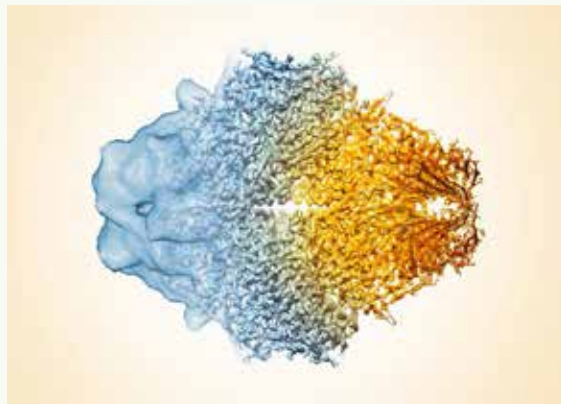
然而，这种构象异质性的存在，让高分辨率3D重建成为了一个非常大的挑战。尽管经过长时间的努力，现有的算法已经能够将异质性数据集划分为结构上更均匀的子集，但还有明显的不足和劣势，需要不断地改进。

2. 单颗粒cryo-EM的发展历程

最近cryo-EM的进展让研究人员能够在近原子分辨率上确定蛋白结构，从而极大地扩展了这种技术的生物学适应性。

β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 真算不上是一个迷人的蛋白，早在几十年前，它的结构便已被X-射线晶体衍射技术 (X-ray crystallography) 确定了。 β -半乳糖苷酶被人熟知的生物化学特性让它成为被人们广泛使用的基因表达实验监测因子。然而谁都没想到，2015年6月，这个“踏实干活”的酶却成为了结构生物学领域的超级明星。通过精心优化他们的单颗粒cryo-EM技术，美国国立癌症研究所 (US National Cancer Institute) 的Sriram Subramaniam等人以平均2.2 Å的空间分辨率解析了 β 半乳糖苷酶。这个分辨率属于近原子水平，并且曾一度被看做X-射线晶体衍射技术的专属分辨率。Subramaniam等人的成果使研究人员得以放大 α -螺旋和氨基酸侧链，从而仔细观察水分子，甚至单个的离子。

据Subramaniam回忆，在这项研究前的几个月，他的一位同事在与他书信往来时直截了当地告诉Subramaniam，要达到这种分辨率是不可能的。这位同事很早就认定，单颗粒cryo-EM技术的分辨率只能达到3 Å，不可能再提高了。现在Cryo-EM的先驱者已经成功地往前迈进了一大步，可以研究更细小、更活跃的蛋白，这只是过去几年里，证明那些反对声音是错误的新技术取得的一系列胜利中的一个。虽然目前X-射线晶体衍射技术仍然是结构生物学领域不可动摇的首选技术，但是越来越多的研究人员已经被采用cryo-EM能在原子或近原子分辨率水平解析单个蛋白分子结构的应用前景所吸引，因为这种技术无需像晶体衍射技术那样，需要改进或掌握非常繁琐的操作以探索蛋白复杂的机制。



Cryo-EM已能获取高分辨率的图像了：上图是 β -半乳糖苷酶的结构。

打破僵局

Dorothy Hodgkin因开发了蛋白晶体衍射技术而获得了1964年的诺贝尔化学奖。到了20世纪60年代末，该技术渐趋完善，这让某些年轻的结构生物学家渴望新技术的出现。哥伦比亚大学（Columbia University）的研究员Joachim Frank表示，这项技术已没有任何挑战可言，他可不想继续钻研了。

EM的分辨率达到原子级别，可用于解析3D结构，它是晶体衍射技术的一种前景光明、但是未经验证的替代方法。英国剑桥医学研究委员会分子生物学实验室（Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, MRC LMB）的David De Rosier和Aaron Klug于1968年用一张噬菌体尾部EM照片首次对EM进行了验证。然而，用于获取生物样品高信噪比图像的样品制备技术（脱水和使用重金属进行染色处理）却导致图像失真，模糊了图像中分子的细节。

欧洲分子生物学实验室（European Molecular Biology Laboratory, EMBL）的Jacques Dubochet根据劳伦斯—伯克利实验室（Lawrence Berkeley Laboratory）的Kenneth Taylor 和Robert Glaeser设计的方

法，开发出一款新技术。该技术在一片很薄的玻璃化冰膜上冻结仍处于天然、水合状态的样品。这种比冰晶还要透明的玻璃化冰膜可以减少图像伪影。自此，cryo-EM领域诞生了。据该领域另一位先驱，来自MRC LMB的Richard Henderson回忆，1984年时他安排了一位学生去听Dubochet的课。这名学生学成归来时告诉Henderson，cryo-EM技术才是未来所在。

最早期的3D结构是由多个对称或高度有序结构，例如病毒粒子的2D图像组装而成的。如果想要获取不对称的结构图像，就需要重新借助晶体衍射技术了。在晶体衍射技术中，高度有序的2D晶体可以将目标蛋白锁定在特定的取向，这样便可拍摄出目标蛋白不同角度的图像。1990年，在电子晶体衍射技术的帮助下，Henderson等人采用EM首次以原子分辨率解析了蛋白结构，这个蛋白就是光响应蛋白细菌视紫红质（bacteriorhodopsin）。然而，相较于X-射线晶体衍射技术，电子晶体衍射技术的优势并不十分明显。马克斯普朗克生物物理研究所（Max Planck Institute of Biophysics）的Werner Kühlbrandt指出，对电子晶体衍射

技术来说，比起获取高质量的膜蛋白的3D晶体，要获取高质量的该蛋白的2D晶体并不是一件容易的事，甚至还有一定难度。

20世纪70年代中期，在剑桥大学（University of Cambridge）任职博士后研究员的Frank试图越过晶体，仅仅依靠由大量单个分子组成的分子群来获取高分辨率的蛋白结构。Frank承认自己的想法有点疯狂，因为当时的行业共识就是你必须要保留有序晶体这一步。Frank的做法是不直接解决无序单颗粒的异质性问题，转而通过捕获大量随机分布的颗粒的2D投影来解决这个问题，随后采用算法来对这些投影进行分类，最后将它们组装成3D图像。Frank等人于1991年发表了他们首

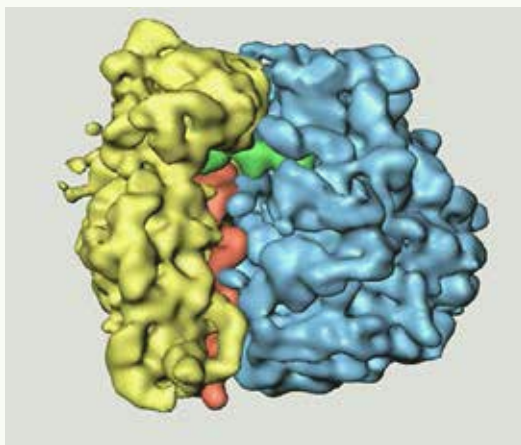
个核糖体单颗粒cryo-EM结构；不到10年，他们又取得了新进展，以接近10 Å的分辨率解析了该蛋白结构。

尽管如此，在接下来的20多年里，该领域仍然笼罩在晶体衍射技术的阴影下，因为这段时间内，晶体衍射技术一直在解析膜蛋白结构方面不懈努力，最终让人们得以仔细观察蛋白细节，而单颗粒cryo-EM的研究人员则仍在费劲地解析相对较大的蛋白结构域。珍利亚研究园区（Janelia Research Campus）Nikolaus Grigorieff表示，许多人都质疑cryo-EM的合理性，同时调侃这种技术为“一团浆糊学（blob-ology）”。



资讯 · 频道

www.LifeOmic.com



借助2000 technology获取的大肠杆菌70S核糖体的11.5 Å cryo-EM结构。

超越“浆糊学”

既要获取结构细节，又不想破坏脆弱的样品，这真是一个两难的抉择。低电子量不会破坏蛋白样品，但这样只能获得低信噪比的噪声图像。直到几年前，cryo-EM的研究人员仍然只能费力地使用照相感光胶片获取这些图像，或牺牲灵敏度，借助电荷耦合器件（charge-coupled device, CCD）摄像机实现自动检测功能。

直到可以直接响应单个电子的、灵敏度非常高的检测器出现，cryo-EM研究领域才发生了翻天覆地的变化。其中一种由一个欧洲协会和Henderson联合开发的“直接电子探测器”的研究基础就是一款粒子物理学原型。据Henderson回忆，只要将这个探测器放进他们的显微镜里，就立即可以看到单个电子，并且能判断这个电子是否运作良好。随后，这款探测器被FEI商品化，同时，Direct Electron公司和加州大学圣地亚哥分校（University of California at San Diego）的研究人员Mark Ellisman和Nguyen Huu Xuong共同开发了一款相似的探测器。灵敏度的提高表明了该技术发生了重大飞跃。MRC LMB的研究人员Sjors Scheres表示，将这款检测器与CCD结合起

来，他们就可以抛弃90%的电子了，现在每两个电子就有1个能被他们检测到。在某些情况下，检测效率甚至可以达到80%。

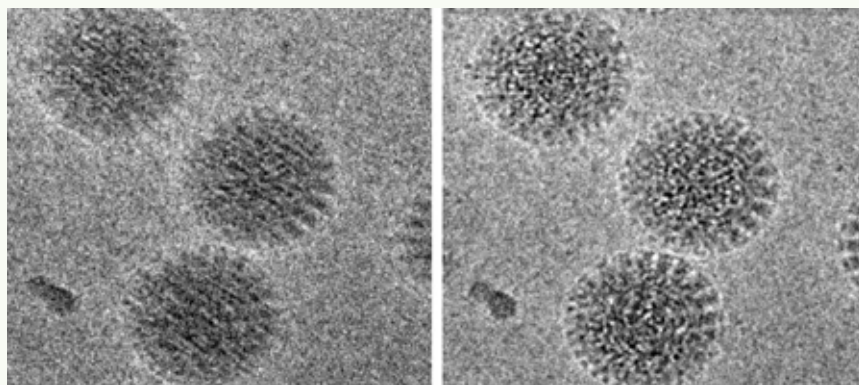
第三款检测器由Gatan公司、劳伦斯—伯克利实验室（Lawrence Berkeley Laboratory）的Peter Dennis以及加利福尼亚大学三藩分校（University of California at San Francisco, UCSF）的David Agard联合开发。这款检测器具有另一种优势。虽然所有的直接探测器都可以在测量周期内捕获追踪电子信号的多帧电影图片，但是Gatan公司的K2还能计算电子的数目，而不是仅仅记录它们。这个特点对捕获细小蛋白的低分辨率结构信息非常有帮助，因为这些信息很容易融入背景而消失不见。位于纽约结构生物学中心的美国国家自动分子显微技术资源网（US National Resource for Automated Molecular Microscopy, NRAMM）的Bridget Carragher指出，如果在那些频率上没有良好的信号，那么你就有可能看不到那个颗粒、无法将它从旁边的颗粒中区分出来，或无法确定它的取向。

这些检测器对cryo-EM研究领域的直接影响离不开经过长期演变、与它并行发展起

来的算法。**Carragher**指出，如果你很努力地利用软件开展研究工作，但是硬件又跟不上，那就是徒劳。但是，如果硬件技术取得突破进展，那么软件的作用就可以超常发挥。1998年，耶鲁大学（**Yale University**）的研究人员**Fred Sigworth**提出了一个基于最大似然法（**Maximum likelihood**）的EM数据解析策略，即采用与“母结构（**parent structure**）”相关的取向概率来对每张2D EM图像进行分类。作为马德里国家生物技术中心（**Centro Nacional de Biotecnología in Madrid**）**Jose-Maria Carazo**’s小组里的一名博士后，**Scheres**一直致力于扩展这种方法，以重建3D蛋白结构，通过这种研究策略，他们可以开展所谓的无监督分类法（**unsupervised classification**）。**Scheres**指出，他们的实验还表明，无需提前了解结构间的实际差异，便可将所有数据划分为不同的结构状态。现在，**Scheres**的这种方法已然成为

被人们广泛使用的图像分类算法的基础。

不得不提的是智能软件，因为它帮助我们解决了另一个cryo-EM问题：电子束释放的能量导致的蛋白运动，这种运动会降低图像的分辨率。在采用直接电子检测器原型开展研究工作后，**Grigorieff**提出了一个新算法，也即利用视频数据格式来解析颗粒的运动情况。现在这种方法已经成为了单颗粒cryo-EM技术的常规方法。**Grigorieff**表示，这种策略不但有助于我们比对多帧电影图片，还能消除可能会发生的图像模糊现象。他还引用另一位实现这些分析技术飞跃发展的无名英雄的话：获取低成本，但强大的处理能力。你可能不相信，但是促进这种飞跃的原因竟是游戏产业，因为这个产业使消费级别的电脑可以处理越来越大的数据集。1997年时只有最大的数据中心才能进行的数据处理工作，到2008年人们在家里的个人电脑上便可实现。



通过减少颗粒图像的模糊程度，可以提高由电子束诱导的样品运动图像的分辨率。

运动的蛋白颗粒

Cryo-EM技术取得的进展极大地鼓舞了该领域的研究人员。随着直接电子检测器在2012年投放市场，cryo-EM技术便开始以惊人的速度取得一次又一次的成功。核糖体是一个大型而又为人熟知的结构，同时它也是cryo-EM领域的重要的基础研究项目。

早期对核糖体的研究已经显示出cryo-EM技术的强大威力。研究人员并非简单地将数以百万计的颗粒拼凑成10 Å的结构，而是通过研究不到50000个颗粒，直接以近原子分辨率解析蛋白。**MRC LMB**的**Scheres**和**Venki Ramakrishnan**共同工作，最终解析了分辨率为3.2 Å的酵母线粒体核糖体（**yeast**

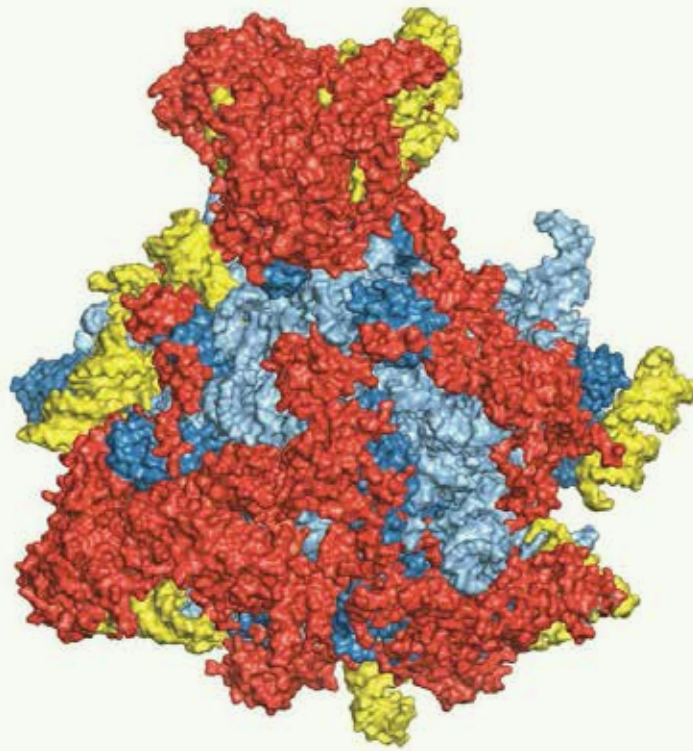
mitochondrial ribosome) 大亚基结构；不到一年，Scheres又在人类整个线粒体核糖体上做出了类似的壮举。

研究人员发现高分辨率的cryo-EM最适合用于研究大型的蛋白质，但是小型蛋白呢？有人质疑信噪比的降低和更频繁的蛋白运动造成的伪影是否会导致cryo-EM无法研究小型蛋白。UCSF的程亦凡是首位利用cryo-EM研究500kDa以下蛋白的研究人员。他以原子分辨率解析了哺乳动物离子通道TRPV1的结构。随后，Scheres学会了辨别由电子束导致的看似不稳定的分子运动的不同模式。他表示，冰里的蛋白颗粒往往与它们旁边的颗粒有着同样的运动趋势，我们可以通过这些信息更好地预判它们的运动情况。这个发现让Scheres和清华大学的研究人员施一公一起得到了分辨率为3.4 Å的γ分泌酶复合物(γ-Secretase)的电镜结构。γ分泌酶复合物是一种阿尔茨海默病(Alzheimer)相关酶，它的蛋白量仅为170kDa。对此，Kühlbrandt表示，这个成果真是让人难以置信。一年半前，Kühlbrandt从未想到居然能取得这种分子量大小的、蛋白分辨率如此高的电镜结构。

接下来，就是要解决分辨率限制的问题了。尽管大量的研究已证实cryo-EM的分辨率能够达到原子级别，但自从达到3 Å分辨率后，基本上就没有多少进一步的研究成果了。

Subramaniam指出，直到去年12月，几乎每个人都认为cryo-EM有着不可逾越的限制。对此，他和他的研究人员并没有积极寻找新的解决方法，而是回顾他们以前对β-半乳糖苷(β-galactosidase)开展的研究，试图优化该技术。最终，他们的努力得到了回报，获得了前所未有的平均分辨率为2.2 Å的蛋白电镜结构。Subramaniam表示，他们系统地整理每一个步骤。Subramaniam还指出，之所以能取得这个成果，只不过是因为他们不去理会这种方法的限制，并且不断摸索条件。

由于cryo-EM能够统计大量的蛋白颗粒和捕获大群构象不同的蛋白颗粒，因此它在研究蛋白动力学方面有着独特的价值和意义。Frank的研究小组最近在原子水平上解析了延伸因子EF-G催化核糖体异位的机制。Frank指出，他们可以在样品中看到两个不同的结合位点。他认为他们现在可以试图解决过去想都不敢想的问题了。多伦多病童医院(Hospital for Sick Children)的John Rubinstein小组同样使用cryo-EM来捕获7个不同构象的牛ATP酶。尽管分辨率没有达到原子级别，但是取得的电镜结构已经为重构这些酶的旋转机制提供了足够多的细节了。Rubinstein表示，他们试图观察这些分子的运动轨迹，然后打算以高分辨率解析它们的结构，从而探明这些分子是如何形成更加动态的结构。



通过2014 technology获取了3.2 Å的酵母线粒体核糖体大亚基cryo-EM结构。

“成长的烦恼”

兴奋是具有传染性的，尤其是对沮丧的结构生物学家而言。**Carazo**指出，现在想投身于EM领域的研究人员简直呈爆炸式增长。这些研究人员手头上都有想要使其结晶的样品，或者曾经将样品交给晶体学家，但却没能从中获取有用的信息。

虽然这个领域慢慢火起来了，但质量控制问题却不得不重视。由于没有非常精准的验证方法，所以围绕数据解析有很多争议。其中一个最突出的例子就是1,4,5-三磷酸肌醇受体1（inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1, IP₃R1）。据Henderson回忆，2002年-2006年间共发表了三篇关于该受体的cryo-EM结构的文章。而且这些结构都是各不相同的！不过这些研究都是在直接电子检测器问世之前开展的，当时的技术分辨率很低，并且背景噪声很严重。一旦图像处理软件将噪声当做信号，那

么后续任何更进一步的数据解析工作都会出现错误。**Henderson**和他在MRC的同事**Peter Rosenthal**针对这个问题提出了解决方法——“tilt-pair验证（tilt-pair validation）”：收集同一个待检样品的两个不同取向的图像，随后分别处理不同取向的图像数据集，并对比两组数据，查看得出的比对结果能否反映已知的取向差异。**Rubinstein**指出，如果捕获的图像无法重现样品相对旋转关系，那么你的图像可能就是错的。现在，这个问题已经没那么严重了，因为我们可以现代仪器中揭示精心准备的样品的清晰的二级结构了（即便不是氨基酸侧链），那么这将会大大简化数据解析工作。不过，值得注意的是，这个过程还不能完全自动化。**Grigorieff**指出，要是出了什么错误，软件可不会通知你。如果你只是使用软件工具而不考虑结果是否正确，你就有可能犯大错。

数据共享将会是防止和纠正错误的另

一种方法。2002年，欧洲生物信息研究所（European Bioinformatics Institute, EBI）构建了电子显微技术数据银行（Electron Microscopy Data Bank, EMDB），研究人员可以往里面存放他们的3D图像数据，并且许多研究论文如果想要获得发表，就必须要有存放在EMDB的相关数据。生物物理学会（Biophysical Society）会长兼美国弗吉尼亚大学（University of Virginia）研究人员的Edward Egelman进一步号召研究人员在提交图像数据时，一并提交经过审稿人审阅的论文手稿，因为如果仅仅提供蛋白结构的图像是无法对其进行独立验证的。Rubinstein赞同Egelman的做法，还表示，但很多人担心这样会在论文发表前就泄露研究成果。另一边厢，EBI也构建了电子显微技术试验性图像档案库（Electron Microscopy Pilot Image Archive, EMPIAR），研究人员可以以自愿为原则，存放原始数据——可用于验证新型分析算法的有价值的资源。

面对cryo-EM取得的成就，即便是经验丰富的研究人员，也会受其鼓舞，不畏艰难困阻地想要采用最前沿的电子显微镜。目前该领域的领军者是FEI的Titan Krios，这台显微镜身

价不菲，竟达500万美元，这可是许多研究机构都无法承受的价格，而且这个价格还没有算上维护和操作的费用呢。Grigorieff感慨到，什么研究都没做，你每年就要花费接近50万美元了（指使用这台显微镜）。集中型设施也许是一个解决方法。在美国，一些机构，例如珍利亚研究园区和美国国家自动分子显微技术资源网就允许研究人员预约使用高端的仪器；而在欧洲，几个国家已经构建起国家级机构，例如英国的电子生物成像中心（electron Bio-Imaging Centre, eBIC）和荷兰的纳米显微技术中心（Centre for Electron Nanoscopy, NeCEN）。Krios显微镜的精密技术使它可以极大地提高数据采集速度，并可以预防出错，然而Carragher却不认为每个研究机构都必须配备Krios显微镜。她指出，只要大多数机构配有性能良好的中档设备，少数几个中心配置高端的仪器就是一个很好的解决方法。成本更低的仪器可以让我们初步了解蛋白结构，然后判断是否需要使用Krios获得进一步的信息，这样性价比更高，Carragher等人已经证明，通过巧妙地使用中档显微镜，就可以获得分辨率低至3.7 Å的电镜结构。



高端电子显微镜——Tian Krios。

消除障碍

精简成像过程是当务之急，目前NRAMM正积极开发cryo-EM的自动化工具。Carragher指出，他们现在已落后于晶体学家，晶体学家可以将样品邮寄给光束线站，然后由机器人自动完成相关工作。Carragher还表示，现在落后没问题，但他无法想像到了某个时期他们还无法实现技术的完全自动化。目前NRAMM的研究人员已经开发出两款软件，即Leginon和Appion，它们可以部分实现图像收集和处理的自动化。然而，Cryo-EM领域内某些经验丰富的研究人员仍然不愿意太过依赖自动化。Rubinstein表示，目前完全自动化技术产生的数据非常多，但其中高质量的数据却不够多。

事实上，我们很容易就能获得大规模的数

据量，因为使用者每天都能生产出百万兆字节的cryo-EM录像。鉴于目前硬盘的容量已经越来越大，数据储存倒不是问题，而数据处理才是问题所在，因为它有瓶颈期。Frank指出，即便现在我们已有功能强大的计算机集群系统，但是要处理大规模的数据，还是需要非常多的计算时间。此时，游戏产业也许能再次拔刀相助，因为该产业内的科研人员已经学会有效利用高端图像处理单元的强大功能了。

“云技术”也可能是另一个选择。哈佛大学（Harvard University）的Michael Cianfrocco和Andres Leschziner已通过采用Amazon的EC2商业基础设施成功将分析费用降低到1500美元/蛋白。

CRISPER技术和高质量图像将有助于进一步减少构成最终结构图像的蛋白颗粒的数

量。1995年，Henderson通过计算得知，理论上每个人可以通过10000-12000个颗粒，而不是数百万个颗粒来解析原子分辨率结构，而这些年来技术进步更加坚定了他的信心。

Henderson认为，总有一天，我们将能通过500-600个颗粒来解析完整的结构。配备更加灵敏、无噪声的电子检测器是进行相关研究的必要条件。Scheres强调，要想打造几近完美的检测器就放手去做，其应该没有物理极限。Henderson等人目前正朝这个方向努力，同时他估计下一代检测器将会在未来几年内面世。改进样品制备技术也会有助于cryo-EM研究。自Dubochet开拓性地改进了样品制备技术以来，该技术就停滞不前了。当时Dubochet将蛋白样品放在一个取样载网上，然后用滤纸吸干多余的液体，随后他们将载网和样品一起冻结，以开展后续研究。某些研究小组一直致力于通过调整取样载网的材料，以进一步提高样品的稳定性，或者试图通过数量较少的蛋白来制备实验样品。而其他小组则开发出一款新型

“相位板（phase plate）”。这块板可以提高图像之间的信噪比。Carazo指出，对于较小的样品来说，这样可以使比对工作更方便易行。

如果能通过数目较小的颗粒取得质量较高的数据，那么将能极大拓宽cryo-EM的作用，这样，研究人员不仅能成像较小蛋白结构的更多细节，还能更有效地分析蛋白结构与功能之间的关系。Frank已经在往这个方向努力了，他目前正在采用时间分辨cryo-EM技术来捕获核糖体翻译过程中的稀少中间产物。Frank表示，他们确实已经发现了以前从来没有被观察到的转瞬即逝的状态。Grigorieff推测研究人员将很快就能完成对细胞蛋白质组的广泛的结构筛查工作。Grigorieff表示，过去，裂解细胞并对其成像，然后用软件技术在不同状态下重构不同的分子就是一个梦想而已，虽然现在还没能实现这个梦想，但也许这只是个技术问题，如果真的是技术问题，那么总有一天能实现。

3. 单颗粒cryo-EM成为主流结构生物学技术的标志性事件回顾

单颗粒cryo-EM问世至今已有20多年。人们通常用它解析生物分子结构和复杂系统。本文回顾了单颗粒cryo-EM成为主流结构生物学技术的标志性事件。

独一无二的结构生物学工具

结构生物学是以生物大分子三级结构的确定作为手段，研究生物大分子的结构功能关系，以探讨生物大分子的作用机制和原理的科学。迄今为止，最广泛使用的、能达到原子分辨率的结构解析方法是X-射线晶体衍射法。然而，这种方法有很大的局限性：需要大量的样品，且蛋白质结晶过程复杂。虽然核磁共振不需要结晶，但也需要大样本，还需要富集同位素，而且只能解析较小的分子，一般限制在很小的蛋白质、小分子RNA或蛋白的单个

域。这些“经典”的结构技术的应用非常有限，不能解析多种构象或组装状态的大型复合物、完整的膜蛋白、聚合物和大分子复合体。

Cryo-EM已经问世二十多年。由于它需要的样本量小，而且不需要结晶，所以常用于研究复杂系统。最近，仪器和软件的进步大大提高了cryo-EM的分辨率，使其能获得包含多种构象和组装状态的混合物的原子密度图。此外，由于数据采集和处理自动化，且所需采集的颗粒图像数目减少（由于新的探测器技术，见背景知识框1），所以生物大分子结构

解析需要的时间大大减少。**cryo-EM**得到的分子结构数据以前所未有的速度涌入数据库（图1），这些数据包括那些重要的、一直被认为是“遥不可及的解析目标”的大分子生物组件。因此，**cryo-EM**在实用性、数据吞吐量和

分辨率上都取得了巨大的飞越，成为了结构生物学的主流技术。

本文将重点展示**3D重建电子显微镜**领域的重大发展（图2）。然而，这篇简评并不打算综合性地介绍各个实验室的贡献。

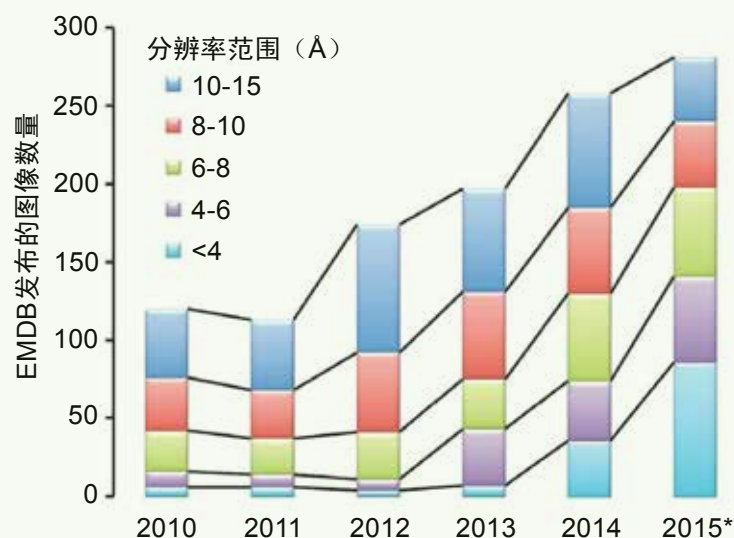


图1 2010-2015年cryo-EM数据银行中cryo-EM图片的增加曲线图。

*2015年数据不完整，数据截止到10月14日。过去两年里，分辨率为4 Å的结构图像数量增长最明显。

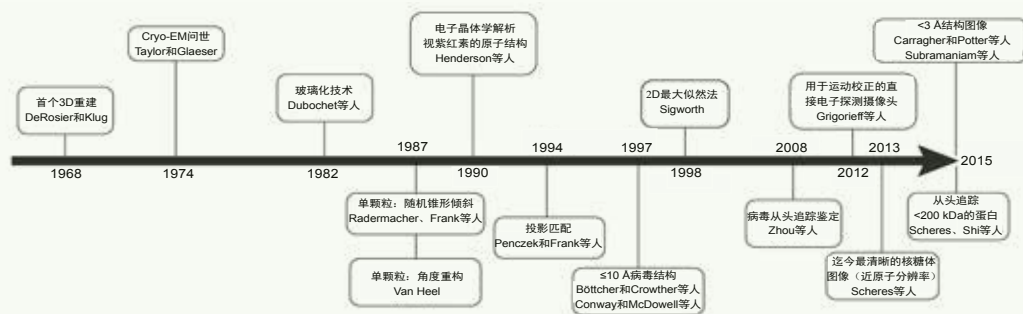


图2 本文展示的3D电子显微镜领域重大突破时间轴。

3D cryo-EM的发展历程

使用透射电子显微镜（**transmission electron microscopy, TEM**）可以直接在分子水平上实现可视化生物样本。**TEM**从不同的方向（视图）产生对象的**2D**投影，叠加处理产生**3D**重建。在20世纪60年代末，**David DeRosier**和**Aaron Klug**用傅里叶德罗斯特贝塞尔原理（**Fourier- Bessel principles**）把**T4**噬菌体尾部的多个视图叠加，**3D**电镜重建因此诞生。

然而，把**3D**重建作为通用方法需要克服三个主要的方法瓶颈。首先，样品需要保存在**TEM**的超高真空条件下。其次，需要克服高能电子轰击对样本造成的辐射损伤。最后，生物样本对电子的散射和水类似，因此信号对比度非常低。

DeRosier和**Klug**提出了第一个实用的解决方案——重原子盐，如醋酸双氧铀染色试剂的使用。在成像前，用重金属盐对样本进行染色，给分子留下干燥的“铸模”。这个方法目前仍然适用于某些样本。重金属染色能降低辐射损伤，因为此时成像的对象是重金属的“铸模”，而非蛋白本身。由于铀的高原子数，这种方法的对比度很高（因为蛋白对电子的散射比染料要少，因此背景和信号反过来，这种方法也叫负染法）。然而，染色和干燥样品也有代价，因为染色可能不均匀或存在小气泡，而干燥则可能会破坏结构。最重要的是，重原子盐的粒度限制了负染法的分辨率（最理想的分辨率为**15 Å**）。

1974年，**Ken Taylor** 和**Robert Glaeser**使用冻干样本来成像，开辟了高分辨率结构解析领域的一个新的分支。冻干样本能保留蛋白的高分辨率细节，非常适用于解析蛋白结构。这也是**cryo-EM**的起源。随后，**Dubochet**等人改良了冻干方法，提出了成熟的玻璃化样本制备方法（把薄薄的液膜放进液态乙烷或液体丙烷等强效制冷剂中冻干）。此外，公司研发出稳定的电子显微镜平台。这些技术进步为

cryo-EM的广泛使用打下了基础。

3D重建技术提出后，螺旋样样本、病毒样本和**2D**晶体样本是几种最常用的样本。不得不提的是，**Henderson**等人在**2D**电子晶体学方面的工作，他们成功解析了视紫红质的原子结构。**Henderson**等人把**2D**晶体的图像和电子衍射图案结合起来。这种方法需要倾斜样本，以获得分子的不同视图，同时还要求产生完美的平面**2D**晶体图（这非常难，因为晶体的厚度可能仅有一个蛋白分子）。因此，极少数分子的结构是通过电子晶体学解析的，而且仅有几个达到了原子分辨率。但电子晶体学得到了一些具有重要生理功能的蛋白的原子模型，包括植物的捕光复合物和微管蛋白，**3D**电子显微镜最突出的成就是**Tom Walz**和**Steve Harrison**以**1.9 Å**的分辨率解析了水通道蛋白0的结构。电子晶体学的一个优点是，它可以用来研究自然膜环境中的完整膜蛋白，例如视紫红质和水通道蛋白0。

一些有序的螺旋排列分子（无论是自然的或人为诱导的）可以被看作是**1D**光子晶体，在低温电镜下，也能接近原子分辨率。其中较有影响力的研究是**Unwin**对乙酰胆碱受体的研究。**Unwin**使用快速冻干技术，动态研究了乙酰胆碱受体在失活前的开放状态。二十面体病毒结构非常对称，并且信号增强明显，因此是第一个分辨率突破纳米界限的非晶体样本，自此研究人员得以可视化蛋白二级结构，产生原子分辨率图谱，最后通过原子模型建立电子密度图。

然而，为了提高**3D EM**在非晶体、非螺旋、非二十面体的样本上的适用性，研究者们还需使用新的算法和重建策略。**Joachim Frank**等人创新性地使用载网，让样本在载网上形成薄薄的液膜，然后快速冻干。样本冻干后，单个颗粒的朝向是随机的（至少具有多种朝向）。这一成果极大地推动了单颗粒**cryo-EM**的问世和发展。如今，单颗粒**cryo-EM**已成为结构解析的主流工具。

机会和挑战并存

单颗粒cryo-EM的一个关键问题是研发运算工具，确定2D投影的相对朝向，从而进行3D重建。这就涉及到了两大挑战——图像的噪声特性和算法确定颗粒的相对方向。为了尽量减少对样品的辐射损伤，cryo-EM数据收集过程中必须使用极低的电子剂量（大约20-40电子/Å²）。为了获得信号，需要采集数千张单颗粒图像，进行叠加平均（在新探测器技术问世之前，这个数字是几百万张）。研究者们已经开发了几种计算方法来确定颗粒投影的相对朝向。

其中一种方法是Frank和Pawel Penczek提出的“投影匹配”法。投影匹配法中，每个实验颗粒的朝向是通过对比各种朝向而构建成的3D图像。根据相互关联算法，计算出最可能的朝向。采用基于几何的方法（即从不同角度对同一区域成多张图像），通过电子显微镜图像确定初始参考结构。这种方法根据不同角度的视图，能确定样本的硬度。另一种方法是Radermacher和Frank提出的随机锥形倾斜（random conical tilt）重建方法。作为基于几何法的替代方法，随机锥形倾斜方法在每对2D投影在3D傅里叶变换中共享一个“共同线”的事实，分析确定颗粒图像之间的相对方向。常用的一种方法是Marin van Heel提出的角度调整重建法，这是对这条“共同线”理论的真实空间实现。该方法无需样品倾斜，但它不能反映样本的硬度。

这些不同的图像分析方法已在电子显微镜软件，如Spider和Imagic软件中广泛利用。Wah Chiu和Steve Ludtke怀着让外行也能进行图片处理的想法，研发了EMAN和EMAN2软件。Niko Grigorieff研发的FREALIGN，以3D细化为核心（这一过程通过分配图像的相对角度，提高参考电子密度图的准确性，最终提高分辨率），成功校正了重建过程中的一个显微镜的对比度传递函数（表征光学系统对图像的影响的空间频率函数）。Penczek、Glaeser、Paul Adams和Ludtke研发了

SPARX系统，终端用户，如X射线晶体学使用者和cryo-EM使用者都可以使用该软件进行图片处理。Jose María Carazo和Sjors等人研发的Xmipp，使用X-Windows接口，重点强调图片分析的模块性和结构异质性的描述。

因为cryo-EM是单颗粒技术，所以cryo-EM样品中经常存在构象或结构异质性，这是高分辨率不易实现的一个主要原因。异质样本的分析需要将颗粒图像分类成结构均质的子集。最开始，研究人员可以使用基于几何的方法完成分类，然后通过使用多个参考图像进行投影匹配。Cryo-EM图像分析的一大进展是由Fred Sigworth引入的最大似然法（maximum-likelihood, ML）的使用。在最大似然法中，实验图像并不是基于相似性标准分配单颗粒的相对方向，而是分析颗粒处于各个方向的概率。这种方法已被证明能有效地降低cryo-EM图像的噪声。最大似然法不对单颗粒图像进行分类，但能鉴别多种构象或组装状态分子共存的样品。虽然鉴别不同结构状态需要大量的运算，但识别和表征多个结构状态对研究大分子动力学有重要意义。今天，FREALIGN和Xmipp等软件也引进了最大似然法算法。Scheres研发的RELION软件，能够处理结构异质性的样本，并且界面对用户非常友好，因此非常受学界欢迎。

Cryo-EM的新纪元：更多、更好、更快

自从成功解析T4噬菌体尾部后，3D电镜领域的发展日新月异。研究人员研发出新的仪器和图像处理方法，自动化数据采集和分析技术又增加了计算机的吞吐量。从cryo-EM首次打破纳米分辨率瓶颈解析病毒结构，到首次从头追踪病毒衣壳之间的10年里，cryo-EM领域不断发展，使用cryo-EM的实验室不断增多，分辨率也获得不断提高。但过去的几年中，最为革命性的进步莫过于直接电子探测摄像头的使用 and 商业化（背景知识框1）。

新的探测器增强了图像的对比度，而且读出非常快，使得以“电影模式”采集数据成

为可能，同时还克服了电子辐射造成的样品偏移。图像采集的过程中，电子穿过玻璃化样品会诱导样品/冰晶的运动，造成模糊。一种有效的校正方法是把总剂量分割开，例如20个电子，分割成 $1\text{ e}/\text{\AA}^2$ 。然后运算处理时，根据电子分割，进行校正处理，缩小运动偏移造成的模糊。这种处理方法最先由Grigorieff提出。校正的颗粒图像的信噪比更高、颗粒方向分配更准确，因此分辨率更高，甚至可能达到原子级分辨率。检测器技术的改进，不仅使用更少的数据集得到了更高分辨率的3D结构，还降低了样品的大小限制，能研究更小的蛋白。直接电子探测器摄像头最大的意义可能在于，能够更好地识别结构异质性的样品，提高对罕见结构状态分子的识别和描述。

因此，硬件和软件方面的改进，大大提高了cryo-EM的适用性、分辨率和吞吐量，使其取代了X晶体衍射法而成为了结构解析领域的主流工具。鉴于此，大量原来无法解析的系统如今都被成功解析。这些系统包括越来越多的完整膜蛋白；生物聚合物，如肌动蛋白和微管；含量少的大型分子组装，如转录起始复合物；以及复杂的生化混合物中罕见的结构状态，如真核翻译起始复合物的研究。

总结

Cryo-EM技术现在已经非常成熟，某些类型的样品，如病毒或核糖体，基本都使用

cryo-EM来解析，很少会用X射线晶体衍射了。完整的膜蛋白现在也出现了这种趋势。随着cryo-EM对较小的分子解析能力的增强，cryo-EM的使用需求自然会增长，结构解析的对象范围也将不断扩大。但研究者的兴趣集中在“大”而非“小”上。大型大分子组件，重建尤其困难，且内源性来源稀少的大型分子组件，曾一度是cryo-EM的主要研究领域。尽管针对生化混合物或多构象样品的分类方法已经有很大进步，但对于一些样本的连续动态解析还存在很大问题，而且分辨率也不高。这一状况在未来几年还会持续。然而，这样的研究将能够达到亚纳米级分辨率，而且能同时描述多个状态（或构象）。Cryo-EM在这些领域大有可为，通过多种策略配合使用，cryo-EM可以产生各种亚纳米模型。在这种情况下，预测蛋白质结构或蛋白相互作用的算法将会对生物学的发展起到极大的推动作用。

Cryo-EM领域机遇与挑战并存。相位板技术、更好的探测器、改良的、可重复的样品制备，以及能处理动态的、结构异质的样本的软件都在研发中，并且可能在不久的将来获得较大的进步。目前的一大挑战是cryo-EM的购买和维护成本，以及运算的高成本，这都要求建立新的资金模式来支持共享cryo-EM资源和相关超级计算机资源。最后，cryo-EM领域的扩张迫切需要简单易行、能在领域内推广的结构验证方法。

背景知识框1：探测元件

传统方法是利用电子显微镜，将图像记录在胶片上，然后采用数字化处理。CCD（电荷耦合器件）摄像头的出现，使数据采集过程自动化，数据集的数目增多，容量也增大了。然而，CCD的一个缺点是，电子必须首先通过与闪烁基数器的相互作用被转换为光子。闪烁基数器里电子的多重散射会产生模糊的光子“云”，光子云比CCD像素大得多。因此，CCD得到的图像分辨率大大降低。这对于cryo-EM这种基于信号重建的技术来说，是个非常大的问题。

其中一个解决方法是直接在硅片上探测电子。要实现这种方法，需要克服一系列的工程障碍，一个主要的障碍就是硅片的抗辐射设计，这样可以减少电子辐射对硅片的损伤，延长探测器中硅片的使用寿命。经过数年的努力，一个英国公司（英国医学研究委员会分子生物学实验室的Richard Henderson、Greg McMullan 和 Wasi Faruqi研发）和两个美国公司（分别由劳伦斯伯克利国家实验室的Peter Denes和加利福尼亚大学的Nguyen-Huu研发）成功商品化了改良的电子探测器。这些直接电子探测摄像头（或直接探测器）噪声很低，甚至没有，对比度强，保存的信号分辨率高。此外，直接探测器的检测速度非常快。Niko Grigorieff等人利用检测速度快这一特性，以“电影模式”收集cryo-EM数据，以此来矫正电子束带来的运动偏移。校正前，大多数图像非常模糊，因此缺乏高清晰度信息。一般来说，20张甚至50张图像中仅有一张不模糊，因此采集高质量数据的效率非常低下。但新一代摄像头仅需一个简单的校正过程，就能达到接近100%的高分辨率图像。这些探测器的改进是支持单颗粒cryo-EM跨越式发展的硬件基础。



百态 · 频道

www.LifeOmics.com

4. 论单颗粒cryo-EM发展的无限可能性

12月30日,《自然方法》(*Nature Methods*)评出了年度最受关注、影响最广泛的技术,单颗粒cryo-EM赫然在列。Cryo-EM具有高分辨率,适用于解析生物大分子的精微结构。那么cryo-EM的分辨率还能提高吗?这一提高多久才能实现?尽管目前cryo-EM已经是非常成熟的高分辨率分子结构解析工具,人们相信它仍有巨大的进步空间。

Cryo-EM已能解析生物大分子的原子分辨率结构,但这一分辨率和物理极限相比仍有较大距离。颗粒可以产生的图像对比度(信号)由其尺度和原子散射因子决定。同时,图像中会存在无法消除的噪声信号,这是由有限的电子暴露造成的(电子暴露过强,样本会发生辐射损伤)。20年前,Henderson根据这些已知的物理极限,估计cryo-EM只需通过合并约12000个颗粒的数据,就能达到3 Å的分辨率,也就是说,能对约40 kDa(千道尔顿)的分子进行结构解析。他当时对于信噪比的估计过于保守,如今科学家们通过技术改进,已大大提高了信噪比,实现了更高的分辨率。然而,目前cryo-EM的信噪比仍然远比物理极限低上3、4倍。这也算是个好消息,因为这意味着未来几年分辨率仍有提升空间,cryo-EM领域仍将面临重大变革。这也是这篇评论要讨论的话题。

样品制备难题

单颗粒cryo-EM的理想样品厚度应小于100 nm(为了避免电子被多次散射),但应大于颗粒本身的大小,通常是10-30nm。目前制备这么薄的样本的方法是:把几微升样品滴到亲水性的采样载网中,用滤纸吸干99.9%以上的液体,形成一层薄薄的水膜。然后往带有样本的载网中注入冷冻剂,使液体玻璃化,从而在电镜的真空环境中保留大分子结构。这种方法的一个关键要求是,颗粒的取向必须是随机分布的,这种情况下,多个投影图像的数据合并后,才能得到分子的3D密度图。

然而在吸干和冻结的短暂瞬间,空气-水

交界处颗粒由于布朗运动会发生多次碰撞。

Cryo-EM样本制备的另一个问题是一些空气-水交界处的分子倾向于保持特定取向。其它一些分子在空气-水交界处时,则会发生部分或完全变性。

样本结构均匀性是巨大挑战。因为多个颗粒的图像数据必须合并平均,以形成3D重建图,所以,若要实现高分辨率,必须保持样本结构上的均匀性。不幸的是,这非常少见。在某些情况下,结构异质性过于严重,以至于项目无法继续进行下去。当这种情况发生时,研究者们就不得不停下来寻找原因。

一种可能性是,样本没有预想的那么均匀。在这种情况下,应深入研究分子的生化特性。另一种可能性是,结构的异质性是在样品制备过程中引入的,例如颗粒粘附在载网的基片上,或者是冻结前样本形成水膜时颗粒与空气-水界面发生相互作用。毕竟,蛋白在水膜(和气泡的膜一样薄)处有些不稳定!

最近研究者们研发了一些方法来稳定那些容易不均匀的颗粒。一种方法是当颗粒通过密度梯度离心时,使用戊二醛交联。另一种方法是使用多种缓冲液进行样本制备,从中选择出最佳缓冲液。还有一种值得研究的方法是使用类似生化纯化的亲和结合法,把样本固定在载网内。这种固定化方法会防止水膜中分子与空气-水界面的相互作用。亲和结合的可选方案包括: Ni-NTA-衍生化脂质单分子层膜、抗体包被的碳薄膜和经过衔接分子修饰的链霉菌生物素单分子层晶体。由于不可能存在单一的、通用的解决方案,制作样本的方法仍需改进。

另一方面，功能异质性也是一大难题。分子存在多种构象，这丝毫不足为奇。同样地，液体和冷冻样本中分子也可能存在不同构象，甚至不同组成。理论上来说，单颗粒cryo-EM的一大好处，就是能区别不同的功能构象，但实践起来却十分棘手。

当只存在几种功能构象，而且不同构象之间的差异足够大时，才可以使用软件来把颗粒图像分配到各个构象中。实际上，软件常用于实现样品纯化的最后阶段。例如RELION软件的3D分类工具，已被证明具有强大的颗粒分配功能，能够将颗粒分类成结构上更均匀的子集。一个样本的图像可用于动态重现一个生物分子在整个功能周期过程中出现的结构变化。然而，各构象之间的差异要多大才能实现多构象重建这一问题，至今仍缺乏理论分析。

但是，即使多构象识别能力增强，带来的成本增加也不容易忽视。例如，Scheres指出，目前剑桥分子生物学实验室（Laboratory of Molecular Biology in Cambridge）的cryo-EM相关运算一天的费用预计达到1000英镑（约9600人民币）。因此，cryo-EM领域需要解决的，不光是仪器本身的问题，还有相关运算的成本问题。

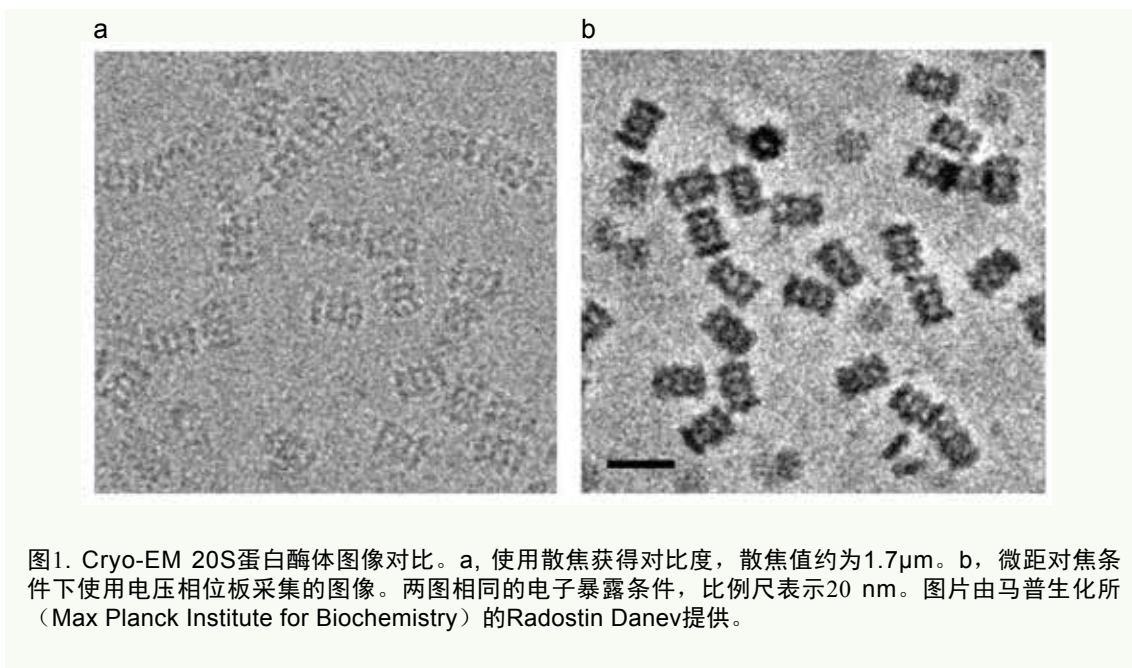
Cryo-EM可能很快就会获得进一步完善。

鉴于可用的硬件和软件不断发展，cryo-EM在生物领域的适用范围将继续增长。未来cryo-EM的分辨率会更高，将能解析更小的分子结构，并且能够区分蛋白质不同构象之间的细微差别。这些技术改进很可能对生物学产生巨大的影响，从而推动生物学的发展。

更好的摄像机。不久的将来，敏感度提高两倍

的直接电子探测器将问世（更多内容，请见背景知识框1）。但这种技术改进带来的代价十分巨大，堪比引进第一代电子探测的代价。实现这种改进的其中一种方法就是：边缘地带的像素点大小至少在10 μm ，并将每个电子事件转换为一个强度可测的信号。目前，FEI Falcon采用了14 μm 像素尺寸，而Gatan K2摄像头的像素尺寸为5 μm ，并且可对电子事件计数。如果将两种相机的特性相结合，那么新型相机的信噪比最终会接近“散粒噪声”的极限，顾名思义，极限的存在是由入射电子本身的泊松分布造成。在这一点上，信噪比很难进一步提高。尽管每幅图像的像素数目增加了四倍，扩大了视野，对于拍摄分子样本非常有利，但这意味着整个成像时间和运算时间的增长。

焦点相位对比。Cryo-EM的图片中“强度”对比非常弱，这是因为未染色的薄样品对于高能量电子基本是透明的。举个简单例子来说明，用光镜对未染色生物样本成像时，也会出现这个问题，一般的解决方法是刻意散焦，和电子波的相位产生一定对比，增强“强度”对比。Zernike在使用光镜的过程中发现，散焦并不是个好方法，更好的方法是使用一种“四分之一波”相位板使散射光的相位发生90度的偏移。早在1947年，就有人发表了文章，提出解决电子显微镜的强度对比弱的问题。但该解决方案非常难以实现。最近，研究者发明了电压相位板，终于成功创造出了一个可用于数据采集的装置。如图1所示，相对于散焦，该电压相位板能大大增强对比度。理论上说，如果聚焦相位对比技术发展近乎完美，低分辨率图像采集中对比度应当出现两倍的增强。



其他可能的改进。目前使用的运动补偿法, 在捕捉高分辨率数据最初曝光阶段无效。克服这个问题具有重要意义, 因为最高分辨率的图像信息也是最容易因为辐射损伤而消失的信号。我们有理由相信, 上述软件和硬件的改进结合起来有可能获得更高分辨率的、能够解析更小的生物大分子, 例如比分子量为64 kDa的血红蛋白分子还小的分子。同时密度图谱也能达到2 Å的分辨率, 目前已完成的 β -半乳糖苷酶的结构解析就达到了这一分辨率。让很多人惊讶的是, 曾经认为十分必要的球面像差校正, 可能在cryo-EM成像中不起作用。另一方面, 正如背景知识框1提到的, 随着分辨率的提高, 聚焦的深度可以小于颗粒的大小, 因此图像的高分辨率特征将不再是简单的分子结构投影。

获得蛋白分子的原子分辨率图像, 或是在液体中成像, 由于电子的“缺点”都不可能实现——电子的非弹性散射和随之而来的辐射损伤。但这些物理极限真的不能突破吗? 背景知识框2提到, 电子的波特特性意味着可能可以用一些我们从未想到的方法来检测电子波。这些想法真正能起多大用处, 还有待观察。

Cryo-EM的培训和推广

虽然有些平台对外开放cryo-EM的使用, 但高端cryo-EM仍然匮乏。购买和维护的高额费用让众多实验室对cryo-EM望而却步。一个明智的解决方案是尽快建立cryo-EM公共使用平台设施, 用户可以把样本带到平台处进行实验, 或直接把样本寄送到平台, 监控数据收集过程。事实上, 目前已有一些这样的设施 (表1), 这些设施有助于研究如何更好地满足研究者对cryo-EM不断扩大的需求。

此外, 学习使用cryo-EM获得高分辨率图像并不容易。该领域发展迅速, 并没有标准的、用户友好的使用方法。虽然最近发表了很多关于这一话题的评论文章, 但书籍还很少, 用户难找到可以借鉴的指导读物。因此, 大多数培训都是由资深使用者分享信息完成。这种培训缺乏规范, 可能造成浪费和尴尬的错误。

即使是cryo-EM的熟练使用者也必须警惕地问自己, 结果是否正确。幸运的是, 正如背景知识框3所说, 可以借助很多方法尽早发现错误, 及时中断实验, 并且还可以通过简单的方法来避免依赖于模型的偏见, 这类偏见是过去犯错误的常见根源。

表1 目前运营中的多用户cryo-EM设施

国家	城市	地点
中国	北京	清华大学国家蛋白质科学中心 中国科学院生物物理研究所蛋白质科学研究平台
	上海	国家蛋白质科学中心（上海）
英国	牛津	Diamond光源有限公司电子生物成像中心（Electron Bio-Imaging Centre, eBIC）
荷兰	莱顿	莱顿大学（Leiden University）莱顿生物研究所（Institute of Biology Leiden, IBL）荷兰纳米显微技术中心（Netherlands Centre for Nanoscopy, NeCEN）
美国	休斯顿	贝勒医学院（Baylor College of Medicine）国家分子成像中心（National Center for Molecular Imaging, NCMI）
	纽约	纽约结构生物学中心（New York Structural Biology Center）自动分子显微镜国家研究所（National Resource for Automated Molecular Microscopy, NRAMM）
	华盛顿	美国霍华德休斯医学研究所/珍利亚研究园区（Howard Hughes Medical Institute, HHMI/Janelia Research campus）

总结

如果过去3年你一直关注单颗粒cryo-EM领域，那么你将会爱上它今后的发展。毫无疑问，cryo-EM的各方面都会越来越自动、越来越日常，目前研究者和企业都受到了前所未有的鼓舞——领域不断扩大，需求越来越大。为提高cryo-EM实验结果的可靠性，有一个方面是最需要改进的，那就是样本制备。样本制备不当，会引入很多噪音信号，造成实验结果的不可信。

最后，要老生常谈一下的是：发表的作品必须是可重复的，对他人有用的！许多科学领域正在呼吁全透明和数据共享，从而增加实验结果的可重复性，cryo-EM领域也在此列。但问题是，科学家宁可和别人分享牙刷，也不愿意和其他人分享数据。当可重复性岌岌可危时，充分公开信息是必需的。事实上，没有比这个更能体现你实验的可靠性，以及你没有隐藏信息！

背景知识框1：2 Å分辨率可行吗？

即使单颗粒cryo-EM的分辨率不足以重建分子的原子模型，它产生的结果也能对生物学领域带来诸多启示。例如，如果分辨率受灵活性和固有的结构异质性制约，即使是中等分辨率获得的结构模型也十分有用。然而，研究者们都非常关注的一个问题是，产生高分辨率的密度图的前景如何。

现代电子显微镜通常分辨率高于2 Å。因此，如果不是因为高能量的电子会快速损伤生物大分子，普通电镜很容易得到生物大分子的原子细节。鉴于此，电镜使用的方法是使用安全的电子剂量对多个结构相同的颗粒进行成像，然后将这些照片融合平均。

只要颗粒是结构均质的，2 Å甚至更高的分辨率都是可实现的。相机性能提高两倍就能解决这个问题。用户友好的相位板也是一个突破点，好的相位板意味着聚焦略有偏差（焦点在关注点附近）也能记录得到高信噪比的图片。一定量的弱焦无疑是有益的，但是，融合弱焦点和过焦点的图片非常棘手。即便如此，弱焦点对对比传递函数（Contrast Transfer Function, CTF）的影响也非常有限。在这种情况下，长期被认为是坏事情的球面像差其实是件好事，因为它能部分抵消散焦造成的波前像差！

但是，随着分辨率的提高，又一个新问题需要解决。当试样的厚度大于给定的分辨率的聚焦深度时，高分辨率得到的信号不能被解读为简单的结构投影。因此，根据傅立叶变换的重建结构因子得到的结构模型就已经失真了。是否能通过迭代的计算方法来解决这个问题仍待考察。如果算法不能解决这个问题，高分辨率cryo-EM就可能需要阻断一半的散射波。更好的解决方法是，使用更高能量、可能比现在使用的电子的能量高上5-10倍的电子。

背景知识框2：嬉皮士能拯救单颗粒cryo-EM吗？

嬉皮士的典故出自最近一本书的标题《嬉皮士如何拯救了物理学：科学、反主流和量子重现》（*How the Hippies Saved Physics: Science, Counterculture, and the Quantum Revival*）。本书介绍了基要物理学小组（Fundamental Physics Group）抛开主流物理学界的局限，探讨量子纠缠态等物理学无人问津的荒野，翻开了近代物理学的新篇章。Cryo-EM领域也需要嬉皮士精神，使用一些反直觉的电子波特性来解决cryo-EM领域的瓶颈问题。目前，“单颗粒cryo-EM”其实并没有使用单颗粒，当然，而是使用一堆颗粒来解析蛋白结构。

电子显微镜科学家只有在解释图像形成时，才会想起电子的波特性。事实上，使用四分之一相位板来改善图像对比度的想法（图1）也是基于电子的波特性而来的。以反常规的方式思考图像形成的过程，科学家们能得到很多其它的灵感。

例如，一个潜在的方案涉及“无互动测量”。该方法使用干涉仪来检测是否存在一个吸收电子的对象。虽然努力的方向是对的，但它不能完全解决未染色的生物样本对比度弱的问题，因为只有在样本完全不透明的情况下才能实现真正的无互动测量。

另一种方案是计算噪声。如果每个像素暴露于 N 个电子中，在接近海森堡极限的情况下，噪声对信号的比例为 $\frac{1}{N}$ ，而不是 $\frac{1}{\sqrt{N}}$ 。这两种理论方法都是最近由Okamoto提出的。

从经典物理学的观点来看，辐射损伤所造成的限制似乎是完全不可克服的。但在几年前，光学显微镜中的衍射也被认为是不可克服的，但如今都算不上是问题了（https://en.wikipedia.org/wiki/Super-resolution_microscopy）。从这个角度来看，辐射损伤今后可能也不再是问题。正如Volkman对Erbst Abbe 1878年的著作的解读：“今天看来无法逾越的障碍，可能在未来就只是小case。”

背景知识框3：你的实验对了吗？

刚进入cryo-EM领域的研究人员需要十分了解自己正在进行的项目。过去，cryo-EM不断发展，研究者们犯了无数错误。但是，研究者们也发展了一系列检测实验是否出错的方法，因此类似的错误是不可原谅的。新手和专家都应避免这样的错误。

3D模型的过拟合是个容易误入的陷阱。两个完全独立的重建过程，能减少过拟合造成的对分辨率过于乐观的估计，同时也是评估傅里叶壳相关性（Fourier shell correlation, FSC）曲线的唯一方法。此外，故意用噪音替代数据（在给定分辨率情况下）也是一种明确的过拟合测试。

已知结构特征的渐进式出现，如螺旋结构分子、分离 β 链和侧链密度都非常必要，但不足以检测图谱的可靠性。更令人信服的方法是重现一个生物大分子复合体已知的高分辨率亚基。另一种方法是添加单克隆抗体分子，不仅是“对齐处理”或“基准”，同时也能帮助验证重建过程是否可靠。

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

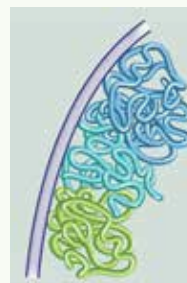
二、2016年值得关注的重要技术与方法学领域的发展

1. 细胞内蛋白标记 (Protein labeling in cells)



更好的蛋白标记方法有助提高成像效果。

2. 解析细胞核结构 (Unraveling nuclear architecture)



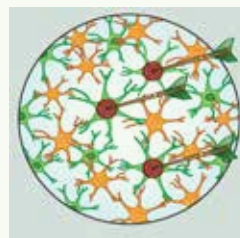
为了能在高分辨率和高通量条件下观察3D染色质结构的动态变化，我们必须开发新的技术和方法。

3. 蛋白结构动态变化 (Protein structure through time)



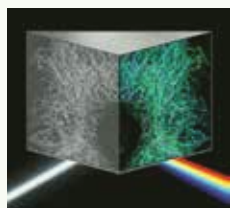
时间分辨晶体学技术 (time-resolved crystallography) 的发展让研究人员可以追踪更快速的蛋白结构变化。

4. 精准光遗传学 (Precision optogenetics)



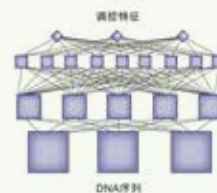
达到细胞分辨率水平的神经元光遗传学操控技术可以让研究人员精准剖析神经微电路。

5. 高度多重成像 (Highly multiplexed imaging)



在单细胞内开展多重靶点成像的技术正在试图突破颜色障碍，从而有望让人们看到一个多彩的细胞。

6. 深度学习 (Deep learning)



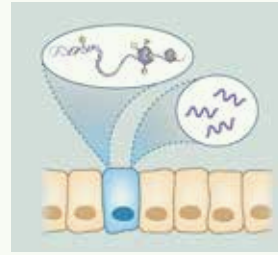
新型计算机工具可以从大规模序列数据集里获取复杂的模式和结构。计算机可以将序列生成功能注释信息。

7. 亚细胞图谱 (Subcellular maps)



人们正在不断改进可以系统地定位细胞内蛋白分布的技术。借助细胞图谱，我们便可以很好地操控生物过程。

8. 综合单细胞图谱 (Integrated single-cell profiles)



综合每个单细胞的图谱有助于人们进一步认识基因调控和异质性的相关机制。人们将能很快通过分析这些单细胞而获知不同的分子态。

原文检索：

- Allison Doerr. (2016) Single-particle cryo-electron microscopy. *Nature Methods*, 13(1): 23.
- Michael Eisenstein. (2016) The field that came in from the cold. *Nature Methods*, 13(1): 19-22.
- Eva Nogales. (2016) The development of cryo-EM into a mainstream structural biology technique. *Nature Methods*, 13(1038): 24-27.
- Robert M Glaeser. (2016) How good can cryo-EM become? *Nature Methods*, 13(1038): 28-32.
- Rita Strack. (2016) Protein labeling in cells. *Nature Methods*, 13(1): 33.
- Nicole Rusk. (2016) Unraveling nuclear architecture. *Nature Methods*, 13(1): 33.
- Allison Doerr. (2016) Protein structure through time. *Nature Methods*, 13(1): 34.
- Nina Vogt. (2016) Precision optogenetics. *Nature Methods*, 13(1): 34.
- Rita Strack. (2016) Highly multiplexed imaging. *Nature Methods*, 13(1): 35.
- Nicole Rusk. (2016) Deep learning. *Nature Methods*, 13(1): 35.
- Natalie de Souza. (2016) Subcellular maps. *Nature Methods*, 13(1): 36.
- Tal Nawy. (2016) Integrated single-cell profiles. *Nature Methods*, 13(1): 36.



张洁&筱悠/编译

省钱!

省时!

表达克隆
真正减价不减质

20,000个人类基因的表达克隆, 保证序列, 即日送货, Fedex寄送!

产品名称	载体	筛选标记	标签	促销价		
				< 500 bp	500-1000 bp	> 1000 bp
哺乳动物载体表达克隆	M02	Neomycin	Native	¥980	¥1,400	询价
	M13	Neomycin	C-Flag	¥980	¥1,400	
	M98	Neomycin	C-eGFP(monomeric)	¥980	¥1,400	
	M67	Hygromycin	Native	¥980	¥1,400	
	M68	Puromycin	Native	¥980	¥1,400	
慢病毒载体表达克隆	Lv105	Puromycin	Native	¥980	¥1,498	
	Lv151	Neomycin	Native	¥980	¥1,498	
	Lv152	Hygromycin	Native	¥980	¥1,498	
	Lv153	Native	Native	¥980	¥1,498	
	Lx304	Blasticidin	C-V5	¥980	¥1,400	
穿梭克隆	Entry clone attL位点与ORF间含 有MCS位点	与EZShuttle™重组克隆技术和Gateway®克隆技 术兼容		¥980	¥1,498	
ORFeome	Entry clone			¥480	¥980	¥1,380

GeneCopoeia, Inc. 是国际ORF collection合作组织 (ORFeome Collaboration) 成员, 亚洲区提供ORFenme克隆系列的代表。GeneCopoeia专注于基因功能研究领域10+年, 是NCBI推荐的克隆供应商。全球累计引用GeneCopoeia克隆产品的SCI文章有1000+篇。

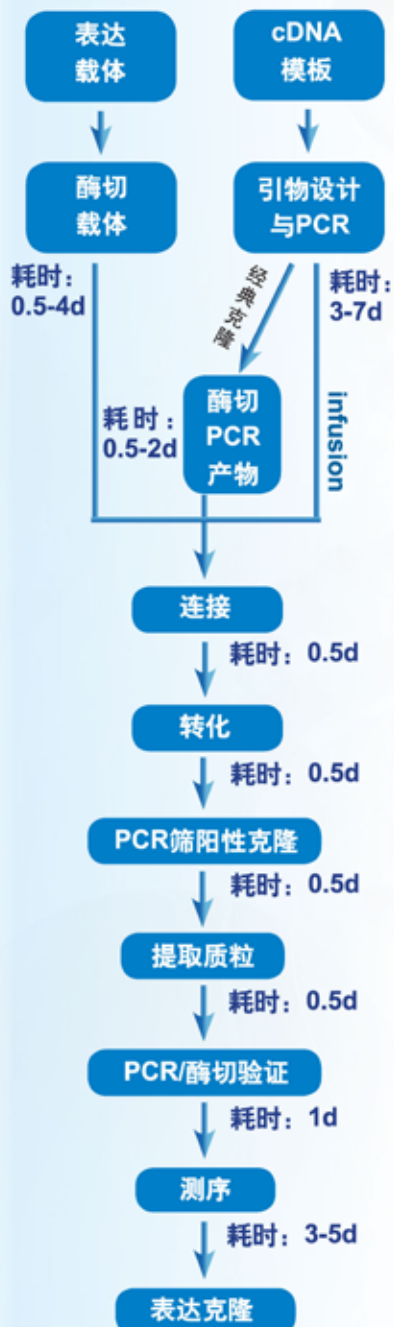
近5年

使用GeneCopoeia克隆产品发表

500+篇SCI 20分以上30+篇

即用型克隆为您省时又省钱!

您拥有 (已购买) cDNA克隆



购买GeneCopia 即用型表达克隆



花费: 低至 980 CNY

省钱!

耗时: 0

省时!

即用型(Ready-to-express)
表达克隆可直接用于转染等
后续实验, 免去了中间亚克
隆步骤。

发表文章举例

Reprogramming human
endothelial cells to haematopoietic
cells requires vascular induction.
VM Sandler, 2014. *Nature*, IF
42.351. SPI1 Lv105 lentivector &
RUNX1 Lv151 lentivector.

Reconstructing and
Reprogramming the Tumor-
Propagating Potential of
Glioblastoma Stem-like Cells.
ML Suvà, 2014. *Cell*, IF 33.116.
SOX1, SOX5, POU3F3,
SOX21, and VAX2 as Gateway
compatible pDONR vectors.

Genome-wide significant risk
associations for mucinous
ovarian carcinoma. 2015.
Nature Genetics, IF 29.352.
HOXD9-GFP and GFP
lentiviral vectors.

Loss-of-function mutations
in TNFAIP3 leading to A20
haploinsufficiency cause an
early-onset autoinflammatory
disease. 2015.
Nature Genetics, IF 29.352.
3×Flag-TNFAIP3 (Ex-
K6040-M12)



GeneCopia, Inc.

Tel: 4006-020-200 020-32068595

Email: sale@fulengen.com

Web: www.fulengen.com

www.genecopia.com.cn



漫漫投稿路



发表学术论文所经历的漫长等待让科研人员们身心俱疲。但真实的情况究竟如何呢？

Danielle Fraser第一次投稿发表论文时，她对以后将会碰到的困难一点思想准备都没有。

Fraser用了一年半的时间，对数千个分布于北美大陆的化石（在这些化石当中，最古老的距今已经有3600万年）进行了研究，终于得出了一个非常有意思的结果。她发现，就纬度来看，在温暖湿润的气候带地区，动物种群的分布范围是最广的。这项研究工作是Fraser在加拿大渥太华卡尔顿大学（Carleton University in Ottawa, Canada）的博士研究工作，该研究成果有助于我们预测哺乳动物会对气候变化做出怎样的反应，这也是当代生态学（ecology）领域里的一个重要问题。如此重要的研究，当然应该发表在高水平的学术刊物上，所以Fraser的博士生导师建议她给《科学》（*Science*）杂志投稿，于是她们在2012年的10月发出了投稿邮箱。

10天之后，她们收到了拒稿通知，于是她们又投了《美国科学院院刊》（*Proceedings of the National Academy of Sciences*），这也是非常著名的杂志，但是又失败了。再接下来又投了*Ecology Letters*，可还是被拒了。Fraser回忆道：“我当时感觉彻底绝望了，我连审稿意见都没有收到，都不知道应该如何修改我的论文，当时我们就想随便投个杂志，只要能够接收就行了。”

2013年5月，Fraser又尝试着投给了《英国皇家学会学报》（*Proceedings of the Royal Society B*），该杂志在她们生态学研究领域也拥有非常高的影响力。终于，《英国皇家学会学报》给她返回了审稿意见，此时距她第一次投稿已经过去了七个月。Fraser以为她的文章终于能够有个着落了。可她哪里知道，这才是发表文章的第一步而已。后面又经历了3次投稿，两次拒稿，两轮大修，以及无数版修改，才最终得以发表。Fraser已经不忍回忆那段经历了。

其实很多人都有与Fraser一样的经历，对于发表文章为什么需要如此大费周章，科研人

员们也提出了越来越多的疑问。投稿、拒稿、审稿、再审稿、再次审稿等等这一连串的过程下来，至少需要好几个月的时间，这对作者的工作、基金、职位申请都会带来很大的影响，也会延缓科研成果公布的进程。2012年，美国纽约洛克菲勒大学（Rockefeller University in New York City）的神经科学家Leslie Vosshall专门为此写了一份评论，对目前科研论文发表这种“冰川速度”表示深深的遗憾。Vosshall表示，近三年来，这种情况甚至变得更加糟糕。现在，发表论文需要很多时间，不论你发表在什么档次的刊物上都需要很多时间，就是需要那么长的时间。

但这是因为论文发表的流程变复杂了吗？如果真的是这样，为什么会变复杂呢？为了寻找问题的真相，《自然》（*Nature*）杂志对近期发表的，对论文发表时间进行分析的文章（很多文章都是等待论文发表的科研人员们写的）进行了一番总结，也走访了相关的科研人员 and 杂志社的编辑们，了解到了一些情况。

调查结果让他们大吃一惊。美国加州大学旧金山分校（University of California, San Francisco）计算生物学专业的研究生Daniel Himmelstein针对PubMed数据库中收录的所有标明有投稿和接收日期的文章做了一番分析，结果显示，稿件接收的时间并没有变长。近三十年来，文章的平均接收时间一直稳定在100天左右。不过Himmelstein也发现了一个很大的问题，很多杂志，包括一些非常著名的杂志都没有在文章中标示出论文的投稿日期和接收日期，有一些杂志只会表明再投稿的日期，而不是第一次投稿的日期。Himmelstein认为，这种重新设定日期的做法非常不好。因为这会影响他的分析结论，并不能充分暴露文章发表时间方面的问题。

很多数据都表明，公开发表的杂志和某些非常受关注的杂志，都存在文章发表时间延长的现象。比如Himmelstein就发现，在近十年来，《自然》杂志，文章的平均接收时间就从85天延长至了150天，而*Plos One*在近十

年来文章的平均接收时间也从37天延长至了125天。

很多科研人员都发现了这个规律，因为大家都希望能够尽快发表电子版，不断出现的各种刊物也的确加快了文章的接收和发表速度。科研人员们表示，杂志社审稿的时间太漫长了，审稿人总是要求提供更多的数据，不断地要求修改，补充其它的试验等。据Vosshall介绍，各个审稿人都在提出各种各样的要求，甚至是不合理的要求。杂志社的编辑们则表示，随着科学的发展，本来就是一个数据不断丰富过程，而且现在投稿的数量也越来越多，所以他们赞成用更高的标准和更加严格的同行评议来审核论文。不过这些编辑们也都表示，他们正在想办法加快审稿的速度。

不过文章发表的速度与专业也有关系，不同专业的文章，接收速度也各有不同。比如社会科学类的文章发表速度就超级慢。物理学杂志的接收速度则要快得多，因为物理学杂志都会在arXiv服务器上发表预印本，即在接受同行评议之前发表的版本。对文章发表速度抱怨最多的声音来自生物学领域，这是因为生物学研究领域的竞争异常激烈，而且是否能够在高水平的杂志上发表文章也会影响科研人员们日后的发展。就在这个月（2016年2月），70多位科学家、科研资助者、杂志编辑和出版商齐聚美国马里兰州的霍华德休斯医学中心（Howard Hughes Medical Institute campus in Chevy Chase, Maryland），探讨生物学家们是否也应该采用物理学界的预印本模式，来加快文章的发表速度。Vosshall认为，我们真的应该好好思考一下这个问题了。

投稿的因素

2012年3月，英国华威大学（University of Warwick, UK）的细胞生物学家Stephen Royle也向杂志社投了一篇文章。他的研究工作解释了一个非常有争议的问题，即细胞在分裂的时候，如何判断已经复制的染色体是否已经排列整齐，准备好进行分裂了。因为

他的研究工作意义重大，所以他最开始瞄准了他们领域的顶级杂志——《自然 细胞生物学》（*Nature Cell Biology, NCB*）杂志，而且该杂志的一位编辑在听过Royle的报告之后也建议他投给该杂志。但结果却是没有经过审稿，直接被拒了。然后Royle又投给了*Developmental Cell*，被拒了。接下来是《细胞生物学杂志》（*Journal of Cell Biology*），终于给审稿人审稿了。然后返回来一大堆修改意见，可最终还是被拒了。

到了2012年12月，Royle又投给了《细胞科学杂志》（*Journal of Cell Science, JCS*），这次没有直接被拒，而是交给审稿人了。有一位审稿人提出，他之前曾经为其他的某个杂志审过这篇文章，当时他给出的审稿意见就是可以发表。他们认为，该研究方法得当，对照可靠，对结果的解读也非常的谨慎。但是第二位审稿人给出的审稿意见却是不予发表。幸好JCS的编辑最终接受了这篇文章。此时距离第一次投稿已经过去了317天。该文章于53天之后，在线发表了。更可喜的是，Royle的这篇文章还获得了JCS杂志2013年年度最佳文章大奖。

虽然收获了这些荣誉，可多次被拒，还是给Royle的课题组，给他的学生们带来了很大的打击，因为学生们是需要文章发表才能毕业的。而且Royle也认为，他的这篇文章应该发表在更高水平的杂志上，被更多的人看到才对。“不幸的是，当时的大氛围就是，如果你的文章不是发表在顶级杂志上，就没人会看。” Royle介绍道。Royle也写过好几篇有关学术论文发表时间的分析文章，并且将这些文章挂在了他自己的博客上。他发现，还有很多人有和他一样的经历。他们对他们实验室12年来发表的28篇文章做过分析，发现平均发表时间和人类孕育一个新生命所需要的时间一模一样，都是9个月。

不过这其中有多少因素是自己的问题呢？Royle发表这篇染色体研究文章时也和广大科研人员们一样，首先就瞄准了他所在领域最顶

级（即影响因子最高的）的杂志，被拒之后再依次投给下一级杂志。在科研界，杂志的影响因子或名声是科研人员和基金评审人员，以及招聘委员会的委员们最看重的指标，因为这从某种意义上来说，就代表了所发表论文的质量。不过批评者们则认为，杂志的编辑往往更愿意发表质量较高的文章，以提升杂志的影响因子，进而提高杂志的受欢迎程度，但这样一来，势必会增加拒稿率，延长发稿时间。不过杂志社的编辑们可不接受这种说法，比如《自然》杂志的主编Ritu Dhand就表示，他们的选稿标准的确是原创的、重要的、会被人引用或者被媒体关注的研究工作，但这些绝不是他们唯一考虑的因素。

那么挑选投稿杂志会给文章发表推迟带来多大的影响呢？Royle通过对他们课题组发表文章的分析发现，在他们课题组发表的文章当中，一半以上的文章都投过不止一个杂志，这样就会让文章的发表有所推迟，短则数天，多则8个多月。接下来，Royle又对PubMed数据库中收录的，在2013年发表的所有文章做了一番分析，想看看影响因子是否与文章发表时间相关，是否影响因子越高的杂志文章接收周期越长。研究的结果呈现一个倒置的钟形曲线，即影响因子最高和最低的杂志文章接收周期最长，而影响因子居中的杂志文章发表得最快，数量最多的中间这部分杂志的平均接收周期为100天，这也和Himmelstein的研究结果非常吻合。影响因子最高杂志（IF介于30至50之间）的平均接收周期为150天，这也说明，想投好杂志，就得等。

一直以来，科研人员、杂志编辑、以及杂志社也都承认，杂志的刊名并不能代表刊发文章的质量和该研究的价值。但还是很多人会用杂志的影响因子来衡量一篇论文的价值。EMBO（欧洲分子生物学组织，是欧洲顶级生命科学专家们组成的一个组织，也是EMBO杂志的出版商）的主席Maria Leptin就表示，文章发表在哪个刊物上与文章作者的科研水平没有任何关系，也不能代表文章的影响力，更

不能证明该研究的结论就是对的或者是错的。没人敢说，我们作为科研资助组织或者教职评审委员会，只看你在哪个杂志上发表过文章，而不看你发表过什么文章。

对顶级杂志的追逐只是导致论文接收迟滞的一个原因，Fraser后来也意识到了这一点。

同行评议的因素

2013年10月，距离Fraser第一次投稿已经过去整整一年，此时的她已经不在乎影响因子了。她的文章在《英国皇家学会学报》那儿审稿已经审了两个月，最终审稿人给出了不同的审稿意见，杂志社也最后给出了拒稿的决定。然后Fraser决定试试*Plos One*，这是一个影响因子3分的杂志，以接收速度快而闻名，他们不考虑文章的意义、研究领域和引用率，只要是科学研究论文就行。

*Plos One*将Fraser的文章发给了第一位审稿人，两个月之后，Fraser收到了编辑的拒稿信，不过信里表示，如果Fraser能够按照他们的要求做一些修改，还是可以再试试。于是Fraser照着修改了一番，增加了一些引用文献，又做了一点再分析。到了2014年3月，Fraser将修改之后的文章再次投给了*Plos One*，这一次文章递到了另外一位审稿人手里，两个月之后，Fraser收到了审稿意见——需要大修。

据Fraser回忆：“他们没有直接拒掉，我已经非常高兴了。为了这篇文章能够发表，我真的是修改了无数遍。”按照审稿人的意见大修之后，她在2014年的6月第三次向*Plos One*发出了投稿邮件，这一次终于成功了。距离第一次向《科学》杂志投稿23个月之后，Fraser的文章终于在线发表了。现在回忆起来，Fraser也认为，她的文章经过如此漫长的同行评议和修改之后，的确好多了。但是文章的主要结论其实并没有太大的改变。

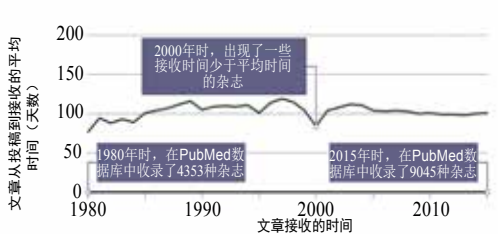
去年，荷兰蒂尔堡大学（Tilburg University in the Netherlands）的行为科学研究生Chris Hartgerink对自2003年诞生

以来，PLOS旗下的所有杂志（Hartgerink之所以选择这些杂志一方面是因为容易获取相关数据，另外一方面则是他自己也有一篇文章投给了*Plos One*，正在等待发表）做了一番分析。他发现，近十年里，一篇文章的平均评审

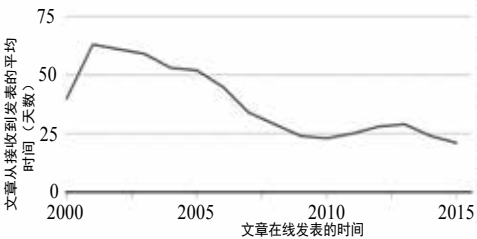
时间几乎延长了一倍，从十年前的50~130天变成了现在的150~250天。Royle对8个细胞生物学领域的杂志分析之后也发现，近十年来，其中7份刊物的发表时间都有延长，最主要的原因也是审稿时间延长。

究竟需要等多久？ 很多科研人员都在抱怨，文章发表的速度太慢，事实的真相又是什么呢？让图表和数字来说话吧。

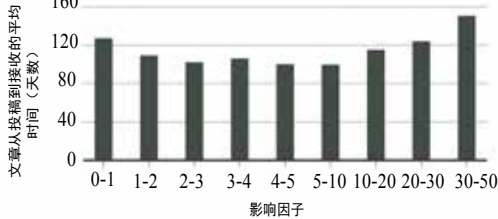
杂志评审时间 对PubMed数据库中收录的所有在2015年以前发表的，标明了投稿时间和接收时间的文章进行分析之后发现，这些文章的平均接收周期为100天左右。有一些杂志会略微更长一点。



文章发表的时间 可是该研究却发现，近十几年来，文章从接收到发表的时间明显缩短，这可能与科技的进步有关。



影响因子的作用 对2013年发表的所有收录在PubMed数据库里的文章进行分析发现，影响因子最高和最低的杂志，文章接收的速度是最慢的。



每一篇文章数据量的影响作用 通过对《细胞》、《自然》和《细胞生物学杂志》这三份刊物中发表的文章进行分析发现，近三十年来（1984年至2014年），一篇论文里的数据量有了极大的增加。



其中有一部分原因是因为审稿人现在要求更多、更高了。比如美国加州大学旧金山分校的细胞生物学家**Ron Vale**就对《细胞》、《自然》和《细胞生物学杂志》这三大杂志上刊登的生物相关文章做了一番分析，他分别选取了1984年上半年和2014年上半年这两个时间段进行采样，结果发现这三十年来，每篇文章的作者数量和试验结果（图表）数量都增长了2~4倍。Vale认为，这说明发表一篇文章所需要的数据量在增加，他还猜测其中有很多数据都是文章作者为了满足审稿人的要求而增加的。科研人员们对此也颇多抱怨，很多审稿人

总是要求更多的试验结果，以及不同的试验结果来证明一个观点。**Royle**表示，很少有文章修改之后会完全变样子，比如题目就不会变。他的分析也发现，在平均9个月的接收周期里，有4个月都花在修改文章上了。

很多科研人员也对杂志编辑满腹抱怨，因为当审稿人给出不同的意见时，这些编辑总是不愿意提供清晰的意见，这也无形中延长了整个过程。不过杂志方面可不这么认为，他们认为自己的编辑在处理不同审稿意见时都是非常经验的。比如《细胞》杂志的首席编辑**Emilie Marcus**就表示，她们那的编辑都会对

文章是否接收负责，而且也会帮助投稿作者理清头绪，便于他们修改。

编辑们还表示，科技的进步意味着我们现在需要处理的数据量也在不断增加，所以他们有很大一部分工作是向整个科研界传递这些最新的信息。据Marcus介绍，她们就正在想办法缩短审稿的时间，增加每一轮修改之后能够接收的文章的数量，在去年，这个比例是14%。2009年，《细胞》也对文章补充材料的数量做出过限制。

PLOS的执行编辑Veronique Kiermer谢绝了与我们详细讨论Fraser文章的要求，不过她表示，9个月的审稿时间不是她们的正常情况，她认为这种由某一个人的经历做的分析不太能够准确地反映事实的真相。不过Kiermer也承认PLOS ONE的发表时间有所延长，有一个原因就是该杂志每年发行的卷数增加了，从2006年的200增加到了现在的一年3万，所以他们有很多时间都会花在为投来的文章寻找合适的编辑与审稿人上面了（2015年，PLOS一共找了7.6万名审稿人）。Kiermer还补充道，近十年来，发表一篇文章又增加了很多必备的审核点，比如竞争性利益声明、动物福利报告、是否涉嫌抄袭等。“不论是从技术方面，还是从流程方面，我们都在尽力压缩整个发表周期。” Kiermer补充道。

Dhand还表示，《自然》杂志的编辑也发现，与过去相比，现在要想找到一位审稿人要困难得多了，这可能是因为有太多的文章需要人去审稿了。Himmelstein发现，从2000年到2015年，在PubMed数据库中收录的论文数量已经翻了一倍，现在已经将近100万篇文章了。

技术进步的影响

数字出版技术的运用可能会帮助我们缩短文章发表（即从文章接收到发表的这段时间，而不是审稿阶段）的时间。从Himmelstein的分析中可以发现，自2000年以来，文章发表的时间已经缩短了一半，现在大约是25天左右。

右。

已经有好几家新成立的杂志和在线出版平台表示，他们将更进一步加快文章发表的速度。2013年成立的PeerJ杂志社就是目前鼓励公开审稿的机构之一，他们发表的文章都会附上审稿人的姓名，以及审稿意见等信息。他们希望这种透明化操作能够减少不必要的拖延或修改工作。

2012年成立的生物医学及生命科学杂志eLife则保证，他们的编辑会在收到投稿之后数天之内给出最初的意见，同时也会尽快安排审稿人审稿。他们对审稿人也有严格的要求，不能泛泛地给出“完美的试验”这样的评论，他们可以要求作者给出更多的分析，但前提是这必须得是能够在2个月之内完成的。否则就直接给出拒稿决定。美国加州大学伯克利分校的细胞生物学家Randy Schekman是eLife的主编，据他介绍，所有这些政策都是为了保证让2/3的文章能够在第一轮审稿之后就被接收。

Himmelstein在他2015年做的一项分析时曾经根据所有3482份杂志（这些杂志自2014年1月至2015年6月发表的文章都收录在PubMed数据库里，而且都有清楚的时间信息）的平均审稿时间做过一番排名。结果发现，PeerJ以74天的接收时间名列第一，eLife是108天，PLOS ONE是117天。相比之下，《细胞》的审稿时间为127天，《自然》是173天，PLOS Medicine是177天，《发育细胞》（*Developmental Cell*）则以194天的超长时间在所有主流生物医学杂志中排名最后。不过Marcus指出，不同杂志之间是很难进行对比的，因为各家杂志对收到文章，到文章的接收和修改天数都有不同的定义，比如《发育细胞》杂志最看重的就是及时审稿，这对他们是最重要的。

预印的问题

生物学家们还有一个办法可以加快文章的发表速度，那就是预印（preprint）。据

*Physical Review E*的副主编，德国马堡大学（University of Marburg in Germany）的理论物理学家Bruno Eckhardt介绍，通过预印方式，可以快速获得同行们的反馈，“这就好像在facebook上发帖一样，公开发表你的研究成果。” Eckhardt这样打比方说。美国纽约的冷泉港实验室建立的bioRxiv服务器就是一个在线发表的平台，将文章提交给该平台之后，会在24小时之内上线，同时会给文章分配一个数字识别码（digital object identifier, DOI），后续的每一次修改也都会注明日期，任何人都可以浏览这些文章，而且可以给出评论。Vale表示，文章一上线，就能够获得来自其他人的评价，以及对该问题的看法，这就好像一场头脑风暴，或者叫智力众筹。而且，支持者们还认为，传统的出版业同样能够很容易地与预印模式相结合。比如2012年成立的F1000Research就是这么干的，他们先发表文章，然后邀请审稿人进行公开审稿和修改。

很多科研人员甚至更加超前，他们会使用GitHub、Zenodo及figshare等平台来发表各种猜想、数据和图表等信息。每一个文件都会获得一个DOI，这样就可以进行引用和追溯。Himmelstein就用Thinklab平台发表过预印文章，并且自2015年1月以来，一直在不断地撰写并发表最新的研究成果。据他介绍，他只需要点一下‘发表’键，就会立即获得一个DOI编号。用传统方法发表文章真的能够给他带来更多获益吗？抑或应该采用这种更高效、更快

速的方法来传播自己的研究成果呢？

不过预印和实时的在线发表平台也不是包治百病的灵丹妙药。Vosshall表示，很多生物学家都非常害怕预印模式，因为他们担心竞争者会抄袭，也担心会因此丧失专利及知识产权等利益。即便预印本出版之后，也会被各种同行评议，也同样会继续寻求在高水平杂志上发表，以便让自己的简历更好看一点。据Vosshall介绍，整个科研界都非常依赖传统杂志，因为这些杂志可以起到过滤器的作用，让更好的研究成果更容易被相关的人士发现。如果没有这些杂志，我们去哪找好文章呢？

对于Fraser而言，能够在*PLoS ONE*上发表文章也是一种成功。她的文章发表之后也获得了很好的反应，至今已经被浏览接近2000次，在facebook和twitter上的转载量也达到了51次，下载量达到了280次。这篇文章也让她保住了在美国华盛顿特区国家历史博物馆史密森尼研究所（Smithsonian Institution Museum of Natural History in Washington DC）做博士后的资格。“我真的非常高兴能够得到这个博后的位置，这也是我能够得到的最好位置。” Fraser说到。

不过Fraser可不想再经历一遍这个投稿过程了。所以这一次她选择一个中等水平的杂志，因为这样更有可能被接收。她指出，如果她的终极目标是获得一个教职，那她可不能为了发一篇文章而白白浪费两年。

原文检索：

Kendall Powell. (2016) THE WAITING GAME. *Nature*, 530:149-151.

 Eason/编译



倒挂行走的狐猴重心前移



红领狐猴（*Varecia variegata rubra*）。

对于大多数动物而言，即便具备最有利的条件，在细细的枝条上保持平衡也是一件难事。当然了，小型蜥蜴和蛇类是没什么问题的，但若体型较大的灵长目动物要在柔弱的枝条上攀爬，那么要保持直立姿态恐怕就比较困难了。不过，有些灵长目动物只

是通过用四肢将身体倒挂在枝条下方，似乎就能解决这个问题。对此，美国杜克大学（Duke University）的Michael Granatosky、Cameron Tripp和Daniel Schmitt进行了阐述，表明这种古怪的运动形式与四肢行走极其相似；并且认为，这种打破常规的定位方

式可能会为“动物最终开始用双臂在林间悬摆穿行”打下渐进式进化的必要基石。

Granatosky表示,虽然已有许多研究对悬空倒挂动物进行了解剖学方面的探索,但目前尚无研究对以四肢倒挂行走的动物与仅用前肢进行悬摆运动的动物进行比较。于是,这种非常规的反向运动激起了三人的好奇心,他们将两种狐猴——喜欢在地上行走的环尾狐猴(ringtailed lemur),以及常常四肢倒挂的红领狐猴(ruffed lemur)——设为研究对象,然后为其设定任务——顺杆快跑及杆下悬吊——来比较两种运动形式。

Granatosky和Tripp为一支杆子装上与测力板相连的配件,以测量动物发出的力。然后诱导狐猴沿杆前行,同时拍摄下它们的动作。不过,Granatosky也承认,想要诱使这些狡诈的小动物悬吊在杆下并没有想得那么容易。他告诉我们:开始,他们试着在“跑道”上放水果,但大多情况下,那些狐猴只是把食物打下来,然后在平地上享受大餐,结果白费了心思。最终,研究小组在杆下挂了些水果,诱使狐猴也悬挂在杆下。忆起这段往事,他轻轻地

笑了下,表示一旦这些小动物知道倒挂意味着乐趣之后,那么接下来的事情就顺利了。

Granatosky和Tripp在狐猴前行时,收集了303次足部碰触产生的力的测量数据,然后仔细分析了不同的力的组成,从而察看两种运动形式的不同点。结果出来之后,他们高兴地看到:尽管两种运动乍看上去有点像,但倒挂式步行与狐猴常规的漫步完全不同。

研究人员对狐猴在杆上前行的方式进行了描述:它们悠然而小心地沿着杆子的上表面行走,用后肢支撑大部分体重,同时也产生推动自身前行的力。不过,最令研究人员印象深刻的是,当狐猴在杆下倒挂时,运动发生了反转:它们用前肢推动自身前行,同时还支撑大部分体重。研究人员解释说,这种转而用前肢支撑体重的方式在灵长目动物中比较罕见,因为大多数动物都以下肢来支撑体重,从而解放双手来处理食物及其它物品。但是,他们也指出,这种承载负荷的转换可能会驱使肢体产生特定的适应性进化,可能会导致狐猴单独用前肢在林间进行悬摆穿行。

原文检索:

Granatosky, M. C., Tripp, C. H. and Schmitt, D. (2016). Gait kinetics of above- and below-branch quadrupedal locomotion in lemurid primates. *J. Exp. Biol.* 219, 53-63.



文佳/编译

厌食肽Nesfatin-1能增加金鱼的心脏每搏输出量

常言道：想要抓住一个男人的心，就要先抓住他的胃。当然，这句话源自何人之口已无从考证，但他/她肯定是一位内分泌专家——只有他们知道许多激素与我们体内的饥饿感相通，不仅如此，还能改变心跳。你相信吗？其实，人们在这类可改变食欲的激素中，新发现了一种名为Nesfatin-1的物质，它是哺乳动物体内的一种可有效抑制食欲的激素。最近，意大利卡拉布里亚大学（University of Calabria）的研究人员认为，该激素具有另外一个作用——调控心脏。他们证实，它能够减少大鼠左心室产生的压力。其实，Nesfatin-1本身就是其它脊椎动物（例如金鱼）的一种食欲抑制剂，但这个意大利研究小组希望知道，这种激素是否也会对金鱼的心脏产生类似的影响。

为了抓住问题的核心，研究小组首先分离出金鱼的心脏，将它们分别与一整套管道相连，使每一个心脏都能将盐溶液泵入心室，就像它们将血液泵入金鱼体内一样。接着，他们把Nesfatin-1加入心脏灌注液中，观察激素是否能在一个心跳周期中改变由心脏射出的盐溶液的容量和压力（分别是每搏输出量（stroke volume）和每搏做功（stroke work））。研究小组发现，即便是少量的Nesfatin-1也能增加心脏的每搏输出量和每搏做功。这就表示，Nesfatin-1可刺激金鱼的心

脏，使之增加做功，这正好与此前描述过的对哺乳动物的效应相反。为了明确这种应答的特定性，研究小组把含有Nesfatin-1及其特异性抑制剂的混合物注入金鱼的心脏，结果符合预期，心脏的功能降低至最初的静息水平。

在确信Nesfatin-1是金鱼的一种心脏调控激素之后，研究小组开始探究另一个问题：既然这种激素能够激动金鱼的心脏，那么其潜在机制到底是什么？他们把Nesfatin-1与某些具有特定药理学机制的抑制剂（分别靶标细胞内信号通路的不同步骤）分成几组，将这些混合物分别灌注到金鱼的离体心脏中，观察哪一种药物组合能够抑制Nesfatin-1的激动效应。通过这种方法，研究小组识别出了金鱼心肌细胞中Nesfatin-1信号转导的几个关键作用点。这条通路始于腺苷酸环化酶的激活，随后导致细胞内环腺苷酸（cyclic AMP）增加，从而激活蛋白激酶A——一种能够磷酸化特定蛋白质的酶，可迅速改变其功能；接着，蛋白激酶A作用于几种肌蛋白，结果促进钙离子的快速循环，并最终导致心脏的收缩。

综上所述，这个意大利研究小组共同提出了金鱼心脏中Nesfatin-1信号通路的作用及其作用过程的完整报告，展示了这种可改变食欲的激素同时也是内分泌性调节金鱼心脏功能的关键。

原文检索：

Mazza, R., Gattuso, A., Filice, M., Cantafio, P., Cerra, M. C., Angelone, T. and Imbrogno, S. (2015). Nesfatin-1 as a new positive inotrope in the goldfish (*Carassius auratus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* doi:10.1016/j.ygcen. 2015. 08. 003.



文佳/编译

A group of people are building a human pyramid against a cloudy sky with a bright sun. The pyramid consists of four people standing on the shoulders of others, with a fifth person at the very top. The people are wearing dark shirts and light-colored pants. The background is a bright, cloudy sky with a large, glowing sun in the upper left corner. The overall tone is motivational and collaborative.

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.COM