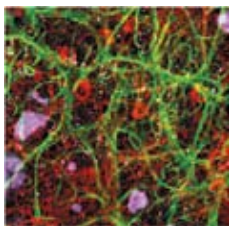


无标记显微镜技术已存在多年，它依赖多个不同的光物理过程诱导生物分子产生光信号。双光子荧光显微镜可以检测某些自体荧光物种。二次谐波和三次谐波方法能够分辨纤维结构和脂质体。拉曼显微镜可以检测特定类型的化学键，还能确定化学组成和脂质的丰度，但其背景强的缺点限制了它的使用范围。

大约十年前，哈佛大学（Harvard University）Sunney Xie领导的小组开发出了CARS（相干反斯托克拉曼散射）显微镜，大大扩展了拉曼显微镜的应用范围，但它在鉴定特定分子方面仍具有不足之处——相对较强的与波长无关的非共振背景，这会导致测量的谱型与拉曼光谱有所区别，因而限制了探测灵敏度。过去两年，Xie等人一直在改进CARS方法。



图片说明：由旧式技术——双光子显微镜、二次谐波和三次谐波显微镜技术所获得的无标记成像。

2008年底，Xie等人报道了一种新的基于拉曼成像的方法——受激拉曼散射（SRS）。这种方法克服了CARS显微镜的某些缺点。SRS显微镜让特定目标分子的鉴定更容易，且灵敏度非常高。一般来说，无标记方法与荧光标记相比，分子特异性相对较差，这是主要缺陷之一。SRS就有望缩小这个差距，它尤其适用于脂类这种很难进行荧光标记的小分子。2009年，研究小组又开发出另一种基于受激发射的新型显微镜用于获取非荧光分子信号。

尽管目前还没有方法能完全取代荧光显微镜，或满足每个无标记成像实验的需求，但我们毕竟看到了无标记显微镜的转折点，对未来应该充满信心。

原文检索：Daniel Evanko. (2010) Label-free microscopy. *Nature Methods* 7(1): 36.

董云巧/编译

（六）高通量表型分析

自动化评估模式生物表型方法的不断发展将会使探索生物学领域未开发之处成为可能。

如果你测出感兴趣的生物的全基因组序列，发展出研究基因组的新技术并构建出功能获得或功能缺失的基因突变体文库，那么下一步该做什么呢？尤其是如果你倾向于进行全基因组层面的研究，或进行经典突变和正向遗传性研究，你就需要一个更精确、更快速、更可靠的方法来鉴定靶基因调节或敲除后表型的改变。

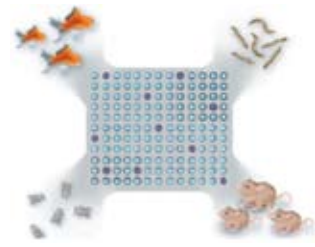
过去十多年，许多大规模研究工作都是通过复杂的手工操作完成的，这都归功于精巧的表型检测实验设计和科学家的勤奋敬业。毫无疑问，自动或半自动化的表型研究方法的不断发展将使以前不可能的任务成为可能。

事实上，一些研究人员正致力于将其它领域的相关技术引入模式生物表型研究。单单在《自然-方法》（*Nature Methods*）杂志上就发表了数篇相关的新方法，这些方法使基于计算机进行表型判断成为现实，而这些细微的表型改变过去是无法被人眼发现的。

研究活体内细胞位置、细胞谱系、荧光报告基因表达等在光学显微镜下的变化也可以通过自

动化实现。如果没有自动化、没有大规模的数据处理，那么这些研究是无法完成的。

当然这些方法投入使用后，相应的问题自然会浮出水面，但随之也必然会被加以完善。只要还有人们感兴趣的表型未被研究透彻，新方法就必然会不断涌现。



图片说明：模式生物的高通量表型分析。

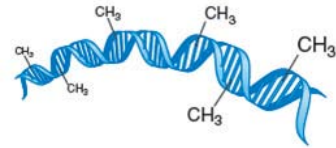
原文检索：Natalie de Souza. (2010) High-throughput phenotyping. *Nature Methods* 7(1): 36.

董云巧/编译

(七) 甲基化检测

单分子测序技术能否直接读出甲基胞嘧啶？

除了A、T、G、C四种碱基，人们对第五种碱基——甲基化胞嘧啶的兴趣日益增加。甲基化修饰的存在对DNA转录的调控起了重要作用。异常的甲基化会严重影响基因调控过程，并会引起多种疾病的发生。考虑到它的重要性，系统地绘制甲基化组，即全基因组范围内的甲基胞嘧啶的方法开始蓬勃发展。



图片说明：甲基化胞嘧啶的DNA双螺旋。

最近，美国Salk生物研究院的Joseph Ecker等人刚刚通过高通量测序的方法，展现了一张人胚胎干细胞中所有甲基胞嘧啶的完整图谱。这是第一张单碱基分辨率的哺乳动物甲基化图谱。尽管这些甲基化图谱的绘制方法略有不同，但都采用了亚硫酸氢盐转化，将未甲基化的胞嘧啶转化成尿嘧啶，并在随后的扩增步骤中转化成胸腺嘧啶。虽然很有效，但这种方法需要一些手工操作来确保转化的完全，并通过计算分析来绘制图谱。

今年年初，英国Oxford Nanopore Technologies公司科学家的报告指出，单分子纳米孔测序可替代这种劳动密集型的技术，测序仪能直接分辨出未修饰的胞嘧啶和甲基化胞嘧啶。当核酸外切酶消化单链DNA后，单个碱基落入孔中，它们瞬间与环式糊精相互作用，并阻碍了穿过孔中的电流。A、T、C、G以及甲基胞嘧啶都有自己特有的电流振幅，因此很容易转化成DNA序列。这样，纳米孔技术就能直接读出这第五种碱基。

目前，纳米孔测序仅限于短的寡核苷酸，离全基因组测序还有一段很长的路要走。此外，还有一些技术障碍需要克服，比如确保碱基以正确的顺序进入纳米孔，然后从另一侧离开。不过，一旦成功，第五种碱基的直接测序将会对生命科学研究产生重大影响。至于2010年会发生什么，让我们拭目以待吧。

原文检索：Nicole Rusk. (2010) A direct view of the fifth base. *Nature Methods* 7(1): 37.

董云巧/编译

注：想了解更多关于纳米孔测序技术的内容，请查看《生命奥秘》第20期专题——新一代DNA测序技术的发展现状。