



www.LifeOmics.com

www.LifeOmics.cn

生命奥秘

LifeOmics

2012年4月刊
总第44期



2011年《自然》年度技术： 人工核酶介导的基因组编辑技术

抗癌新药开始选择早期癌症患者进行临床试验

蜜蜂如何打破抉择的僵局



无奇不有

生命世界

解读生命

走进科学



目录 | CONTENTS

专题译述

2011年《自然》年度技术：人工核酶介导的基因组编辑技术

前言

一、2011年《自然》年度技术：人工核酶介导的基因组编辑技术

- 1. 人工核酶介导的基因组编辑技术 02
- 2. 基因组编辑新技术在生物学研究领域的应用 05
- 3. 更多阅读：锌指核酶与转录激活因子样效应物核酶 12

二、2012年值得期待的技术

- 1. 单细胞检测技术 28
- 2. 功能基因组学资源 28
- 3. 糖基化蛋白组学研究方法 29
- 4. 单倍体致病突变检测技术 30
- 5. 单层光显微技术 30
- 6. 非模式生物 31
- 7. 光电生理学研究新进展 32
- 8. RNA结构解析技术 33

下一期（2012年5月刊）预告：向Ralph M. Steinman致敬——树突状细胞从基础到临床

下一期《生命奥秘》在缅怀树突状细胞发现人Ralph M. Steinman教授的同时，将从多个方面回顾树突状细胞的发现历史、树突状细胞的分类、功能及树突状细胞的临床应用，并阐述目前我们对树突状细胞的认识，同时我们将会从基础研究和临床应用方面来展望树突状细胞的研究方向以及可能为我们所带来的改变。

热点话题

- 抗癌新药开始选择早期癌症患者进行临床试验 36
- 孟德尔难题 43

生命百态

- 蜜蜂如何打破抉择的僵局 47
- 小把戏溅出的灵感火花 50
- 氦气吸入法证明海豚的“鸣啸”并非真正的发声

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。

2011年《自然》年度技术： 人工核酶介导的基因组编辑技术

<<<<< 前言 >>>>>

每年年底，《自然-方法》（*Nature Methods*）都会对过去一年中推动生物学发展的技术方法做出回顾与总结，由此评选出当年最受瞩目、影响力最大的技术。2011年，人工核酶介导的基因组编辑技术荣膺《自然-方法》年度生命科学技术。

2010年，当选年度技术方法的是光遗传学技术，也即光刺激基因工程（optical stimulation plus genetic engineering）。它是一种通过使用光学技术和遗传技术来实现控制细胞行为的方法。光遗传学技术克服了传统的只用光学手段控制细胞或有机体活动的许多缺点，为神经科学提供了一种变革性的研究手段。而2011年，《自然-方法》则将年度技术颁给了人工核酶介导的基因组编辑技术。目前人工核酶技术已经成为在多种细胞类型和生物体内进行高效、位点特异性的基因修饰的一个常用工具。

人工核酶是一类通过基因工程改造的核酶，它主要包括三种类型：锌指核酶（zinc-finger nucleases, ZFN）、转录激活因子样效应物核酶（transcription activator-like effector nucleases, TALEN）以及兆碱基大范围核酶（engineered meganucleases）。基因组编辑核酶能够定位和准确改变生物基因组，这为研究基因功能、治疗疾病创造了新的可能性。

2011年年度技术方法的评选结果已尘埃落定，人工核酶介导的基因组编辑技术击败其它挑战者，拔得头筹。那么2012年，哪一项技术会胜出，勇夺年度技术方法的称号呢？单细胞检测技术（single-cell method）、糖基化蛋白组学研究方法（glycoproteomics）、单倍体致病突变检测技术、单层光显微技术以及RNA结构解析技术等似乎都有可能。究竟那一项技术最终会脱颖而出？让我们拭目以待吧！



2011年《自然》年度技术： 人工核酶介导的基因组编辑技术

1. 人工核酶介导的基因组编辑技术

哺乳动物细胞基因编辑技术的快速发展得益于Jasin等人的发现，即DNA在发生基因特异性的双链断裂（**gene-specific double-stranded break**）之后能够通过同源重组机制将基因打靶（**gene targeting**）操作的效率提高至少三个数量级。

科研人员在研究工作中使用了I-SceI归巢内切酶（**homing endonuclease**，这是一种由内含子编码的限制性内切酶），但是人工改造的核酶也能达到同样的效果。这种核酶能对基因打靶操作表现出“强大的”刺激作用，这完全是因为它利用了细胞本身用于修复断裂双链的同源重组修复途径。Carroll等人证实，人工核酶能够利用细胞自身的另外一种修复途径——非同源重组末端连接修复途径（**nonhomologous end-joining repair pathway, NHEJ**修复途径，这是一种容易产生突变的修复机制）造成突变，破坏正常的基因。因此，人工核酶介导的基因组编辑技术实际上就是利用人工核酶在基因组的特定位置造成双链断裂损伤，然后再利用细胞内源的修复机制对损伤进行修复的一个过程。

从原理上说，同源重组修复机制和非同源重组末端连接修复机制都可以被用于我们感兴趣的基因进行遗传学改造。目前主要有三种不同的人工核酶，它们分别是锌指核酶、转录激活子样效应物核酶以及经过遗传改造的归巢内切酶。虽然到目前为止几乎所有突破性的成果都是由锌指核酶取得的，但是我们相信上述这三种核酶都能够用于基因组编辑工作。而且转录激活子样效应物核酶很有可能会取代锌指核酶的地位和作用，这是因为这两种核酶的作用都差不多，但是转录激活子样效应物核酶要比锌指核酶更容易合成。即便如此，锌指核酶和重组归巢内切酶依旧会在基因组编辑工作中占据它们各自的一席之地。

1.1 基因编辑工具的开发

基因组在很大程度上都是受序列特异性的DNA结合蛋白控制的，后者帮助前者折叠，使其有序化。这种结合再控制的策略已经逐渐被科学家们利用，并开发出了一系列的基因组定向编辑（**targeted genome editing**）工具。一般来说，这种开发工作包括两个步骤。首先，设计一种类似核酸内切酶的核酶。这种核酶可在基因组中识别特定的序列，并将其切断，形成一个双链断裂缺口。然后，细胞会利用自身高度保守的两条修复途径中的一条修复这个缺口，在修复的同时就可以在这个缺口位置引入我们所需要的特定基因组修饰物。

1.1.1 制造缺口

目前主要有三种可用于基因组改造的核酶（表1）。

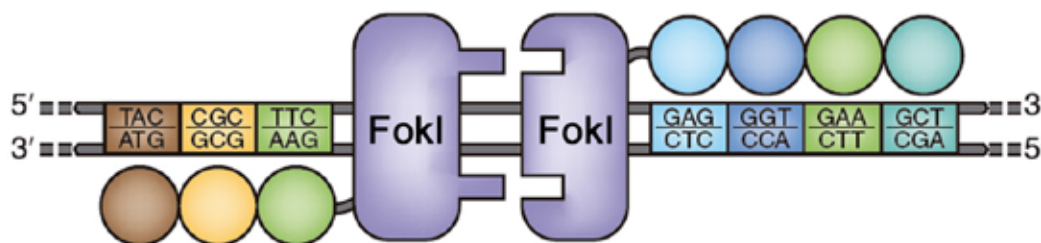
表1 目前三种可用于基因组改造的核酶	
核酶	简介
锌指核酶（Zinc finger nucleases, ZFN）	该核酶含有一个锌指蛋白的DNA结合结构域，以及一个来源于限制性内切酶FokI的核酸切割结构域。鉴于此，锌指核酶与FokI内切酶一样，都必须以二聚体的形式才能发挥DNA切割功能。 锌指核酶的DNA结合结构域由串联的Cys₂His₂锌指结构组成，其中每一个单元都可以识别DNA靶序列中的三个核苷酸，所以理论上说，科学家们应该可以任意设计，让锌指核酶的DNA结合结构域能够任意识别基因组中任何的特异性序列。如果多加上几根“手指”（在已经报道过的研究当中，每一个结构域单体上的手指数目都各不相同，从3个到6个都有），那么锌指核酶二聚体蛋白可能会结合18~36bp长的DNA序列。 如果两个锌指核酶单体反向结合在DNA上，并且刚好形成了一个5~7bp的最佳距离，那么这个核酶二聚体就能够将结合位点之间的DNA片段给全都切掉。
转录激活因子样效应物核酶（transcription activa-tor-like effector nuclease, TALEN）	该核酶整体结构与锌指核酶区别不大，主要的差别就在于前者的DNA结合结构域来自TAL效应子蛋白（这是一种源自植物致病菌的转录因子）。这种DNA结合结构域是由多个氨基酸重复序列串联排列而成，每一个单元由34个氨基酸组成。这些重复序列彼此之间都差不太多，一般来说只会第12和13位上有所差异，所以科学家们又把这两个位点称作重复可变双残基（repetitive variable di-residue, RVD）。 每一个RVD位点都能特异性地与A、T、G及C碱基中的一种结合，这就意味着每一条重复氨基酸序列也只能和一个碱基对结合。目前人们对这种DNA结合结构域的作用机制了解得还不多，远不如对锌指蛋白的认识，但是这两种蛋白表面上比较简单的编码方式可能会给今后的核酶改造工作带来便利。 与锌指核酶相同，转录激活因子样效应物核酶同样也是以二聚体形式发挥DNA切割功能，不过它切割的范围比较广，一个单体最少也能切割13bp长的DNA片段，而且它对结合位点之间的距离的限制也不如锌指核酶那么严格。
兆碱基大范围核酶（meganucleases）	该核酶是在多种微生物和相关病毒基因组中经常会见到的一种归巢核酸内切酶（homing endonucleases）。这种核酶可以在基因组中以很高的特异性对较大范围的DNA片段进行切割。如果我们想利用这种天然核酶在基因组中人工引入修饰物，那么首先就需要在被改造的位点处引入这种核酶的靶序列片段。如果想利用这种核酶对内源基因进行遗传学改造，那么就需要设计出各种不同的兆碱基大范围核酶，在这方面已经有人成功进行了尝试。

PS. 关于锌指核酶和转录激活因子样效应物核酶的更多介绍请见《更多阅读：锌指核酶与转录激活因子样效应物核酶》一文。

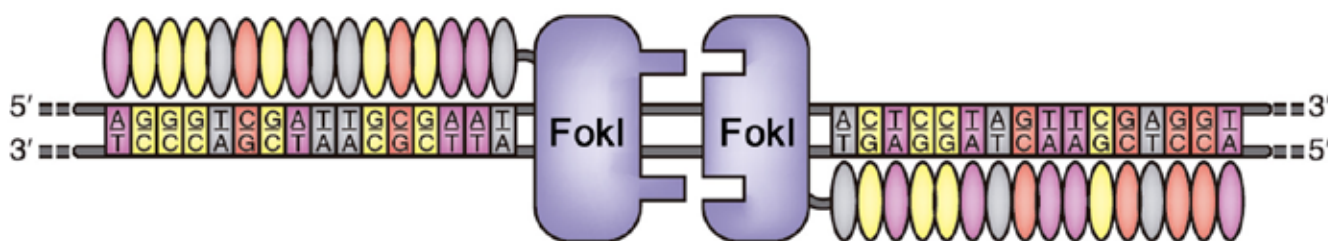
1.1.2 修补缺口

毫无疑问，细胞DNA断裂后势必会想尽办法将缺口填补起来。一旦科学家们利用各种人造核酶在基因组DNA上造成双链断裂，细胞修复机制马上就启动了。广义来说，细胞内主要存在两种DNA双链断裂修复机制，即容易发生突变的非同源末端连接修复机制（nonhomologous end-joining, NHEJ）和不容易发生突变的，需要利用外源DNA链为模板进行修复的同源重组修复途径（homology-directed repair, HDR）。细胞如果借助NHEJ途径进行修复就会在DNA链上产生小的缺失片段或者插入片段，从而产生基因突变，甚至会使整个基因被敲除。不过，我们如果需要对DNA序列进行特定的改造，比如对一个已有的突变位点进行修正，那么这时就必需用到HDR修复途径。我们可以通过在待改造细胞内同时引入含有目的同源DNA序列和核酶的方式来完成这种改造，因为在核酶完成剪切工作之后，细胞就会以这段外源性的DNA链为模板，借助HDR途径完成修复。

ZFN



TALEN



图中展示了核酶与DNA片段结合的方式。图片上部展示的是锌指核酶，下部展示的是转录激活因子样效应核酶（本图据*Nat. Methods* 8, 53–55 (2011)文献图片修改而成）。

1.2 目前取得的进展以及存在的问题

NHEJ修复途径和HDR修复途径是非常保守的两条修复途径，在所有物种细胞内都广泛存在，所以理论上说我们可以在所有物种细胞内利用这种人工核酶的方式对细胞基因组进行反向遗传学（reverse genetics）的改造工作。实际上，在锌指核酶和转录激

活因子样效应物核酶出现之后，人们已经证实很多物种都可以利用这种方式进行遗传改造。科学家们已经在大鼠、小鼠、鱼、果蝇、青蛙、猪、海胆、线虫、多种人体细胞以及多种植物细胞中达成了基因突变改造的目的。而且科学家们也在多个物种细胞中实现了在基因组特定位点加入新基因以及给基因组内源基因添加标签等工作。还有人成功利用兆碱基大范围核酶在人体细胞基因组中完成了基因突变的操作。但是我们在此需要提醒各位读者的是，利用人造核酶对基因组进行遗传学改造这种方法现在还不是那么完善，在如何将核酶和外源序列送入细胞、核酶和外源序列等各种改造工具的特异性和效率，以及改造的可控性（如何让这些改造工具自由接触到基因组中的任意位点）等方面还都存在一些问题。

2. 基因组编辑新技术在生物学研究领域的应用

对于生物学研究来说，拥有一种高度精确的基因组编辑工具非常重要，并且意义非常重大。比如酵母就一直是一种非常有用的工具，其中部分原因是因为科研人员们可以通过同源重组技术（homologous recombination）对酵母的基因组进行非常精确的改造，而且这种改造工作的效率也非常高。同样，利用同源重组技术对小鼠胚胎干细胞进行的基因靶向改造工作也给小鼠遗传学研究带来了一场革命，开发这项技术的Mario Capecchi和Oliver Smithies还因此获得了2007年的诺贝尔医学奖。但是，在其它物种里都还没能成功开展基因组精确改造工作，究其原因还是改造的效率太低。然而，现在这一切都被改变了。在近十年里，部分原因是临床需求的驱动，科学家们已经针对多种实验系统开发出了高效率的基因组编辑方法。现在，这种技术已经成为实验室研究工作中的标准基因改造操作了。

2.1 基因定向突变操作（targeted gene mutation）

在我们对感兴趣的蛋白质或信号通路及作用机制开展科学研究的工作当中，基因抑制（gene knockdown）或基因干扰（gene disruption）技术是一项非常重要的实验操作（图1）。对于哺乳动物细胞来说，现在通常都利用siRNA技术来达到基因抑制的目的。但是，这种基因干扰方式的作用很不彻底，而且效果不稳定，还需要克服脱靶效应（off-target effect）的影响。人工核酶的出现让科学家们又多了一个非常可靠的选择。

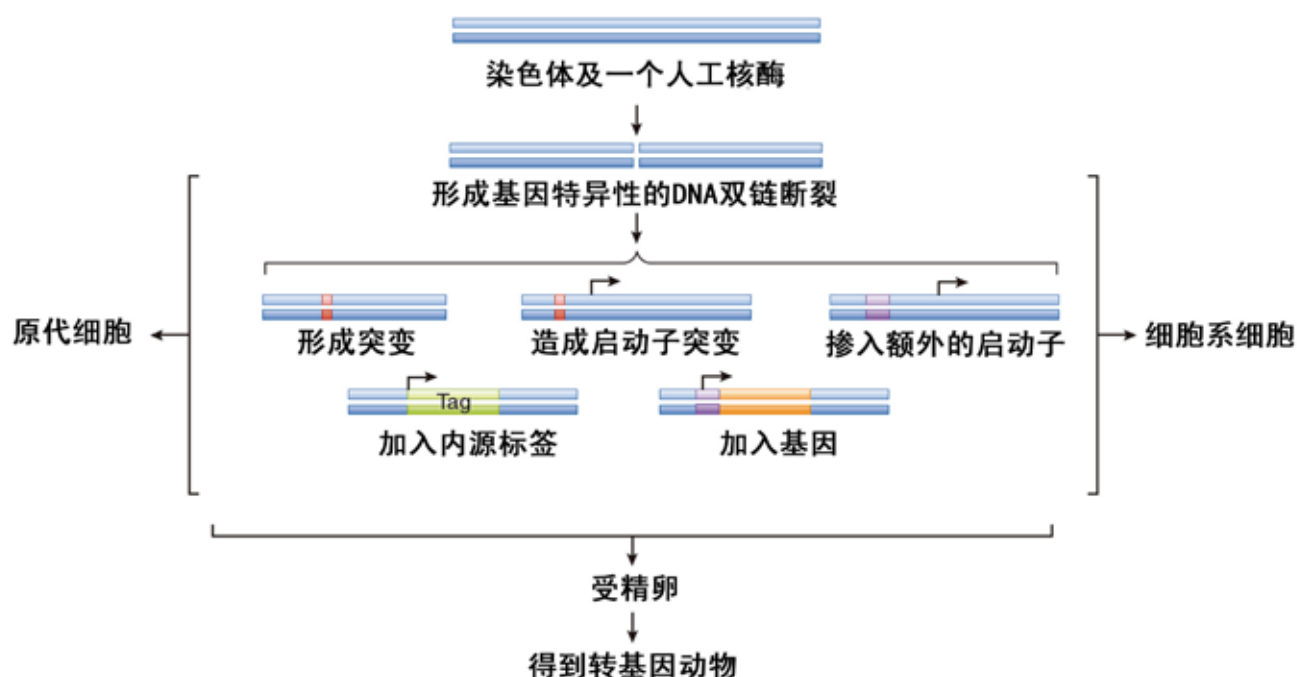


图1 利用一对人工核酶进行基因组编辑操作的流程示意图。在基因组中形成一个双链断裂缺口之后我们就能引入一系列的基因组修饰。这种基因组编辑操作可以在细胞系、原代细胞（包括体细胞和多潜能干细胞）以及受精卵（最后可以得到转基因动物）等各种细胞里开展。

利用某种人工核酶和容易诱发突变的非同源重组末端连接修复途径，我们就可以在基因组的特定位置引入小的插入突变或者缺失突变，从而使某个基因或者基因组元件失活。又或者可以借助人工核酶和同源重组修复途径在基因组中引入某种特定的修饰（改变），使得基因失活、激活或者赋予基因另外一种新的功能。我们既可以对蛋白编码基因进行这种操作，也可以对非蛋白编码基因进行这种改造。比如有人就利用锌指核酶对中国仓鼠卵巢细胞（Chinese hamster ovary cell）的两个二氢叶酸还原酶（dihydrofolate reductase）等位基因进行了突变操作，提高了细胞对某种重组蛋白的表达能力。还有人用这种方法对人体的血液细胞进行了改造，让CCR5编码基因突变，得到了能够抵抗HIV病毒感染的新细胞。

在核酶选择恰当的情况下，利用人工核酶和非同源重组末端连接修复途径造成突变的成功率一般都在10%以上，借助人工核酶和同源重组修复途径对基因进行改造的成功率也超过了1%，这些成绩都说明，只要设计合理，上述这两种方法都能够用于各种实验操作。如果人工核酶的活性特别高，那么基因组改造的效率甚至可以达到40%，这样我们就能很容易筛选到一个或两个等位基因都被人工改造过的细胞。另外，如果基因突变的速度足够快，我们甚至还可以用这种策略（即依次使用核酶切割，然后再修复，进行改造的方法）构建一个或多个基因被敲除的细胞系。我们甚至可以将核酶和传统的Cre-lox或Flp-FRT重组技术结合起来，设计出更精巧、高度可控、可逆式或者可诱导的基因敲除模型系统。

2.2 人工构建染色体重排 (chromosomal rearrangement)

人工核酶除了可以针对基因进行小范围的定向突变操作，用于基因功能研究之外，还可以同时对一个基因簇进行缺失操作（图2）。一般来说，小范围的基因缺失比较多见，大范围的基因缺失比较少见，但是这并不意味着这种基因大范围缺失的机制就没有意义。最近发现，如果人工设计一段可以跨越DNA核酶结合位点和同一染色体远端DNA位点的单链DNA寡聚核苷酸模板，那么就能达到从染色体上切除大段DNA的目的。同样，如果针对不同的染色体设计相应的核酶，则可以达到染色体易位（chromosomal translocation）的目的（图2）。如果能够构建出能够模拟某些人体疾病，尤其是癌症的染色体易位的原代细胞，那么这将会是一个非常好的研究工具，可以帮助我们更好地认识这些染色体易位在疾病发生发展过程中的作用。

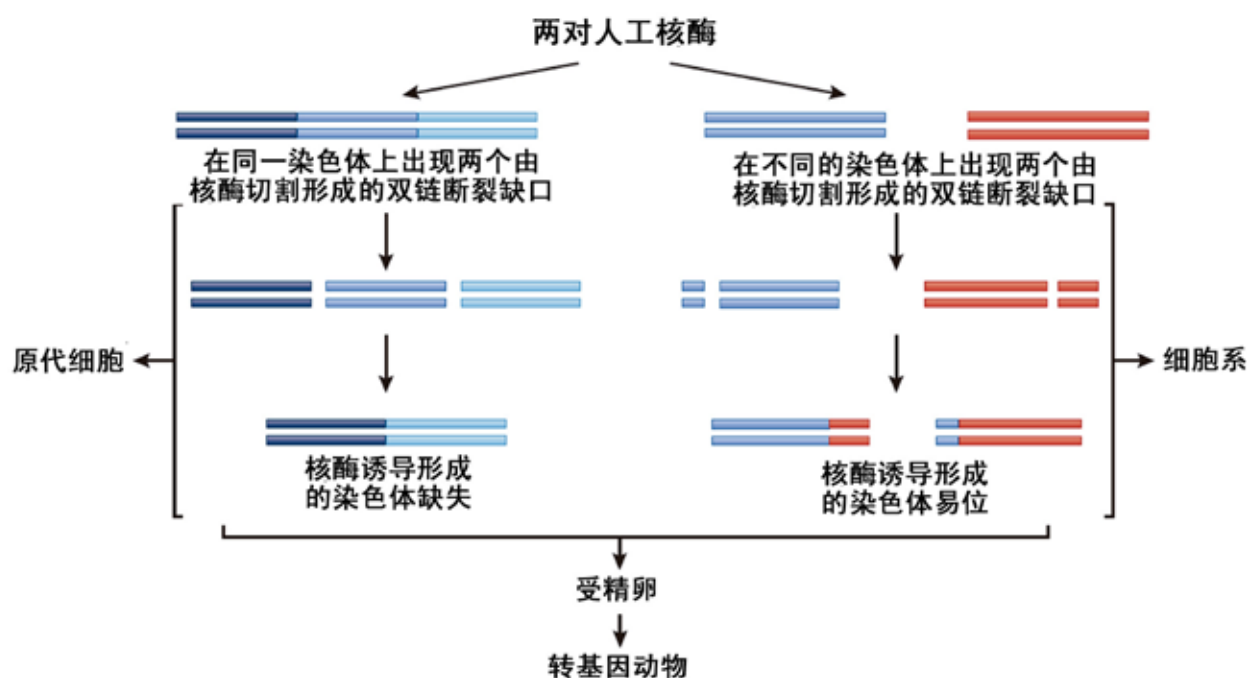


图2 利用两对核酶实现的基因组编辑操作。染色体间重排可以通过使用两对核酶切割染色体形成双链断裂切口的方式来实现。核酶决定了发生重排的位点位于何处，不过我们也要注意由于核酶存在脱靶效应，发生错误切割之后将会形成的非特定重排现象。这种染色体重排操作可以在各种细胞系和原代细胞（包括体细胞和多能干细胞）中进行，还可以用于构建转基因动物。

2.3 内源基因标记操作 (endogenous gene labeling)

稳定细胞系是现代生物化学研究工作中不可或缺的一个研究工具，它们在无数的科学研究工作中都起到了非常重要的作用。人工核酶的诞生也将彻底改变将来稳定细胞系

的培育方式。按照传统方法开展的转基因操作最后得到的结果往往是转进细胞的基因都不受控制地散布在基因组的任意位置，而且往往还聚集到一起形成多聚体，这样就会带来诸多的不便。

首先，我们一般都会选择用巨细胞病毒启动子（**cytomegalovirus, CMV**）或者其它启动子来驱动基因表达，这与使用细胞内源启动子相比就会产生一个问题，即蛋白表达水平上的差异，会造成蛋白表达量不正常。另外，使用人工启动子会完全破坏细胞正常的基因转录调控机制，包括反馈调控机制等。

其次，由于转基因操作通常都是在基因组中随机插入的，这样最终形成的结果就会与转基因插入的位置相关，而不是与转入细胞的基因本身相关。已经有两个研究小组使用人工核酶介导的基因组改造方法成功地在一个细胞内源基因上添加了荧光标签（图1）。Doyon小组开展的研究工作尤其值得一提，这是因为他们证明了在细胞内源基因上添加荧光标签这种方法在研究哺乳动物内含体（**endosome**）动力学问题上有非常大的实用价值，与使用标准的在细胞内表达一个外源荧光融合蛋白的方法得到的是完全不同的结果。用新方法进行试验之后发现，细胞内含体的演变过程比我们过去所认为的要有效率得多。在使用了内源荧光蛋白的新条件下可以对内源荧光蛋白进行非常精确的化学计量测定，这一点对于研究内含体的演变这种受到高度控制的胞内过程是非常重要的。Hockemeyer小组采用的也是非常类似的策略，他们使用转录激活子样效应物核酶在人体多潜能干细胞里引入了一个绿色荧光蛋白标签，使其与**Oct4**蛋白的**C**末端融合。上述这两项研究的重点都集中在如何在活体细胞里表达荧光标签融合蛋白，以用于活体细胞显微镜观察，但是我们还是可以很容易地想到这种添加标签的技术还有很多其它的应用方式，比如我们可以不添加荧光蛋白标签，可以添加抗原表位或者亲和标签等其它的标签。

2.4 定向转基因操作

我们还有一种方法可以实现构建稳定的转基因细胞系的目的，那就是在细胞基因组的特定位点插入目的基因（图1）。我们现在已经有了一些出于这种目的而构建的细胞系，比如Invitrogen公司在HEK293细胞里构建的**T-REx**系统就是这种稳定的细胞系，但是这些都不能让科研工作者们在多个不同类型的细胞里对同一个基因位点进行遗传操作。不过，使用核酶介导的基因靶向技术（**Nuclease-mediated gene targeting**）就能获得同基因细胞系（**isogenic cell lines**），即每一个细胞都能在受到同一调控元件调控的同一个位点处携带同样的目的基因或者目的基因突变体。用这种方法就能够精确分辨出基因功能的细微差别，这是对使用传统方法构建的稳定细胞系进行研究时不可能做到的。科学家们现在已经针对很多基因位点设计出了相应的人工核酶，其中就包括人体细胞的**CCR5**基因位点和**AAVS1**基因位点，所以这两个位点都可以用作转基因插入的整合位点。我们完全相信在几年之内，还会有更多针对不同位点的人工核酶出现。我们还可以使用这种人工核酶的方法让原本依赖人工启动子表达的转基因转而依赖细胞内源启动子来表达。比如，我们可以设计一个插入到胰岛素编码基因位点的抗凋亡转基因，这样就可以让能够表达胰岛素基因的细胞达到抗凋亡的目的。如果没有人工核酶的帮助，在人体细胞内实现这种转基因操作几乎是不可能的。

2.5 改变调控区域

基因编辑操作不仅仅限于蛋白编码区域或者其它功能元件（比如miRNA或结构RNA）编码区域，还可以对调控区域进行改造，比如在启动子或增强子中引入一些改变（图1）。再比如为了研究某个转录因子对某个基因的调控作用，就可以利用上述手段对这个转录因子的结合位点进行改造，或者在转录因子上动一些手脚。我们还可以用这些技术在基因的启动子区域里添加一些调控元件，比如某种转录因子的结合位点或是四环素抑制子等，实现人工调节基因表达的目的。或者也可以利用人工核酶介导的基因组编辑技术添加或者去掉一些microRNA结合位点，同样也能实现控制内源基因表达的目的。

2.6 基因编辑技术在细胞上的应用

几乎对每一个细胞生理进程的研究工作都能或多或少地从细胞基因组精确修饰技术中获益，但我们还是应该着重注意这种技术在几个关键研究领域里的应用以及在这些研究领域里有可能发挥的协同效应。第一个应该重点关注的就是合成生物学（**synthetic biology**）研究领域。所谓合成生物学就是对利用生物学手段人工合成出具备某种新功能的人工细胞，甚至是有机体的新兴科学。人工核酶就非常适合合成生物学研究工作的需要，可以在基因组中插入或者去掉某些元件，创造出一个新的更加复杂的系统，甚至还可以在基因组中插入一整套基因，给细胞添加一条新的信号通路。第二个重点研究领域就是干细胞生物学（**stem-cell biology**）研究领域。随着人体多潜能干细胞定向分化技术的不断发展和完善，定向基因修饰技术既可以用于研究细胞分化研究，也可以用于重建疾病进程研究。毫无疑问，该技术必将在研究干细胞基因功能的工作当中发挥出应有的重要作用。实际上，核酶早就应用于构建携带有患者特异性致病突变的多潜能干细胞系，或者构建纠正了这些致病突变的多潜能干细胞系的工作当中了。

2.7 构建转基因动物

核酶介导的基因编辑技术还可以用于转基因动物的构建工作，比如转基因黑腹果蝇、斑马鱼、小鼠、大鼠、兔等等，将来还会应用于更多的物种。核酶介导的基因组编辑技术还可以对更多的物种进行改造，从而让转基因操作成为一项常用的实验研究手段，帮助我们取得更重要的研究成果。核酶介导的转基因技术几乎可以对任何物种进行改造，只需要拥有足够的序列信息，然后提取受精卵，进行改造，再植入子宫，着床生长就能够得到转基因生物。在卵母细胞里进行基因编辑操作的成功率非常高，似乎已经足以满足使用上述这些实验手段的要求了（可能染色体易位会比较困难一点）。我们可以用这种方法构建出各种更好的转基因动物模型，用于人体生理机能研究，还可以构建出一系列的谱系报告系统（**lineage reporter**），用于研究人体的发育过程。

2.8 在研究DNA修复机制方面的应用

过去，科学家们都只能使用电离辐射等非常简陋的、非特异性的手段造成DNA双链断裂损伤。不过现在有了核酶，我们就可以在各种不同的实验条件下，以非常高的时间和空间特异性造成各种不同的DNA双链断裂损伤，这将有助于科学家们对DNA双链

断裂损伤修复机制开展更精细的研究。由于DNA双链断裂损伤修复过程在肿瘤的发病机理中占据了非常重要的地位，所以核酶也将在肿瘤研究领域发挥非常重要的作用。

2.9 总结

人工核酶介导的基因组编辑技术将从根本上彻底改变很多生物学研究手段。这项新技术可以让科研人员们从一个以前想象不到的角度，对各种细胞和动物模型内的基因功能进行特异性的、可控的研究。最近有人从构建时间、成本和用途等多个方面对锌指核酶和转录激活子样效应物核酶进行了全方位的比较，这样每一个科研人员都可以根据自己的需要作出最合适的选择。与其它任何一个新兴技术一样，人工核酶也将会变得越来越便宜，供应量也会越来越大，最终我们会发现人工核酶会成为实验室里的一个常规试剂，就好像我们现在每天都会用到的限制性内切酶一样。

生命世界 无奇不有

www.LifeOmic.com

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）。

职位职责：

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

3. 更多阅读：锌指核酶与转录激活因子样效应物核酶

基因组精确修饰技术是一个意外收获。

3.1 首个人工锌指核酶的出现

就在人类基因组计划（Human Genome Project）启动和哈勃太空望远镜（Hubble Space Telescope）发射升空的同一时间，美国约翰霍普金斯大学（Johns Hopkins University）刚刚聘用的助理教授Srinivasan Chandrasegaran向他的导师——诺贝尔奖得主Hamilton Smith咨询：有没有什么项目足够复杂，可以让一个新建立的实验室正常运转五年。Smith的答案是限制性内切酶重构工作。曾有无数的科学家试图人工构建可以识别并切割新鲜序列的限制性内切酶，但几乎没有人取得成功。由于Chandrasegaran（不过大部分人都叫他Chandra）一直以来接受的都是化学方面的训练，所以他比较倾向于改造限制性内切酶的底物。

当时大部分科学家关注的都是最常用的内切酶，这些酶识别和切割的DNA位点都一样，而Chandra则另辟蹊径，选择了另外一种酶作为研究目标，这种酶的识别位点和切割位点之间有好几个碱基的距离。Chandra检索新英格兰生物实验室目录（New England Biolabs catalog），结果在长长的限制性内切酶名单中发现只有两个酶符合他的要求，其中之一就是FokI酶。这种内切酶源自一种可以感染淡水鱼的细菌，我们已经对这种酶了解得比较透彻，所以以FokI酶为研究对象似乎是一个不错的选择。

Chandra最开始的研究计划其实非常简单，即先将FokI酶用物理方法分解为两个结构域，然后分别检测这两个结构域的酶切活性。但是科研基金评审们认为这个方案很难取得什么好的成果，因为被分开的两个结构域根本不可能在独立的情况下正确折叠成天然构象。然而最终这些评审们还是决定支持Chandra开展这项研究，给他拨付了科研经费。有一位评审在决议上这样写道：哪怕这个项目失败了，也是非常有意义的。随后，Chandra开始按原计划开展了研究工作（图1）。



Chandra Srinivasan，就职于美国约翰霍普金斯大学，他发明的锌指核酶今天已经成为了人工DNA内切酶的鼻祖和设计模板。

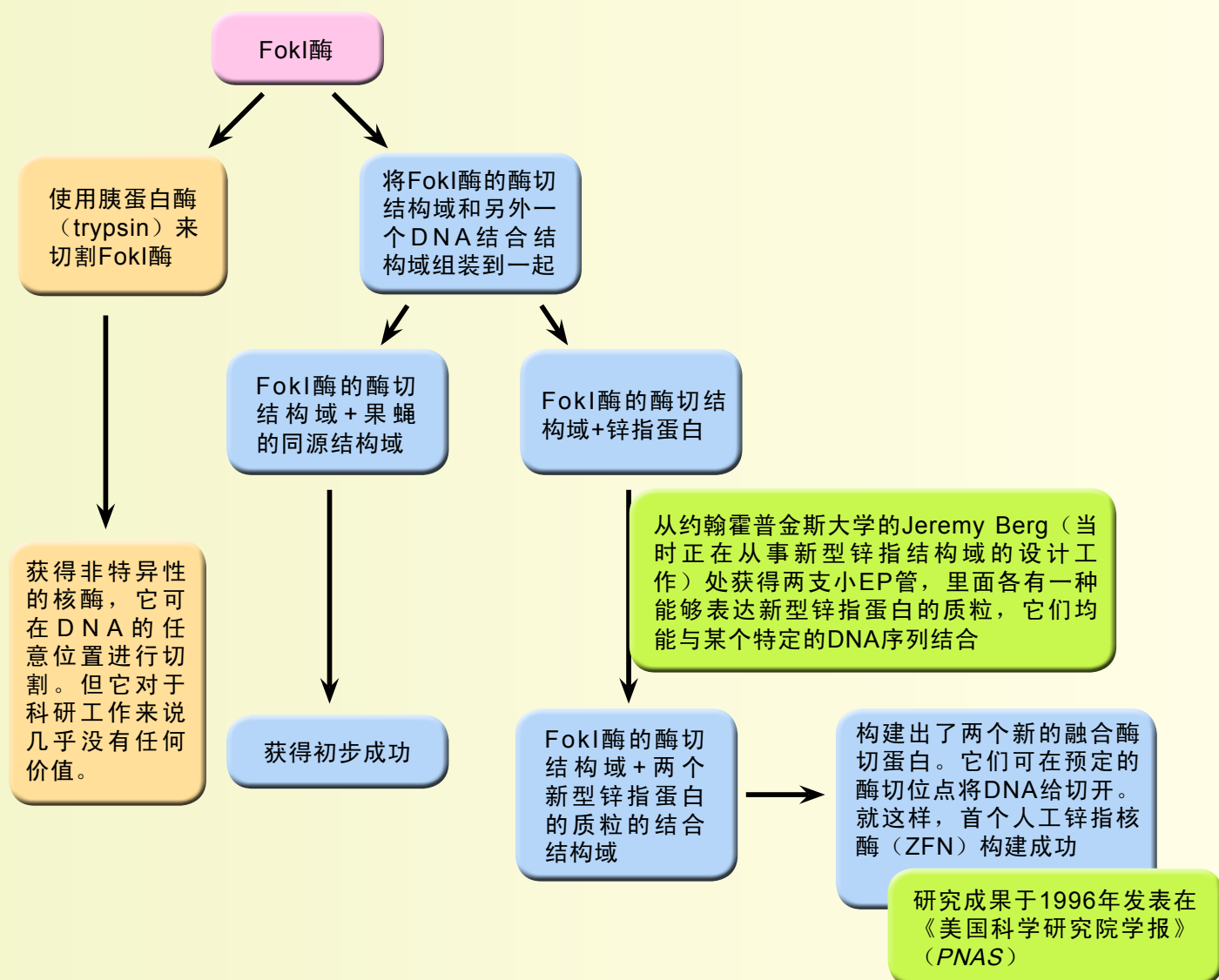
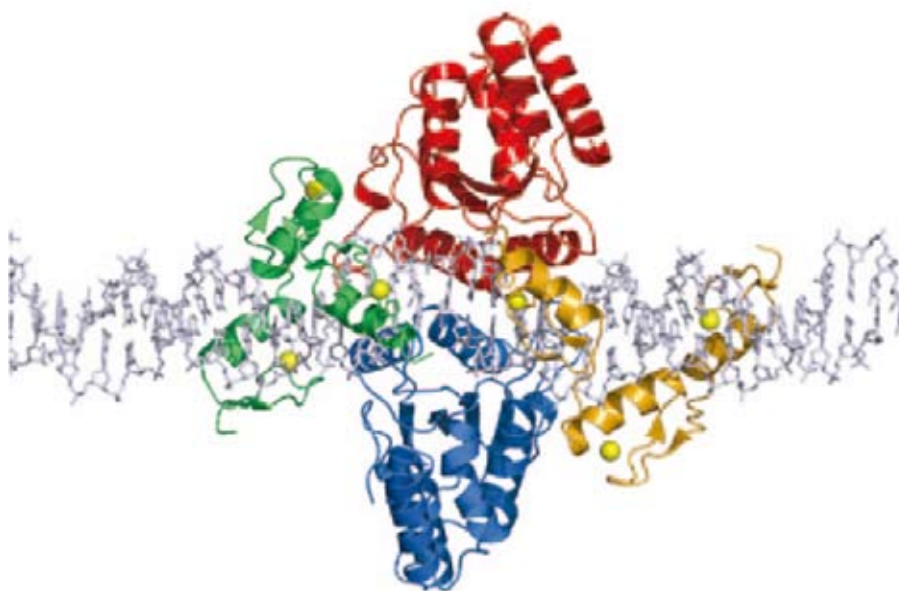


图1 Chandra人工构建可以识别并切割新鲜序列的限制性内切酶的全过程。

这些前期工作伴随着我们对DNA结合以及DNA修复机制的不断了解，最终催生出了一门新的技术——基因组定向修饰技术（targeted ways to modify sequences in the genome）。虽然我们现在已经获得了很多物种的基因组序列，但是如果想要知道这些基因组中的基因究竟有哪些确切的功能，还是得从基因序列着手，通过令一些基因缺失，或者对一些基因进行修饰，来看看最终会给表型带来哪些改变。但是科学家们除了能够对小鼠和酵母细胞进行这种遗传学操作之外，对其它的真核生物基因组都还不能进行精确的基因组改造操作。

人造核酶的出现彻底改变了这种状况。在近15年里，科学家们已经对锌指核酶进行了多种优化。就在最近，又有人将一种名为转录激活因子样效应子的DNA结合基序与内切酶结构域结合起来，形成了一种新的人工核酶。虽然对这种核酶还没有开展比较彻底的检验工作，但是就目前得到的实验数据来看，这种核酶要比锌指核酶更容易设计，而且完全能够起到与锌指核酶同样的作用。

转录激活因子样效应物核酶的功用也是非常引入注目的。就在今年，有科学家利用这种核酶对人体多潜干细胞进行了改造，将其中的致病等位基因切除掉，替换上一个健康的等位基因，并且还对改造前后的细胞进行了比较。另外一组科学家则利用这种核酶切除掉一个物种细胞里的一些基因，再用另外一个物种来源的相近基因进行了弥补，他们想用这种方式查看整个基因组的大环境是不是会影响其中每一个基因的具体功能。现在，我们已经可以用这种人工核酶技术对大鼠、线虫和其它一些物种的基因组进行定向改造了，这在以前可以说是不可想象的。



锌指核酶与DNA结合复合体结构示意图。图中绿色和金黄色表示的是锌指核酶的识别基序，蓝色和红色表示的是锌指核酶的切割基序。

3.2 借助人工锌指核酶对人体细胞内源基因进行修饰操作

有很多人都曾经尝试过对基因进行定向改造，但是几乎没有人成功过。这也是美国犹他大学（University of Utah）的Dana Carroll曾经有过的痛苦经历。Carroll通过自己以及他人的科研经历发现，只要能够在基因组DNA双链的特定部位进行切割，造成双链断裂切口，那么就能够依靠细胞自身的修复机制在这个位点引入任何想要的修饰。



美国犹他大学的Dana Carroll证实锌指核酶能够从整个生物体水平上对基因进行改造。

但问题就出在如何形成DNA双链断裂缺口上。Carroll将一段寡核苷酸连接到一个可以切割DNA分子的化学分子上，从而形成一个可以自我切割的三环结构（triple helices），但是实验结果并不理想。Carroll指出，他们一直都没能取得突破，直到看到了《美国科学研究院学报》上的那篇文章。Carroll打电话与Chandra取得联系，并提议与Chandra开展合作，因为Carroll已经找到了一种方法，可以检测蛙卵细胞里的DNA修复情况。这一次Carroll成功了。他在蛙卵试验中证实人工核酶的确可以切割DNA，形成双链缺口，触发细胞自身的修复机制进行双链断裂修复。

Carroll接下来希望能够获得一个可以将整段基因编码DNA序列全都切除掉的人工核酶。他向美国犹他大学的同事Kent Golic寻求帮助，因为Golic是果蝇遗传学方面的专家。Golic建议Carroll应该从果蝇的yellow基因下手，因为如果敲除果蝇幼虫体内的yellow基因，那么当果蝇成年之后，它们身上棕褐色的

外皮上就会间杂有琥珀色的斑点。于是Carroll带领他的博士后Marina Bibikova和实验室的其他人员一头扎进了Golic的实验室。由于前面已经打下了很好的基础，知道哪一个锌指结构域可以与哪一段DNA序列相结合，所以Carroll等人很快就设计出了能够切割yellow基因编码序列的锌指核酶。他们用这种核酶对果蝇幼虫进行了基因敲除实验，然后满怀希望地等待果蝇成熟。

Bibikova第一个在显微镜下看到了他们期盼已久的实验结果，在果蝇深黑色的腹部果然出现了一些浅色的斑点。但是Carroll还不敢肯定这就是他们想要的表型，于是他把Golic叫了过来，想听听专家的意见。Golic坐到显微镜前看了一回，然后站起身来表示，如果他是Carroll，早就高兴得跳起来了。之后的研究还表明人工核酶的用途远远不止基因敲除这么简单。如果用人工核酶对同源DNA序列进行切割，就能够取代细胞内源DNA序列。

与此同时，Matthew Porteus在了解了基因敲除小鼠技术之后开始热衷于基因编辑（gene editing）技术。当时Porteus还是一名医学生，正在治疗重症镰状细胞性贫血（sickle cell anemia）患者，他对只能采取姑息保守疗法的现状非常不满。而基因编辑技术却有望修正患者体内出现的致病基因突变，这才是治本的方法。于是，Porteus在20世纪90年代中期开始寻找有没有哪个实验室愿意接收他做博士后研究，他将遗传治疗作为了研究方向。但是当时没有多少实验室对这个方向感兴趣。现在在美国斯坦福大学（Stanford University）工作的Porteus指出，当时大家都认为对人体细胞进行改造是不可能的。最终David Baltimore决定让Porteus试一试。

Baltimore的实验室在美国加州理工学院（California Institute of Technology），Porteus在那里开发出了一套令人激动的人体细胞报告系统。有了这套报告系统，细胞如果发生了DNA双链断裂，就会表达绿色荧光蛋白。但可惜的是，Porteus使用的DNA归巢内切酶（homing endonuclease）只能识别一个酶切位点，他需要一个特异性较低的方法对DNA双链上的任意位点进行酶切。实验室的一名同事刚好以前从事过锌指蛋白方面的研究工作，他建议Porteus看看相关的文献，于是Porteus很快就看到了Chandra的工作，并且从Chandra那里得到了两个锌指核酶。Porteus还从Carroll那里得到了很好的建议，重新设计了酶切位点，并且还参与了一个大型的实验项目。Porteus指出，他记得那是一个星期六的早上，他当时正在实验室里做荧光活化细胞分类计数实验，却突然看到了绿色荧光细胞。Porteus之前已经进行过无数次实验，但是都没有得到绿色荧光细胞，所以深知这一次一定不是假象。换句话说，这一次他使用的人工锌指核酶真的在人体细胞基因组里进行了切割，形成了DNA双链断裂缺口。几年之后，Porteus和他在Sangamo BioSciences公司的合作者们报道，他们成功地利用锌指核酶对人体细胞的内源基因进行了人工修饰操作。

其实在上述这些激动人心的成果诞生之前，锌指蛋白早就因为一系列令人激动的成就吸引了生物公司们的目光，只不过当时的公司们主要是想利用锌指蛋白对基因表达进行“开”和“关”的操作，而不是对基因组DNA进行人工改造。Edward Lanphier在阅读了Carl Pabo于1991年发表的，介绍结合了DNA的锌指蛋白的晶体结构的论文之后就开始对锌指蛋白着迷了。Pabo的工作介绍了锌指蛋白的每一个锌指结构域是如何与DNA上的三个核苷酸结合在一起的。有了这个理论基础，其他科研工作者们就可以据此设计出可以识别任何DNA序列的锌指蛋白。

当时还是Somatix公司（这是一家主要从事基因导入治疗产品开发的公司）商业开发部门经理的Lanphier在和全世界顶尖的锌指蛋白研究者会面之后立即辞去了公司的工作，于1995年成立了Sangamo Biosciences公司，亲自担任公司的CEO。发现了锌指蛋白的诺贝尔奖得主Aaron Klug在意识到很多转录因子都含有和锌指蛋白类似的结构域之后，也立马参与成立了另外一家生物公司Gendaq。最开始是在美国麻省理工学院（Massachusetts Institute of Technology）Pabo实验室从事博士后研究期间才接触到锌指蛋白，并且开始从事相关工作的Keith Joung现在回忆起当时的心情时这样评价：当时并不知道这些小东西有什么作用，但是当知道如果能够设计出可与任意DNA序列结合的蛋白，那么这就是一项非常有用、非常了不起的技术了。

Lanphier通过Sangamo公司进一步加强了与锌指蛋白设计相关的专利和技术。Sangamo公司从各个大学获得了技术授权，并且在2001年收购了Gendaq公司，从而掌握了与构建锌指蛋白相关的拥有详细资料的庞大数据库，同时他们也聘请Klug在他们公司的科学顾问团里担任科学顾问。还是在2001年，Sangamo公司聘请Pabo出任他们公司的首席科学官。

但是锌指蛋白并没有马上进入各个领域，开展广泛的应用。Sangamo公司还是牢牢抓住和锌指蛋白作用相关的各项技术和专利，只是在小范围内和几家科研单位开展了合作。据Sangamo公司估计，他们开展的合作项目大约在150项左右。锌指和DNA的结合是非常精细的，绝不仅仅是DNA链上的核苷酸三联体和相应的锌指结构域之间的配对

这么简单。锌指蛋白结构域与我们五个手指一样，是长短不一，有它们自己的顺序的。比如位于食指位置的锌指和DNA之间的结合能力就会强一些，其它位置上的锌指的结合能力就会弱一些。

Pabo在2003年又返回了学术界，现在他自己开了一家咨询公司，关于锌指蛋白的应用问题他认为，制约锌指蛋白的一个重要因素就是一直以来都没人知道如何才能得到最好的锌指蛋白（锌指核酶的改造技术存在很多难点，详见文后背景知识1），他们做了很多工作之后才知道锌指位置的重要性。所以锌指核酶没能像PCR技术和RNA干扰技术那样诞生之后就马上风靡世界。但是这种核酶的应用潜力还是非常巨大的。他认为转录激活因子样效应物核酶也会给人们带来惊喜，打开一片巨大的应用市场。

3.3 探寻转录激活因子样效应因子识别并结合DNA的简便方法

转录激活因子样效应物核酶是以一种我们以前不知道的方式与DNA结合的，它的这种结合方式比锌指核酶简单多了。黄单孢菌（*Xanthomonas*）可破坏庄稼，感染西红柿、水稻以及200多种植物。黄单孢菌感染作物之后能够将毒性致病因子注入植物细胞。美国堪萨斯州立大学（Kansas State University）的Frank White和他的博士后Bing Yang一起发现了黄单孢菌注入植物细胞的毒力因子——转录激活因子样效应因子能够与DNA分子结合，但是他们还不知道转录激活因子样效应因子具体与哪一段DNA序列结合。2007年，德国马丁-卢瑟大学（Martin Luther University）的Ulla Bonas和Thomas Lahaye带领的科研团队进行了一系列精细而又辛苦的“启动子攻击实验（‘promoter-bashing’ experiments）”，由此逐渐探明被灯笼椒病原体所激活的植物基因的调控序列，从而揭示出转录激活因子样效应因子具体的结合部位。通过对其它能够与转录激活因子样效应因子结合（激活）的DNA序列的分析，科学家们发现了一段16bp长的转录激活因子样效应因子保守结合序列。

这是科研史上第一次发现细菌编码的蛋白能够直接激活植物基因。美国爱荷华州立大学（Iowa State University）的Adam Bogdanove对此非常感兴趣。Bogdanove的研究对象是两种水稻病原体，而每一种病原体都能编码大约20种不同的转录激活因子样效应因子蛋白。每一种病原体编码的这些蛋白都各自影响了不同的水稻基因，但是这些蛋白之间的结构却又非常的相似，只不过在蛋白的中间部位有所不同。这个有所差别的部位是一段高度重复序列，是由36个氨基酸长的肽段多次重复拼接而来。每一种转录激活因子样效应因子蛋白里的重复片段都与其它蛋白不同，但也只是中间位置的两个氨基酸残基有所差异而已，这两个残基有个专门的名字，叫做重复可变双残基。White开发了一套系统，专门用于对转录激活因子样效应因子蛋白进行分类，这套系统依据的就是这些彼此之间有差异的氨基酸残基。Bogdanove就比较习惯于根据重复可变双残基来审视不同的转录激活因子样效应因子蛋白，他注意到在灯笼椒病原体编码的转录激活因子样效应因子蛋白中，重复片段的数目大约和这个蛋白所结合的DNA碱基数相等。据Bogdanove回忆，当时他就想，不会是这么简单吧？



理学家Adam Bogdanove和美国犹他大学的生物信息学家Matt Moscou一起揭示了转录激活因子样效应物核酶是如何与基因组DNA结合的。

当时科学家们还只知道一种转录激活因子样效应因子蛋白的具体DNA结合位点，但是Bogdanove却已经发现了很多能够被转录激活因子样效应因子蛋白激活的基因的启动子序列，而且他还熟悉这些转录激活因子样效应因子蛋白的重复可变双残基信息。同时，Bogdanove还拥有一项非常特别的资源，那就是一个优秀的生物信息学智囊团，这个智囊团是美国爱荷华州立大学的一群大学在校生，他们当时出于个人兴趣和积累工作经验的需要正在从事一项小型的运算项目。

凑巧的是，这个学生智囊团的领头人Matthew Mouscou刚好和Bogdanove在同一栋大楼里办公，他的实验室就在Bogdanove的楼下。Bogdanove将他的想法告诉了Mouscou，Bogdanove认为转录激活因子样效应因子蛋白里的每一个重复可变双残基位点都能够和一个核苷酸位点结合，而且他认为这是可以通过计算机模拟技术进行验证的。他们的工作思路就是让每一个重复可变双残基都在基因启动子区域里过一遍，看看在这个区域里哪个DNA片段能够与重复可变双残基结合。一共只用了不到一个星期的时间，Bogdanove和Mouscou就找到了能够与重复可变双残基结合的植物基因启动子序列。而且他们还发现，重复可变双残基和DNA序列之间的结合区域总是维持在20个bp左右。这个结合规律已经很明确了。

与此同时，德国马丁-卢瑟大学Bonas科研团队里的Jens Boch、Sebastian Schomack以及其他一些人也在尝试探究转录激活因子样效应因子蛋白与DNA的结合机制问题。他们注意到拥有相似重复可变双残基位点的转录激活因子样效应因子蛋白都能与同样的植物基因启动子结合。只要在结合位点上有连续的核苷酸残基，那么就一定有相应的连续重复可变双残基与之对应。Boch等人利用这种关联效应找到了其它7种转录激活因子样效应因子蛋白的DNA结合位点。后来科学家们又人工为转录激活因子样效应因子蛋白设计出了相应的DNA结合序列，结果在试验中发现这段序列同样能够被转录激活因子样效应因子蛋白结合，并且激活下游的报告基因。同样，Boch他们还人工构建了一个能够结合某段DNA序列的转录激活因子样效应因子蛋白。上述实验结果说明了一个非常浅显的道理，我们可以轻而易举地设计、制造出能够与任何DNA序列结合的蛋白质。Boch指出，这项技术的应用潜力从一开始就表现得非常清楚了，为此他激动得两个晚上都没能睡着觉。

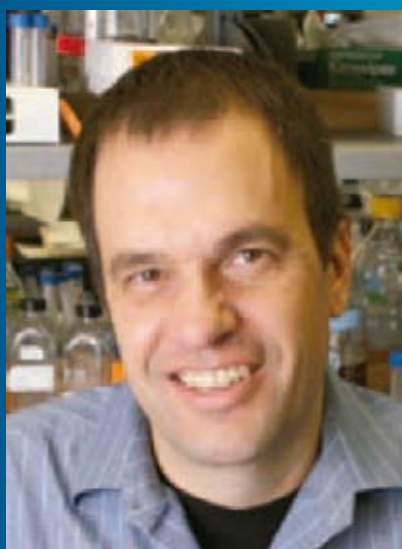


Jens Boch和Sebastian Schomack对一种植物病原体编码蛋白进行了人为改造，使其能够与预定的DNA序列相结合。

2009年，Bogdanove和Boch将他们的这项科研成果，即转录激活因子样效应因子识别并结合DNA序列的作用机制发表在《科学》（*Science*）杂志上。当时他们早就开始投入到这项科研技术的应用开发工作中了。Bogdanove和美国明尼苏达大学（University of Minnesota）的Dan Voytas展开了合作，这是因为Voytas曾经在植物锌指核酶方面做出过极富开创性的工作。Bogdanove和Voytas设计出了一种新型的转录激活

因子样效应因子蛋白，并且将其与Chandra最初挑中的FokI内切酶的酶切结构域进行了连接。由于有了Voytas的前期锌指蛋白的工作基础，所以一切用于检测DNA双链断裂的试剂和实验器材他们全都应有尽有。

Voytas一直都承受着转变科研方向给他所带来的折磨。他指出，他最开始还怀疑这个项目，自己过去一直都在辛苦地从事锌指核酶的改造工作，可是最后却要转过头来做这个。Voytas和他们实验室的其他工作人员在酵母细胞里建立了一个简单的实验系统，有了这个实验系统，只要DNA双链被切断，那么反应管里澄清的液体就会变黄。Voytas对实验结果感到非常吃惊，因为实验结果非常明显，而且重复性很高。但是Voytas还是不敢相信这个结果，他还认为这很有可能是假象。于是他们又接连换了好几个DNA结合位点重复进行了实验，但每一次都还是得到了阳性的实验结果，这下他们不得不信了。现在Voytas的实验室还在使用锌指核酶，但是据他介绍，他们实验室的工作人员却更愿意使用转录激活因子样效应因子核酶。现在，Voytas所有一年级的学生都被



美国明尼苏达大学的Dan Voytas发现，由于他前期从事了大量与锌指核酶有关的工作，所以他在设计转录激活因子样效应因子蛋白的时候觉得出奇的容易。

派去从事制备并验证基因编辑核酶的工作。**Voytas**表示，现在他的学生们只需要不到6周的时间就能得到一个核酶。但是在两年前，如果他要求学生制备锌指核酶，那么他的学生们要不就是根本不能通过验证阶段，要不就是能够通过验证，但是得到的锌指核酶根本没有作用。

3.4 人工核酶产品的出现改变了科学家们的研究方式

就在短短两年时间之内，转录激活因子样效应物核酶就已经在很多方面取代了锌指核酶的应用工作，比如对人体多潜能干细胞的修饰工作以及对大鼠、线虫和斑马鱼基因组的编辑工作等。据美国麻省中心医院（**Massachusetts General Hospital**）的**Joung**介绍，由于转录激活因子样效应物核酶非常好用，所以很多科研工作者都打算开始进行基因编辑工作。

各大生物制品公司也都积极开展转录激活因子样效应物核酶的商业化操作。美国生命科技公司（**Life Technologies**）已经从德国马丁-卢瑟大学获得了相关的技术。法国巴黎的**Collectis**公司则从美国爱荷华大学获得了相关技术，并且已经开始出售专为客户定制的转录激活因子样效应物核酶产品。甚至连曾经宣称锌指核酶是更好技术的**Sangamo**公司的首席科学官**Philip Gregory**现在也表示，他们公司的科研人员也为推动转录激活因子样效应物核酶的发展做了不少的工作，并开发出了一系列的试剂产品，并且还和科学家们合作证实，转录激活因子样效应物核酶能够对哺乳动物基因以及大鼠和人体多潜能干细胞进行编辑操作。



美国麻省中心医院的**Keith Joung**为基因编辑的核酶的设计需要开发出了一个非专利技术（**nonproprietary techniques**）——开放性代码方法。

但现在要说转录激活因子样效应物核酶已经可以大规模应用还为时尚早。锌指核酶诞生至今已经超过了十个年头，直到今年才有科学家发现了锌指核酶在基因组内的非特异性切割现象。一些前期工作表明，与锌指核酶相比，转录激活因子样效应物核酶可能特异性会更高、毒性更低，但是这还没有得到大规模的验证。**Bogdanove**则补充指出，“脱靶效应（**Off-targeting**）”也是一个不能忽视的关键问题。我们总不能在修复好一个基因的同时又破坏掉另外一个基因吧。

另外一个关键问题则是新设计的人工核酶切除**DNA**双链的效率问题，这一点对于想在同一个细胞里针对多个基因进行编辑操作（比如将一条信号通路给全部敲掉）的科学家们来说显得尤为重要。在目前这个阶段，科研工作者们还在先后发表利用转录激活因子样效应物核酶取得成功

的实验结果，并没有报道失败的案例，我们也不知道失败的频率有多大。Joung认为，由于转录激活因子样效应物核酶操作起来更加简单，所以认为锌指核酶应该被丢到一边的想法是完全错误的。他就不赞同这种观点。到最后，我们肯定是最希望使用脱靶效应最小、突变最少、成功率最高的那种技术。只要我们能够对如何更好地在胞内表达核酶以及对DNA结合序列有更好的了解，那么不论是转录激活因子样效应物核酶还是锌指核酶都会更加有价值。从这一点上来说，在预定位点进行DNA双链切割要比激活我们所需要的DNA修复机制，得到我们预期的基因编辑结果容易得多。所以其实还有很多生物学问题我们都没有研究清楚。Voytas指出，我们总是在考虑如何让核酶和外源基因、修饰物等进入细胞，可我们却从来没想过怎么样让这些分子在恰当的时机、合适的位点发挥作用。我们必须形成一个双链断裂缺口，然后插入人工模板。可是到目前为止还没有找到一个最直接有效的方法。也没有制定出一个用于某个物种的标准化的、优化的操作流程。不过情况很快会发生改变。

现在锌指核酶比较容易得到。虽然耗费的劳力比较多，但是Joung和其他一些科研人员还是非常热衷于干“义务劳动”。他们为人工设计锌指核酶开发了一种公开的、没有专利保护的方法，并且公布了操作手册、所需试剂以及设计工具等资源。第一份实验手册已经于2008年发表，恰好就在Sigma-Aldrich公司和Sangamo公司达成协议，开始锌指核酶产品项目（Sangamo公司早在2008年就已经开始在HIV病毒感染患者人群中进行了临床试验，他们现在还在开展临床项目）的几个星期以前。客户定制的锌指核酶产品一个就要价数万美元，现在Sigma公司的要价也是一个1.2万美元，非定制的锌指核酶一个6000美元。Sigma公司还出售使用锌指核酶制备的携带有某些特定突变的大鼠、小鼠和细胞系产品。虽然科研工作者们担心Sigma公司会对这些产品进行一些限制，比如不允许他们饲养或者私下馈赠给其他合作者，但他们还是购买了这些动物和细胞产品。

锌指核酶产品的出现也开始改变科学家们的研究方式。据Sigma生命科技公司（Sigma Life Sciences）功能基因组学产品经理Keith Hansen介绍，绝大多数科研工作者在开始一项科学研究的时候都没有想到开展人体基因组编辑实验，但现在，他们应该要改变这个观点了。早期锌指核酶的用户几乎全都是打算用锌指核酶对细胞系进行基因敲除操作的，但现在他们开始进行更加精细的实验操作，比如对基因进行某种遗传学修饰等。”在面对一些比较精细的科学问题时，对基因进行改造要比将其敲除更能够说明问题。最后还需要提醒一句，争论锌指核酶和转录激活因子样效应物核酶孰优孰劣其实没有多少意义，不论使用哪种核酶，它们的最大意义就在于能够让科学家们多掌握一项科研技术，能够解决更多的科学问题。



背景知识1 锌指核酶改造技术的难点分析与对策

与单个的DNA结合结构域相比，锌指核酶二聚体更加难以进行人工遗传学改造，但是最近出现的新技术将有望改变这种状况。

锌指核酶最典型的应用方式就是将两个各含有3~4个锌指结构域的人造锌指DNA结合蛋白（zinc-finger DNA-binding protein）与一个FokI核酶的酶切结构域连接起来，形成一个新的、序列特异性的核酶二聚体（图1）。这种人造核酶可以将基因组DNA双链切断，然后细胞会启动自身的双链断裂修复机制，即NHEJ或同源重组修复机制（homologous recombination, HR），以供体DNA片段为修复模板进行修复，然后我们就可以利用这种机制对细胞染色体进行定点突变操作。

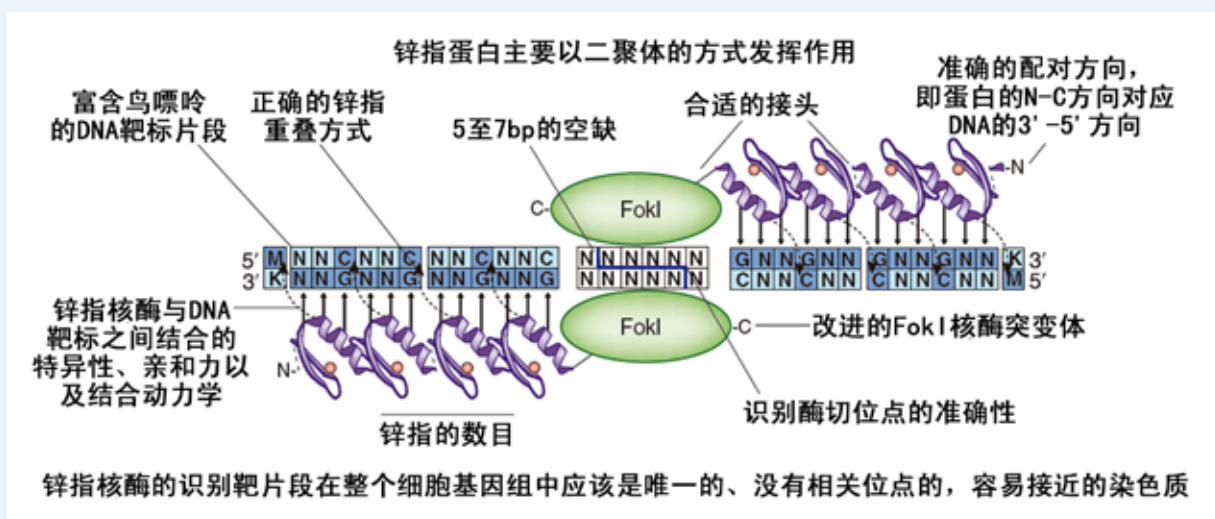


图1 提高人工锌指核酶功用的方法。图中展示的是两个各含有4个锌指结构域的锌指核酶以最典型的作用方式与靶标DNA结合时的情况，图中标明了几个主要的注意事项，DNA中以深蓝色表示的是与锌指发生结合的碱基。

尽管已经有很多研究已经证实这种方法的实用价值非常高，而且还不断有新的证据出现，但是我们却不能忽视这样一个实际问题，并不是每一个实验室都能够很轻易地构建出针对任意DNA序列的锌指核酶。到目前为止，所有利用锌指核酶技术成功开展了实验研究的实验室要不就是从Sigma-Aldrich公司等拥有大量锌指核酶资源的生物技术公司那里购买现成的锌指核酶，要不就是与其它科研单位合作，利用锌指协会（Zinc Finger Consortium）网站<http://www.zincfingers.org>上开放的工具自己人工合成的锌指

核酶。从生物公司购买定制的商业化锌指核酶产品非常贵，不过他们也提供现成的预制锌指核酶产品，但是这些核酶都是针对特定DNA序列的，所以我们就不能随心所欲地对任意DNA序列进行人工改造了。幸好锌指协会的网站上提供了一些非常方便的计算机辅助设计软件，比如ZiFiT，但是初学者使用这些工具可能还是会存在一些问题，他们即便是按照操作说明来操作在最初的一到两次设计时可能还是会失败。

对鸟嘌呤 (G) 的需求

我们在图1中已经详细介绍了为什么设计人工锌指核酶这么困难。最主要的障碍就在于我们实际上并不能够针对任意DNA序列设计出相应的锌指核酶。虽然锌指改造技术已经有了很大的进步，但是在面对富含G的DNA序列（比如Zif268: 5'-GCG(G/T)GGGCG-3'；Sp1: 5'-GGGGCGGGG-3'）时比较容易以锌指结构为

模板进行改造，并与之匹配，这绝非偶然。原作者课题组和其他一些研究单位在不富含G的DNA序列方面做了大量的工作，比如使用重叠锌指技术（overlapping finger）等，但是他们不得不承认富含G的DNA序列才是锌指结构最合适的天然结合对象。针对其它DNA序列靶标设计锌指结合结构域通常都会以失败告终，这主要基于以下两点原因。首先，蛋白与DNA之间强烈的相互作用主要发生在DNA大沟的鸟嘌呤（G）和蛋白质的精氨酸残基之间。其次，相邻锌指之间彼此交叉的接触作用会形成一个构象，在这个构象条件下，位于1号位置和3号位置的鸟嘌呤与各自锌指结合位点之间的相互结合作用最为稳定。所以对于最开始利用计算机软件进行锌指核酶设计的新手来说，选择一个富含G的DNA序列作为靶标进行练习是最佳选择。

锌指核酶对G的偏好给我们的实际应用工作带来了不小的麻烦，不能够随心所欲地对任意DNA片段进行切割，这和第二个问题有关，即构建单个的DNA结合结构域要比将两个结构域以某种恰当的方式、以适当的距离结合起来、形成一个有功能的核酶容易得多。让我们以一个1kb的基因组序列为例，要为单个锌指DNA结合结构域找到一个合适的DNA结合位点还是比较容易的，所以在近十几年来我们也都一直是这么干的。但是对于核酶而言，这种最简单的靶向序列应该是5'-MNNCNCNNCNCNCX5-7GNNGNNGNNGNNK-3'（其中M代表A、C；N代表结合碱基（最好是G），X代表非结合碱基，而K代表G和T），这是通过结构分析和各种噬菌体展示实验得出的最佳DNA结合序列。但是，锌指核酶的靶向序列最好在整个基因组中是唯一的，即没有多少相似序列，这样才能避免发生脱靶效应（off-target）。DNA结合靶标和其它无关序列之间最少应该有3个碱基以上的差异，而且同源片段应该少于2/3。

综上所述，在开始设计锌指核酶之前，就应该对靶向DNA序列进行严格的限定，最好是通过网络程序进行筛选。

缺口、接头和酶切位点的位置问题

两个锌指DNA结合蛋白结构域所识别的靶序列之间必须有一个5~7bp长的缺口(gap)，这是进行锌指核酶设计时必须考虑的另外一个限制性条件。不过，这主要取决于锌指结构域和FokI核酶结构域之间接头(linker)的长度。如果使用较长的接头，那么这个限制条件就会放宽一些，但是这样会增加结合的非特异性，让存在各种不同长度缺口的序列都能够被锌指核酶识别。多数情况下，最合适的接头应该是-LRGS⁻⁴（针对5~6bp的缺口），-QNKK⁻¹

（针对6bp的缺口）和-TGQKD-（针对7bp的缺口）。这些接头都能够和锌指蛋白末端的组氨酸以及FokI核酶起始处的QLV氨基酸残基很好地搭配。

不过锌指核酶对靶位点的挑剔也成了它的一大应用优势，这一点主要应用于在某个特定的碱基位点进行基因修饰操作。比如如果要将一段外源DNA序列插入到细胞基因组的某个基因位点，那么这段外源序列就应该被插入到由锌指核酶切开的两个同源染色体臂之间的位点处。这时定位的精度就显得非常重要了，因为被切开的染色体末端必须以

外源DNA为模板开始修复，所以不相邻的外源DNA片段的插入效率会非常低。如果要借助细胞自身的同源重组修复机制在细胞基因组中引入点突变，或者对已有的点突变进行修复，那么灵活性就可以高一些。虽然突变位点也应该靠近酶切位点，但是距离可以扩大到400bp，因为绝大部分的重组修复机制都能在这个范围内发挥作用。另外还有一点需要提醒的就是，我们可以在外源DNA质粒模板上引入几个沉默突变(silent mutation)，即突变鸟嘌呤(mutating guanines)，以防止外源DNA自身被锌指核酶降解。最后介绍的是在缺乏外源DNA模板的情况下，利用易错的NHEJ修复途径在细胞基因组中引入敲除突变(knockout mutation)。这种情况对切除位点位置的要求就更加不严格了。此时可以在编码序列片段的任意位置酶切位点，或者引入移码突变(frame-shifting mutation)，不过选择蛋白质的N末端一侧更好。

锌指蛋白文库

在锌指设计工作中一直存在的一个问题就是锌指是“反传统的”，它们是以“反向”方式与DNA片段结合的，即锌指蛋白是以N-C方向和DNA的3'-5'方向结合。因此，我们在开展锌指设计工作，或者构建锌指蛋白文库时一定要注意一点，即以3'-5'方向的思维进行设计工作。由于太过复杂，所以我们在此就不对锌指蛋白文库的构建工作进行了介绍，而会在其它地方再做具体介绍。简单来说，

构建锌指蛋白文库最大的困难就是以下这个问题，即DNA识别结构域可能发生突变的数目会很快超越我们的最大筛选能力，虽然只有5~6个氨基酸位点会发生突变。现有的几种技术主要以以下几种方式来解决这个问题，比如通过逐渐缩小结构单元的方式，找

出1~2个有效的锌指模块。虽然我们现在可以借助计算机的帮助设计锌指核酶的各个部件，但是这样得到的核酶通常都没有正常的功能。

如果锌指核酶不能发挥作用，通过体外酶切实验就能快速鉴定出究竟是1个部分（锌指部分还是核酶部分）出了问题，还是两个部分都出了问题，这样就能方便后续的改进工作。如果是两个部分都出了问题，那么最简单的方法就是重新选一个酶切靶标。但是如果只有1个部分出了问题，那就麻烦多了，此时需要构建一个小型文库，从中筛选出能够解决问题，让核酶具备功能的突变体。虽然可以使用细菌单杂交系统（bacterial one-hybrid system）或细菌双杂交系统（bacterial two-hybrid system）等方法来完成这项工作，但是我们认为如果能有商业化的试剂盒来完成这项工作就方便多了。所以我们最近就开发了一个商业化的酵母单杂交试剂盒产品。我们这款产品可以对一个小型文库进行筛选，从中挑选出最合适的锌指蛋白，挽救那些锌指蛋白部分出错的锌指核酶，让它们恢复功能。这项工作成败的关键在于文库的质量。

用于这种筛选工作的文库的大小取决于构建的锌指数目，锌指数量越多，就越难随机化，所以也就需要越大的文库。锌指链的长度也会对锌指与DNA的亲合力以及与DNA结合的相互作用动力学产生影响。锌指蛋白越长亲和力就越高，但是结合速度会降低，半衰期会长达数天。如果单纯增加锌指的数目似乎也不能提高锌指核酶的质量。比如有人对锌指核酶的脱靶效应进行过分析，结果发现如果提高结合的活化能就能提高锌指核酶与DNA靶标之间结合的特异性。有趣的是，最近有报道称拥有三至四个锌指的锌指核酶要比拥有五至六个锌指的同种核酶酶切效果更好。但是还是有文献报道用拥有5~6个锌指的锌指核酶进行试验取得满意结果的例子。这种核酶会在第二个锌指之后使用一段更长的连接序列（6个氨基酸），比如会用TGSERP取代常见的TGEKP。我们还可以使用这种不常用的连接序列将多个锌指隔开，但是在ZiFit等工具中并没有提供这种选择，所以我们不建议普通用户使用这种连接序列。最后需要提醒的是，细节决定成败这句话同样适用于锌指核酶的设计工作。

提高酶切效率

蛋白设计和文库选择不仅局限于锌指核酶的DNA结合结构域设计工作当中。近几年来，FokI核酶结构域中的异源二聚体突变（heterodimer mutation）已经成为了一种新的选择，这同样有助于避免对非靶标的同源二聚体发生“误伤”。最近出现了一种FokI核酶的“Sharkey突变体（‘Sharkey’ mutant）”。这种突变体的活性比普通的FokI核酶有很大提升。其它提高实验效率的

方法还包括用30℃休克的方法提高NHEJ修复途径的活力；换一种启动子（比如使用pPGK启动子）在细胞内表达锌指蛋白；使用可复制质粒（比如含有SV40复制起点或大T抗原的质粒）以及在锌指核酶编码质粒和外源DNA模板质粒转染细胞七天之后再利用同源重组修复机制进行基因组修饰操作等等。

最近还有人使用图2所示的巧妙方法间接提高了锌指核酶对细胞基因组的修饰作用。他们在细胞里共转染了一个附加体报告质粒。由于在这个质粒的RFP编码序列和框外GFP编码序列之间有一个锌指核酶的识别位点，这样在发生了酶切之后，GFP编码框就会因为NHEJ途径的修复作用得到回复，所以在能够表达GFP荧光蛋白的细胞里锌指核酶的作用效率也就更高。这种细胞还可以在流式细胞仪上进行分选和回收。由于在这种方法中使用的是瞬时转染方法，所以报告基因不会持续表达，最后还是留下许多没有荧光蛋白表达的细胞。因此可以重复进行多次报告质粒的转染，进一步富集阳性细胞，所以哪怕锌指核酶的效率低一点也没有关系。

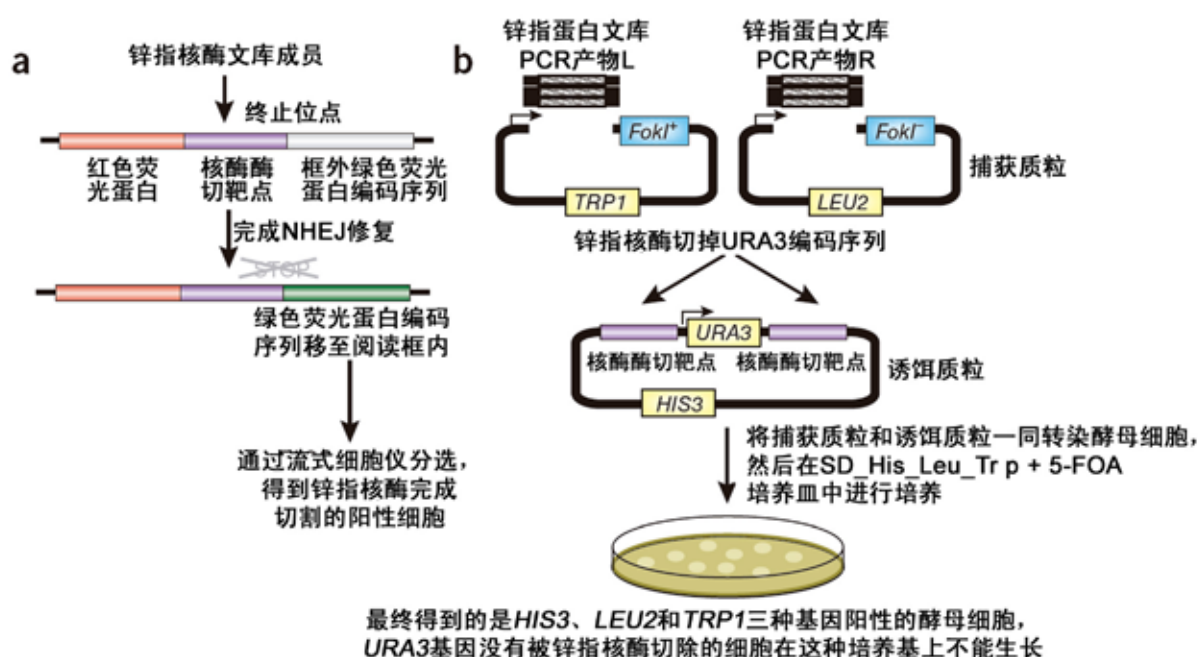


图2 对锌指核酶活性进行筛选的两种方法。(a) 图中所示的是由Kim课题组开发的技术，报告质粒上处于编码框外的GFP编码序列能够在锌指核酶作用之后移至框内，得以表达，所以可以起到一个标志物的作用，利用流式细胞仪间接地得到锌指核酶切割阳性的细胞。这种方法还可以用于在哺乳动物细胞内对锌指核酶文库进行筛选。(b) 如果在真核动物细胞里对大型文库进行筛选就可以采用这种最近开发成功的酵母单杂交系统。锌指核酶能够将诱饵质粒上的负向选择标记——URA3基因切除掉，然后用含有5-FOA的培养基筛选出锌指核酶切割阳性细胞。其中FokI⁺和FokI⁻是FokI核酶的两源二聚体突变体。

这种以真核生物为平台的锌指核酶活性筛选系统让我们能够直接在哺乳动物细胞里对任意锌指核酶文库进行筛选。只要文库的大小合适，我们就能用这种方法挽救因为锌指蛋白部分出问题而不具备活性的锌指核酶。该系统还有一大优势就是可以让研究人员在近似真实的染色质环境下进行筛选，从而避免发生核酶在体外实验和体内实验中表现不一致的问题。但是这种利用瞬时转染技术的哺乳动物筛选平台不能让我们在一个细胞里对不同的文库成员进行筛选，只能一个接一个的完成筛查工作（图2a）。

还有人设想将我们的酵母单杂交系统进行改造，用于核酶筛选（图2b）。这套系统具备以下几点优势：可以在真核染色质环境下（而非酵母细胞环境）对两种核酶的组份进行筛选；由于酵母质粒的拷贝数较低，所以可以做到一个细胞里同时转染几种文库成员；还可以利用成熟的酵母选择标志物对转染阳性、但锌指核酶切割阴性的细胞进行筛选。我们首先可以借用ZiFiT软件提供的锌指核酶为模板，然后对其DNA结合结构域进行改造，直接筛选出我们所需要的锌指核酶。在图2b中已经详细介绍了这个系统的作用原理，即利用5-氟乳清酸（5-fluoroorotic acid, 5-FOA）进行筛选，因为当尿嘧啶生物合成基因*URA3*处于活化状态时，只有有活性的锌指核酶才能将其切除，这种缺少了*URA3*基因的细胞就能够在存在5-氟乳清酸的环境下生存下来。在此我强调一点，以上这只是一个假想的实验操作，我们现在还没有具体实施这个项目，但我们很想看看利用这种配对筛选技术是不是能够降低锌指核酶设计工作的失败率。

锌指核酶未来的发展趋势

目前我们已经掌握了好几种锌指改造技术，所以如果有人认为设计锌指核酶已经不成问题也毫不奇怪。但是值得注意的是，在锌指核酶的实际工作当中依旧存在很多问题。不过我们也不应该就此气馁，因为锌指核酶的确能够给我们的科研工作带来极大的帮助，而且即便出现了更新、更好的核酶，如巨核酶（meganucleases）和转录因子样效应子核酶等也不应该将锌指核酶束之高阁。

转录因子样效应子核酶出现之后很快就受到了科研界的欢迎，最新的4.0版ZiFiT软件也已经可以进行该核酶的设计工作。转录因子样效应子核酶的出现会不会彻底解决对DNA靶标中鸟嘌呤G的偏好问题呢？这种核酶在体内反应中的特异性高吗，毒性作用大吗？又或者是不是有一天，商业化的锌指核酶产品变得非常普及，不再需要科研单位从事锌指核酶的定制工作呢？只有时间能够告诉我们答案。



2012年值得期待的技术

2011年年度技术方法的评选结果已尘埃落定，人工核酶介导的基因组编辑技术击败其它挑战者，拔得头筹。那么2012年，哪一项技术会胜出，勇夺年度技术方法的称号呢？单细胞检测技术（single-cell method）、单倍体致病突变检测技术、单层光显微技术以及RNA结构解析技术等似乎都有可能。究竟那一项技术最终会脱颖而出？让我们拭目以待吧！

1. 单细胞检测技术

单细胞分析技术主要就是为了解决细胞异质性的问题而发展起来的，不过从技术角度来看，该技术面临着许多非常棘手的难题。幸好目前科研人员们在各个问题上都取得了不错的进展，如在质谱流式细胞技术（mass cytometry）领域采用了同位素作为抗体的标记方法，取代了过去的荧光标签，极大提高了流式细胞术的多路处理能力（*Science* 332, 687–695; 2011）；在基因表达检测方面，人们则利用微流体设备（microfluidics device）进行数字化逆转录PCR（digital reverse-transcriptase PCR），该技术能够达到同时对数百个单细胞里的数百个基因的表达水平同时进行检测的目的。正如一项最近开展的肿瘤异质性（tumor heterogeneity）研究所显示的那样，利用这种PCR技术，再结合单细胞分选技术（single cell sorting）和统计聚类方法，就可以将某个组织里的细胞亚群给分离开（*Nat. Biotechnol.* 29,1120–1127; 2011）。微流体技术（microfluidics）近年来一直都是分子单体型分析（molecular haplotyping）领域里取得进展最多的一个方向，而这门技术简直就是专门为单细胞分析实验准备的。随着单细胞分析技术的应用范围越来越广，它对敏感性和通量的要求会越来越高，尤其是在分析DNA和RNA之外的生物大分子方面的要求将会更高。

2. 功能基因组学资源

由于基因测序技术和注释技术的不断发展，我们现在几乎已经完全掌握了所有的小鼠基因序列。但是我们还不知道这2万多个小鼠基因究竟能干什么。由于这件工作不是哪一个人可以独自完成的，所以在好几年以前整个小鼠研究领域的科研人员们聚到一起组成了国际基因敲除小鼠协会（International Knockout Mouse Consortium）。该协会的目标就是利用C57BL/6小鼠为每一个蛋白编码基因构建一个相应的基因突变小鼠，以及突变的胚胎干细胞和突变载体，供全世界的科学家使用。虽然这项工作还在进行

当中，但是2011年一定是他们难以忘记的一年，因为在这一年当中取得了非常大的突破。韦尔科姆基金会桑格研究所（Wellcome Trust Sanger Institute）的科学家们开发出了一种新方法，可以有条件地将小鼠等位基因给敲除掉，但是之后又可以让它们回复成野生型小鼠，接下来又可以在任何时候，将任何组织里的基因再次有选择性地给敲除掉（*Nature* 474, 337–342; 2011）。目前已经用这种技术对将近半数的小鼠基因进行了改造，另外一半的小鼠基因改造工作也正在加紧进行之中。而且有很大一部分经过这种遗传改造的C57BL/6N小鼠胚胎干细胞都是能够遗传下去的，所以就可以大量繁殖携带有这种细胞的小鼠，并进行表型分析。欧洲小鼠疾病临床中心（European Mouse Disease Clinic）等机构和国际基因敲除小鼠协会合作，利用标准的表型检测手段对这些基因敲除小鼠进行了检测，要不了多久我们就能得到这些基因的功能数据了。下一步计划就是构建基因敲除大鼠，当然也会在国际基因敲除小鼠协会之后再成立一个国际基因敲除大鼠协会（Knock Out Rat Consortium）。

3. 糖基化蛋白质组学研究方法

目前，各种研究蛋白质组学以及研究蛋白磷酸化等最简单的翻译后修饰情况的工具都已经逐渐成熟了，但是针对最广泛、最常见的翻译后修饰——糖基化修饰情况的研究工作还一直都是蛋白质组学研究工作中的一项空白。这可不是因为科学家们对这个问题不感兴趣，这只是因为科学家们手中缺少研究糖基化蛋白质组学问题的趁手工具。

所谓聚糖（glycan）是一种复杂的多糖链分子，它们不仅仅是一种储存能量的工具，同时也在蛋白质糖基化修饰过程中扮演了非常重要的生物学角色。真核细胞表面的蛋白通常都会发生非常多的糖基化修饰，这说明这种修饰作用在细胞的信号通路中、在细胞间的相互作用中以及在免疫反应过程中都具有极其重要的意义。

在研究蛋白质糖基化问题时有几个技术难题需要解决。作为一种翻译后修饰手段，糖基化修饰（glycosylation）没有序列依赖性（nontemplated）。而且和其它诸如磷酸化修饰之类的最简单的修饰方法不同，由于各种糖基在结构上千差万别，所以很难对它们进行分析。比如说一个蛋白就可以有成百上千种不同的糖基化修饰情况，结合上数千种不同的聚糖修饰物。胞内蛋白则很少发生糖基化修饰的现象，而且即便有糖基化修饰发生，结合的聚糖修饰物也不会太多。

到目前为止，糖基化研究和蛋白质组学研究还没有发生太多的交融，基本上处于各自为政的状态。从事糖基化研究工作的关注点都在聚糖的结构方面，很少关注这些聚糖都结合在哪些蛋白上，反过来从事蛋白质研究的人又非常关注蛋白质，但是又会忽视结合在上面的聚糖分子。幸好现在已经有人注意到了这种不合理的情况，也知道了这两个研究领域相互交流的重要意义。最近，有蛋白质组学研究人员报道了一种检测蛋白质糖基化修饰位点（而不是聚糖结构）的高通量检测方法。同时也有糖基化研究人员找到了如何鉴定一个蛋白上所有聚糖分子的方法，但是这种方法还不是一种高通量的检测手段。

质谱检测技术（mass spectrometry）早就是在蛋白质组学研究工作中被广泛应用的一项技术，现在发现，它也很有可能会在糖基化蛋白质组学研究工作中大放异彩。过

去我们很难对各种各样不同的蛋白质片段和聚糖分子进行测序，但是高通量的质谱分析仪和最新的裂解方法（fragmentation）却可能会派上用场。不过我们还需要能够在质谱仪之前对各种糖蛋白进行分离的技术，以及在进行质谱检测之后如何对各种复杂的数据进行分析的技术。

希望不久的将来能开发出多种高通量的糖蛋白研究手段，并且能够从检测数据中发现糖基化修饰的真正作用，但是这可能还需要等待一段时间。

4. 单倍体致病突变检测技术

高通量测序技术的快速发展已经让大家的关注重点从数据采集转移到了数据解读上面。在人类基因组测序方面，初步测序分析早就已经不成问题了，我们现在可以对单核苷酸多态性、插入或缺失等较短片段范围内的突变进行分析，甚至还可以对复杂的结构变异进行检测。但是有两个问题还一直都没有得到解决。第一个问题就是单倍体（haplotype）问题，即每个人基因组中两条染色体中的一条染色体是什么样子，尤其在缺少相关信息的时候这个问题更难解决。第二个难题就是确定所有已知突变体的功能，并且从中找出可以致病的突变。

2011年我们在单倍体问题上取得了几点突破，比如德国马普研究所（Max Planck institute）的高通量fosmid克隆测序技术（*Genome Res.*10,1672-1685;2011），以及借助微流体设备分离出单个染色体，然后进行测序分析的技术（*Nat Biotechnol.*29,51-57;2011）。这些研究都发现了很多新的基因突变，而且也提示这些突变对于今后评价它们对于人体有何影响作用具有非常重要的意义。

在单倍体上找出突变还只是第一步，我们还需要找出哪些突变对人体有害，但是这就像Gregory Cooper和Jay Shendure所说的那样，“这即便算不上是大海里捞针，也算得上是从针海里捞针”（*Nat.Rev.Genet.*12,628-640;2011）。科学家们一直都在借助计算机的帮助，从进化保守的序列、有功能的蛋白质序列及其结构信息等方面着手，希望从基因组蛋白编码序列和非编码序列中找出潜在的有害突变。但即便这种方法真的可行，我们也只能拿到潜在有害突变名单，然后还是得用大量的实验对这些突变位点进行分析和验证，看看哪些突变真的对人体有害，同时还需要建立起一套分子表型，以便对每一种突变进行功能评价。

5. 单层光显微技术

单层光显微技术（light sheet microscopy）的回归给活体细胞成像带来了新的可能性。

类似于共聚焦显微镜（confocal microscopy）或多光子显微镜（multiphoton microscopy）一类的光学断层显微技术（Optical sectioning microscopy）能够对活体生物样品进行三维成像操作。尽管这类技术已经取得了不错的发展，我们还是缺乏能够

对全细胞、组织或器官进行高分辨率、快速和大范围或长时间成像的技术。

20世纪初，德国科学家使用了一种平面照明（**planar illumination**）方法来研究胶体溶液（**colloidal solutions**），实际上他们借助的是散射光成像技术（**scattered light imaging**）。90年之后，科学家们在这种技术的基础之上发明了选择性平面照明显微镜（**selective plane illumination microscopy**），这种显微镜又被称作荧光单层光显微镜（**fluorescence light-sheet microscopy**）。

使用这种选择性平面照明显微镜时，一个非常薄的光源会从侧面照射被检样品，然后从样品上方或下方收集发射出来的荧光信号进行成像。我们可以将入射光限定在一个非常小的范围内，这样依次对整个样品进行扫描，以尽可能地减少总体的光毒性效应（**phototoxicity**）和光漂白效应（**photobleaching**），从而达到以非常快的速度和非常高的分辨率获得三维光学断层图像的目的。

平面照明显微镜可以采用单光子（**single-photon**）和双光子（**two-photon**）这两种激发模式，照射方式也可以是静止固定的、线性的或者对整个区域的。

这种显微镜技术在近几年里取得了非常不错的发展，而且随着商品化进程的加快，也逐渐开始被越来越多的人所接受。几年之前，这种平面照明显微镜在活体器官发育研究工作中的突出表现震惊了整个科研界。今年，这种显微镜的应用途径又有所拓展，已经覆盖了单个活体细胞成像的应用领域。Eric Betzig等人利用贝塞尔光束（**Bessel beams**，这是一种非常窄的无衍射光，每一束光都被强度更弱的同心圆样光线所环绕）和双光子激发方法或者有结构的照射方法对活体细胞的亚细胞结构进行了高分辨率的成像操作（*Nat. Methods* 8, 417–423; 2011）。如果结合单层照明方法和超高分辨率显微镜（**super-resolution microscopy**）甚至可以得到更高分辨率的图像（*Nat. Methods* 8, 1047–1049; 2011）。

我们希望在未来的几年之内能够看到成像速度更快、成像质量更高的新技术出现。毫无疑问，我们将来肯定会使用单层照明技术研究各种生物机能问题，而且还可以对活体生物进行深入彻底的观察，不论这个生物体有多么大或者多么小。

6. 非模式生物

新一代测序技术让所有生物都成为了遗传学及基因组学研究的对象。

模式生物（**model organism**）指的是那些能够在实验室这个人工环境里好好生长、并且能够满足遗传学均一性（**genetic uniformity**）要求、可供科学家们开展实验研究的生物。但是现有的各种模式生物还缺少很多有意义的性状，而且在用于研究进化问题和生态学问题时还存在一定的局限性。DNA测序技术的发展终于让遗传学研究的触角得以伸向各种非模式生物以及野生生物，开辟了一个令人激动的、崭新的研究领域。

有很多进化研究和生态学研究都希望能够将导致各种表型功能差异的DNA序列差异（**sequence variation**）给统一起来。而其中的关键就在于找出多个标志物，并且对多个生物个体里的这些生物标志物进行评价。有了新一代测序技术，我们就能以更快的

速度和更低的成本完成这项工作，甚至有可能通过一次实验就能达到目的。有一种以测序为基础的基因分型技术（**genotyping-by-sequencing approach**）可以在不需要参考序列的情况下找出所有的标志物。限制性酶切位点相关的DNA测序技术（**Restriction site-associated DNA sequencing**）和能够大大降低测序复杂程度的多态性序列（**polymorphic sequences**）就能够很好地说明，只有在限制性酶切位点附近的短DNA片段才会在整个基因组中广泛存在。这样形成的标志物就能够用于数量性状遗传位点（**quantitative trait locus**）作图，以及系统地理学（**phylogeography**）研究和自然种群的进化跟踪研究等工作。

上述这些研究方法都揭示出了许多非常有意思的现象背后的机制，比如适应辐射进化现象（**adaptive radiation**），即在一个种系内进化出各种不同表型的现象。针对目标基因或者候选目标基因进行测序都能发现驱动蝴蝶翅膀呈现出各种不同拟态等趋同进化（**convergent evolution**）现象背后的等位基因变异的情况。再结合转录子组装技术（**transcriptome-assembly tool**）和数字标签技术（**digital-tagging approach**）就能在没有DNA参考序列的情况下对编码基因和基因表达的改变情况进行研究。

测序成本的大幅降低以及各种高级生物信息学技术的发展已经让全基因组测序操作成为了非常常见的一项实验室工作，也让全基因组比对研究成为了可能。我们也可以对在种系发生过程（**phylogenetic**）中占据关键位置的物种进行全基因组测序，从而对整个种系的发生和发展进行更深入的研究。比如对卷柏（**spike moss**）这种最早发育出真根（**true roots**）的植物进行全基因组测序就有助于了解植物的根是如何进化、发育而来的。我们还可以借助已经被注释得非常清楚的、亲缘关系较近的生物的参考序列对非模式生物进行研究。类似于万名基因组计划（**Genome 10K Project**）一类的大规模全基因组测序项目就准备对在种系发生关系上比较相近的不同物种进行全基因组测序研究，其中就包括很多能够借助保守的基因组研究资料开展研究的物种。

很快我们还将开展种群基因组比对研究（**population genomic comparisons**），我们还非常希望在将来的某一天能够看到科学家们因为基因组测序技术的发展，能够对那些有意思的、还没有被研究过的物种开展基因组研究。

7. 光电生理学研究新进展

科学家们用遗传学改造的方法获得了能够快速、敏感检测细胞动作电位的电压传感蛋白。

所有的神经科学家们都非常清楚将一个电极插入活体细胞当中，检测细胞电位变化是有多么的困难。只有颇具天赋，极具耐心，而且受过良好训练的科研人员才能从事这项高难度的操作，可是这种人就好像熊猫一样稀少，因此他们也都是各大实验室苦苦寻觅的“至宝”。

于是有人采用电压敏感的荧光染料（**Voltage-sensitive fluorescent dyes**）来研究细胞的电位变化情况。可是虽然这种染料的确足够灵敏，反应速度也很快，足以检测神经元细胞里的单个动作电位，但是光毒性（**phototoxicity**）问题和细胞的染料掺入

问题却极大地限制了这种方法的广泛应用。所以神经科学家们一直都希望能够利用遗传学技术开发出一种足够敏感、反应速度足够快的电压传感蛋白，帮助他们开展神经电生理研究。最初的电压传感蛋白不论在反应速度还是敏感性上都比不上电压敏感的荧光染料，不能够及时反映出细胞每一个动作电位（**action potentials**）的变化情况。于是日本理化学研究所（RIKEN）的Thomas Knöpfel对这种电压传感蛋白进行了大量的改进工作。Knöpfel利用了荧光共振能量转移（**fluorescence resonance energy transfer**）技术和取自海鞘（**sea squirt**）的电压敏感的磷酸酶蛋白（**voltage-sensing phosphatase**）作为开发新型电压敏感荧光蛋白（**voltage-sensitive fluorescent protein**）的基础。最终，这种新型蛋白在体内试验中表现出了可以监测哺乳动物神经元细胞动作电位的能力，但是这种蛋白的敏感性还是不够高，所以不能监测单个动作电位（*Nat. Methods* 7, 643–649; 2010）。

美国哈佛大学的Adam Cohen团队最近利用了另外一种完全不同于海鞘电压敏感磷酸酶蛋白的蛋白，即微生物视紫红质蛋白（**microbial rhodopsins**），开发出了新型的、快速敏感的电压传感蛋白。光子传感器视紫红质蛋白（**proteorhodopsin optical proton sensor, PROPS**）是第一种人工合成的微生物视紫红质蛋白，科学家们将一个海洋细菌（**marine bacteria**）的内源荧光视紫红质蛋白经过遗传学改造之后得到了PROPS蛋白，但是这种蛋白只能用于原核生物（*Science* 333, 345–348; 2011）。在本期杂志中Cohen等人将向读者介绍如何利用古细菌视紫红质蛋白3（**Archaeorhodopsin 3, Arch**）这种受光驱动的质子泵蛋白（该蛋白以在光遗传学试验中能够让神经元细胞“安静”而著名）打造出一种新型的，可用于哺乳动物神经元细胞的电压传感蛋白（*Nat. Methods* 9, 90-95; 2012）。

古细菌视紫红质蛋白及其不具备质子泵功能的突变体古细菌视紫红质蛋白（**D95N**）能够以非常高的信噪比和极低的光毒性应用于体外培养的哺乳动物神经元细胞实验，检测到这些神经元细胞的每一个动作电位。相信只要不断加以改进，这种电压传感蛋白一定可以用于所有体内和体外的光电生理学（**optical electrophysiology**）实验研究工作。

8. RNA结构解析技术

科学家们正在开发可以准确检测RNA结构的新方法。

虽然RNA分子在最初合成的时候是线性分子，但是最后它们都会折叠成各种复杂的结构，这些结构对于RNA分子在细胞内完成各种生理功能至关重要。我们知道细胞内的RNA不仅仅能发挥模板、转运和核糖体的功能，还能发挥许多其它非常重要的功能，比如能够参与RNA剪切、端粒维持、蛋白质分泌、感知小分子以及催化各种反应等。仅仅只由A、U、G及C这四个碱基组成的RNA分子为什么就能够发挥这么多的功能呢？这一直都是科学家们非常感兴趣的一个问题。最终，大家都把目光集中到了RNA分子的结构上面。

但是RNA分子结构解析工作可没那么简单。由于很多RNA都不是保守的分子，所以我们很难通过简单的一级结构（碱基序列）同源比对的方法来预测某一个RNA分

子的功能。所以更多的人选择了对相对保守的RNA分子二级结构进行相关变异分析（**covariation analyse**），而且利用这些二级结构信息还可以借助计算机的帮助，模拟出RNA分子中有功能的三维结构模块（类似于蛋白质的结构域）。

为了解析RNA的二级结构，科学家们首先建立了几种高通量的实验手段。最近在化学方法和RNA足迹法（**RNA footprinting**）方面取得的进展已经表明可以以单个碱基水平的精确度开展高通量RNA二级结构解析工作。如果实验设计得当的话甚至还可以得到RNA的三级结构信息。

利用经典的结构生物学方法可以获得高精确度的RNA三级结构。但是所有上述这些结构解析方法都存在一个问题——处理通量不够。使用核磁共振技术（**nuclear magnetic resonance**）只能对小分子进行分析，对较大的、带负电的RNA结晶分子进行分析则比较困难。计算机模拟技术也是一个不错的选择，但这种技术只能用于比较保守的RNA结构，而且需要大量的计算机资源，并且不能够处理复杂的情况，比如用计算机模拟时不能有任何环境因素和分子间相互作用等会影响到RNA结构的因素存在等。

理论上说，单分子衍射技术（**single-molecule diffraction**）似乎是一条可行的道路，正在开发之中的高分辨率的X线自由电子激光技术（**X-ray free electron laser technology**）则看起来更加可行。大规模合作可以提高数据采集能力和数据分析能力，从而促进RNA结构预测和高保真度的结构建模工作。虽然这还需要一定的时间，但是我们肯定会迎来RNA结构解析技术成熟的那一天。

原文检索：

- Monya Baker. (2012) Gene-editing nucleases. *Nature Methods*, 9(1): 23-26.
- natalie de souza. (2012) Primer: genome editing with engineered nucleases. *Nature Methods*, 9 (1): 27.
- Moira A McMahon, Meghdad Rahdar & Matthew Porteus. (2012) Gene editing: not just for translation anymore. *Nature Methods*, 9(1): 28.
- Mark Isalan. (2012) Zinc-finger nucleases: how to play two good hands. *Nature Methods*, 9(1): 32-34.
- Natalie de Souza. (2012) Single-cell methods. *Nature Methods*, 9(1): 35.
- Allison Doerr. (2012) Glycoproteomics. *Nature Methods*, 9(1): 36.
- Nicole Rusk. (2012) Causal mutations in a haploid landscape. *Nature Methods*, 9(1): 36.
- Erika Pastrana. (2012) Imaging life with thin sheets of light. *Nature Methods*, 9(1):37.
- Tal Nawy. (2012) Non-model organisms. *Nature Methods*, 9(1):37.
- Erika Pastrana. (2012) Light-based electrophysiology. *Nature Methods*, 9(1):38.
- Petya V Krasteva. (2012) RNA structures. *Nature Methods*, 9(1):38.



YORK、筱玥/编译

OmicsLink™ 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。

热点话题

Hot Topics

抗癌新药开始选择 早期癌症患者进行临床试验

一般情况下，医生都会在晚期癌症患者中检测抗癌药物的疗效，但是现在某些医生却在早期癌症患者身上进行抗癌新药的疗效测试，也因此他们不得不面对由此而来的众多质疑声。

大约两年前的3月中旬的一个星期三，有一项不同寻常的癌症临床试验项目——I-SPY2正式启动了。项目人员正在寻找至少800名刚被确诊为高度恶性乳腺癌，同时又愿意尝试接受新技术治疗的女性患者。在手术切除肿瘤组织之前，这些患者会接受一种尚处于试验阶段的抗癌新药，并且同时搭配常规的化疗方法进行治疗。据了解，这些患者都是早期癌症患者，肿瘤细胞还没有波及到附近的淋巴结组织，但同时她们都是高度恶性的肿瘤患者，这类肿瘤的恶性程度和侵袭性都非常高，致死率高达40%。



治疗要趁早。乳腺外科医生Laura Esserman合作参与了一个研究项目。该研究主要是针对早期，但是高度恶化的乳腺癌患者。研究人员利用肿瘤组织分子标志物的表达情况，帮助她们选择相应的抗癌新药进行临床试验。

I-SPY2项目有一个非常显著的特点，那就是它肯定会引起人们的众多讨论与质疑，因为这些女性患者都处于疾病早期阶段，而且标准疗法尽管效果不理想，还是起到一定作用的。这种类型的病人通常都不是未经检验的新疗法的常规接受者。

抗癌新药的临床试验“规矩”一般都是这样的：选择那些已经走投无路、毫无选择的患者，或者是已经被疾病折磨到不堪忍受的地步的患者作为志愿者。即便实验成功了，这些人最多也就能多活6个月，有很多抗癌药物即便还达不到这么好的“疗效”，但还是会被认为是成功的抗癌新药而获准上市。实际上，根本没人想过这些志愿者可能会被彻底治愈。

开发新药是有风险的，它可能会比肿瘤组织更加致命，让患者更快死去。而且研究人员表示，在一群一只脚已经迈进鬼门关的人（指晚期癌症患者）身上检测药物的疗效会更加容易。如果肿瘤组织的体积迅速缩小，或者患者的寿命稍微延长了几个星期或者几个月，就可以看作是这款新药的功效。不过在这种规则下，那些尚处于疾病早期阶段的乳腺癌患者、黑色素瘤患者，或者肺癌患者可能会有好多年都不可能接受这种新药的治疗。

然而，随着比传统化疗药物的毒性更小的、新型的针对肿瘤分子靶标的抗癌药物的大量出现，肿瘤学家、制药公司以及药物监管部门也都开始重新思考这样一个问题，抗癌药物的临床试验规则是不是需要改一改了呢？

不过一般来说，新药都会选择那些所患肿瘤疾病为可治愈的患者进行疗效检测，这种临床试验通常都在药物的开发晚期进行，例如在研究至少已经开展了10年之后，或者这款新药已经在晚期癌症人群中进行过实验、已经获得了主管部门的批准以及可以上市销售。但是对于那些只能帮助患者将生命延长几周的新药，临床医生们已经没有太大的兴趣了。

美国德克萨斯州休斯顿市（Houston, Texas）M. D. Anderson癌症研究中心（M. D. Anderson Cancer Center）的肿瘤学家Razelle Kurzrock是该中心肿瘤治疗调查研究部门的头，他指出，我们现在已经走到了一个交叉路口，虽然可以选择仍然在末期疾病上进行投入，但结果可能徒劳无功；又或者可以对新近发现的肿瘤开展研究，当患者体内的肿瘤组织长到1厘米左右时，掌握这种肿瘤的分子学特点，并且彻底根除它。



对于肿瘤学家José Baselga而言，这种战略上的转变始于抗癌新药赫赛汀（Herceptin）。这是一种针对HER2蛋白过表达型乳腺癌患者的抗癌新药。早在20世纪90年代初，Baselga还是美国纪念斯隆-凯特林癌症中心（Memorial Sloan-Kettering Cancer Center）里的一名年轻医生，那时他已经开始为赫赛汀的开发者，美国加利福尼亚州的

Genentech公司工作了。当时Genentech公司刚好在为赫赛汀进行第一次临床试验，而他们当时选择的实验对象就是晚期乳腺癌患者。现在已经成为美国波士顿麻省综合医院（Massachusetts General Hospital, MGH）肿瘤科主任的Baselga指出，当时那款药物的应答率（response rate）只有12%，这不是一个能够让大家接受的结果，也没能从中看出赫赛汀存在什么潜力。于是Genentech公司内部展开了一场大讨论。Baselga也参加了那次讨论。当时大家的意见几乎全都是要求彻底终止这个项目。

不过，Genentech公司并没有将赫赛汀彻底扔进历史的垃圾箱，而是又给了它一个机会，开展了一个更大规模的临床试验。这一次还是选择晚期乳腺癌患者作为实验对象。随后，Baselga又开展了一次临床试验，并选择从未接受过任何治疗的乳腺癌患者作为实验对象，用赫赛汀对他们进行了首次治疗。这与以往的实验完全不一样，因为在过去，都是选择已经经历过无数次治疗的患者作为实验对象，他们只不过想最后用赫赛汀来碰碰运气。Baselga的这个实验取得了意想不到的结果，应答率居然高达40%。如果乳腺癌患者在做手术之前就使用赫赛汀，那么当医生切开患者的皮肤之后，往往会什么肿瘤组织都看不到了。现在还在与诺华制药公司（Novartis）合作，在早期乳腺癌患者人群中检测另外一款抗癌新药疗效的Baselga如此评价：这个结果对他来说就好像是在早上吵醒他的电话铃。

不过，选择尚未发生转移的早期癌症患者进行临床试验说起来容易做起来可不简单。其中最大的问题就是伦理问题，如果因为使用这些新药耽误了手术或者放射化疗的最佳时机怎么办？要知道这些患者也许使用常规的方法是完全可以被治愈的。可不能浪费任何一个拯救患者生命的机会。

黑色素瘤（Melanoma）就是最典型的一个案例。大约有75%的黑色素瘤患者在确诊时肿瘤都在皮肤上，简单的手术切除就可以彻底治愈这种疾病。但是医生们也都知道，在小部分患者中，还有一些黑色素瘤是会转移的，而且在患者体内的这些小转移灶是以目前现有的影像诊断技术根本发现不了的。所以这部分患者最终也会死于黑色素瘤，但是绝大部分黑色素瘤患者都是可以被治愈的。美国麻省综合医院的黑色素瘤专家

Keith Flaherty就曾指出，他们现在还无法判断哪部份患者体内的肿瘤发生了转移，谁又没有转移。

面对这种情况，如何判断应该在哪部份患者人群中开展新药的临床试验就得从以下这两个方面来进行风险评估：从疾病的角度来考虑，就是该病的致死率有多大；从治疗的角度来考虑，就是药物的副作用有多大。Flaherty表示，对于晚期肿瘤患者而言，他们的死亡率几乎是100%，所以考虑起来就比较简单，只需要给他们用药，看看究竟会不会有点起色就可以了。可是如果疾病的致死率只有15%，那就必须慎重考虑，最好还是安全第一。

但是如何评价风险一直是一个充满争议的问题。比如Flaherty曾经参与过临床试验的一款药物vemurafenib就是一个很好的例子。FDA在去年8月就批准可以用vemurafenib治疗黑色素瘤转移的病人或者不能手术治疗的黑色素瘤患者，vemurafenib针对的是BRAF基因突变靶点，大约有50%的黑色素瘤患者都携带这种突变。

对vemurafenib的临床试验还在继续，不过到目前为止，还没有哪个实验项目招募过可以用手术切除的早期黑色素瘤患者。原因之一就是这种BRAF突变基因抑制剂类药物存在一个明显的副作用——它们在抑制BRAF突变基因阳性的肿瘤生长的同时，却又能够促进BRAF突变基因阴性的肿瘤生长。所以接受过vemurafenib治疗的患者有时又会患上BRAF突变基因阴性的肿瘤——鳞状细胞皮肤癌（squamous cell skin cancer），幸好这种肿瘤比较容易治疗。但是，医生们仍然担心会出现一些更加不可预料的异常情况，比如vemurafenib会不会让我们患上恶性程度很高的BRAF突变基因阴性的肿瘤，比如胰腺癌？美国纪念斯隆-凯特林癌症中心的肿瘤学家David Solit就曾表示，真的应该非常小心。这些药物可能是非常危险的。Solit是专门研究vemurafenib的专家。

可是对于Flaherty而言，这些都只是数字。有一部分单纯的（没有转移等其它情况的）黑色素瘤患者的确可以用手术的方法彻底治愈，治愈率达到50%。Flaherty明确指出，这种风险是固定的，你们都知道。的确是这样的，因为在很多人体内实际上都存在潜伏的胰腺肿瘤细胞，我们现在还不知道这种药物促进胰腺癌细胞生长的能力究竟有多大。Flaherty补充：“如果我们说‘我们不愿意要让这部分患者来承担这种风险，那么这部分患者就会有50%的死亡几率。’而且我们也不可能有任何进展了。”

几个针对早期肿瘤患者开展的新药临床试验项目

肿瘤类型	病情分期	志愿者人数	给药时间
乳腺癌（I-SPY2项目）	II期和III期，高危患者	至少800人	术前给药
肺癌	I期患者	258人	术后给药
前列腺癌	未转移的，高危患者	58人	术前给药
乳腺癌（尚处于计划阶段的实验项目）	II期和III期患者	200人	术前给药



何时开始治疗

如果修改抗癌药物的临床试验规则也就意味着我们需要重新考虑该在何时开始使用这些新药。美国马里兰州巴尔的摩约翰霍普金斯大学（Johns Hopkins University in Baltimore, Maryland）的Charles Rudin是专门研究肺癌的专家，他最近就开始了一个临床试验项目，他们选择I期肺癌（即早期肺癌）患者作为志愿者，这部分患者的常规治疗方案是接受手术治疗，之后就不会再有其它的化疗治疗方案了。但是他们的肿瘤复发率会高达40%，并且最终还是会死于癌症。



早期干预的效果真的那么好吗？肺癌专家Charles Rudin最近在身患肿瘤的复发率高达40%的I期肺癌的患者中开展了一次临床试验。

去年，Rudin提交了两种实验新药的小规模临床试验报告，这两种药物都是影响肿瘤基因表达的药物。根据他们在晚期肿瘤患者人群中得到的结果来看，这些药物貌似是有效的，于是Rudin和来自其它5个肿瘤中心的医生们决定再招募258名早期肺癌患者，以查看如果将这两款药物联合使用，是不是效果会更好一些。他们将会将志愿者平均分为两组，其中一组先接受手术治疗，然后再使用试验新药进行治疗；另一组作为对照。该项目由非营利机构——“勇敢面对癌症”（Stand Up To Cancer）提供经费资助，药物则由与制药公司合作的美国国立癌症研究院（U.S. National Cancer Institute）提供。据Rudin介绍，到目前为止，临床上的情形还是所有接受了手术治疗的患者都会被医生告知要查看他们的CAT检查结果，希望手术清除得非常干净。Rudin接着指出，如果没有明确的证据表明被治疗的疾病比较容易治疗，那么就涉及到需要对结果进行判断，而不是仅仅只要观察到一个结果就行了。

由于这类肺癌患者一般都会在一年之内复发，所以Rudin会以复发时间作为一个评价指标，衡量药物的疗效。但是，据美国马萨诸塞州坎布里奇诺华制药公司生物医药研究所（Novartis Institutes for Biomedical Research）肿瘤转化医疗部门（Oncology Translational Medicine）的高级副总裁Barbara Weber介绍，乳腺癌等疾病的复发时间可能会长达5年，所以在选择乳腺癌患者作为临床试验的志愿者时实验规模会非常大，以至于实验费用会非常昂贵，这是因为需要招募足够多的志愿者，并且进行长时间的跟踪观察才能得到正确的结论。Weber表示，让一款用于治疗转移癌的新药获得批准要比让一款用于治疗非晚期肿瘤的新药获得批准快得多，因为收集转移癌治疗数据更加容易。当然每家制药公司都会选择开发获批速度更快的药物。

所以正在对分别由不同公司生产的四种抗癌新药进行临床试验的I-SPY2项目就部分出于上述原因，选择了另外一条不同的临床试验策略——在术前给药。这样做可以给我们提供更多更有价值的信息，因为手术医生在术中就可以直接通过观察肿瘤组织而得到一些信息，从而判断药物是否有效。虽然科研人员还希望在术中发现的肿瘤病灶可以更少一些，但是衡量I-SPY2项目成败的关键标准还是所谓的“病理学完全反应（pathologic complete response）”，即在术前肿瘤组织完全消失。这也正是Baselga在早期乳腺癌患者中开展赫赛汀临床试验时观察到的现象。

近期讨论得很火热的一个问题就是肿瘤在术前消失这个评价终点，或者如Rudin采用的肿瘤复发时间等指标是不是可以被看作药物有疗效的标志。

FDA也在考虑这个问题，因为各家制药公司都不愿意招募早期肿瘤患者开展新药临床试验，除非他们可以利用这些实验结果向FDA证明其药物有效。近日，FDA药物评估研究中心（Center for Drug Evaluation and Research）的主任Janet Woodcock和美国加州大学旧金山分校（University of California, San Francisco）的乳腺外科医生，同时也是I-SPY2项目的负责人Laura Esserman共同在《美国医学会杂志》（*The Journal of the American Medical Association*）上发表了一篇文章。她们认为，对于某些特定的乳腺癌，病理学完全反应的确能准确地预测疾病复发的风险，因此FDA在审批新药上市问题时也会考虑这方面的实验结果。FDA还计划制定一份指导意见，帮助各大制药厂商和科研人员在针对早期肿瘤患者开展临床试验的工作过程中选择合适的判断指标，更好地判断药物的疗效。

Esserman认为，他们过去经常只采用一种临床试验方案，但这并非就说明不能采用另外一套试验方案。而且她还表示她对患者的关心要超过任何其它事情。尽管我们现在还不能一劳永逸地彻底清除体内的肿瘤转移病灶，但是Esserman相信，如果对早期肿瘤患者进行新药临床试验，那么一定会有更多的乳腺癌患者同胞会获救，乳腺癌一定会被彻底治愈。那一天将是一个值得庆祝的日子。

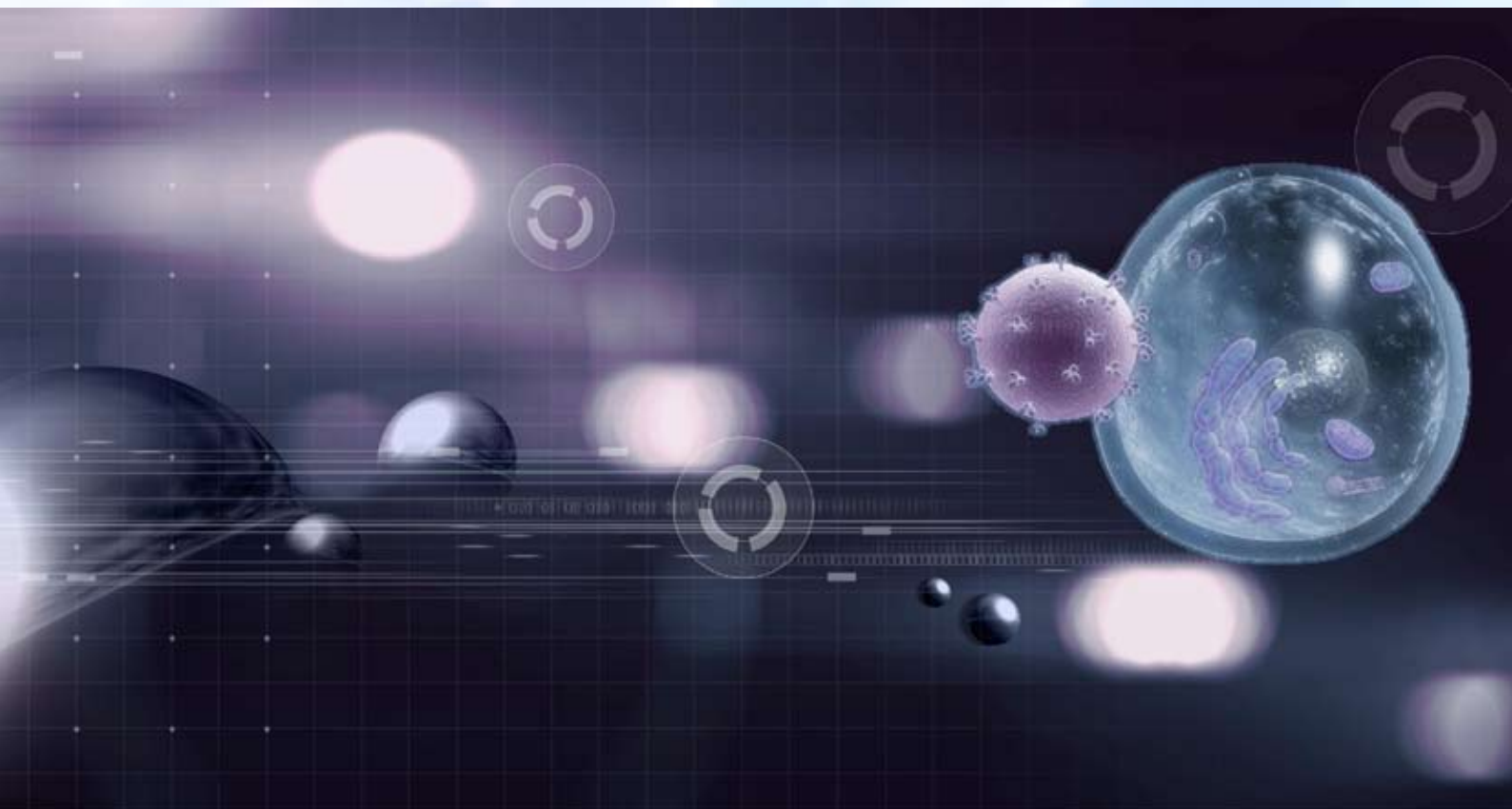
原文检索：

JENNIFER COUZIN-FRANKEL. (2012) Experimental Cancer Therapies Move to the Front Line. *Science*, 335:282-283.

 筱玥/编译

慢病毒颗粒包装服务

慢病毒质粒构建 + 病毒包装 + 质检 = **最快20个工作日**



产品优势

- ◆ 25000个人源/15000个小鼠基因，1126个人源/672个小鼠/408个大鼠miRNA，多种载体和标签可供选择
- ◆ 15000个已构建慢病毒载体人源基因表达克隆、1200个慢病毒载体miRNA前体表达克隆、1200个慢病毒载体miRNA inhibitor表达克隆
- ◆ 选择已构建好的表达克隆包装病毒，最快20个工作日即可提供病毒颗粒，病毒滴度 $>10^7$ copies/ml

应用范围

- ◆ 目的基因、miRNA的过表达与抑制表达
- ◆ 可转导大部分细胞，包括原代细胞、干细胞等难转染细胞
- ◆ 稳定细胞株筛选
- ◆ 癌症、基因组疾病等的基因治疗

孟德尔难题

在突变基因编码区之外的变异也会给孟德尔式遗传疾病（Mendelian genetic disorder）带来一系列复杂多变的临床表型。

孟德尔式遗传病，即源于单基因突变的少见临床表型，其表现形式多种多样，可以影响人体的每一个器官，甚至影响各个种族的每一个年龄段人群。这些表型的累计发生率还不到5%，这是因为这些表型都是对人体有害的表型，患病的人很少能够孕育下一代。这种突变在近几代人体内有可能会重新出现，但是有一些隐性突变（recessive mutation）却是例外，因为它们对人体的影响可能会在好几百代人中都不表现出来，一直处于隐性状态。人类基因组项目（Human Genome Project）的初期成果之一就是确定了2500多种孟德尔式遗传疾病的致病基因和致病突变。最近，全外显子组测序研究的兴起又进一步推动了孟德尔式遗传疾病的研究。但是我们不要忽略了基因调控序列，只有对这部分DNA序列进行深入研究才能够帮助我们充分认识复杂多变的孟德尔式遗传疾病表型。

最近Lee等人指出Joubert综合症（Joubert syndrome）的发病原因——两个相邻的、共用同一段顺式调控元件（cis-regulatory module）序列的基因如果任一个发生了突变，就会导致孟德尔式遗传疾病的发生。通过这个典型例子我们可以发现，科学家们对人类遗传学的研究正在逐步从只关注一个基因的研究方式向关注更大范围基因组的方式转变，现在的遗传学家已经获得了更广阔的基因组视角。

对单基因进行突变分析会带来两个问题：第一，并非所有患有同一种孟德尔式遗传疾病的患者在其基因编码区内都会出现突变；第二，即便在同一个家族当中，所有携带了同一种突变的个体受到该突变的影响程度也不是完全相同的，其中有些人甚至不会表现出任何症状。对于第一个问题，科学家们提出了各种假说加以解释，比如像Lee等人证实的那样，这种疾病可能是由其它基因出现问题导致的；也可能是由基因调控序列中的突变导致的；还有可能这种疾病根本就与基因突变没有关系，仅由环境因素导致，只不过看起来好像是一种遗传疾病而已。在一个像我们人类这样家族谱系关系非常复杂的群体中研究这类问题非常困难，因为即便这种孟德尔式遗传疾病属于单基因（monogenic）遗传病，我们也无法肯定它就只有一个致病因素（monocausal）。

对于第二个问题，要解决它的困难更大。在携带了相同突变的人群中，同一种疾病的表型不一致（phenotypic discordance），或者说疾病的外显率（disease penetrance）不固定，这很有可能是因为环境因素的不同造成的。以苯丙酮尿症（phenylketonuria）患者为例，如果对他们进行饮食控制，他们的智力就不会受到影响；但是如果对他们的饮食不加控制，他们的智力就会出现异常。但是绝大部分的不一致现象都是原始基因（primary gene）与修饰基因（modifier genes）共同作用的结果。还有一种理论认为，原始基因调控序列中的突变就足以解答上面提到的这两个问题了。

人类基因组序列的公布让我们对一小部分基因和大量的非编码保守DNA序列有了一定的了解。非编码保守DNA序列里包含了多种调控元件和序列，比如增强子（enhancer）、沉默子（silencer）、绝缘子（insulator）以及剪接位点操纵子（splice site controller）等。我们对于这些元件的具体作用、它们在各种不同组织中的分布、它们在人体不同发育阶段里起到的作用等完全都不了解，可是了解这些信息的重要性却是不言而喻的。序列变异图谱（sequence variation map）也表明，这些调控序列里的确有可能存在对人体有害的突变。虽然我们现在对与孟德尔式遗传疾病相关的非编码序列的研究还处在入门阶段，但是我们非常清楚，这些序列的作用是不容小觑的。

孟德尔式遗传病患者根据疾病的遗传模式可能会携带某个突变基因的一个或两个拷贝，这种突变基因可能是功能缺失的，也可能是获得了某种功能，还可能是属于显性负性突变基因（dominant negative mutation）的。这种基因的所有调控元件通常都会“散落”在它附近以及基因编码区内，有时还可能距离基因编码区有一定的距离。但是不论这些调控元件位于什么地方，它们都有可能发生突变，增强或者抑制正常等位基因或者突变等位基因的作用。比如，某种常染色体显性疾病（autosomal dominant disorder）患者体内会携带一个正常的野生型等位基因和一个突变的等位基因。如果与这个基因比较接近的沉默子或增强子发生了突变，那么就可能会影响野生型等位基因和突变等位基因之间的“力量平衡”，让患者表现出较其他人更明显的症状，或者较轻的症状（图1）。最终的结果取决于调控序列的作用，以及这段调控序列究竟是对野生型等位基因发挥作用还是对突变等位基因施加影响。如果突变调控序列或突变等位基因，又或者它们一起对两条同源染色体全都能够施加影响，或者突变调控序列位于无关的非同源染色体上，那么情况就会变得更加复杂。但是不论发生上述哪种情况，我们是否会表现出疾病的症状最终还是靠突变型转录体（蛋白质）和野生型转录体（蛋白质）之间的比值来决定的。比如在一个先天性巨结肠症（congenital Hirschsprung disease）家族中，这个家族成员的消化道都不能发育出正常的神经系统，但是是否会发病并不单单取决于酪氨酸激酶（tyrosine kinase）RET的编码基因是否发生了无效突变（null mutation），还会受到这个基因内含子中包含的增强子的影响。这个内含子遗传自父母，在普通人群中都会经常发生突变，但是它与RET基因是否突变无关。正如Lee等人报道的那样，在Joubert综合症患者体内，对那两个相邻致病基因的调控作用依赖的就是一套非常常见的调控元件，但是就是因为存在这套调控元件的作用，所以疾病的最终表现才会那么复杂多变。

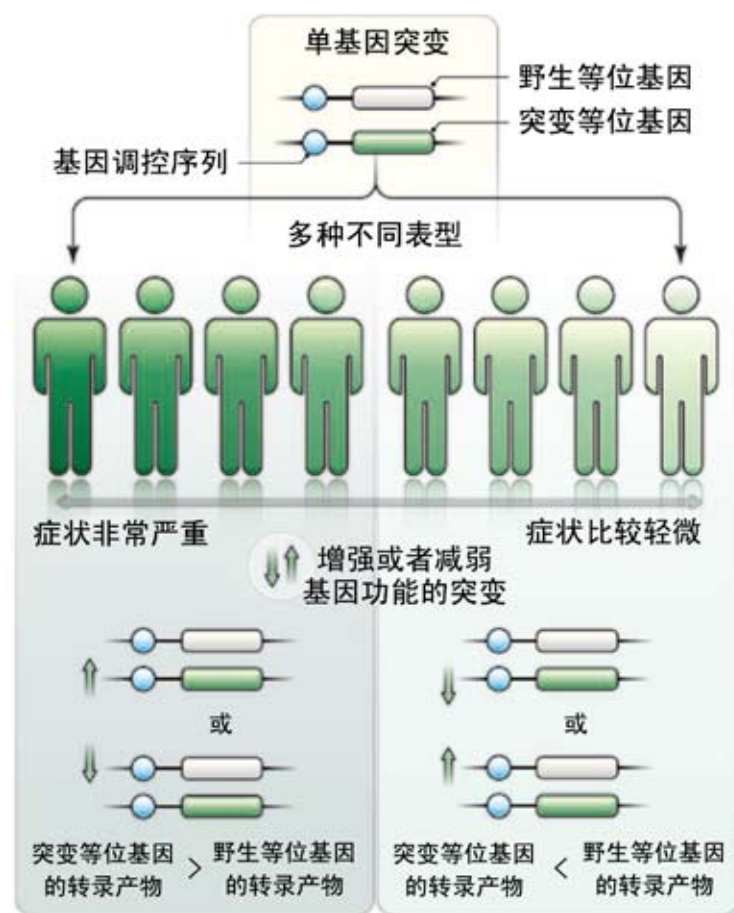


图1 出现多种不同表型的机制。每一个携带了相同突变的个体并不一定会表现出相同的表型。调控序列里的突变就会影响到突变等位基因和野生等位基因转录产物的比例，从而产生各种不同的表型。

自然选择法则（**natural selection**）是帮助我们理解这些调控元件作用的关键因素。能够去除有害编码突变的负向选择作用（**negative selection**）就是孟德尔式遗传疾病为何如此少见，可是却又会因为再次形成突变而一再反复出现的原因。但是这种自然选择作用对位于非编码区里的调控元件的作用好像不大，所以这些突变的调控元件在我们人群中非常常见。这些突变序列本身对人体的影响并不大，最多就是给我们体内的基因转录过程带来一点“噪音”，但是如果这些“噪音”再配上基因突变这个“大喇叭”，那就非常可怕了。实际上，这些局部等位基因间的相互作用非常普遍，所以才会出现普遍的多态性（**polymorphisms**）现象。罕见的编码区突变搭配上常见的调控区突变就可以形成非常复杂的遗传模式，所以才会出现前面提到的那两种奇怪的孟德尔式现象，即并不是所有患有同一种孟德尔式遗传疾病的患者在其基因编码区内都会出现突

变，和即便在同一个家族当中，所有携带了同一种突变的个体受到该突变的影响程度也不是完全相同，其中有些人甚至不会表现出任何的症状。

普通的慢性疾病也存在病情表现各异的多态性问题，对于这个问题，科学家们的主要研究方向也开始逐渐转向寻找罕见突变位点上。对孟德尔式疾病的研究也应该从对少见突变基因位点的关注慢慢转向对常见多态性问题的关注，尤其是对调控元件的关注，因为这些调控元件不论是在先天性巨结肠症这类比较罕见的疾病当中，还是在心肌梗塞（myocardial infarction）这类非常常见的疾病当中都起到了非常重要的作用。在早期曾经出现是否只应该对人类基因组中的蛋白编码区进行测序的争论，幸好大家最后意见统一，开展人类基因组项目，我们才能够对基因组中的非编码序列有所了解。现在看来这的确是一个非常明智的决定。我们现在已经非常清楚，如果要真正了解蛋白编码基因的功能，就必须了解它们调控序列的功能，只有了解了这些信息才能更清楚地认识孟德尔式遗传疾病的发病机理。

原文检索：

Aravinda Chakravarti & Ashish Kapoor. (2012) Mendelian Puzzles. *Science*, 335:930-931.

 YORK/编译

研究前沿

www.LifeOmics.com

蜜蜂如何打破 抉择的僵局



在寻找新蜂巢的时候，蜜蜂利用一种抑制性信号促使自己做出决定。

对于可能有成千上万名成员的蜜蜂蜂群来说，如何选择能够遮风避雨的家是一个重大决定。如果无法选定一个确定的落脚点，那么就会遭遇蜂群离散、蜂后被弃的悲惨命运；如果选的地方不好，就会限制蜂群的发展壮大，或者使它们不得不在寒冬腊月时分饱受寒风刺骨的煎熬。过去60年间的研究表明，蜜蜂蜂群懂得运用群体效应，即一种分散决定的方式来选择某个合适的筑巢地点，但我们对这一过程认识仍够不足。Seeley等人证明，在支持不同安家地点的蜜蜂之间存在一种抑制性信号，这样，即使有多个条件相当的筑巢地点的选项，它们也能够从中做出一个决定。

大多极富经验的工蜂会飞到外面探查合适的新筑巢点。这些侦察员们回来之后，会通过跳摇摆舞来告知蜂群自己找到的可能落脚点及其质量的好坏。跳舞时，侦查员会向营中驻扎的蜜蜂直奔而去，用其身体跳出左右摇摆的舞蹈。然后，它会停下来，接着左转或者右转，再飞一个半圈，沿此路返回原点。你可别小看这种卖命表演的摇摆舞，它的整个过程及方向都能被译为其外出飞行的路程长短和角度，而舞动圈子的数量则相应地翻译为待选窝巢点的质量情况。就这样，摇摆舞不断地吸引其它侦察工蜂到某一个地点，直至蜜蜂“选民”达到一定的群体数量，整个蜂群就会作好准备，搬到它们的新家去。不过，当侦察工蜂向同伴告知不那么具有吸引力的蜂巢地点时，就会在表演跳舞时绕较少的圈子，也很少再飞去那个地方。

根据这些不安分的侦察工蜂逐渐聚集到更具有吸引力的地方的事实，足以使人们认为这种途径能够让蜜蜂达到一定的群体数量，从而决定选择哪一个落脚点。但事实并非仅仅如此。觅食的工蜂还利用另一种信号来与其它蜜蜂进行沟通交流。当它们从供不应求的食物源返回，或者从天敌出现的地方逃回来的时候，就会发出一种简短的振动信号，阻止其它蜜蜂跳宣传那个食物源的地方的摇摆舞。**Seeley**等人假设那些外出寻找新家的蜜蜂使用一套相似的信号传递消息，然后开始观察侦察工蜂的行为。结果他们发现，这些工蜂在跳摇摆舞的返回段时，会从别的蜜蜂那儿接收“停止”的信号——此时传送信号的蜜蜂头部主要对着接收信号蜜蜂的头部和胸部（图1）。这类停止信号在侦察工蜂快要结束舞蹈之时出现得更为频繁。

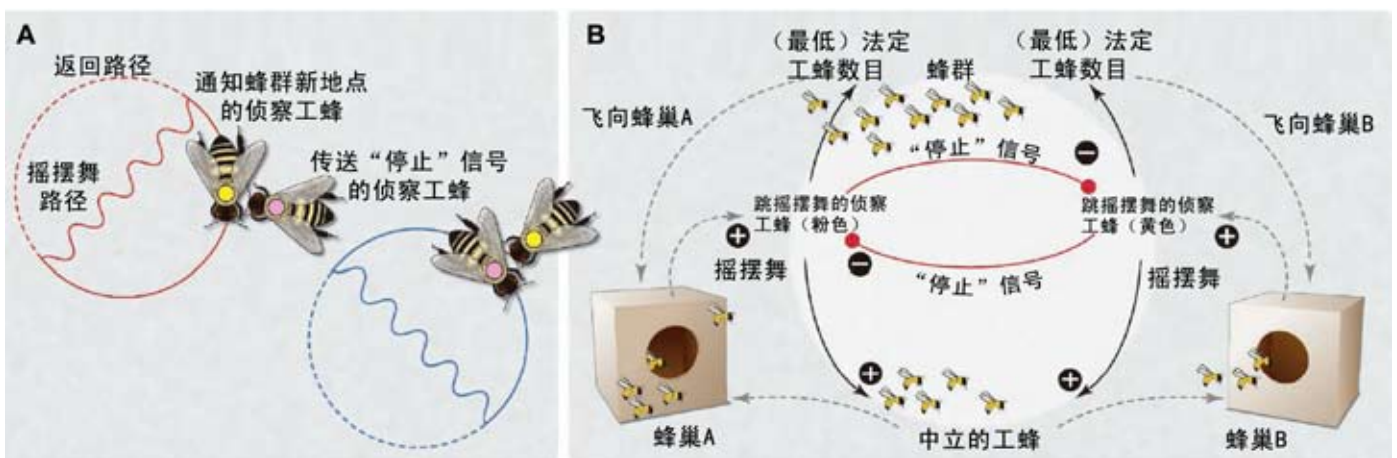


图1 A侦察工蜂之间的信号交流。**Seeley**等人发现，在寻觅蜂巢时，宣传某一筑巢地点的侦察工蜂会在蜂群决定期间优先抑制宣传另一个筑巢地点的侦察工蜂的行为。这种抑制是通过传递“停止”信号达到的，它们会在对方跳摇摆舞的返回段时主要通过接触其头部和胸部来完成。图B蜂群选择蜂巢的群体效应。左边的蜂巢A是粉色标记蜜蜂选择的地点，右边的B蜂巢则是黄色标记蜜蜂选择的地点，这些蜜蜂相互抑制对方对蜂群的宣传行为，从而使受到抑制的蜂群聚集到它们自己选择的蜂巢中，并促使中立的工蜂也聚集到它们那儿。这样，由侦察工蜂传来的停止信号抑制了其它工蜂的行为，阻止它们宣传其它潜在的筑巢点。这些抑制性停止信号再加上它们对中立态度的侦察工蜂的吸引，就能达到胜利的彼岸。

接着，论文作者在缅因的阿普尔多尔岛（**Appledore Island**）上养了一群还没有天然窝巢可以安置的蜜蜂，然后提供给它们两个一模一样的蜂巢箱让它们从中选择。他们将部分侦察工蜂拜访的一个蜂巢箱漆以黄色，而将其它工蜂拜访的另一个蜂巢箱漆以粉色。同时，他们将大多数发出“停止”信号的蜜蜂漆上相应的标志，表明它们是侦察工蜂。结果，在蜂巢地点选择过程中的决定期间，身上带有黄色标志的侦察工蜂从漆有粉色标志的侦察工蜂那儿接受到比其它蜜蜂多得多的停止信号，反之亦然。这表明，选

定某一筑巢点的侦察工蜂会倾向于阻止那些告知蜂群其它竞争窝巢的蜜蜂的舞蹈（图A）。而一旦侦察工蜂开始采取某一决定，那么正在跳舞的侦察工蜂就会从已经拜访了另一个筑巢地点的蜜蜂那儿接收到停止信号。而当研究者只给予蜂群一个蜂巢箱时，侦察工蜂就很少在决策期间收到停止信号，但会在执行搬家期间收到不少停止性信号。而这种在搬家执行期间对蜜蜂舞蹈普遍性阻止的意义很可能是使蜂群在启程搬家之时，确保所有的蜜蜂都在场的一种行为。

Seeley等人为了描述他们所观察到的“竞争宣传筑巢点的侦察工蜂间相互抑制”的作用，又构建了一个包含做出集合性决定程序的计算机模型，这是基于他们从侦察工蜂之间所观察到的相互影响规则做出来的。他们将这套模型并入了“无停止信号”和“不受限停止信号”两种情况，这意味着侦察工蜂可能会形成一种双方平衡的僵局，从而出现无法在两个同样合适的筑巢点之中选择一个的情况。只有在模型并入了足够大量的相互抑制信号之后，才意味着侦察工蜂能够快速做出同一个决定。

研究者将侦察工蜂之间的相互影响和主要负责决策网络的神经元之间的相互作用进行比较，后者能够被模型化为类似的相互作用。研究者认为，蜜蜂群体和神经元都能被视为具有相互抑制的联系，而感觉的整合缺失表明，在这种相互抑制超过某个限度的时候，就会使之产生一个决定（图B）。当然，这些特征并非只限于神经通路，还在许多生物学进程的决策方面起支持作用，比如群落类型的形成。

尽管Seeley等人只让蜜蜂在两个相同窝巢之间做出一个选择，但实际情况是，那些勤奋的找房子蜜蜂大军会去评估考察多个不同质量的地方，这是它们的特点。如此一来，就必然要求侦察工蜂能将宣传其它地方的摇摆舞和自己的区分开来，这个过程很可能是通过建立“相同”和“不同”的类别完成的，又或者，更有可能通过气味线索完成。在这种情况下，侦察工蜂可能按照它们锁定地方的质量情况来相应发出停止信号，即两者是成一定比例的。如此产生的效应与神经通路和细胞生命决策中的旁抑制很类似。旁抑制通过平衡邻近环境的生理活动，来减少内部干扰造成的效应，并对广泛范围的激发强度保持灵敏。因此，正如增强不对称性对于解决僵局问题十分关键一样，侦察工蜂产生的抑制性信号也可能对减少决策过程之初的干扰起着重要作用，并且在出现多个合适选择时，这种抑制性信号对重新审视这一过程也可能起着重要的作用。

Seeley等人的这些发现提升了与觅巢蜜蜂决策相关的信号的计算价值。蜜蜂的这种停止信号要么是应用于觅食，要么是来源于觅食，但不管如何，这种作用的功能已经发生了转变。现在，侦察工蜂利用停止信号来抑制其它蜜蜂宣传不同的筑巢地点，而对同一地点则不作阻止，这样做的原因是它们认为与别人的相比，自己所拜访的地方质量较好而非较差。因此，抑制性信号（振动头部）和刺激性信号（摇摆飞行）都能用于行为性通路（如觅食、觅巢）的建立，就如同它们在神经系统之中建立神经通路一样。研究者提出，他们下一步的研究重点是，将此计算方法与行为分析，以及神经科学、进化生物学的一些原理和思想结合起来，并从中获益。我们期待着化学反应在其中产生。

原文检索：

Jeremy E. Niven. (2012) How Honeybees Break a Decision-Making Deadlock. *Science* 335, 43-44.

 文佳编译



瓶鼻海豚（图片来源：www.hudong.com/wiki/瓶鼻海豚）

我们可能都见识过晚会上有这样的把戏，表演者吸入气球中的氦气，使他们的声音变得尖锐，产生各种有趣的效果。但是，你一定很少想到，这可以是一个相当有用的科学方法，能用于检测动物是如何发出其特征性声音的。这正是丹麦奥胡斯大学（Aarhus University）的Peter Madsen及其研究小组所完成的工作。据悉，《生物学通讯》（*Biology Letters*）在线新刊登了一篇论文，讲述了Madsen及其合作者如何用氦氧混合吸入法来检测海豚发出其特有的像口哨一样的‘鸣啸声’的机制。

海豚利用充满音调性的鸣啸声来彼此交流，但它们是如何在复杂多变的水下环境之中连贯地完成这一举动的，目前仍然不甚清楚。毕竟，它们会碰到变化范围极大的水压，在这种情况下，很可能仅凭海豚所处的水深位置就能显著改变它们发出的声音。那么海豚的号叫真的是因为空气在它们复杂的鼻系统中流动而产生的鸣啸声吗？还是由于某种振动结构所导致的呢？

我们知道，当人类说话时，声带的振动会使喉咙中的空气发生振动。而当我们呼吸氦气时，声带仍然以同样的频率振动，但因为声音在氦气中比在空气中传播的速度快，所以音色就会发生变化。音色是什么呢？它是一个描述声音质量的概念，能使我们区分不同的声音。比如，如果你分别用钢琴和单簧管以同一音量演奏同一音符，将会听到两种不同的声音，这是因为它们的音色不同。那么，我们的声音为何在吸入氦气之后变得尖锐呢？原因就是发声通道随声音传播变化而发生的共振频率的变化。这种情况下，低

频声音减弱，同时高频声音提高，因此我们听到的是有点儿像唐老鸭一样的声音。

海豚碰到的也是类似的情况。如果它们的呼号声真的是由发声通道所产生的，那么它们在水面时的声音听起来就应该是尖锐的，而在深海中就应该是浑厚洪亮的。这是因为海豚鼻子中的空气量在潜水时会减少，那么它们发声通道的共振频率就会增强。

于是，**Madsen**及其研究小组利用这种现象来测试海豚的鸣啸是否确实为真正的发音，抑或只是个误导。他们使一条海豚分别在氦氧混合气体和一般空气中发声，然后对声音进行分析并做出判断。如果这种“鸣啸”是由空气流动所产生的（真性鸣啸），那么基音的频率就会在海豚吸入氦氧混合气体时发生改变；而如果“鸣啸”是由某种振动结构产生的（非真性鸣啸），那么其频率就不会发生改变。幸运的是，早在20世纪70年代，**Sam Ridgway**和**Donald Carder**就已经记录下一种瓶鼻海豚（*Tursiops truncatus*）分别在氦氧混合气体（含80%氦气和20%氧气）和一般空气中所发出的声音。于是，研究小组决定利用这些记录分析海豚的呼号声，以找出它们是否发声的真相。

Madsen等人分析了海豚每一声呼号的音量分布，结果证明尽管海豚在氦氧混合气中鸣叫的基音频率（最低频率）能量较低，但其它的频率变化在两种情况（氦氧混合气和空气）之中却没有明显的区别。这表明，虽然海豚在音色上有一些空气效应的迹象，但其基音频率却是一致的，因此它们的“鸣啸”是由其它组织的振动所产生的。下此结论的原因是，如果声音是由真正的“鸣啸”所产生，那么研究小组应该会发现音频的改变才是。这个研究结果意味着：海豚“鸣啸”这个词在学术上用的并不正确，因为它的鸣啸并非由气体共振产生，而是由某种替代鼻子的振动结构导致的，它相当于人类及其它哺乳动物的声带。很神奇吧？

综上所述，**Madsen**等人的结果表明，海豚的声音是由其振动结构而非空气的振动所产生的。这一结论能使我们更好地理解这么一个事实，即不管所处位置的水深如何，海豚都能够毫无障碍地彼此交流信息以及识别信号。

原文检索：

Madsen, P. T., Jensen, F. H., Carder, D. and Ridgway, S. (2011). Dolphin whistles: a functional misnomer revealed by heliox breathing. *Biol. Lett.*, doi: 10.1098/rsbl.2011.0701.

 文佳编译

A group of people are standing on their shoulders to form a human pyramid. At the base, several people are visible from behind, looking up. The pyramid consists of four people standing on the shoulders of others, with one person at the very top. The background is a bright, cloudy sky with a large, glowing sun in the upper left corner, creating a lens flare effect. The overall image has a purple tint.

合办专题专刊
网站广告合作
邮件群发推广

请致电 (020) 32051255