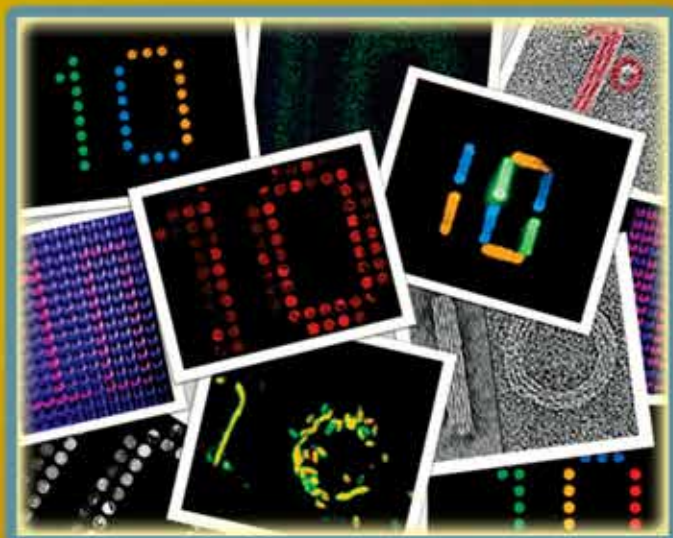


# 生命奥秘

## LifeOmics

2015年 5月刊 总第75期



## 生物技术方法的十年

- 自动化合成仪
- 蜥蜴以昼夜节律改变体色

无奇不有

生命世界

解读生命

走进科学

# 目录 | CONTENTS

## 专题

### 生物技术方法的十年

前言 .....	01
一、生物领域十大技术点评 .....	03
二、DNA测序发展史上具有决定性的十年 .....	06
三、细胞重编程技术 .....	10
四、基因组工程：下一场基因革命 .....	15
五、光遗传学：光时代到来 .....	19
六、取得跨越式发展的单分子技术 .....	25

#### 下一期（2015年6月刊）预告：肺癌

肺癌是死亡率最高的恶性肿瘤，每年导致160万人死亡，并且其五年生存率低于20%。面对如此严峻的统计数据，研究人员不断努力，试图揭开肺癌的病因，从而开发更好的疾病疗法，甚至提前预防疾病发生。下一期《生命奥秘》将介绍相关的内容。

## 热点

自动化合成仪 .....	33
--------------	----

## 百态

蜥蜴以昼夜节律改变体色 .....	42
蚊子利用生物钟调控冬季滞育期 .....	44

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*

## 生物技术方法的十年

### 前言

---

2004年至2014年经历了生物研究方法突飞猛进的快速发展期，这十年间，各个生物研究领域的进展都是突飞猛进、日新月异的。如今的生物学领域，与2004年相比，已经大不相同，这很大程度上要归功于方法及技术的大步迈进。

十年前，我们仅有一个人类参考基因组的数据，而且是采用Sanger法，并集全世界之力才获得的；如今，在高通量测序平台的帮助下，我们得到了数以千计的基因组数据，而且这个数字还将不断增加。

2004年，超解析显微镜成像技术（super-resolution microscopy）还处于开发初级

阶段，而光层照明显微镜（light-sheet microscopy）则刚刚应用于发育期的胚胎。自那时起，各类检测仪器、分析方法不断更新，更不用说令生物学家们兴奋不已的、越来越快捷、敏锐的成像技术的进展了，这些不断革新的技术不断被应用于细胞及发育生物学、神经科学等研究中。

十年前，使用质谱技术，最好的蛋白质组学研究团队，在高强度努力工作状态下，可以在一份样本中对1000至2000个蛋白质进行分析。如今，几乎可以对一份样本完成完整的蛋白组学分析——包括很多翻译后修饰——而且，不仅仅是进行鉴别分析，还包括定量。而完成这些工作所花费的精力却比十年前少得多，同时具备良好的质量控制体系。

与此同时，神经科学领域在过去的十年里还见证了光遗传学的发展。早在2004年，采用光照调节神经活性的理念就已经不是什么新鲜的命题了，但是，针对遗传编码的光敏感蛋白通道进行研究的方法，却开辟了对神经功能激活和抑制研究的新视角，并由此产生了一系列相关的研究工具。

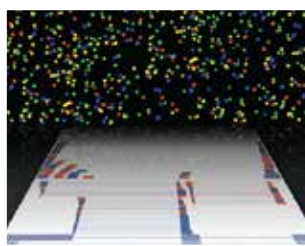
十年前，人们刚刚发现可以将体细胞重编程成“诱导性”多潜能细胞，并为之一振。现在，我们已经对细胞的可塑性有了全新的认识，对多种具有目标遗传背景的人细胞类型的研究也已经开始。由于对靶向遗传修饰的研究基金已经建立了几十年，有足够的资金支持进行相应的核酸酶设计，尤其是利用RNA引导的CRISPR-Cas9系统，可以对细胞和有机体内的基因进行灵活剪接，这一切都给研究者带来了极大的便利。

这一期《生命奥秘》将介绍过去十年间，对生物研究领域起到最重要影响的十个领域里的研究方法的进展。其中一些方法，包括其发展历史、可应用的领域，以及需要改善的方面以便发挥最大的潜能——会有更为详细的介绍。

# 一、生物领域十大技术点评

下文是对在过去十年里十个对生物学研究影响最大的方法的进展介绍。如果有兴趣，读者可访问Methagora，阅读这些领域内在*Nature Methods*上的一些文章。

## 新一代测序



新一代测序技术（Next-generation sequencing），也即大规模平行测序几乎影响了生物学领域的各个方面，它使得科学家可以对各类基因组进行测序，检测遗传变异、定量基因表达、研究表观遗传学调控、研究显微镜下的生命，而且可以相对容易地进行大量检测及筛选工作。除了技术创新所驱动的测序数据的数量与质量的不断进展，测序数据库的建立已经从曾经仅仅局限于对有限的材料或者样本进行检测，进展到可以灵活选择序列的靶向片段，对细胞内多种分子进行标记，以及对分子间的相互作用和基因组结构进行研究。同时，相关的计算机应用已经成为获得基因数据、鉴定序列变异、调控及进化过程研究中不可或缺的工具。

## 基因组工程（Genome engineering）

科学家利用基因组工程对培养细胞、以及模式和非模式有机体进行定制化改变，极大地简化了研究者敲除基因、引入突变或者对内源性基因产物进行融合的操作。在所有此类工具中，设计好的核酸酶对靶向基因组序列进行剪切，启动修复过程，最终获得想要的序列改变。核酸酶、锌指结构和转录活化因子样效应蛋白分别通过其DNA结合结构域与靶向序列结合。就在最近，成簇的、规则间隔的、短回文重复序列（CRISPR）- Cas9系统，采用RNA，而非蛋白质，靶向作用于核酶的方法，已经在研究领域获得青睐。这主要是因为设计简单，并且几乎可以改变任何基因组序列。

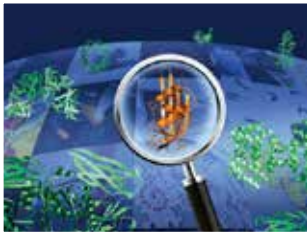


## 单分子技术



单分子技术（Single-molecule methods）被用于研究某个分子——蛋白质或DNA的功能，并以期深入了解其生物学机制，而这些信息是无法通过对普通分子性质的研究来获得的。过去十年中，一些单个分子技术已经逐步成熟。其中，包括应用力光谱学技术对分子的结合、折叠机制进行检测；此外，还可利用荧光显微镜在体外或细胞内对单个分子进行检测和跟踪。结合更新的、诸如纳米控技术，可以实现对单个分子的序列测定；光学及电浆子设备可以无需进行标记就对单个分子进行检测。这些方法共同构成了深入研究分子功能机制的根本。

## 以质谱作为基础的蛋白质组学



十年以前，以质谱为基础的蛋白质组学（Mass spectrometry-based proteomics）曾经是个相对冷僻的领域，很多细胞生物学家选择对其避而远之。但是，随着质谱仪的运行速度以及可信度的不断提高，以及在样本制备、实验设计、数据分析方面的巨大进步，质谱仪解决了许多问题，诸如数据的可重复性和全面性，这些都推动了这一领域的蓬勃发展。对细胞进行深入的蛋白质组水平的定量研究，曾经需要花费数天，而如今可以在几小时之内完成。这使得研究者可以很轻松地对蛋白质翻译后修饰，以及蛋白质之间的相互作用进行深入研究。

## 合成生物学

随着实验及计算机技术的提高，合成生物学（Synthetic biology）领域科学家们曾经的雄心壮志正在一一实现：从药物及生物燃料研发中的遗传工程微生物代谢通路，到构建合成有机体，再到为哺乳动物细胞增添新的功能等。在基因合成与装配领域的进步，已经使研究者成功获得了合成细菌基因组以及酵母染色体；对调控转录和翻译的调控元件的功能研究，有助于构建更好的通路。此外，软件的帮助也功不可没。现在，研究者们正在努力构建一个模型，可以用于预测各种模块结合在一起，会获得怎样的功能，而这也将是下一个十年里，合成生物学能够取得成功的基础。



## 光遗传学



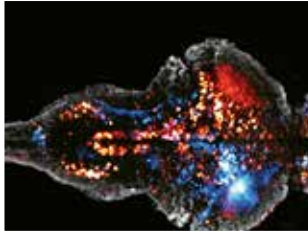
通过对外源性引入细胞的光敏蛋白进行照射，可以对细胞功能通过非侵入的方式加以改变。光遗传学（Optogenetics）工具在神经科学中格外受到青睐，可以利用其以精确的时间与空间控制，激活或者抑制神经活性。这些工具已经被用于体内和体外。例如，研究神经元集群中的某些单个细胞的功能，或者神经元冲动及突触传导等性质。此外，还可以利用光敏工具使蛋白质发生二聚化，或者激活转录。不断发现新的光敏蛋白，并对现有的进行改善，都将促进光遗传学研究工具的不断成熟与增多。同时，照明程序也在不断改进，其中，包括采用图案光源进行刺激，以及双光子激发等。

## 细胞重编程（Cellular reprogramming）

当人们发现，体内的细胞可以在一定的条件下重新获得多潜能，多个领域的研究者们都不禁产生了各样的科学联想。理论上而言，所获得的诱导性多潜能干细胞（iPSC）可以大批量制得，并且诱导形成各类型细胞，进而被用来研究正常与疾病状态的生物学性质与功能，也可用于药物筛选。由于iPSC是按照标准操作方法获得的，目前，在很多实验室，都可以制备具有特定遗传学背景的人体细胞，尽管，对大部分细胞而言，更好的细胞分化技术还在摸索中。这一发现，也引起了人们再次关注所谓的直接重编程方法，该方法采用外源性转录因子，改变体细胞的分化方向。



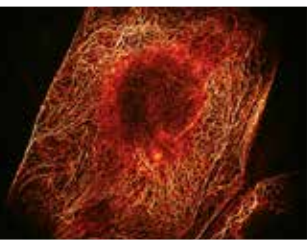
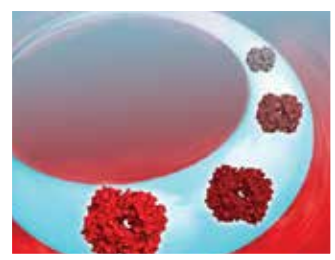
## 光片照明成像



光片照明成像（Light-sheet imaging）是一项由来已久的技术，但是最近却大有复兴之势，这很大程度上是由于各类仪器的改善提高，这些仪器包括显微镜、照相机，以及更好的荧光探针，和成像分析技术的进展。在这一方法中，样本被很薄的一层光源照射，而不是传统使用的点光源或全景照明。这意味着，生物学样本的三维整体可以被快速地、以很高的分辨率进行成像，而且受到的光毒性危害较少。神经科学及发育生物学领域的科学家，正在将面形光源成像技术应用于多种不同有机体，从而对其生物学功能，例如，胚胎发育、大脑功能等进行研究。（注：光片荧光显微技术荣膺2014年《自然-方法》年度生命科学技术，具体内容请参看《生命奥秘》2015年4月刊）。

## 结构生物学（Structural biology）

使用X射线衍射晶体分析法，对小的可溶性蛋白质的原子水平结构进行分析，已经是常规方法，这部分要归功于结构基因组学领域的研究者所做出的努力。他们一直以来都在不断优化蛋白结构研究的各个流程，从蛋白表达达到形成晶体。在这些进展的基础上，研究者们开始着手对难度很大的膜蛋白及大的蛋白质复合体结构进行研究。这些蛋白的研究难点在于难以大量获得样本，而且不易结晶。在过去十年里，该领域的进展表现在样本制备技术、蛋白结晶技术以及数据分析方法等。可供选择的新技术不断出现，如核磁共振光谱检测、单颗粒低温电子显微技术，还有X射线自由电子激光技术等，这些技术进步使得研究者们阐释那些具有挑战性的生物分子结构成为可能。



## 超解析显微技术

几个世纪以来，光学显微镜的“衍射极限”一直被视作是无法克服的：人们认为无法使用光学显微镜，对小于照射光源波长一半的物质结构进行解析。然而，在过去十年里，各类旨在打破这一“极限”的技术不断出现，并已经应用于生物学研究，它们被称为超解析显微技术（Super-resolution microscopy），或者纳米显微镜技术。这意味着，那些细胞内的微小物体——细胞器或者甚至是大分子复合体——如今都可以被有效辨别出来了，而在此之前，只能看到一片模糊。技术的进展，尤其是对超解析数据的分析能力，仍然在迅速向前，这些技术已经向科学家们展示了未来分子与细胞研究的全新图景。



## 二、DNA测序发展史上具有决定性的十年

DNA测序技术领域的革命性进展，让我们得以对成千上万种不同生物的基因组进行测序，从而对相关的知识获得全新的理解。

提及生物技术领域的重大进展，不得不说DNA和RNA测序能力的巨大提升，此类所有相关进展统称为新一代测序（NGS）。2013年，Frederick Sanger去世，他因为建立了氨基酸及核苷酸测序的方法，而两次获得诺贝尔

奖（分别在1958年和1980年），他的去世也再次让世人回顾了测序领域所发生的最新进展和重大突破。很多新的测序平台逐渐成熟，同时，也有许多测序平台被市场淘汰出局，但总体趋势是测序能力大幅提高（图1）。

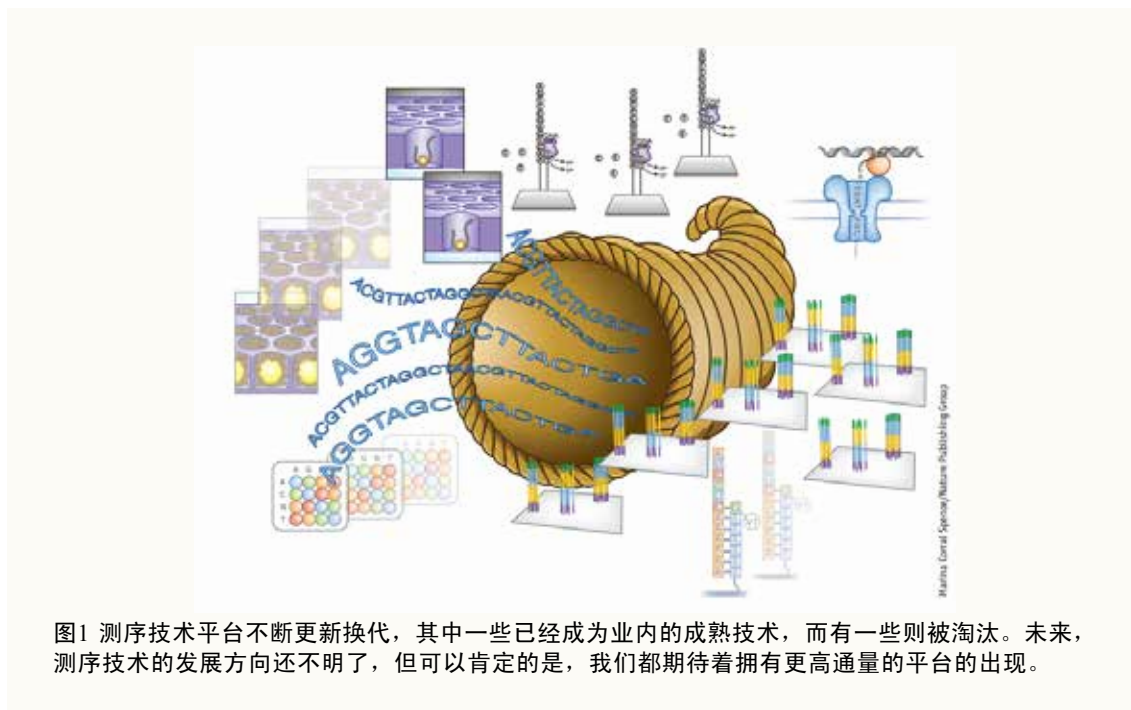


图1 测序技术平台不断更新换代，其中一些已经成为业内的成熟技术，而有一些则被淘汰。未来，测序技术的发展方向还不明了，但可以肯定的是，我们都期待着拥有更高通量的平台的出现。

多年来，Sanger DNA测序法——双脱氧核苷酸链中止法一直是DNA分析领域的主导方法。其主导地位由于引入荧光标记物得以确保，这实现了测序数据的自动收集。基于此技术的数量增长实现了全自动化的测序平台，每天的测序量可以达到500,000碱基，这也使得首个人基因组测序在不到十年里得以完成。一直以来，市场上基于Sanger

测序法的应用平台都被同一家公司主导，这家公司就是Applied Biosystems，如今隶属Life Technologies旗下，属于Thermo Fisher Scientific的一部分。而这些测序平台如今仍然是临床DNA诊断测序的主流仪器。

一个在核苷酸测序领域经常被忽略的里程碑式的进展就是大规模平行签名测序（massively parallel signature

sequencing, MPSS)的建立,该方法由Lynx Therapeutics首创,比NGS技术早五年出现。但是,相对高昂的测序成本,限制了该方法广泛的应用潜能,但它毕竟是首个非Sanger法高通量测序平台,并且也为即将到来的NGS时代做了铺垫。接下来,DNA测序前景被彻底改变,在第一个人类基因组序列发布4年后,焦磷酸测序平台问世,在4小时的运行中可完成25,000,000碱基的测序。基于此技术的454 Genome Sequencer (GS20)是首个投入市场的NGS系统,可供单个实验室研究使用(454目前属于Roche Diagnostics旗下产品)。在这一技术出现十年后,NGS领域的技术竞争日益激烈。

另一个主要方法是Solexa测序法,它采用可逆性双脱氧终结法,每次增加一个单个碱基(合成测序同步进行,sequencing-by-synthesis, SBS),对单个DNA分子扩增成簇。Solexa收购了Lynx Biotherapeutics,将其首个测序平台Genome Analyzer (GA)推向市场。GA读取序列数量惊人,可产生1 gigabase数据,但是读长过短限制了其在复杂基因组测序中的应用。Illumina收购了Solexa,对GA测序平台进行更深入的开发。在那之后不久,Applied Biosystems携SOLiD系统进入NGS市场。SOLiD系统是基于碱基连接的化学测序平台。Applied Biosystems(之后与Invitrogen合并,组成Life Technologies)与Illumina之间就此展开测序平台领域的“军备竞赛”,在序列读取长度和读取序列总数量两个重要参数上进行比拼。最终,Illumina以绝对优势赢得了这场竞赛。Illumina虽然主导当今测序市场,但并非完全没有对手。当Illumina宣布可以将基因组测序成本控制在1000美元时,意味着他们取得了终极胜利。

如今,我们可以看到DNA测序平台市场已经开始多元化,几乎每年都有新的成员进入这一领域。而可以不经扩增,直接测定单个分子序列的平台也已经出现。Helicos

Biosciences开发了功能强大的DNA显微镜——Heliscope,由于无需进行模版扩增,因而具有前所未有的测序速度和准确性。这无疑是一个伟大的成果,但是,这一技术最终没能市场竞争中胜出。这是因为当今测序市场的大方向是比拼更长的读长以及更低的测序成本,而Heliscope因其高昂的设备成本而被淘汰。Helicos Biosciences于2012年宣布破产,距其创建仅仅过去了九个年头。

Pacific Biosciences (PacBio)创建于2004年,并于2010年通过“及早通报项目”(earlyaccess program)发布了他们的单个分子测序技术,所获评价褒贬不一。这一测序技术的读长非同一般,超过4000碱基,但是伴随而来的是高达~15%的错误率。该技术对重叠序列的共同读取准确率较高,但是,在开发能够处理这些不准确的、长读取序列所需的技术方面进展很慢。此外,由于读取数目停留在几百、几千的数量级,而非百万数量级,因此,其在大基因组测序方面的应用也被限制了。而杂合测序方法的出现,可将足够长的读长,以及数量众多的、确保准确性的短读长结合起来进行测序。这些测序平台领域早期积累起来的经验促使许多公司开始进行新的测序平台的开发工作。在NGS领域,各家公司闷声埋头分别开发各自新技术的模式已然成为了这个行业的一个标志,这也是早期开发积累下来的经验,可以避免新的技术被缺乏耐心的研究领域武断地拿来与成熟技术相比较,从而导致给出并不可观的评价。

NGS的一个重要理念是,把测序从“神坛上请下来”——曾几何时,大规模测序仅仅是少数几家为人类基因组项目而建立的基因组中心才能使用,如今,人们都希望测序技术能够走进更多的实验室、研究机构及临床中心等。Ion Torrent Systems(后被Life Technologies收购)充分地践行了这一理念。2010年,该公司推出了Personal Genome Machine (PGM),这是一款真正的可放置于实验台上的测序仪,而且大部分实验室都

能够负担得起。PGC的原理是，在DNA链合成过程中，采用半导体检测由核苷酸释放的质子，从而避免了昂贵的光学元件的使用。PGM和其后来者Proton很快就大张旗鼓地宣称适用于任何测序，其中Proton甚至对外宣布人类基因组测序的成本可以降至1000美元。尽管新的测序平台实现了低成本，但是却缺少每个运行循环结果的基准。然而，无论如何，低成本测序技术还是一路向前发展，测序量不断增加。面对“低价战”，Illumina也推出了针对这一市场的仪器MiSeq。上述两个机器填补了临床上需要快速进行DNA诊断的技术空白。在NGS领域，一个引人注目的事件是Roche将于2016年年中左右关闭454的相关业务。人们大可对这一事件的缘由进行推测，但是有一点是肯定的，在这个竞争激烈的领域，各个公司比拼的是测序量的增加与更低的价格，因此，测序平台必须顺应需求不断优化，否则必然会被淘汰出局。

过去十年间，我们见证了由NGS新测序技术所推动的DNA和RNA测序领域的改变。这十年里出现了多达50多个用以描述新技术的首字母缩略词或者“MLA-seq”技术，以用于广泛的基因组测序。其中一个为RNA-seq技术，它可对转录产物进行量化和描述。该技术具有更胜一筹的动态范围、敏感性以及发现未包含在微阵列探针组内的转录产物的能力。RNA-seq极大地扩展了我们对转录组的认识，阐明了非蛋白编码转录产物的重要性。染色质免疫共沉淀测序法（Chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq）的出现，则让我们能够在整个基因组范围内进行蛋白质-DNA相互作用的定位，包括转录因子结合位点，以及与基因表达相关的组蛋白修饰模式。采用全基因组测序对亚硫酸氢盐处理过的DNA进行分析（WGBS-seq），可以实现对诸如甲基化的DNA表观遗传学修饰进行检测。所有这些方法帮助我们建立了功能性基因组元件的详尽目录，其中最好的例子就是2012年DNA元件

百科全书（Encyclopedia of DNA Elements, ENCODE）发布的30份文档，这些文档描述了超过1600个注释数据组。这一项目是在人类基因组项目完成不久之后开始的，旨在为人们提供一个可以了解DNA测序工作的平台。将来人们还需要对这些工作流程进行更多的优化，目标是能够让功能性元件检测的效率和准确性与单个碱基突变检测相媲美。

在将测序技术普及化的过程中，一种可能的改变方式是向有需要的人和机构提供可以负担得起的测序服务，而不是将测序仪器推向每一个实验室。由于Illumina和Complete Genomics之间的竞争，人类基因组测序成本已经降至5000美元以下。这一领域最新的动向来自Illumina公司推出的HiSeq X Ten，它可以把人基因组测序成本控制在1000美元，并且每年可完成多达20,000个人类基因组测序工作。这是一个十分重大的成果，它对未来大规模人类遗传及医学研究具有重要意义。癌症和肿瘤基因图谱（Cancer Genome Atlas）以及国际癌症基因组协作组（the International Cancer Genome Consortium）已经开始着手对数千个肿瘤基因组进行测序了，这能很好地帮助研究者了解肿瘤的致病机制，但是，肿瘤异质性的特点也不可避免地需要研究者进行进一步的测序工作。对来自不同环境的微生物的检测，可以让我们看到有机体多样性的存在。这些微生物或者是与我们共存，或者是正生存于我们体内，因此，它们与我们的健康和疾病是息息相关的。想要实现全面的以DNA为基础的诊断，以及基于此的治疗，需要进一步扩大测序规模，进一步削减测序成本。

此外，除了人基因组测序之外的领域，还有许多不同的检测和分析需求，因此也就需要能够满足更加多元化的研究需求的系统。尽管NGS领域一直被Illumina一统天下，但还是呈现出一些变化，并且能够容纳新的平台技术，以便让多样化的应用平台进入市场，为小众群体提供选择。目前已经出现了基于蛋白质

及半导体纳米孔的技术，可以进行超乎寻常序列长度的读取工作。Oxford Nanopore是首个推出这一系统的公司，其读长、准确性以及测序量都引起了人们的关注。该技术似乎极具前景，但是也还没有达到能够给测序领域带来颠覆性改变的程度。总之，测序技术的未来之路将走向何方是难以预测的，但是有一点是肯定的，从以模版引导的DNA复制方法为基础的测序，向更加直接的对待测分子进行检测的转变，是极有可能的。

测序能力的提高使得基因组分析领域的瓶颈问题发生了改变。未来测序容量之大，意味着需要数量超乎想象的DNA和RNA样本，并且需要确保是采用正确的方法收集获得的，并且已经征得相关人员的同意。事实上，从大量不同组织类型的样本中提取分析物，并正确储藏，并非易事。对于每个样本检测所获得的大量数据，已经给我们的基础设备及分析流程提出了挑战。针对目前的测序平台，还有许多需要改善的方面，例如提高与基因组参照序列进行比对的速度，以及提高对核苷酸替换或大片段发生改变的检测的准确性。基因组装配相较于参考比对更有优越性，但是还难以应用于大型基因组。想要获得基因组测序全面的技术优势，需要大幅提高对编码基因变异体和非编码元件的功能性进行预测的能力。随着通过MLA-seq进行以测序为基础的基因组特征分

析的种类不断增多，以及在疾病中这些特征的重要性被揭示，会使得这一过程更加繁复。

过去十年间，在DNA测序技术领域发生了翻天覆地的变化，完全可以称得上是一场革命。在此期间，各种不断涌现和提高的技术平台在各类综述中被详细叙述。NGS领域的成功，从发表文献中的引用数量就可见一斑（在PubMed中，用“next generation sequencing”关键词进行搜索，搜索范围为标题及摘要，搜索出的结果>6300）。逐渐降低的成本及增加的测序通量，让我们能够对很多不同种类的样本进行深入的基因组测序。就如同光学显微镜所带来的进展一样，测序技术的进步，让我们可以持续、深入地了解这一研究领域，也为我们提出了更多的问题，而不只是给出一个笼统的答案。测序领域的未来十年一定具有极大的发展潜力，但是，和过去的十年一样，其具体的方向很难预测。如果继续沿着目前的轨道向前发展，那么，我们要问的问题，恐怕要从我们是否能够实现对自己的基因组进行测序，转变成何时可以实现这一目标了。测序领域的局限性主要有以下几点：对成本更低的测序技术的突破，海量数据的合理诠释以及对非编码DNA的有效利用问题，以及如何获得许可，使用某个靶点基因或者全基因组数据——这都是下一代测序技术发展过程中必然要面对的问题。

### 三、细胞重编程技术

将体细胞转变成诱导性多潜能干细胞的研究，帮助我们在进一步了解疾病发生、发展及致病机制，以便寻找细胞治疗方法方面，具有不容忽视的巨大潜力。然而想要实现这些目标，研究人员必须扩展以下领域的知识：动物模型构建方法、对驱动细胞重编程的基本机制的定量描述。

自诱导性多潜能干细胞（iPSC）技术被首次报道以来，细胞重编程研究领域涌现了大量的研究成果。iPSC之所以受到科学家如此青睐，很大程度归因于多潜能细胞的独特性质：增殖与分化同时进行的潜能。如果能够阐明并学会控制驱动这些功能的机制，那么无论对基础研究，还是临床研究都意义重大。从事基础研究的科学家，希望能够藉此揭示单个细胞如何最终形成一个具有完整功能的机体；而在临床科学领域，人们则一直希望能够对疾病发病机制进行透彻研究，从而寻找基于细胞重编程的治疗方法。由于iPSC可以来源于任何

一个特定的人，可以是健康人，也可以是患者，所以，这就为研究提供了全新的、基本没有任何限制的细胞来源，以用于构建人类疾病模型，并在相关细胞类型上进行药物试验。

一种常见的对细胞的演进过程的描述是：具有多能分化潜能的细胞，犹如坐在山顶，在细胞信号网络所带来的“重力”作用下，向山下运动，直到达到自身最终的分化状态（图1）。因此，在细胞重编程领域，人们面临着双重的挑战：科学家需要将已分化细胞重新转化为多潜能状态，因此，也就同样需要沉默那些会驱动细胞重返分化状态的因子。

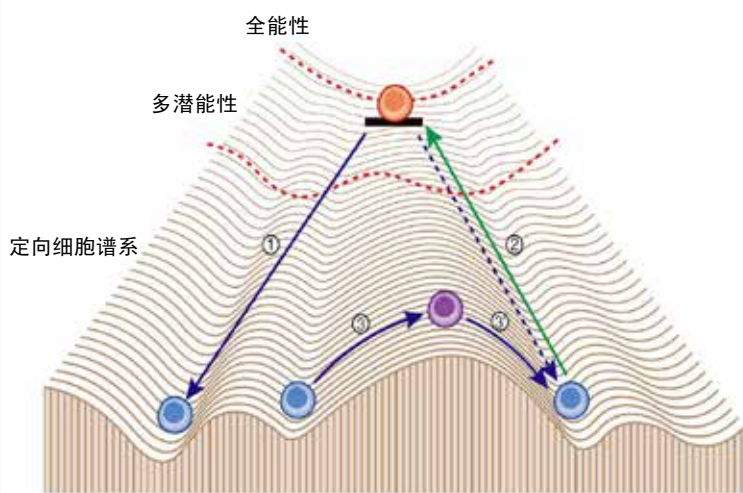


图1 处于多潜能状态的细胞可以被看作是处于山顶之上的球，它被各种信号驱使，从山顶滚下，进入到特定的分化状态。通过细胞重编程，细胞进入多潜能状态，包括将其拉回山顶，与此同时，使各种会驱使其滚下山顶的信号失活。①表示细胞分化过程；②表示在分化后，细胞重回多潜能状态。③和④则演示了直接重编程过程，已分化细胞被转化成比多潜能状态更进一步的状态③，然后分化形成特定类型的细胞④。

细胞重编程技术的发展，是建立在很多关键科学进展的基础之上的。本文将对其中一些重大发现予以简要的概括。对两栖类及哺乳类动物在核转移方面的研究结果证实了体细胞含有所有驱动细胞发育形成完整有机体所需要的遗传信息。研究者还发现了调控细胞向某个方向发展的主要转录因子，这也具有十分重要的意义。上述两项发现，再加上构建了可以使胚胎干细胞（ESC）长时间存活和培养条件，对鉴定以下四个转录因子——Oct3/4、Sox2、Klf4和c-Myc(OSKM)，起到了关键的作用。这四个转录因子可以将体细胞重编程为iPSC。

起初人们通过将携带OSKM的逆转录病毒植入细胞，以实现细胞重编程，但现在，研究者已经可以使逆转录病毒携带各种不同组合的转录因子了，这就使得重编程过程包含各种复杂的动态及状态转化。只有细胞达到理想的状态，才会启动重编程过程。但是，这个理想状态是动态的，当有重编程过程介入时，细胞会据此转化成不同的状态，由此形成的具有异质性的细胞，会导致一系列不良结果，这其中包括基因突变、重编程效率低下等。iPSC技术若想进入临床应用，就得考虑采用无需逆转录病毒辅助的替代方法。

由此，一系列旨在规避上述问题的第二代细胞重编程方法应运而生，其中不乏一些具有更高安全性的方法。逆转录技术之所以受到研究界的欢迎，是由于其具有显著的可重复性，并且操作简单，这也是目前我们还在体外实验中使用这些方法的原因。但是，对于再生医学研究来说，我们的首选方法是使用游离型质粒。其它方法还包括使用腺病毒、Sendai病毒、合成蛋白质以及RNA。然而，尽管这些方法更加安全，也更适用于人体研究，但对技术要求却很高，而且完全没能解决细胞重编程效率低的问题。最近基于第二代重编程方法的其中一个成功的例子，就是在重编程中仅仅使用小分子。这一结果表明，仅仅靶向针对间接参与维持细胞多潜能状态的分子路径就足够

了。

对这些间接路径方法的研究，有助于细胞重编程的另一个层面的技术创新：寻找阻止已经具备多潜能分化能力的重编程细胞重返已分化状态的技术。研究人员已经发现，多潜能细胞和已分化细胞在DNA甲基化以及组蛋白乙酰化方面均存在差异。此外，靶向针对表观遗传学机制的小分子有利于提高重编程的速率与效率。靶向针对表观遗传因子，也有可能减少往往会在重编程细胞内出现的克隆变异：一些iPSC克隆比其它克隆具有更强的倾向性，能分化成为某些特定的种系。总之，表观遗传学因子可能是细胞重编程中一个可以避免的结果，这表明，我们应该给予这些因子足够的重视，以便提高重编程的效率。

iPSC的多潜能性意味着，我们可以获得任何想要的细胞类型。但是，也许正是因为这个潜能太大了，科学家们需要在此过程中对多种因子加以控制，以确保iPSC可以分化形成我们预期的细胞类型。特定克隆的种系偏差意味着，将iPSC诱导形成与其起源不同的细胞种系并不是一件容易的事情。尤其在医学应用中，更好的选择也许是阻止细胞从已分化状态回复到更低级状态。为实现此目的而采取的策略与制备iPSC相似，而且已经被应用于制备多种类型的重编程细胞。事实上，研究者已经在无需细胞进入完全未分化多潜能的状态下实现了体细胞的重编程，甚至在某些情况下，只需使用一个外源性的转录因子就足够了。值得注意的是，与iPSC合成法相比，这种所谓的直接重编程方法只需较少的基因组改变，这也许正是该方法更加高效的原因。因此，更多的细胞可以被重编程成所需的细胞类型，使得直接重编程法在疾病模型构建领域更为研究者所青睐。

与其它生物学研究领域一样，细胞重编程的最初突破也是通过体外实验实现的。但是越来越多的研究表明，重编程可以在体内进行，且效率超过体外重编程。其中一个令学界为之兴奋的研究是由Abad等人进行的。

Abad通过将OSKM引入转基因小鼠，成功利用多种组织实现了细胞重编程。他们发现，iPSC在体内可以达到的全能性超越了体外。更多的分析表明，这些体内获得的iPSC在转录组水平与桑葚胚的相同之处多于它与胚胎干细胞（ESC）的相同之处，这也可能是其处于更加原始状态的原因。这一结果提醒我们对转基因动物体内的重编程细胞进行检测的重要性，因为iPSC在培养基和在有机体内的环境是不同的。此外，只要重编程及分化技术能够完善，体外产生的iPSC更适合作为制备不同类型细胞的工具，但是，为了了解机体发育及疾病发生的过程，在动物模型内进行细胞重编程，也许更能够给我们提供有价值的帮助，因为机体内所具有的周边细胞构造（培养基中细胞不具有周边细胞构造）可能会间接影响细胞的分化。

细胞环境所具有的影响超越了基因组范畴，这也是为何大规模或者“组学”数据可能会影响细胞重编程未来的原因。尽管我们认为iPSC和ESC功能上似乎是一样的，但对此仍然存在争议：对转录组学、蛋白组学及表观遗传组学水平的进一步分析可以帮助我们找到问题的答案。此外，对单个细胞同时进行多个“组学水平”的检测，能帮助我们判断经不同重编程方法，或不同重编程细胞类型，甚至是体内和体外重编程方法所获得的基本组件的差异。

这一领域一直缺少一个定量数据。除了重编程研究，研究者一直想要用数学方法描述细胞的分子特性。因为在细胞内，基因、蛋白质和其它细胞组成部分不可避免地一定量的背景噪音下运转，这对我们在细胞重编程中观察到的各类变异具有重要的意义。体细胞与生俱来的异质性，对报道中产生的不同的重编程速率带来的影响，可能超过了因为使用不同方法所带来的变化。如果能够对细胞异质性进行定量描述，将有助于我们根据不同的应用需求，选择最合适的细胞。

Buganim等人采用两种状态的模型描述了

在细胞重编程中异质性的基础。在第一种状态下，OSKM转基因激活一系列随机事件。当这些事件达到“合适”的条件，细胞则转变成第二个状态，其中包括确定性的基因表达。在后一种状态下，转基因被沉默，细胞重新进入多潜能状态。在这一模型中，获得活化和沉默重编程转基因之间的平衡，是细胞重编程低效率的一个主要原因。活化或者沉默这些因子，可以极大地提高重编程速率。“组学”数据研究将毫无疑问地深化我们对这些因子的认识。最终，明确重编程中哪些是必需的因素，哪些不是必需因素，这样可以帮助我们解释为何某些转录因子的组合，或者其它分子组合，在某一细胞类型中高效运行，而在另一些细胞类型中则相反。

上述形成的基本认识，还能帮助我们与细胞动态进行同步，从而使大部分细胞在引入转基因时，处于重编程的最佳状态。之前的研究已经表明，重编程动力学被尽可能少的限速步骤所调节。在此基础上，通过消耗组蛋白去乙酰化的抑制因子，可以使体外重组达到近100%的效率。引入OSKM转基因，也有可能刺激细胞内某些生物学进程，例如甲基化，这对维持内环境稳态具有重要的作用。进行这些细胞动力学研究，定量技术具有特别的优越性。尽管FACS和Raman spectroscopy等技术在细胞重编程领域的应用才刚刚开始，但是可以确定这些技术在这一领域内具有很好的应用前景。

在公众眼里，细胞重编程领域最令人兴奋的成就就是能够构建疾病模型，从而提高医疗水平。例如，患有神经退行性病变的患者可能能够通过多潜能细胞获得通常难以从患者自身得到的神经元，神经元是比其它细胞更加高级的细胞。目前，最适合采用细胞重编程方法进行研究的疾病，是那些由于基因突变所导致的疾病。因为，可以通过细胞重编程，对表观基因组进行改造。尽管有证据表明，那些由更复杂的基因组改变所导致的疾病也可以用iPSC技术进行研究，但目前的模型还不足以对由于

异常细胞网络或动力学所导致的疾病进行研究。

细胞重编程技术在今后的科学研究领域将迎来光明的前景和机遇。自从iPSC被首次报道起，关于此的新的进展与技术不断涌现，所发表文章的数量和速度也是有目共睹的。然而，尽管目前的技术已经为我们提供了深入了解许多生物学过程、疾病发展的可能，但仍然

局限于相对简单的系统上。对于由更加复杂的生物学网络、动力学因素参与的疾病、生物学现象等，我们还需要开发能够对各元件之间的相互作用，或者转基因动物内各类相互作用之间进行定量描述的技术平台。这些方法的开发将有助于深化我们对重编程机制的认识，并帮助我们实现该领域的更高的目标。



# 资讯 · 频道

[www.LifeOmics.com](http://www.LifeOmics.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](mailto:editor@lifeomics.com)

## 四、基因组工程：下一场基因革命

基因组工程技术经过长达十年的发展，已经能够使科学家任意地编辑基因组序列了，就如同程序员编辑计算机代码那样轻而易举；科学家们将会越来越多地应用这些能够精确控制基因组结构和功能的技术。

在过去15年的基因革命的推动下，科学、技术和医学领域取得了巨大进展。2001年首次公布的人类基因组测序结果，以及其他很多物种的基因组测序结果为我们提供了一张DNA清单，而细胞正是利用这些DNA来行使生命所必需的众多功能。随后遗传学和基因组学领域继续深入发展，进一步明确了这些DNA是如何被组织起来的，它们在疾病状态与健康状态时是如何变化的。

尽管我们获得了如此丰富且价值连城的信息，但是这些数据基本上只告诉我们：基因组中存在哪些DNA。我们还需要利用一些特殊的工具来深入基因组内部，单独控制每个DNA，就像工程师利用工具来控制计算机内的电路或软件程序中的代码那样。但是如果没有任何工具的话，我们就不可能清楚地解读基因组中每个DNA发挥功能的方式。我们对基因代码的操控能力就如同计算机程序一样，能够确定特殊代码的功能、创建新代码或修复有问题的代码。传统的基因工程方法通常只能用于添加新的DNA片段，而无法控制这些DNA片段在细胞内的去向，因此研究者无法在自然环境下利用这些方法对特定的DNA序列进行编辑。

1991年，研究者发现了锌指蛋白ZIF268的晶体结构——这项具有根本意义的科技突破

表明：我们可能能够从数以亿计的、复杂基因组内的碱基对中定位一些特定的DNA序列。随后，研究者发现了这种DNA结合蛋白是如何靶向于特定DNA序列的（图1a），而这一发现表明：通过改变锌指蛋白上关键的氨基酸残基，能够使锌指蛋白靶向于新的DNA序列。实际上，这标志着研究者开启了一个全新的研究领域——经过设计的合成性锌指蛋白。将FokI核酸内切酶的催化结构域融合到这些DNA结合蛋白中，形成锌指核酸酶（zinc-finger nuclease, ZFN），而ZFN可能能够靶向于研究者感兴趣的任何DNA序列。由于基因组内被靶向的双链DNA断裂点能够用来控制DNA修复的结果，并且能促进基因的靶向（图1b），因此ZFN这种合成蛋白促进了基因组编辑领域的诞生。

2005年，研究者利用ZFN介导的基因组编辑技术矫正了可引发人类疾病的基因突变。这一成就具有里程碑意义：研究者首次将基因组编辑技术应用于科学领域和医学领域。在随后的十年里，研究者做出了大量的改革，提高了ZFN的实用性，但是由于存在着技术上的挑战，并且ZFN与可靶向于新DNA位点的改良性锌指蛋白之间仅存在着细微的差别，因此专家们将ZFN的应用范围只局限在基因组编辑领域。

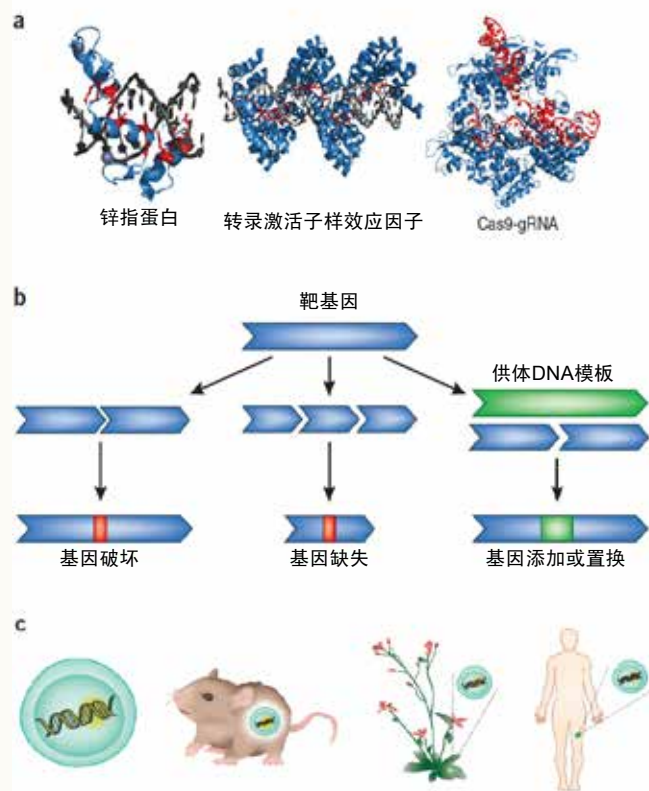


图1 基因组编辑技术的应用。(a)与DNA结合的锌指蛋白 (PDB: 1AAY)、TALE (3UGM) 与 CRISPR (4OO8) 的结构。左图和中图: 灰色代表DNA; 蓝色代表蛋白质; 红色代表负责靶向于DNA的氨基酸侧链。右图: 灰色代表DNA; 蓝色代表Cas9酶; 红色代表gRNA。(b)核酸酶诱导的DNA双链断裂可以导致基因敲除、基因组区域的缺失或基因修饰。(c) 基因组编辑技术的应用领域包括反向遗传学、疾病建模、农业生产和基因治疗。

转录激活子样效应因子 (transcription activator-like effector, TALE) 是一种天然存在于植物致病菌内的蛋白质。2009年, 研究者发现了TALE上的DNA识别码, 从而极大地简化了合成性DNA结合蛋白的设计流程。锌指蛋白中每个锌指样结构域能够与三个或四个碱基对之间产生复杂的相互作用, 而TALE蛋白的每一个基本单位都只能识别一个碱基对 (图1a), 因此TALE蛋白的功能似乎更为模块化和独立。如果能够设计出可靶向于新DNA序列的TALE蛋白的话, 它将会比ZFN蛋白更为直接, 更为成功。此后不久, 研究者将TALE融合到FokI催化域上, 从而生成了TALE核酸酶 (TALE nuclease, TALEN), 以

用于基因组编辑。这一方法使研究者能够更广泛地应用基因组编辑技术, 但是这仍然需要利用分子生物学专业技能来设计、合成和验证TALE大型蛋白 (该蛋白可靶向于用户定义的DNA序列) 的编码基因。

最近出现的CRISPR-Cas9技术改变了基因工程领域的状况: 研究者不需要任何的分子生物学专业技能就能够开展蛋白质工程。成簇的、规律间隔的短回文重复序列 (clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats, CRISPR) 是一种适应性免疫系统: 细菌将较短的入侵病毒DNA序列整合到自己的基因组上, 作为病毒感染的一种“记忆”。这些外源性DNA重复序列经过转录加工后生

成CRISPR RNA (crRNA)；crRNA与另一种名为tracrRNA的短链RNA共同退火，并且与Cas9核酸内切酶结合形成复合物。当细胞再次接触同一种外源性DNA时，就会通过crRNA的碱基互补配对来识别这种DNA。随后，与crRNA结合的Cas9酶能够将外源性DNA裂解掉，从而清除这些侵入性DNA。

研究者在2012年指出，crRNA可以与tracrRNA结合，形成嵌合型向导RNA (guide RNA, gRNA)，而Cas9和gRNA是目标核酸酶发挥酶活性所必需的两个组件。如果要将Cas9-gRNA复合物靶向于任何新的DNA序列，只需要改变gRNA上的一段短序列 (~20个碱基对) 即可 (图1a)。此后不久，该系统就在人类细胞、斑马鱼和其它多种生物体中得到了应用。CRISPR-Cas9系统应用简便，许多不同科学领域的实验室都迅速将这一系统投入使用。自从第一项原理验证性研究完成以后，它在不到两年的时间里就被广泛地应用于各个领域，并且取得了大量里程碑式的成就。它的广泛应用已经证明它在多种细胞类型和物种中具有稳健性。因此，基因组编辑技术正在成为所有研究实验室需要用到的一种商品化技术。

这些技术共同创建了一个科学范例，都将基因组设想为一个可以无限编辑的软件。这一范例对基因功能的研究能力产生了显著的影响：我们能够敲除基因；针对性地修改基因，使其获得新功能；修饰基因，以便进行条件控制；或者标记基因，以便追踪其蛋白质产物。这一范例也对反向遗传学 (reverse genetics) 产生了直接且重要的影响。在历史上，研究者努力解释特定的人类遗传变异对细胞表型的影响，但是其它数以百万计的、在不同个体间存在差异的碱基对往往都会干扰研究者的解读和判断。而基因组编辑技术能够使研究者在不改变基因组的情况下，对特定碱基对进行精确的修改，从而巧妙地避开了这一问题。这些基因组编辑方法与基因重组技术相结合，可以促进药物的筛选工作，也使得科学家

能够研究那些无法从人类患者身上获取的各种细胞类型，例如神经元、心肌细胞和肝细胞。

这些方法也能够用来直接控制DNA调控元件，从而阐释基因组结构和功能之间的关联。此外，这些研究工具能够用于高通量的基因筛查工作。利用RNA干扰原理的筛查工作通常会受到脱靶效应 (off-target effect) 与不完全性靶基因敲除的影响，而相比之下，用于功能性基因敲除的众多核酸酶可能会产生更加稳健的、可选择性更高的表型。

除了可以编辑人工培养的细胞之外，这些基因组编辑工具还被广泛地应用于转基因生物体的创造工作中 (图1c)。将基因组编辑核酸酶或者编码核酸酶的DNA或mRNA直接注入受精卵，就可以在生物体内完成基因组编辑。传统的转基因生物创造方法的操作步骤十分繁琐，而这种新方法则避开了很多步骤。

研究者已经利用这些方法对很多不同的物种进行了基因改造，包括小鼠、大鼠、猴、猪、牛、兔子、蛙类、斑马鱼、果蝇、蠕虫、酵母菌及细菌等。这些生物体既被应用于农业和医药等领域，也被应用于基因功能学、遗传学、基因组学和疾病建模的基础科学研究，作为同种异基因组织和器官的宿主。对植物的基因组进行编辑，从而将农业生产所需要的各种特性导入植物基因中——这一工作目前正成为一个重点行业。有趣的是，植物基因组编辑技术与植物选择性培育的自然机制相类似：在控制植物基因组的同时，并不会将其它物种的基因转入植物基因组中。因此，一些联邦监管机构可能不会将基因组编辑工具修改过的植物归类为转基因生物。

最后，基因组编辑技术在基因治疗领域中的应用极具争议，但这也是它最有可能直接影响人类健康的途径。在基因治疗过程中，靶基因的编辑可以产生多方面的效益，其中包括能够敲除促使疾病进展的内源性基因或者有害的内源性基因，将具有治疗作用的转移基因靶向到已被研究透彻的“安全港” (safe harbor) 位点上，从而避免干扰内源性基因

调控机制，并矫正致病性基因突变。自从首次从原理上证明ZFN可矫正那些引发人类遗传疾病的基因突变以来，ZFN如今已经进入了临床试验阶段：HIV需要利用CCR5基因来进入T细胞，而ZFN可以干扰CCR5基因的作用。TALEN和CRISPR-Cas9向临床应用的转化工作也正在进行之中。这三种基因组编辑技术都已经被运用于多种不同疾病的临床前期模型之中，例如病毒性感染、肿瘤免疫治疗、镰状细胞疾病（sickle-cell disease）、血友病（hemophilia）、杜氏肌肉营养不良症（Duchenne muscular dystrophy）和各种免疫功能缺陷性疾病。尤为重要的是，最近有研究表明，有效的活体内基因编辑技术和人类造血干细胞基因编辑技术预示着基因组编辑技术在疾病治疗方面将具有广泛的实用性。

重要的是，这三种基因组编辑技术都面临着一些共同且独特的挑战。其中研究者重点关注的一点是：这些技术是否具有较好的特异性和精确性来精准地改变DNA序列？如果由于脱靶效应而靶向于未知的基因组位置上，就可能歪曲科研成果或产生不良反应。研究者目前已经取得了巨大的进步，提高了每一种技术的特异性，但是基因组编辑领域仍然迫切需要一些更为敏感的、更为系统的方法，以确定基因改良种群中每个细胞的基因编辑的特异性。一般而言，只有极少数被处理的细胞真正发生了基因组编辑，因此研究者也重点强调应当增加核酸酶的活性，并且开发出一些新方法，来挑选出那些被正确修改的细胞。

研究者所面临的另一个挑战是核酸酶的导入问题；在体内应用基因组编辑技术时，这一问题尤为突出。Cas9和TALEN的编码基因较大，是基因组编辑技术应用领域的一大障碍，而研究者目前正在解决这一问题。病毒载体工程和纳米粒子工程取得了进步，研究者也开发

出了核酸酶的直接导入策略——这些研究进展可能在推动基因组编辑技术的应用上扮演了重要的角色。最后，研究者到目前为止尚未对某些问题进行报道，例如基因编辑工具的免疫原性；而这些问题在未来将会成为临床应用领域中让人感兴趣的课题。

展望未来，大量新兴技术可能将会在未来几年内对基因组编辑领域产生重大的影响。科学家根据以FokI和Cas9为基础的核酸酶来研发替代性酶催化域，但研发工作较为缓慢；然而大范围核酸酶（meganuclease）、重组酶（recombinase）、转座酶（transposase）及其与锌指蛋白的杂合物、TALE和无催化活性型Cas9（dCas9）的研发工作最近都取得了突破。在CRISPR-Cas9系统的有效性基础上，将来可能也会出现其它一些技术，能够利用RNA-DNA相互作用和DNA-DNA相互作用，来进行靶位点的识别。

研究者还会应用一些可控制转录调控机制、编辑表观基因组的基因组工程工具，这些工具和DNA序列编辑工具均会在不久的将来产生重大的影响。它们具有极高的应用价值，可以将复杂的真核细胞基因调控机制拆分开来；对基因网络重组等应用领域而言它们也是非常重要的，可以引导细胞表型的改变。研究者可以利用正交Cas9酶来单独控制多个表观遗传编辑工具，从而可能推动这项工作的开展。这些工具在去年才被应用于其他领域，包括染色体位点成像、控制基因组的三维结构、生成复杂的DNA序列文库；研究者可能会对其进行广泛的应用。最后，有一些技术（例如光遗传学技术）可以利用精准的时空控制机制来动态调控这些基因组工程工具的活性。这些技术非常关键，将会帮助我们实现最终的目标——即在任何时间内，在任何细胞中设计基因组的任何特性。

## 五、光遗传学：光时代到来

光遗传学革命（optogenetic revolution）正在转变神经科学（neuroscience）。最近，在用光控制神经活动，以及用光解读神经活动研究方面取得了巨大的进展。这也提示我们，需要有更好的探针，提高光传输的效率和精准度，需要有更加精细的方法解读光遗传学试验结果，只有这样，才能够更加充分地发挥光遗传学技术的无限潜力。

用光线控制神经活动，解读神经活动，这个点子说起来非常简单，而且也很容易让人理解，在近几十年来也让无数神经科学家们遐想联翩。使用光线作为效应器（effector）的优势是显而易见的：首先，这是一种非侵入式的方法，而且在时间和空间上都具有非常高的精准度；此外，还可以同时利用几种不同波长的光线，对多个不同的部位进行同步操控；最后，利用光线也可以反映出某种特定分子的活动情况。虽然光遗传学研究取得了不错的进展，但是直到最近才开始被广泛使用，主要用于对某些特定的神经元细胞进行操控，以及神经活动分析的研究工作当中。光遗传学技术需要用到遗传学改造的蛋白作为工具，这些蛋白能够精确到特定的神经元亚型。因此，光遗传学概念就是遗传学与光学的结合。在神经活动解读方面，已经开发出了高灵敏度的探针，能够捕捉到突触释放、钙离子内流和跨膜电压等图像。光操控方面会用到能够激活神经元细胞的蛋白质和使神经元细胞失活的蛋白质，用各种不同波长的光对这些蛋白质进行精确的调控，目前的调控精度已经达到了毫秒级。

这些光遗传学工具的通用性及其强大的功用已经在神经科学研究领域掀起了一场革命，并且正在迅速占领全世界的神经科学实验室，逐渐成为一项标准的试验技术。虽然光遗传学

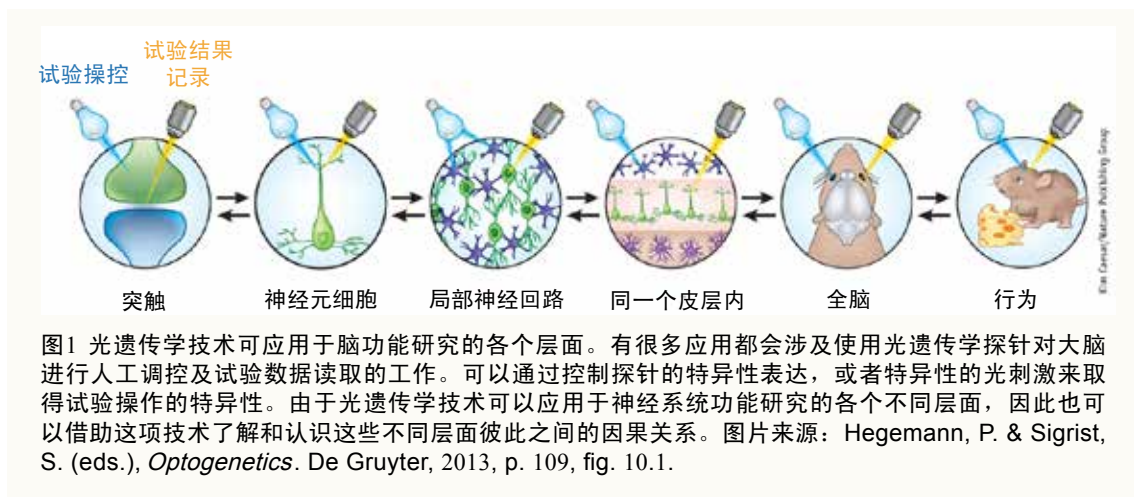
目前还算不上是一个家喻户晓的概念，但是可以毫不夸张地说，光遗传学技术已经成为了科研界的主流技术，尤其是在光遗传学技术荣获2013年的脑科学大奖（2013 Brain Prize，详见[http://www.thebrainprize.org/flx/prize\\_winners/prize\\_winners\\_2013/](http://www.thebrainprize.org/flx/prize_winners/prize_winners_2013/)），以及将光遗传学技术列为美国国立卫生研究院（NIH）脑科学研究项目（BRAIN Initiative）的主要试验技术以后。此外，大家对光遗传学技术的未来也越来越有信心。大家相信，利用光遗传学技术不仅能够了解动物模型的发病机制，同时也有利于我们治疗人体疾病，尤其是针对视网膜（retina）等比较容易触及和操作的脑神经部位。

尽管光遗传学技术拥有如此美好和远大的前景，但还是能够听到一些反面的声音。比如随着光遗传学技术的广泛推广和使用，在解决复杂的生理问题时，我们的科研模式已经从过去的原理论证（proof-of-principle）模式转变成了试验论证模式。伴随这种转变而来的就是慢慢发现了光遗传学技术的各种不足，然后再反过来促进光遗传学技术的进一步发展。本评论文章将就最近利用光遗传学技术在脑功能研究方面所取得的最新进展做一个简短的综述，同时也会就已经发现的一些问题，做一番探讨，同时会对光遗传学的未来进行展望。

## 优势

光遗传学技术最显著的特点就是能够锁定目标探针，精确地瞄准各种细胞亚型和胞内组织结构，从而能够如图1所示，利用这些探针，在多个不同的层面上对整个神经系统的功能展开研究。因此，光遗传学技术能够覆盖神经科学研究工作的所有领域，从探索每一个突触（synapses）的特征，到研究在神经回路内，或者神经回路之间的某种细胞，直至最后认识全脑，并且对复杂的行为展开人工操控。这些技术不仅被越来越多地用来研究脑功能的基本运作机制，同时也被越来越多地用来研究动物模型的发病机制。我们可以在同一个细胞上既表达光遗传学激动子

（optogenetic activators），同时又表达光遗传学抑制子（optogenetic inhibitors），这一点对于试验的必须性（necessity）和充分性（sufficiency）都非常重要，利用这两种因子就可以构建出一组因果关系。其中又以开发光遗传学抑制子尤为重要，因为科研人员在此之前完全毫无办法对神经回路开展毫秒级的功能抑制试验。综上所述，这种试验的特异性、双向性（bimodality）和广度让光遗传学技术能够将不同层面的神经功能联系起来，为科研人员们提供一种直接的证据，来解释行为和认知这种高级脑功能的产生和运作机制。



对于光遗传学技术而言，最为关键的就是开发出各种各样的探针，而探针的开发工作也一直在以惊人的速度进步。光敏通道蛋白（Channelrhodopsin）及其各种变体最近已经被广泛应用于各种分子改造工作，从而创造出C1V1和ReaChR等功能强大的新探针。C1V1蛋白更适合双光子激发（two-photon excitation），而ReaChR蛋白则是一种红移蛋白（red-shifted），适合对大脑深处的结构和骨骼下结构进行穿透激发。最近对光敏通道蛋白进行的高分辨率的晶体结构分析工作，更

加有利于我们今后对该蛋白的离子通道进行分子结构改造，使其从阳离子（cation）通道变成氯离子（chloride）通道，从而由激发离子通道蛋白变成抑制离子通道蛋白。科研人员们也在继续从大自然中寻找新的抑制性视蛋白（opsins），比如正在被广泛使用的质子泵蛋白Arch，和刚刚被发现的Jaws蛋白。有科研人员将Jaws蛋白改造成了一种红移蛋白，因此能够对大脑深部组织进行有效抑制。在信息读取方面，也根据蛋白的结构设计出了新一代的钙离子感受器蛋白，比如GCaMP6蛋

白，该蛋白问世之后，终于有望能够让梦想已久的体内单峰（高）敏感性（**single-spike sensitivity**）操作成为现实。此外，最近开始使用的一种比例式（**ratiometric**）钙离子感受器——**Twitch**蛋白在体内长时间基础钙离子水平成像方面也具有独特的优势。最近在电压感受器（**voltage sensors**）的人工设计方面也取得了不错的进展，其中最值得一提的就是新近开发的**QuasAr**家族蛋白，该家族蛋白具有无可比拟的电压敏感性和快速反应动力学特性。

这些优异的科研成果凸显出逐渐形成的光遗传学工具开发管理原则的重要性，光遗传学工具与以往推动神经科学发展的其他研究工具还有所不同。这种差别尤其体现在光遗传学工具的开发需要依靠分子和生物物理工具在大

自然中发现，并找到有潜力的光遗传学分子工具这一方面，然后才能对它们进行分子结构改造（可能还会辅以高通量筛选操作），改变其光谱特性（**spectral properties**）、动力学特性（**kinetics specificity**）和离子特性（**ionic specificity**）等性质。然后再利用分子及细胞生物学工具，按照科研人员的意愿（如图1所示）将这些人工改造过的光遗传学工具置入神经回路的各个元件当中，发挥其应有的控制作用。因此，光遗传学技术离不开微生物学（**microbiology**）、结构生物学（**structural biology**）、生物物理学（**biophysics**）、细胞生物学（**cell biology**）和神经科学（**neuroscience**）等多学科的参与和帮助，反过来，光遗传学也会加深与这些学科之间的交叉，促进相关学科的进一步发展。

## 不足

针对光遗传学激动子的常规应用（即在神经回路中的大量神经元细胞都经历了人工遗传学改造，可以在细胞上表达光遗传学探针，这些细胞被光照射之后就会激活），也出现了很多批评的声音。首先，光刺激的程度有可能会使神经细胞的反应超出正常的生理范围，而这种风险又是难以评估的，因为在这种试验过程中往往都不会同时记录神经细胞的活动程度。这样就有可能给神经回路造成非自然的影响，招募或者解除下游元件，而这些下游元件在正常情况下可能并不会受这些上游神经反应的影响，这样关于该神经回路的功能，最终就可能得出错误的结论。问题还不仅仅局限于使用激动子，沉默子（**silencers**）能够让细胞的活性处于正常水平以下，但其作用解除之后，有可能会引起反弹性的细胞活化。其次，光刺激和光遗传学基因表达对于整个目标神经元细胞群体而言并不一致，这样就会造成光遗传学操作在强度和空间分布上的不一致。

第三点，对神经元细胞的刺激可以带来相当一致的同步反应，但这种反应往往都不是正常生理状态下会出现的反应，尤其是哺乳动物的神经回路很少会出现大量神经细胞精确到毫秒级的同步反应。最后一点，传统的光遗传学刺激通常都会同时针对所有接受过人工遗传学改造的神经细胞施加作用，不会选择性地对其中的某些亚群细胞进行影响，比如，根据刺激的选择性或其他功能信号进行特异性的作用。因此，科研人员们也正在利用立即早期基因（**immediate early genes**）表达光遗传学基因的办法来解决这个问题，但是这类试验还是缺乏独立于立即早期基因活性之外的输出功能指标。

对于正确解读光遗传学试验结果而言，刺激的部位也具有非常重要的意义。在寻找某个特定神经投射（**projection**）的作用位点时，通常的作法都是对表达有光遗传学探针的神经轴突（**axons**）进行刺激。但是这种针对轴



突的直接光刺激会导致非生理性的神经递质释放，从而让我们高估突触连接的实际作用。另外，对轴突的直接光刺激还会导致逆向活化（**antidromic activation**），比如动作电位反向传导等，这反过来也会让轴突所在神经元细

胞，及其侧索向脑内的其他部位进行投射。这个问题非常难控制，因为即便是用化学的方法让轴突所在神经元细胞沉默，也不能阻止该细胞侧索的逆向活化。

## 难点

除了对光遗传学试验结果的解读存在困难之外，光遗传学探针的使用本身也会给整个试验对象系统带来干扰。原因之一就在于，现有的、能够在特定细胞上表达的光遗传学探针工具还相对有限。如果考虑到针对人体的长期治疗需要，这个问题就显得更加突出，因为这不能对人体进行转基因操作。虽然构建能够表达光遗传学感受器的转基因动物正在慢慢走向成功，但是使用病毒载体，在哺乳动物大脑中表达光遗传学工具始终都是一个需要逾越的难点。最大的问题就在于如何确保病毒载体具有精确的靶向性（尤其在缺乏位点特异性重组酶的情况下），如何解决病毒对机体的长期毒性，以及病毒载体蛋白表达的长期稳定性。这些都是非常严重的问题，而且从目前的文献检索情况来看，这些问题也还都没能得到很好

的解决，而且还有一些问题值得我们关注。比如最近发现，借助病毒载体或宫内电穿孔（**in utero electroporation**）等方法让机体长期高水平表达**ChR2**蛋白，根据所使用启动子的不同，这会使神经轴突的形态出现异常。长期表达经过人工遗传学改造过的钙离子指示剂（**calcium indicators**）也与某些细胞的生理改变有关。这些研究发现已经向我们展示出了冰山的一角，进而让我们认识到，光遗传学基因的表达有可能会干扰被研究神经回路的正常功能，因此，我们在进行光遗传学研究时，应该更加注意在解剖和生理层面的精细操控。对病毒载体进行更加合理的改造，同时加大对长期安全性的仔细评估，以及病毒载体系统效率的评估，也都将有助于确保使用光遗传学技术治疗人体疾病时的安全性和治疗效果。

## 展望

尽管光遗传学技术拥有无限的潜力，但它也不是万能的神药。与任何一项新技术一样，光遗传学技术也有自身的局限和弱点。在我们设计、开展，以及解读光遗传学试验时也必须考虑到这些因素。本文提到的很多问题都可以借助“全光学（**all-optical**）”方法，即同时表达光遗传学执行子（**actuators**）和感受器等方法，在同一个神经元细胞内解读试验结果，再反馈加以调节的方式来解决。不过因为很多原因，这很难做到，比如因为高速光子激

发器（**high-speed photostimulation**）和记录仪等硬件方面的限制，目前所使用的探针还达不到足够高的灵敏度和时间分辨率，光遗传学执行子和感受器之间存在光谱重叠的问题等。后面这两个问题最近因为钙离子及电压双重感受器的出现，已经得到了解决。科研人员们将能够快速反应的新型电压感受器与在光谱上不会产生重叠效应的执行子搭配使用，已经从原理上证明可以打造出一套全光学电生理系统。这是光遗传学发展史上具有重要意义的一大

步，因为可以直接读取光遗传学试验操作的结果，同时在试验过程中，用比光极（optrode）更加精准的方式对试验进行实时校正。

不过这种系统还不足以模拟体内神经元细胞的天然活动方式。还需要再加入一个组件，即能够在体内同时针对多个神经元细胞发挥作用的光激活子或抑制子。使用快速声光偏转器（acousto-optical deflectors）或立体光调制器（spatial light modulator）将有望解决这些问题。因为这些装置可以在单个细胞的光遗传学操控和上万个细胞的光遗传学操控这种数量级的差距之间搭起一座桥梁，最终达到如体内真实情况那样的，同时对这些神经元细胞进行时空层面的精确操控。不过这一点可并不容易做到，在体内锁定单个的神经元细胞需要对光刺激信号，以及光遗传学探针的表达水平进行非常精细的调控，以确保能够在某一个神经元细胞内（而不是临近的细胞内）产生一个刺激信号，这就

需要让光遗传学激活子和感受器分子有更加标准化的表达，同时试验操作也必须更加精细（这应该成为标准光遗传学试验的必备要求）。如果在大脑深部组织开展这些试验将更具挑战，因为能够适用于那些部位的光遗传学技术会更少。不过随着新探针和光靶向技术的不断出现，一定会出现在生理的条件下，针对同一套神经元细胞，试验数据读取、神经元细胞激活和抑制全都能搞定的新技术，这也是我们探索哺乳动物大脑神经编码奥秘所必需的技术。

光遗传学技术与神经科学研究的联姻早在十年前就已经完成了，目前双方正处在蜜月期。第一代光遗传学技术暴露出来的问题也加快了新型光遗传学探针和新型光遗传学研究策略的开发，从而掀起了一股新的、开展更加高级、更易解读的试验的热潮。我们完全有信心，在今后的十年内，光遗传学研究会迎来一个更加辉煌的未来。



# 百态 · 频道

[www.LifeOmics.com](http://www.LifeOmics.com)

# BioPh China 2015

## 2015生物制药与技术中国展



同期举办: CPH China 2105  
十五周年华诞 荣耀呈现

2015年6月24-26日 上海新国际博览中心 (SNIEC)

www.biophchina.com

### 展示范围

抗体  
生物燃料  
生物制剂  
生物制造  
生物工艺  
细胞生物学  
临床试验

新药研发  
基因组学/遗传学  
个性化用药  
干细胞研究  
仿制药  
疫苗

生物信息  
生物信息科技  
给药系统  
纳米技术  
平台技术

商业服务  
云计算  
知识产权  
法规合规  
技术转让

### 同期论坛: 第二届生物制药峰会

模块一: 法规更新与解读	
9:30-10:00	签到
10:00-10:05	开幕致辞 夏明德 资深总监 美国强生集团
10:05-10:35	2015版中国药典解读—生物技术药物质量控制 饶春娟 研究员 中国食品药品检定研究院
10:35-11:05	最新中国生物类似药研发法规与策略 李明田 新药审评专家 国家药品监督管理局
11:05-11:15	茶歇与交流
11:15-11:30	问答环节
模块二: 市场分析展望	
13:00-13:30	生物仿制药市场预期 Rong Chen 医学总监 葛兰素史克
13:30-14:00	生物仿制药在中国的机遇与挑战 张海洲 医学与转化中心执行副主任 上海中信国健药业股份有限公司
14:00-14:15	茶歇与交流
模块三: 技术优化与创新	
14:15-14:45	疫苗技术的创新及应用 正在邀请中, 史力 CEO 上海润泽生物
14:45-15:15	生物制药设施设计在中国的机遇与挑战 Scott M Wheelwright 首席顾问 苏州智真生物技术咨询有限公司
15:15-16:15	未来生物制药产业发展趋势探讨 夏明德 资深总监 强生集团 杨一毅 临床前安全性评估部总监 赛诺菲 吴波冰 研究院院长 上海中信国健药业股份有限公司 Rong Chen 医学总监 葛兰素史克
16:15-16:20	闭幕致辞

### 部分参展企业



010-58036295/021-33392255



## 六、取得跨越式发展的单分子技术

我们有很多关于生物系统 (biological systems) 的认识都是通过对各种分子开展的研究而得来的。但这种模式正在悄悄发生改变, 这主要是因为单分子检测技术 (single molecule measurements) 在检测的精度和明晰度上都已经达到了一个前所未有的地步。近十年来, 单分子检测技术在分辨率 (resolution) 和所能检测的复杂程度 (complexity) 方面都取得了惊人的进展, 已经完全有能力承担起科研工作的重任, 探索并解决一些我们之前从来就没想过的新问题。

几十年以前还没有单分子实验技术, 不能够对单个分子的各种特性进行检测, 不过当时已经建立起能够描述多分子集合信号的理论框架 (theoretical frameworks)。这也正是为什么科学家会在物理化学 (physical chemistry) 中使用气体常数  $R$  (gas constant  $R$ , 该常数等于阿伏伽德罗常数乘以玻尔兹曼常数,  $k_B$ ), 为什么会在描述千焦和千卡路里的時候使用每摩尔能量 (energy per mole)  $RT$ , 而不使用更小的单位。不过现在已经不需要这样了, 单分子技术正在给体外及细胞内生物学研究带来一场革命, 因为借助单分子技

术, 我们可以获得大量有关最基本生物进程的、前所未有的数据。少见的分子、隐秘的中间分子、多种作用途径, 这些研究领域都是单分子技术展现实力的舞台。实际上, 单分子技术正在被化学家和生物学家广泛接受, 而且大家已经自然而然地开始用单分子热力学单位  $k_B T$  替换掉了  $RT$  单位。

在现代单分子科研工作中, 荧光技术和光学技术是最主要的两大技术, 也将是本文介绍的重点。接下来, 我们将为大家介绍近十年来所取得的关键性突破, 并就未来的发展进行一番展望。

### 进一步发展单分子检测技术

近年来, 单分子技术 (Single-molecule methods) 取得了长足的进步。单分子测量在时空精确度 (spatiotemporal precision) 方面取得了质的飞跃。而多路并行处理技术

(multiplexing) 又使得我们能够同时获得多方面的检测数据, 一次了解这个分子的多种特性, 及其与其它分子之间的关系, 能够让我们提出更多的科学问题 (图1)。

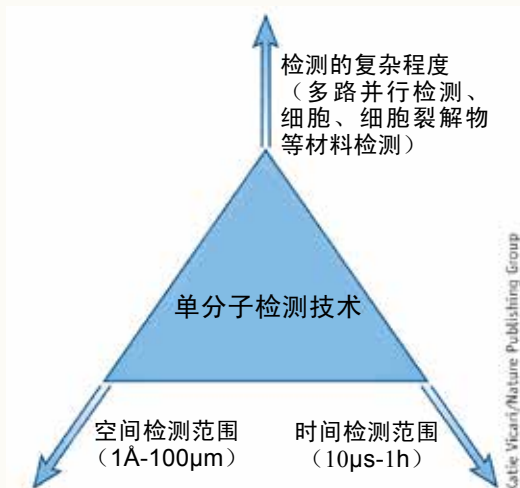


图1 近十年来，单分子检测技术取得了长足的发展，因此不论在更广阔的时间、空间和复杂程度方面的问题也都逐渐成为了我们可以开展常规研究工作的课题。细胞及细胞裂解物都是复杂程度更高的实验材料。

## 空间分辨率

从最基本的层面来看，所有的生物过程其实都是一个个具体发生的化学反应，比如ATP水解反应，为肌动蛋白的运动提供了能量。能量经历了多个分子之后，这些反应的作用就被平均了，因为这些反应都是随机发生的，但是在单分子实验里，可以将这些反应步骤一个个地分解开，并且以极高的空间分辨率观察这些反应步骤。

光学显微镜由于存在衍射（diffraction）的局限，所以单个的荧光团在镜下就会表现为伸展的图像，大小大约为入射光波长的一半左右。不过从原理上来说，光团的位置是可以确定的，这个只会受到信噪比的影响。2003年，Yildiz等人证明，用大约1万个可探测光子（detected photons），使用荧光基团标记的方法，可以将单个运动蛋白（single motor protein）的定位精确度提高到1~2纳米，这几乎已经达到了Watt Webb计算出的理论极限。这一技术进步给我们带来了决定性的数据，为肌凝蛋白V（myosin V）和驱动蛋白（kinesin）是通过交替式机制（hand-over-

hand mechanism）运动的假说提供了坚实的依据，同时也为基于单分子定位需要的超高分辨率显微镜的开发工作打下了基础。

虽然仅需要100个光子就可以利用在荧光受体和供体分子间发生的单分子荧光共振能量转移（single molecule fluorescence resonance energy transfer, smFRET）作用测量3~5埃米的相对距离变化，但是这种技术还是没有被广泛应用于绝对距离的测量工作中。值得一提的是，科研人员已经开始在结构生物学研究工作中使用smFRET技术，他们开发出了一套精密的算法，能够解决染料和其他因素误差的多种构象问题。因此，也可以利用多位点荧光共振能量转移测量（multisite FRET measurements）所带来的大量的距离参数（distance constraints）对核酸、蛋白质，以及它们的复合物进行高分辨率的结构解析工作。但是FRET技术对于3纳米以下，或者8纳米以上的测量都是无能为力的。另外一项叫做蛋白质诱导的荧光增强技术（protein induced fluorescence enhancement）能够检

测的距离范围要小于现有的FRET技术，而且只需要一个荧光基团。

在众多单分子技术中，光钳夹（**optical tweezers**）技术，也被称作光捕获技术（**optical trapping**）的敏感性一直都是独一无二的。2005年，科学家们终于使用双重捕获技术（**dual-trap configuration**）解决了因为设备误差（**instrument drift**）所导致的DNA长

度测量问题，获得了埃米级别的测量精确度。这种分辨率超高的光捕获技术能够让科研人员在基因转录的过程中观察到RNA聚合酶的运动，而且分辨率高达**1bp**。正因为有了这种技术，后来才发现了核糖开关（**riboswitch**）的共转录折叠现象（**cotranscription folding**），以及病毒DNA组装装置的详细形成过程。

## 时间分辨率

单分子荧光技术的时间分辨率会受到光子流的限制，即受到在单位时间内能够检测到多少个光子的能力的限制。在较低的激发水平时，光子流会随着激发强度的递增呈线性递增，如果激发处在较高的水平，光子流就会达到饱和状态。比如，会因为三态（**triplet-state**）而最终影响到检测的时间分辨率。**Trolox**等新的三态淬灭剂，以及去氧剂系统（**oxygen-scavenger system**）都有助于提高光子流的最大幅度，同时将光漂白的作用时间改善5个因子的水平，从而帮助科研人员进行时间分辨率要求比较高，或者观察时间比较长的研究工作。我们也可以利用统计技术，对单个光子的到达时间（由蛋白质折叠过程中的第一次转换时间得来）进行统计分析，来获得高达**10微秒**的时间分辨率。有趣的是，虽然使用**Trolox**能够解决给单分子荧光技术带来困扰的染料闪光问题（**dye-blinking**），但是利用

染料闪光的特性，也能够获得分辨率高达**30纳米**的荧光图像，这也正是以单分子定位技术为基础的超高分辨率显微镜的由来。

拥有越来越高时间分辨率的各种实验技术也拓宽了我们的视野。使用最早由**Toshio Ando**开发的高速原子力显微镜（**high-speed atomic force microscopy**），可以获得最真实的分子运动图像。**Rico**等人以惊人的、每秒数毫米的速度打开了一个蛋白质的折叠结构，这样就能够将实验结果与全原子分子动态模拟（**all-atom molecular dynamics simulations**）结果进行直接比较。之前已经用较低的速度开展过类似的实验，但是大家对分子动态模拟的数据在多大程度上能够真实反映现实情况还是持怀疑态度，因为之前的技术在时间上与实际的实验有一个巨大的不匹配问题。不过现在的实验结果已经获得了一致好评。

## 检测复杂程度

直到不久以前，几乎所有的单分子实验都还只能检测数量很少的单个参数，这与**smFRET**技术或测量DNA长度的光捕获技术还有很大一段差距。如果我们能够对由很多不同组份组成的复杂系统进行检测，那将能够更

好地模拟正常的生理状况，但这对技术的要求就要高很多，远远不是检测一个参数就能够满足的。

虽然由于标记技术的复杂程度所限，现在还很难对多个不同的参数进行跟踪检测，但

是smFRET技术已经可以做到对3种或4种不同的颜色进行检测，分别能够对3种和6种距离进行测量，并且还会考虑到它们的变化情况。现在，使用多种颜色共定位（**multicolor colocalization**）方法可以发现蛋白质抵达或离开反应位点的相对时间。最初被开发用于单分子测序技术的零模式波导技术（**zero-mode waveguide technology**）则能够使多颜色共定位检测在荧光标记分子的浓度极高时（>100

nM）开展实验。在机械实验（**mechanical experiments**）中，使用4轴光捕获技术可以独立地对两个DNA分子进行操控，并且分别控制它们运动的目的地。这些多维测量的复杂程度还在不断地增加，但这势必会减少实验的成功结果，不过我们可以同时多开展一些单分子平行实验，在一定程度上进行弥补，比如使用DNA门帘技术（**DNA-curtain technology**）。

## 联合技术（Hybrid approaches）

如果将单分子机械实验看作是我们拿自己的双手对分子进行操作，并且亲手感受分子的反应，那么单分子荧光实验就好比是我们亲眼看到单分子一样。如果将这两种技术结合起来，我们就会有新的发现。已经有一些研究向我们展示了这种单分子检测结合技术（图2），而且在科技未来的发展中，这种技术一定会变得愈加重要。

在单分子层面，一直都有将力学技术与荧光技术相结合的传统。我们课题组就将smFRET技术与光捕获技术相结合，在使用大约1pN力的条件下，对大约只有0.5纳米的构象改变进行了成功的检测，这在纯力学实验条件下是不可能完成的，我们后来又用这种方法对体内力学感受器进行了校正。我们还使用两束捕获光和一束荧光激发光的多重时间（**time multiplexing**）方法，实现了超高单碱基对分辨率的光捕获实验（**ultrahigh single-base-pair-resolution optical trap**），而且该实验的敏感度达到了单荧光基团水平。这样就可以利用smFRET技术和光捕获技术，同时对构象改变进行多维测量。另外一种组合策略是将单分子荧光检测技术与磁捕获（**magnetic**

**tweezers**）技术相结合。del Rio等人用这种方法观察到，当对talín蛋白施加一定的作用力时，黏着斑蛋白（**vinculin protein**）的秘密结合位点就被暴露出来。我们知道，talín蛋白在细胞膜与膜下的细胞骨架之间起到了一种桥梁作用。

在研究会同时发生旋转和线性运动的系统时，Bustamante课题组建立了一套旋转珠实验方法（**rotor-bead assay**），这样就可以直接观察到荧光珠的旋转情况，同时也能够观察到DNA长度的变化情况。用这种技术能够精确地测定DNA在包装作用下插入病毒衣壳时的旋转强度（**rotational pitch**）。虽然磁捕获技术主要是用来旋转、延伸DNA的，但是最初的仪器却不能确定DNA的扭矩，因为当时的捕获作用在角度上太僵硬。在旋转角方向上使用光捕获技术中用到的微焊接颗粒（**microfabricated particles**）的双折射作用（**birefringence**），这就有可能开展诸如在RNA延伸时RNA聚合酶的作用那种精确的扭力测量，同时伴以机械力的作用，或者让旋转角上的磁捕获作用更柔和一点。

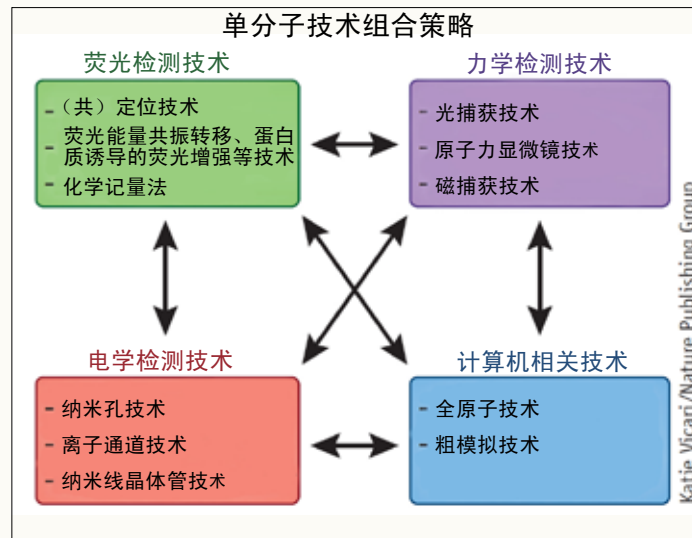


图2 不断涌现的各种单分子试验技术彼此之间的交叉、融合让我们能够拥有更多、更强大的试验手段，完成仅仅依靠一种单分子技术所不能完成的工作。

## 细胞内单分子技术

很多前期的工作已经为基因表达单分子成像打下了坚实的基础。2005年，我们第一次实时观察到了单分子的mRNA图像，紧接着又在2006年获得了实时的、单个蛋白分子形成的图像。这些研究成果都证实了，在细菌内，RNA和蛋白质的表达都是突然的、爆发式的；后来的研究也进一步发现，这是在大量生物体内普遍存在的一种模式。将大量荧光蛋白标记到单个的、高度修饰的转录体上，就可以将单分子mRNA检测大规模放大。得益于DNA探针的合成成本的大幅度下降，我们现在可以用大量的DNA探针对胞内的转录体进行标记，从而在单分子层面和单细胞层面对多个基因进行非常精确的mRNA定量，假阳性和阴性率都非常低，还可以对组织样品进行这种检测。这些研究工作也让单分子生物合成（single-molecule biophysics）研究与单细胞系统生物学（single-cell systems biology）研究能够挂起钩来。

虽然大部分单分子研究使用的都是在体外纯化的分子，或者是直接在胞内进行试验，但

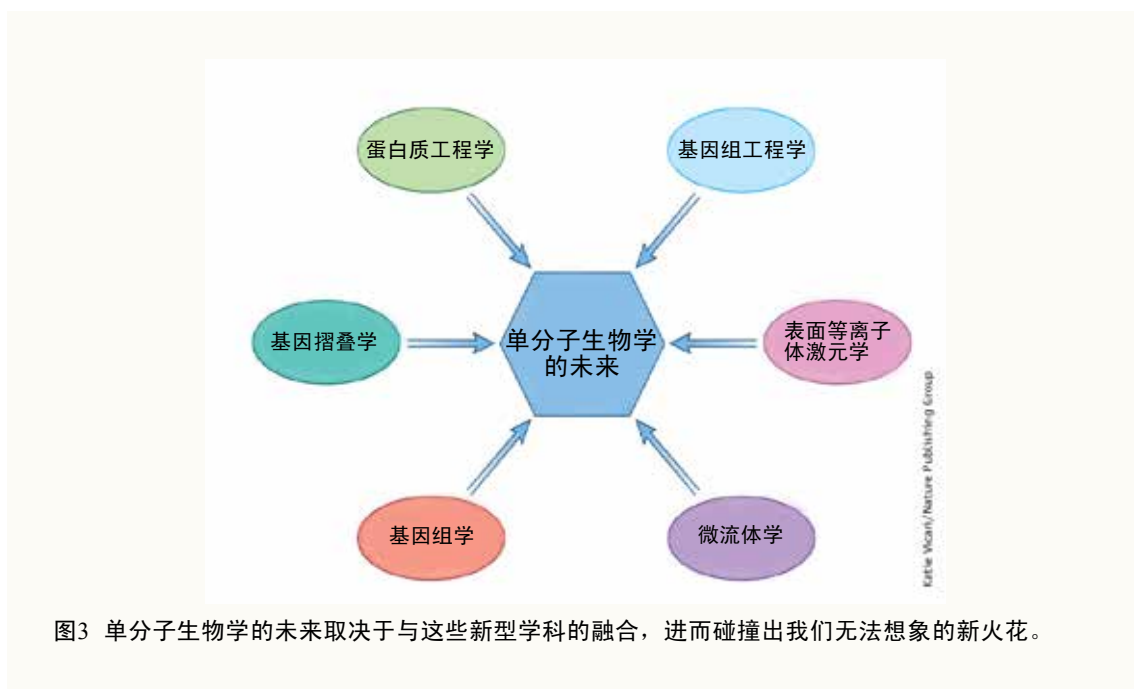
一种以细胞裂解物为试验材料的新方法也正在被一些实验室采纳。在单分子pull-down试验中，我们可以直接从细胞裂解物里分离、捕获得到细胞蛋白复合体，然后将其置于显微成像设备里，通过多颜色共定位和单分子光漂白分析等技术，分析这些复合体的组成情况。通过单分子pull-down试验捕获的蛋白复合体还可以被用于原位生化分析（biochemical analysis *in situ*）工作，了解胞内最真实的蛋白修饰或者辅助因子（cofactors）等信息。如果使用纯化的蛋白开展这类研究工作往往得不到这些结果，因为严苛的纯化操作往往会洗掉这些“信息”。借助酵母遗传学和新型标记技术，我们可以对细胞裂解产物里的蛋白质进行特异性的标记，进而对那些还不能通过体外试验充分重建的反应开展实时的单分子研究，比如mRNA剪接（mRNA splicing reaction）等反应。这些半胞内试验有望成为胞内精确研究蛋白复合体试验的有力补充，而且很快也会达到单细胞研究水平。



## 展望：已经显现出与其他生物技术融合的趋势

单分子技术在过去十年里，已经完成了飞跃式的大发展，在检测的精确性和复杂程度方面都更进一步，极大提高了检测数据的丰富程

度，让我们得以真正了解活体生物系统内部正在发生的情况。那么在接下来的这十年里，还会发生些什么呢？



“融合（Convergence）”将成为今后的主题。各种新的生物技术都将找到它们自己的途径，参与到这场单分子生物学研究的新浪潮当中（图3）。微流体技术（microfluidics）已经被用于自动化smFRET分析工作当中，能够在不发生表面圈合（surface tethering）作用的情况下检测到单分子间的相互作用。最近一直被用于获得超高分辨率图像测试模式（super-resolution imaging test patterns），以及改善分子圈合机械力分析工作的DNA折叠（DNA origami）技术被用来与能够对金属表面（metallic surfaces）附近起到光增益（light enhancement）作用的等离子体光学（plasmonics）技术结合，增强对单分子荧光信号的定位能力。

单分子相关试验数据的分析计算手段也是

一个非常重要的因素。随着单分子试验在时间和空间分辨率上还会不断的发展和完善，时间跨度（timescales）的规模和全原子模拟（all-atom simulations）的规模一定会发生相当大的重叠和交叉。因此，对试验结果和模拟结果进行比较一定会成为工作中的常态。我们还需要大力开发诸如隐马尔可夫模型（hidden Markov modeling）这类非偏倚的、自动化的分析算法，以便跟上单分子试验技术在复杂程度和高通量方面飞速发展的步伐。

基因组学也能够从高精度的单分子技术中获益。核糖体分析（ribosome profiling）、染色质免疫沉淀测序（chromatin immunoprecipitation sequencing）以及高通量RNA测序等能够提供全基因组数据的测序技术都已经达到了胞内单碱基分辨率。将体外

高精度的单分子数据和针对体内同一过程（比如因为RNA聚合酶而暂停的转录过程）的测序数据相结合，将能够帮助我们发现很多质量非常高的细节信息。当然，我们还可以利用最近比较热门的纳米孔测序技术对单分子本身进行测序。

随着蛋白质工程学和标记技术的不断发展，我们可以非常容易地对任何感兴趣的生物分子进行多重和多维度的单分子测量。对于细

胞单分子试验，基因组工程学技术也会加入其中，5年之内，这一定会成为标准流程。使用转染GFP融合蛋白等开展的检测工作一定会跟不上时代的发展。

单分子技术在近十年来所取得的惊人发展成果几乎扫除了很多科研领域里的技术障碍。在接下来的十年里，单分子技术与其它新兴生物技术的融合将为我们这些敏锐的、极富创造力的科研工作者提供很多无法想象的机会。

#### 原文检索：

(2014) Ten years of *Methods*. *Nature Methods*, 11(10): 1000-1001

John D McPherson. (2014) A defining decade in DNA sequencing. *Nature Methods*, 11: 1003-1005.

Peter Karagiannis & Shinya Yamanaka. (2014) The fate of cell reprogramming. *Nature Methods*, 11: 1006 -1008.

Charles A Gersbach. (2014) Genome engineering: the next genomic revolution. *Nature Methods*, 11(10): 1009-1011.

Michael H usser. (2014) Optogenetics: the age of light. *Nature Methods*, 11(10), 1012-1014.

Taekjip Ha. (2014) Single-molecule methods leap ahead. *Nature Methods*, 11, 10: 1015-1018.



EASON、筱玥 & Dee /编译



BIOTECH CHINA

中国(南京)国际生物医药产业博览会  
The All China Biotech Conference & Exhibition

南京

NANJING

2015.09.03-05

国际博览中心

Nanjing International Expo Center



★ 规模盛大:

15000平米, 397参展商, 5733买家, 3000万美金交易额

★ 行业鼎力支持:

110余家协会、学会支持

★ 境外展商云集:

14个国家和地区的48家境外企业参展, 境外买家来自28个国家和地区

★ 媒体密集关注:

102家合作媒体, 卫视面向全国报道展前新闻发布会和展会现场盛况

★ 高端同期论坛:

主论坛外商参会比例突破60%, 同期举办近10场论坛、会议、沙龙、推介



请扫描二维码关注

我们敬候您光临展会/会议活动!



☎ 025-68273766

即刻登录

www.biotechchina-nj.com Go

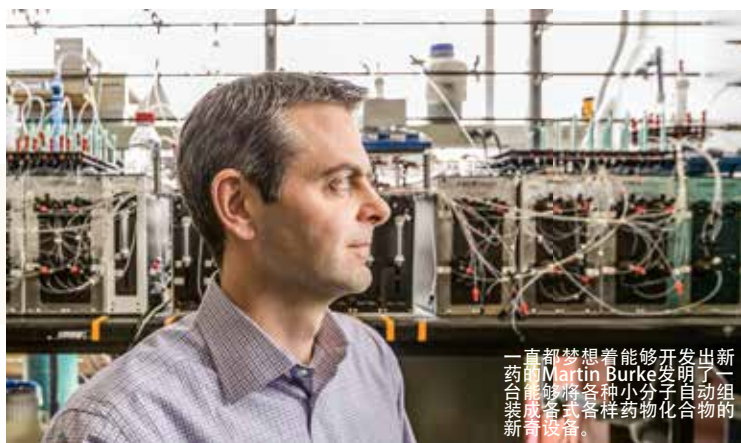
进行参观预登记, 与超过8000名行业精英共同参与生物医药行业盛会!

中国生物医药领域的  
“五星级”品牌盛会!

# 热点

*Hot Topics*

## 自动化合成仪



一直都想着一台能够自动合成新药的机器。Martin Burke发明了一组能够将各种小分子化合物组合成各种药物的设备。

一台能够自动合成有机小分子的设备将给药物开发工作带来革命性的改变。

在大部分科学学科里，有机化学（organic chemistry）是最折磨人的一门学科。这门学科里有太多令人眼花缭乱的分子、

元素、化学键、化学反应以及各种化学试剂。除此之外，还需要记忆大量的反应步骤，在实验室里从事繁重的试验工作，彻夜不眠地守着

一大堆瓶瓶罐罐，等着看反应结果。后面还有分离、纯化、分析等工作。即便是让该领域的专家来合成某种有机分子也是非常费力的。

不过美国伊利诺伊大学香槟分校（University of Illinois, Urbana-Champaign）的 chemist Martin Burke 觉得他们可以改变这种现状。为了实现这一目标，他决定将我（Robert F. Service，原文作者）这样一名化学新手训练成一名合成 chemist（synthetic chemist）。

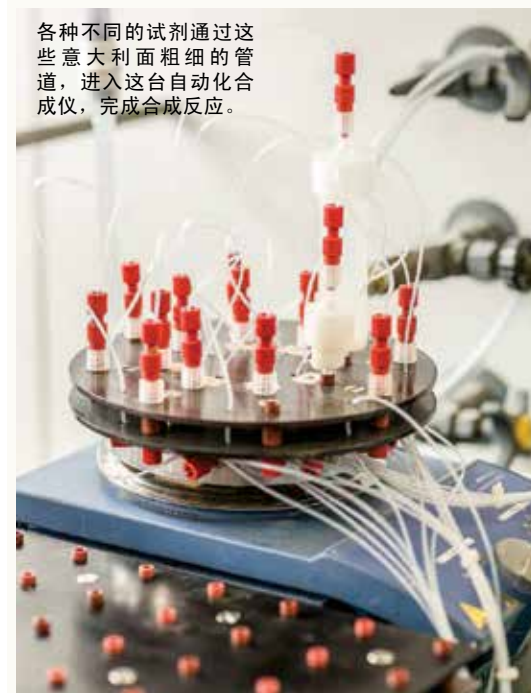
Burke 将我带到了美国伊利诺伊大学香槟分校 Roger Adams 试验大楼的 456 房间，我们直接走到一张黑色的试验台前。这张试验台上有一台奇怪的仪器，大小看起来和星巴克里那种能够调制 espresso 咖啡的咖啡机差不多。在这台仪器上方还搁了两个大铝架子，架子上钻满了 2.4 cm 见方的小洞，用来插试剂瓶。一堆细塑料管将仪器的各个部件连成了一体。这台仪器看起来非常复杂，但是基本的操作原理却很简单，这就是一架化学版的高速公路苜蓿叶式立体交叉立交桥（highway cloverleaf），它能够把各条通道上的反应元素和产物混合到一起。Burke 和他的学生们将这台仪器叫做“那玩意”。

Michael Schmidt 是 Burke 实验室里的一名二年级研究生，他给了我一份合成 crocacin C 的配方。crocacin C 是 3 名澳大利亚科学家在 2000 年时首次合成出的一种抗真菌药物。1 号试剂瓶里装了一点白色的结晶状粉末，2 号试剂瓶里则装了另外一种白色的结晶状粉末，每一个试剂瓶都连接着对应序号的试剂槽。Schmidt 让我将几根意大利面粗细的试管与设备联接，然后注入水、有机溶剂、空气和氮气等反应元素。最后我按下了在试验台桌面上摆着的一台戴尔笔记本电脑里的“启动”按钮，我的活就干完了。

仪器开始工作。一阵呼呼声响过之后，这台自动化设备就完成了好几十道工序，包括准备（preparing）、反应（reacting）、纯化（purifying）、洗涤（washing）等；准备、

反应、纯化、洗涤；……如此反复好多轮。两天之后，Burke 给我发来了一封电子邮件，告诉我操作的整个化学合成反应已经完成了，我一共得到了 8.6 毫克的米黄色粉末状 crocacin C 产物。

这台由 Burke 等人发明的自动化合成仪除了能够合成 crocacin C 之外，还能够合成很多其它化合物。据 Burke 等人在《科学》（Science）杂志上介绍，他们已经使用这台自动化合成仪合成出了多种化合物分子，比如线状分子、环状分子、碗状分子等不同形状分子，这些分子里都含有各种各样扭曲的化学键。与自动化 DNA 合成仪一样，这台自动化合成仪的工作原理也是将各种元件组装在一起。由于市面上已经可以买到成千上万种商业化的化学元件，所以从理论上来说，使用这台自动化合成仪可以合成数十亿种不同的有机化合物分子，以作为新药、农药，或新材料开发的候选分子。



各种不同的试剂通过这些意大利面粗细的管道，进入这台自动化合成仪，完成合成反应。

“这真是一项了不起的新技术。这是小分子合成方向上的一大进步。”

——加拿大皇后大学有机化学家 Cathleen Crudden

加拿大皇后大学 (Queen's University in Kingston, Canada) 的有机化学家 Cathleen Crudden 认为这是一项了不起的新技术, 这是小分子合成方向上的一大进步。德国马克斯普朗克胶体和界面研究所 (Max Planck Institute of Colloids and Interfaces in Potsdam, Germany) 的 Peter Seeberger 也赞同, 他认为这是一个有重要意义的里程碑, 未来还会出现更多、更新的进展。Seeberger 是自动化合成仪器行业的先锋人物, 他开发的自动化合成仪主要用于合成另外一种分子, 即覆盖在很多蛋白质和脂质上的寡聚糖链分子 (oligosaccharide sugar chains)。Seeberger 等人表示, 随着自动化技术的不断发展, 生物学家和很多其他领域的科学家都将能够从中获益, 获得更多的、各种各样的新分子, 而有机化学家也将从繁重的合成工作中解脱出来, 攻克其它更有价值的课题。Seeberger 表示, 他们的自动化设备越好用, 越更加容易走进每个人的实验室, 也会对科学研究带来更大的帮助。

从19世纪20年代首次合成有机化合物分子以来, 有机化学界就一直在拒绝自动化设备。最早的例外是生物高分子多聚物 (biopolymers), 即由少量元件通过同一种化学键连接起来的化合物。由于只涉及到一种化学键, 所以这种反应就好像挂火车车厢一样, 想挂多少个车厢就挂多少个车厢。到了今天, 这种合成仪已经能够合成出 DNA 寡聚核苷酸链 (oligonucleotides)、蛋白多肽 (peptides) 和寡聚糖链分子 (oligosaccharides)。

这种自动化合成仪给有机小分子合成带来了巨大的改变。根据MarketsandMarkets商业研究机构的预测, 到2019年时, DNA寡聚核苷酸链合成的业务规模将达到17亿美元。而同期多肽类药物合成的年销售额则将超过140亿美元。英国南安普顿大学 (University of Southampton in the United Kingdom) 的有机化学家 Richard Whitby 表示, 如果你也能

用小分子做同样的工作, 那么也将产生巨大的影响。这不仅仅因为这些分子是制药企业的骨干和支柱, 同时也是其他诸多行业, 比如染料业、农药业、发光材料业和生物探针业等行业所必需的原料。

这一切在过去看来都几乎是不可能实现的, 因为小分子几乎有无数种形状。比如最近刚刚发表的一篇文章就对仅仅含有碳元素、氧元素和氮元素这三种元素的小分子数量进行了一番估算, 结果发现达到了 $10^{60}$ 种不同的组合, 这要比宇宙中的原子数量还要多。据 Crudden 介绍, 如果要将更加复杂的化合物分子连接到一起, 则需要更多的反应。

合成有机分子可要比挂车厢复杂多了, 更类似于打家具。木匠能够使用各种不同的木材, 用榫卯、接头及榫槽等结构进行拼接和组装。有机化学家也一样, 必须保证用恰当的方式、合适的方向将不同的组件组装在一起。如果将某个碳原子的方向装反了, 本来应该向内却装成向外了, 那就好比将一把椅子的一条腿装成朝上了, 这种产物就完全不能用了。因此, 除了几种非常常见的商业化化学反应能够自动化完成之外, 有机化学家现在在合成复杂的产物时, 还是每一次只完成一个反应, 慢慢地完成数十个, 甚至是数百个反应, 得到最终的化学产物。大部分合成化学家都认为, 有条不紊、按部就班才是保证不出错的唯一方法。“这也是我们这180多年来一直都奉行的宗旨。” Burke 说到。

Burke 有着与长跑运动员一样修长的身材, 同时也具备与马拉松选手一样的毅力和恒心。1998年时他还在哈佛大学上研究生, 当时他遇到了一位22岁的女性囊性纤维化病 (cystic fibrosis) 患者。囊性纤维化病是一种因为细胞膜上缺失了一种离子通道蛋白而导致的疾病。由于缺乏这种通道蛋白, 患者肺部组织里的盐离子平衡被打破, 患者极易发生肺部感染。这位阳光、健谈的患者向 Burke 详细了解了囊性纤维化病的各种信息, Burke 也告诉她是因为哪个基因发生突变才使她患上这种

疾病的。最后这位患者问道，既然医生对这种疾病这么了解，为什么还治不好她呢？“就是那次谈话彻底改变了我的人生。” Burke回忆道。

Burke也知道，现代医学的主要治疗手段都是抑制过度活化的蛋白质，但是基本上还没有弥补过一个缺失的蛋白质。不过他也知道，在某些时候，小分子药物能够起到相同的替代作用。他之前在哈佛大学上过的一堂有机化学课就介绍过这种小分子药物——两性霉素B（Amphotericin B, Amph B），这是一种由细菌合成的抗真菌药物。两性霉素B单体不断聚合生成的多聚体与细胞膜组份脂质分子（sterols）一起，可以形成一个离子通道。科学家一直以来都认为，两性霉素B就是通过这种方式，在真菌细胞上形成“穿孔”，才能够起到杀死真菌的作用的，不过这一理论一直没能得到试验的证实。不论其作用机制如何，两性霉素B都挽救了无数严重真菌感染患者的生命。可不幸的是，这种药物的毒性也非常强，会给很多患者带来非常严重的副作用。

Burke在2005年拿到了他的博士学位。当时他就想找出两性霉素B的杀死真菌的作用机制，然后对其进行分子改造，降低其毒副作用。不过他的远期目标则更加宏大，他希望掌握两性霉素B形成离子通道的机制，来帮助囊性纤维化病患者。如果他成功了，那么就能够为囊性纤维化病患者“装上”一个人工离子通道，恢复他们肺部的正常离子平衡，也许不能完全达到和我们正常人一样的水平，但是也应该足以让这些患者的健康状况得到很大的改善。

但是最初的设想很快就碰到了障碍。据Burke介绍，他们很快就发现，问题的瓶颈在于合成工作。两性霉素B是一种非常复杂的分子，含有超过38个碳原子，而早在1987年发表的两性霉素B合成方法中就涉及100多个合成步骤，这也是到目前为止唯一的一种两性霉素B合成方法。如果要合成足够多的两性霉素B及其变体，然后开展试验，了解其形成离

子通道的机制，这即便不需要几十年的时间，也至少需要很多年。

为此，Burke非常羡慕他的好朋友——哈佛大学的博士研究生Rahul Kohli。因为Kohli研究的对象是环状多肽生物大分子的生物活性。每个周末，Kohli和Burke都会到美国马萨诸塞州坎布里奇市的Cellar酒吧去喝一杯。

“我每次都会对Kohli的试验进度之快表示膜拜。” Burke回忆。Kohli的优势就在于他们拥有自动化合成仪，能够合成出一大堆多肽文库，供他开展试验。“就在我们喝酒的同时，他实验室里的多肽合成仪就给他又制造出了一堆多肽，我当时真是嫉妒得要命，同时我也在想，‘我们该如何像他这样自动合成出一堆化学小分子呢？’” Burke继续回忆。

Burke意识到，Kohli的自动化多肽合成仪所使用的很多氨基酸元件的结构也都非常复杂，它们有着各种各样的性状，大小也都各不相同，有一些还有一个或两个环状侧链，有一些又没有这些“装饰物”。但是这台自动化合成仪却能够用一种化学键将它们通通连接起来。Burke指出，所有的复杂性全都在氨基酸原料上，可是你能够买到所有的氨基酸原料。

**26万**

已知的  
小分子  
天然化合物

**70-75%**

的化合物可以  
在5000种MIDA硼酸基反应  
元件的基础上，用自动化  
合成仪合成出来

**200种**

商业化的  
MIDA硼酸基  
反应元件（市面上）

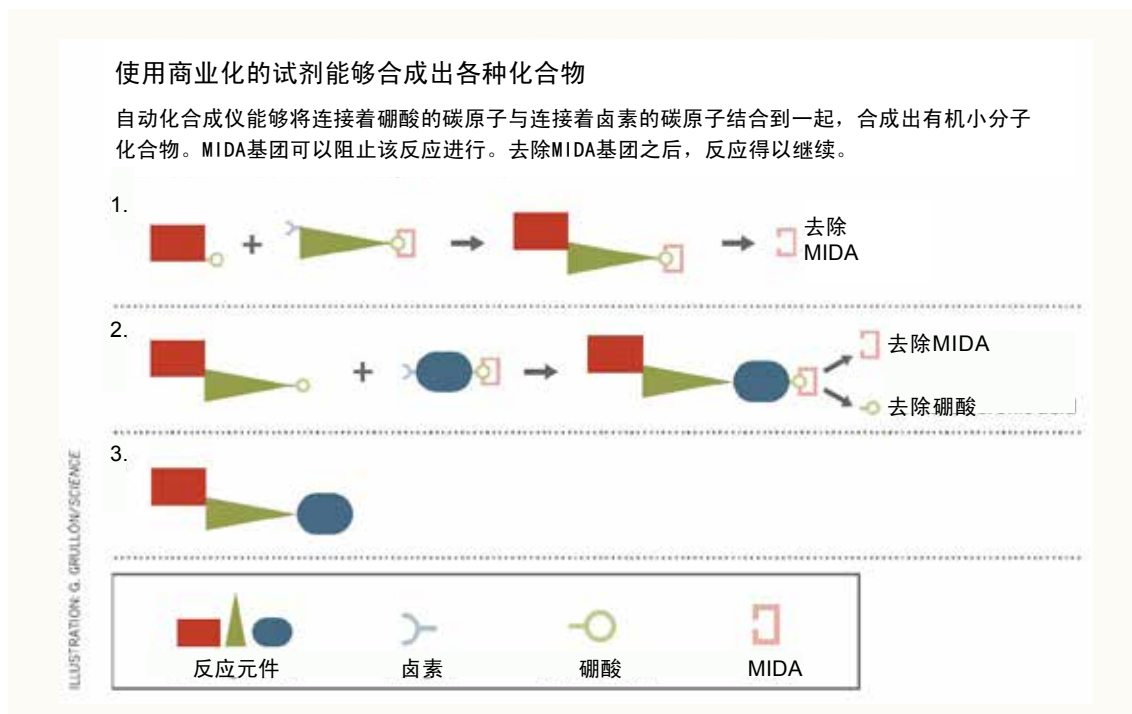
那么可以用这种方法来合成有机小分子化合物吗？在拿到博士学位之后，Burke决定也来试试。他在找工作的同时拿出了自己的试验计划。“在我到美国伊利诺伊大学香槟分校面试的那天，他们就向我发出了邀请，我也当场答应了下来。”Burke回忆。从那天起，他也就一直为他的科研计划而努力着。

第一项任务就是找到能够将各个元件连接到一起的最佳反应。答案看起来好像很简单。早在20世纪70年代，日本北海道大学（Hokkaido University）的化学家Akira Suzuki就发现用金属钯（palladium）做催化剂，能够将两个分子上的碳原子连接起来，而且只是将碳原子连接起来。Suzuki的诀窍就是先用硼酸（boronic acid）将其中一个分子上的碳原子修饰一下，然后用碘（iodine）或溴（bromine）等卤素对另外一个分子上的碳原子进行修饰。接着在金属钯催化剂的拉近作用下，将硼酸修饰的碳原子与卤素修饰的碳原子连接起来，同时释放出硼酸和卤素。据Seeberger介绍，即便到了今天，这种Suzuki反应在有机化学反应中也都是最有效、且应用

范围最广泛的一种反应。

Burke也有自己的诀窍。他能够通过Suzuki反应将两个分子紧密地结合在一起。但是他还有更高的要求，他需要的是可控的反应，他需要的催化剂要能够有效地催化反应的进行，但是又不能够无限制地、随意地催化反应进行。Burke表示，为了做到这一点，他们需要有一个开关样的控制器。

2007年，Burke等人发现，一种名为MIDA的分子能够自动缠绕在硼原子周围，抑制其反应活性。目前，Burke的科研团队能够用一个不含卤素，但是含有硼酸的反应元件开始，然后再加入一个既含有卤素，同时又含有被MIDA包裹的硼酸的反应元件进行合成反应。由于后面加入的反应元件上的硼酸被MIDA包裹、遮蔽，所以无法进行化学反应，所以该元件只能通过其上连接的卤素与第一个反应元件进行连接反应。然后再去掉MIDA，加入第三个既含有卤素，同时又含有被MIDA包裹的硼酸的反应元件，完成反应，去除MIDA，再加入第四个反应元件，如此反复下去。





这种方法的确不错。2012年，Burke等人在《美国科学院院报》(PNAS)上发表了一篇文章，介绍了他们的最新成果。他们用这种方法成功地合成出了两性霉素B的衍生物，该物质虽然不能够形成离子通道，但是同样具备杀真菌的能力。这一研究成果也证实，我们关于两性霉素B杀真菌作用机制的猜测是错误的。两性霉素B并不是通过在真菌细胞膜上打孔的机制杀死了真菌，而是通过与真菌细胞膜上的脂质结合，干扰了胞膜蛋白的正常功能才起到了杀真菌的作用。除了两性霉素B这个成果之外，Burke等人还曾经在2008年时在《美国化学学会杂志》(JACS)上介绍了他们合成出多种聚烯(polyenes)类化合物的工作。之后，他们又计算出，只需要12个MIDA硼酸基反应元件，就可以合成出一共2839种天然聚烯类化合物中75%以上的聚烯类化合物。在这条有机化合物人工合成的赛道上，Burke等人早已扬帆，并且处于领先地位。

但问题是他们还是没能实现自动化操作，依旧使用的是传统的手工合成模式。如果要实现自动化合成，那还需要解决一系列问题。其中最大的问题就是如何进行产物纯化，即将已经完成反应生成的产物与那些部分完成反应的产物、多余的反应元件、试剂等其它物质分离开。

自动化多肽合成仪、DNA合成仪，以及低聚糖合成仪之所以能够取得成功是因为所有这些合成仪使用的反应元件都有一个共同的化学特性(接头)。利用这个化学接头，科学家可以将这些反应元件与某种固定物结合，比如塑料珠。在每一步合成反应结束之后，只需要将这些塑料珠收集起来，洗涤几次，就可以得到纯化的产物。但是在Burke等人开展的工作中，找不到这样一种接头。不过在2008年，Burke等人偶然发现，在同时存在甲醇(methanol)和醚(ether)这两种有机溶剂的情况下，MIDA硼酸基能够与沙样的硅(silica)颗粒结合，当加入另外一种有机溶剂THF之后，它们又会彼此解离。他们终于找

到了解决纯化问题的办法。所以他们现在只需要在一步反应结束之后，将反应体系注入一个含有硅颗粒的纯化柱就可以了。Whitby认为，这个简单的纯化方法就是Burke自动化合成仪取得成功的关键。

Burke和他的学生们很快就投入了自动化合成仪的开发工作当中。大约用了两年左右的时间，他们完成了原型机的设计和改造工作，他们和美国伊利诺伊大学香槟分校的工程师一起造出了自动化合成仪的各个组成部件，并编写出了配套的计算机自动化工作软件。同时，他们还进行了很多其他的改进，比如如何将方向不同的反应元件连接到一起，将链状化合物改造成环状化合物等，这些改进也进一步拓展了该自动化合成仪的功能，使其能够合成出更多的天然有机化合物分子。

我们现在还不清楚，Burke的自动化合成仪究竟能够合成出多少种不同的有机小分子。他们目前可以获得大约5000种反应元件，而世界上目前已知的天然有机小分子化合物大约有26万种，所以Burke估计，他们大概可以合成出其中的70%~75%。Burke指出，如果他们真的能够做到这一点，那么就解决了一直束缚着他们的一大难题——终于不用再浪费大量的时间和精力，去完成人工合成工作，而是可以用这些时间和精力去研究这些有机小分子的功能。他相信有机化学家全都等待着这一天的到来。

但还是有很多有机化学家对自动合成表示拒绝。Seeberger就表示，有很多人都感觉自己受到了威胁。此外，到目前为止，可以在市面上买到的，含有卤素和MIDA硼酸基的商业化的反应元件大约只有200种左右。而其他数千种商业化的反应元件都只含有卤素和硼酸基中的一种，所以只能在第一步和最后一步反应时被加到Burke自动化合成仪里。不过我们相信，会有越来越多的科学家接受这种新鲜事物，也会出现更多的配套反应元件。

Burke并没有被动地等待。他正在使用他的自动化合成仪追逐他最初的梦想——两性

霉素B。据他介绍，他们课题组已经合成出了一种只具备杀真菌作用，而对人体细胞无害的两性霉素B衍生物。因为真菌和人体细胞的细胞膜使用的是不同的脂质成份，Burke等人合成出的这种两性霉素B衍生物只能够与真菌细胞的胞膜脂质麦角固醇（ergosterol）结合，而不能与人体细胞的胞膜脂质胆固醇（cholesterol）结合。他们的这一研究成果已于2013年发表在了《美国化学学会杂志》（JACS）上。这种选择性杀真菌作用至少给实验室里的细胞培养工作带来了一种更好的抗

真菌药物。就在上个月，Burke的课题组将更多的科研成果移交给了Revolution Medicines公司（这是由Burke参与创办的一家新兴生物企业），该公司之前已经获得了商业化开发Burke自动化合成仪的知识产权。

Burke表示，他也已经开始使用他们的自动化合成仪为挽救囊性纤维化病患者做一些事情。他们正在努力合成可以在细胞膜上打孔的两性霉素B衍生物。这项工作还在继续。有机小分子自动化合成仪的序幕也才刚刚拉开。

原文检索：

Robert F. Service. (2015) THE SYNTHESIS MACHINE. *Science*, 347:1190-1193.



Eason/编译

6折  
免费试用

## 荧光染料 / 探针 / 抗体

活动时间：2015年3月10日 — 6月10日

免费试用

### 新型核酸荧光染料：安全无毒

6折

- 安全无毒，无致突变；
- 灵敏度高于EB和SYBR® Safe；适用于前染或后染；
- SafeGreen™、SafeRed™ 与6 × DNA loading buffer 预混，可直接使用；并且具有超高灵敏度。

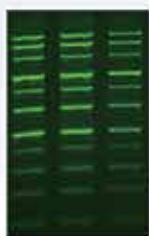


图1. GreenView Plus的琼脂糖凝胶染色示意图。

货号	产品名称	激发/发射波长	灵敏度	目录价/规格	促销价
N100	GreenView™ DNA Gel Stain	488/530 nm	1~2 ng dsDNA	¥400 / 500 µL	¥240
N101	GreenView™ Plus DNA Gel Stain	488/530 nm	200 pg dsDNA	¥600 / 500 µL	¥360
N103	GreenView™ Ultra DNA Gel Stain	488/530 nm	50 pg dsDNA	¥800 / 500 µL	¥480
N102	RedView™ DNA Gel Stain	300/600 nm	1~2 ng dsDNA	¥600 / 500 µL	¥360
D012	SafeGreen™ Loading Dye	488/530 nm	50 pg dsDNA	¥300 / 1 mL	¥180
D013	SafeRed™ Loading Dye	300/600 nm	200 pg dsDNA	¥300 / 1 mL	¥180

免费试用

### eLuminol™ 蛋白荧光染料

6折

eLuminol™ 蛋白荧光染料是GeneCopoeia公司最新研发的总蛋白荧光染色液。

- 极高灵敏度（0.25 — 1ng），且宽广的线性范围；
- 染色操作简单，耗时短；
- 与标准仪器兼容性好；
- 产品质优价廉，性价比高；
- 非常稳定，可常温保存。

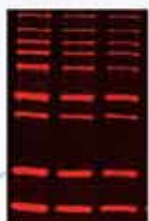


图2. eLuminol蛋白胶荧光染色示意图。

货号	产品名称	规格	目录价	促销价
P003A	eLuminol™ 蛋白胶荧光染色液	0.5 mL	¥600	¥360
P003B	(1,000 ×)	1 mL	¥1,000	¥600

免费试用

## 细胞结构和细胞器荧光探针

6折

探针种类齐全，选择多样，性能卓越，价格实惠！

- 细胞核、细胞质、细胞膜、细胞骨架、溶酶体、线粒体、内质网、高尔基体荧光探针；
- 与不同仪器兼容的探针；
- 膜通透性和膜不通透性荧光探针。

了解详细产品目录与信息、申请试用装等，您可以  
咨询当地经销商，

或拨打4006-020-200，

或登录官网：<http://www.igenebio.com/category/product/fluorescent-labeling-and-detection/>

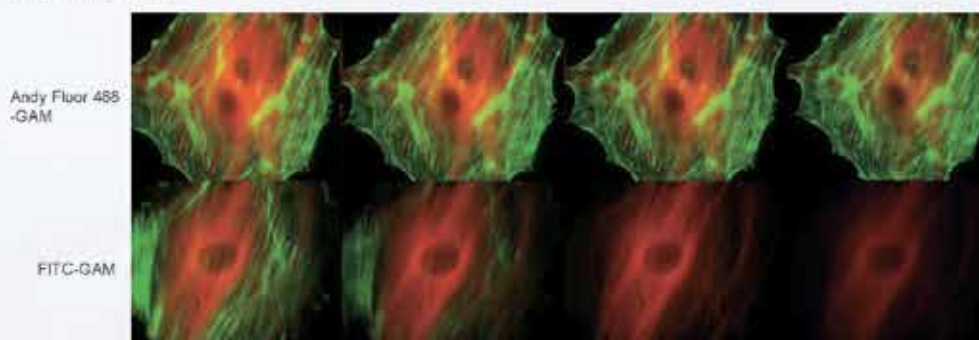
免费试用

## 荧光标记二抗

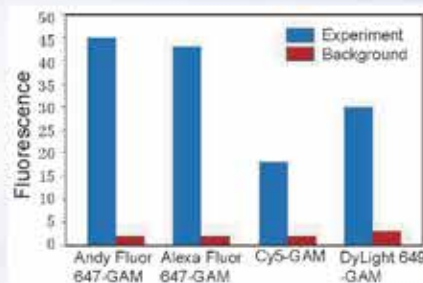
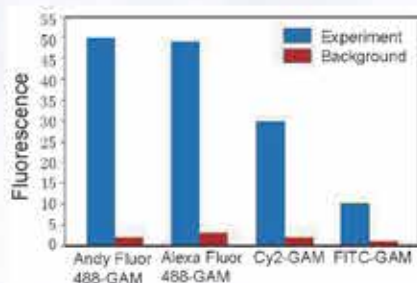
6折

Andy Fluor标记的二抗或Streptavidin（链霉亲和素），信号强、稳定性好、背景信号弱。

- 荧光稳定性好



- 荧光信号强、背景信号弱



了解详细产品目录与信息、申请试用装等，您可以  
咨询当地经销商，

或拨打4006-020-200，

或登录官网：<http://www.igenebio.com/product/labeled-secondary-antibodies/>

**GeneCopoeia, Inc.**

Tel: 4006-020-200 020-32068595

Email: [sales@igenebio.com](mailto:sales@igenebio.com)

Web: [www.genecopoeia.com](http://www.genecopoeia.com)

[www.igenebio.com](http://www.igenebio.com)



# 百态

*Amazing Lives*

## 蜥蜴以昼夜节律改变体色

拥有改变肤色的能力是极其有用的。比如，有些动物会利用色素的动态变化来向潜在的配偶或者竞争者发出信号，有的则利用变色来自我伪装，与环境融为一体，以躲避天敌的袭击。然而你知道吗？体色的改变还有助于调节动物的体温，使身体根据需要吸收较多（或较少）的热量。对于变温动物而言，这最后一种功能尤为重要，因为它们几乎全靠依赖外源性热量来维持最适体温。那么，变色和体温有什么关联呢？原来，较深色素的反射率较低，可以促使动物从阳光中吸收更多的热量；相反，较浅的肤色反射率较高，会减少热量的获取。据此，人们已证明了某些变温动物会在一日之中发生体色变化：早晨时分，较深的肤色明显有助于沐浴阳光；随着气温的升高，热量吸收的需求下降，肤色变浅。而今，大家都知

道变温动物拥有这种色素的周期性变化现象，但激发它们变色的机制又是什么呢？目前仍在探究中。



有个假说认为，光周期可能与蜥蜴（lizard）产生体色变化有关。为了验证这个假说，澳洲墨尔本大学（University of Melbourne）的Marie Fan等人训练内陆鬃狮蜥（inland bearded dragons, *Pogona vitticeps*）去适应四种不同的光周期（分别是24小时全黑、每日光照6小时、12小时和18小时），并观察其结果。这种内陆鬃狮蜥是一种体型很大、魅力十足的澳洲蜥蜴，因此前的研究（证明它们可利用体色变化来协助调节体温）而闻名，所以是验证所提理论的理想之选。此外，Fan等人还想弄清一件事：蜥蜴皮肤中的色素是根据环境指标的变化而迅速做出反应、发生变化（比如在光亮条件下变色）呢；还是在昼夜节律（每日）生物钟的调控下发生变化？为此，研究小组从野外捕捉了许多鬃狮蜥，并将它们带回实验室，分别置于恒温下的四种光周期实验条件中3日。并在第3日对蜥蜴进行72小时的皮肤反射率测试，期间

每3小时测一次，这使他们观察到了发生在蜥蜴皮肤中的一昼夜的变化，从而确定了它们的任何色素波动变化背后的明确节律。

研究小组发现，蜥蜴的色素变化与光周期一致：在黑暗中肤色变浅，在白日中变深。而在可变的光照条件下，体色变化的时间点反映了人为设置的白日和黑夜：最大反射率（体色最浅的时候）正好出现在黑暗时相的起始之后。甚至在蜥蜴被置于黑暗中24小时的情况下，这种昼夜节律仍然会保留。上述发现表明，鬃狮蜥体内的生物钟不仅能控制它们的体色变化，而且还能被光周期的变化操控和诱导。昼夜节律的存在，使蜥蜴能通过预知环境指标的变化，进行体色改变。这种色素的变化会导致蜥蜴在白日活动的时相中体温升高，表明鬃狮蜥的体色变化能控制其热量调节作用。不过，到底是什么直接激发了它们的体色变化？在可变的环境条件下，昼夜生物钟是否会做出不同的反应？这些问题依然有待发掘。

原文检索：

Fan, M., Stuart-Fox, D. and Gadena, V. (2014). Cyclic colour change in the bearded dragon *Pogona vitticeps* under different photoperiods. *PLoS ONE* 9, e111504.



文佳/编译

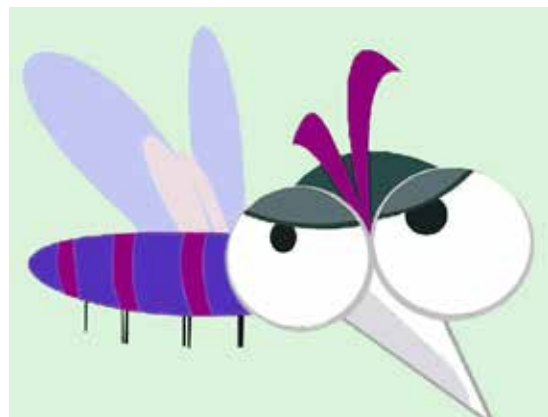
## 蚊子利用生物钟调控冬季滞育期

对于某些生物而言，在冬季生存实在是一个太过严峻的考验，以致无法停下所有事务去安心休眠。尖音库蚊（Northern house mosquitoes, *Culex pipiens*）就是一个很好的例子。为了明年开春能尽快恢复生产，一旦日间时长达到一定程度，成蚊就开始为季节性繁殖滞育期（diapause）做准备了。对此，美国俄亥俄州州立大学（Ohio State University）的Megan Meuti表示，目前，人们对伴随整个滞育期并起调控作用的光周期、内分泌信号和生理改变已有丰富的了解。然而，对于蚊子如何测量日间时长，如何将相关信息转化为激素信号，以精确地协调自身的滞育期，还知之甚少。当然，我们也知道，许多昆虫都能利用受光线调控的昼夜生物钟来调控身体的各种功能，可尖音库蚊是否也用这套机制来激活滞育期的准备工作呢？目前仍不清楚。因此，Meuti及其同事Mary Stone、Tomoko Ikeno和David Denlinger开始研究日间时长对蚊子昼夜生物钟关键部分的影响情况。

研究小组解释说，分子生物钟的五个组成部分（*Clock*、*cycle*、*period*、*timeless*和*cryptochrome2*基因）表达水平的上升和下降都与日间光照超过24小时有关。而在蚊子的滞育期间，这个生物钟是否仍在运行呢？这是他们想要考量的问题。于是，研究小组测量了成年雌蚊（已分别暴露于日间光照条件下不同的时长）的*period*、*timeless*、*cycle*和*cryptochrome2*基因在其脑中的表达情况，来估算滞育期开始和持续的时间。结果发现，它们的mRNA水平仍在不断地循环——哪怕深陷冬眠之中也是如此。对此，Meuti表示，生物钟只有全年行使职责，才能确保蚊子知道何时该从滞育期中恢复过来。她还表示，他们的观

察支持了一个观点：昼夜节律原理适用于尖音库蚊的滞育期初始阶段和持续阶段，表明基因转录的节律性波动很可能与蚊子在滞育期间持续测量夜间时长有关。不过，研究小组发现，*cryptochrome*基因的表达在滞育期结束时发生了反转（即夜间达到高峰），这使得他们感到有点费解，只能推测这种现象反映了蚊子的此种生理活动在清晨时分最为活跃。

研究小组明确了蚊子的昼夜生物钟可在调控滞育期中起作用，随后开始研究它们的每个部分所起的特定作用。他们为蚊子注入一种RNA分子（被设置为可关闭mRNA功能），以阻止生物钟的某个特定部分转录到刚成年的雌性蚊子体内，然后监控这部分的缺失对雌蚊脂肪和繁殖力的影响情况。结果发现，经历了短时日间光照的雌蚊——本应诱生滞育期的——却无法进入滞育期，同时，转录*period*、*timeless*和*cryptochrome*基因的mRNA水平都降低了。而当研究小组使分子生物钟基因的其它组成部分（色素扩散因子，pigment dispersing factor）失活时，哪怕是经历了长时间的日间光照条件，也无法激活蚊子的滞育期，从而也就无法进行原本能够进行的繁殖活动。



Meuti等人的研究结果显示，昼夜生物钟启动了尖音库蚊的滞育期。Meuti还表示，他们通过测量日间时长，研究蚊子能在冬天生存下来的生理机制，搞清了整条影响蚊子滞育期的通路。这项研究不仅有趣，而且还有深远的意义。由于尖音库蚊是多种疾病（如

西尼罗河脑炎病毒（West Nile virus）、圣路易脑炎（St Louis encephalitis）和丝虫病（filariasis）的携带者，Meuti希望能利用这一研究成果——抑制蚊子的冬季滞育期，或者在其它季节启动它们的滞育期——来对抗蚊子，以达到控制疾病传播的目的。

原文检索：

Meuti, M. E., Stone, M., Ikeno, T. and Denlinger, D. L. (2015). Functional circadian clock genes are essential for the overwintering diapause of the Northern house mosquito, *Culex pipiens*. *J. Exp. Biol.* 218, 412-422.



文佳/编译



# 当qPCR试剂 遇见 表达克隆



## 它们降价了!

活动时间: 2015年3月10日-2015年6月10日

### miRNA 定量检测 **20% OFF**

产品名称	货号	目录价	促销价
RNAzol® RT RNA Isolation Reagent	E01010A	¥800	¥640
All-in-One™ miRNA First Strand cDNA Synthesis Kit	AMRT-0020	¥1,380	¥1,104
	AMRT-0050	¥3,105	¥2,484
All-in-One™ miRNA PCR Kit	AMPR-0200	¥1,100	¥880
	AMPR-0600	¥3,135	¥2,508
	AMPR-1200	¥5,940	¥4,752
All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit	AOMD-Q020	¥2,380	¥1,904
	AOMD-Q050	¥5,680	¥4,544
miRNA Universal Adaptor PCR Primer	P01011A	¥660	¥528
miRNA qPCR Primers	上游特异引物	¥200	¥160
	内参引物	¥200	(一次购满5条)

备注: 一次性购满5条miRNA qPCR引物才可享受促销价(160元/条)。

### mRNA 定量检测 **40% OFF**

产品名称	货号	目录价	促销价
All-in-One™ qPCR mix	AOPR-0200	¥555	¥333
	AOPR-0600	¥1,580	¥948
	AOPR-1200	¥2,997	¥1,800
All-in-One™ First Strand cDNA Synthesis Kit	AORT-0020	¥360	¥216
	AORT-0050	¥810	¥486
	AORT-0100	¥1,440	¥864
mRNA qPCR Primers	基因上下游引物	¥200	¥120
	内参引物	¥200	¥120

# 购 表达克隆，就为了 **省**！

**40,000**个人/小鼠基因、**150+** 种载体可选，保证序列！

GeneCopoeia专注于基因功能研究领域10多年，是NCBI推荐的克隆供应商。

全球累计引用克隆产品

**1000+ 篇SCI**  
**20分以上 40+ 篇**

畅销克隆 **特惠！即日送货！**

克隆类型	载体	标签	促销价	
			< 500 bp	> 500 bp
哺乳动物载体表达克隆	M02	Native	¥980	询价
	M13	c-Flag	¥980	
	M98	c-eGFP (monomeric)	¥980	
慢病毒载体表达克隆	LV105	Native	¥980	
	LX304	C-V5	¥980	
穿梭克隆	Entry克隆 attL位点与ORF间含MCS	和Gateway®克隆技术兼容	¥980	
ORFome	Entry克隆	和Gateway®克隆技术兼容	¥480	¥980



扫一扫，关注官方微信号：**易锦生物**

**GeneCopoeia, Inc.**

Tel: 4006-020-200 / 020-32068595  
Email: sales@igenebio.com  
Web: www.genecopoeia.com  
www.igenebio.com

A group of people are performing a human pyramid against a cloudy sky with a bright sun. The pyramid consists of four people standing on the ground, two people standing on their shoulders, and one person standing on the shoulders of the two people in the middle. The text is overlaid on the image in a bold, red font with a white outline.

**合办专题专刊**  
**网站广告合作**  
**邮件群发推广**

请致电 (020) 32051255



[www.LifeOmicS.com](http://www.LifeOmicS.com)

[www.LifeOmicS.com](http://www.LifeOmicS.com)