

# 生命奥秘

LifeOmics

2017年 4月刊 总第94期



2016年Nature Methods年度技术：  
表观转录组分析

科研项目里的那些“大词”

苍蝇为什么会特别喜欢某种“重口味”？

无奇不有  
生命世界

解读生命  
走进科学



# 目录 CONTENTS

## 专题

### 2016年Nature Methods年度技术：表观转录组分析

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| 前言 .....                                              | 01 |
| 一、表观转录组分析 .....                                       | 02 |
| 1. 喜忧参半的表观转录组学 .....                                  | 02 |
| 2. 生殖细胞与多潜能干细胞的RNA可逆性修饰 .....                         | 07 |
| 3. 测序技术：揭开RNA修饰的神秘面纱 .....                            | 15 |
| 二、值得关注的重要技术与方法学领域的发展 .....                            | 28 |
| 1. 全球代谢组学技术（Global metabolomics） .....                | 28 |
| 2. 膨胀显微技术（Expansion microscopy, ExM） .....            | 29 |
| 3. 靶向RNA的新型CRISPR系统（CRISPR targets RNA） .....         | 29 |
| 4. 低温电子断层扫描术（cryo-electron tomography, cryo-ET） ..... | 30 |
| 5. 捕捉微生物的相互作用（Capturing microbial interactions） ..... | 30 |
| 6. 更快的脑部成像技术（Faster brain imaging） .....              | 31 |
| 7. 单细胞如何发挥作用（How single cells do it） .....            | 32 |
| 8. 类器官培养（Organoid culture） .....                      | 32 |

下一期（2017年4月刊）预告：2016年Nature Methods年度技术：表观转录组分析（Epitranscriptome analysis）

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。2016年，表观转录组分析（Epitranscriptome analysis）荣膺*Nature Methods*年度生命科学技术。这一期专题将会详细介绍相关内容。

## 热点

|                    |    |
|--------------------|----|
| 科研项目里的那些“大词” ..... | 36 |
|--------------------|----|

## 百态

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 苍蝇为什么会特别喜欢某种“重口味”？ ..... | 43 |
| 狼蛛三对“计步器”眼睛的作用 .....     | 45 |

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。

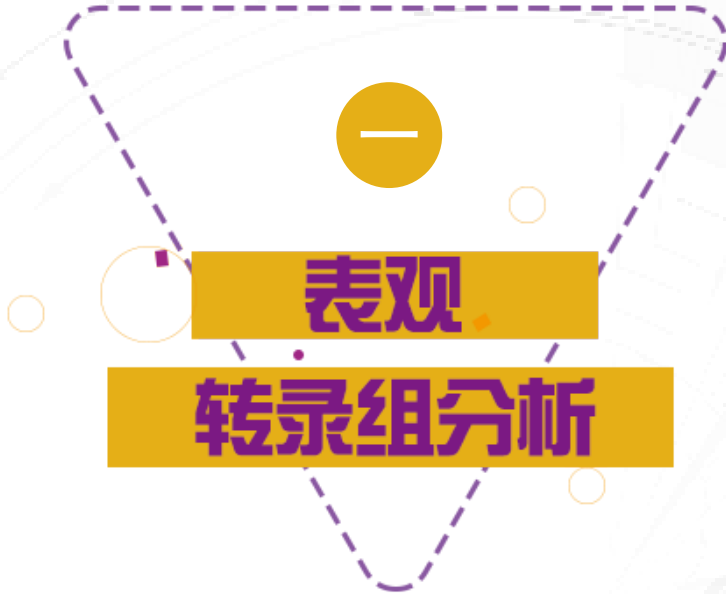


# Worthy issues 专题

## 2016年Nature Methods年度技术： 表观转录组分析

### 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。2016年，表观转录组分析（Epitranscriptome analysis）荣膺*Nature Methods*年度生命科学技术。下文将介绍自20世纪60年代RNA修饰被首次发现以来，相关转录组技术的发展历程，同时指出了这些技术的优缺点，并讨论了RNA修饰在干细胞内发挥了哪些功能重要性。



# 表观 转录组分析

## 1. 喜忧参半的表观转录组学

研究人员发现了一系列在基因调控中起关键作用的RNA修饰，但我们对这些修饰仍然知之甚少。

在这个“组学”层出不穷的时代，基因组、转录组、蛋白质组、代谢组、表型组学、表观组学让人眼花缭乱。这里我们要介绍的是epitranscriptome，即表观转录组学，指的是RNA上丰富的化学修饰。最近的研究揭示，很多RNA修改是普遍存在、进化保守，并具有重要功能的。表观转录组学专家们建议，表观转录组学领域也需要开展多个像人类基因组计划之类的全球合作项目。

据以色列威兹曼科学院(Weizmann Institute of Science)的Schrage Schwartz回忆，他们已经得到了很漂亮的RNA修饰图谱。Schwartz在博士后期间参与了第一批RNA修饰图谱绘制工作。2012年，他所在团队绘制了RNA上N-甲基腺苷( $N^6$ -methyladenosine,  $m^6A$ )修饰的图谱。他感慨地指出，这种开拓性的工作非常刺激！他感觉自己就像探险家，就像哥伦布发现新大陆一样——不过他是坐在电脑前，寻找基因组的新大陆！

1965年，研究人员发现某些尿苷被转化为“第五核苷酸”——假尿苷，他们开始意识到

RNA存在转录后修饰。20世纪70年代，密歇根州立大学(Michigan State University)的Fritz Rottman团队证实， $m^6A$ 存在于蛋白质编码信使RNA(mRNA)中。此后，新发现的RNA修饰的数量一直稳步上升，但几十年来，这些修饰的功能研究一直进展甚微。对mRNA的研究尤其如此，因为检测到的RNA修饰多存在于含量更多、更稳定的转移RNA(tRNA)和核糖体RNA(rRNA)中。

人们对这些RNA修饰的研究深入揭示了它在局部结构、功能和稳定性上的影响，但目前对其基因组、细胞乃至机体等整体的影响尚不明确。20世纪90年代，人们如火如荼地开展表观转录组学领域的研究，但往往以失败告终。约翰内斯·古腾堡大学(Johannes Gutenberg-Universität Mainz)研究RNA修饰的Mark Helm指出，当时每个人都在说tRNA如何无聊。他申请基金和投稿论文时，也会收到这种评价。直到最近，大家才意识到，原来RNA修饰这么酷！

## 甲基化

一系列围绕开m<sup>6</sup>A开展的里程碑式研究为RNA修饰领域注入了新的活力。90年代末，康奈尔大学威尔医学院(Weill Medical College of Cornell University)的Samie Jaffrey对RNA修饰非常感兴趣。据他回忆，当时有一些非常有趣的发现，但不知为何整个领域突然就受到冷遇了。1978年曾有一项研究非常有力地表明，m<sup>6</sup>A似乎与mRNA的稳定性有关。然而，之后RNA修饰领域就进入了寒冬，基本上研究人员都放弃研究它了，甚至分子生物学教科书上都没有m<sup>6</sup>A这样的字眼。Jaffrey与许多研究人员谈过，他们担心这些发现只是假象，但是又缺乏工具去深入研究。

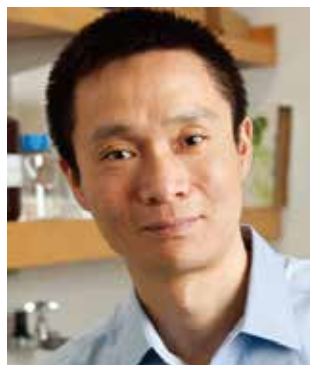
2011年，RNA修饰领域有了一个重大突破！芝加哥大学(University of Chicago) Chuan He等人发现，脂肪和肥胖相关蛋白(fat mass and obesity-associated protein, FTO)能让RNA去甲基化，也即扮演了RNA修饰的“橡皮擦”(擦除RNA修饰)的角色。Jaffrey团队即将发表的论文显示，FTO不能在体内有效去除m<sup>6</sup>A，而是靶向与m<sup>6</sup>A化学上相似的RNA修饰——N(6)，2'-O-二甲基腺苷。然而，他们后来确定了第二种“橡皮擦”蛋白——ALKBH5，ALKBH5似乎能特异性地删除m<sup>6</sup>A修饰。早在20世纪90年代末，Rottman等人就发现了m<sup>6</sup>A的主要“写入者”——某种RNA修饰酶。但当时他们对这些RNA修饰的功能一无所知。随着这些“橡皮擦”被发现，研究者们发现这些RNA修饰可能



Samie Jaffrey

是高度动态的，这可能就是主动调节基因表达的重要机制。

得益于高通量下一代测序技术(next-generation sequencing, NGS)的发展，RNA修饰领域迎来了第一次爆发式发展。希巴医疗中心(Sheba Medical Center)的Gideon Rechavi指出，在NGS问世之前，我们根本不可能大规模寻找这些RNA修饰。2012年，两个团队——一个由Rechavi (Schwartz的合作者)领导，另一个由Jaffrey领导——使用基



Chuan He

于NGS的方法，独立绘制了第一个转录组范围的mRNA修饰图。两个团队都使用识别m<sup>6</sup>A的抗体收集被修饰的RNA片段，然后对这些片段进行测序，以确定哪

些位点被甲基化。Helm表示，这是一个巨大的突破。知道了被修饰的位点，你就可以对这些修改的功能提出假设，并进行验证。

然而，事实证明，将这些修饰与分子功能关联起来非常困难。Schwartz指出，RNA修饰与RNA稳定性、剪切、定位及翻译等都有关系。m<sup>6</sup>A简直是与RNA生命周期的每一个组成部分都有联系。但m<sup>6</sup>A修饰的功能动力学的研究并没有多少进展，Schwartz等人观察到酵母减数分裂期间转录组出现大范围的m<sup>6</sup>A变化，但他们仍不清楚“写入者”、“橡皮擦”和“读取者”在哪里，以及如何发挥作用。

目前有一些有趣的初步结果。Jaffrey等人发现了一组m<sup>6</sup>A修饰，这组修饰似乎能调节

与X染色体失活相关的基因沉默过程。还有一种证据支持m<sup>6</sup>A与早期胚胎发育的模式相关。Jaffre表示，如果敲除m<sup>6</sup>A系统，细胞分化就会出问题——这些细胞会停滞在干细胞或祖细胞状态。他假设，m<sup>6</sup>A在不同RNA上的多种功

能可以共同控制合成关键发育蛋白的精确时间。Jaffrey还指出，基本上，这些RNA被单独合成、翻译和降解，而m<sup>6</sup>A把它们联系在了一起。

## 无数的图谱

Rechavi和He联手借助基于抗体的方式来绘制m<sup>6</sup>A图谱，随后他们检测了另一种甲基修饰——N<sup>1</sup>甲基腺苷（N<sup>1</sup>-methyladenosine, m<sup>1</sup>A）。他们的研究以及北京大学的伊成器（Chengqi Yi）团队同时发表的论文报道了这种甲基修饰，并表明其在酵母和哺乳动物细胞中是受到动态调节的。值得注意的是，m<sup>1</sup>A的分布与m<sup>6</sup>A的分布明显不同。Rechavi指出，m<sup>6</sup>A主要位于终止密码子附近和mRNA的3'端非翻译区的起点。而m<sup>1</sup>A位于第一外显子连接处的上游，并且有一些证据表明这与翻译的调节有关。但这只是推测，有待进一步研究证实。

尽管过去常认为假尿苷是rRNA、tRNA和剪接体RNA的特征，但是越来越多的图片绘制研究表明，假尿苷也存在于酵母和人类mRNA中。研究中使用的方法通常依赖一些永久性改变被修饰的碱基的处理方式，这样研究人员便可以通过对逆转录过程的破坏性干扰来化学分离或检测假尿苷。假尿苷似乎在非编码RNA中具有主要的结构作用，但它可能在mRNA中具有附加效应。2011年，罗切斯特大学（University of Rochester）的Yi-Tao Yu在特定mRNA上引入人工假尿苷酸化位点，得到了惊人的结果。在研究中，他们瞄准了一个终止密码子，

并使核糖体经过该位点，即令核糖体完全无视该终止密码子，这样mRNA的翻译就不会在终止密码子处停止，而是继续翻译成蛋白质。这种研究同样具有一定的临床意义。Schwartz表示，人体13个假尿苷合成酶中至少4个与疾病相关。问题是，催化底物是什么？

绘制其它mRNA修饰的图谱的研究备受争议。5-甲基胞嘧啶（5-methylcytosine, 5mC）是一种已被广泛研究的DNA修饰，并且研究者们已确认其在tRNA和rRNA上也存在。化学分析研究表明，mRNA中可能存在5mC修饰，并且这些修饰多达数千种——但是已在实验室中开发出5mC分析方法的Helm却对此持怀疑态度。Helm指出，目前不同的研究报道的修饰位点完全不同，并且几乎没有重叠。对此，他认为我们应该开展某些独立的验证研究。澳大利亚国立大学（Australian National University）研究员Thomas Preiss承认了现有检测技术的局限性，但鉴于最近的研究将这种修饰与细胞增殖和癌症联系了起来，所以他仍然认为现有证据已强有力证明了mRNA中存在m<sup>5</sup>C修饰。Preiss表示，很明显，某些mRNA中的确出现了5mC修饰，尽管人们对这种修饰的普遍程度持不同意见。

## 寻找路标

质控是绘制其它研究得比较深入的mRNA修饰的一个重要问题。例如，基于抗体的m<sup>6</sup>A分析方法就有抗体特异性的问题。Schwartz指出，酵母中大概50%的很有说服力的峰值实际上是非特异性的。他的团队最终不得不使用甲基化缺陷突变体，来验证他们的RNA数据。对于假尿苷酸修饰，要区分逆转录停止的位点非常困难，这是因为难以判断这种停止到底是因为修饰，还是因为酶与mRNA脱离。到目前为止，各研究的结果几乎没有重叠，现有假尿苷图谱的准确性和全面性仍然值得质疑。实际上Yu关心的是，为什么不同实验室得到的结果不同。Helm相信，通过多种方法的结合才能提高研究的正确性。他认为，至少需要使用两种以上的技术。

定量分析RNA修饰也非常困难。细胞内mRNA远不如rRNA和tRNA丰富，并且各基因的转录物的数目大不相同，这极大地影响了图谱绘制的准确性。此外，还存在化学计量的问题：即使研究正确地识别出修饰位点，也很难确定该转录物实际上有多少个拷贝被修饰。Jaffrey指出，一个峰值可以代表50个转录物中有1个被甲基化，或者代表50个中有48个被甲基化。这对于衡量生物相关性非常关键。如果只有一小部分转录物被甲基化，那么甲基化

不可能对mRNA有显著的影响。

现在还没有简单的方法来把某种RNA修饰与功能关联起来。单个修饰的选择性敲除在很大程度上难以实现，并且功能实验通常靶向对应的酶机制——如果这些酶具有其它功能，就会引入非预期的后果。Jaffrey指出，虽然几项研究已经确定了生理状态和环境因素能影响表观转录组谱，但我们仍然不知道，哪一单一信号分子或通路需要m<sup>6</sup>A修饰mRNA，才能影响细胞功能。

细菌和酵母等模式物种含有许多与哺乳动物细胞相同的RNA修饰，这使得它们可以作为研究RNA修饰的有力的工具。然而，模型物种和人体内RNA修饰的程度和分布可能有很大的差异，因此难以用它们来探究这些修饰在人体内的功能。Yu指出，细菌rRNA只含有少量的假尿苷酸化位点，但酵母大约有50个这种位点，人类大约有100个。Chuan He表示，在越高等的生物中，诸如m<sup>6</sup>A等修饰的生物重要性越显著——这种延伸作用使得进化具有重要意义。一旦有一个类似m<sup>6</sup>A的修饰，细胞就会开始进化出其它功能或过程，例如应激反应，以很好地利用这个修饰。生物越复杂，这种修饰越重要，因为这是转录后调控的主要目标。

## 革命尚早

对于未来越来越扩大的RNA修饰领域来说，这些早期研究的经验教训具有重大借鉴意义。这些试验和错误还有助于指导未来的数据收集、解读和质量控制。Schwartz指出，现在，当他尝试思考这些问题时，会想建立一个规范的工作流程来分析特定修饰，以保证方法的敏感性、特异性和定量性。Schwartz现在

就很清楚，实验设计时要使用什么样的对照组才能确保方法的有效性。

新技术还扩展了可开展的实验范围。在功能方面，使用CRISPR/Cas9技术可以选择性去除单个转录修饰位点。许多专家还预计，以后可以直接对RNA进行测序，而不需要转化成cDNA——这个步骤往往会去除一些修

饰。Rechavi表示，部分技术相对敏感，可以区分修饰的核苷酸和常规核苷酸。Oxford Nanopore（一家基因测序公司）在这方面取得了重要进展，宣称可以使用他们的纳米孔技术平台来进行RNA测序。这类方法可以同时创建多个修饰图谱。

Rechavi认为，这将是理解这些化学变化的功能的关键一步。他指出，未来我们将能鉴定不同修饰之间的协同和拮抗关系，这就和

我们处理组蛋白密码比较像。尽管现在科学家们还不确定这些化学修饰的重要性，但他们相信，未来表观转录组学会和表观遗传学一样，成为理解细胞内机制的重要工具。Rechavi补充指出，已有迹象表明，这种修饰存在于RNA生命周期的每一个阶段。他相信他们能够证明，RNA修饰并不是一种局限于小部分RNA的、额外的基因表达调控方式，而是主要的调控方式。



# 资讯 · 频道

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

## 2. 生殖细胞与多潜能干细胞的RNA可逆性修饰

早在几十年前，科学家们就发现了RNA转录后修饰 (Post-transcriptional RNA modifications) 的现象，但是直到最近，我们才知道这种修饰是可逆的。随着科技的进步，我们近来对表观转录组的了解（包括标志物、修饰及去修饰酶等）也有了飞速的进展。本文将重点介绍生殖细胞与多潜能干细胞mRNA里腺嘌呤的甲基化及去甲基化修饰的相关信息。

对于蛋白质和DNA而言，各种不同的化学修饰物 (chemical modifications) 都代表了不同的作用与功能。科学家们对这类化学修饰动态变化过程的不断研究让我们对基因表达调控的动态变化过程的本质有了更加深入的认识。此外，各种编码及非编码RNA的存在也给遗传及表观遗传学调控增加了复杂性。这种复杂性又更进一步放大了化学修饰作用的多样性，比如到目前为止，我们已经发现了100多种RNA的转录后修饰作用，而且这些修饰作用都是由高特异性的酶介导的。比如，数十年前我们就知道，tRNA在生成之后会发生明显的修饰，目前的资料则进一步显示，在tRNA里，超过10%的核酸都发生了转录后修

饰。虽然其中有一些修饰没有特别明显的作用，但还是有很多修饰具有非常明确，且重要的作用，比如能够帮助维持tRNA的稳定性和翻译的保真性等。不过，tRNA并不是唯一一种会发生转录后修饰的RNA分子。包括mRNA和X失活特异性转录体 (X-inactive specific transcript, *XIST*) 等非编码RNA在内的多种长链RNA分子都会发生转录后修饰。最近，由于研究人员发现了核酸甲基化修饰的可逆特性，所以对这类RNA分子转录后修饰的研究工作又重新成为了科研界的热点。而且，研究人员还发现了一系列与多种人类疾病相关的RNA甲基化及去甲基化酶的突变信息。

### mRNA修饰的调控

mRNA转录后修饰的调控可以被广泛定义为内在的修饰或终端端的修饰。比如真核生物mRNA分子5'端的帽子结构和3'端的多聚腺嘌呤尾部结构都是为了维持mRNA分子的稳定性，同时也是有利于成熟的mRNA的翻译。而mRNA分子内部的大量

修饰则处于动态调控变化过程当中，比如 $N^1$ 甲基腺嘌呤 ( $m^1A$ ) 和 $N^6$ 甲基腺嘌呤 ( $m^6A$ )。 $m^6A$ 是最常见的mRNA内在修饰，其动态调控过程是生殖细胞和多潜能干细胞调控的基础机制。

## 生殖细胞内的m<sup>6</sup>A动态调控过程

对预合成 (presynthesized) mRNA 分子的依赖, 是减数分裂过程的特有现象。因此, 在减数分裂过程中, 这些预合成 mRNA 分子的稳定性和活性就决定了基因表达的情况。1992年, 我们首次在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 细胞中发现了减数分裂启动因子4 (Initiator of meiosis 4, IME4), 并且发现若营养缺乏则会导致该因子的表达, 而IME4因子是细胞减数分裂和孢子形成必需的因子。IME4因子与哺乳动物体内的METTL3因子同源, 而METTL3因子能够使mRNA分子和包括*XIST*等长链非编码RNA分子里的腺嘌呤甲基化, 形成m<sup>6</sup>A。我们知道, 非出芽的酿酒酵母细胞里含有多聚A尾部结构的mRNA分子是不会形成m<sup>6</sup>A修饰物的。可是, 由于IME4因子与METTL3因子同源, 再加上IME4因子与减数分裂之间的关系, 让我们发现了酿酒酵母细胞在形成孢子的

时候, 会依赖IME4因子来生成m<sup>6</sup>A。最近, 科研人员又利用高分辨率的研究手段, 精确地在减数分裂期酿酒酵母细胞的转录组里确定了由IME4因子介导而产生的m<sup>6</sup>A核酸的位置。其中一些研究结果引起了特别的关注。这些科研人员发现, 有1183个与减数分裂密切相关的基因会被IME4因子甲基化修饰。而且, 他们还还对与IME4因子和METTL3因子拥有同样进化历程的蛋白质进行了梳理, 结果发现前20名共同进化的蛋白质 (包括WTAP家族蛋白和YTH家族蛋白) 都是m<sup>6</sup>A的识别因子 (reader)。不过, 目前还不清楚m<sup>6</sup>A是否只在减数分裂1期和2期发挥特有的重要作用。另外, 研究人员也不清楚高等真核生物中的m<sup>6</sup>A是否在包括原始生殖细胞 (primordial germ cell, PGC) 至精子和卵子细胞等成熟生殖细胞在内的整个减数分裂期发挥了重要作用 (图1)。

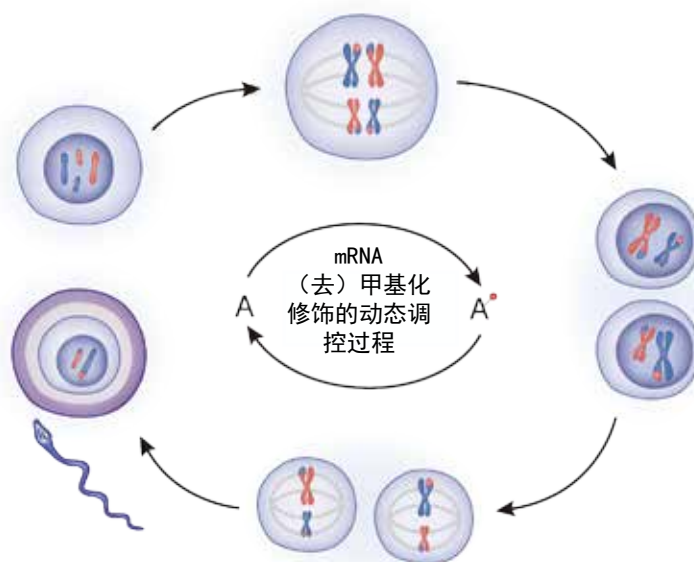


图1 真核细胞减数分裂过程示意图。对模式生物的研究发现, 在细胞整个减数分裂周期中, mRNA的甲基化修饰与去甲基化修饰呈一个动态的调控过程。在减数分裂过程中, 预合成mRNA的翻译和稳定性对于基因调控都非常关键。鉴于此, mRNA的甲基化修饰与去甲基化修饰都参与了基因表达的调控过程。

时相信息显示，在酿酒酵母细胞内，m<sup>6</sup>A峰只在减数分裂初期(meiotic prophase)出现，这种甲基化修饰高峰也刚好与MIS复合体（这是一种重要的甲基转移酶复合体，IME4就是其组分之一）组分的积聚时间相吻合。而在减数分裂末期，m<sup>6</sup>A的水平显著下降，这也与此时IME4表达量降低相吻合。明显缺乏m<sup>6</sup>A去甲基化酶活性的酿酒酵母细胞里也存在一种特有的IME4酶反向调节机制，从而获得了去甲基化修饰的作用。在准备进入减数分裂循环，生成单倍体细胞的二倍体细胞会转录出正义链（即能够翻译出蛋白质的RNA链）。单倍体有丝分裂细胞则会直接转录出一整条IME4基因的反义链，抑制正义链的转录。IME4基因控制正义链或反义链转录的启动子是细胞类型特异性的，正义链转录与反义链转录通过顺式作用（而非反式作用）相互抑制。

除了酵母细胞，其它物种里也发现了RNA甲基化修饰与减数分裂之间的关系。比如小鼠

细胞也含有m<sup>6</sup>A去甲基化酶。缺乏ALKBH5因子会使m<sup>6</sup>A水平升高，由此损害了雄性和雌性小鼠的生育能力，同时也让小鼠精子和卵子形成时出现减数分裂错误。在二倍体细胞初级精母细胞(primary spermatocyte)里，*Alkbh5*基因是高度表达的。这些初级精母细胞可以经过减数分裂生成两个单倍体细胞次级精母细胞(secondary haploid spermatocytes)。在果蝇(*Drosophila*)的睾丸细胞和卵巢细胞中，m<sup>6</sup>A甲基转移酶*Ime4*也是高度表达的。我们也发现了部分缺失功能的*Ime4*突变基因。与酵母细胞一样，这些Ime4酶同样在细胞的减数分裂过程中起到了非常重要的作用。综上所述，mRNA的m<sup>6</sup>A甲基化修饰与减数分裂之间的关系是在进化上非常保守的一种现象。这种特有的时序调控机制对于生殖细胞的产生具有非常重要的作用。不幸的是，目前为止我们还只是在酵母细胞中发现了这种现象，并未能在哺乳动物细胞内获得验证。

## m<sup>6</sup>A甲基化修饰与多潜能干细胞的关系

近两年来，一系列的研究又发现mRNA的m<sup>6</sup>A甲基化修饰对于小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cell, mES cell)的多向分化潜能作用也具有非常重要的调控功能(图2)。在胚胎早期阶段，这些胚胎干细胞能够无限制繁殖，即保持了二倍体状态，同时还能

够保证核型的正确性。在合适的条件下，这些细胞还可以分化出3个胚层的细胞。当这些细胞进入囊胚期(blastocyst)之后，它们又可以分化为人体内的任意细胞，包括生殖细胞。

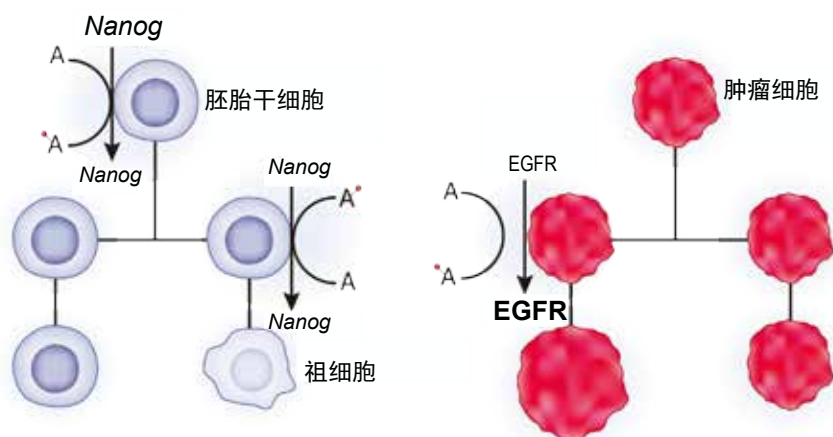


图2 m<sup>6</sup>A修饰对单细胞的动态调控作用。在图左所示的胚胎干细胞中，母代细胞依赖较高水平的m<sup>6</sup>A，避免因*Nanog*基因过度表达，从而使细胞处于高度多向分化潜能状态。到了子代细胞中，一旦m<sup>6</sup>A的水平低于某个阈值，那么细胞中NANOG因子的表达水平将进一步降低，这就可能使细胞发生分化，成为某种祖细胞。在图右所示的肿瘤细胞中，由于某个子代细胞发生了突变，使得细胞内m<sup>6</sup>A的水平升高，最终经由转录后机制让EGFR等关键因子的表达水平上调，从而令这些突变细胞进一步获得了选择优势，肿瘤病情进一步发展、恶化。

最近有一项工作是筛选出所有维持细胞处于原始态（native）多潜能状态，而非始发态（primed）多潜能状态的因子。在特定条件下生长的胚胎干细胞被人为特异性地抑制了MAPK信号通路，因为科研人员相信，这样可以让细胞保持在胚胎植入前外胚层细胞的原始态。这些外胚层干细胞（Epiblast stem cell, EpiSC）在MAPK信号通路正常的情况下，与植入后的外胚层细胞的始发态多潜能性相似。如果在原始态细胞内敲除*Mett13*基因，那么就会产生“超级多潜能性（hyperpluripotency）”胚胎干细胞，从而损害细胞的分化能力，同时还会影响下调多潜能分化转录因子的能力。如果始发态EpiSC细胞缺乏METTL3因子，则会促使细胞分化和死亡。

首先，研究人员对野生型的原始态胚胎干细胞进行全转录组m<sup>6</sup>A测序，然后与成熟度更高细胞的测序结果进行比对，结果发现有

80%的多潜能性和谱系相关转录因子都发生了m<sup>6</sup>A甲基化修饰。因此，m<sup>6</sup>A同时影响了原始态和始发态的多潜能基因，并且在野生型的细胞里，经m<sup>6</sup>A修饰的mRNA分子的半衰期也会缩短。METTL3缺失会增加某些基因转录子的丰度，这些基因都是在具有m<sup>6</sup>A甲基化修饰作用的情况下，高度表达的基因。这样一来，*Nanog*等多潜能基因的转录作用也会被放大，进而阻碍了细胞的正常分化。在始发态阶段，细胞谱系特异性转录因子占优势，使细胞向分化的方向发展。令人吃惊的是，该研究还发现，在敲除了*Mett13*基因的胚胎干细胞里也存在m<sup>6</sup>A修饰，只不过丰度比较低，只有大约200倍。不过也许是METTL14或者其它尚未被发现的甲基化酶在起到修饰作用。有意思的是，在敲除了*Mett13*基因的胚胎干细胞里发现的这些m<sup>6</sup>A修饰mRNA分子的半衰期也延长了。这些mRNA分子编码的都是转录抑制子，可能是尚存甲基转移酶复合体的作用靶

标, 这样一来, 很多原本被这些抑制子抑制的 mRNA 的丰度也就提高了。在测序中检测到的 m<sup>6</sup>A 峰也可能是多个不同 mRNA 分子的总体表现结果, 可能其中大部分 mRNA 分子都缺少 m<sup>6</sup>A。因此, 其中那些少数的、真正被甲基化修饰的 mRNA 分子可能让我们感觉所有 mRNA 分子的稳定性都提高了。不过, 关于 m<sup>6</sup>A 与 mRNA 分子稳定性的关系, 第二份报告则得出了不同的结论。有两个在含有血清和白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 环境下生长的缺乏 METTL3 甲基转移酶因子的胚胎干细胞克隆与对照组胚胎干细胞相比, 也表现出分化能力受损的情况。在这些细胞中, m<sup>6</sup>A 阳性的 mRNA 分子的半衰期都较短, 研究人员认为 METTL3 因子和 m<sup>6</sup>A 可能是确保多潜能性转录子具备正常功能的关键因素。不过这种试验结果也可能是由于 mRNA 分子半衰期检测技术、测序时使用的标化技术、细胞培养条件、基因敲除细胞各个克隆之间的异质性等多种因素导致的。鉴于此, 人们还需要开展更多的研究, 以彻底阐明 RNA 甲基化组 (RNA methylome) 对于多潜能干细胞分化能力的调控机制。

另外一个有争论的问题就是为什么具有超级多潜能性的、*Mettl3* 基因被敲除的胚胎干细胞在原始基态条件下还能够表达高水平的、细胞谱系特异性的转录子。这也许是因为敲除了 *Mettl3* 基因之后, 某些原始态胚胎干细胞获得了超级多潜能性, 而另外一些胚胎干细胞则离开了基态环境, 开始分化为特定的细胞。此外, 上调的转录噪声 (transcriptional noise) 也可能会起到一定的作用, 但也可能会明显低于在原始态条件下需要启动细胞分化的阈值。

最初的研究发现了 m<sup>6</sup>A 缺乏与多分化潜能的关系, 即利用 RNA 干扰技术敲除了 *Mettl3* 基因或 *Mettl4* 基因之后, 胚胎干细胞可能会发生自发性分化行为。这种效应还同时伴有后续的、其它发生了 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰转录子表达水平方面的改变。编码 *Nanog*、*Sox2* 和 *Rex1*

等多潜能性转录因子的 mRNA 发生了下调, 而 *Fgf5*、*Sox17* 和 *Igfbp3* 等与特定细胞谱系相关的转录因子则发生了上调。但是, 多个研究都发现, 编码 *Oct4* (官方标记为 *Pou5f1*) 这种在多潜能调控机制中占据中心地位的转录因子的 mRNA 分子, 却没有发生 m<sup>6</sup>A 修饰, 其水平也未发生变化。而且 *Oct4* mRNA 这种未经历 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰的现象非常保守和普遍, 这可能是因为 OCT4 因子在维持细胞多向分化潜能方面具有十分重要的地位。OCT4 水平发生任何一点微小的波动, 都会让胚胎干细胞进入另外一种分化过程。对于各个不同研究结果之间的差异, 某些科研人员指出, 这可能是因为存在有血清和 LIF 因子的培养条件下, 在异质性的、亚稳态 (metastable) 的干细胞群中存在 EpiSC 细胞所致。不过大家对这种可能性还存在争议, 因为 EpiSC 细胞需要在另外的生长条件下才能够在细胞整体中占据优势数量。但是, 这种结论也可能是因为在异质性的细胞群体中, 各个不同细胞对 m<sup>6</sup>A 修饰的 mRNA 的依赖程度不同而导致的。而且, 在基因敲除细胞和基因敲减细胞中甲基转移酶水平的差异, 以及 METTL3 因子急性缺失和慢性缺失等因素, 都有可能带来不同的研究结果。

问题是, 目前 m<sup>6</sup>A 缺失的检测数据仅仅来自细胞整体的数据 (即平均数据), 而且是静态的数据。单细胞转录组分析, 以及持续的长程单细胞分析将为我们带来更多、更有用的信息, 这也是对目前结论更有力的补充。对敏感的多潜能性报告细胞系 (sensitive pluripotency-reporter cell lines) 进行活体细胞成像研究, 将为我们提供更多有关每一个历经数代分裂的胚胎干细胞活动和行为的信息。细胞选择压力、细胞群体对甲基转移酶的反应性分化、m<sup>6</sup>A 缺失等其它重要的研究方向将能发现更多有价值的信息。这些技术极有可能帮助我们以更精确的方式, 以更加多元的视角了解 m<sup>6</sup>A 在细胞多向分化潜能调控机制中的动态作用, 以及与疾病的发生和进展的关系。

## RNA甲基化修饰在其它方面的作用

RNA甲基化修饰研究工作还陆续发现了更多更新颖、更加多样化的m<sup>6</sup>A依赖性作用。mRNA分子不同位点上的m<sup>6</sup>A修饰，其排列组合的可能性将是一个巨大的数字，这无疑增加了RNA甲基化修饰的复杂程度，以及表观转录组学（epitranscriptome）动态修饰调控机制的复杂性。对其它细胞系开展的研究发现，METTL3因子的水平也会影响microRNA合成等其它复杂的生物进程。m<sup>6</sup>A修饰还会改变mRNA分子的二级结构，限制mRNA分子与蛋白复合体的结合等。而且，这些甲基化修饰也会影响mRNA分子的剪接过程，影响mRNA分子的成熟、翻译、出核转运过程，以及加速mRNA分子代谢。对小鼠胚胎成纤维细胞的研究发现，如果在体细胞重编程试验（Somatic-cell reprogramming）的最初阶段就敲除其METTL3因子，那么细胞分化的逆向进程——体细胞重编程的进度就会减慢。不过在试验进行2天之后，生成的iPSC细胞的克隆形成速度就不会再受到METTL3因子缺失的影响了。另一项研究发现，过表达METTL3因子有助于细胞的重编程操作，而且还发现，miRNA分子能够通过与其靶标mRNA分子结合，并招募METTL3因子的方式，调控m<sup>6</sup>A甲基化修饰的发生。因此，调节miRNA等分子的表达，或者改变mRNA分子的序列，都将会因为改变了METTL3甲基转移酶的结合位点，而改变了m<sup>6</sup>A修饰的水平。m<sup>6</sup>A水平升高会促使小鼠胚胎成纤维细胞更快地重编程为iPSC细胞，而m<sup>6</sup>A水平降低则会减慢小鼠胚胎成纤维细胞重编程为iPSC细胞的速度。这些研究发现都非常有意思，根据之前对胚胎干细胞的研究，我们估计多向分化潜能关键因子mRNA分子的m<sup>6</sup>A依赖性降解途径将会是阻碍细胞重编程的重要因素，并最终会激活细胞内源性的多向分化潜能基因网络。可能还有其它的因子也参与了细胞重编程调控网络，起到了反向平衡的作用，比如YTHDF1因子和锌指蛋白217（zinc-finger protein 217，

ZFP217）等。ZFP217具有稳定多向分化潜能及重编程关键转录子的作用。这是因为该蛋白能够抑制依赖METTL3因子的m<sup>6</sup>A甲基化修饰的作用。这种抑制作用反过来又会促进细胞进入胚胎干细胞样的多向分化潜能状态，并提高细胞重编程的效率。

毫无疑问，胚胎干细胞向超级多向分化潜能细胞（而不是肿瘤细胞）的转化在肿瘤研究领域也是一大类非常有意思，并且非常重要的问题（图2）。这类问题包括，长期处于超级分化潜能状态是否意味着基因组不稳定？m<sup>6</sup>A水平的改变最终是否会影响肿瘤细胞的进化和转移？还有研究显示，处于转化阶段的细胞核提取物里的m<sup>6</sup>A甲基转移酶的活性大约是非转化细胞里的8倍。而且，人类基因组关联研究发现，*FTO*去甲基化酶基因变异与乳腺癌和黑色素瘤的进展有关，这也提示我们，m<sup>6</sup>A的稳态如果发生改变，将会提高人体的患癌风险。同样，如果将乳腺癌干细胞（breast cancer stem cell）置于缺氧的培养条件下，将激活由ALKBH5因子催化的NANOG因子编码mRNA分子的m<sup>6</sup>A去甲基化反应。这种去甲基化反应将提高NANOG mRNA分子的稳定性，从而提高乳腺癌干细胞的增殖能力和恶性程度。METTL3因子也能够与翻译起始途径（translation initiation machinery）发生相互作用，从而提高EGFR和TAZ等重要癌基因的表达水平。因此，METTL3因子也是帮助肺腺癌细胞生长、存活和侵入的重要因子。这种机制是不依赖甲基转移酶催化活性和m<sup>6</sup>A识别因子（包括YTHDF1和YTHDF2）活性的。不过，我们还需要开展更多的工作，以判断METTL3复合体中的其它m<sup>6</sup>A识别因子是否能够选择性地帮助METTL3因子特异性地识别mRNA靶标，从而放大它们在肿瘤细胞里的自我翻译增强作用。对这些机制的了解将帮助我们开发出更好的新型抗癌手段。

## RNA动态修饰

现在人们对RNA化学修饰可逆性问题的研究工作正在飞速发展。到目前为止，我们已经发现了100多个不同的化学修饰的核糖核苷酸，由此看来，RNA动态修饰的调控潜力一定是惊人的。最近，人们又在mRNA分子上发现了m<sup>1</sup>A（1-甲基腺嘌呤）修饰，这也是一种可逆性核糖核苷酸化学修饰。m<sup>1</sup>A的拓扑结构与m<sup>6</sup>A截然不同，m<sup>1</sup>A主要富集在mRNA分子的5'端。与之前的研究结果非常符合的是，ALKBH3因子也能逆转mRNA分子的m<sup>1</sup>A修饰。虽然平均只有5~20%的mRNA分子会发生m<sup>1</sup>A修饰，但是在tRNA分子上更容易发生m<sup>1</sup>A修饰。最近人们又发现，大肠杆菌AlbB因子的同系物——ALKBH1因子能够使tRNA分子茎环结构基序上的m<sup>1</sup>A修饰发生去甲基化反应。值得一提的是，ALKBH1因子还能够使线粒体tRNA分子上的5-甲基胞苷（m<sup>5</sup>C）羟化生成5-甲酰

胞嘧啶（5-formylcytosine），这类似于由ALKBH8因子介导的tRNA分子里的尿嘧啶羟化反应，以及由TET1或TET3介导的DNA分子里的m<sup>5</sup>C的羟化反应。如果tRNA分子里缺少m<sup>5</sup>C和5-甲酰胞嘧啶，那么就会出现严重的线粒体呼吸链障碍。这种疾病主要由NSUN3基因突变，丧失正常功能导致。NSUN3基因编码的就是m<sup>5</sup>C甲基转移酶。该发现又进一步拓展了与tRNA代谢疾病相关的基因数量。会引起人体疾病（尤其是线粒体相关疾病）的RNA介导的现象（RNA-mediated phenomena，主要因为遗传突变而导致）是非常难以发现的，因为这非常罕见，而且异质性很高，同时又不符合孟德尔遗传规律。因此，目前在RNA修饰，以及RNA修饰酶、去修饰酶，以及识别子等方面的认识非常有助于我们了解表观转录组与人类疾病的关系。

## RNA修饰的遗传问题

DNA及组蛋白的表观遗传学修饰对基因的表达都能够起到直接的影响作用。此外，其中有很多修饰都是可以遗传的，而且可以从母代细胞直接传递给子代细胞，以及从生殖细胞直接传递给下一代生殖细胞。雌性生殖细胞减数分裂时会出现大量预合成的RNA分子，这是其一大特征。预合成的RNA对于早期胚胎也是非常重要的，由于大部分RNA都来自卵细胞，因此还存在一个母体偏倚（maternal bias）的问题。将来，我们也需要解决RNA动态修饰的遗传问题，以及了解m<sup>6</sup>A动态修饰对单个mRNA分子功能的影响作用等。对RNA修饰

可逆性问题的研究必将超出m<sup>6</sup>A对mRNA修饰的范围。当然，随着研究的不断深入，我们将会发现更多的问题。比如RNA修饰系统里的写入因子（writer）、擦除因子（eraser）是如何调控的？这些酶是如何选择RNA靶标的（是否是序列特异性的）？我们已经知道，储存的母体因子对于激活母体细胞向合子细胞转化（maternal-to-zygotic transition）所需要的基因组具有非常重要的作用。RNA的动态修饰可能在这个过程中也发挥了重要的作用，而且在胚胎早期发育过程中起到了精准调控的作用。

## 特约编辑招聘启事

为了及时收集生命科学最新资讯、提高《生命奥秘》办刊质量，现面向从事生命科学或对这学科有浓厚兴趣的科研人员、学生诚聘特约编辑（兼职）。

### 岗位职责：

独立完成《生命奥秘》专题的策划：对基因组学、蛋白组学、生物信息学和细胞生物学等学科的发展以及生物医学领域相关技术（例如基因诊断技术、干细胞和克隆技术、生物芯片技术等）的应用进行翻译及深入评述。

选题要求内容新颖、评述精辟、注重时效和深入浅出。尤其欢迎以自身系统研究为基础的高水平译述与评论，结合所从事的科研工作提出自己的见解、今后设想或前瞻性展望。

### 要求：

1. 具备基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞生物学等生命科学学科背景；
2. 具备良好的生命科学前沿触觉；
3. 具备较高的外文文献翻译、编译水平；
4. 具备较强的选题策划、资料搜集、组织能力，以及专业稿件撰写能力；
5. 具有高级职称；或者拥有（正在攻读）该领域的最高学位。

有意者请将个人简历发送至 [editor@lifeomics.com](mailto:editor@lifeomics.com)

### 3. 测序技术：揭开RNA修饰的神秘面纱

近几年来，由于研究人员在由RNA修饰介导的基因表达调控 (RNA-modification-mediated regulation of gene expression) 领域里取得了许多新的研究进展，进而催生出一门新的研究领域——表观转录组学 (epitranscriptomics)。我们对这些处于动态变化之中的RNA修饰的分布、调控，及其功能的了解，全都建立在测序技术的进步之上。本文将重点介绍真核细胞转录组中最常见的mRNA修饰，包括N<sup>6</sup>甲基腺苷 (*N*<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A)、N<sup>6</sup>, 2'-O-二甲基腺苷 (*N*<sup>6</sup>, 2'-O-dimethyladenosine, m<sup>6</sup>Am)、5甲基胞苷 (5-methylcytidine, m<sup>5</sup>C)、5羟基甲基胞苷 (5-hydroxymethylcytidine, hm<sup>5</sup>C)、肌苷 (inosine, I)、假尿嘧啶 (pseudouridine, Ψ) 和N<sup>1</sup>甲基腺苷 (*N*<sup>1</sup>-methyladenosine, m<sup>1</sup>A)。下文将介绍能够识别这些修饰的测序技术，包括其测序适用范围、分辨率、定量特性和预富集能力等，还将介绍相关的生物信息学工具。最后，本文还将探讨表观转录组学面临的挑战，以及未来的发展方向。希望本文能够在读者选择不同表观转录组学测序方法时提供一点帮助，也希望能够激发出读者新的想法，为RNA生物学的发展贡献一份力量。

目前，已知的转录后RNA修饰已达一百多种。核糖体RNA (rRNA)、转运RNA (tRNA)、小核RNA (snRNA) 等非编码RNA (ncRNA) 都存在大量的转录后修饰现象，这种转录后修饰对维持这些非编码RNA在翻译及剪接过程中的功能至关重要。在真核细胞的mRNA中可以发现各种转录后修饰，包括m<sup>6</sup>A、m<sup>5</sup>C、hm<sup>5</sup>C、I、Ψ和m<sup>1</sup>A等 (图1)。这些修

饰都能够影响mRNA的代谢及功能。鉴于此，2010年，人们首次提出了RNA表观遗传学 (RNA epigenetics) 的概念，以表示这种种类繁多的RNA转录后修饰现象；2012年，人们又提出了“表观转录组学” (epitranscriptome)，这与代表DNA及组蛋白修饰的表观基因组学相对应。

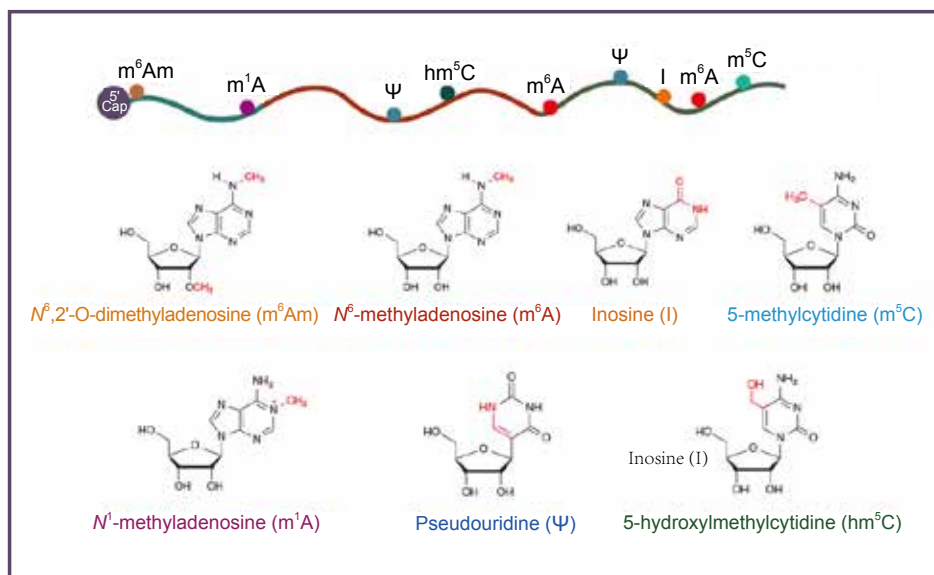


图1 mRNA 的各种化学修饰。

不过，与表观基因组学相比，对于表观转录组学的功能研究却明显的滞后了。这主要是因为测序技术没有跟上，还无法在全转录组的层面上对各种RNA的转录后修饰进行检测。表观转录组学测序方面主要面临以下几大问题：首先，无法使用高通量测序技术对大部分RNA修饰进行直接检测。这是因为RNA的化学修饰往往不会改变被修饰碱基的配对特性，而逆转录过程又很容易去除这些修饰物，使我们无法分辨常规的RNA碱基和这些已修饰碱基。其次，细胞里含有大量的rRNA、tRNA和snRNA，相比之下，mRNA、长非编码RNA（long noncoding RNA, lncRNA）等其它RNA分子的含量就要少得多。最后，缺少相应的计算机工具，以帮助我们识别这些被修饰碱基。

幸运的是，近几年来，人们在表观转录组学测序技术方面取得了重大的突破，现在已经能够区分各种表观转录组学修饰标志物了。这也帮助科研人员们明确了RNA的修饰位点，了解了这些修饰在整个转录组中的分布模式。当将这些测序技术与其它技术，比如基因组编辑技术（genome-editing tools）等结合之

后，人们又发现了RNA修饰酶的作用靶点。此外，通过这些测序技术，我们还发现，RNA在不同的生理条件下会发生不同的修饰，即转录组学表观修饰是一个动态变化的过程。此外，这些新技术还帮助我们发现了“识别”蛋白（‘reader’ proteins，这种蛋白能够特异性识别特定的表观转录组学修饰物），并且了解了其功能。由此可见，新的测序技术不仅让我们对表观转录组学有了一个全面的认识，还能够让我们深入了解这些转录后修饰作用的重要功能。

目前已有非常多篇非常出色的综述详细地总结了各种表观转录组学修饰物的功能，所以本文不再赘述，本文的重点将集中在介绍测序技术的原理、生物信息学工具、检测范围、分辨率，以及定量信息等方面。RNA修饰物的化学计量方法对于评估其生物学影响作用的范围非常重要，一个碱基上的修饰就有可能影响到整个转录子的功能。我们还会介绍某种测序方法是否会在测序之前进行样品预富集操作，因为这将影响到该测序技术的灵敏度、测序深度，以及测序成本。

## m<sup>6</sup>A，第一种可逆转的mRNA修饰

m<sup>6</sup>A是真核细胞mRNA最常见的一种转录后修饰物。由METTL3、METTL14和WTAP，以及其它一些蛋白质组成的甲基转移酶复合体催化完成该修饰反应。m<sup>6</sup>A也是在真核细胞内发现的第一种可逆转的mRNA修饰，FTO和ALKBH5因子能够去除该修饰物，逆转转录后修饰反应。实际上，我们早就知道mRNA会发生这种修饰，但是科研人员们是在发现了m<sup>6</sup>A的可逆转特性之后，才开始对这种修饰产生兴趣的。此外，人们又发现了多个能够特异性地与m<sup>6</sup>A结合的蛋白，这些蛋白也会通过各种不同的途径影响经m<sup>6</sup>A修饰过的mRNA的代谢与功能。m<sup>6</sup>A除了在哺乳动物细胞内发挥上述调控作用之外，也会对病毒的RNA进行修饰，并且影响病毒的感染和复制过程。

早在上世纪70年代，科研人员们就发现了mRNA的m<sup>6</sup>A修饰现象。后续的研究又发现，RRACH (R = A/G, H = U/A/C)序列是m<sup>6</sup>A修饰的高发区。不过，直到2012年，因为两个实验室各自独立地发现了两种强大的测序技术，我们才得以对哺乳动物细胞的转录组进行m<sup>6</sup>A修饰研究。这两种测序技术都以m<sup>6</sup>A特异性的甲基化免疫沉淀及高通量测序手段 (m<sup>6</sup>A-specific methylated immunoprecipitation and high-throughput sequencing, m<sup>6</sup>A-seq<sup>19</sup> and MeRIP-seq) 为技术基础 (图2)。使用这些方法，研究人员会先纯化出100 - 150 nt大小的mRNA，然后再通过m<sup>6</sup>A特异性的抗体进行免疫沉淀反应，最后将这些富集的、含有m<sup>6</sup>A修饰物的RNA分子构建成文库，再进行高通量测序。通过这两种方法，科研人员们在哺乳动物的转录组里发现了一万多个m<sup>6</sup>A修饰位点，也首次发现，在mRNA的3'UTR端和临近的终止密码子处是m<sup>6</sup>A修饰高发区。这些测序技术的分辨率在100 - 200 nt左右，非常容易操纵，所以很快就被各个实验室所采用，在表观

转录组学研究中发挥了重要的作用，取得了很多不错的研究成果。后来人们又发展出改进版的、分辨率更高的m<sup>6</sup>A免疫沉淀技术，并被应用于减数分裂的酵母研究当中。使用这种方法，将缺乏m<sup>6</sup>A甲基转移酶的酵母菌作为阴性对照，以消除假阳性结果。而且，还使用了更短的m<sup>6</sup>A修饰RNA分子和以配体为基础的链特异性文库制备技术 (ligation-based strand-specific library preparation)，以提高检出m<sup>6</sup>A的分辨率 (图2a)。再加上我们已知的m<sup>6</sup>A修饰共有序列信息，就可以在酵母m<sup>6</sup>A修饰研究中实现单碱基的超高分辨率了。这样一来，这些最新的技术让我们对真核细胞的全转录组m<sup>6</sup>A修饰情况有了一个清晰的了解和认识，也为后续的m<sup>6</sup>A修饰功能研究提供了非常有价值的研究手段。毫无疑问，m<sup>6</sup>A修饰已经成为了一个非常重要的、关键性的表观转录组学修饰物。

最近，紫外线诱导的RNA-抗体交联技术 (UV-induced RNA-antibody crosslinking) 也被应用于m<sup>6</sup>A-seq和MeRIP-seq技术当中。这使得人体细胞转录组学的m<sup>6</sup>A修饰研究也达到了单碱基水平。其中有两种交联技术应用得最为广泛，第一种技术就是光活化的核糖核苷增强交联及免疫沉淀技术 (photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation, PAR-CLIP)，在此基础上发展出了光交联m<sup>6</sup>A测序技术 (photo-crosslinking assisted m<sup>6</sup>A sequencing strategy, PA-m<sup>6</sup>A-seq)。在细胞培养基里添加4硫尿核苷 (4-thiouridine, 4SU)，再使用这种技术处理细胞样品，就会在RNA分子里添加上4硫尿核苷。随后进行免疫沉淀操作，并在365nm的紫外线下让含有m<sup>6</sup>A的RNA分子与抗m<sup>6</sup>A的抗体发生交联反应。然后用RNase T1将这些交联的RNA分子酶切成30nt

大小的小分子片段，最后进行测序操作（图2b）。由于4SU会促使交联处的T变成C，所以PA-m<sup>6</sup>A-seq能够极大地提高甲基化检测技术的信噪比。而且，再结合25 - 30 nt大小片段的共有甲基化修饰序列信息，就可以达到单个碱基的测序分辨率。然而，使用这种技术会遗漏附近没有4SU掺入位点的m<sup>6</sup>A修饰信息。因此，人们又发展出了第二种紫外线交联策略，即紫外线交联免疫沉淀技术（UV crosslinking immunoprecipitation, UV CLIP），进而发展出m<sup>6</sup>A-CLIP技术和m<sup>6</sup>A单碱基分辨率交联及免疫沉淀技术（m<sup>6</sup>A individual-nucleotide-resolution crosslinking and immunoprecipitation, miCLIP）。m<sup>6</sup>A-CLIP和miCLIP都会免疫沉淀出RNA分子，然后在254nm的紫外线条件下让RNA与抗体发生交联反应（图2c）。m<sup>6</sup>A-seq技术使用的是竞争性洗脱策略来收集经m<sup>6</sup>A修饰的RNA分子，而m<sup>6</sup>A-CLIP和miCLIP使用的则是蛋白酶K来回收交联的RNA分子，这是这两大类技术的区别。蛋白质与RNA分子的交联位点在逆转录反应时会发生有规律的突变，或者截断，因此，我们可以据此精确地掌握m<sup>6</sup>A修饰的位点信息。

虽然在测序的分辨率上已经取得了这么好的成果，但是人们对于m<sup>6</sup>A位点的化学计量信息还是不太明确。2013年，一种名为配体辅助的提取及薄层层析位点特异性的剪切及放射性标记技术(site-specific cleavage and radioactive-labeling followed by ligation-assisted extraction and thin-layer chromatography, SCARLET)出现了。借助该技术，人们就可以对特定的位点进行非常精确的m<sup>6</sup>A定量分析。最近，一种名为m<sup>6</sup>A水

平异构体鉴定测序(m<sup>6</sup>A-level and isoform-characterization Sequencing, m<sup>6</sup>A-LAIC-seq)的技术被用来在全转录组水平进行精确的m<sup>6</sup>A计量分析。使用m<sup>6</sup>A-LAIC-seq技术时，全长RNA分子可以被用来进行m<sup>6</sup>A免疫沉淀操作，然后再使用过量的抗体将所有的RNA分子富集出来。随后再加入外源性的RNA对照体系(External RNA Controls Consortium, ERCC)作为对照，上清液和洗出的RNA分子作为内参。每一个基因的m<sup>6</sup>A水平都可以通过ERCC的标化进行定量分析（图2d）。通过m<sup>6</sup>A-LAIC-seq测序发现，大部分基因的m<sup>6</sup>A甲基化修饰程度都不到50%，同时还发现，经m<sup>6</sup>A修饰的RNA往往都结合了一个近端可替换的多聚腺苷位点(proximal alternative polyadenylation sites)，这样一来，3'UTR就变短了。

虽然我们已经拥有了m<sup>6</sup>A单碱基测序技术和定量测序技术，但还是存在一些问题。首先，虽然可以使用m<sup>6</sup>A-LAIC-seq测序技术了解不同样品中同一位点m<sup>6</sup>A修饰物的定量变化，但目前还是很难对同一转录子中不同位点的甲基化修饰水平进行比较，这是因为我们在m<sup>6</sup>A-LAIC-seq测序操作时使用的是全长RNA样品。其次，m<sup>6</sup>A修饰水平检测结果会受生物信息学分析工作（比如测序峰检测、算法等因素）的明显影响。因此，在进行测序数据分析和比对时一定要非常谨慎，该原则同样适用于对其它RNA修饰的分析。第三，目前所有的测序技术都需要用到m<sup>6</sup>A特异性的抗体，而酵母研究已经发现，这些抗体对RNA序列和二级结构存在固有偏倚。因此，我们还需要继续开发新的、不需要使用抗体的测序技术。

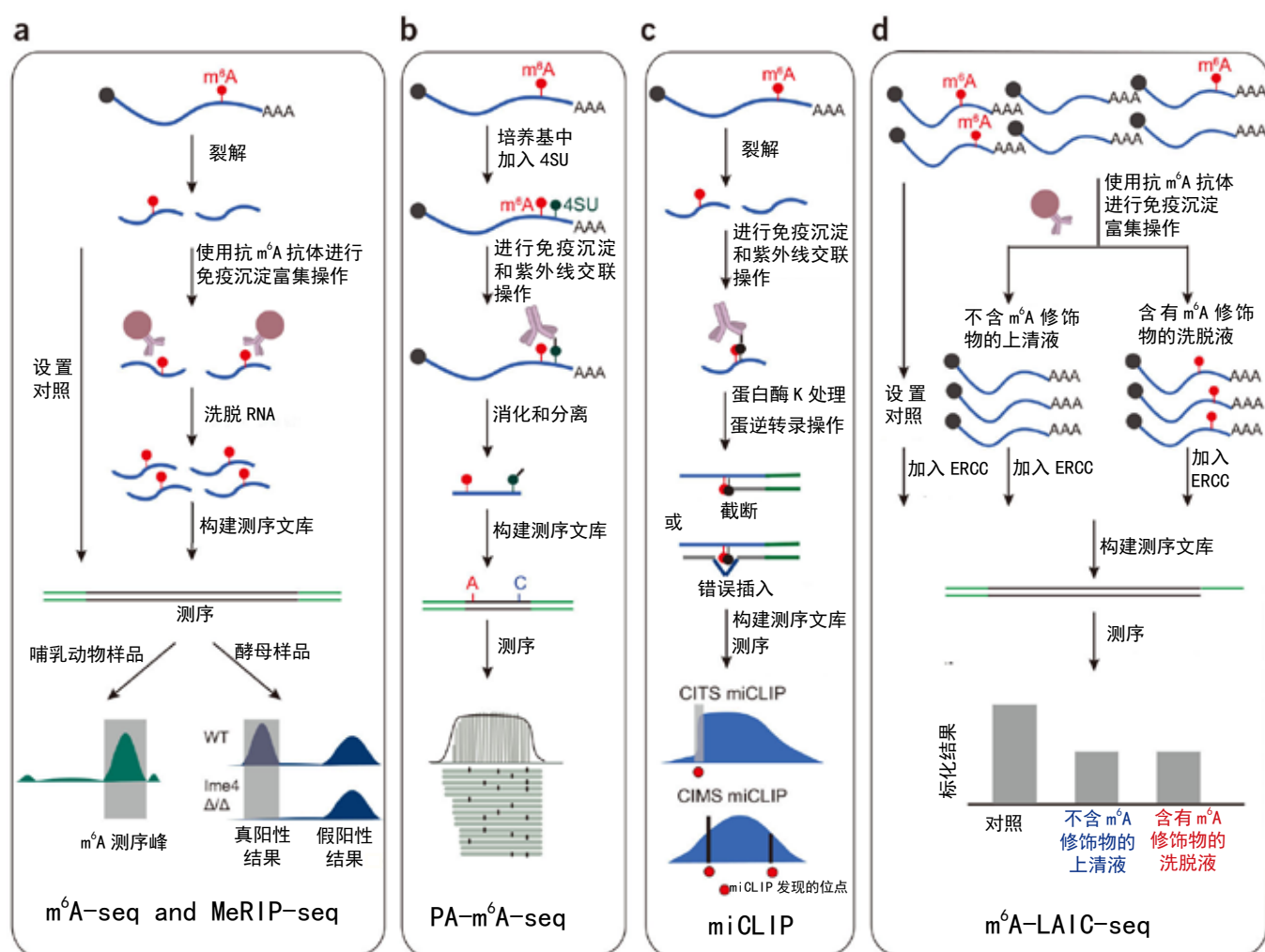


图 2 四种常用全转录组 m<sup>6</sup>A 测序技术流程简介。(a) m<sup>6</sup>A-seq 和 MeRIP-seq。(b) PA-m<sup>6</sup>A-seq。图片下部的黑点表示由 4SU 和交联处理后出现的 T-C 突变。(c) miCLIP。(d) m<sup>6</sup>A-LAIC-seq。WT: 野生型酵母; lme4  $\Delta/\Delta$ : 甲基转移酶缺失酵母。

## 位于mRNA多聚核苷起始处的m<sup>6</sup>Am

m<sup>6</sup>Am是一种与mRNA帽子结构相关的修饰手段，它往往出现在7甲基鸟嘌呤核苷帽子结构之后的第一个核苷酸处。当mRNA 5'帽子结构处有一个2'-氧-甲基腺苷时，该位点就会发生甲基化修饰。由于特异性的抗m<sup>6</sup>A抗体也能够识别m<sup>6</sup>Am修饰物，所以m<sup>6</sup>A测序也能够发现位于转录起始位点（transcription start site, TSS）附近的m<sup>6</sup>Am修饰情况。使用单碱基分辨率的miCLIP测序技术，还可以根据5' UTR处的交联诱导的截断位点（crosslinking-

induced truncation sites, CITS）信息，更加精确地确定m<sup>6</sup>Am修饰位点。这些位于5'UTR处的交联诱导的截断位点往往都是BCA（B = C/U/G）序列，而不是传统的RRACH序列。该结果也与已知的TSS处富含嘧啶碱基的事实相符。该结果还说明，这些位点都是真正的m<sup>6</sup>Am修饰位点，而不是内在的m<sup>6</sup>A。虽然在mRNA中m<sup>6</sup>Am的含量要比m<sup>6</sup>A少30倍，我们还是应该仔细确认抗体识别的特异性。

## 相比DNA，在RNA中更难鉴别的修饰物——m<sup>5</sup>C

m<sup>5</sup>dC是一种在DNA中普遍存在的表观遗传学修饰物，因此，相关的研究也已经相当充分了。在tRNA和rRNA等大量的非编码RNA中，也发现了m<sup>5</sup>C。在tRNA里，m<sup>5</sup>C起到了稳定RNA二级结构，以及影响反义密码子茎环构象的作用；在rRNA里，m<sup>5</sup>C则起到了影响翻译保真性的作用。在更高级的真核细胞内，主要由NSUN2和DNMT2这两种RNA甲基转移酶催化m<sup>5</sup>C甲基化修饰反应。

为了检测DNA里的m<sup>5</sup>dC修饰情况，研究人员使用了亚硫酸氢盐（bisulfite）测序法。可是由于在使用亚硫酸氢盐处理时，核酸会大量降解，所以无法使用该技术进行RNA m<sup>5</sup>C测序。因此，科研人员们又开发出了一种新的亚硫酸氢盐测序法。通过这种方法，人们就可以对tRNA和rRNA里的m<sup>5</sup>C位点进行检测。2012年，科研人员们利用亚硫酸氢盐测序法和高通量测序技术，首次获得了全转录组水平的m<sup>5</sup>C甲基化修饰图谱（图3a），并一共在人体mRNA里发现了8000多个m<sup>5</sup>C甲基化修饰位点。但是，由于使用亚硫酸氢盐并不能让dsRNA里所有的胞嘧啶全都发生转

化，而且用亚硫酸氢盐法也不能检测其它修饰，所以有些人认为，这8000多个位点里有一些肯定是假阳性结果。而且，由于使用亚硫酸氢盐处理会使RNA大量降解，并且没有预富集这个步骤，所以只能使用极大的测序深度，才能够完成低丰度RNA的检测。在另一项研究中，人们使用m<sup>5</sup>C RNA免疫沉淀法（m<sup>5</sup>C RNA immunoprecipitation, m<sup>5</sup>C-RIP）对通过亚硫酸氢盐法获得的嗜热硫磺硫化叶菌（*Sulfolobus solfataricus*）mRNA m<sup>5</sup>C的修饰结果进行了验证（图3b）。

最近，人们开发出了两种不同的m<sup>5</sup>C修饰检测方法，这两种方法均直接检测m<sup>5</sup>C甲基转移酶的作用靶点。第一种方法是5-氮胞苷介导的RNA免疫沉淀法（5-azacytidine-mediated RNA immunoprecipitation, Aza-IP）。该方法主要利用了m<sup>5</sup>C甲基转移酶能够促使甲基转移酶与其RNA靶标共价结合的特性。首先，在过表达经标记的m<sup>5</sup>C RNA甲基转移酶的细胞里，胞苷类似物5-氮胞苷会随机掺入新生的RNA分子。由于在C5位发生了氮替换，所以在RNA甲基转移酶作用于靶标RNA C6

位点时能够与RNA稳定地共价结合在一起。通过免疫沉淀操作对RNA进行富集，随后便可进行测序检测（图3c）。另外，使用这种方法也可以发现C-G转换，这使得m<sup>5</sup>C检测也达到了单碱基水平的分辨率。两个试验都确定，使用这种方法，可以在全转录组水平确定NSUN2和DNMT2的直接作用靶点。但是使用这种方法会漏掉没有被5-氮胞苷替换过的m<sup>5</sup>C位点。第二种策略也是利用了m<sup>5</sup>C甲基转移酶的催化特性，即发生了C271A突变的人体NSUN2甲基转移酶不能从RNA-甲基转移酶复合体中脱离出来，从而形成了稳定的NSUN2甲基转移酶——RNA复合体。因此，再使用CLIP策略，就形成了miCLIP测序方法，能够成功地发现转录组里的NSUN2作用靶标（图3d）。这两种方法都能够发现甲基转移酶的直接作用靶点，也不会受到各种甲基转移酶因为丰度不同而带来的影响。而且，因为有了免疫沉淀操作，所以虽然降低了测序的深度，也同样能够完成对低丰度RNA的检测。

DNA里的hm<sup>5</sup>dC是由TET蛋白对m<sup>5</sup>dC进行氧化之后形成的，hm<sup>5</sup>dC也是一个非常重要的表观遗传学修饰物。这种在DNA里发生的m<sup>5</sup>dC氧化反应促使我们联想到了另外一个问题，即RNA里是否也会发生同样的反应呢？事实上，最早在1978年时，人们就在小麦

种子的rRNA里发现了hm<sup>5</sup>C。最近，人们又发现哺乳动物和果蝇 (*Drosophila*) 的TET蛋白能够将m<sup>5</sup>C氧化成hm<sup>5</sup>C。同位素标记研究也发现，RNA分子里的m<sup>5</sup>C可以被氧化生成hm<sup>5</sup>C和5-formylcytidine。2016年，一种名为hMeRIP-seq的新方法出现了，人们可以使用hm<sup>5</sup>C特异性抗体对全转录组进行hm<sup>5</sup>C检测。人们利用这种方法对S2细胞进行检测，结果发现在黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的转录组中存在着3000多个hm<sup>5</sup>C测序峰。其中许多hm<sup>5</sup>C位点都位于编码区内，这与m<sup>5</sup>C的情况完全不同，说明hm<sup>5</sup>C和m<sup>5</sup>C的作用应该有差异。不过目前还没有单碱基水平的hm<sup>5</sup>C检测手段。针对DNA的hm<sup>5</sup>dC，目前有两种定量的、单碱基水平的检测方法可供选择。第一种是TAB测序法（TAB-seq），该方法首先使用糖基化反应（glucosylation）对hm<sup>5</sup>dC进行保护，然后使用TET酶去除m<sup>5</sup>dC，再用亚硫酸氢盐法检测hm<sup>5</sup>dC。第二种是oxBS测序法（oxBS-seq），即使用K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>选择性氧化hm<sup>5</sup>dC，然后利用亚硫酸氢盐法鉴别hm<sup>5</sup>dC和m<sup>5</sup>dC。但是这些都需要用到亚硫酸氢盐的方法是否适用于RNA检测，目前还不太清楚。此外，β葡萄糖苷转移酶处理ssRNA的能力可能不如它处理dsDNA的能力，而K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>催化的氧化反应可能会与核糖核苷上的2'羟基发生反应。

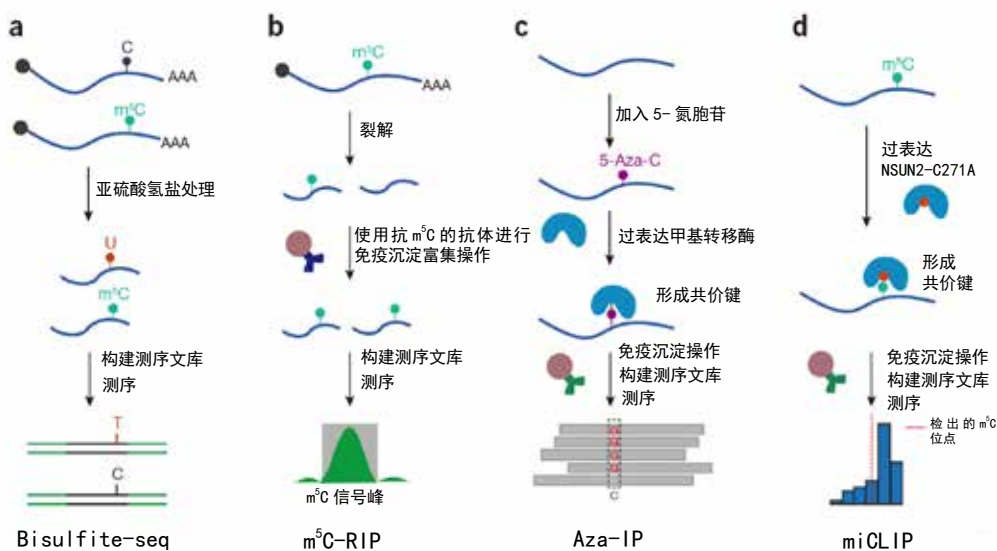


图3 (a) Bisulfite-seq; (b) m<sup>5</sup>C-RIP; (c) Aza-IP 和 (d) miCLIP 等四种全转录组 m<sup>5</sup>C 检测技术流程图。

## 严格的生物信息学和正交工具——次黄嘌呤（Inosine）

在较高级的真核细胞内，腺嘌呤次黄嘌呤编辑（Adenosine-to-inosine (A-to-I) editing）是最常见的RNA编辑方式，该反应由对dsRNA特异性的腺嘌呤脱氨酶（adenosine deaminases acting on RNA, ADAR）催化完成。ADAR酶偏好dsRNA分子，并且A-to-I编辑多见于非翻译区和内含子中的*Alu*元件里。A-to-I编辑对于基因表达调控起到了多种重要的作用，包括密码子的重新编码（recoding codons）、改变可变剪接（altering alternative splicing）和调控miRNA的生物合成及功能等。

次黄嘌呤编辑就是一种很好的例子，可以展现碱基替换之后，碱基配对特性也随之发生了改变的现象。在逆转录反应里，由于次黄嘌呤与胞嘧啶配对，而不是与腺嘌呤配对，因此在cDNA中它被转换成了鸟嘌呤。鉴于此，有一种检测A-to-I编辑位点的方法就是通过对cDNA序列以及相应的基因组序列进行分析，找出A-G错配的地方，进而确定A-to-I编辑位点。该方法最大的问题就在于单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism, SNP）、体细胞突变（somatic mutations）、假基因（pseudogenes）以及测序错误等情况会带来巨大的背景噪声。因此，人们最开始只会选择位于dsRNA区域里的位点作为检测对象，以尽可能地减少背景噪声。2009年，人们通过大规模平行目标捕获和DNA测序（massively parallel target capture and DNA sequencing）技术，开发了一种新的无偏倚的方法，并在重复序列之外的序列中，发现了3.6万个潜在的A-to-I编辑位点。虽然这种通过比对同一个体的基因组DNA和RNA序列，来鉴定次黄嘌呤的方法看起来挺简单的，但实际操作起来却非常复杂，因

其受到多种因素，比如不合适的生物信息学工具的影响等。幸运的是，多个科研团队又陆续开发出新的计算机程序，让我们能够在全转录组水平，精确无误地发现编辑位点。这再一次证明，严谨而功能强大的计算机程序在帮助我们发现RNA修饰方面具有不可替代的重要作用。最近，人们又开发了一种新方法——仅仅依靠多个样品的RNA测序结果，就可以发现次黄嘌呤编辑位点。由于该方法借助的是公共RNA数据库资源，因此不需要对同一个体进行深度的DNA和RNA测序，就可以达到检测的要求。

鉴于使用传统方法来检测A-G错配位点会受到很多因素的干扰，因此人们在2010年，又开发了一种新的化学标记方法，即次黄嘌呤化学清除法（inosine chemical erasing, ICE）。在这种方法里，人们使用丙烯腈（acrylonitrile）选择性地与RNA分子中的次黄嘌呤发生化学反应，生成 $N^1$ -cyanoethylinosine( $ce^1I$ )。由于 $ce^1I$ 能够终止逆转录反应，因此就会生成截断的cDNA，从而“消灭”了含有次黄嘌呤的RNA诞生的可能性。这样一来，只有未发生修饰的RNA分子才能逆转出完整的全长cDNA分子。通过对经丙烯腈处理和未经丙烯腈处理的RNA分子的测序结果进行比对，就能够精确地确定发生了A-to-I编辑的位点。2014年，ICE法又与高通量测序技术相结合，形成了ICE-seq新方法（图4）。使用该方法，人们可以在全基因组内无偏倚地筛查出A-to-I编辑位点。目前该方法已经应用于人体大脑转录组研究工作。ICE-seq方法是使用正交技术的典范，它让我们能够以非常高的精确度完成RNA修饰情况分析。

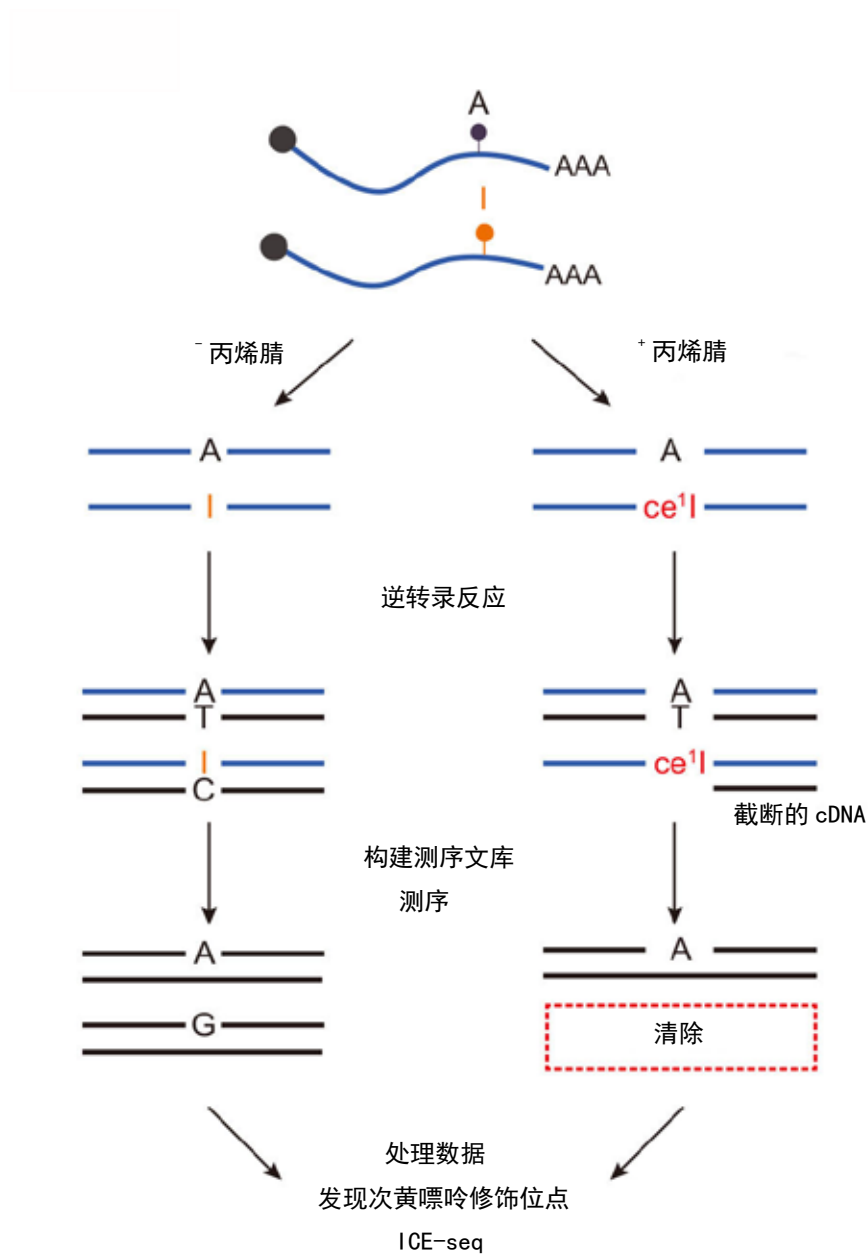


图 4 ICE-seq 技术原理图示。

## 非常常见的mRNA修饰——假尿嘧啶 (Pseudouridine, $\Psi$ )

$\Psi$ 是构成RNA分子的第五种核苷酸，也是含量最多的RNA修饰物，它广泛存在于rRNA、tRNA和snRNA等稳定的非编码RNA分子中。尿嘧啶经过两种不同机制的异化反应生成 $\Psi$ 。第一种异化反应机制是依赖RNA的机制，这种机制有H/ACA核糖核蛋白参与；第二种异化反应机制是不依赖RNA的机制，这种机制有功能强大的 $\Psi$ 合成酶参与。在这些非编码RNA分子中， $\Psi$ 发挥了非常重要的作用——调控这些RNA的功能。比如， $\Psi$ 可以帮助rRNA正确地折叠，并确保其翻译的保真性； $\Psi$ 还可以帮助tRNA稳定分子结构；另外， $\Psi$ 还能影响snRNP的生物合成和mRNA的剪接作用。最近，人们又在mRNA里发现了 $\Psi$ ，不过其功能还不明确。无论如何，哺乳动物的mRNA里存在着大量的 $\Psi$ ，比如在人体细胞和小鼠组织中， $\Psi/U$ 比值就达到了0.2-0.6%。

与尿嘧啶相比， $\Psi$ 多了一个氢键供体和一个更加稳定的C-C键。但是这些特点并不会改变其碱基配对特性，所以我们无法通过测序来区分 $\Psi$ 和U。为了区分这两种不同的碱基，科研人员们开发了一种特殊的化学标记方法，该方法主要采用*N*-cyclohexyl-*N'*-b-(4-methylmorpholinium) ethylcarbodiimide metho-p-toluene-sulfonate (CMCT)试剂。由于CMC- $\Psi$ 加合物也能够阻止逆转录反应，生成截断的cDNA，所以在引物延伸试验(primer extension assay)里，可以对rRNA达到单碱基分辨率的 $\Psi$ 检出水平。但是引物延伸试验需要预先了解被测RNA分子的哪些区域可能含有 $\Psi$ ，所以只适合检出特定位点的 $\Psi$ 。最近，该领域又出现了几种新型检测方法，这些方法能够在全转录组水平进行 $\Psi$ 检测，究其原理，主要是利用了几种选择性标记反应和高通量测序技术，比如 $\Psi$ -Seq、Pseudo-seq和PSI-seq。如图5a所

示，裂解的mRNA分子都需要与CMCT进行反应，然后确定出 $\Psi$ 的位置(图5a)。通过这些方法，人们已经在酵母细胞mRNA中发现了50~100个 $\Psi$ 位点，以及在人体细胞mRNA中发现了100~400个 $\Psi$ 位点。原作者课题组也利用叠氮CMC (azido-CMC, N3-CMC)这种CMC衍生物开发了CeU-seq技术。 $\Psi$ 被特异性化学标记之后，他们又在含有 $\Psi$ 的RNA分子上标记了一个生物素分子(biotin)，然后利用生物素pulldown试验富集出含有 $\Psi$ 的RNA分子，再进行测序分析(图5b)。由于有了这个富集的步骤，所以能够检测到低丰度的 $\Psi$ 碱基位点。他们利用CeU-seq技术，在人体和小鼠的转录组里发现了数千个 $\Psi$ 碱基位点。

之前通过对各个酵母细胞mRNA  $\Psi$ 修饰情况的比较发现，每个研究得到的结果都不太一致，几乎没有重复的结果。所以研究人员没有重新去评估酵母细胞的数据，而是使用 $\Psi$ -seq、Pseudo-seq和CeU-seq这三种方法对人体转录组 $\Psi$ 修饰情况开展的研究进行了比较。而且他们还对使用了同一种生物信息学软件(以保证对比条件一致)的3个不同测序结果进行了再次分析。结果他们发现， $\Psi$ -seq和Pseudo-seq的测序结果有一定的重叠，重叠比例从13%(已报道的结果)上升至41%，这说明使用不同的生物信息学切点(cutoffs)会影响不同数据之间的重复性。而且，在 $\Psi$ -seq和Pseudo-seq发现的 $\Psi$ 修饰位点中，分别有51%和69%的位点可以在更全面的CeU-seq结果中得到验证。实际上，使用相同的计算机算法也能够提高m<sup>6</sup>A-seq和MeRIP-seq测序结果的一致性。除此之外，他们还发现mRNA  $\Psi$ 修饰具有组织特异性，这说明在比较RNA修饰情况时，除了计算机软件之外，还有其它因素需要考虑。他们使用 $\Psi$ -seq、Pseudo-seq和CeU-seq这三种方法对

3种不同的人类细胞系进行了分析，由于哺乳动物细胞内存在13种 $\Psi$ 合成酶，因此，在不同的细胞和组织里，这些酶的表达丰度也是不一样的，这也极有可能会影响到RNA分子的 $\Psi$ 修饰情况。

虽然这些第一代技术已经成功地让我们发现了真核细胞mRNA  $\Psi$  修饰状况的普遍性和动态变化特征，但是科研人员们还不满足，他们还会进一步开发出新的改进技术。首先，所有现有技术里都需要用到CMC- $\Psi$ 来终止逆转录反应，如果能够进一步优化逆转录反应条件，允许在CMC- $\Psi$ 位点处发生碱基错误掺

入通读反应（misincorporation-containing readthrough events），而不是终止逆转录反应，那么也应该能够发现这些修饰位点。与逆转录反应终止相比，通读反应产物更有利于测序操作，更加能够降低信噪比。其次，为了达到一定的特异性，CMC介导的 $\Psi$ 标记反应既不充分，也不能定量操作。新的、能够更高效地与 $\Psi$ 发生反应的化学标记物将达到全转录组定量分析的要求，而且这些标记物也可以叠氮化反应，进一步增加其 $\Psi$ 检测可信度，类似于在CIMS和CITS中的应用和miCLIP里的 $m^6A$ 峰。

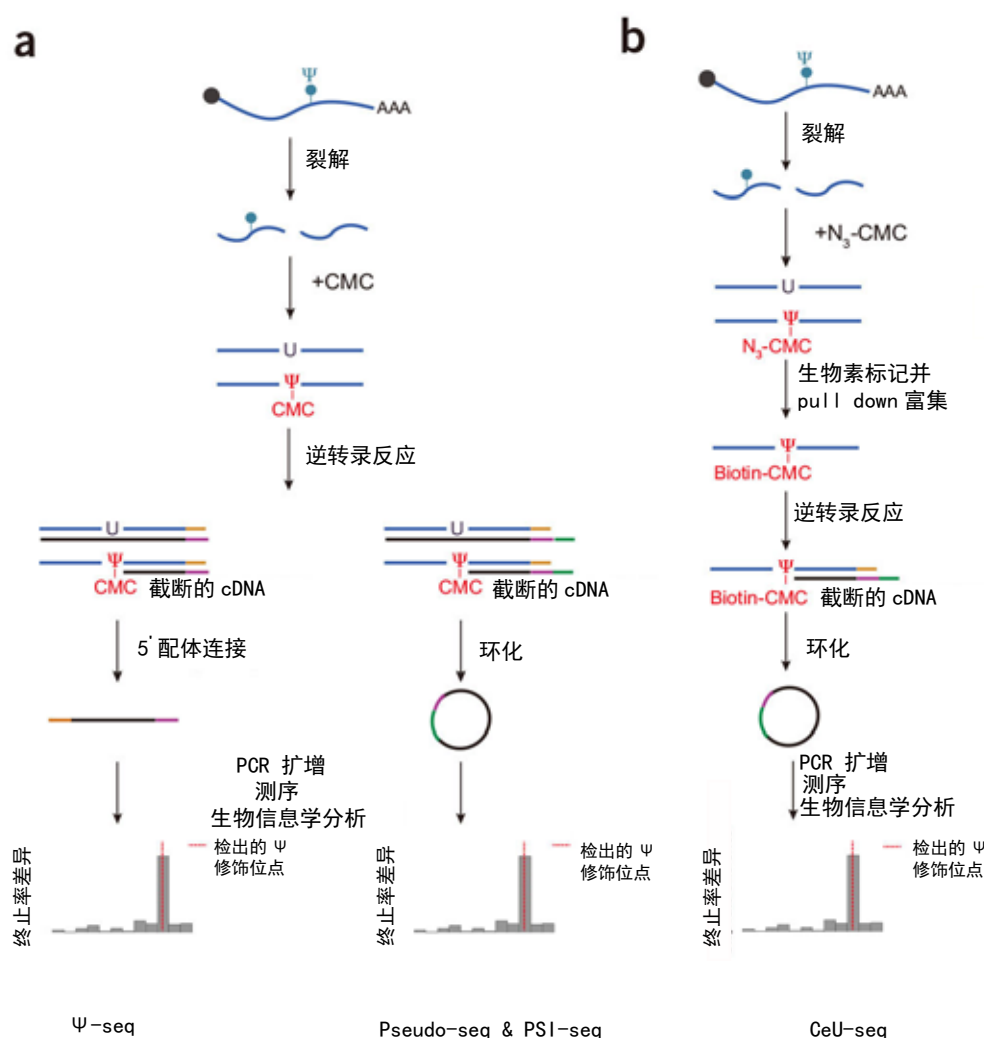


图5 真核细胞全转录组  $\Psi$  修饰检测技术原理示意图。(a)  $\Psi$ -Seq、PSI-Seq 和 Pseudo-Seq。(b) CeU-Seq。

## 新型真核细胞mRNA腺嘌呤甲基化修饰产物——m<sup>1</sup>A

m<sup>1</sup>A广泛见于tRNA和rRNA分子里。在tRNA中，m<sup>1</sup>A甲基化修饰反应发生于第58号碱基处，由TRMT6和TRMT61A复合体完成胞浆tRNA修饰反应，由TRMT61B完成线粒体tRNA修饰反应。这种修饰对于稳定tRNA分子的三级结构起到了非常重要的作用。多细胞生物（metazoan）线粒体tRNA分子第9位的m<sup>1</sup>A甲基化修饰反应则由Trmt10C催化完成，这能够影响tRNA分子结构的折叠过程。在人类28S rRNA分子里，m<sup>1</sup>A甲基化修饰反应发生在1322位点，由RRP8（又名NML）催化完成，该修饰反应是正确的rRNA生物合成的必要条件。

与常规的腺嘌呤相比，被m<sup>1</sup>A甲基化修饰过的腺嘌呤在Watson-Crick作用界面上又添加了一个甲基基团。这种结构改变让m<sup>1</sup>A不仅能够生成截断的cDNA分子，还能够在该修饰位点处引入错误的碱基，实现通读反应，生成全长的cDNA分子。不过，利用m<sup>1</sup>A的这种特性来直接在全转录组里检测m<sup>1</sup>A修饰位点，需要相当大的测序深度，同时这对后续的生物信息学分析也构成了不小的难题。因此，进行预富集操作就显得尤为重要。2016年年初，原文

作者实验室和其他实验室独立地开发出了两种不同的真核细胞转录组m<sup>1</sup>A甲基化修饰组检测方法，即m<sup>1</sup>A-seq和m<sup>1</sup>A-ID-seq法。这两种方法里都采用了特异性的m<sup>1</sup>A抗体来富集含有m<sup>1</sup>A修饰物的RNA分子，同时均结合了免疫沉淀和高通量测序技术。此外，他们还利用了其它一些策略来提高检测的可信度和分辨率。比如，m<sup>1</sup>A-seq法就利用了化学辅助反应，把会干扰逆转录反应的m<sup>1</sup>A转换成了不会造成影响的m<sup>6</sup>A（图6a）。而m<sup>1</sup>A-ID-seq法则在免疫沉淀反应之后，利用了RNA/DNA脱甲基酶，将m<sup>1</sup>A转换成了普通的腺嘌呤（图6b）。通过比较使用脱甲基酶处理和未使用脱甲基酶处理的测序结果，就能够发现高可信度的m<sup>1</sup>A峰信号。尽管这两种技术存在一定的差异，但主要结果都是能够互相印证的。而且，由于之前的m<sup>6</sup>A测序技术利用抗体成功地实现了单碱基分辨率和定量分析能力，我们相信在不久的将来，改进版的m<sup>1</sup>A测序技术一定能够取得成功，帮助我们更进一步地认识和了解这种新型表观转录组学标志物的作用和功能。

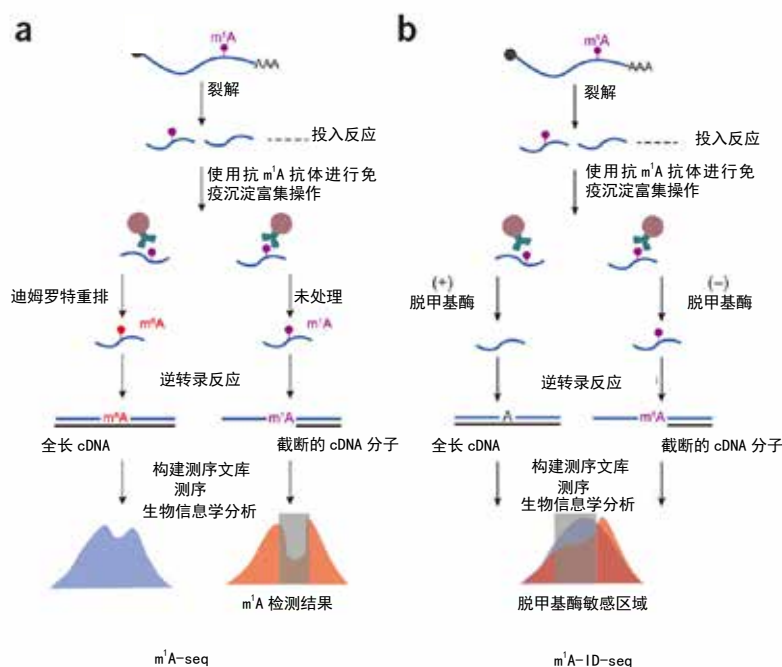


图6 m<sup>1</sup>A检测技术原理示意图。(a) m<sup>1</sup>A-seq。(b) m<sup>1</sup>A-ID-seq。

## 未来展望

尽管我们已经取得了不小的成就，但还是存在很多最新测序技术也不能满足的生物学研究需求。首先，我们还缺少能够检测RNA修饰物的正交技术（orthogonal methods）。其次，我们也需要绝对定量检测技术。由于人们发现DNA里的不同差异化的甲基化修饰区域（differentially methylated regions, DMR）具有非常重要的意义，所以大家都认为，发现RNA里的不同的差异化的甲基化修饰区域也一定很有意义。第三，我们还需要功能更强大、敏感性更高及所需检测样本更少的检测方法，这不仅仅是生物学的需要，更是未来研究表观转录组学生理学功能的需要。第四，在同一个转录子内，各种不同表观转录组标志物空间分布的关系也是一个亟待阐明的的问题。最近，在检测人工合成RNA分子 $m^6A$ 修饰情况的研究中，SMRT测序技术和纳米孔测序技术都向我们展现了特异性的、单碱基级别的分辨率。这些单分子检测技术未来也有望应用

于同时发现多个RNA修饰物，并解决表观转录组学研究目前所面临的一些问题。第五，我们还需要开发更多的新型测序技术，以便在转录组层面发现新的表观转录组学标志物。比如，最近出现的，检测真核细胞2' 氧甲基修饰（2'-O-methylation）的方法就是以碱性水解（alkaline hydrolysis）或逆转录反应终止技术为基础开发出来的。随着技术的不断进步，在全转录组水平进行2' 氧甲基修饰，或其它RNA修饰检测都将成为现实。

与不同的组蛋白修饰代表不同的转录调控作用类似，不同的RNA修饰方式也将发挥不同的RNA代谢及功能调控作用。尽管最近在表观转录组学研究领域里取得了不错的成绩，但人们对该领域的认识还只是冰山的一角。相信未来的表观转录组学测序技术将继续帮助我们揭开表观转录组学的奥秘，展现表观转录组学的神秘功能。

# 百态 · 频道

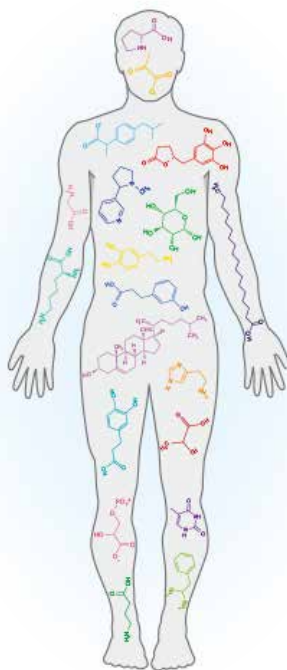
[www.LifeOmics.com](http://www.LifeOmics.com)



值得关注的

## 重要技术与方法学领域的发展

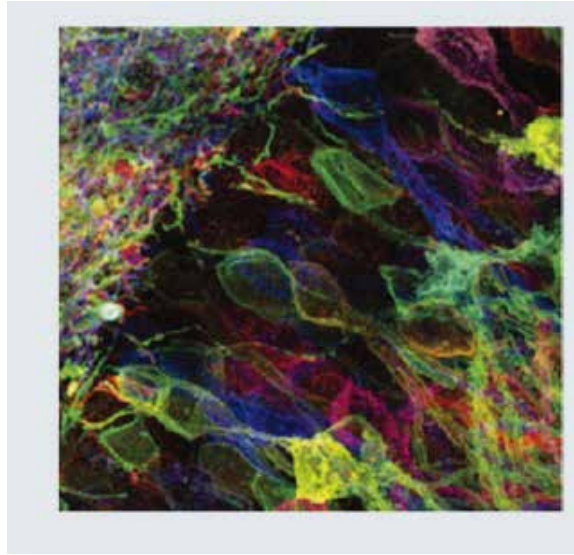
### 1. 全球代谢组学技术（Global metabolomics）



代谢物具有非常重要的生物学功能，要开展相关的研究，必须开发更多、更新的技术。然而目前在全球范围内，人们对代谢组进行测量研究的工作远远落后于对其它组学的研究。

希望将来研究人员能开发更多用户友好型的代谢组学技术，并让它们成为生物学家们“生物技术工具箱”中不可或缺的部分。

## 2. 膨胀显微技术 (Expansion microscopy, ExM)

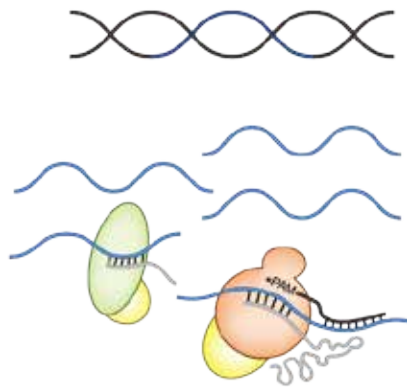


灵长类动物的神经元经膨胀后成像。

在膨胀显微技术成像前，我们可以通过一种吸水膨胀的聚合物令组织样品增殖，也即变得更大，从而实现常规显微镜的高分辨率成像

功能。这种技术操作简便，成本低廉。希望在这些技术的帮助下，我们能获得分辨率更高的图片。

## 3. 靶向RNA的新型CRISPR系统 (CRISPR targets RNA)

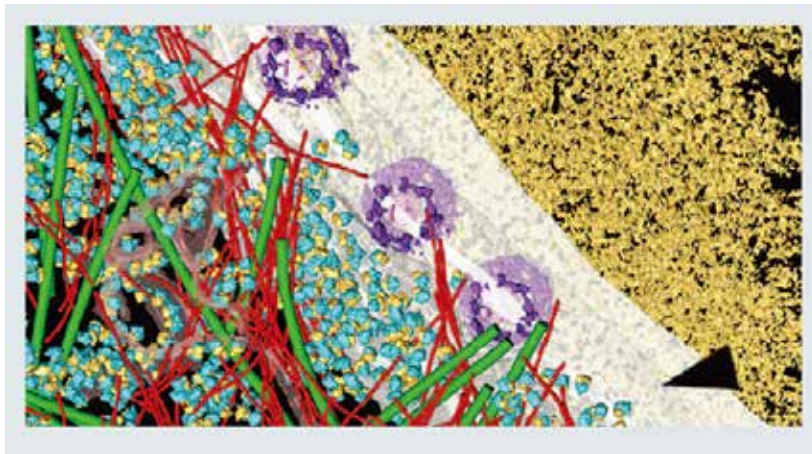


C2c2 (绿色) 或结合了PAM上的 DNA oligo的dCas9 (橙色) 分别与它们各自的指导RNA (灰色) 配对后，将效应蛋白 (黄色) 送到RNA处 (蓝色)。

虽然CRISPR系统主要被应用于DNA编辑，但是最近的研究已将其应用拓展至RNA编辑。这种靶向RNA的新型CRISPR系统可能允许科学家们让细胞基因组发生可根据需要进行上下调

节的临时变化，而且它比现有的RNA干扰技术具有更强的特异性和功能性。靶向RNA的新型CRISPR系统将为构建用于生命科学研究和医学的平台打下坚实的基础。

#### 4. 低温电子断层扫描术（cryo-electron tomography, cryo-ET）



采用cryo-ET技术来观察HeLa细胞的核周。

Cryo-ET是一种应用于探索生物体内部，尤其是细胞内结构的仪器。它将三维成像技术和保持完整细胞结构的样品制备方法有机结合，从而实现了在接近真实状态下高分辨率地

观察大分子结构的目的。Cryo-ET的出现将在蛋白质组规模上促进原位结构生物学新型技术的开发进展。

#### 5. 捕捉微生物的相互作用（Capturing microbial interactions）



微生物群落影响周围环境，并反过来受环境影响。

深入了解微生物间相互作用的新型技术将帮助研究人员解决该领域长期存在的问题，例

如微生物组是如何防止病原菌入侵的，并进一步协助研究人员开发可控的实验平台。

## 6. 更快的脑部成像技术（Faster brain imaging）



加快神经元活动的成像速度。

钙或电压敏感型探针可以让我们实时看到神经元的活动。但是同时观察较大神经元网络的活动并非一件容易的事情，因为许多相关的成像技术受到了时间分辨率和视野相互制约的阻碍。虽然对于透明生物来说，宽场显微技术，例如激光层照荧光显微技术（light-sheet fluorescence microscopy）或光场显微技术（light-field）可以解决这个难题，

但是对于光散射型的啮齿动物脑部来说，问题就显得更加复杂了，因为采用传统的技术，例如双光子扫描技术来对神经元活性进行成像，速率会非常低。鉴于此，业界开发了很多新型的技术，而最近新型显微镜硬件设备和现有技术的结合使得脑部成像技术获得了更快的发展。

## 7. 单细胞如何发挥作用 (How single cells do it)

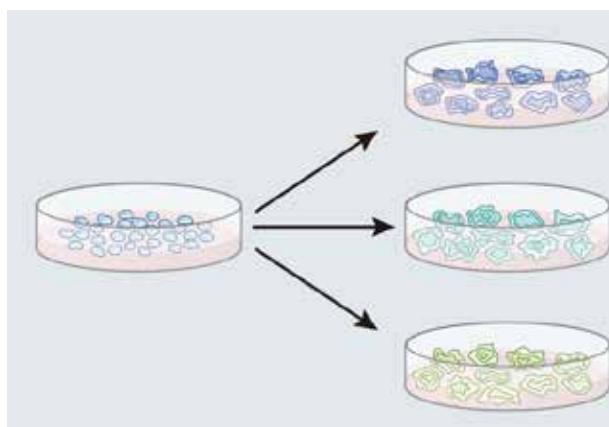


单细胞测序技术有助阐明细胞的作用和相关工作机制。

单细胞测序技术破解了组织异质性的难题，并使人们能够研究新型细胞和罕见的细胞群落。人们现在利用新型应用和分析工具来揭示细胞在组织、发育过程，以及相关的遗传程序中所发挥的功能。

而随着单细胞RNA测序技术的使用变得越来越普遍，研究人员将能开发出更强大的实验性和分析性平台，以探究细胞的功能。

## 8. 类器官培养 (Organoid culture)



许多方法都可以培养出不同类型的类器官。

目前研究人员已经培养出一系列类器官组织，包括视网膜、肾、肠、肺、脑和肝，这些还仅仅是其中一部分。随着人们对该领域的兴趣越来越大，研究工作慢慢转向改善成熟的器官，甚至是尝试将免疫细胞和血管整合进器官中。有趣的是，研究人员甚至还通过原发肿瘤来培养类器官，从而将其作为肿瘤生物学的

模型，或作为试管内部等体外实验的更为真实的系统，以开展药物筛选工作。但是值得一提的是，虽然活体外（*ex vivo*）组织化培养有望带来一场生物学革命，但是我们必须深入了解其结果的可变性，同时能够修正它，并控制它。

#### 原文检索：

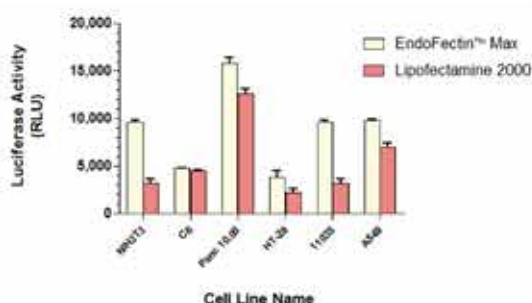
1. Michael Eisenstein. (2017) Epitranscriptomics: mixed messages. *Nature Methods*, 14 (1): 15-17.
2. Arne Klungland<sup>1</sup>, John Arne Dahl, Gareth Greggains, Peter Fedorcsak & Adam Filipczyk. (2017) Reversible RNA modifications in meiosis and pluripotency. *Nature Methods*, 14(1): 18-22.
3. Xiaoyu Li, Xushen Xiong & Chengqi Yi. (2017) Epitranscriptome sequencing technologies: decoding RNA modifications. *Nature Methods*: 14(1): 23-31.
4. Allison Doerr. (2017) Global metabolomics. *Nature Methods*, 14 (1): 32.
5. Rita Strack. (2017) Expansion microscopy. *Nature Methods*, 14 (1): 32.
6. <http://www.ebiotrade.com/newsf/2016-6/201662152510957.htm>
7. Nicole Rusk. (2017) CRISPR targets RNA. *Nature Methods*, 14 (1): 33.
8. <http://www.ebiotrade.com/newsf/2016-6/201661155130939.htm>
9. Allison Doerr. (2017) Cryo-electron tomography. *Nature Methods*, 14 (1): 34.
10. <http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical/smdhx200504023>
11. Tal Nawy. (2017) Capturing microbial interactions. *Nature Methods*, 14 (1): 35.
12. Nina Vogt. (2017) Faster brain imaging. *Nature Methods*, 14 (1): 34.
13. Tal Nawy. (2017) How single cells do it. *Nature Methods*, 14 (1): 33.
14. Natalie de Souza. (2017) Organoid culture. *Nature Methods*, 14 (1): 35.
15. <http://www.cnblogs.com/burellow/archive/2012/10/09/2717251.html>

张洁、Eason /编译

# EndoFectin™ 转染试剂

· 高效 · 低毒 · 适用于多种细胞系

- 转染效率高，适用于多种细胞系的转染
- 细胞毒性低，保证高细胞活性
- 转染前无需去除细胞培养液或血清
- 转染后无需清洗细胞或更换培养基
- 可用于基因过表达、基因敲减/敲除、微孔板的高通量转染操作



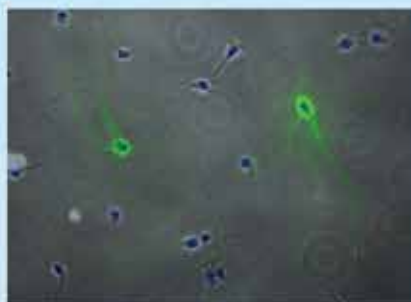
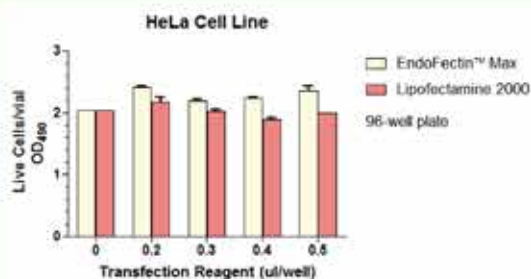
转染效率更高

图 1. EndoFectin™ Max、Lipo2000 分别以 Fluc 表达质粒转染几种低转染效率细胞，通过检测荧光素酶的表达活性比较转染效率。

\* Lipo2000 即为 Lipofectamine® 2000, 是 Invitrogen 的注册商标。

细胞毒性更低

图 2. EndoFectin™ Max、Lipo2000 分别对 HeLa 细胞进行转染操作，通过计算转染后的细胞存活率比较细胞毒性。



客户使用实例

图 3. 体外培养 11 天后，应用 EndoFectin™ Max 将绿色荧光蛋白 (GFP) 转染至大鼠海马神经元细胞，转染后 24 小时后荧光观察的转染效果，转染效率比 Lipo2000 高 10 倍。(蓝色荧光：细胞核的 DAPI 荧光染色)

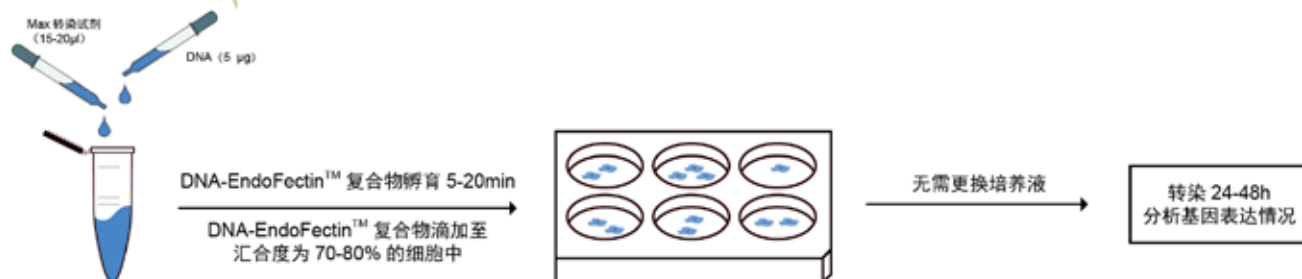


图 4. Max 转染试剂简便操作流程

| 产品名称            | 适用性       | 货号    | 规格   | 目录价     | 促销价     |
|-----------------|-----------|-------|------|---------|---------|
| EndoFectin™ Max | 广泛适用于多种细胞 | EF003 | 1 ml | ¥ 2,000 | ¥ 1,600 |
|                 |           | EF004 | 3 ml | ¥ 5,000 | ¥ 4,000 |

## EndoFectin™ 系列其他转染试剂

EndoFectin™ 系列除了明星产品 Max，更有针对 HepG2、293T、悬浮 293F 细胞的专业转染试剂！

| 产品名称                        | 适用性                     | 货号    | 规格   | 目录价     | 促销价     |
|-----------------------------|-------------------------|-------|------|---------|---------|
| EndoFectin™ Lenti           | 转染 293T 细胞，可收获更高滴度的慢病毒  | EF001 | 1 ml | ¥ 1,700 | ¥ 1,360 |
|                             |                         | EF002 | 3 ml | ¥ 4,000 | ¥ 3,200 |
| EndoFectin™ Expi293 增强转染试剂盒 | 专注转染悬浮细胞 293F，转染效率极高    | EF009 | 1 l  | ¥ 3,300 | ¥ 2,640 |
| EndoFectin™ HepG2           | 专注转染人肝癌细胞系 HepG2，转染效率极高 | EF005 | 1 ml | ¥ 2,400 | ¥ 1,920 |
|                             |                         | EF006 | 3 ml | ¥ 6,000 | ¥ 4,800 |

## 双重特惠

“

**特惠一** 订购 EndoFectin™ 系列任一转染试剂即享 8 折特惠价！

“

**特惠二** 同一订单订购 EndoFectin™ 系列转染试剂 10 个及以上享额外优惠！

### 客户发表文章举例：

- ◆ Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of complex I deficiency, 2010, *Nature Genetics*, IF 36.377.
- ◆ Increased internalization of complement inhibitor CD59 may contribute to endothelial inflammation in obstructive sleep apnea, 2016, *Science Translational*, IF 15.843.

易锦生物  
iGeneBio

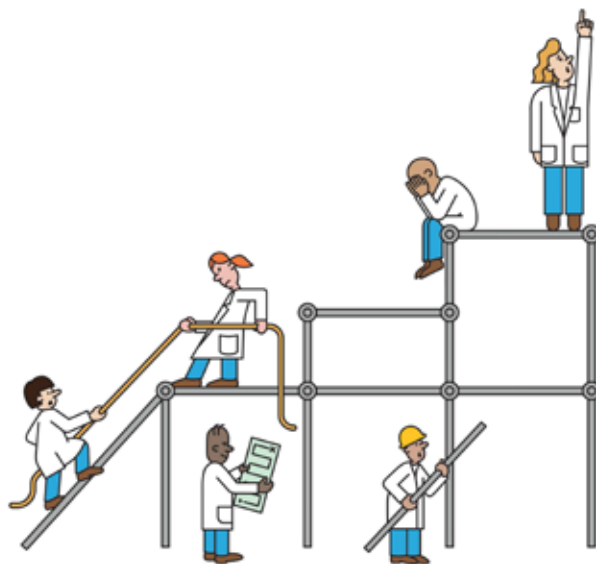
复能基因  
FulGen

地址：广州科学城揽月路 3 号 F 区 8 楼 (510663)  
电话：4006-020-200 020-32068595  
邮箱：sales@igenebio.com  
网址：www.igenebio.com  
www.fulengen.com



# Hot topics 热点

## 科研项目里的那些“大词”



在各个大型的科研项目里，我们经常会看到登月计划、框架图、路线图这些词，但这些词究竟是什么意思呢？

2016年1月12日，就在即将迎来人类首次踏上月球50周年之际，一位总统和一位大富豪各自宣布了一项新的“登月计划”。美国总统Barack Obama在美国华盛顿特区向大家介绍了一个由美国政府领导的大项目，即“癌症研究界的登月计划（Cancer Moonshot）”，其目的是加快癌症研究的步伐。而在美国加利福尼亚州，大富豪Patrick Soon-Shiong也召开了一个新闻发布会，宣布了他的“癌症登月2020计划（Cancer MoonShot 2020）”。这不是一个政府主导的项目，而是一个由企业和科研机构合作完成的工作。

如果大家对“癌症登月计划”这个名字感觉比较耳熟，那一定是因为美国德克萨斯大学MD安德森癌症研究中心（University of Texas's MD Anderson Cancer Center）也在2012年9月时宣布过他们的“癌症登月计划”。Soon-Shiong也曾经为此被控侵权。

将某个项目比喻为登月项目，这在科研界是一种非常常见的做法。据美国国立卫生研究院（NIH）科学、外延及政策部副主任Kathy Hudson介绍，他在华盛顿工作过很长一段时间，并且感觉每过一段时间，就会有人跟他提到一个‘登月计划’。

“登月计划”、“路线图”和“倡议”等科研界做计划时最常用的行话都有一定的意义，但是选择这些词的人其实也很难准确地说清楚，这些词究竟是什么意思。这些词彼此之间似乎也可以互换，但如果详加揣摩，又似乎能够发现在所表达意思（科研意图和目标）的层次上面一些区别和不同。比如“登月计划”，重点强调的就是可达成性，只不过在技术层面上还有相当大的困难。而“路线图”和“十年调查（decadal surveys）”则更具有里程碑和大事件式的意味，更强调在该领域的前驱性。这也就是说，很多科研计划其实在命

名时就已经用了不恰当的词了。

策略性的机会往往会耗费大量的经费，也更加鼓励以协作的模式来开展。比如在美国，很多科研资助机构就希望在2017年启动，或者继续“大科学（big science）”的工作。美国国家科学基金会（National Science Foundation）就已经向Obama政府的BRAIN项目提出了7400万美元的经费申请，同时还向美国国家战略运算首创项目（National Strategic Computing Initiative）要求了3300万美元的经费。NIH则希望继续为BRAIN项目、精准医疗项目提供资助，也有可能支持癌症登月计划。美国能源局科学办公室（Department of Energy's Office of Science）则为包括大型强子对撞机（Large Hadron Collider）在内的高能物理项目申请了8.18亿美元的经费，也为继续支持大型的国际合作项目ITER（ITER fusion project）提供了3.98亿美元的科研经费。当然，美国国家航空航天局（NASA）也不甘落后，他们提出了15亿美元的行星探索计划（planetary exploration proposal），其中就包括了探索木星的卫星木卫二的计划，以及继续开展火星探索工作等。

不过，大家对开展这些科研工作的价值还存在争议。一方面，很多人都认为一项科研工作资源、组织和长远目标等方面的完美结合，是科学取得进展的关键。美国田纳西州橡树岭国家实验室（Oak Ridge National Laboratory in Tennessee）的主任Thom Mason就参与了ITER项目的很多工作，他认为，有很多科学问题的解决都需要大量资源的投入。很多时候，这些重大项目真的决定了整个领域的发展。

进行全面、宏观的思考，并做出大量的实际工作的确经常会成功。但是批评者认为，这

些表面光鲜的宏大工程也势必会增加不必要的官僚主义，浪费大量的金钱，减少创造性和经费支持的稳定性，而且往往缺少基础科学方面的理论基础依据。

美国约翰霍普金斯大学公共卫生学院（Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health in Baltimore, Maryland）的微生物学家、mBio杂志的主编Arturo Casadevall认为，科学从其本质来说就需

要稳定性。重大科研项目，尤其是政策主导的项目，往往就会在稳定性上出问题。Casadevall表示，他们都很担心，出于政策的需要和预期而将科研经费集中到某一个科研领域，使其盲目地扩张，以至于超出了可控的范围，造成不必要的浪费。

为了帮助大家了解科研项目计划的生态学问题（ecology），接下来将会介绍几个与此有关的因素。

## 登月计划（moonshot），即向月球发射宇宙飞船的计划

登月计划（moonshot），即向月球发射宇宙飞船的计划，这是牛津英文词典对“登月计划”的解释。登月计划往往也特指美国国家航空航天局的“阿波罗计划”，正是因为“阿波罗计划”，人类才在1969年首次登上了月球。不过有证据显示，早在1891年，美国明尼苏达州的一家报纸专栏就使用登月计划来比喻在技术上非常有难度，但也并非完全不可能实现的项目。当时这家报纸将要求住房比喻为“比登天还难”。儒勒凡尔纳在1865年的科幻小说《从地球到月球》（*From the Earth to the Moon*）里也用到了登月的概念。

现在很清楚的是，“登月计划”已经成为了美国科研界最鼓舞人心的一个词。现如今的科学家们用这个词来形容一项伟大的工程学项目。美国加州理工大学（California Institute of Technology in Pasadena）的生物学家Barbara Wold曾经担任过人类基因组计划的科学顾问，她指出，人类基因组计划就和NASA的登月计划一样，因为它们拥有同样具体的目标（完成人类基因组的测序），而且在启动该项目时，她们手头还没有太多的技术手段来实现这个目标。帮助美国开发出原子弹的曼哈顿计划（Manhattan Project）也曾经被用来与登月计划类比。但是Wold认为，这种比喻不太合适，因为她觉得，曼哈顿计划

只不过用到了已有的技术，而且当时的项目目标其实并不明确。

阿波罗计划、曼哈顿计划和人类基因组计划最终都取得了成功，这是因为背后有国家和政策的支持，而且有坚实的基础科学理论（比如牛顿物理学和核裂变理论）做支撑。所以很多人担心，癌症登月计划是否可行，因为目前并没有非常坚实的癌症基础科学理论。对此，Casadevall指出，只有在基础科学领域取得了突破，才有可能在大型科研项目中获得成功。而癌症登月计划的问题就在于此。

美国约翰霍普金斯大学医学院Sidney Kimmel癌症综合研究中心（Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins University School of Medicine）的主任Elizabeth Jaffee表示，科学界目前已经有了足够的储备，能够迎接规模达到10亿美元的Obama癌症登月计划。我们在基础科研领域、癌症生理学领域和科研技术方面都已经取得了很大的进展，因此，现在是时候将这些科研成果转化成临床治疗手段了，我们要治疗癌症，而不仅仅是阻断癌症的进展。

2016年9月，癌症登月计划28个项目成员之一的“蓝带小组（Blue Ribbon Panel，在美国，往往会就某个特定的项目成立一个特别工作组，即蓝带小组，Jaffee是该小组组长

成员之一)”就未来5年内的发展方向确定了10个研究领域，也就是重点支持和发展的研究领域。其中包括对结肠癌高危家族成员进行早期筛查、建立网络肿瘤患者数据库等比较容易实现的目标。Jaffee认为这些都不是什么高科技工作。

但是挪威奥斯陆大学（University of Oslo）专门从事癌症和科学传播交流研究的Jarle Breivik则认为，无论如何，使用“登月计划”这个词都会给人误解，也会给公众带来误导。他一直认为，如果我们花费大量的金钱和力气来研究癌症和化疗，那就一定得解决

这个问题。

公众如果认为开展癌症登月计划就意味着能够彻底治愈癌症，那是可以理解的。Obama在2016年1月的演讲中也说到：“让我们一起，让美国成为一个能够彻底治愈癌症的国家吧。”可是在现实情况中，政府的目标是用未来5年，去完成一个原本需要花费10年才能完成的工作，而不是治愈癌症。Jaffe也承认，他们回过头来看，‘登月计划’这个词很有可能用得很不恰当。如果用‘路线图’这个词应该更合适，不过听起来就没有那么高端大气上档次了。

## 路线图，即能够指引你到达某个地区的地图

欧洲人特别爱用“路线图”这个词。比如2008年提出的历经3次更新的“欧洲天体物理路线图计划（European Roadmap for Astroparticle Physics）”等。后来他们又陆续提出了“欧洲宇宙生物学路线图（European Astrobiology Roadmap）”和“欧洲血液学会欧洲血液学研究路线图（European Hematology Association’s Roadmap for European Hematology Research）”等项目。当时大约300人在两年内就完成了“欧洲血液学会欧洲血液学研究路线图”项目的编制，该项目一共分9大块，涉及60多种疾病。欧盟委员会（European Commission）是欧盟的执行机构，他们自2015年起，已经提出了384个涉及政府工作各个领域的路线图计划。

路线图一般用来代表为了完成某个短期或长期的里程碑式的工作，而制定的战略性计划。比如1998年的国际半导体技术路线图计划（International Technology Roadmap for Semiconductors）就将摩尔定律（Moore’s law）从一个观察到的现象转化成了用来促进微处理器发展的研究发展计

划。

据布达佩斯欧洲创新及技术研究院（European Institute of Innovation and Technology in Budapest）的Stefano Fontana介绍，“路线图”这个词是在21世纪初在欧洲流行起来的，在此之前，美国的NASA和能源局特别喜欢用这个词。欧洲注意到这个词是因为NASA的“2004太空探索项目（2004 Vision for Space Exploration）”。他们当时成了一个部门，专门处理月球返回、国际空间站建立和火星探索等任务。

Fontana在2007年将NASA的这个路线图项目纳入了他自己的计划里，这是一个包括了16个项目的“路线图之路线图计划（road map of road maps）”。这也导致路线图项目在欧洲遍地开花。据Fontana介绍，欧洲已经有20多个国家开展了自己的路线图项目。

路线图也非常适合欧洲，这是因为它能够将欧盟的28个成员国集合起来，互相合作。Fontana指出，这也是他们处理复杂问题的方式。Fontana在他的分析报告里指出了成功的战略计划的四大要素，即持续时间长、资

金支持、良好的质量评估体系和竞争性（比如一个对所有人开放的市场）。

Fontana还总结道，路线图项目能够有效实施的最低要求就是要获得国家级基金的支持，比如NASA和美国国家能源局那样。更常见的情况是，由国家出面组织一个路线图项目。比如癌症登月计划里的蓝带小组，其实就

是由四个美国联邦机构出资，由学术界、私人机构和政府等多方代表共同制定一个路线图计划的组织。在更大的层面来说，路线图项目也可以是多国共同参与的项目，这在欧洲比较常见。大家会共同制定出一个计划，来完成一个科研首创项目倡议（initiative）。

## 首创项目（initiative），即首次、开始启动一个 新的流程或工作

眼下，首创项目这个词在美国非常流行，有两个超大规模的科研项目都用到了这个词，那就是Obama的2013大脑项目（2013 BRAIN Initiative）和他的2015精准医疗项目（2015 Precision Medicine Initiative, PMI）。

大脑项目是一个投资45亿美元，历时12年的大型科研项目，几乎每一个政府科研机构都会参与该项目。到目前为止，他们已经在生命科学研究领域里拨付了1.5亿美元的经费。而2015年启动的精准医疗项目则投资2.15亿美元，其中有1.3亿美元将用于收集数据，即计划在一个较长的时间内，收集全美100万人口的健康数据。

精准医疗首创项目很像一个包装得非常漂亮的大型科研项目，但是该项目也被叫做“登月计划”。作为精准医疗项目工作组组长之一的Hudson表示，大脑项目和精准和医疗项目这两个首创项目的名字都是在同一间办公室里诞生的，但是它们可不仅仅只是在名字上有相似之处。首先，这两个项目都需要包括美国NIH、FDA和国防部等各大科研机构的通力合作，才能实现其科研目标。

而且，这两个项目都是致力于打造大型的、以技术为基础的科研平台。多个领域的疾病都可以（并且只能够）利用这个平台开展更进一步的科研工作。这两个项目并非只是针对单一疾病的疾病特异性的科研项目，而是和其它的登月计划或路线图项目一样，专注于将资源投入到会产生更广泛的、我们目前还无法预料的影响。而且这两个项目也和其它的登月计划或路线图项目一样，更注重计划性、协作性和管理职能。

但是，当这些大型科研项目进展到最后阶段，也开发出了一些新技术的时候，就会面临一个质疑，这些技术是否真的有用，还是再一次对科研资源的浪费？比如当时还在美国国家人类基因组研究所（National Human Genome Research Institute）工作的Francis Collins在对人类基因组计划做总结时，就对从事基因组工作的科研工作者们提出了一系列的、需要继续攻克的重大科研问题，比如开展HapMap研究，以发现人们个体之间最常见的遗传变异；开展ENCODE项目，对基因组中所有有功能的DNA序列进行分类，编制成目录。所有这一切，就是为了“收回投资”，让这些

科研进展能够最终为我们服务，产生回报。

但是美国亚利桑那州立大学（Arizona State University in Tempe）的政策分析师 Daniel Sarewitz 却认为，仅仅依靠收集数据和信息，还不足以保证一个首创项目成功。Sarewitz 同时也是《自然》（*Nature*）杂志的专栏作者，他在去年撰写的《新亚特兰蒂斯》（*The New Atlantis*）一文中就批评道，大脑项目和精准医疗项目不过也是 datageddon 而已，即希望使用大数据项目和海量的数据资源来解决复杂的问题，提出近乎无穷种可能的

假说，再对其进行验证。因此，这些数据可能会给我们一些看起来有意义的结果，但是对于真实世界里的医疗实践而言，却毫无意义。Sarewitz 指出，对于大脑这种复杂的系统，科研工作似乎能够获得一些进展，但实际上，只不过是给科研工作增加了一些噪音而已。

当人们在评价一些大项目的时候，依然会有这些担心。Mason 也表示，在投入这种规模的科研资源的时候，真的需要有一套责任机制。你必须对社会有所交代，有投入就得有产出。

## 框架图（framework），即一套必需的底层结构、 一种临时的设计、一个轮廓、一种概念上的设计或系统

澳大利亚阿德莱德卫生技术评估机构（Adelaide Health Technology Assessment）是一个专门为澳大利亚卫生部提供健康干预手段评估服务的研究机构，该机构的执行主任 Tracy Merlin 认为，**框架图是为某个领域提供一份计划，或者是为某个组织或国家指出一个未来的发展方向。框架图就是为某个政策和科学提供一个定位，及思想交流的平台。**

澳大利亚在框架图方面下了很大的力气。2009年，澳大利亚政府宣布了国家气候变化科学框架图项目（Climate Change Science National Framework），准备为澳大利亚十年内的国家级气候变化排定一个先后顺序。该项目预计在四年内投入2350万美元的科研经费。澳大利亚还开展了医疗卫生领域里的安全

和质量框架图项目，涉及医疗、慢性病、精神卫生服务、医学美容和产后抑郁等诸多方面。

早在2013年，Merlin就在一个国家级的个性化医疗框架图项目里担任过主要负责人。他表示，如果有一系列的工作，全都涉及同一

个目标，那么你可以叫它框架图项目，这也有利于突出该项目的重要性。他们也正是这么干的，然后还加上了一点市场化的东西。

Mason 认为，只要应用得当，框架图这个词不仅可以辅助政策制定者和公众，还有助于科研人员在更大的层面上了解，并更好地解释这项工作。他指出，我们可以这样理解，‘如果我可以解决这个问题，那么在一个更大的企业里，就可以开发出一种治愈某种疾病的新药，就可以消除贫穷，或者创造出我们所需要的能源等。

不论是否开展框架图、登月计划或其它的项目，这种大局观都有助于我们集中注意力和所有的资源。Mason 指出，好点子总是比钱要多得多，因此，大家一起坐下来，共同讨论出优先发展的事项，这才是整个领域取得成功的关键。Mason 总结道，科学在一定程度上也是要靠运气的，但是也需要依赖技术的进步才能解决更大的难题。如果没有那些难题激励我们去攻关，你就会错过很多科学发现的机会。

## 科研项目的别名

并非所有由政府主导的科研项目都会使用“登月计划”这类宏大的字眼。大多数情况下，即便科学界开展的是一些“草根”式的项目，也会用一些字眼来吸引眼球。接下来就给大家介绍几个常见的科研项目“别名”。

### 十年规划 (DECADAL SURVEY OR STRATEGY)

这是美国国家科学与工程医学研究院 (US National Academies of Science, Engineering, and Medicine) 特别钟爱的一个词。所谓“十年规划”指的就是应该重点支持某个发展方向和领域。美国科学院 (The National Academies) 自 1964 年以来，就一直在为天文学 (astronomy) 和天体物理学 (astrophysics) 制定十年规划，他们也已经将空间地球科学 (space-based Earth science) 列为 2017~2027 年间的重点发展方向。

### 蓝图 (BLUEPRINT)

这种计划也是非常常见的，但是也有了“首创项目 (initiative)”这个词一样的新的含义。比如 2009 年的英国生命科学蓝图 (The 2009 UK Life Sciences Blueprint) 就是加快新药在英国上市速度的一个项目。就在同一年，美国国立卫生研究院 (NIH) 也为 NIH 神经科学研究蓝图 (Blueprint for Neuroscience Research) 设立了一个子项目，即神经疗法网络蓝图项目 (Blueprint Neurotherapeutics Network)。

### 未解的难题 (PROBLEMS)

1900 年，德国数学家 David Hilbert 列出了有名的 23 道未解的难题，引起了整个数学界的关注和重视，也引领了后续数十年的研究工作。到了 2000 年，克莱数学研究所 (Clay Mathematics Institute) 也打算效仿 Hilbert，列出一份新的名单。他们列出了七大世纪难题。美国国防高级研究计划局 (US Defense Advanced Research Projects Agency, DARPA) 也不甘落后，他们在 2008 年也提出了一个包含 23 个问题的难题名单。

### 研究策略 (RESEARCH STRATEGY)

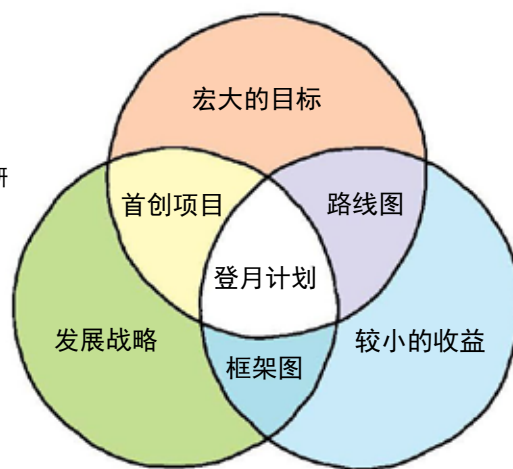
制定研究策略是为了在一个较短的时期内，为科研项目排定优先发展级别。2014 年，英国癌症研究所 (Cancer Research UK) 制订了一个 5 年发展计划，重点支持那些与发展策略有关的研究项目。今年，伦敦的癌症研究所 (Institute of Cancer Research in London) 又推出了他们的 5 年计划，重点支持与肿瘤适应和演进问题相关的研究项目。

### 共识 (CONSENSUS STATEMENT)

往往在某个研讨会开过之后，会马上发布一个会议共识。这种共识通常都是对某个非政府组织和非宣传机构观点的总结。自 1977 年起，NIH 就开始主持了一个共识制定项目，已经就医学领域的多个问题发布了 160 多个共识。该项目于 2013 年结束，由科克伦协作体 (Cochrane Collaboration) 和美国医学会 (Institute of Medicine) 等其他组织继续开展这类公平、公正的，以循证医学为基础的综述性工作。

为一个科研项目命名的小窍门

当我们有了一个好点子、一个远大的目标和一大笔科研经费的时候，就该想想如何为这个工作起个好名字了。希望这个图例能够帮到你。



原文检索：

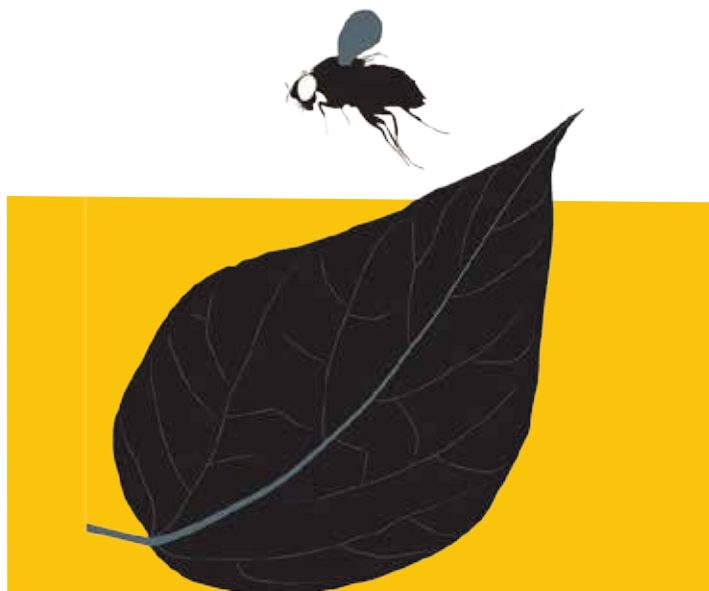
Megan Scudellari. (2017) Buzzwords and big dreams. *Nature*, 541: 450-453.

Eason/编译

Amazing lives

# 百态

苍蝇为什么会特别喜欢某种  
“重口味”？



讲到便便，谁都会掩鼻而走，但苍蝇和某些昆虫却对这些东西有着不同寻常的喜好。它们不但在上面产卵，而且还偶尔飞到动物的便便上美餐一顿。值得一提的是，人们已经证实，世间的便便并不是“生来”平等的。这一点苍蝇就很清楚，它们会识别哪些便便才是自己的心头好：某些粪堆对它们有高度的吸引力，而芳香扑鼻的花儿则备受冷遇。于是问题来了：难道苍蝇也有口味上的选择吗？最近，《当代生物学》（*Current Biology*）上刊登了一篇文章，作者是瑞典隆德大学（University of Lund）的Suzan Mansourian等人，他们向我们展示了其中的原因。

众所周知，大型哺乳动物能以不同的方式被分类，其中一种大的分类方法是以动物的饮食习性特征为准，将其分为肉食性和植食性的，亦即人们熟知的食肉动物和食草动物。这两种动物除了在外形上存在明显差异（如牙齿、爪子等）之外，肠子长度和结构也有所不同。更深入地看，两者的体内存在截然不同的微生物群，以帮助它们消化食物。据Mansourian团队表示，这最后一条，正是苍蝇识别粪便的最关键所在。

首先，研究小组为苍蝇的产卵地提供了两个选择，分别是食肉动物和食草动物的粪便，结果发现存在显著的差异。苍蝇对食草动物的粪便表现出喜欢或是无所谓的态度，但对食肉动物的粪便却极为厌恶。而且，当它们缺失了某种特定的嗅觉神经，再次进行试验时，这种厌恶感竟然会消失。因此，很明显，苍蝇对食物的喜好源于对气味的偏爱。

但是，为什么某种动物的粪便闻起来会比其它动物的要好呢？为了明确这一问题，研究小组获取了一些粪便样本，以进行详细的化学分析。当然，他们并不意外地发现，粪便含有复杂的微生物分解

产生的味道。但是，尽管粪便里有多种化学物质能将其与其它东西（譬如一瓶啤酒或一个成熟香蕉）大体区分开来，但其中只有极少的一部分能与苍蝇的饮食喜好直接联系起来。其中一种特别的物质就是苯酚：它在食肉动物的粪便中大量存在，但在食草动物粪便中却不见踪影。更重要的是，研究小组确证，单是这种化学物质就足以驱动苍蝇产生反应。当苯酚被加入到苍蝇通常可接受的长颈鹿粪便中时，它们就会嗤之以鼻，跑到别处去产卵。此时若是强迫苍蝇在加了苯酚的“食物”中产卵，那么产卵的数目大约只有正常的五分之一。

那么，为何苍蝇要避免苯酚呢？研究小组对食肉动物和食草动物肠内的细菌进行了分析。结果发现，两者最令人关注的差异在于，细菌对于苍蝇而言是否属于致病菌，而这类致病菌正好产苯酚（并非巧合）。当然咯，我们不能光相信苍蝇的判断。于是，研究小组又对屎壳郎（dung beetles）——真正的便便专家——进行了试验，以查看它们在食草动物和食肉动物的粪便之间选择哪一个。结果它们也选择了前者。因此，昆虫对苯酚的厌恶似乎具有普遍性。

在上述研究结果中，最赞的地方在于：虽然不过是一个看似简单的现象，却与化学生态学、神经生物学和动物行为学存在多种联系。而这些共同点凸显出模糊而散在的线索，可能为将来的研究提供某些很有前途的方向。其中有些问题包括：为什么食果实的果蝇会对粪便具有如此优秀的辨别力？苯酚对苍蝇具有致病性风险，这条线索的可靠性有多高？苯酚的浓度范围对苍蝇存在确切的风险吗？而苯酚的制造者真的具有致病性吗？希望在将来，研究者能够针对上述某些问题进行阐述，因为确实很有意思。

#### 原文检索：

Mansourian, S., Corcoran, J., Enjin, A., Lofstedt, C., Dacke, M. and Stensmyr, M. C. (2016). Fecal-derived phenol induces egg-laying aversion in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 26, 2762-2769.

文佳/编译

# 狼蛛三对“计步器”眼睛的作用



在地洞的顶部，有一个巧妙地用细枝、叶子和石头堆成的小塔，它很好地掩护了洞口。里面躲着一只饥饿的意大利狼蛛（wolf spiders, *Lycosa tarantula*）。它的八对眼睛圆睁，正在准备伏击下一只不幸路过此处的“口粮”。不过，当它们追捕并制服了倒霉的牺牲品之后，哪怕非常饥渴，也得先将猎物拖回家，再大开盛宴。对此，来自西班牙马德里自治大学（University Autónoma of Madrid）的Joaquín Ortega-Escobar解释说，狼蛛能记住外出捕猎时所行的方向和距离，以设法沿最短的路径返家，而不是简单的原路返回。这是怎么回事呢？原来，它们依靠与一对小前中眼（位于

头部前方）相关的偏振光罗盘来确定方向。同时，还有一个能够测量掠过其视网膜的图像运动的“计步器”，可用于测定它们走过的距离。不过，狡猾的狼蛛到底是用哪四对眼睛来记住自己行走的距离呢？此前人们尚不清楚。

于是，Ortega-Escobar开始训练狼蛛，使之沿着一条铺有条纹墙纸的通道行进30cm回家，然后再将狼蛛的后侧眼和后中眼覆上水溶性的遮物，再驱使狼蛛跑回家。结果令他们印象深刻：当狼蛛较大的后中眼被覆盖时，它们能够精确地测出返回的距离；但当其后侧眼被遮住时，它们在离家还有3cm的地方就停下了。而当人们用条纹绒毯取代条

纹墙纸时，狼蛛估计行走距离的能力最差。那么，若是用涂了黑色的东西遮住它们细小的前侧眼和后中眼呢？结果显示，若是遮住前侧眼，狼蛛就会在离家（全程30cm）还有7cm的地方停下；若是遮住较大的后中眼，那么它们只会在离家3cm的地方停下。

综上所述，位于狼蛛头部前方的两对最外侧的眼睛和后中眼是追踪其行进距离的关键所在。Ortega-Escobar表示，意大利狼蛛很可能通过前侧眼和后中眼将信息整合在一块儿，从而获得所观察到的脚下不断变化的图像，以在捕猎之后返回洞穴时辨别方向。

#### 原文检索：

Ortega-Escobar, J. and Ruiz, M. A. (2017). Role of the different eyes in the visual odometry in the wolf spider *Lycosa tarantula* (Araneae, Lycosidae). *J. Exp. Biol.* 220, 259-265.

文佳/编译

A group of people are standing on their shoulders to form a tall human pyramid. The pyramid consists of four layers: a base of several people, three people in the second layer, two in the third, and one person at the top. They are all wearing dark shirts and light-colored pants. The background is a bright, cloudy sky with a sun or moon visible in the upper left. 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



**[www.LifeOmics.com](http://www.LifeOmics.com)**  
**[WWW.LIFEOMICS.COM](http://WWW.LIFEOMICS.COM)**