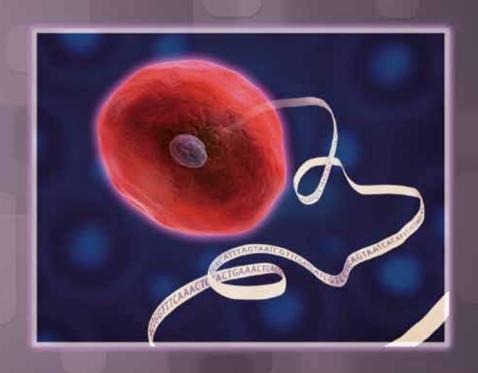


2014年 4月刊 总第64期



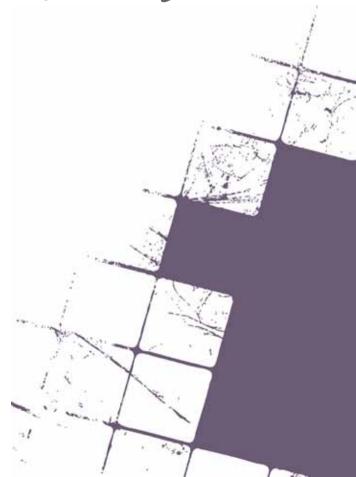
# 单细胞测序技术

"危险的"教授 聆听热闹的蝈蝈鸡尾酒会



这一个 经 生 全

左命世界



# 目录 CONTENTS

# 专题

### 单细胞测序技术

前言		01
—、	单细胞测序技术	02
	1. 单细胞测序技术简介	02
	2. 单细胞测序技术——科研界主流关注的焦点技术	04
	3. 单细胞分析技术——认识遗传多样性的利器	12
	4. 生物学及医学开始进入单细胞转录组学研究时代	17
	5. 单细胞测序技术的前景	23
_ `	值得关注的重要技术与方法学领域的发展	28
	1. CRISPR与表观基因组编辑(CRISPRs and epigenome editing)	28
	2. 促进神经学工具的发展(Bring on the neuro tools)	
	3. 原位测序(In situ sequencing)	
	4. 测量细胞力的微型工具(Tiny tools to measure force)	30
	5. 单颗粒低温电子显微技术(Single-particle electron cryomicroscopy)	31
	6. 胞内的迷你生物探针(Intracellular mini-binders)	32
	7. 群众的智慧(The power of a crowd)	
	8. 能够自我组织的干细胞(Self-organizing stem cells)	34

下一期(2014年05月刊)预告: 新一代位点特异性基因组工程学利器——TALEN、ZFN以及CRISPR/Cas

下一期《生命奥秘》将以TALEN、ZFN以及CRISPR/Cas三种技术为例,介绍并探讨新一代位点特异性基因组工程技术的生物学原理、未来发展趋势,及其在遗传学研究领域的作用和潜在的医学应用前景。

烈点

"	$\overline{\mathbf{u}}$	27
コロ バッ・ロソー・セン・ド		

# 百 态

聆听热闹的蝈蝈鸡尾酒会	 48
应激下的生存	50

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。



# 单细胞测序技术

# 前言

每年年底,《自然-方法》(*Nature Methods*)都会对过去一年中推动生物学发展的技术方法进行回顾与总结,由此评选出当年最受瞩目、影响力最大的技术。2013年,单细胞测序技术(single-cell sequencing)荣膺《自然-方法》年度生命科学技术。

单细胞测序技术有助于我们剖析细胞的异质性。它可以揭示肿瘤细胞基因组中发生的突变及结构性变异,而这些突变和变异往往有着极高的突变率。有了这些信息,我们就可以描述肿瘤细胞的克隆结构,并追踪疾病的进展及扩散范围。该期《自然-方法》使用较多篇幅向我们介绍了2013年单细胞测序技术在人类早期发育、癌症以及神经科学研究等几个重点领域的最新应用成果。

此外,该期《自然-方法》还向我们展示了一系列精心挑选的、在未来几年内值得关注的重要技术与方法及其发展,包括CRISPR与表观基因组编辑(CRISPRs and epigenome editing)、促进神经学工具的发展(Bring on the neuro tools)、原位测序(*In situ* sequencing)、胞内的迷你生物探针(Intracellular mini-binders)、群众的智慧(The power of a crowd)以及能够自我组织的干细胞(Self-organizing stem cells)等。

# 一、单细胞测序技术

# 1. 单细胞测序技术简介

### 下文将概述如何获得一个单细胞的基因组及转录组。

单细胞基因组及转录组测序所需要的测序 样本量要比单细胞中本身所含有的基因组及转 录组分子高出好多个数量级,所以这对核酸扩 增技术(amplification technology)也是一大 考验。面对如此微量的分子,任何降解、样品 损失、或者污染都会对测序质量带来非常严重 的影响。而且多重扩增又容易带来试验误差, 比如基因组或转录组覆盖不均一、背景噪声以 及定量不准确等问题。

最近所取得的技术进步有望部分解决上述问题,使单细胞测序技术能够走进更多的实验室,解决更多领域的科学问题。比较罕见的细胞、异质性的样本、与遗传嵌合或突变相关的表型、不能人工培养的微生物,这些都是单细胞测序技术能够一展所长的研究平台。使用单细胞测序技术能够发现克隆突变(clonal mutation)、隐藏的细胞类型,或者在大块组织样品研究工作中被"稀释"或平均掉的转录特征。

### 1.1 选择恰当的细胞

说到分离单细胞,显微操作

(micromanipulation) 无疑是一项非常精确的技术,而且利用毛细管(microcapillary)可以直接吸取细胞内容物,但是这项操作也需要耗费大量人力。很多组织解离之后都能够制成单细胞悬液,这种单细胞悬液很容易操作,而且可以用细胞分选器(cell sorter),根据细胞表面表达的特异性分子标志物对细胞进行分类富集操作。这种策略也被用来分离非常微量的循环肿瘤细胞。

### 1.2 单细胞转录组策略

现在有很多单细胞RNA测序操作流程可供选择,不过不管采用何种策略,首先都需要通过逆转录反应,利用RNA合成出cDNA。然后才会有所区别,比如有一些方法是对整个转录子进行测序,有一些方法只针对转录子的5'和3'端进行测序。

不论采用何种方法,目的都只有一个,那就是捕获原始的RNA分子,然后均一的、准确地对其进行扩增。核酸的捕获效率主要受到逆转录反应的影响,不过我们可以使用更小的反应体系,选择更好的逆转录酶来进行改善。另外,采用模板转换技术(template switching)也能够保证被捕获的绝大部分转录子都是全长片段。

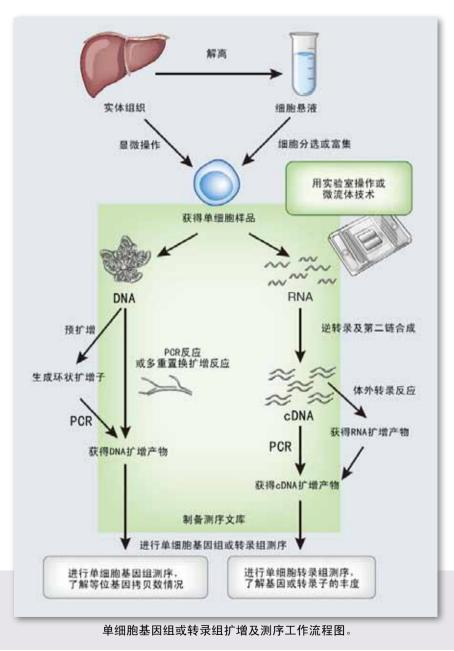
减少反应循环数也能够改善核酸扩增反应,还可以借助"抑制PCR(suppression PCR)"技术减少引物扩增,或者将取自不同样品的cDNA(这些cDNA都是分别做好标记的)混合到一起,提高起始反应模板浓度,用体外转录技术进行线性扩增(linear amplification)。另外,还可以利用特有的分子识别序列(molecular identifier sequences)对每一个RNA分子进行标记,这样即便在经历了非均一的扩增之后,我们还是能够对原始的RNA分子数量进行绝对定量。

### 1.3 单细胞基因组策略

全基因组扩增(whole-genome amplification)的起始反应产物更少,只有一

个DNA分子。这样在扩增反应时就难免出现不均一的问题,即可能在基因组中某些位点会扩增多次,而另外一些位点则无法扩增。解决这个问题最常用的办法就是多重置换扩增技术(multiple displacement amplification,MDA),即使用随机引物,让这些引物与基因组广泛结合,同时使用一种特定的聚合酶,这种聚合酶能够置换与它自身附着在同一模板上的DNA链片段,形成一种反复分支结构(iterative branching structure),扩增出大

段的DNA。早期循环对整个扩增反应的均一性起到了决定性作用。有一种扩增技术采用了一种独特的引物,这样能够生成闭合环状的扩增子(amplicon),而且这种扩增产物不会再进一步复制,等于是在进行PCR扩增反应之前先进行几轮线性扩增反应。将反应按比例扩大,同时对反应情况进行实时监控都有助于改善基因组扩增成功率低的问题,另外减少扩增次数,准备更少模板的测序文库也是一个比较值得发展的方向。



### 1.4 一个细胞解决所有问题

在单细胞研究工作中,扩大试验规模是确保采集足够多的生物多样性信息的关键。微流体设备(microfluidics)或微孔板技术(microwell technology)能够提供标准化、高通量的选择,而且由于这种设备的反应体积通常都比较小,所以反应效率也都比较高。不过微流体设备也有一定的限制,只能处理某些特定大小的细胞样品。当然,将待测分子用生

物条码(barcoding)标记之后混合起来进行 分析也是一条处理通量的途径。

单细胞核酸扩增及测序技术正在不断成熟、完善之中。我们相信,随着单细胞试验操作变得越来越容易,成本变得越来越低,会有更多的科研人员选择使用单细胞测序技术,这将会像PCR技术一样成为每个实验室里的常规试验操作,帮助我们以更高的分辨率去研究问题、解决问题。

# 2. 单细胞测序技术——科研界主流关注的焦点技术

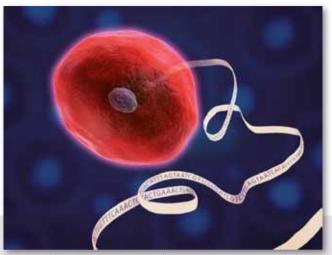
单细胞基因组测序技术及单细胞转录组测序技术又掀起了一波新的科研浪潮,让科研人 员们能够以新的视角看待发育、肿瘤及神经科学问题。

对于不孕不育症夫妇而言,孕育一个孩 子是非常困难的事情,而且这也会让他们的 情感饱受折磨。即便他们怀孕了, 也不是高 枕无忧的,因为这些家长需要担心另外一个 问题,如何生育一个健康的宝宝。对于那些 存在遗传风险,需要借助体外受精技术(in vitrofertilization, IVF) 辅助的父母而言, 胚胎 植入前遗传学诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 技术(即从早期胚胎中取出 一个细胞进行遗传学疾病筛查的技术) 是孕育 出健康下一代的保证,虽然目前PGD技术也 只能够对基因组中的一个、或少数几个位点进 行筛查和诊断。由于取自早期胚胎的细胞数量 都不会太多, 所以极其珍贵, 临床医生们必须 从这些宝贵的细胞中尽可能地获取有价值的信 息。

而单细胞全基因组测序技术(single-cell whole genome sequencing method)就有望解决早期胚胎发育及其他科研领域里存在的这些重要的问题。由于单细胞分离技术以及单细胞中痕量的DNA或RNA扩增及测序技术的进步,科研人员们得以对单细胞的整个基因组或

转录组(而不是少数几个位点)以前所未有的 高分辨率进行扫描和研究。

美国哈佛大学(Harvard University)的 Sunney Xie等人就是在IVF工作中进行单细胞 基因组测序研究的课题组之一,他们用第一 极体和第二极体(所谓极体指的是受精卵分裂 时"遗弃"的细胞成分,可以反映染色体的健 康状况)验证了他们新开发的全基因组扩增 技术。Xie等人最近发表的文章介绍了他们对 8位女性供体的研究成果,研究发现极体活检 (polar-body biopsy) 和单细胞测序都能够准 确地反映胚胎染色体非整倍体(aneuploidy) 的情况,其中就包括唐氏综合症(Down's syndrome)这种染色体数目过多的情况, 也包括染色体丢失,或者遗传自父母的单核 酸突变(single-nucleotide variation)等情 况(Cell, doi:10.1016/j.cell.2013.11.040 19 December 2013)。Xie发现染色体非整倍体 平均只需要在每一百个基因组位点中挑出一个 位点进行测序就足够了, 所以这要比传统的方 法成本更低,而且准确性也会更高。



2013年,单细胞测序技术开始成为科研界主流关注的焦点。

Xie与这篇论文的合作者——中国北京大学(Peking University)的Fuchou Tang和中国北京大学附属第三医院(Peking University Third Hospital)的Jie Qiao针对这些接受IVF帮助的女性开展了一项临床研究。他们对这些志愿者的胚胎极体进行了基因组扩增和全基因组测序研究,以此来判断胚胎是否健康,是否适于进行移植、受孕。据Xie介绍,如果将时间提前两年,在临床上开展这项研究工作几乎是不可能的,当时有大批没有遗传问题,可是不能受孕的夫妻给他发邮件寻求帮助。目前这次临床研究的第一位婴儿将在年内降生。Xie指出,他并没有想到他们的技术能够这么快地走向临床,给患者们提供切实的帮助。"



Sunney Xie很快就能够看到他们课题组开发的基因组扩增技术被应用到临床PGD实际工作当中的表现情况了。

### 2.1 2013年测序技术回顾

单细胞测序技术可谓是科技发展史上的一大创举。一个细胞里的DNA或RNA仅仅处在皮克(picograms)级的水平,这么少的量远远达不到现有测序仪的最低上样需求。因此科学家们必须先对单细胞内的微量核酸分子进行扩增,而且必须保证尽可能少地出现技术误差,以便开展后续的测序及其他研究。直到最近,也还是只有少数几位专家相信能够对单细胞进行可靠的研究。

虽然早在几年前就开始有研究团体在宣传、推广单细胞基因组及转录组测序技术,但是这些技术是最近这两年才开始被大范围接受,其中就包括从事神经科学研究、肿瘤及微生物生态学研究的科研人员。据美国Fluidigm公司的联合创始人,斯坦福大学(Stanford University)的Stephen Quake介绍,几乎从PCR技术诞生的第一天开始,就不断有人尝试用PCR技术进行单细胞基因表达研究及单细胞基因组研究。但是由于种种原因,单细胞测序技术直到现在才算是刚刚起步。

DNA和RNA扩增技术的不断改进,尤其是最近这两年新出现的进步给刚刚涉足这个领域的科研人员在开展试验时提供了非常丰富的选择。工业界也提供了无数种商业化的、而且价格低廉的单细胞核酸扩增试

剂盒及读取技术。Fluidigm公司就在2013 年推出了世界上第一款单细胞RNA测序自 动化准备系统(single-cell automated prep system for RNA-seq)。所有这些技术上的 进步极大地降低了科研人员们进入单细胞研 究这个领域的技术门槛。瑞典卡罗林斯卡研 究院(Karolinska Institutet in Sweden)的 Rickard Sandberg在谈到单细胞RNA测序时 说道: "大家等这一天已经等了好几十年了。 直到今天,由于技术的进步,这些试验才变得 足够简单,而且成本也能够让大家接受,所以 才能够走进千千万万个实验室。"

进行单细胞研究的核心问题其实是:为什么要进行单细胞研究?这主要是因为如果将成千上万个细胞混在一起进行研究,就会模糊我们对大脑、血液系统、免疫系统,及其组成这些系统的细胞之间异质性(heterogeneity)的认识。美国宾夕法尼亚大学(University of Pennsylvania)的James Eberwine就认为,当你的研究深入到单细胞层面时,你就会失去对整个系统的把控,但是如果你能够从整个系统中挑选多个不同的单细胞进行研究,则可以

重建出整个系统,而且这种重建过程能够提供 更多更有价值的信息。

有大量很难对大块组织进行研究的科研领域也都会从这些最新的单细胞研究技术中获益。这种单细胞测序技术不仅有助于我们认识细胞之间的差异,还可以为我们提供一个新的比较层面,这也是大家期盼已久的,能够重新定义细胞类型的层面。

可与大家这种极高热情相伴的却是各种各样的技术难题,包括单细胞分离、基因组或转录组扩增,以及数据解读等各个方面。试验成本也是需要考虑的一大因素。通常来说,对细胞进行分析时所需要的细胞数量要比对组织进行分析时所需要的组织数量多很多,所以在决定是否应该进行单细胞研究时一定要谨慎,要根据实际情况做出合适的判断。"我们真的需要进行单细胞研究吗?如果答案是否定的,那就不要进行单细胞研究。单细胞研究非常贵,而且你会碰到很多的变数。"美国博大研究院(Broad Institute),同时也在麻省理工学院任职的Paul Blainey这样说道。



对体外受精卵分裂产生的极体进行基因组测序能够为临床医生们进行胚胎植入前的遗传学诊断和筛查提供非常有价值的帮助。

### 2.2 从少数几个RNA分子开始

对细胞的转录组进行测序,关键在于能 否利用细胞内的RNA扩增出大量的cDNA。然 而,捕获少量的RNA分子制备cDNA,以及大量扩增这些cDNA分子的工作很难做到平等和高效。

1990年,Norman Iscove的课题组首次证实对单细胞进行转录组分析是可行的,他们用PCR技术实现了对cDNA分子的指数级扩增。在20世纪90年代初期,Eberwine等人发明了一种新技术,能够从单个的活神经元细胞中获得cDNA,并且再以这些cDNA为模板转录生成RNA,实现RNA的线性扩增。随着芯片时代的来临,科学家们用这些线性、和指数级扩增技术对单细胞之间的基因表达差异进行了大量的比较和研究。

2008年时出现了高通量RNA测序技术,不久之后,科研人员们就将这种技术与前面发展起来的核酸扩增技术结合起来,对单细胞转录组进行了更加精细的研究。2009年,当时在英国剑桥大学Gurdon研究所(Gurdon Institute at the University of Cambridge)M. Azim Surani实验室工作的Tang通过对单个小鼠卵裂细胞(blastomere)的研究发现,与芯片技术相比,利用单细胞转录组技术可以多发现数千个基因的表达情况(Nat. Methods 6, 377–382, 2009)。

就在同一年,美国冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory)也召开了第一次单细胞大会,参加大会的有科研人员、技术开发人员,以及涉足单细胞研究领域的先驱们,参会者一共还不到50人。据现在在美国弗吉尼亚大学(University of Virginia)工作的Mike McConnell回忆,每一个人都试过做RNA测序,也尝试过对测序结果进行分析,想从中找出有价值的、可重复的结论。

不过技术的发展经历了很长一段时间,现在终于有了一整套单细胞测序的操作流程和各种商业化的试剂盒产品。瑞典卡罗林斯卡研究院的Sten Linnarsson认为,纯粹技术上的发展到今年已经达到了顶点,现在是考虑如何将这些技术应用到实际工作当中。有很多课题组瞄准的可不是几百个细胞,他们想要研究上万个细胞。

比如Kun Zhang课题组承担的、由美国国立卫生研究院公共资金(US National

Institutes of Health Common Fund) 资助 的单细胞研究项目(Single Cell Analysis Program) 就打算对取自人类大脑皮质三个 不同区域里的10,000多个细胞进行全转录组 分析。Zhang等人计划根据转录子对细胞类型 进行分类(可能还会对细胞类型进行重新定 义),并且将这些转录子重新定位到不同的大 脑组织切片里。当然单细胞RNA测序这项技 术本身已经不再是障碍了。据Zhang介绍,如 果你有好的细胞,如果你想进行转录组研究, 那么你会有很多种选择,帮助你达成目标。不 过通常而言,如何在人死后提取神经元细胞, 并尽可能减少RNA的降解,保持大脑组织正 常的空间结构,这也都是需要解决的问题。 Zhang等人也在从事这方面的工作,正在对几 种不同的技术进行比较。

### 2.3 基因组扩增技术

开发一项新的单细胞全基因组扩增技术是需要一定的时间的,这是因为在一个细胞内,通常都只有一至两个DNA的拷贝,所以直到2005年才出现单细胞全基因组扩增技术,这要远远落后于单细胞RNA扩增技术。当时Roger Lasken的团队成为世界上第一个成功完成单细胞DNA扩增及测序的团队,他们当时使用的是自己开发的多重置换扩增技术(multiple displacement amplification,MDA)对大肠杆菌进行试验。这项工作给微生物学家带来了极大的激励,他们利用这项技术对各种不能人工培养的微生物进行了测序研究,获得了大量的参考基因组序列(reference genome)。

MDA作为最常用的技术和策略一直沿用至今,该技术用到了Phi29等聚合酶,能够使经退火、结合到基因组上的任意随机引物不断延伸。每一种聚合酶都能够置换临近的延伸链,形成大量的、覆盖多个小片段的、长达7至10kb的大片段产物,用来进行DNA测序。

到了2011年,科研人员们将单细胞基因组扩增技术与高通量测序技术结合起来开展

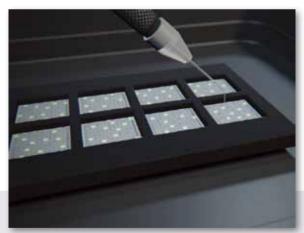
研究。Nicholas Navin当时就在美国冷泉港实验室的Michael Wigler课题组工作,他在取自两位乳腺癌患者的乳腺癌肿瘤细胞中发现了大段的基因组DNA缺失或重复突变,即拷贝数变异(copy-number variant, CNV),该研究的分辨率达到了50kb(*Nature* 472, 90–94, 2011)。

在单细胞基因组测序工作中最大的困难就是某些DNA片段的扩增效率要远远高过另外一些DNA片段。Xie等人在2012年又发明了一种新的多重退火环状扩增循环技术(multiple annealing and looping-based amplification cycles,MALBAC),该技术首先需要进行5轮MDA预扩增,然后就可以使新获得的扩增产物形成闭合的环状分子(Science 338,1622–1626,2012)。由于这些环状分子不能够被进一步扩增,所以整个扩增过程就变成了线性扩增。然后再进行常规的PCR扩增,由于此时采用的模板更加均一,所以在进行PCR扩增时就不易造成较大的差异。Xie等人用这种MALBAC技术获得的人类基因组扩增

产物能够达到93%的覆盖度,同时也在单个肿瘤细胞中检出了CNV突变。

很快,科学家们就能够对单细胞的基因组进行更加深入的研究了,他们将能够发现更小的缺失和重复突变,乃至单碱基突变。虽然基因组均一扩增还是一个问题,但是专家们相信,缩小反应体积应该可以带来一定的帮助。

比如美国加州大学圣地亚哥分校(University of California, San Diego)的Zhang等人最近就介绍了一种MIDAS技术,即微孔板置换扩增系统(micro-well displacement amplification system),使用这套系统可以用纳升级的反应体系同时进行数千个MDA反应(Nat. Biotechnol., 31, 1126-1132, 2013)。科研人员们可以手工、或者用机械手取出这些扩增产物,进行测序。借助这套MIDAS系统,Zhang等人课题组只进行了很少的测序工作就在人类神经元细胞中发现了单拷贝变异(single-copy-number change),分辨率达到了1至2MB。



这套MIDAS系统是一种高通量的单细胞分离、扩增及测序技术。

### 2.4 细胞表达差异

在美国博大研究院(Broad Institute), Aviv Regev与Joshua Levin等人在开始单细 胞RNA测序工作之前,先利用质量很差、降 解严重的组织样本对多种RNA测序技术进行 了比较,最后她们决定采用Smart-Seq技术对骨髓来源的树突状细胞(dendritic cell)进行研究。这些树突状细胞是一种有丝分裂后的免疫细胞,能够对抗原产生非常强烈的转录反应。

Regev等人一共选择了18个细胞,耗时 一周分批进行了试验。她们之前尝试了各种方 法,最终都失败了。可是这一次却一次就成功 了。研究发现,每一个细胞都会统一表达所谓 的持家基因('housekeeping'genes), 但是每一个细胞也都有各自独特的表达谱, 与免疫调控功能相关的基因在有些细胞里的 表达水平非常高,可是在有些细胞里却压根 不表达。之前还从来没有在树突状细胞中发 现这种两极分化的现象, 因为一直以来都是 对一堆细胞进行研究,细胞之间的差异全部 被平均掉了。该研究成果于去年6月得以发 表,该文章首次报道了一种"隐藏的"细胞 类型,即非常罕见的"第一应答者细胞(first responder) " (*Nature* 498, 236-240, 2013)。从更广义的角度来说,这一发现有 助于我们重新认识这些树突状细胞,以及它们 的信号通路和功能。



单细胞RNA测序技术第一次尝试就取得了成功。 ——美国博大研究所Aviv Regev

单细胞转录组测序也能够帮助科研人员研究发育早期的基因表达与调控情况,而且借助这项技术还能够以前所未有的精细程度对罕见的样品开展科学研究。比如美国加州大学洛杉矶分校(University of California, Los Angeles)的Guoping Fan与他在中国的合作者们在去年8月发表的一篇文章就对33个单细胞进行了转录组测序研究。这33个细胞全都取自处于发育不同阶段的胚胎,他们根据测序结果确定了发育初期基因的表达顺序,还发现

了人类与小鼠胚胎发育过程中基因表达时限上的差异(*Nature* 500, 593–597, 2013)。



单细胞测序技术是一项非常强大的技术,可以帮助我们发现肿瘤细胞里的基因组变异。——美国德克萨斯大学MD Anderson癌症中心Nicholas Navin

与此同时,Tang的课题组也在从好几个人类早期胚胎中仔细地分离细胞标本,并且对这些细胞挨个进行单细胞转录组测序。据Tang介绍,他们非常紧张,因为这些标本全都来之不易,非常珍贵。不过他们的工作也获得了回报,他们发现了2700多个新的长非编码RNA(long noncoding RNA)分子,这些分子可能都与早期基因调控作用有关(Nat. Struct. Mol. Biol. 20, 1131–1139, 2013)。据Tang介绍,在此之前,所有的单细胞RNA测序工作还都只是针对已知基因进行分析,充其量也仅仅增加了已知基因的可变剪接亚型(alternative splicing isoforms)而已。

### 2.5 混合的肿瘤细胞

从疾病预后判断到病情监测,肿瘤研究人员都能够从单细胞测序技术那里获得巨大的帮助。我们都知道,肿瘤细胞的突变速率非常快,而且肿瘤组织是一种高度异质性的组织。确定肿瘤组织中存在哪些细胞亚群(或者叫克隆)具备转移能力,哪些克隆对化疗药物是敏感的,这些信息对于临床工作都非常有帮助。尤其针对隐藏在人体循环系统里的循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)进行全基因组或者转录组测序最有帮助,因为这些CTC

细胞就是导致肿瘤转移的元凶,有关它们的信息对于疾病的诊断、监测和治疗都至关重要。

比如Navin于2011年在《自然》(Nature)杂志就发表过一篇文章,介绍了他们的单细胞基因组研究成果。他们发现CNV突变与肿瘤的进化模式有关,肿瘤在稳定增长之后会突然发生基因组失稳。据现在在美国得克萨斯大学MD Anderson癌症中心工作的Navin介绍,这一发现让他们非常吃惊,因为他们一直认为肿瘤细胞一直在缓慢地积累突变。这次研究工作也证实,单细胞技术非常强大,至少能够帮助他们发现人体单个肿瘤细胞里的基因拷贝数变异。Navin与他的合作者们还在继续对三阴型乳腺癌患者进行研究,主要想了解CNV方面的情况,同时也希望能够更好地了解肿瘤转移的问题。

除了Navin等人之外,还有其他几个课题 组也都在利用单细胞测序技术开展与肿瘤相关 的研究工作。比如前面介绍过的Xie就与中国 北京大学的Fan Bai,以及美国哈佛大学的Jie Wang一起,在一种肺癌亚型(不包括其它亚 型)的CTC细胞中发现了一种特定的CNV突 变(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, doi:10.1073/ pnas.1320659110, 9 December 2013)。 Xie认为,这些最新的进展都有助于我们开发 早期诊断产品和技术。



Mike McConnell在单个人脑神经元细胞中发现了大段的DNA缺失或重复突变。

转录组上的差异也有助于我们认识肿瘤 的进展情况。比如Sandberg的团队就使用他 们自己开发的Smart-Seq技术对单个CTC细胞进行了RNA测序研究,并对他们的这套方法进行了验证。使用最新版的Smart-Seq2技术,他们能够以比以前更低的成本观察更多的细胞。由于观测的细胞数更多,所以让从事CTC研究的科研工作者们头痛不已的试验误差问题也能够得到更好的控制。据Sandberg介绍,他们真的希望拿出一套更加系统的解决方案,帮助大家更好地认识CTC细胞的异质性问题,帮助大家更好地认识CTC细胞进入血液循环系统时的基因表达情况。



Wolf Reik希望表观遗传学技术也能够早日达到单细胞检测水平。

比基因组和转录组研究更困难的就是以化学标志物形式附着在基因组上,并对基因的表达实施调控的表观基因组(epigenome)研究了。虽然目前的表观遗传学技术还达不到单细胞研究水平(因为传统的表观遗传学研究技术都会使DNA降解),但是科研人员们还是迫切希望看到单个肿瘤细胞的表观基因组情况。

Tang的科研团队开发了一种可以对单细胞全基因组内的DNA甲基化修饰情况进行研究的新技术(Genome Res. 23, 2126-2135, 2013)。Tang认为,表观基因组研究真的也需要单细胞技术,只有这样,科研人员们才能够了解这个肿瘤细胞与它周围的肿瘤细胞有什么差别,而且这种差别是因为甲基化修饰引起的,还是因为其它机制引起的。英国Wellcome基金会Sanger研究所(Wellcome

Trust Sanger Institute)的Wolf Reik团队对50至100个细胞的甲基化组(methylome)情况进行了分析,他表示他真的很想再往前走一步。

### 2.6 大脑中的"禁区"

神经元细胞是最新一个被用来进行单细胞 研究的对象,科学家们其实也不太清楚能够 通过这些研究获得怎样的信息和结论。也是 直到最近才开始有试验证据表明, 神经元细 胞之间也具有不同的基因组。虽然有这些研 究成果, 但是科学家们对神经元细胞的这种 多样性也还是一头雾水。早在2001年,当时 还在美国加州大学圣地亚哥分校(University of California, San Diego) 工作的Jerold Chun就在小鼠的大脑中发现了染色体非整倍 体现象,随后又于2005年在人类大脑细胞当 中发现了同样的现象。据当时在Chun实验室 读研究生的McConnell介绍,拿到这些结果之 后,他们也没人知道下一步该怎么办。他们 等于是发现了冰山的一角,如果细胞里存在 非整倍体现象,那么一定会有很多的基因突 变,或者基因组突变。

几乎就在同一时间,另外一帮科研人员 发现,在人类基因组当中,平均每一个基因 组里都含有80~100个具有潜在活力的L1元 件(这是一种可以在整个基因组当中自我复 制、自我粘贴的DNA元件),而且在大脑神 经元细胞当中,这些L1元件都是有活性的。 该研究,以及其它一些研究成果都证明,基 因组至少是具备多样性可能的,但是这种变 异的程度究竟有多大,没人说得清楚。

据美国国立精神卫生研究院(US National Institute of Mental Health)的 Thomas Insel介绍,他们还只是刚刚开始尝试去了解大脑细胞的分子多样性问题。在这个领域单细胞研究技术起到了关键性的作用,不仅仅是在确定神经元细胞和神经胶质细胞的(分类)类型方面,同时也有利于我

们了解体验和发育对大脑某个区域里的基因 表达有何作用。

科学家们可以用好几种方法发现单细胞基因组变异情况。美国哈佛大学医学院(Harvard Medical School)的Christopher Walsh团队就对300个取自死者大脑的神经元细胞进行了单细胞L1元件插入研究(Cell 151, 483-496, 2012)。他们只发现了几个L1插入元件,这说明L1元件应该不是导致基因组多样性的主要原因,但至少在大脑皮质细胞和尾状核(caudate nucleus)细胞里是这样。

2013年,另外几个课题组也对单个人类神经元细胞进行了全基因组扫描研究。比如在2013年11月发表的文章就对3名健康人大脑的110个额皮质(frontal cortex)神经元细胞进行了全基因组测序研究,结果相当令人吃惊,他们发现在神经元细胞里有大量的大段CNV突变(Science 342, 632–637, 2013)。对源自健康人皮肤细胞的神经元细胞进行的研究也发现了同样的情况,而且这些神经元细胞里的CNV要比其来源的皮肤细胞更多,这说明这种源自iPS细胞的神经元细胞是一种非常好的研究材料,适合用于开展细胞多样性方面的研究工作。

实际上,虽然有了这些发现,但是神经科学家们还是很头疼,因为他们不知道这些体细胞突变意味着什么。美国弗吉尼亚大学(University of Virginia)的遗传学家Ira Hall也是去年这篇发表于《科学》上的文章的合作者之一,他认为这些研究意味着大脑对影响和干扰的抵抗力很弱,另外,遗传嵌合现象(genomic mosaicism)也能够影响人们罹患肿瘤和其它疾病的风险。为了明确大脑中哪些部位与其它部位相比更容易受到干扰,以及大脑不同区域间的差异有多大,科研人员们还得研究更多的细胞才能够找到答案。现在就在从事这方面研究的McConnell认为现在还是一无所知。

### 2.7 概念验证之后的工作

虽然单细胞技术已经有可能解决很多生命科学领域的重大问题,但是技术上的进步还远远没有结束。比如科研人员就必须研究如何将真正的生物学差异与试验技术本身的背景噪音区分开。瑞典KTH皇家理工学院(KTH Royal Institute of Technology in Sweden)的Joakim Lundeberg(他们实验室就曾经开发过组织RNA测序技术)就认为,单细胞RNA和DNA测序技术还远远算不上足够强大,他表示,他们还需要在一次试验中对更多的单细胞进行分析,以便解决背景噪声问题,这至少也能够加深他们对同一个组织里不同细胞之间差异的了解。

由于存在方方面面的问题,比如细胞分 离、数据运算、以及用于不同领域时出现的特 异性问题等等,所以Blainey希望在未来的几 年里单细胞研究技术还能够有更大的进步。

对于新进入这个领域的人而言,光是选择哪一种转录组测序技术可能就够他们头疼半天的了。关于这个问题,应该视研究目的而定,比如是想对多个细胞进行分析,找出同型的转录子,还是想发现低丰度的RNA。"不过有多种方法可供选择总归是件好事。" Quake 这样说道。在去年10月,Quake的课题组发现,如果将预处理时的反应体积控制在纳升级(他们使用的是Fluidigm公司提供的C1系统),那么单细胞qPCR技术和单细胞RNA测

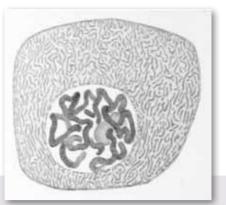
序技术的检测效果是差不多的(*Nat. Methods* 11, 41-46, 2014)。"这对于我们整个试验操作的可信度而言是一个重大的好消息。" Quake补充道。

随着商业化产品的推出,以及各个实验室 经过多年实践总结出了自己的"独门秘笈", 基因组扩增技术的选择也在同步改善。不过由 于每一个人使用的进行基因组扩增的技术都不 一样,所以很难对不同的研究成果进行直接的 比较。比如Xie就认为,他们感觉MALBAC技术要比MDA技术更好,但是这也要取决于你 是如何进行MDA试验的。不过随着技术的不 断进步,这两种技术都将会过时被淘汰,但我 们也会继续改进这些技术,MALBAC一定会 赢得最终的胜利,我们会让这项技术变得更 好。

与此同时,从事肿瘤研究、脑神经科学研究、微生物研究、以及从事药物开发和其他领域研究的科研人员也都会从这些技术进步当中受益。而且这些技术进步也会吸引众多优秀的人才加入单细胞研究领域,比如已经在表观遗传学研究领域颇有建树的Reik等。Reik在去年才第一次参加单细胞学术会议,而在此之前还从来没有接触过单细胞研究,看到这么多新技术,Reik感到非常激动。他指出,最开始人们会因技术本身而激动,过不了多久,人们就会利用这些新技术去解决重要的生命科学问题,那将是更加令人激动的事情。

# 3. 单细胞分析技术——认识遗传多样性的利器

技术上的新进展已经让单细胞基因组测序技术(single-cell genome sequencing)逐渐成为了一项主流的检测手段,该领域的研究工作已经初步揭示出细胞之间在基因组结构(genetic architecture)与遗传变异性(genetic variability)方面的差异,这也反映出基因组并非一成不变的天然本质。



Flemming在1882年时发表的文章中绘制的单细胞基因组染色体模式图。

其实单细胞基因组分析这个项目很早就 出现了,早在1882年就有人报告了昆虫唾 液腺的单细胞图像, 该图展示了多线染色体 (polytene chromosomes) 的带状结构。到 了1935年,Calvin Bridges又发表了一幅类似 的果蝇(Drosophila)细胞基因组图片,从这 幅图中可以看出个体之间、品系之间, 以及种 系之间都存在大范围的基因组重排(genomic rearrangements) 现象。最近研究人员也开 展了大量的单细胞研究工作,使用的主要技术 手段包括PCR和其它生化扩增技术。其中比 较知名的工作包括在20年前开展的对单个精 子细胞(single sperm cell)进行的重组热点 (recombination hot-spot) 研究,以及现在 在人工辅助生殖工作中常规开展的胚胎植入前 的胚胎单细胞遗传诊断工作(preimplantation genetic diagnoses)。既然单细胞检测技术 已经发展了一个多世纪了, 为什么现在才突然 火起来呢?

我们认为这应该与最近取得突破的单细胞基因组测序工作有关。这主要包括以下三个方面:技术进步使全基因组及转录组扩增的效率大幅度提高;DNA测序技术的跨越式发展使得测序的通量更高,测序的成本更低;微流体技术(microfluidics)和荧光活化细胞分选技术(fluorescence-activated cell sorting)等不断涌现的新型单细胞试验技术。最近这5年,全世界各个实验室里出现了一大批单细胞

研究论文,包括单细胞基因表达研究、单细胞基因组分析研究,以及商业化的服务等,这些工作对新技术的推广起到了非常重要的作用。单细胞基因组分析现在就是一个非常有影响力的技术,而且涉及了很多的方面,比如微生物生态学(microbial ecology)、肿瘤、产前诊断以及人类基因组结构及变异等。接下来我们将重点介绍这几个方面的最新进展,以及未来可能的发展方向。

### 3.1 单细胞生物的单细胞测序

微生物生态学是最适合进行单细胞基因 组测序的研究项目, 因为据估计, 绝大多 数(99%的物种)微生物都是无法进行人 工培养的。这些不能培养的微生物被科学 家们形象地称作生物界的"暗物质(dark matter)",因为我们只能根据对标志基 因 (marker-gene) 序列的检测来间接地 "观察"这些暗物质。虽然元基因组技术 (metagenomic approaches) 有助于我们了 解这种复杂环境里的基因组成情况, 但是物种 与基因之间的关系还是不得而知, 因此只有借 助单细胞基因组技术才能够了解单细胞生物 (unicellular organism) 与自身基因组功能之 间的关系。这也说明我们现有的基因组数据库 还相当欠缺,有大量的遗传与进化多样性信息 都没有被收入在内。

科学家们开展的第一个不能人工培养的单细胞生物基因组测序工作就是针对人类牙菌斑(human tooth plaque)上的细菌开展的。最近几年已经发表了十几篇有关不能人工培养的单细胞生物基因组方面的论文,随着单细胞研究技术与测序技术的进一步发展,我们相信这方面的工作会以指数扩增形式迅速发展起来。随着这些数据的不断积累,我们也会陆续发现更多新的、以前未知的微生物功能和微生物代谢产物(metabolites),发现更多与人类身体健康相关的新物种,甚至有可能彻底改变生命之树的结构,颠覆真核生物、细菌和古细菌之间传统的进化学关系。

微生物在形态学(morphology)、生理 学(physiology)和基因型(genotype)方面 的多样性也给单细胞分析技术带来了不小的 挑战。在我们选择单细胞分析技术、试验反应 和化学试剂时,需要考虑每一种样品的特殊 性。比如,微生物试验经常需要非常严格的 裂解条件,而且不同的微生物往往需要不同 的试验条件,这就会增加试验操作的复杂程 度。由于在核酸扩增之前并不一定需要进行 DNA纯化操作, 所以扩增试剂就需要能够与 细胞裂解试剂兼容。复杂的裂解及扩增操作 流程比较适合微孔板试验和需要用到整合技 术的微流体设备的试验操作, 因为这些操作 都可以实现自动化。有意思的是, 当反应体 系缩小到纳升 (nanoliters) 时, 生化扩增仪 的表现反而会更好。相对简便的操作规程比 较适合反相乳液液滴系统(reverse emulsion liquid-droplet systems) 试验,使用这种系 统可以快速地进行数万个独立的微反应。到 目前为止,几乎所有的单细胞微生物测序结 果全都使用了同一个全基因组扩增反应,即 多重置换扩增技术(multiple displacement amplification, MDA)。该技术是一种等温的 扩增技术(isothermal amplification),使用 随机引物,主要依赖的是<sub>●</sub>29 DNA聚合酶的链 置换功能。

# 3.2 人类单体型(human haplotypes)研究

人类基因组分析工作已经从确定所有人的"平均"参考序列(reference sequence)快速进入个体基因组测序时代,看起来单细胞技术似乎也帮不上太多的忙。但是我们人类基因组中有一些部分使用传统技术进行分析还是有比较大的难度的。比如人体内的每一个细胞里都含有两套基因组,其中一套来自父亲,另外一套来自母亲,这就叫做单体型现象,而每一个单倍体基因组(haploid genome)中的变异都会对基因的表达、蛋白质的功能,以及疾病造成非常大的影响。

人自细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA) 编码基因变异就是非常典型 的例子, HLA基因单体型信息是骨髓移植 工作中非常重要的一项信息, 不过这只适 用于非常复杂的杂合突变(heterozygous mutation) ——在一个基因位点上发生了两 个突变。如果这两个突变都位于同一个单体 (一条染色体),那么可能是无害的,但是 如果分别位于两个不同的单体, 那么就极有 可能是有害的。现有的技术还无法在基因 组的层面上进行这种单体区分(haplotype determination)。传统的、进行单体区 分最精确的方法需要对一个家系(family pedigree) 进行测序,主要是对父母进行测 序。很明显,在临床上大规模开展这种工作是 不现实的。

不过单细胞染色体分离技术(Single-cell chromosome isolation)帮了我们的大忙,这 是第一种全基因组单体型测量技术 (genomewide haplotype measurement),能够对完 整的染色体进行单体鉴定。该技术出现之后很 快就与其它技术搭配起来, 比如只需要用到少 量细胞(不过对于男性精子细胞来说可能需 要的细胞数量会多一些)的单细胞测序技术 (single-cell sequencing approach) 等。我 们希望这些技术, 以及确定基因组片段单体 型的长读长测序技术(long-read sequencing technologies) 能够得到更进一步的应用,以 促进我们对人类基因组的认识和了解。HLA编 码区是我们人类基因组中多态性最明显的一个 区域, 该区域与人类免疫系统关系密切, 也与 多种人类疾病有非常直接的联系, 所以一直都 是研究的热点。不过由于HLA的单体型太过复 杂,所以迄今为止也只对少数几个人的HLA区 域进行过单体型测序。

单细胞基因组研究工作涉及的另外一个领域就是对各种人的重组方式(recombination pattern)的研究。所谓重组指的是精子细胞和卵子细胞内分别遗传自父系和母系的两条染色体大片段各自断裂,然后相互再连接,形成

一个全新的基因组的过程,这也是造成人类遗 传多样性的最主要原因。我们知道,整个基因 组内的重组几率并不是完全一样的,即存在所 谓的"重组热点",这些位置发生重组的几率 要比基因组内其它区域更高。单细胞基因组分 析工作的最早成果之一就是发现在不同的个体 之间,这些重组热点也会有所差异,这些热点 对于某些人而言的确是热点, 但是对于另外一 部分人来说其实也不是那么热。最近,单细胞 研究技术已经被用于分析全基因组重组模式 (genome-wide recombination pattern), 以及单个精子细胞的突变率等,世界上也有了 第一个针对不同个体的全基因组热点行为研究 (genome-wide hot-spot behavior)。我们 希望未来的单个精子细胞基因组研究也能够 涉及重组突变(recombination mutant),比 如对携带罕见PRDM9等位基因的个体开展研 究; 以及针对与不孕不育疾病 (sterility and infertility) 相关的、可用于临床诊断的减数分 裂功能紊乱(meiotic dysfunction)的研究。

### 3.3 体细胞突变研究

越来越的人开始慢慢认识到个体基因组测 序的意义和价值,不过目前的个体基因组序 列指的还是人体内所有细胞基因组的"平均" 序列。科学家们在几十年之前就已经发现,人 体某些(种)细胞之间是存在基因组差异的, 比如属于我们人体免疫系统的B淋巴细胞就是 一个很好的例子。每一种B细胞都会严格表达 一种特定的抗体,这些B细胞基因组里的基因 是绝对不会被重编程(reprogram)的。正如 前面已经介绍过的,生殖细胞在减数分裂和遗 传重组的过程中也会出现分化和差异。在细胞 不断的分裂过程中, 以及在可移动的遗传元件 (mobile genetic elements) 的转移过程中也 会慢慢积累各种突变,这些突变都具有非常重 要的意义,不过我们目前对此了解得还不是特 别清楚。

这些不断积累的突变与衰老,尤其是与肿瘤有非常密切的关系,所以衰老和肿瘤这两

个研究领域一定会是单细胞基因组分析技术大显身手的舞台。到目前为止,已经有科研人员利用单细胞研究技术对人体精子细胞和永生化细胞系细胞进行过研究,他们直接检测了这些细胞的自发突变速率(de novo mutation rate)。还有人用这些技术对造血干细胞进行检测,以确定这些造血干细胞的突变程度,判断正常的造血干细胞转化成急性髓性白血病(acute myelogenous leukemia)肿瘤细胞之后的突变程度是不是有了一个大幅度的提升,并借此了解这些白血病肿瘤细胞的演变规律,判断乳腺癌细胞的克隆结构(clonal structure)等。

在成体神经组织里也存在嵌合型突变 (Mosaic variation),这些突变与阿尔茨海 默病(Alzheimer's disease)等神经退行性病 变有关。最近,有科研人员利用单细胞MDA 等基因组分析技术在诱导性多潜能干细胞 (induced pluripotent stem cell) 分化的神经 细胞和尸检获得的脑细胞 (postmortem brain cell) 中发现了大段的(达到MB级别的) 基因拷贝变异(copy number variation)。 也有人利用单细胞MDA技术和以PCR为基 础的全基因组扩增技术发现了L1逆转座子 (retrotransposition) 是促使大脑细胞内出 现体细胞嵌合突变的潜在因素, 而且还用这 种方法发现在不到1/3的脑细胞里存在的突变 也同样能够诱发严重的疾病, 比如半侧巨脑 症(hemimegalencephaly)等。荧光原位杂 交技术(fluorescence in situ hybridization) 也被用来研究小鼠大脑中部分非整倍体 (aneuploid) 的神经元细胞与小鼠衰老之间 的关系。这是一个让人着迷的研究领域,有各 种证据表明嵌合型体细胞突变与机体发育相 关,也具有一定的功能,在正常的成熟神经组 织里一样能够发现这些突变。这可能就是"正 常的"神经表型之间的差异能够导致神经疾病 的原因,这些差异也可能与心理疾病相关,而 且突变会随着年龄增长越来越多。

### 3.4 何时需要单细胞测序

什么时候进入单细胞基因组测序项目才合算呢?肿瘤基因组是一种高度异质性的核酸,而且突变的速度非常快,所以对肿瘤组织进行单细胞基因组测序是最合适的。虽然大批量的肿瘤组织测序并没有让科研人员们清楚地认清肿瘤组织的亚克隆组成情况,可是如果再使用单细胞基因组测序技术,我们就可以获得更详细的信息,明确基因组中核酸序列存在高度异质性情况的基因组位点。这种分阶段的技术极大地降低了测序成本,因而增加了对某个肿瘤组织进行测序时可以进行单细胞测序的细胞数目和测序次数。

虽然目前我们还不能确定,对某个肿瘤组织进行多次、大量的单细胞全基因组测序在经济上是否划算,但是对基因组中的重要部分进行分析,或者用测序深度较浅的方法(shallow sequencing)进行低分辨率测序,了解细胞里的基因拷贝数变异情况,也能够得到同样的结果。其实Bridges在80年前开展果蝇基因组研究时就是这么干的。还有一种办法可以代替这种分阶段策略,而且只需一步,那就是对多个单细胞进行全外显子组测序,这样一方面能够了解到肿瘤组织的"总体"外显子组情况,另外也可以发现肿瘤组织内部的亚克隆组成情况,而且成本要比全肿瘤测序(whole-tumor sequencing)经济得多。

### 3.5 植入前测序

单细胞测序有时是我们发现罕见、或独特细胞的唯一手段。胚胎植入前遗传诊断(Preimplantation genetic diagnosis, PGD)是接受体外受精(in vitro fertilization)等人工辅助生殖技术帮助的夫妻常用的一项技术,在胚胎被植入母体之前,医生们会从体外培养的胚胎中提取一个细胞,对其进行基因组分析。不过对之前开展的临床试验进行荟萃分析(meta analyses)发现,PGD并不是筛查遗传疾病的有效手段,因为在随机对照实验中发现,许多更先进的技术成功率更高,而且生出

孩子的几率几乎会高出一倍。应用微阵列比较基因组杂交(array comparative genomic hybridization)等全基因组分析方法可以在胚胎植入前以更高的分辨率对胚胎的基因组进行检测。我们希望这些更高分辨率的基因组分析技术能够尽快应用到PGD临床实践工作当中,能够对胚胎进行结构异常、甚至是点突变的检测。所得的这些数据就可以帮助临床医生们进行更加精细的判断,以了解哪一些胚胎更加健康,可以生下一个健康可爱的宝宝。

### 3.6 单细胞技术的未来

测序的成本肯定还会不断地降下去。近十年来也诞生了很多生化DNA扩增技术,而且现在又出现了多种单细胞试验手段。然而,目前还没有哪一种核酸扩增技术是绝对的赢家,如果真的出现这样一种技术,那对所有人都会是个意外的大惊喜。但是很难说哪一种核酸扩增技术是最好的技术,因为有很多参数需要考虑。尤其是以下这几点,比如样本类型、反应方式、方便程度(恒温反应还是变温反应,一步法还是多步法)、成本(商品化的还是自制的)、可靠程度(脱靶情况、污染品扩增、扩增时的均一性和误差、扩增技术的覆盖度、错误率,以及嵌合等人工误差)以及最终的得率等。

另外,在比较这些不同的扩增技术时,一定要使用在统计学上相关样品的单细胞样品进行评价,而且一定要避免反应体积、反应方式、裂解条件、污染、样品特异性的差异和细胞间的随机差异所带来的影响。因此,只有针对这些因素做好对照才能找出最好的扩增技术。

另外,还需要开发出自动化的单细胞分离和基因组扩增技术。现有的技术能够处理数百个数量级为单位的细胞,我们可以使用商业化的细胞分选仪完成细胞分选工作,也可以用机械手完成细胞裂解和核酸扩增反应,还可以用微流体设备自动完成上面这一整套操作。自动化和小型化是未来单细胞测序仪的发展方

向,这是因为只有分析足够多的样本才能够充分认识样品里的遗传多样性。我们希望芯片技术、微流体技术,以及微型零件加工制造技术(microfabricated approach)都能够有创新性的发展。这样将会极大地提高处理的通量,同时也能够大幅度降低测试成本(降低几个数量级),还可以简化反应步骤,如此便可以在一次实验中对数万个细胞进行单细胞分析。我们相信这只是个时间问题。

单细胞基因组分析技术实际上是多项技术 共同发展的结果,而且涉及了生命科学领域里 多个基础领域,这将有助于我们解决生命科学 领域里的多个重大问题。我们希望随着核酸扩 增技术和反应类型的不断发展和多样化,单细 胞测序技术的影响力能够进一步扩大,应用到 更多的领域,以帮助我们更好地认识和了解整 个生命系统。

# 4. 生物学及医学开始进入单细胞转录组学研究时代

最近的技术进步使得单细胞RNA测序成为了可能。探索性研究已经让我们见识了分化的 动态变化过程,细胞对各种刺激做出的反应,以及转录的随机本质。我们正在步入一个 单细胞转录组学时代,该研究方向会对生物学和医学产生深刻的影响。

我们现在提到的转录组学

(transcriptome)主要源于近二十年来在生物学研究工作中成为主流的群体观测工作(population-level observation)。我们一直习惯于这样一种研究思路,即对整体组织或某个条件下的基因表达倍增情况(明显的或细微的)进行比较,但是细胞之间的实际差异可能会更明显。某些细胞可能会产生非常明显的改变,可是另外一些细胞却"无动于衷",如此一来,即便那部分发生改变的细胞的变动幅度再大,也会被"沉默的大多数"细胞给掩盖掉和稀释掉。实际上,早在60年前就已经发现,刺激单细胞会得到"全"或"无"这两种截然不同的结果,可如果对一大群细胞进行研究就会得到一个渐进的、可定量式的反应结果。

很明显,对单细胞的基因表达情况进行检测和分析非常有助于我们了解细胞的行为,以及明确都有哪些细胞参与了组织发育、成熟和病变的过程。为了达到这个目的,就需要对单个细胞进行长期的转录组学研究。但是实验技

术直到最近才发展到能够对单细胞进行RNA测序的水平,科学家们才能够借助这项技术了解单细胞在基因表达方面有意义的差异。现在也出现了非常详细的实验指南,帮助科研人员构建测序文库,而且Fluidigm C1等商业化的单细胞全自动制备系统也极大地降低了广大科研人员涉足这个领域的门槛。单细胞实验操作技术的广泛应用将对我们产生深远的影响,也将帮助我们加深对细胞状态、转录本质以及基因表达调控,乃至对疾病病理进程的认识。

### 4.1 信噪比问题

单细胞转录组研究工作主要依赖逆转录反应(reverse transcription)。首先,将待研究的RNA逆转录成cDNA,然后再通过PCR反应或体外转录反应(*in vitro* transcription)进行扩增,最后对扩增产物进行深度测序。不过其中扩增反应非常容易出错,也容易丢失信息。这是由于单个细胞里含有的RNA非常少,所以需要对这些微量的核酸进行大量扩增,以致这个扩增反应产生了大量的偏差。虽

然技术噪声会干扰科研人员对低丰度的RNA 分子进行高分辨率的测序, 但是当前经过改进 的实验操作流程已经可以让我们获得足够多的 单细胞转录组信息。比如,在单细胞转录组学 研究工作中有一个屡次被提及的问题,那就是 在未对细胞进行分类的情况下, 如何根据细胞 的类别或状态对细胞进行准确的、可重复的分 类。与细胞类别,或者发育阶段相关的基因表 达模式是一个比较可靠的判断依据, 远比与细 胞周期等动态进程相关的生理变量或者技术噪 声值得信赖。另外,有人已经对不同细胞里成 百上千个基因的表达差异进行过研究,证实这 种单细胞研究技术的确能够发现有意义的信 息。最近开展的更深入的研究工作将进一步提 高单细胞测序研究的信噪比, 因为我们将进一 步提高逆转录和PCR反应的效率,也可以采 用分子标签 (molecular barcoding) 策略来 控制核酸扩增反应中出现的偏差。

# **4.2** 单细胞转录组学研究工作中存在的挑战

科研人员们基于几种不同的目的开发出了现有的单细胞RNA测序技术。比如可以对转录子全长序列进行测序,这样就能够了解整个基因和各种转录子亚型(transcript isoform)的序列信息,也有利于我们发现并监测单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphisms)和其它突变的情况。而主要依赖标签,只对转录子5'或3'端进行测序的策略则可以在牺牲全长序列信息的前提下为我们提供与转录子丰度相关的信息,有利于大规模开展分子定量研究。

不过整个单细胞测序界全都在追求同一个目标,那就是用一种经济、高通量的技术对细胞里所有的RNA进行全长序列测序。其中在进行核酸扩增之前如何减少RNA的丢失率,提高RNA逆转录成cDNA的效率是需要重点突破的技术难关,也是有助于提高RNA检测成功率的关键所在。另外一个同样重要的技术就是如何对单细胞进行分离、分类及分选,而

且是在不给细胞基因表达情况带来任何扰动的前提下从整块组织中分离得到单个的细胞样品。另外,科研人员们还希望能够在不考虑转录子长度的情况下,同时对poly(A)<sup>+</sup>RNA和poly(A)<sup>-</sup>RNA,以及各种RNA修饰体(比如m<sup>6</sup>A)进行检测。

我们现在已经发现, 在单细胞测序研究工 作中,细胞转录过程有一大特点,会给我们 的研究带来非常大的麻烦, 那就是我们在对细 胞群体的研究工作中发现的细胞基因表达规律 在单细胞的水平上其实一点都不可靠,任何随 机的扰动都有可能使该基因在某些细胞里不表 达,或者表达量很低,但也有可能变得很高。 这种多变性可能是因为细胞内的基因表达是一 个随机的分子进程, 所以在单个细胞内, 基因 的转录就是一个或全或无的概率性事件。科学 家们已经对原核生物和单细胞的真核生物进行 过大量的研究, 对基因转录的这种随机本质有 了非常深刻的认识和了解,现在越来越多的证 据表明,哺乳动物细胞内其实也是一样的。因 此,我们在开展单细胞转录组学研究工作时也 需要注意这一点。比如,标准的基因表达差异 试验 (differential expression test) 可能就不 太适于进行单细胞研究, 因为在这些被研究的 细胞当中,可能有一部分细胞里就没有相应基 因的表达。现在已经出现了适于这类研究工作 的试验策略, 可以将转录子丰度差异与细胞基 因表达比例差异结合起来进行观察。

到目前为止,开展单细胞转录组研究时还是需要单细胞悬液(比如组织解离液或者细胞培养悬液)做检测样品,但这种样品不能反映细胞在组织里的空间组织结构信息,除非我们知道这些细胞取自组织的哪一个部位。RNA原位杂交(RNA *in situ* hybridization)技术可以部分体现这种空间组织结构信息,能够了解组织里某些特定细胞里特定基因的表达情况。不过现在也有人在开发能够同时了解空间结构信息与转录组信息的单细胞研究技术,比如芯片式的多路测序技术(array-based multiplexing strategy)或原位测序技术(*in* 

situ sequencing)等。这类技术出现之后将帮助我们了解正在发育中的、成熟之后的、或者病变组织内的单细胞转录组情况,让我们对生命与疾病有更深入的了解,发现转录组与细胞间相互作用、组织极性形成以及局部差异之间的关系。

#### 4.3 单细胞测序技术与生物学的关联

对单个细胞内的基因表达情况进行研究将 彻底颠覆我们对基因表达调控的认识和理解, 也将解决很多长久以来一直困扰着我们的生物 学难题。比如细胞聚集在一起是由细胞种类决 定的,还是因为在发育的过程当中,根据细胞 的表达谱而决定的。如果是根据细胞基因的表 达情况来决定的,那么在对足够多的单细胞进行测序之后我们就可以准确无误地重建出(这也叫反向工程学技术)任何细胞(图1)。如果被研究的细胞数量足够多,而且已经彻底解决了试验误差的问题,那么这种研究就可以发现组织里的所有细胞类型,包括那些尚未被发现的新型细胞。同一个群体的细胞也可以被用来发现特定细胞类型的基因表达谱,此时也一样是以测序结果为依据,也同样在事前不知道哪些组织或细胞里会表达哪种标记基因的前提下。因此,单细胞RNA测序是一种以试验结果为基础的,可以对细胞种类进行定量分析的研究手段。

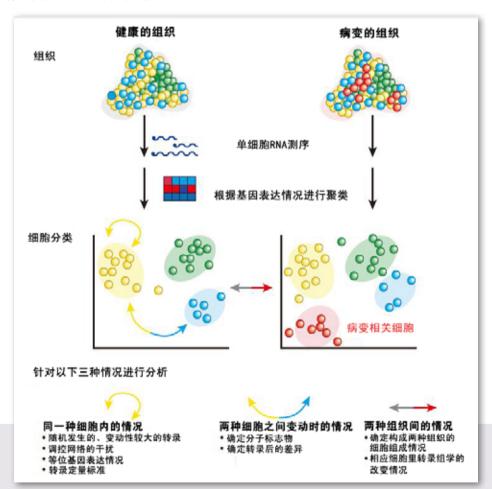


图1 对组织和不同的细胞进行单细胞转录组分析。首先将健康组织和病变组织解离,制成单细胞悬液,然后利用单细胞RNA测序技术,以及获得的基因表达谱信息对细胞进行单独的聚类分析,最后可以得到一张细胞聚类分析图。根据此图可以了解组织的细胞构成情况,甚至还可以发现以往不知道的未知细胞。如此丰富的信息还可以用来解决其它生物学问题,比如同种细胞和组织内,或者不同的细胞或组织间的基因表达情况和基因表达调控情况等。

单细胞转录组学研究还可以提供高质量的 细胞转录组图谱,这不仅针对稳定的细胞状 态,也同时针对复杂多变的细胞状态,比如细 胞分化或重编程时的状态。不过要达到这种研 究目的, 就必须对覆盖整个阶段的、数量足够 多的单细胞进行测序研究,这样才能在事后的 数据分析工作中重点关注其中的某一个阶段 (比如开始出现不同分化方向的那个时刻), 得到有价值的研究成果。样品量还反映了我们 预计会得到多少细胞种类,或者有多少生物学 事件会发生。当然,这也取决于人类基因组当 中基因转录的幅度究竟有多大,因为有多个研 究发现,人类基因组当中很多基因只发生了很 少的转录,平均1万个细胞里只发现了一个转 录子拷贝。这种转录子可能是在很少量的细胞 里高度表达(比如平均在10万个细胞里有一 个细胞内的拷贝数超过了10个),或者是在 大量的细胞里都维持非常低的表达水平, 即所 谓的渗漏表达。对大量的细胞(数千个)进行 研究可能会解决这个问题, 也有助于我们认识 细胞内整体的转录水平和整个细胞的基因表达 调控网络。

对人体组织和细胞进行RNA测序分析已 经证明,RNA研究手段可以用于各种转录组 学及蛋白质组学研究。进行组织比对时发现, 大量的差异都是非常细微的, 但是发现可变剪 接(alternative splicing)情况、多腺苷酸化 (polyadenylation)情况和转录起始位点的 选择,在单细胞层面上都是一种全(开)或无 (关)模式,这也与之前的单细胞研究结果相 吻合。针对可变多腺苷酸化调控机制的研究 发现,在增殖比较活跃的细胞里,以及体外培 养的转化细胞里,转录子3'端非编码区都比较 短。单细胞RNA测序技术尤其适用于对体内 的肿瘤细胞进行分析, 因为针对一堆转化细 胞、间质细胞和其它浸润细胞单独提取转录产 物进行分析,可以了解各种转录产物的丰度和 亚型信息。对离散的肿瘤组织和健康组织进行 单细胞转录组分析还可以精确地确定与转化状 态相关的、不同的mRNA亚型。

### 4.4 单细胞测序对于医学的意义

转录组学技术对于医学的意义主要集中在 对病变组织和相应健康组织的比较工作上, 或者可以对大量的病变组织进行分析, 找出其 间的差异,即进行亚型鉴定。我们主要是通过 细胞组成情况(比如浸润的免疫细胞),以及 和转化细胞和周围间质细胞里的基因表达情况 来确定肿瘤组织的。因此,在组织层面进行观 察时需要同时对几种不同的基因表达谱进行研 究。高通量的病变组织单细胞分析能够同时检 测细胞的组成变化 (通过细胞聚类分析手段) 和相应的基因表达变化。我们可以对健康组织 和病变组织里特定的细胞进行比较,发现与疾 病相关的特异性基因表达改变情况。不过要了 解细胞组成成分方面的局部变动信息就一定得 在同一块肿瘤组织的不同部位进行多点取样研 究。

无法用传统技术开展研究的、比较难获得 的、珍贵的临床细胞样品也是能够从单细胞转 录组学研究技术中获得好处的一个研究方向。 比如数量非常少的循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC) 就是一个非常好的单细胞 研究方向, 在一毫升血液中往往也就只有几个 CTC细胞,所以用常规的方法对这些细胞进 行全基因组研究几乎是不可能的。两项开创性 的研究工作已经证实,可以用单细胞RNA测 序技术来判断CTC细胞是黑色素瘤细胞还是 前列腺癌细胞。转录谱也已经证实细胞分离步 骤没有问题, 而且也发现了特异性的基因表达 谱变异情况。对CTC细胞的全长转录产物进 行单细胞RNA测序在成功检测基因表达情况 的同时,可以检测突变情况。对单个CTC细 胞进行转录组学分析还是一种无创检测手段, 可以帮助临床医生们选择合适的抗癌药物和治 疗方案,还可以随时监测病情的进展情况和疗 效。现在是时候判断CTC转录组学研究手段 对于癌症诊疗工作的指导意义了,也可以根据 CTC细胞上的分子标志物确定将来的靶向治 疗方案。

### 4.5 单细胞测序技术未来的发展前景

由于我们刚刚进入单细胞转录组学研究时 代, 所以在不久的将来一定会有很多新的发 现。RNA丰度与细胞表型(比如细胞大小、 核大小等)之间是否存在某种对应关系,这也 是一个很有意思的研究课题。比如为了维持不 同大小细胞胞膜或者细胞器质膜上的蛋白质浓 度,是否需要不同丰度的RNA?基因表达的 种类可能与胞膜或核膜的特定区域相关, 也可 能与胞质体积的大小或核大小相关。只有了解 了这些信息之后,我们才可以开始研究细胞的 异质性问题, 以及组织层面的细胞组成情况 等。比如,对由大小不同的细胞组成的两个组 织进行比较可能就会发现与细胞大小相关的基 因表达特征。对单细胞表达谱进行更深入的研 究还可能会为将来的试验设计打下更科学的基 础,比如是应该从组织层面、同种细胞,还是 单细胞层面,或者综合这三个层面来开展下一 步研究。

随着单细胞转录组学研究技术的不断成熟,估计在未来几年内单细胞基因表达及调控研究一定会成为一个新的大热门,科研界很快也会获得足够多(成百上千、甚至是数百万个细胞)的转录子定量研究数据。这些信息可以帮助我们回答很多重要的科学问题,也可以为将来定量研究细胞种类和异质性问题打下基础。根据这些信息,几乎还可以确定复杂的多细胞器官内所有种类细胞的转录组情况。而且单细胞转录组学信息还可以帮助我们提高对基因表达调控网络的人工操纵能力,因为大量的单细胞数据都真实地反映了细胞面临的生物扰动情况,这些信息都能够帮助我们加深对基因表达调控网络的了解。



# 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



### 5. 单细胞测序技术的前景

通常来说,我们会将具有同一表型的细胞看作是一个具有特定功能的整体,并将其称作组织或者器官。不过对单个细胞进行深度DNA和RNA测序会发现,各种各样的细胞状态构成了一个复杂的生态系统,这样一个复杂的系统才形成了组织和器官的整体功能。继续发展高信息度、实时的、多模单细胞检测技术将帮助我们真正认识处于微环境系统下单个细胞的功能。

自从Robert Hooke在1665年时第一次使 用"细胞(cell)"这个词来描述他用他自己 发明的显微镜观察软木塞时看到的镜下结构 之后,细胞就一直是科学家们关注的重点对 象。虽然早期的形态学研究(morphological study) 已经清楚地确定了各种各样的细胞形 态,但是最近的研究还是出乎意料地发现了 很多新的、不同的细胞状态(cell state)。 一个标准的人体细胞大约含有60亿个DNA碱 基对,以及6亿个碱基的mRNA(这个规模的 mRNA已经足以提供超大的编码能力)。对单 细胞的DNA和RNA进行深度测序就能够以前 所未有的更高的分辨率, 更全面地掌握细胞的 功能。科学家们对细胞状态的这种特异性识别 能力有助于我们更好地了解细胞的正常功能和 异常情况。

单细胞测序能够以更高的分辨率发现细胞之间的差异,这也引出了一系列的新问题。 其中最根本的问题可能就是发现并衡量出这种细胞间的差异并不一定有意义,也就是说,我们并不知道哪种细胞状态才是真正有功能的细胞状态。由于在一个典型的人体细胞里,每一种mRNA平均大约只存在几十个拷贝,这么少的mRNA分子能够像我们在发育初期看到的那样,对细胞进行精细的调控吗?单个细胞彼此之间又是通过何种相互作用,实现组织层面的功能,这种对细胞生态学(cellular ecology)的本质研究是一个非常值得深入挖掘的崭新领域。另外,如果我们认定细胞的表型就是多个细胞所形成的一个局部生态系统的功能,那 么,在一个多细胞组成的组织里,那么多的局部生态系统是如何共存在一起的,它们彼此之间有相互交换作用吗(图1)?

虽然单细胞测序技术(single-cell sequencing)给我们带来了很多惊喜,我们对该技术也寄予了厚望,但是该技术目前还不是实验室里一项常规的检测技术。因为基础技术以及数据分析和解读技术的不断进步是提高单细胞测序技术精确度的关键,而要在系统层面了解单细胞测序研究。我们接下来会对这些问题进行评述,同时也会重点介绍单细胞测序技术未来的发展方向,以及新近出现的单细胞测序技术未来的发展方向,以及新近出现的单细胞测序补充技术,还将介绍单细胞在整个生态大环境下的具体功能。

#### 5.1 关于单细胞研究的几个重要问题

有多个重要的问题会影响单细胞测序研究所获得的数据质量。其中尤其需要注意的、不可避免的问题就是,转录组(transcriptome)会根据各种刺激做出改变,而且这种改变在单细胞层面上表现得更加突出。考虑到这一点,我们应该慎重对待单细胞转录组数据,(至少在一定程度上)将其看作是干扰试验(perturbation experiment)的结果,除非能够开发出破坏性较低的RNA分离技术。

#### 5.1.1 细胞分离问题

单细胞分离技术几乎算是最需要开发, 也

最需要建立一套标准化体系的技术。使用膜片 钳(patch pipette)或纳米管(nanotube) 获取单个细胞的胞质内容物是目前分离细胞 RNA的常规方法,但是这种操作容易遗漏 细胞器成分。使用微流体设备(microfluidic device)可以分离得到一个个单独反应室里的 细胞, 但是需要将细胞与其它底物分离开, 而 这些底物有可能会干扰细胞的转录状态。细胞 在解离、分类富集的过程中,细胞的转录状态 是否发生改变,就是要特别注意的一个问题。 分散培养的细胞非常容易分离, 但是用这种细 胞做实验需要非常好的试验设计, 以免因为缺 乏微环境的影响而造成实验结果解读问题。最 理想的情况是在组织、或者天然的微环境状态 下,对单细胞进行内容物分离操作。只有这 样,进行单细胞mRNA检测才能够反映出细胞 在整体条件下最真实的状态, 也只有这样, 才 能尽可能地减少人为操作给细胞带来的影响。

### 5.1.2 核酸扩增问题

在缺乏成熟的、强大的单分子测序技术 的情况下, 开展单细胞研究最大的问题就是 底物(核酸)的扩增问题,因为扩增失误往 往会导致最终的测序结果发生偏差,让我们 无法得到目标核酸的序列。进行DNA测序时 这个问题显得尤为突出,因为只有一个DNA 分子可供测序。DNA测序的最大问题就是测 序的覆盖度(coverage)问题。以PCR技术 为基础的扩增技术能够获得很高的覆盖度, 但是会带来扩增不均一(uneven)和错误 扩增的问题。如果要进行错误修正(error correction),并发现单碱基突变(singlenucleotide variant), 这又需要额外的统计学 方法。对于单细胞测序而言,错误修正更加困 难,因为缺乏好的对照,而且我们根本不知道 单个细胞之间究竟会有多少个变异。

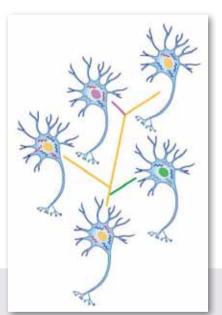


图1 经过单细胞测序发现的多种不同的单细胞状态。图中"核"表示DNA,"折线"表示RNA,每一种不同的颜色代表这些核酸拥有不同的序列。从图中可以看出,这些看起来一样,或者彼此相近的细胞其实在核酸序列水平上是不一样的。

对于RNA分子而言,最大的问题是如何 在扩增的过程中保证这些分子之间最初的(丰 度)比例关系。RNA扩增的第一步就是利用 逆转录酶(reverse transcriptase, RT)获得 互补DNA(complementary DNA, cDNA)。 在单细胞转录组测序工作中,这是最关键的一个步骤,RT反应的效率直接决定了细胞里最 终有多少RNA能够被测序。RT酶最初来自感 染了小核糖核酸病毒(picornavirus)的哺乳动物细胞,这种酶的效率非常高,细胞里哪怕只有一个病毒RNA拷贝,也能够合成出全长病毒核酸。虽然这种RT酶在体外实验中没有表现出太强的持续合成能力(合成出全长产物的几率还不到10%),但是经过优化之后,其持续合成能力也能够达到90%。突变之后的RT能够合成出更长的cDNA产物,在RNA浓度不佳时这种突变RT酶更加适用。

单细胞PCR技术(single-cell PCR)能 够让这些源自RNA的cDNA分子以指数形式扩 增。虽然在很多研究中都会使用PCR技术来 构建测序文库,但是我们也应该清楚,PCR 针对某些特定序列(比如高GC含量或茎环结 构等)的低反应效率也会呈指数形式扩增。所 以大部分科研人员都会尽量减少PCR的反应 循环数,就是为了减少这方面造成的误差。不 过由于这种扩增误差主要源自特定的序列,而 且基因的表达水平本来就千变万化,所以我们 很难估计误差究竟有多大。虽然某些序列的 转录效率也不是太高,而且会生成较短的扩 增产物或者缺失某些序列,但是以cDNA体外 转录技术(in vitro transcription of cDNA into amplified RNA, aRNA) 为基础的线性扩增技 术(Linear amplification)还是能够在一定程 度上解决这种因为扩增而带来的误差问题。如 果我们的研究目的只是对RNA进行定量,而 不是研究间接突变体,那么生成较短的RNA 转录产物问题还不算太大。对经过系列稀释的 对照转录RNA进行测序,同时对测序结果进 行泊松分布(Poisson distribution)分析,结 果证明,这种aRNA扩增方法的分辨率能够达 到对2至4个分子进行定量分析,不过试验结 果也会受扩增和回收效率的影响。

有一种解决这种扩增偏差的策略是在cDNA第一链合成时掺入特定的分子信标(sequence tag)。由于我们有大量的分子标签可供选择,所以源自每一个RNA分子的每一个cDNA分子都可以带上独特的标签。在PCR扩增时,其偏差不会影响这些标签分子

(除非标签分子失落),所以就不会造成扩增偏差问题,标签分子的数量就可以准确地反映出细胞里原始RNA分子的数量。不过这种标记技术还非常复杂,目前仍在优化当中。

### 5.1.3 动态范围和细胞数问题

目前估计,在一个典型的哺乳动物细胞 内, 大约有5000至15000个不同的基因在 转录和表达。如果我们认为每一个基因的情 况都是不同的,那么要确定转录组的协方差 (covariance),理想状态应该是比自由度 (degrees of freedom) 多检测10至30倍。 如果这些基因之间的变化情况是非线性的,而 且更加复杂,那么检测的次数还应该更多。目 前没人知道单细胞转录组的自由度究竟有多 大, 但是至少会有数千个, 这说明至少需要对 数万个细胞进行测序。现在已经有这样规模的 研究工作正在进行当中, 不过只针对少数几个 特定的靶分子,而且测序的覆盖度也很低。因 此, 在研究单细胞转录组时, 如果要获得足够 的转录组覆盖度,需要对多少个细胞进行测序 研究,这也是一个非常重要的课题。

多个研究认为,细胞表达量最高的基因平 均大约有3000至5000个转录产物。但是通过 查阅文献, 以及我们实验室自己的经验, 我们 发现在细胞内,大约90%的转录组产物都不 到50个分子。这就产生了一个问题,这么低 的表达量能够决定细胞的表型和功能吗? 我们 都知道,很多基因都存在"开"和"关"这两 种状态,而且这些基因的开关状态在一群细胞 里是不一样的, 另外还有很多表达水平很低的 基因, 在组织学研究工作中是根本发现不了 的。在这些一个细胞里转录子含量还不到50 个分子的基因的补体中有很多非常重要的因 子,比如转录因子和信号转导分子等。所以我 们不能忽视敏感性(sensitivity)问题,而且 充分覆盖每一个转录组的动态范围(dynamic range)与对足够数量的细胞进行测序具有同 等重要的意义。

### 5.2 空间问题

荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)也是研究细胞内RNA分子的一项技术。目前FISH技术通常都会使用多种短片段荧光标记探针,这些小分子探针能够自如地进入组织和细胞内部,与目标RNA片段结合。由于FISH技术在敏感性方面有非常大的改进,所以很难像芯片那样进行选择性杂交,我们也不知道在细胞交联之后,有多少RNA可用于杂交试验。更重要的是,不能同时对这些发射广谱各异的、数量有限的荧光分子进行"转录组式"的检测(即同时对各种RNA分子进行检测)。据报道,现在可以同时对细胞内大约30种不同的mRNA(荧光探针)分子进行检测,这和以往的FISH技术相比已经是相当大的进步了,不过这还不够。

多个研究小组都在开发原位测序技术(in situ sequencing),以及组合式标记技术,但是即便细胞内所有的RNA分子在空间上都是等距的,我们现有的显微分辨率(一个标准的20×20微米的哺乳动物细胞组织切片在250纳米分辨率的光学显微镜下)最多也只能分辨大约13000个色点(像素,每一个像素代表一个RNA),而一个细胞内至少有10万至30万个mRNA分子。不过这种对细胞内RNA分子空间分布情况的研究也有助于我们认识细胞的功能和表型。

### 5.3 单细胞蛋白质组学研究

科学家们往往借助对转录组的研究来了解细胞内的蛋白质组学情况。目前也不是十分清楚细胞内mRNA与蛋白质丰度之间的关系,因此急需一种能够直接评价转录组与功能蛋白质组之间关系的技术。蛋白质复杂的化学特性让我们很难像对RNA进行定量研究那样对蛋白质进行精确的定量研究,不过随着质谱技术(mass spectrometry)的灵敏度变得越来越高,蛋白质挥发技术(volatize)越来越成熟,我们也看到了进行单细胞蛋白

质研究的希望。另外,由于高亲和力抗体、纳米体(nanobody)、抗体单链可变区片段(single-chain variable fragment)等抗体衍生物,以及配体(aptamer)的不断发展,这些高亲和力技术也能够给我们提供灵敏性更高的技术手段,让单细胞蛋白质组学研究早日变成现实。

除了测序之外,我们还需要进行其它方 面的单细胞研究,比如单细胞DNA结构研 究和单细胞表观基因组学 (epigenome) 研究等。染色体构象(Chromosomal conformation)、DNA甲基化(DNA methylation)、染色质结构打开以及小分子 代谢组学 (small- molecule metabolome) 等 技术也都在朝着单细胞层面迈进。不论是何种 细胞, 对组织里的活细胞进行实时的、多变 量、多维度的检测才是我们最需要的理想检测 手段,因为只有这样才能获得最真实的、最系 统的细胞状态和数据。对于RNA分子而言, 这可能就意味着活细胞单个转录子分子的检 测。这种检测不仅能够发现都有哪些分子参与 每一个生物学进程,而且也能帮助我们对每一 个生物学进程有更深入的了解和认识。

除了检测和分析之外, 我们还需要在单 细胞水平进行一些干扰实验, 以便对细胞 的功能有一个动态的了解。比如使用RNA 分子来调节细胞的功能, 甚至还能够起到 治疗的效果。用定量稀释的RNA转染细胞 是第一个被报道的转录组诱导的表型重构 技术 (transcriptome induced phenotype remodeling, TIPeR)。全转录组,或者部分 RNA分子被转染进细胞之后,能够让细胞的 表型朝着既定的目标发生变化。TIPeR技术的 目标就是利用细胞的"RNA记忆"来实现特 定的细胞功能,这是一种能够调节细胞功能和 表型的功能基因组学技术。转录组分析和定量 调控技术让我们能够操纵细胞的表型和功能, 这不论是对于基础科学研究还是临床治疗都有 非常重要的意义。

### 5.4 单细胞生物学研究的前景

在单细胞层面,所有的疾病在病理学上都是不一样的。单细胞研究能够帮助我们更好地认识为什么有些细胞生病了,而另外一些细胞却还是正常的;也能够告诉我们为什么有些细胞对药物的敏感性非常高,可是另外一些细胞对药物却"无动于衷"。科学家们已经发现了很多受疾病影响最明显的细胞或组织特点,以及与疾病发病或严重程度有关的细胞或组织特点。找出这些与疾病相关的特异性分子状态有助于我们发现,并很好地利用药物作用靶点,但是能否发现这些靶点却取决于我们能否很好地认识"生病的"细胞。

比如,我们都知道多巴胺能的神经元细 胞(dopaminergic neuron)在患者患上帕 金森氏病之后会逐渐失去合成并分泌多巴胺 (dopamine) 的能力,而且这些细胞最终都 会随着病情的进展逐渐死亡。在这些神经元细 胞上发现的每一个受体、离子通道蛋白或者转 运体蛋白都可以是药物作用的靶点, 可以延缓 病情的进展或者改善患者的病情。现在用来 治疗帕金森氏病的药物主要针对这些神经元 细胞上的四种蛋白,它们分别是多巴胺转运 体蛋白(Dopa transporter)、毒蕈碱性受体 M1(muscarinic receptor M1)、单胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO) 以及腺苷A2A 受体(adenosine A2A receptor)。之前的组 织学研究已经发现了药物作用靶点,可是其中 有很多靶点都不在目标细胞上。单细胞研究特 有的敏感性和特异性告诉我们,在多种细胞上至少存在300至400种不同的药物作用基因。如果帕金森氏病患者也是如此,那么在漫长的疾病进展期内,我们至少可以选择30至40种药物作用靶点进行有针对性的治疗。

除了转化研究作用之外,单细胞研究还能够从根本上改变我们对多细胞组织(器官)工作方式的看法,让我们提出很多新的科学问题。比如在人体数千亿个细胞当中,究竟有多少种不同的细胞?体细胞DNA变异对于细胞的鉴定和细胞的多样性究竟意味着什么?如果体细胞突变非常常见,那么它们是随机发生的,还是属于基因组有计划变异的一部分?细胞的表型是由其自身基因组决定的,还是周围环境动态影响的结果?换句话来说就是,DNA是执行程序的执行者还是只是一个信息的载体而已?

微生物组测序数据不断表明,单细胞微生物就是一个多细胞宿主的组成部分。另外一方面,对一个多细胞组织里的单个细胞进行DNA和RNA测序研究也发现,这些细胞具有极大的异质性。这说明多细胞生物里的细胞并不像每一个生物体内的组织那样没有明显的差异,这些组织的功能是由这些细胞组成的生态系统决定的,而这些细胞彼此之间的相互作用决定了整个组织的表型,这种情况与微生物组非常类似。如果这是所有生物的共同准则,那么确定单细胞的多样性,以及细胞之间的生态系统将是我们认识每一个生物的必然途径。

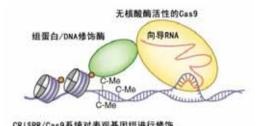


# 值得关注的重要技术与方法学领域的发展

下面呈现了一系列精心挑选的、在未来几年值得关注的重要技术与方法学领域的发展。

# CRISPR与表观基因组编辑

利用靶向性酶精确地改变表观基因组。



CRISPR/Cas9系统对表观基因组进行修饰。

最近有两个研究小组利用更为成熟的 TALE(类转录激活因子效应物)技术来修 饰表观基因组。Bernstein等人将去甲基化 酶/去乙酰化酶复合物作用于增强子上的组蛋 白标记,以探索它们在转录中的作用(Nat. Biotechnol. 31, 1133- 1136, 2013), 而 Zhang等人则将TALE与一种光诱导系统进行

融合, 随后利用融合物将组蛋白修饰酶靶向 到内源性基因座上,结果发现转录过程受到 了抑制(Nature 7463, 472-476, 2013)。 尽管这些方法都很有前景, 但是相对于利用 CRISPR/Cas9系统对酶进行靶定的技术而 言, TALE靶向技术更加繁琐, 并且需要大 量的人工操作。通过将Cas9与任何选定的酶 进行融合,我们不仅能够改变组蛋白修饰情 况, 进而改变染色质的状态, 而且还能够影响 DNA的甲基化,从而实现全新的细胞功能调 控。CRISPR是否能被精心打造成一把编辑表 观基因组的手术刀, 而不必担心脱靶效应的存 在——这一问题在不久的将来就会变得更加明 显。

### 促进神经学工具的发展

促进神经系统科学中技术的发展将具有重要的革命性意义。



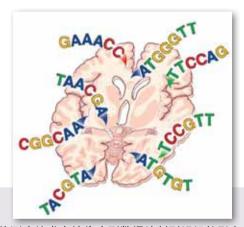
最近几年里我们看到,利用光遗传学原理 控制神经元活动的方法取得了极大的进展。 但是研究者们所关注的大脑功能可能是由许多 相互连接的神经元之间的交互作用所导致的, 而这些神经元广泛地分布在大脑的大部分区域 中。在活的生物体中监测并控制这些大型的神 经元聚集体,并使它们的活动与生物体的特殊 行为相匹配——这仍然是一个艰巨的挑战。这 就需要进一步发展光学与非光学方法,来扩展 我们对神经元活动的看法,直到其包含所有相 互联系的功能电路。

那些能让我们监测并干扰活体大脑内神经 元活动的生物传感器是至关重要的部分。我们 期待在未来几年内能够看到基因编码的电压传 感器的性能出现重大的提升,并且其在活体中 的应用次数出现激增。开发出对可见光谱中的 远红外区域敏感的神经元活动报告器,并且更 多地应用基于自适应光学原理的方法——这对 于更深层次的活体成像而言是至关重要的。

我们预测,神经系统科学中技术的发展在未来几年内将会以多种令人兴奋的方式出现。一篇名为"描绘大脑"的焦点文章已经发表在2013年的《自然方法》(Nature Methods)期刊上(http://www.nature.com/nmeth/focus/brainmapping/index.html),我们期待在未来几年内能够发表多篇有关该领域方法学进展的文章!

### 原位测序

### 生物学家需要一些能够对完整组织中的遗传物质进行直接测序的技术方法。



原位测序技术直接将序列数据绘制到组织的形态上。

长久以来,原位杂交(in situ

hybridization)等方法一直被用于精确定位完整细胞和组织中的基因序列,然而在应用这些技术时必须清楚目标序列的情况,这致使其应用范围受到了限制。在测序方面,许多技术都采用了一种基于光学原理的读取方式,这就说明这些技术能够与完整组织中的成像技术相兼容。但是基因序列的扩增和测序反应需要一种特殊的底物,或者需要在乳液中才能彼此分离。

另一种可供选择的策略是滚环扩增技术 (rolling circle amplification),它已经被用

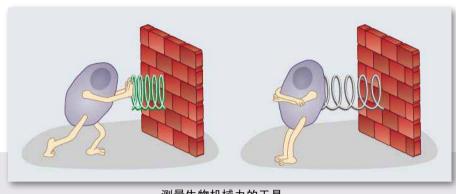
于增强信号,以便对细胞进行原位基因分型。 该方法依赖于一种"锁式"探针,它能杂交到 目标序列的任意一侧上,形成环状模板,从而 作为一段长序列进行反复地复制。由于滚环扩 增技术的产物被"拴"在了模板上,因此它能 够提供可靠的定位,并且通过连续多次地与基 于连接反应的寡核苷酸探针进行整合,从而 实现原位测序(*Nat. Methods* 10, 857- 860, 2013)。

这种形式的原位测序技术曾经直接测序过 组织切片的转录本中由四个碱基组成的序列变 异。然而这是一种靶标方法,仍然需要清楚侧 翼序列的情况。因此将来非常重要的一个任务 是增加单个细胞中可被测序的转录本数量和序 列长度,并且平衡成像的分辨率以及组织范围 内成像的能力。图像配准方法是这一放大过程 中的关键要素,而且我们也将需要一些能够对 序列与细胞形态的关联强度进行定量的工具。

这一技术的最终目标是测序多个基因座位 点,甚至是转录组或基因组中较大的片段,但 是这就需要突破性地解决信号密度问题:即在 如此狭小的细胞空间内却包含了太多可被成像 的信息。我们期待在未来能够将测序技术与生 物学背景更紧密地结合起来。

## 测量细胞力的微型工具

### 基于成像技术的传感器已经被用于测量细胞所产生的机械力。



测量生物机械力的工具。

细胞既能感知机械力,也能产生机械力。 在体内,机械力通过各种各样的方式在发育 和组织功能维持方面可能发挥了重要的作用。 为了了解这一相对尚未开发的生物学领域,细 胞机械力的测量方法引起了研究者们的极大兴 趣。

细胞与细胞之间,细胞与细胞外基质之间 会发生相互推拉,而黏附分子则是其中的主要 参与者。如今,研究者们正在使用一些配备有 精心设计的传感器、基于成像技术的测量方法 来衡量这些黏附分子所产生的机械力。

较早的测量工具都是以荧光共振能量转移(FRET)传感器(对机械力敏感)为基础所形成的。譬如,蜘蛛丝蛋白质中有一段对机械力敏感的结构域,研究者们将这一结构域的编码序列插入两种将进行FRET的荧光蛋白的编码基因之间,随后拼接成黏着斑蛋白(vinculin)编码序列的基因盒,并对整个基因盒进行表达(Nature 466, 263–266, 2010)。在经过校准后,FRET信号就是衡量细胞表面上黏着斑蛋白间机械力的一个指标。另一个研究团队构造出了一种略有差别的测量工具:利用一种对张力敏感的聚合物,将感兴趣的配体结合到细胞外基质上。基质内的猝灭剂会使共轭的荧光团发生猝灭,随后通过监测

共轭荧光团的猝灭程度,来测量同源的细胞表面受体上的张力(*Nat. Methods* 9, 64–67, 2011)。基于成像技术的机械力传感器能够与其它高分辨率的成像技术相结合,共同在细胞结构上"描绘"出机械力的强弱。

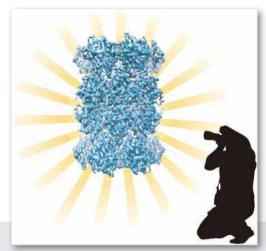
最近出现了一次技术性转折,研究者们不再读取荧光信号。他们通过把感兴趣的配体结合到DNA上,构建出了细胞拴系,利用其已被研究透彻的力学特性来调节拴系强度(即拴系断裂时所需要的机械力)。研究者们只需要监测细胞是否能够利用一定强度的拴系来粘附到配体所在的细胞表面上,从而测量单个受体-配体对所产生的机械力(Science 340,991–994,2013)。

最近,细胞机械力测量方法也已经用于测量活体内细胞的机械力了。研究人员能够利用一些结合有配体的、且其力学特性已知的微型油珠,通过成像技术来测量活体组织中细胞所产生的机械力(*Nat. Methods* doi:10.1038/nmeth.2761)。

毋庸置疑,用于监测生物机械力的微米级 和纳米级的成像工具将会不断发展,最终呈现 在我们面前的将可能会是一幅幅意想不到的生 物学景象。

# 单颗粒低温电子显微技术

单颗粒低温电子显微技术(single-particle electron cryomicroscopy)的进展已经使该技术的分辨率达到了原子级(atomic resolution)。



由于使用了新型的电子感应成像技术,单颗粒低温电子显微技术的分辨率已经可以达到原子级别,成为研究大分子复合体结构的新一代利器。

单颗粒低温电子显微技术(cryo-EM)诞生至今已经有几十年的时间了,不过一直以来都属于一门相对比较专业的技术,其主要作用就是弥补结构生物学研究两大利器——光学显微镜和X线晶体照相术(X-ray crystallography)之间的空缺。不过最近的技术进展让单颗粒低温电子显微技术的分辨率有了极大的提高,这也彻底改变了该技术的地位。

在单颗粒低温电子显微试验中,大分子复合体都会被冷冻在一个冰薄层平面上,然后用电子显微镜对其进行扫描成像。每一个复合体都会拍摄上万至数百万个图片,然后利用计算机对这些图片进行拼接、组合,最终融合成一个三维立体结构图。

与X线晶体照相术相比,单颗粒低温电子显微技术具有一个明显的优势,那就是不需要大分子结晶(crystallization)步骤,这样就

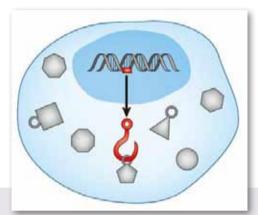
能够观察并获得更加天然的大分子结构。不过 虽然大家一直都认为单颗粒低温电子显微技术 的分辨率应该能够达到原子级别,可由于技术 水平的限制,这个目标一直都没有实现。这 主要是因为存在如下难关:无法获得足够的 样品、分子结构存在异质性问题(structural heterogeneity)、辐射对分子结构有损害、 电子束照射时会使样品移动,以及照相机的成 像效率太低等。

直到最近,单颗粒低温电子显微镜用户们 基本上都只有两个选择, 要么使用效率很低的 CCD照相机,要么使用传统的、非常不方便 的底片。新型的、能够直接感应电子的照相机 的成像速度则比上述这两种技术快很多,而且 能够以更高的效率拍摄图片,这就解决了一个 很大的问题。再加上这种直接感应电子的照相 机还能够录影,这样也解决了电子束照射时使 样品移动的问题。去年分别发表在《自然-方 法》(Nat. Methods)杂志以及eLife上的两 篇文章(分别是Nat. Methods 10, 584-590; 2013和*eLife* 2, e00461; 2013) 就使用了这 种新技术,用实际结果证明单颗粒低温电子显 微技术的分辨率完全能够达到原子级别, 可以 获得较小的、不对称的复合物, 比如核糖体 (ribosome) 和蛋白酶体 (proteasome) 的 三维立体结构。而且由于分辨率的提高,所需 要拍摄的图片的数量也得以大幅度降低。

随着样品制备技术的不断提高,样品制备 工作也逐渐走向了自动化,再加上新的数据分 析算法不断涌现,单颗粒低温电子显微技术将 成为一种新的研究大分子复合体三维立体结构 的技术,对传统技术提出强有力的挑战。

### 胞内的迷你生物探针

遗传编码的小型探针可以被用来对胞内生理进程进行实时监测,还可以对其进行干扰, 这项技术近来正逐渐引起人们的关注。



能够与特定蛋白质结合的遗传编码的小分子探 针正在引起越来越多科研人员的关注和兴趣。

使用对小分子进行跟踪、并对其活性进行 干扰的技术可以帮助科学家们了解活细胞的 工作情况和原理。随着显微镜分辨率的不断提 高,科学家们能够观察到更多的胞内世界。因 此,在细胞成像或者细胞试验时选择合适的探 针就显得越来越重要了。

能够对胞内蛋白质进行标记的探针应该具有极高的特异性,同时又不会对被标记蛋白的功能、胞内定位,或者蛋白质表达带来任何的影响。而且这些探针还得足够小,以便与蛋白质接触、结合。遗传编码的探针(Genetically encoded probe)就是一个不错的选择,该探针能够轻易地进入靶细胞或者细胞器内。

为了达到上述目的,科学家们正在努力发掘细胞内抗体(intrabodies)和配体(aptamer)这些"老朋友"的新功能。我们都很熟悉这些小分子的药用价值,可它们现在又以生物探测器(biosensor)和探针的身份

被广泛应用于基础生物学的科研工作当中。

细胞内抗体非常小,是一种重组的抗体样蛋白质,能够与特定的抗原结合。骆驼或鲨鱼这些动物都能够合成这种能够与一个结构域结合的小分子抗体,所以能够从这些动物体内获得天然的细胞内抗体,也可以通过对较大的哺乳动物抗体,或纤维结合蛋白(fibronectin)等进行人工遗传学改造的方式获得细胞内抗体。而仅仅由几个核苷酸或肽键组成的配体以及更小的探针则可以通过遗传学技术或自然选择的方式获得。

编码这些迷你连接物的基因还可以与编码其它生物元件或蛋白质的基因融合,以便对细胞内的组份或生理进程进行监测及干预。最近就有科研人员将细胞内抗体与荧光蛋白融合,来跟踪亚细胞结构蛋白质的运动情况(Neuron 78,971-985,2013)。他们还曾经在实验中人为操纵,让蛋白降解复合体与靶蛋白结合,并使靶蛋白降解(Nat.Struct. Mol. Biol. 19,117-121,2011);也曾经以这些探针为媒介和平台,使原属于不同复合物的蛋白质组份聚集到一起,促进某个基因的表达(Cell 154,928-939,2013)。能够探测细胞内靶蛋白构象的胞内抗体也可以被当作生物探测器,用来监测活细胞内这些靶蛋白构象的变化情况(Nature 495,534-538,2013)。

对这些探针进行进一步改良和优化能够使 探针的使用更加方便,而且在科学研究领域的 应用更加广泛。由于这些探针都具有独特的特 性,所以它们一定会成为科研人员们开展生物 研究工作中的好帮手。

### 群众的智慧

### 很多时候,一群人的力量要远远胜过当前运算速度最快的计算机。



在解决涉及很多视觉数据分析的工作时,让一群人来完成这项工作会更合适。

近十年来计算机软件和硬件技术都出现了飞跃式的发展,取得了长足的进步,因此很多人也许会得出这样一个结论:这是唯一的一种运算手段。科研人员们也这样认为,于是他们几乎把所有的数据全都扔给了计算机,不论这些数据分析和预测工作有多么的复杂。可是大家慢慢发现,在需要解决涉及视觉元素(visual element)处理工作的时候,人类还是比计算机更合适。很多人都拥有敏锐的视觉、智慧,甚至是直觉,他们在处理这类工作时的表现要优于最高级的计算机算法。

科 研 数 据 分 析 工 作 的 众 包 (crowdsourcing)模式部分起源于互联网的兴起,被互联网连接起来的个人电脑其运算能力不亚于、甚至超过了目前世界上运算速度最快的超级计算机。比如著名的众包游戏程序Foldit就是一群Rosetta@home的用户创建的,他们想告诉计算机软件该如何解决蛋白质结构问题,这些问题对我们能够在屏幕上看到蛋白质立体结构的人类而言是轻而易举的。Foldit游戏展现出的这种众包的超级力量帮助科学家们在10天里解决了逆转录病毒蛋白酶

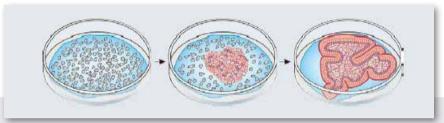
(retroviral protease) 晶体结构的难题(*Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1175–1177, 2011), 也帮助科学家们重新设计了一种酶,使其活性比之前提高了18倍多(*Nat. Biotechnol.* 30, 190–192, 2012)。

虽然公众有一种强烈的意愿,希望参与这种科研数据分析工作,但是如何让公众对这种工作产生兴趣可是一件不那么简单的事情。而且让计算机跟踪神经组织里轴突(neurite)的生长运动轨迹可不容易。让我们人来干这项工作就要可靠得多,但这是一件非常无聊,又很艰难的工作,所以只要一开小差就会出错。如果能像Foldit那样,将这项工作设计成一款游戏就好办多了。一家叫做scalable minds的公司正在与德国马克普朗克神经生物学研究所(Max Planck Institute of Neurobiology)开展合作,为这个名为Brainflight的科研众包项目设计一款游戏,来解决这个问题,并帮助科学家们绘制出大脑里轴突生长的进程图。

科研人员们即便没有众包软件也没问题。 亚马逊土耳其机器人(Amazon Mechanical Turk)就可以为求助者提供这类帮助,他们会 将求助者的任务分发给其他人,大家共同完成 这项任务,网站只会象征性地收取很少一点费 用。该服务的结构限制了可以提供的服务类 型,但是他们背后参与完成任务的工作人员也 都是经过筛选的,所以这种双向的限制性也是 有其实际意义的。 毫无疑问,在生物学研究工作中,计算机 分析还会继续起到主导性的作用,并且会在更 多的研究领域内起到决定性的作用。但是至少 在未来的几年内,对于某些科研任务,选择众 包的形式,让一群人来完成任务可能会比计算 机完成得更快、更好一些。

#### 能够自我组织的干细胞

体外培养的干细胞在培养皿中就能够形成具有复杂结构的组织样类器官(Tissue-like organoid)。



体外培养的干细胞在培养皿中就能够形成具有复杂结构的组织样类器官。

我们知道,如果体外培养的多潜能干细胞(Pluripotent stem cell)生长条件不再能够维持其多向分化潜能,它们就能够自发分化成为多种不同类型的终末细胞。不过近几年来科研人员们发现,这些干细胞在合适的条件下还能够形成组织样的复杂结构,而且这些结构与体内组织的真实结构都有几分类似,这让我们大吃一惊。最能够让科研人员们惊喜的就是,一旦发现了能够促使这种组织样类器官形成的最关键的培养条件,那就好办了。

比如,小鼠与人类的胚胎干细胞来源的 视网膜色素上皮细胞(embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cell)只要能够在基质胶(matrigel)上聚集形成具有三维结构的立体聚合物,它们就可以自动组装形成视杯结构(optic cup),如果进一步培养还能够形成分层的神经视网膜组织(*Nature* 472, 51- 56,2011)(*Cell Stem Cell* 10,771-785,2012)。最近,有人将人多能干细

胞来源的神经外胚层细胞(neuroectodermal cell)放置在基质胶中,然后将培养瓶置于培养箱中进行旋转培养,结果得到了厚达数毫米、类似于未成熟大脑皮质(毫无疑问,这是人体最复杂的器官)结构的类器官(*Nature* 501, 373- 379, 2013)。

在此之前,也有科研人员将肠道干细胞(intestinal stem cell)埋置于基质胶中培养,得到了肠道组织样类器官,而且这种类器官内含有体内肠道组织的所有组成细胞(Nature 459, 262-265, 2009)(Nat. Med. 15, 701-706, 2009)。用胚胎干细胞和源自其它组织的成体干细胞做实验也得到了类似的结果。

我们目前还无法用体外培养的方式制造出一个器官,不论多么高级的培养基和培养箱也无法模拟体内的生长环境。而且大量实验也证实,体外诱导培养获得的分化细胞只有被植入到体内环境之后才能够最终分化成熟。

然而体外细胞培养毕竟是一种易于操作和 控制的技术,有助于科学家们研究细胞和组 织的正常发育以及病变过程,所以这种干细胞 体外培养形成的类器官还是有巨大的应用潜力的。

#### 原文检索:

Kelly Rae Chi. (2014) Singled out for sequencing. Nature Methods, 11:13-17.

Tal nawy. (2014) Single-cell sequencing. Nature Methods, 11:18.

Paul C Blainey & Stephen R Quake. (2014) Dissecting genomic diversity, one cell at a time. *Nature Methods*, 11(1):19-21.

Rickard Sandberg. (2014) Entering the era of single-cell transcriptomics in biology and medicine. *Nature Methods*, 11: 22-24.

James Eberwine, Jai-Yoon Sul, Tamas Bartfai & Junhyong Kim. (2014) The promise of single-cell sequencing. *Nature Methods*, 11(1): 25-27.

Nicole Rusk. (2014) CRISPRs and epigenome editing. Nature Methods, 11(1):28.

Erika Pastrana. (2014) Bring on the neuro tools. Nature Methods, 11(1):28.

Tal Nawy. (2014) In situ sequencing. Nature Methods, 11(1):29.

Natalie de Souza. (2014) Tiny tools to measure force. Nature Methods, 11(1):29.

Allison Doerr. (2014) Single-particle electron cryomicroscopy. Nature Methods, 11:30.

Erika Pastrana. (2014) Intracellular mini-binders. Nature Methods, 11:30.

Daniel Evanko. (2014) The power of a crowd. Nature Methods, 11:31.

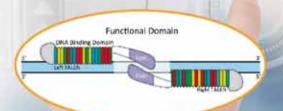
Natalie de Souza. (2014) Self-organizing stem cells. Nature Methods, 11:31.

YORK、筱玥、Dee/编译



# 基因组编辑工具—CRISPR & TALEN

### • 快速交货

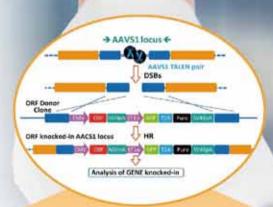


#### Genome-TALER™ TALEN 和 TALE-TF 定制服务

一应用于基因敲除或敲入。 靶基因激活

专为精确、快速的基因组编辑实验而设计 提供多层次的TALENs,TALE-TFs和其他基于 TALE的靶向基因组修饰工具的设计,构建和 验证服务

¥4800元起

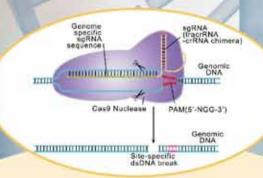


#### 人类 AAVS1 safe harbor 基因融入试 剂盒及敲入克隆

应用于基因融入

通过TALEN或CRISPR-Cas9系統介导的同源重组,将您的目标基因。筛选标记或其他遗传因子靶向敵入人类第19号染色体上的(AAVS1 safe harbor)安全敲入位点。在AAVS1位点上插入外源基因片段能保证转入基因片段的功能,对细胞无已知的副作用。超过18,000个经过序列确证的ORF敲入克隆可供选择。

## • 保证序列



#### Genome-CRISP™ CRISPR-Cas9 产品与服务 应用于基因敲除或敲入

专为简单、快速的基因组编辑实验而设计。提供多层次的CRISPR-Cas9 sgRNA设计、克隆构建、功能验证及其他相关服务。

¥2800元起

#### 比较TALEN与CRISPR-Cas9系统的应用

特性	TALEN	CRISPR-Cas9
识别方式	蛋白质-DNA	RNA-DNA
甲基化敏感性	敏感	不敏感
染色质结构敏感性	敏感	敏感
多基因(位点)靶向 编辑	较少使用	可使用
脱靶效应	极低	潜在脱靶效应较 TALEN和ZFN高

#### 相关服务

服务		TALEN	CRISPR- Cas9
细胞水平功能验证	代理报告基因检测	N	V
染色体水平 功能验证	T7核酸内切酶I酶切 检測	V	V
	qPCR检测	V	
供体克隆服务	设计与构建	V	V
稳转细胞株 服务	筛选单克隆细胞株	V	1
	构建稳转细胞库	V	V





# "危险的"教授



直言不讳的David Nutt,他认为政客们对药物的看法还处于非常原始、幼稚的阶段。

David Nutt希望药物政策能够以科学为依据,他还希望为全世界提供一种酒精替代品,他表示只要政治家们同意,他完全能够做到。

David Nutt正在尝试开发一种新的休闲药品(recreational drug),他估计全世界大约有数百万人会成为他的客户。现年62岁的科学家David Nutt可不是"绝命毒师(Breaking Bad)",其实他开发这种药物是为了挽救人类。他打算开发一种酒精替代品,这种饮品与啤酒或威士忌一样能够给人带来愉悦的感受,但是对身体的伤害却要小得多。而且他还打算开发一种解毒剂来缓解酒精替代品的功效,可以使人饮"酒"之后立即清醒过来,不用再担心酒驾的问题。

Nutt是英国帝国理工学院(Imperial College London)的一名神经精神药理学家(neuropsychopharmacologist),也曾经是英国政府药品相关政策制定咨询委员会的成员。据他介绍,他现在已经发现了几种候选药物,准备进行下一步研究工作。Nutt指出,人

们喜欢喝酒,大家都喜欢那种放松的感觉,那种喝醉酒的感觉。那么为什么就不能开发出一种既能够带给大家醉酒之后的轻松感,又不会对人体的肝脏和心脏造成伤害的药物呢?

Nutt去年在BBC电台里提出了这种观点,并且希望能够有人为他提供科研资助,可是很多人听说了这个消息之后都被他这个疯狂的念头给吓坏了。比如有一个专门涉及酒精问题的慈善团体就对Nutt提出了批评,他们认为Nutt这么做只不过是用一种上瘾品替代了另外一种上瘾品而已。还有一位评论员认为BBC播出这样的节目是不能接受的。新闻报纸则将Nutt的酒精替代品比作Aldous Huxley的反乌托邦小说《美丽新世界》(Brave New World)一书中的迷幻药soma。Nutt的一些同事也认为他的这种想法从科学层面上来看也是不太容易实现的。

"我们都知道人们喜欢喝酒,大家都喜欢那种放松的感觉,那种喝醉酒的感觉。那么为什么我们就不能开发出一种既能够带给大家醉酒之后的轻松感,又不会对人体的肝脏和心脏造成伤害的药物呢?"

——英国帝国理工学院神经精神药理学家David Nutt

Nutt对于大家的这种反应一点也没有感到惊奇。Nutt认为他的这种药物开发思路更加先进、也更加合理,所以他一直以来都在不遗余力地推广、宣传他的这一观念,也因此招致了很多的批评和非议。他当引雷上身的"避雷针(lightning rod)"已经很多年了。Nutt认为那些政客们在制定政策时只考虑如何吸引选票,根本就不考虑是否科学。所以现行的药物相关政策反映的只是一种道德判断,即能够不用药就不要用药,应该尽可能避免用药的大众心理。Nutt认为药物管理政策应该以科学为依据,以各种药物对身体的危害为依据,其实很多药物对身体的危害要比酒精等非药品轻得多。所以他提出了这个开发酒精替代品药物的计划,就是要尽可能地减少酒精对人们身体健

康的危害,他相信这会挽救全球数百万人的生命,同时还能节约数十亿美元。

Nutt的这种观点,以及他提出这些观点的方式经常会把他置于舆论的风口浪尖上。报纸评论员就给他起了各种外号,比如"疯狂教授(Professor Nutty)"、"危险教授(the dangerous professor)"等。2009年,由于Nutt对英国政府有关大麻(cannabis)的决议提出了批评意见,让他失去了专门为英国内政部长提供科学意见的英国药物滥用咨询委员会(United Kingdom's Advisory Council on the Misuse of Drugs)主席的职位。

不过在去年的11月,由于他出色的科学成就,Nutt获得了约翰·马多克斯奖(John Maddox Prize)。该奖项的评委之一,神经

生物学家Colin Blakemore如此评价Nutt: 面对足以使大多数人感到屈辱,并因此而沉默的不利环境, David Nutt还能够继续坚持宣传他

的观点,帮助大家认识药物危害的重要意义, 促进政府制定正确的药物政策,这是难能可贵 的。

#### 备受争议的比较

David Nutt看起来一点也不像一位有威胁的教授。他个子不高,但是身材非常壮实,有着一张和气的胖脸庞,留着老派的胡子,第一眼看到他时往往会误认为他是伦敦的的士司机。Nutt步子很轻,说话很实在,而且说话时常常都会伴以微笑。德国海德堡大学(Heidelberg University in Germany)的精神药理学家Rainer Spanagel这样评价Nutt:他是一个非常有魅力的人。比如你们在开会,已经快要达成一致了,但是1个小时之后才到的Nutt却能够综合各方的意见,最后让大家全都赞同他的看法。

据Nutt自己介绍,他在很小的时候就意识到,研究大脑的工作机制是整个宇宙里最有意思,也最具挑战性的一项工作。在他十几岁的时候,他的父亲给他讲了一段Albert Hofmann的故事。Albert Hofmann发现了最强大的精神迷幻药物LSD。有一次Hofmann服用了LSD之后,骑车回家居然感觉好像花了好几个小时,而不是平时的几分钟,这也让他发现了LSD的致幻作用。"那不是很神奇吗?这种药物居然能够改变时间。"小David听完这个故事之后问他爸爸。后来Nutt进入了剑桥大学学习,在他入学的第一个晚上就见识到了这种致幻药物的威力,当时他和一帮同学去喝酒,其中有两名同学服药之后就完全失去了控制,其

中一人痛苦不已,另外一人则变得充满了敌 意。

在后来的临床训练期间,Nutt治疗了很多酒精成瘾者(alcoholics),可是即便经过他不断的宣传和尝试,最终也还是没几个人愿意了解如何能够减少酒精这种对人体健康有害物品的成瘾性。于是他决定自己来解决这个问题。起初,Nutt在英国开展这方面的研究,然后又来到美国,在美国国家酒精滥用和酒精中毒研究所临床科学中心(Clinical Science at the U.S. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism)部门负责人的岗位上工作了两年。现在,Nutt是英国帝国理工学院神经精神药理学系的主任,他正借助现代化的成像技术来研究人们服药之后,或者药物成瘾之后大脑里都发生了哪些变化。

不过Nutt认为他对科学最大的贡献还是他早些年间的发现,当时他发现有些分子不仅会封闭脑内的某些受体,还能够起到与这些受体激动剂相反的作用,彻底关闭与该受体相关的整条信号通路。Nutt将这些分子称作"拮抗剂(contragonists)",他自己的第二份职业也有点科学拮抗剂的味道,他正在努力让整个社会对他开发酒精替代品而产生的激烈反应慢慢平息下来。

#### 小说引发的问题

早在2009年时,Nutt就在《精神药理学杂志》(Journal of Psychopharmacology) 上发表过一篇文章,文章对能够给人们带来愉 悦感的骑马与致幻剂(ecstasy)的危害进行了比较。根据Nutt的测算,每1万粒致幻剂就可能会给一个人带来伤害,而骑马每骑350个

小时就会出现一次事故,因此Nutt认为体育运动要比声名狼藉的致幻剂更加危险。Nutt进而提出了这样一个问题,为什么我们的社会会容忍,甚至是鼓励大家从事这样一些有潜在危害的行为,对于实际危害更小的药物却不能够接受呢?

政客们可不愿意看到这种意见,哪怕Nutt 在虚幻莫测的小说里提到这种观点也不满意,他在书中专门给这种骑马上瘾者起了一个名字,叫"骑马上瘾综合症(equine addiction syndrome,equasy)"。Nutt在这本名为《药物一实话实说》(Drugs - Without the Hot Air)的书里记录了一段在他2009年那篇文章发表之后与英国内政部长Jacqui Smith的电话内容,谈话内容如下(不过Smith认为这段谈话内容经过了修饰):

Smith: "你不能将骑马这种合法活动的 危害与嗑药这种非法活动的危害相提并论。"

Nutt: "为什么不行?"

Smith: "因为嗑药是非法的。"

Nutt: "为什么嗑药是非法的?"

Smith: "因为嗑药对人的身体健康有害。"

Nutt: "那我们难道不应该以是否对人的 身体健康有害为标准来评价某项活动是否合法 吗?"

Smith: "你不能将骑马这种合法活动的 危害与嗑药这种非法活动的危害相提并论。"

据Nutt介绍,每当他与政客们讨论致幻药物问题时,就总是会出现这种兜来兜去的车轱辘对话。他介绍道:"这就是在我们精神科学领域里常说的'分裂'状态,这种非黑即白的看问题方法非常的原始、幼稚。"

Nutt就是这么直白。他认为当今药物管理政策对科学研究的阻碍(比如限制精神科药物的临床应用)就好像当年教会对伽利略和哥白尼的打压和迫害。英国政府最近颁布了一项禁令,禁止使用阿拉伯茶(khat),并将其列为C类毒品。我们知道阿拉伯茶里含有能够刺激人类大脑的物质,在非洲好望角一带和阿拉伯

半岛使用得非常普遍,Nutt认为英国政府禁止 人们使用阿拉伯茶就好像禁止人们养猫一样可 笑。Nutt也对俄国政府提出了批评,因为俄国 政府蓄意用酒精来麻痹反对者。Nutt认为,不 论俄国反对者多么的穷困潦倒,不论他们多么 的痛恨俄国政府和他们的祖国,他们都能够喝 到酒,直到喝到爬不起来为止,直到喝到不能 走上街头抗议为止。

但就是因为对大麻的态度,也让Nutt惹上 了麻烦。2009年初,Smith无视Nutt的咨询委 员会给出的意见,将大麻从C类毒品提升至了 B类毒品,持有大麻的最高刑期也从两年一下 子提高到了5年。几个月之后,Nutt在一次公 开演讲中对此决定提出了批评, 他认为综合 来看, 使用大麻并不会给人们的身体健康带 来非常大的危害,相比之下烟酒的危害反而 要更大一些。这番言论一经媒体播出,Alan Johnson(他在2009年年中接替Smith成为新 一任英国内政部长)就立即要求Nutt辞去咨 询委员会主任的职务。Johnson在给英国《卫 报》(The Guardian)的一封邮件里这样写 到: "我们认为Nutt不适合继续担任这一职 务,因为他不能一方面给政府提供咨询建议, 另外一方面又不断地指责政府的意见。"

Nutt可没有悄无声息地离职。他在一位年轻的对冲基金经理Toby Jackson的资助下成立了与政府对立的"药物独立科学委员会(Independent Scientific Committee on Drugs)",帮助公众了解与药物相关的最准确、最独立、不受政治及商业利益影响的、有切实科学根据的信息和建议。Nutt认为政治不仅影响了药物的使用,同时也影响到了科研工作本身。他表示,如果你想从美国政府那拿到一笔科研经费来研究某种药物,那么你首先得证明这种药物对人类的大脑是有害的。

Nutt最喜欢举的一个例子就是于2002年9 月发表在《科学》(*Science*)杂志上的一篇 文章。这是由美国约翰霍普金斯大学(Johns Hopkins University)的George Ricaurte等人 完成的一项科研工作,他们发现只要给试验猴 使用2至3粒致幻剂MDMA,就可以对试验猴的大脑造成非常严重的损伤。Ricaurte等人认为,这表明人们即便偶尔使用一下MDMA,也非常有可能对他们的大脑造成严重的伤害。这篇文章一经刊登就引起了媒体广泛的关注,但是一年之后这篇文章被撤稿,因为Ricaurte等人发现给试验猴注射的并不是MDMA,而是去氧麻黄碱(methamphetamine),又名冰毒(crystal meth),可我们都知道给猴子注射冰毒的确会给试验猴的大脑造成严重的损害。Nutt认为Ricaurte等人在最开始就应该发现这么明显的错误,因为这完全不符合科学。他评论道: "如果这一发现是真的,那么服用MDMA的孩子都应该因为患上帕金森氏病而死去。"

对于Nutt这种直白的表达方式,很多人都

非常难以接受。比如美国匹兹堡市Carnegie Mellon大学(Carnegie Mellon University in Pittsburgh, Pennsylvania)的公共政策教授 Jonathan Caulkins就认为,他本身就是一个 很极端的人,而药物政策制定又是一个非常极端的领域。但加拿大多伦多市加拿大成瘾及精神卫生研究中心(Centre for Addiction and Mental Health in Toronto, Canada)的流行病学专家Jürgen Rehm则认为Nutt的言论非常有价值,这些观点让很多长期以来被忽视的问题得以公诸于众,接受公众的讨论。Rehm说道:"如果你的观点不激烈一点,你永远也不可能登上《柳叶刀》(The Lancet)或《纽约时报》(The New York Times)的封面。我也会这样。"

"如果你的观点不激烈一点,你永远也不可能登上《柳叶刀》(*The Lancet*)或《纽约时报》(*The New York Times*)的封面。我也会这样。"

——加拿大成瘾及精神卫生研究中心流行病学专家Jürgen Rehm

"Nutt本身就是一个很极端的人,而药物政策制定又是一个非常极端的领域。"

——Carnegie Mellon大学公共政策教授Jonathan Caulkins

#### 药物分类问题

2010年,Nutt又引发了新一轮的暴风雨,他在《柳叶刀》(*The Lancet*)杂志上又发表了一篇文章,他在这篇文章里根据药物对人体的危害性对各种药物进行了一次排名和分类。Nutt与其他几名专家一起根据16项指标对一大串药物进行了一番"评比",其中有9项指标与使用者有关(比如使用过量致死或关

系障碍等),7项指标与整个社会有关(比如药物引发的暴力问题、经济问题等)。文章最后对每一种药物的整体危害性给出一个分值介于0至100范围内的评分。在这份药物危害表当中,酒精名列榜首,其危害高于海洛因,而蘑菇和致幻剂的危害则最低,详见附图。



Nutt和英国伦敦药物独立科学委员会的其他几位专家一起对20种药物进行了一番排名,排序的依据就是这些药物对人体以及对社会的危害性大小。他们在0至100这个范围内,根据药物的整体危害给出了自己的评分。他们认为快克可卡因(crack cocaine)是对使用者本人危害最大的一种药品,而酒精则是对整个英国社会危害最大的一种药品。

批评者们认为这项研究所采用的方法有问题,因为他们没有考虑药物之间的相互作用,以及社会大环境的问题。Caulkins就批评道: "比如,因为过量饮酒而死亡的人数在部分程度上也与枪支管制法有关。"所以,Caulkins认为这种用打分的方法来评价药物危害的做法是非常荒谬的,很难让人接受。

Caulkins还补充说,即便可以拿出一份非常完美的药物危害排名列表,那也不代表政治

家们就应该对列表中排名处于前列的药物进行严格管制。Caulkins举例说假设药物A对个人和整个社会的危害远远大于药物B,但是药物A里的杂质如果被非法利用,就有可能导致使用者发生严重的器官衰竭;可是如果这些杂质混杂在药物B当中,那只会让药物B的口味稍差一点而已。如果只能够禁用一种药物,那么应该禁用药物B,哪怕药物B本身的危害更小,因为非法使用药物A会引起更大的危害,

使更多人死亡。所以Caulkins认为Nutt做的这个药物危害排名就是一次伪科学实践,要从技术的角度来控制政策的制定,哪怕这个技术本身并不可靠。

可是这篇文章也有很多支持者。比如有两名加拿大药理学家就写信给《成瘾》(Addiction)杂志,他们认为Nutt做的这个药物危害排名表虽然也存在一些瑕疵,但是至少在尊重科学证据的前提下,在定量评价药物危害性方面迈出了可贵的第一步,这有助于加拿大和世界其他国家制定出更合理的药物管理政策。Rehm认为,不论这个排名表的质量如何,这篇文章至少起到了很大的影响作用。他说道: "在欧盟国家里,不论大家喜欢与否,每个人都知道这篇文章。这篇文章具有划时代的意义。"

Nutt表示,他做这个排名表只是希望用科学证据来指导制定药物使用政策工作中的第一步,他希望将来的药物使用管理政策能够降低药物的危害,而不要只为了满足道德的评判标准。Nutt认为最好的办法就是为酒精饮品,以及其它所有比酒精危害更低的替代品建立一个管制市场。

按照这种标准,只有海洛因、快克可卡因 和去氧麻黄碱才属于违禁药品,不过这似乎 不太可能成为现实。但是Nutt表示他已经看到有些国家在执行更加合理的管理规定。最近乌拉圭(Uruguay)政府和美国的科罗拉多州(U.S. states of Colorado)及华盛顿州政府专门为大麻的销售制订了新的法律,他们甚至比荷兰还要更前卫一些,我们知道荷兰早在几十年之前就已经不再认为持有和销售少量软性毒品(soft drug)属于违法行为了。Nutt也很高兴地看到,美国总统奥巴马最近对大麻的一番评论也认为大麻对人体的危害性要小于酒精。Nutt充满信心地说道:"最终,政客们会说实话的。我也会告诉他们,我当初就因为说实话被下岗了。"

新西兰也于2013年通过了一项新法令,按照这项最新的法令,如果新合成的致幻药物被证明对人体不会产生太大的危害,就可以合法地在新西兰进行销售。Nutt也曾经给新西兰政府提供过建议,他很高兴看到新西兰政府的这一举措,他称之为药物管理措施方面的"理性改革"。不过目前最大的问题是如何评价药物的危害性,因为新西兰政府禁止开展药物动物实验,同时也很难确定何谓低风险。"我告诉他们(新西兰政府),只要药物的危害比酒精小就可以了。可他们说:'天呐,那样太危险了。'"Nutt介绍道。

#### 更安全的替代品

Nutt认为酒精就是目前市场上最危险的药品之一,所以他才想到要开发一种更安全的酒精替代品。据世界卫生组织估计,每年大约有250万人因为酒精丧命,饮酒与肝硬化、癌症、胎儿酒精综合症、醉驾及家庭暴力等都有关系。据Nutt介绍,他对很多慢性酒精依赖症患者进行过大脑扫描检测,发现他们中有很多人的脑损伤程度比阿尔茨海默病患者还要严重。

Nutt和Rehm本月在《精神药理学杂志》 (Journal of Psychopharmacology) 上发表 了一篇文章,他们对6项最有利于政府降低酒精危害的措施进行了总结和评估,这些措施包括限定烈性蒸馏酒(hard liquor)的最低价格,对销售场所也做出限制等。他们还认为,政府应该对开发酒精替代品的工作给予支持。Nutt指出,电子烟(e-cigarette)就是一个很好的榜样,从理论上来说,电子烟每年可以挽救500万人的生命,这比因为艾滋病、疟疾、结核病和脑膜炎死亡的人数加起来还要多。Nutt个人认为,电子烟是继疫苗之后最伟大的医学发明。

不过德国的精神药理学家Spanagel质疑,酒精替代品真能起到替代酒精的作用,给人饮酒之后的感觉吗?他认为不太可能。他这么说的理由之一就是科研人员最近刚刚发现,乙醇(化学家们对酒精的称呼)的作用机制非常复杂。"20年之前,科学家们认为,乙醇进入大脑之后会透过神经元细胞的胞膜,改变神经元细胞的特性,从而引发各种酒后反应。可现在我们发现不是这样的,除非你喝了5升荷兰杜松子酒,才会发生这种情况。"Spanagel介绍说。

实际上,科学家们已经发现酒精与其它药物一样,也能够与某些神经递质受体结合,发生相互作用。但是与其它药物不同的是,酒精能够与多种受体结合,包括GABA受体、NMDA受体、5-羟色胺受体及乙酰胆碱受体等。所以Spanagel认为,我们很难开发出能够同时与这么多受体结合,模拟多种酒后愉悦反应,同时又能够避免酒精危害的替代品。

Nutt目前主要在研究GABA系统,这也是哺乳动物大脑中最重要的一套抑制系统。酒精能够激活GABA受体,有效地促使大脑安静下来,从而达到很多人都非常希望借助饮酒而达到的那种放松状态。Nutt已经对好几种靶向GABA受体的化合物进行了试验,他对结果感到非常的满意,他在最近发表的一篇文章里写到: "在发现了一种比较有潜力的酒精替代物之后我这颗悬着的心总算是落下来了,因为使用这种药之后,大约在1个小时我都感到非常

的放松,有一种酒后昏昏欲睡的感觉,可是在使用了解毒剂之后,仅仅只过了几分钟的时间,我就立即清醒过来了,并进行了一场演讲,没有受到任何的影响。"

不过Nutt还不满足,他知道有很多种GABA受体亚型,每一种亚型受体模拟的酒后反应都不一样。因此Nutt进行了大量的文献和专利检索工作,寻找靶向各种GABA受体的化合物,结果在一篇尚未发表的文献报告里发现了几种符合他要求的小分子,他也和《科学》(Science)杂志分享了这篇文献。alpha2和alpha3这两种靶向GABAA亚型受体的化合物是最有希望获得成功的,其它一些候选分子因为存在类似于酒精中毒一样的毒副作用而落选。

Gregg Homanics是美国匹兹堡大学(University of Pittsburgh)的一名酒精研究人员,他不相信有这样一种物质能够模拟出酒精具备的所有正向效应。他表示,你也许能够找到一种让你感觉不错的药物,但那种感觉能够跟饮酒之后的感觉一样吗?他对此持怀疑态度。德国柏林Charité大学医学院(Charité University Medicine Berlin)的药物成瘾研究专家Andreas Heinz也提醒道:"这些药物可能还会带来其它问题。它们也有可能具备成瘾性,或者对一小部分人群有害。像酒精这种东西有一个好处,那就是我们非常了解它们,已经使用了成百上千年,我们知道它的危害有多大。"

"你也许能够找到一种让你感觉不错的药物。但那种感觉能够跟饮酒之后的感觉一样吗?我对此表示怀疑。"

——美国匹兹堡大学酒精研究人员Gregg Homanics

Nutt在BBC电台发表的那番言论也为他吸引来了一些投资人,其中就包括乌克兰的啤酒商和美国的对冲基金。专门提供技术转化服务的Imperial Innovations公司也在与Nutt接触,

希望Nutt的研究工作能够继续深入开展下去。 Nutt也表示,他们现在有足够的资本支持这种 酒精替代品上市。事实上,他们计划在一年之 内推出第一款鸡尾酒产品。 不过再好的酒精替代品也有它自身需要面对的问题。比如Spanagel就认为,很多人都不会因为有了替代品就抛弃饮用了多年的啤酒、红酒及威士忌等传统饮品。Rehm也认为这会引发大量有关政治及管理法令的讨论。他说道: "我们应该如何看待这些新产品?我们能够随便在超市里买到这些产品吗?还是应该

到药店里去买?整个社会能够接受这些产品吗?"

Rehm还补充了一点,不论最终的结果如何,Nutt提出的这种更安全饮品的观念已经让人们对酒精有了一种新的态度。Rehm说道: "这种观念刺激了全世界。也可以说是Nutt刺激了全世界。"

#### 原文检索:

KAI KUPFERSCHMIDT. (2014) The Dangerous Professor. Science, 343:478-481.

/ YORK/编译





# qPCR试剂与验证引物

## — 开学聚惠, 好礼相送

针对基因和miRNA表达的定量检测,GeneCopoeia专业的技术团队研发并推出一整套基于SYBR Green I 染料法的qPCR检测相关试剂。

# 活动期间,miRNA qPCR试剂 8折优惠! 基因qPCR试剂 6折优惠!

凡购买以下qPCR试剂, 累积:

○满1980元,可获得50元京东购物卡

○满3880元,可获得150元京东购物卡

○满5000元,可获得200元京东购物卡

○满10000元,可获得价值450元全能九阳豆浆机一台

○满20000元,可获得900元京东购物卡



产品名称	货号	目录价	活动价格
TOTAL A MARK TO SHOULAN	AMRT-0020	¥1380	¥1104
miRNA 逆转录试剂盒	AMRT-0050	¥3105	¥2484
miRNA qPCR Kit	AMPR-0200	¥1100	¥880
	AMPR-0600	¥3135	¥2508
	AMPR-1200	¥5940	¥4752
All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit	AOMD-Q020	¥2380	¥1904
	AOMD-Q050	¥5680	¥4544
All-in-One™ qPCR Mix	AOPR-0200	¥555	¥333
	AOPR-0600	¥1580	¥948
	AOPR-1200	¥2997	¥1800
	AORT-020	¥360	¥216
II-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit	AORT-050	¥810	¥486

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

#### 现货qPCR验证引物**促销中**

# 一次性购买基因qPCR验证引物10对以上,6折优惠 All-in-One™ qPCR引物 人、小鼠、大鼠基因上游和下游引物的混合液 All-in-One™ qPCR内参引物 人、小鼠、大鼠各3个持家基因的qPCR引物 同时购买同种miRNA的qPCR验证引物,第2、3、4...条半价 All-in-One™ miRNA qPCR引物 人、小鼠、大鼠特异的miRNA检测上游引物 All-in-One™ miRNA qPCR内参引物 人、小鼠、大鼠snRNA U6的特异检测上游引物

以上所有现货引物均经过qPCR实验验证,提供验证报告。3个工作日内即可送货

活动时间: 2014年3月15日-2014年6月15日

#### 基因与miRNA表达量检测芯片 (qPCR arrays)

基因表达量检测阵列	Exprofile™ Cancer Gene qPCR Arrays	癌症相关基因表达量检测
<b>签囚衣</b> 込重位两件列	Exprofile™ Pathway-Focused Gene qPCR Arrays	信号通路相关基因表达量检测
miRNA表达量检测阵列	miProfile™ miRNome qPCR Arrays	全基因组miRNA表达量检测
	miProfile <sup>™</sup> Cancer miRNA qPCR Arrays	癌症相关miRNA表达量检测
	miProfile <sup>™</sup> Disease and Focus-Group miRNA qPCR Arrays	疾病或特定群组相关表达量检测
表达量检测阵列的定制服务	Custom-made Gene or miRNA qPCR Arrays	表达量检测阵列定制与qPCR检 测服务
数据分析工具	Online data analysis tool	在线分析,完全免费

#### 已发表的文章

- DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration, 2011, Nature, IF 36.101.
- miR-612 suppresses the invasive-metastatic cascade in hepatocellular carcinoma, 2013, JEM, IF 14.776.
- CUL4B promotes replication licensing by up-regulating the CDK2-CDC6 cascade, 2013, JCB, IF 9.921.

更多文章,请浏览公司网站 www.fulengen.com/tech/publication/qPCR.php

#### GeneCopoeia(复能基因)

经销商:

Tel: 4006-020-200 020-32068595

Email: sales@fulengen.com

Web: www.genecopoeia.com.cn





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



# 聆听热闹的蝈蝈鸡尾酒会



纺织娘

当夜幕降临到马来西亚的热带雨林时,唧唧喳喳的雄性纺织娘(蝈蝈,Mecopoda)的合唱才刚刚开始,它们正在为每晚必备的音乐会暖场,以向蝈蝈女士们展开热烈的追求攻势。与其它单打独斗的雄性不同,这群夜间求

爱者喜欢同时发声,形成合唱。这就产生了一个问题:众多的蝈蝈"男"之间如何能够让彼此唱得合拍呢?这可并非易事。因为它们身边都是与其亲缘关系非常相近的蝈蝈兄弟,每只蝈蝈都必须得在同胞产生的喧闹夜曲背景下进

行相互协调,这就显得尤为困难了。来自奥地利格拉茨大学(Karl-Franzens University)的Manfred Hartbauer解释说,这种蝈蝈所使用的声学信号与周边同类(鸣唱纺织娘)的频谱几乎相同(2-80kHz),却能在正在唱响的歌曲串烧中发出属于自己的信号,这实在令人激动。而他们的问题是:这些鸣唱的蝈蝈怎么能够在如此嘈杂的噪音掩蔽下,建立同步性的合唱呢?于是,Hartbauer决定与同事Heiner Römer和博士生Marian Siegert合作,揭示问题的答案。

首先,研究小组打算查明"唧唧歌手"蝈蝈是否确实能够在颤音掩蔽的环境下进行同步性的鸣唱。为此,他们把一位"唧唧歌手"的鸣唱声记录下来,回放给单独隔离的雄性蝈蝈听。而当雄蝈蝈加入这个周期性信号中并与其进行同步鸣唱时,Hartbauer和Siegert就马上放出颤音音带,并逐渐增加其音量,直到雄蝈蝈中也无法与回放的录音同步合音为止。Hartbauer告诉我们,实验表明,蝈蝈能够忍受很高的噪音水平。因为在播放比同种纺织娘信号的音量还要高8 dB的颤音时,所有参与测试的雄性蝈蝈仍能达到同步性的鸣唱效果。

那么,它们怎么能如此精准地完成合唱呢?研究小组将蝈蝈的鸣唱和颤音进行了比较,结果发现了其中的不寻常之处。Hartbauer回忆说,蝈蝈的鸣唱含有部分非常强劲的频率(2 kHz),而颤音则不存在这一情况。这个现象似乎很不寻常,因为他们知道,到目前为止,人类所了解的大多数蝈蝈的

全部听觉神经元都只能接收10 kHz以上的声频。那么,这些蝈蝈能监听到2 kHz吗?答案是肯定的。当两位研究者将这部分的频率掩蔽之后,那些蝈蝈"男"就无法"同声合唱"了,这就是雄性蝈蝈能够监听到低频音波的充分证明。

接着,两位研究者继续观察,看蝈蝈体 内的T状听觉神经元(TN1)在噪音背景下是 否参与监听同类的鸣唱。为此, Hartbauer 和 Siegert先将微小的钩形电极仔细地插入蝈蝈 的颈部,以在蝈蝈鸣唱时观测其TN1神经元的 神经活动。然后,再观测TN1神经元是否能够 监听到低频音,为此他们将蝈蝈暴露在2 kHz 的纯音环境中。可结果出乎他们的意料,神经 元的监听阈值非常高,这意味着纯音必须达到 很大的音量,才能诱导TN1神经元细胞产生反 应。然而,Hartbauer告诉我们,只要他们播 放屏蔽噪音,这个阈值就下降了大约10 dB。 这个研究结果令人非常惊讶, 因为在正常情况 下,如果你播放噪音源,那就必须增加信号强 度才能诱导听觉神经元发生反应。但在蝈蝈之 中,却是反其道而行之。对此, Hartbauer表 示,这确实是一个令人兴奋的消息,它意味 着,如果蝈蝈的周围有一只异种雄性存在,那 么这种特殊的能力就能赋予"唧唧歌手"一 耳之力, 使之神不知鬼不觉地通过2 kHz音频 监听到具有种族特异性的信号。总之, 蝈蝈在 夜间丛林中举办鸡尾酒会, 确实是有助于鸣唱 中的它们相互交流,而非阻碍。

#### 原文检索:

Siegert, M. E., R mer, H. and Hartbauer, M. (2013). Maintaining acoustic communication at a cocktail party: heterospecific masking noise improves signal detection through frequency separation. J. *Exp. Biol.* 216, 4655-4665.

文佳/编译

## 应激下的生存



如果你的身边有一头野兽正对你虎视眈 耽, 盘算着"马上有美食", 那么恐怕最冷静 的人也会毫无疑问地压力顿生吧——毕竟谁也 不想被吃掉啊。虽然这种应激会随之产生诸多 不利影响,但在面对一头饥饿的野兽时,就意 味着生死抉择。而且,人们还认为应激会产生 著名的"打还是逃"的本能反应。不过,近年 来的研究结果认为,很难证明动物的应激反应 与行为变化有直接关系,而且在某些动物中, 应激反应似乎与行为反应并不同步。那么,它 们之间到底有没有联系呢? 应激反应对动物的 生存又起何等作用?来自加拿大戴尔豪西大学 (Dalhousie University) 的Shelley Adamo决 定一探究竟。考虑到某些动物的应激反应可能 会非常复杂, 所以他们选择对这方面相对简单 的蟋蟀进行研究,目的是观察它们的应激反应

首先,Adamo在大学本科生llya Kovalko和Brianna Mosher的协助下,让蟋蟀在一个没有任何威胁的十字形迷宫里逛荡。迷宫的其中两条分支通道上方覆有黑色的板盖,充当保护区域。然后,研究小组记录下蟋蟀分别在敞

是否会导致其行为的变化。

开区域和保护区域所待的时间。

接下来,研究小组计划给蟋蟀小伙伴们进行一次诱导应激反应的实验。为此,三名研究者将部分蟋蟀暴露在一个会移动的机器玩具仓鼠面前,用以模拟潜在的天敌。同时,他们还给另一部分蟋蟀注射酚乙醇胺(octopamine)——一种非常类似于去甲肾上腺素(noradrenaline)的可导致应激反应发生的化学物质。接着,研究小组将这些受过处理的蟋蟀放回到十字形迷宫中,结果发现,不管是此前曾被移动机器仓鼠诱导产生紧张的蟋蟀,还是接受过酚乙醇胺注射的蟋蟀,它们躲在保护区域的时间都比未接受应激处理之前要长。可见,应激反应对蟋蟀的行为产生了一定的影响。

 的蟋蟀小伙伴们在面对可怕的天敌时,往往僵在了开放区域,结果反倒成为了饥饿的鬃狮蜥的首选目标。这是多么直观的反面教材啊!所

以,有时压力感是很有用的,作为生物,谁都 不能忽视这一点!

#### 原文检索:

Adamo, S. A., Kovalko, I. and Mosher, B. (2013). The behavioural effects of predator-induced stress responses in the cricket (Gryllus texensis): the upside of the stress response. J. Exp. Biol. 216, 4608-4614.

文佳/编译





# 慢病毒完整解决方案



40,000个现货克隆,即选即包,完全免费!



ORF表达克隆的病毒低至8000元;miRNA、shRNA 克隆的病毒低至3000元!



滴度高达1010copies/mL!



最快20个工作日内送货!



已发表几十篇高分文章,详情见官网。

注: 以上荧光图为真实实验结果图



请致电(020)32051255

www.LifeOmics.com