

# “混合方法”演奏结构“交响乐”

## 生物学家用新方法了解细胞动态与功能

与其他结构生物学家一样,Eva Nogales 赶上了好时机。这位美国加州大学伯克利分校的教员现在可以利用新工具,解决几年前根本无法解答的细胞分子机制问题。

最近,Nogales 和同事、分子生物学家、CRISPR-Cas9 的联合发明人 Jennifer Doudna 的合作项目正是个好例子。她们都对 R 环十分感兴趣。很多情况下,在 DNA 被 CRISPR-Cas9 剪切前,细胞内会形成一个由核苷酸构成的 R 环。Nogales 等人对化脓性链球菌中的 R 环进行了成像,得到了近原子分辨率的结构图像,提示了 Cas9 酶在特定位点如何打开 DNA,并使其可用于 CRISPR 的分子剪刀。

这项工作最突出的是科学家能快速地将其功能与结构联系起来,而且他们能把成像方法结合起来。一个多世纪以来,结构生物学的首选方法一直是 X 射线晶体衍射法。但有些生物分子太大或太小,难以结晶,因此不能采用 X 射线法。而且,一些分子在发挥功能时,会发生形态或朝向的变化,而结晶法无法捕捉这些变化。

现在,科学家拥有一个庞大的成像工具箱。低温电子显微镜或化学家的核磁共振(NMR)成像等方法,都能在不结晶的情况下,获得接近原子分辨率的结构图像,从而揭示分子的形状、大小和方向。但并非所有方法对活细胞内的全部蛋白质、核酸都有用。

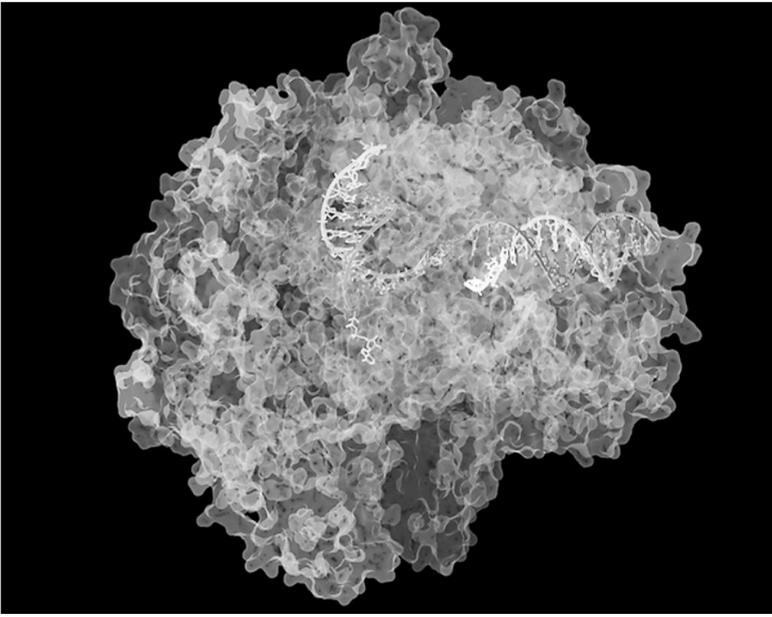
经验证明,没有一个单一的方法足以探讨细胞中发生的动态行为和复杂的相互作用。最好的解决办法是整合来自多个工具的图像。

这种方法得到了诸多追随者。斯坦福大学结构生物学家 Roger Kornberg 指出,每个方法都能提供一些重要信息,结合起来,就能实现 1+1>2 的效果。由于在揭示基因转录机制方面的贡献,Kornberg 于 2006 年获得了诺贝尔化学奖。对于这一突破性研究,他使用的是 X 射线晶体衍射法。现在,和其他晶体学家一样,他开始使用多种方法的结合。

Kornberg 继续分析 RNA 聚合酶 II,但现在他把冷冻电镜和晶体学技术结合起来。与晶体技术相比,冷冻电镜可用于不易结晶的生物分子,并且能解析较大的分子,但目前分辨率则稍逊一筹。Kornberg 实验室还使用化学交联和质谱法,揭示邻近蛋白质之间的关系以及利用已知蛋白质信息进行同源性质建模。

同时,Nogales 和 Doudna 团队也使用混合方法研究 R 环。Nogales 表示,“高分辨率的 X 射线晶体法无法解析完整的 R 环结构。”所以他们用冷冻电镜在低分辨率上对完整的结构进行解析。只有把两者结合起来,研究人员才能真正揭示 CRISPR-Cas9 中 R 环的作用。

这种混合或综合性方法有助于研究人员深入研究基础科学问题,对药物开发者也非常有用。细胞膜上的大蛋白质往往是治疗靶标,高分辨率混合方法能揭示药物与受体相互作用的原子细节。同样,展示艾滋病病毒、埃博拉病毒和其他病原体的包膜蛋白与免疫细胞相互作用机制有助于疫苗发展。纳什维尔范德堡大学结构生物学家 Jens Meiler 表示,



RNA 聚合酶

图片来源:美国斯坦福大学

这些结构对人们理解免疫系统的工作机制非常重要。

Nogales 总结道:“这是混合方法的黄金时代。”

### 梦想成真

德国欧洲分子生物学实验室(EMBL)细胞生物和生物物理部主任 Jan Ellenberg 表示,这个时代对很多生命科学家来说是梦想成真的时代。这个梦想是从原子层面无缝衔接到细胞层面。针对细胞大分子的深入理解自然能解答结构生物学的首要问题:一个分子的结构是怎么和其功能联系在一起的?

结构生物学家工具箱中的每种技术都提供了不同的视角。生物学家相信,使用混合方法构建的模型可以准确地反映分子或复合体在细胞中的行为。Meiler 说:“你需要把这些技术结合起来,才能得到全面答案。”

X 射线晶体衍射一直是确定蛋白质原子结构的标准方法。在成立于 1971 年的蛋白质数据银行拥有的大约 12 万个模型中,约有 90%来自晶体学研究。

不过,对于结构生物学家而言,该技术虽然分辨率高,但也有局限性。首先,样品要高度纯化,以产生有序的晶体。科学家通过分析原子如何散射光确定分子结构。该技术需要有足够的原子,以产生可测量的衍射图案,并且每一个晶体必须是静态的。因此,该方法不能揭示一个分子是如何运动以及如何起作用的,也不能揭示

它如何与其他系统互动。

德国复杂系统研究所计算结构生物学小组组长 Gunnar Schroder 指出,蛋白质不仅是一个单一的静态结构,“通常情况下,你看到的是整个蛋白质如何工作”。Schroder 使用混合方法理解蛋白的行为和彼此间的联系。晶体技术能提供蛋白在脱离正常环境时的快照。但结构生物学家需要其他方法补充晶体结构信息,并提高他们对蛋白质形态和功能理解。

此外,许多蛋白质,例如细胞膜上的药物靶点,是灵活而不稳定的。为了让这些蛋白质形成晶体,研究人员经常要在某种程度上改变它们。Meiler 指出,改变样本可能无法准确反映分子的原生态及其在细胞内的排布方式。他把实验和计算方法结合,以便更好地理解分子结构。“晶体法是很好的初始方法,但这个方法不足以提供功能方面的信息。”他说。

### 帮个小忙

Nogales 等人使用的混合策略达到了 10 埃的整体分辨率,相比于以往分析的 30 埃分辨率是极大的进步。分辨率的提高带来了新视角,正如 Nogales 所说,“我们可以看到氨基酸与 DNA 的相互作用”。

但冷冻电镜要求标本被冰冻。这并不理想,因为冷冻的样本远远脱离了自身动态、天然的状态。而核磁共振光谱可以解决这个问题。Schroder 表示,“核磁共振有一个很大的优势,

你可以在室温下观察样本,获得蛋白质的动态信息。”他的实验室通过整合 NMR、冷冻电镜和晶体学数据建立了实验模型。

NMR 于 20 世纪 40 年代被首次应用到实验中。研究人员在外部磁场中激发原子得到大分子结构。当原子恢复后,其内部磁场的变化可以被检测到,从而反映出分子的原子结构。然而,核磁共振光谱只适用于相对较小的大分子或复合体。

结构生物学家也使用混合方法解析超大复合体——这是过去无法完成的任务。Kornberg 最新的成果进一步拓展了其对 RNA 聚合酶 II 的研究,并使用混合方法描述了一个由 50 多个蛋白质和转录因子组成的巨大复合体。“通过多个方法的结合,他们首次看到了整个复合体。每个方法的贡献同样大。”他说。

### 仍有缺点

虽然不同的方法能带来更多信息,但混合也会造成错误的叠加。因此,混合方法的一个潜在问题是,多个错误来源造成的误差增加。Meiler 指出:“我关注的是如何在整合方法的同时减小误差,保证得到的模型具有准确性、精度和可靠性。”

另一个障碍是多类数据集的共享和利用。任何一个技术都能得到丰富的信息,因此信息共享是个挑战。冷冻电镜生产商 FEI 公司的首席科学家 Jeffrey Lengyel 表示,“每天都能生成百万兆字节的数据”。他希望,结构生物学领域可以向高通量的遗传生物学领域学习处理数据超载的方法。虽然有能灵活结合高分辨率晶体结构数据和冷冻电镜图的软件,但其他方法得到的数据无法简单地混合。例如,电子顺磁共振光谱测量高分子的距离和方向,而冷冻电镜有密度图。虽然这两种数据结合在一起一起非常有用,但这两种数据语言并不相同。Meiler 提出疑问,“我如何整合这些数据,如何分享?”

为了探讨数据组织、共享和使用的最佳方式,几十名结构生物学家于 2014 年 10 月齐聚英国欧洲生物信息研究所。Schroder 表示,目前,PDB 存储单个蛋白结构的数据,并应该增加蛋白质所有方面的数据。细节越丰富,越有助于全面解析蛋白和大分子功能。

学界已经作出了一些努力:目前已建立二维电子显微镜图像档案库和三维的 EMDData-Bank。这些档案库由 EMBL 等机构提供资金,其中包含的数据可以共享、归档和分发。

另一个可能阻碍该领域的威胁是专业知识。Meiler 指出,“技术需要投资,但在培训科学家方面进行投入也非常重要。”他建议,结构生物学领域的学生都去学习每一种方法的优缺点,并至少精通一种方法。“我们需要培养新一代科学家理解如何整合这些不同的技术。”

最后,结构生物学家必须学会提问题,提出新的、复杂的,以前被认为不可能的生物问题。Ellenberg 还表示,多亏混合方法,“很多 5 年前我甚至以为直到退休都没法探索的问题已能解决了”。(张章)

## 科学线人

全球科技政策新闻与解析

## 南非学者警告 大学系统面临崩溃



学生抗议学费上涨,而教师警告资金危机。

图片来源:Nic Bothma/EPA

超过 1200 名南非教师警告,由于连续多年经费不足,该国高校系统正处于崩溃的边缘。

来自南非 18 所大学的研究生人员在写给总统 Jacob Zuma、高等教育和培训部长 Blade Nzimande 以及财政部长 Pravin Gordhan 的一封公开信上签名。

这封信于 8 月 11 日发出,并于 8 月 15 日发表于《邮卫报》上,它呼吁政府解决高等教育的“资金危机”。

“大学的核心功能受到了威胁。”该公开信写道,“我们已经走到了极限。我们简直难以预测任何进一步的经费削减会让大学教育处于怎样的危险之中。”

这封信发表的背景是学生抗议学费不断上涨、紧张的大学资源以及政府对免费本科教育的探究(批评人士认为这是南非负担不起的)。该国现处于财政紧缩状态,今年经济增长预测为 0%。

因为学生抗议学费增长 6.3% 的提议,已经导致夸祖鲁-纳塔尔大学和马古苏托理工大学在本月初停课。

“我们正处于一个临界点上。如果现有轨迹持续下去,而国家不加以干涉,那么我们将会看到一段时期的经费紧缩,这将会破坏我们的公立大学。”约翰内斯堡金山大学历史学家 Noor Nief-tagodien 说。

作为对学校经费削减的回应,他和该校社会科学学院的同事 Kelly Gillespie 协调了这封公开信,他们希望得到更广泛的学界人士响应。“学术人员倾向于以他们的机构为基础对这些问题作出回应,我们希望可以不分机构、地区和学科,让尽可能多的学术人员参与其中。”

南非的大学系统由政府津贴、学生学费、研究合同以及投资共同资助。最新数据表明,其 2014 年的花费为 606 亿兰特,相当于 43 亿美元。

但是政府资助的部分 10 年来却在稳步下滑,而学生人数在过去 22 年间却从 360250 人增长到 983698 人,为原来的 3 倍。2009 年,政府拨款覆盖了大约 49% 的高校收入,但在 2009 年却下降到了 40%。(冯维维)

## 美 NIH 科研诚信部门起纷争



科研诚信办公室新任 Kathryn Partin 与员工发生了冲突。图片来源:William A. Cotton

美国马里兰州罗克维尔市科研诚信办公室(ORI)负责监管生物医学研究领域的科研不端行为,通常该机构会因其发现吸引公众注意力,而不是因为内部的工作问题。但是两年前,该办公室主任 David Wright 一怒之下决定辞职,指责 ORI 被功能失调的官僚主义搞得蹒跚难行。现在,他的继任者也碰到了难题。

Kathryn Partin 在 2015 年 12 月接管 ORI,曾对该办公室发起了一场自上而下的审查,因为该办公室被指责行动迟缓,且相关制裁“没有牙齿”。她还从国家科学基金会(NSF)请来了一位研究员担任她的副手,这一举措可能意味着她希望扩大 ORI 的权力,效仿 NSF 监察长办公室的科研诚信部门,例如可以发出传票。

但是在写给 Partin 的上级管理部门卫生与公众服务部(HHS)的若干封抗议信的一封信中,ORI 的很多研究人员近期对她所采取的“语气和导向”表达了“深深的担忧”。他们认为 Partin 并未充分理解 ORI 的权限,并且不合理地设法替换掉 ORI 的两位部门主任,他们的离职将会是一场“灾难”。John Dahlberg 在去年退休之前担任 ORI 的副主任,他表示自己原来的办公室“似乎即将崩溃”。

很难说这场纷争是否超越了新老板挑战不愿改变的旧部下的范畴。Partin 及其上级拒绝对此员工骚动以及革新计划作出评论。“我们正在聚焦审查办公室的所有程序,以及支持研究机构开展调查的所有方式。”这位原神经科学家在接管该办公室后首次接受《科学》杂志采访时说。

ORI 创建于 24 年前,旨在监管由国立卫生研究院(NIH)和其他 HHS 机构资助的科学家发生的科研不端行为。(晋楠)

# 人类世亟需一颗“金钉子”

## 原子弹和油气依赖预示地球新时代



1951 年开始在土壤中发现的来自原子能武器测试的铯,可以作为人类世的标志。

他和其他地层学家怀疑,他们的标准可能适用于沉积数十年的淤泥和泥沙,而不适用于记录更古老地层分界的固体岩石。他们质疑人类世应在 7000 年前开始,当时人类开始将森林大规模变为牧场和耕地,可能导致二氧化碳急剧增长;一些人支持将起点定为 3000 年前,当时冶炼污染了大地;一些人则投票认为时间应该定得更近一些,即 1610 年,当时来自新世界的花粉被带到欧洲;还有人认为应该是 19 世纪初,工业革命开始之时。但是绝大多数投票都支持“高加速度”。

该团队将人类世的开端定为距今如此近的时间,这让弗吉尼亚大学环境科学家、名誉教授 Bill Ruddiman 感到沮丧。“将这个词汇正式确定为单一的时间点是错误的。”他说,“尤其是这一时间错过了地球表面大多数重要的过渡期。”很多考古学家也支持距今 7000 年的提法,当时早期人类开始改变地表特征。但是工作组在寻找全球性的标志,即人类导致的变化可能对岩石记录产生的影响,而不是人类对某一地区地表的首个影响。

该工作组由 35 名地质学家、气候学家、考古学家以及其他领域的专家组成,他们考虑了人类世不同的时间开端。一些人投票支持人类世应从 7000 年前开始,当时人类开始将森林大规模变为牧场和耕地,可能导致二氧化碳急剧增长;一些人支持将起点定为 3000 年前,当时冶炼污染了大地;一些人则投票认为时间应该定得更近一些,即 1610 年,当时来自新世界的花粉被带到欧洲;还有人认为应该是 19 世纪初,工业革命开始之时。但是绝大多数投票都支持“高加速度”。

但到今年为止,该工作组尚未找到一颗真正的金钉子。但他们依然支持给人类世的开端下定义,地层学家仅将这种方法用于前寒武纪(超过 5.4 亿年)时段内的时间单位,因为当时很难发现岩石中的分界信息。但是包括 Finney 在内的若干 ICS 成员明确指出,若想人类世开端获得批准,必须找到一颗金钉子。该工作组当前的提议并没有让他满意。但是 Waters 希望,ICS 可以根据事情本身的特点,对他们选择的金钉子作出考虑。“因为它很薄、持续时间很短,而且它可以说范围相当大,这是最重要的。”他说。(晋楠)

第二次世界大战结束后,随着原子弹热潮冷却,人类对煤炭和石油的渴望已经发展到完全“成瘾”的地步,地球随之进入了人类世——人类造成的环境效应在全球沉积层留下标记的一个新地质时期。这是人类世工作组的主要结论,该工作组的研究人员在过去 7 年默默研究了这个问题,是否应被提交为地质时期上的一个正式跨度。

经过 8 月份的计数投票,该工作组已经决定提议将 20 世纪 40 年代末期和 50 年代早期的战后繁荣作为人类世的开端。该工作组将向监管地质年代的机构——国际地层委员会(ICS)提出申请,将人类世论证为一个时代的系列地层,就像在此之前的全新世和更新世那样。人类世工作组秘书长、英国地质调查局地质学家 Colin Waters 近日将在南非开普敦举行的国际地质学大会上公布该工作组的建议。

该工作组将不会递交一份正式的提议。要这样做,它必须收集全球沉积层的大量岩芯,证明它们含有地质学轨迹上的明显转折,这样的轨迹很可能会成为岩石记录的永久部分,而这一转折时期的最佳岩芯标本将被看作是标志着人类世开始的“金钉子”。这些岩芯可能来自湖床、海底、冰盖,乃至珊瑚或树轮。但是它们必须具备“高加速度”的特征:即二战后化石能源燃烧迅速崛起,英国莱斯特大学地质学家、该工作组召集人 Jan Zalasiewicz 说:“我们打算开始行动,动手实践,探查那些能够正式提议作为金钉子的地层。”

因为人类世的提议面临地层学家的深度质疑,所以这些地层将需要各种极为丰富的标签。“ICS 的投票者将会以批判的眼光看待这些东西。”ICS 主席、美国加州大学长滩分校地质学家 Stan Finney 说。