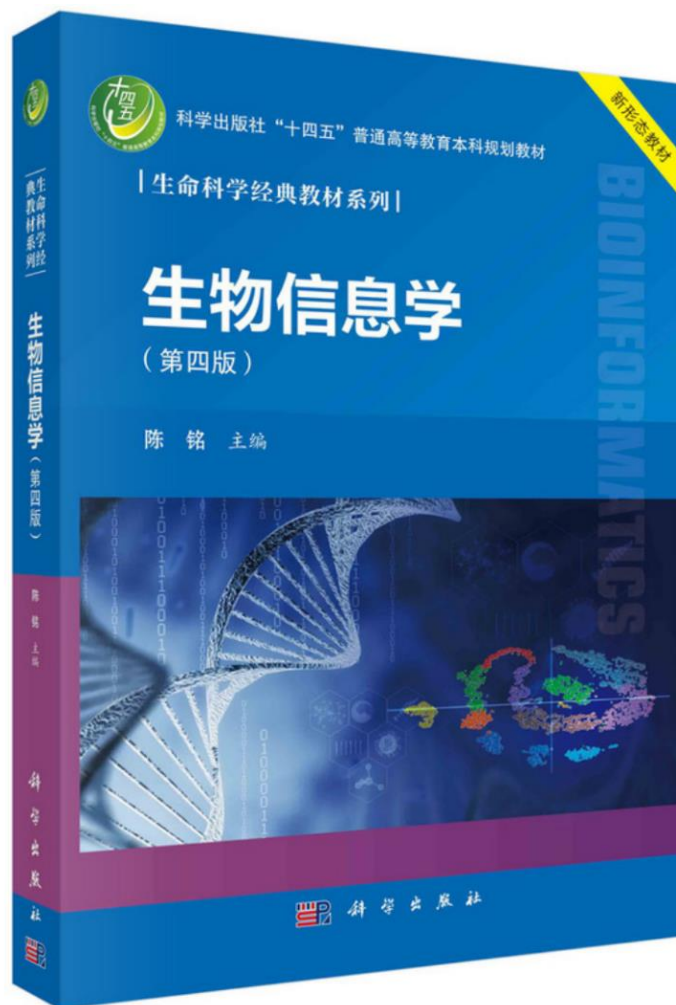


课程学习笔记

之

《生物信息学》

(第四版 陈铭主编 科学出版社)



第一版

毕夏安

(如有改进或者建议, [请发到邮箱 bixiaan@hnu.edu.cn](mailto:bixiaan@hnu.edu.cn))

2022年5月4日

目 录

第一章 生物信息学的概念及发展历史	6
第一节 生物信息学的发展历史	6
第二节 生物信息学的研究领域	9
第三节 生物信息学的主要应用	12
第四节 生物信息学面临的挑战	21
第二章 生物学数据库及其检索	24
第一节 生物学数据库简介	24
第二节 生物学数据库的数据存储格式	30
第三节 生物学数据库的检索	37
第三章 序列比对原理	49
第一节 序列比对相关概念	49
第二节 序列比对打分方法	54
第三节 序列比对算法	59
第四节 序列比对工具	61
第五节 多序列比对	65
第四章 蛋白质结构预测与分析	71
第一节 蛋白质结构组织层次	71
第二节 蛋白质结构的测定与理论预测	79
第三节 蛋白质对接	99
第四节 蛋白质折叠与疾病	102
第五章 基因组学	110

第一节 生物信息学的发展历史	110
第二节 蛋白质编码基因的注释	114
第三节 RNA 基因的注释	119
第四节 重复序列的注释	120
第五节 假基因的注释	123
第六节 案例分析：黄瓜基因组的注释	123
第六章 转录组学	132
第一节 转录组学概述	132
第二节 试验设计和测序流程	136
第三节 转录组数据核心分析	139
第四节 功能分析	146
第五节 RNA-seq 数据分析案例	154
第七章 非编码 RNA	159
第一节 非编码 RNA 概述	159
第二节 非编码 RNA 的分类	163
第三节 microRNA	168
第四节 lncRNA	172
第五节 circRNA	176
第六节 其他小分子 RNA	181
第八章 蛋白质组学	187
第一节 蛋白质组学概述	187
第二节 蛋白质的大规模分离鉴定技术	189

第三节 蛋白质的翻译后修饰	197
第四节 蛋白质分选	198
第五节 蛋白质相互作用	200
第九章 系统生物学	210
第一节 系统生物学基本概念	210
第二节 复杂网络及特征	214
第三节 系统生物学基本技术与方法	219
第四节 基因表达调控网络	224
第五节 代谢网络	224
第六节 信号转导途径	226
第七节 蛋白质蛋白质相互作用网络	232
第八节 虚拟细胞	237
第九节 生物学网络的构建、分析与可视化	238
第十章 合成生物学	245
第一节 合成生物学	245
第二节 合成生物学基础研究经典实例	249
第三节 合成生物学应用研究经典实例	254
第十一章 分子进化与系统发育	260
第一节 分子进化与系统发育	260
第二节 分子系统发育树的构建方法	266
第三节 系统发育树构建及应用	273
第十二章 统计学习与推理	292

第一节 统计学习与推理基础	292
第二节 统计模型与参数推断	297
第三节 聚类分析、主成分分析与 Fisher 判别	299
第四节 贝叶斯推理	305
第五节 隐马尔可夫模型	306
第六节 动态神经网络	310
第七节 深度学习	313
第八节 支持向量机	322
第九节 MATLAB 的应用实例	326
第十三章 生物信息学编程基础	327
第一节 Linux 操作系统	327
第二节 生物信息学中的编程语言	339
第三节 SQL 及数据库编程	355
第四节 并行计算	361
第十四章 新一代测序技术及其应用	366
第一节 测序技术概述	366
第二节 第二代测序原理	369
第三节 第二代测序技术的应用	376
第四节 生物信息学在第二代测序中的应用	380
第五节 生物信息学新技术与发展趋势	385

第一章 生物信息学的概念及发展历史

第一节 生物信息学的发展历史

目前，绝大部分的核酸和蛋白质数据库由美国、欧洲及日本的三家数据库系统产生，它们共同组成了 GenBank/ENA/DDBJ 国际核酸序列数据库，每天交换数据，同步更新。其他一些国家，如德国、法国、意大利、瑞士、澳大利亚、丹麦和以色列等，在分享网络共享资源的同时，也分别建有自己的生物信息学机构、次级或者衍生的具有各自特色的专业数据库及自己的分析技术，服务于本国生物医学研究和开发，有些服务也开放于全世界。

国内对生物信息学领域的研究也越来越重视，自北京大学于 1996 年建立了国内第一个生物信息学网络服务器以来，我国生物信息学的研究得到蓬勃发展。较早开展生物信息学研究的单位主要有：北京大学、清华大学、浙江大学、中国科学院生物物理研究所、中国科学院上海生命科学研究院、中国科学院遗传与发育生物学研究所等。北京大学、天津大学分别于 1997 年、1998 年成立了生物信息学中心，中国科学院上海生命科学研究院也于 2000 年 3 月成立了生物信息学中心。如今，生命科学的基础研究与技术开发对生物信息学的科研与人才需求越发迫切，越来越多的高等院校、科研单位开展了生物信息学教育和科研工作，少数如哈尔滨医科大学专门设置了生物信息学学院，越来越多的生物信息学技术服务机构或公司也提供了相应的科技服务。

下表列出了生命科学、计算机科学及生物信息学大事记，从中可

以看出其发展进程及中国的贡献。

生命科学	年份	计算机科学
	1642	Blaise Pascal 发明机械计算器
Robert Hooke 在其著作中描述了细胞结构	1665	
John Ray 提出了物种分类	1686	
	1858	电报
达尔文的《物种起源》出版	1859	
孟德尔遗传定律提出	1865	
Nirenberg 和 Khorana 破译了遗传密码字典的全部 64 个三联体密码子	1966	美国计算机协会设立图灵奖
首次分离得到 DNA	1869	
	1876	电话
Walter Flemming 观察到有丝分裂	1879	
确认孟德尔遗传定律	1900	
疾病可以有序遗传；遗传的染色体理论	1902	
术语“基因”的出现	1909	
染色体理论在果蝇中得到验证	1911	
Alfred H. Sturtevant 绘制了第一张遗传连锁图谱	1913	
“一个基因一个酶”假说	1941	
DNA 的 X 射线衍射	1943	第一台电子管计算机 ENIAC 研发并于 1946 年诞生
DNA 可以改造细胞的特性；跳跃基因的发现	1944	
O. T. Avery 证明 DNA 是遗传物质	1944	
	1945	第一个计算机 Bug
Lederberg 和 Tatum 证实了遗传重组现象	1946	
发现 DNA 配对法则	1952	第一个编译器的发明
Francis Crick、James Watson 和 Maurice Wilkins 发现 DNA 的双螺旋结构	1953	
人类 46 条染色体的确定；DNA 聚合酶的发现；第一个蛋白质序列（牛胰胰岛素）被测定	1955	
血红蛋白的一个氨基酸改变可以导致镰状细胞贫血	1956	
DNA 的半保留复制	1958	中国第一台电子管计算机诞生
染色体异常致病被发现	1959	
	1960	计算机 COBOL 处理电话交换

生命科学	年份	计算机科学
mRNA 将信息从细胞核内传递到细胞质	1961	
	1963	美国信息互换标准代码 (ASCII); 鼠标
	1964	BASIC 语言
中国人工合成牛胰岛素结晶; Margaret Dakley Daghoff 收集蛋白质序列, 并在随后一年提出 PAM 模型	1965	
发现第一个限制酶	1968	
	1969	UNIX 操作系统
	1970	Needleman-Wunsch 序列比对 算法
	1971	个人电脑
第一个重组 DNA	1972	C 语言
第一个动物基因被克隆	1973	文件传输协议 (FTP) 出现
DNA 测序工作的开启	1975	微软公司成立
第一个遗传工程公司成立	1976	苹果公司成立
Sanger 研究小组完成了第一个噬菌体全基因组的测 序; 内含子的发现	1977	
	1978	第一个电子布告栏系统 (BBS) 的出现
	1979	新闻组 (Newsgroup) 的出现
中国实现酵母丙氨酸转移核糖核酸的人工合成	1981	第一个计算机病毒 Eld Cloner 出现; Smith-Waterman 序列比 对算法; MS-DOS 1.0 发布
	1982	Sun 公司推出第一个工作站 Sun 100; 英特尔 80286 处理器
	1983	微软 Windows 系统命名
	1984	互联网节点数超过 1000 个
Kary Mullis 创立 PCR 技术; 生物信息学专业期刊 (CABIOS) 创刊; 德国生物信息学会议 (GCB) 举行	1985	Bjarne Stroustrup 创建 C++ 语言
日本核酸序列数据库 DDBJ 诞生; 蛋白质数据库 Swiss-Prot 建立; 中国开始实施 “863 计划”	1986	标准通用置标语言 (SGML) ISO 标准公布
	1987	Perl 语言
美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 成立	1988	Pearson 实现 FASTA 程序
	1989	英特尔发布 486 处理器
国际人类基因组计划 (HGP) 启动; 第一届国际电 泳、超级计算和人类基因组会议在美国佛罗里达州 会议中心举行	1990	Altschul 实现 BLAST 程序; HTTP 1.0 标准发布
	1991	Linux 出现; Python 语言发布
欧洲生物信息学研究所 (EBI) 获准成立; 第一届 ISMB 国际会议在美国国家医学图书馆 (NLM) 举 行; HGP 新 5 年计划, 中国开始参与人类基因组 计划	1993	英特尔发布奔腾处理器
Marc Wilkins 提出蛋白质组 (proteome) 的概念; 细 菌基因组计划	1994	雅虎公司成立; Perl 5 发布
人类基因组物理图谱完成; 日本信息生物学中心 (CIB) 成立	1995	Sun 正式发布 Java; Apache HTTP 项目启动; 微软发布 Windows 95 系统

生命科学	年份	计算机科学
Affymetrix 生产商用 DNA 芯片; 北京大学蛋白质工程和植物遗传学工程国家实验室加入欧洲分子生物学网络 (EMBNet)	1996	微软发布 IE 3.0
大肠杆菌基因组测序完成; 北京大学生物信息学中心 (CBI) 成立; 中国科学院召开“DNA 芯片的现状与未来”和“生物信息学”香山会议	1997	微软发布 IE 4.0; IBM 深蓝计算机击败国际象棋世界冠军
亚太生物信息学网络 (APBioNet) 成立; 瑞士生物信息学研究所 (SIB) 成立; 美国 Celera 遗传公司成立; 线虫基因组测序完成; CABIOS 期刊更名为 <i>Bioinformatics</i> ; 中国人类基因组研究北方中心 (北京) 和南方中心 (上海) 成立	1998	W3 C 发布可扩展标记语言 XML 1.0; 微软发布 Windows 98
人类 22 号染色体序列测定完成; 中国获准加入人类基因组计划, 成为第 6 个国际人类基因组计划参与国	1999	英特尔发布奔腾 III 处理器
德国、日本等国科学家宣布基本完成人体第 21 对染色体的测序工作; 果蝇基因组测序完成; 中国科学院上海生命科学研究院生物信息中心 (SIBI) 成立	2000	微软发布 Windows 2000 和 Windows Me 简单对象访问协议 (SOAP)
美国、日本、德国、法国、英国、中国 6 国科学家和美国 Celera 公司联合公布人类基因组图谱及初步分析结果; 中国首届全国生物信息学会议 (CCB) 举行; 中国完成水稻基因组工作框架图	2001	微软发布 Windows XP Linux 内核 2.4
小鼠基因组测序完成	2002	
HGP 完成	2003	微软发布 Windows Server 2003; Linux 内核 2.6
蛋白质组学; 解码基因组; 大鼠和鸡基因组草图完成	2004	
大猩猩和狗全基因组测序完成; 人类 HapMap 项目完成	2005	
我国研制出全球首例骨髓分析生物芯片	2006	
世界首份“个人版”基因组图谱完成	2007	谷歌和 IBM 合作推动云计算
千人基因组测序计划启动; 拟南芥 1001 株系测序启动	2008	英特尔发布酷睿 i7 处理器
黄瓜、高粱和两个玉米品种的基因组测序	2009	
外显子测序	2010	我国“天河一号”成为全球运算速度最快的超级计算机; 苹果公司发布 iPad 平板电脑
体细胞重编程技术; “垃圾”DNA 得到正名	2012	
CRISPR 基因编辑技术将成为基因编辑的常用工具	2013	我国“天河二号”超越美国“Titan 号”, 再次成为全球运算速度最快的超级计算机
癌症的 CAR-T 疗法和 HIV 的 T 细胞疗法	2014	
Roadmap Epigenomics Program 发布表观基因组图谱	2015	
深圳国家基因库 CNGB 正式运营	2016	基于强化学习的 AlphaGO 程序击败围棋世界冠军; 采用国产核心处理器的“神威·太湖之光”超过“天河二号”成为世界上运算速度最快的超级计算机
人类细胞图谱计划启动; 首次合成包含两种人工碱基的生命体	2017	光子量子计算机诞生
单细胞水平细胞谱系追踪技术; 世界首例单条染色体真核细胞出现; 小麦基因组图谱历经 13 年绘制完成	2018	我国新一代“E 级超算”“天河三号”原型机首次亮相
DNA 显微镜研制成功; 新型人造 DNA 结构信息密度可加倍; 国家基因组科学数据中心 (NGDC) 成立; 国家生物信息中心挂牌成立	2019	新型类脑计算芯片——“天机芯”芯片研发成功; 中国正式进入 5G 商用元年
首张人类细胞图谱公布; CRISPR 基因编辑技术首次用于临床治疗; mRNA 疫苗首次投入使用	2020	量子计算原型机“九章”实现量子优越性; 基于深度学习的 AlphaFold 解决蛋白质折叠难题

第二节 生物信息学的研究领域

就研究面来说, 其涉及并参与生命科学各个领域的研究。

1. 分子生物学与细胞生物学

该领域以 DNA-RNA-蛋白质为对象，分析编码区和非编码区中信息结构和编码特征，以及相应的信息调节与表达规律等。由于生物功能的主要体现者是蛋白质及其生理功能，研究蛋白质的修饰加工、转运定位、结构变化、相互作用等活动将推动对基因的功能、表达和调控的理解，对细胞活动及器官、系统、整体活动的调控都很关键。

2. 生物物理学

生物物理学其实是物理学的一个分支，研究的是生物的物理形态，涉及生物能学、结构生物学、生物力学、生物控制论、电生理学等。但这方面的生物数据获取和分析也越来越依赖于计算机的应用，如模型的建立、光谱和成像数据的分析等。

3. 脑和神经科学

脑是自然界中最复杂的组织，长期以来，通过神经解剖、神经生理、神经病理和临床医学研究，获得了大量有关脑结构和功能的数据。近年来，神经生物学研究也取得了大量科研成果，但是这些研究大多是在组织、细胞和分子水平进行的，不能很好地在系统和整体水平上反映人脑活动的规律。随着核磁共振成像和正电子发射断层成像的发展，应用计算机技术，我们有可能在系统和整体水平上开创地研究人脑的功能定位、功能区之间的联系及神经递质和神经受体等。由此产生的神经信息学研究，将对我们了解脑、治疗脑和开发脑产生重大的作用。

4. 医药学

人类基因组计划的的目的之一就是找到人类基因组中的所有基因。如何筛选分离各疾病的致病基因，获得疾病的表型相关基因信息的工作才刚开始。我们需要在现有的基因测序的工作平台上，强化生物信息学平台的建设，从而加快对突发性疫情、公共卫生的监控，以及对致病源进行快速有效的分析和解决。此外，结合生物芯片数据分析，确定药物作用靶，再利用计算机技术进行合理的药物设计，将是新药开发的主要途径。

5. 农林牧渔学

基因组计划也加快了农业生物功能基因组的研究，加快了转基因动植物育种所需生物信息学研究的步伐。通过比较基因组学、表达分析和功能基因组分析识别重要基因，为培育转基因动植物、改良动植物的质量和数量性状奠定了基础。通过分析病虫害、寄生生物的信号受体和转录途径组分，进行农业化合物设计，结合化学信息学方法，鉴定可用于杀虫剂和除草剂的潜在化学成分。此外，通过此方法可以进行动植物遗传资源研究，保护生物多样性；还可以对工业发酵菌进行代谢工程的研究，有目的地控制产品的生产。

6. 分子和生态进化

另一个重要的研究对象就是分子和生态进化。通过比较不同生物基因组中各种结构成分的异同，可以大大加深我们对生物进化的认识。从各种基因结构与成分的进化、密码子使用的进化，到进化树的构建，各种理论上和实验上的课题都等待着生物信息学家的研究。

第三节 生物信息学的主要应用

一、生物信息学数据库

生物信息学很大一部分工作体现在生物数据的收集、存储、管理与提供上，包括：建立国际基本生物信息库和生物信息传输的国际联网系统；建立生物信息数据质量的评估与检测系统；生物信息工具开发和在线服务；生物信息可视化和专家系统。比较著名的与生物有关的数据资源有 NCBI、EMBL、KEGG 等。

（一）数据库建设

生物数据库的建设是进行生物信息学研究的基础，尽管目前已有许多公共数据库可供使用，如 GenBank，且它们还同时集成开发了相应的生物分析软件工具，如 NCBI 的 BLAST 系列工具 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。但我们进行专项研究时，往往需要组建新的数据库。建立自己的数据库，就必须分析数据库的储存形式和复杂程度，选择什么数据库，怎么开发信息交流平台，要不要提供相应的分析程序，甚至要不要将各搜索算法硬件化，实行并行计算、显卡处理器 (GPU) 计算和先进的内存管理以提高速度等。此外，也需要考虑架设数据库的成本。Oracle (<http://www.oracle.com>) 这类大型数据库的价格较高，而免费的 MySQL (<http://www.mysql.com>) 则可能会有功能上的缺失。目前来看，基于 UNIX 开发的共享数据库 PostgreSQL (<http://www.postgresql.org>) 较为适宜。此外，XML 类数据库亦可提供一些解决方案。

（二）数据库整合和数据挖掘

生物数据库覆盖面广，分布分散且异质。当根据一定的要求将多个数据库整合在一起提供综合服务、提供数据库的一体化和集成环境时，最简单的方法是用超级链接或进行拷贝再整理。但往往简单的链接并不能符合要求，再整理涉及数据下载和更新的问题，而且不是真正意义上的“整合”。目前使用较多的是联合数据库系统，它是 IBM 分布式数据库解决方案的重要组成部分，支持用户或应用程序在同一条 SQL 语句中查询不同数据库甚至不同数据库管理系统中的数据。也有直接基于 Internet 技术而进行远程查询，从而进行文本数据挖掘和再整理的。由于生物学的分支学科较多，整合时还需从语义学的角度考虑不同数据库的一致性问题，其实这已经成为了通过标准查询机制来连接数据库的一大阻碍，Ontology 技术可能可以解决这一问题。

二、序列分析

（一）序列比对

生物信息学最基本的操作对象是核酸序列和氨基酸序列。1955 年桑格（Frederick Sanger）完成了第一个蛋白质——牛胰岛素化学结构的测定。1977 年，他领导的研究小组再一次成功地测定了第一个噬菌体 Φ X174 全基因组 5386 个碱基对的核苷酸序列，并发明了快速测定 DNA 序列的新方法。此后，全世界生物科学研究进入了分子水平。在使用鸟枪法进行 DNA 测序时，完整的 DNA 链被打散为成千上万条长 600~800 个核苷酸的 DNA 片段，这些 DNA 片段的两端相互重叠，只有依照正确的顺序组合，才能还原为完整的 DNA 序列。对于较大的基因组，鸟枪法能够迅速地测定 DNA 片段的序列，但将它们

组装起来的工作则相当复杂。由于现今几乎所有基因序列均由鸟枪法测定，基因重组算法是信息生物学研究的重点课题。比较序列的目的是发现相似的序列，得到保守的区域，它们可能有功能、结构或进化上的关系。对于一个感兴趣的 DNA 或蛋白质序列，寻找到与它同源的序列是基本工作。目前已开发了许多的算法，其中 BLAST 或 FASTA 都是不错的算法。在此基础上开发的 PSI-BLAST 和 megaBLAST 等，针对不同情况有更好的性能。

（二）基因序列注释

越来越多的物种测序工作的开展，迫切需要全基因组的自动注释，这一直都是生物信息学的研究领域。Ensembl 是由 EBI 和 Sanger 研究院合作的一个项目，利用大型计算机根据已有的蛋白质证据来对 DNA 序列进行自动注释。自动寻找基因和调控元件的工作通常需要的步骤包括：翻译起始点和终止点的确定，潜在的阅读框、剪切位点的识别，基因结构的构建，各种反式和顺式调控元件的识别等。除此以外，转录起始位点和可变剪切体的鉴定等工作都可利用计算生物学方法从庞大的基因组数据中提取出生物学信息，把它注释并图形化显示给生物学家。

三、其他主要应用

（一）比较基因组学

各种模式生物基因组测序任务的陆续完成，为从整个基因组的角度来研究分子进化提供了条件。比较基因组学的核心课题是识别和建立不同生物体的基因或其他基因组特征的联系。利用比较基因组学方

法可以研究不同物种间的基因组结构的关系和功能。发现基因组中新的非编码功能元件是很有前途的应用。起初，真核生物中基因预测依靠概率模型预测得到，该方法的缺点是会产生很多的假阳性。通过比较不同物种间的同源基因可以大大提高预测的精度和准确度。例如，在人类基因预测上，老鼠的基因信息起到了很重要的作用。

（二）基因和蛋白质的表达分析

进入后基因组时代，高通量技术高速发展并得到广泛应用。多种生物学技术可以用于测量基因的表达，如微阵列、表达序列标签、基因表达连续分析、大规模平行信号测序、多元原位杂交法等。所有这些方法均严重依赖于环境并能产生大量高噪声的数据，而生物信息学致力于发展一套统计学工具，以从中提取有用的信息。通过蛋白质微阵列技术或高通量质谱分析对生物标本进行测量所获得的数据中，包含有大量生物标本内蛋白质的信息，生物信息学被广泛地应用于这些数据的分析。对于前者，生物信息学所面临的问题与 RNA 微阵列数据分析中遇到的问题相似；对于后者，生物信息学将所获得的大量质谱数据与通过已知蛋白质数据库预测的数据进行比较，并使用复杂的统计学方法进行进一步分析。

（三）生物芯片大规模功能表达谱的分析

生物芯片因为其具有高集成度、高并行处理能力及可自动化分析的优点，可对不同组织来源、不同细胞类型、不同生理状态的基因表达和蛋白质反应进行监测，从而获得功能表达谱。此外，生物芯片还可进行 DNA、蛋白质的快速检测及药物筛选等。由此可见，无论是

生物芯片还是蛋白质组技术的发展都更强烈地依赖于生物信息学的理论与工具。鉴于生物芯片固有的缺陷及实验重复性等问题，以及有关表达谱的分析还不很精确，仍需大量的工作来提高对斑点图像处理的能力和系统的分析。近年来，随着第二代测序技术的使用，人们已普遍运用 RNA-Seq 技术来进行大规模转录组表达谱的分析（第十四章）。

（四）蛋白质结构的预测

蛋白质结构的预测是生物信息学最重要的任务之一。蛋白质的一级结构决定其高级结构，而后者又决定着它的生物学功能，目标是通过氨基酸序列来预测出蛋白质的三维空间结构。这方面的用途在医药工业上特别突出，如药物设计、设计各种特殊用途的酶等。对于序列同源性大于 25% 的蛋白质，可以使用比较同源模建的方法预测蛋白质结构，如 SWISS-MODEL 和 Modeller 软件。对于没有合适的模板的蛋白质预测可以使用折叠识别方法。折叠识别方法尝试寻找该目标序列可能适合的已知的蛋白质三维结构。如果前两种方法都无效，则要从头预测（denovomodeling），它的缺点是计算量大、耗时，而且仅适用于长度为几十个氨基酸的蛋白质片段，因此该方法目前主要作为前两种基于模板预测法的补充。整体来看，蛋白质结构预测领域还有待发展，特别是深度学习技术的成功应用有望推动该领域进入一个新的阶段。

（五）蛋白质与蛋白质相互作用

蛋白质与蛋白质相互作用与识别是当今生命科学研究的前沿和

热点。基因的复制与转录、蛋白质的翻译与加工、免疫识别、信号传导等重要细胞生理过程都是通过蛋白质相互作用实现的。能够鉴定特定蛋白质是否相互作用的生物学实验技术有很多种，如免疫共沉淀、酵母双杂交系统、双分子荧光互补等，但这些方法无法反映出蛋白质从空间结构的角度是如何相互作用的。X 射线晶体衍射和核磁共振等结构生物学技术可以高分辨率地展示蛋白质之间在空间上是如何在结合的，但实验操作十分困难且昂贵。利用计算机技术有望基于蛋白质的各种性质，如理化性质、初级结构、三维结构等，来对蛋白质互作进行预测。其中，卷积神经网络、循环神经网络等深度学习技术已经大幅提高了蛋白质互作的预测精度，但其对训练集的依赖较大且可解释性仍有待提高。但目前来看，这方面的工作还有很长的路要走。

（六）表型组学

表型组学即通过评估生物体的形态、生理和生化特征，以及与遗传、表观遗传和环境因素的相关性，对表型进行高通量组学分析。近年来，表型组学在植物学研究中应用广泛，且被认为可能是未来粮食安全和第二次绿色革命的关键。植物表型组学是对植物生长发育、性状等的调查分析。植物表型分析则是从图像和传感器数据中提取和分析有关植物结构和功能的定量数据。这种方法可以将基因型与表型差距对应，已普遍用于植物育种、通过遗传标记预测表型等领域。一些高通量的自动化表型分析平台已被用于不同环境条件下的植物表型组学研究，有助于研究人员将多参数表型信息与遗传变异联系起来。其中，植物表型图像的识别与处理是表型组学的重点与难点。一些自

动成像分析方法可将图像信息转换为生长、生理特征，以及抗性和产量等表型测量值。基于深度学习的图像识别处理技术将会是一个重要的研究方向。

（七）生物系统模拟

生物体是个复杂的系统，整个系统可以分成多个亚系统。现在的生物学家越来越清楚地认识到网络涉及生物的方方面面，从而兴起了一个新概念——系统生物学。Leroy Hood 认为系统生物学是确定、分析和整合生物系统在遗传或环境的扰动下所有内部元件间相互作用关系的一门学科。模拟生物系统对于更好地理解生命的本质活动至关重要。细胞水平下的代谢网络、信号转导通路、基因调控网络的构建，以及分析和可视化工作都给生物信息学带来了挑战。另外，人工生命或虚拟进化的研究往往致力于通过计算机模拟简单的生命形式来理解进化过程。

（八）代谢网络建模分析

代谢网络涉及生化反应途径、基因调控及信号转导过程（蛋白质间的作用）等。后基因组时代将研究大规模网络的生命过程，又称为“网络生物学”研究。

1. 预测调控网络

尽管目前已有多个代谢网络途径数据库，有些数据可以直接参考使用，而且这些数据库本身除了手工和自动检索文献以补充数据外，也有开发预测工具的，但是都有局限性和准确性的问题，还需要从基因组来预测网络，或有针对性地去整合某些数据，研究其规律，开发

算法模型等。已有若干研究小组从事“基因组到代谢网络”的预测。

2. 网络普遍性分析

构建调控网络之后，人们对网络的“图论”方面的属性作了分析，如最短距离、连接度等，试图给出一些重要的结论；也有分析其最小单元的代谢途径等。越来越多的人开始开发专门的软件工具来自动分析大规模网络系统的物理属性，提供路径导航、模式搜索、图形简化等分析手段。

3. 建立模型分析

目前已有若干个比较优秀的代谢网络建模工具，如 Copasi (<http://www.copasi.org>)、E-cell (<http://www.e-cell.org>) 等，它们大都基于代谢控制分析原理，使用常微分方程来求解反应速率。基于标准化数据输出输入考虑，已经组成了合作组，共同支持 SBML (<http://sbml.org>) 数据交换。其他形式的建模工具也很多，如用随机方法处理的，因为毕竟确切的动态参数目前还很难得到。其他如用 Petrinet 进行建模的，由于其强大的数学计算功能和明了的示图形式，也越来越多地引起人们的兴趣。另外，如何自动建立大规模的代谢网络，也是个正在进行中的课题。

与代谢分析直接相关的便是系统生物学研究，它将是后基因组时代最为突出的研究方向。EMBL (<http://www.embl.de>) 2006~2015 年战略发展目标中已将系统生物学列为三大主要挑战之一。它要求我们看待生命活动过程要用系统的眼光，而不能只盯住一个方面的数据分析而隔离联系。所谓的“VirtualCell (虚拟细胞)”模型就是基于系统考

虑。

（九）计算进化生物学

引入信息学到进化生物学中，使得生物学家可以通过测量 DNA 上的变化来追踪大量生物的进化事件。通过比较全基因组，还可以研究更复杂的进化事件，如基因复制、水平基因转移、物种形成等，为种群进化建立复杂的计算模型，以预测种群随时间的演化。

（十）生物多样性研究

生物多样性数据库集合了物种的各种信息。计算模拟种群动力学过程，或计算人工培育下或濒危情况下的遗传健康状况。生物信息学在这方面一个重要的前景是保存大量物种的遗传信息，可以把自然的遗传信息保存成电子信息，为濒危物种建立基因库，将各物种的基因组信息保存下来，这样即便在将来这些物种灭绝了，人类也可能利用它们的基因组信息重新创造出它们。

（十一）合成生物学

合成生物学这个术语是由波兰遗传学家瓦克罗·斯巴斯基（Waclaw Szybalski）在 1974 年提出的。目前合成生物学仍然没有一个明确的定义，一般认为合成生物学是依据生物学、化学、物理学和工程学等原理设计的优越的或新型的生物系统。合成生物学涉及许多不同的生物学研究领域，如功能基因组学、蛋白质工程、化学生物学、代谢工程、系统生物学和生物信息学，它将自然科学和工程科学结合到一起进行生物学上的研究。由于近几年来在系统生物学和 DNA 合成与测序等新技术上取得了长足的进步，合成生物学逐步形成了自己

的研究领域，广泛应用于医药、化学、食品和农业等行业。

（十二）生物医学文本挖掘

近年来，生物医学领域的文献数量迅速增加。这些文献作为科学研究成果的载体，大多以电子格式提供且易于获取。如何从海量的文献中挖掘蕴藏的知识对于生物医学研究和应用至关重要。融合自然语言处理技术的生物医学文本挖掘应运而生。其任务包括生物医学命名实体识别、文本分类、关系抽取、知识图谱构建等。其中，命名实体识别是具有挑战性的关键基础任务。常用于生物医学命名实体识别的模型有基于规则、基于字典、基于机器学习（尤其是深度学习）的方法。目前，命名实体识别面临的问题包括同义词、替换表达、一词多义或歧义、缩写等，因而可能需要大量的人工标注。如何在保持精度的同时减少标注训练集、运用迁移学习和半监督学习等是生物医学文本挖掘的发展方向。

第四节 生物信息学面临的挑战

近年来，生物信息学家已经取得了多项研究成果，获得了海量的生物数据，确定了数千个基因的功能，其中包括搜索碱基对序列匹配的有效方法、统计学工具，利用新的计算机工具组装整个基因组等，但生物信息学的发展面临着新的挑战，迫切需要新的研究手段和研究方法。

生物信息学并不是一个足以乐观的领域，究其原因，它是基于分子生物学与多种学科交叉而成的新学科，现有的形势仍表现为各种学科的简单堆砌，相互之间的联系并不是特别紧密。在处理大规模数据

方面，没有行之有效的一般性方法，而对于大规模数据内在的生成机制也没有完全明了，这使得生物信息学的研究短期内很难有突破性的结果。那么，要得到真正的解决，最终不能从计算机科学得到，真正的解决方法可能还是得从生物学自身，从数学上的新思路来获得本质性的动力。毫无疑问，正如 Dulbecco 在 1986 年所说：“人类的 DNA 序列是人类的真谛，这个世界上发生的一切事情，都与这一序列息息相关”。然而，要完全破译这一序列及相关的内容，我们还有相当长的路要走。

我们很难预测生物信息学在未来几十年将给生物学的发展带来什么样的根本性突破，但是人类科学研究史表明，科学数据的大量积累将导致重大的科学规律的发现。例如，对数百颗天体运行数据的分析导致开普勒三大定律和万有引力定律的发现；数十种元素和上万种化合物数据的积累导致元素周期表的发现；氢原子光谱学数据的积累促成量子理论的提出，为量子力学的建立奠定了基础。我们有理由认为，今日生物学数据的巨大积累也将导致重大生物学规律的发现。

统计学原理表明，在一定程度上，统计结果的显著性与数据量的对数成正比。因此，随着数据库中数据量的飞速增长，基于数据库的研究工作必将有所突破。可以相信，随着人类基因组计划的完成及蛋白质组学研究的逐步开展，生物信息学在揭示生命的奥秘中会更加成熟和完善，生物信息学科也将随之得到巨大发展。相信生物信息学将发挥越来越大的作用，并推动生物学进入一个全新的境界。

《第三次技术革命》里有这样的描述：“一场与工业革命和以计

计算机为基础的革命有相同影响力的变化正在开始。下一个伟大时代将是基因组革命时代，它现在处于初期阶段”。基因组学的发展已经进入后基因组研究阶段，致力于蛋白质功能研究的蛋白质组学和功能蛋白质组学正在蓬勃发展，在生物信息学发展的带动下，我们必定能够揭示各种生命现象的奥秘，并带动多个学科的跨越式发展。生物信息学的发展将对分子生物学、药物设计、 workflow管理和医疗成像等领域产生巨大的影响，极有可能引发新的产业革命。此外，生物信息学所倡导的全球范围的资源共享也将对整个自然科学，乃至人类社会的发展产生深远的影响。

第二章 生物学数据库及其检索

第一节 生物学数据库简介

一、什么是数据库

数据库 (database) 是一类用于存储和管理数据的计算机文档, 是统一管理的相关数据的集合, 其存储形式有利于数据信息的检索与调用。数据库开发的主要任务就是将数据以结构化记录的形式进行组织, 以便于信息的检索。数据库的每一条记录 (record), 也可以称为条目 (entry), 包含了多个描述某一类数据特性或属性的字段 (field), 如基因名、来源物种、序列的创建日期等, 这也是数据结构化的基础; 值 (value) 则是指每个记录中某个字段的具体内容。当我们进行数据库记录的检索时, 就是利用查询语言在整个数据库中查找符合条件 (即对特定字段包含特定内容的限定) 的所有记录的过程。例如, 我们可以在 GenBank 核酸序列数据库中查找所有来源于人类 (organism: Homosapiens)、最近 30 天公布的 (publishedinthelast30days)、类型为 mRNA (moleculartype: mRNA) 的核酸序列。

二、数据库的类型

到目前为止, 生物学数据库使用了 4 种不同的数据库结构类型: 平面文件、关系型数据库、面向对象数据库和基于 Internet 平台的 XML。

最早的数据库是以平面文件的格式 (flatfileformat) 进行保存的, 这种格式是将多个记录以特殊约定的分隔符 (如“/”或“|”) 进行区分, 而每一个记录内的众多字段也是通过一些特定的分隔符 (如“,”或“:”)

加以区分。数据库文件就是由这些字段及内容所组成，并不包含什么隐藏的计算机指令。显而易见，这样的数据库就会形成一个很长的文本文件。因此，要想在平面文件格式的数据库中检索某一类信息，计算机必须通读整个文件。当记录逐渐变多或描述记录的字段很复杂时，这种格式的数据库就变得非常难于进行检索。于是，更多的数据库则是使用了包含能够帮助寻找数据记录间隐含关系的计算机操作指令的数据库管理系统，以便于数据的接入与检索。根据不同的数据结构类型，数据库管理系统可以分为关系型数据库管理系统和对象型数据库管理系统。关系型数据库及其管理系统的具体内容请参见本章第二节及第十三章第三节。

三、 生物学数据库

生物学数据库的类型多种多样。根据存放数据类型的不同，可以分为序列（如 GenBank、Swiss-Prot 等）、（三维）结构（如 PDB）、文献（如 NCBI 的 PubMed）、序列特征（如 PROSITE、Pfam 等）、基因组图谱（如 MapViewer、Ensembl 等）、表达谱等多种数据库，每一种还可以进行更细致层次的划分。根据数据库存储的具体内容还可以分为一级数据库和二级数据库（primaryandsecondarydatabase），以及用户针对性更强的专用数据库（specializeddatabase）。

（一） 一级数据库与二级数据库

一级数据库属于档案数据库（archive），库中的主要内容是来源于实验室操作所得到的原始数据结果（如测序得到的序列或经过 X 射线晶体衍射所得到的三维结构数据等），当然也会包含一些基本的说

明（如序列所属的物种、类型、序列发表的文献出处等）。核酸序列数据库 GenBank、EMBL、DDBJ 及蛋白质结构数据库 PDB（ProteinDataBank）就是典型的一级数据库。二级数据库则是在一级数据库的信息基础上进行了计算加工处理并增加了许多人为的注释而构成的。例如，NCBI 的 RefSeq 数据库，其 mRNA 序列是综合了 GenBank 中来源于同一物种相同基因的所有 mRNA 序列信息的一致性序列（consensussequence）；而公共数据库中大多数的蛋白质序列是将核酸序列中的编码序列区域（codingsequenceregion, CDS）进行蛋白质翻译后，通过后续的一些计算分析（如利用 BLAST 进行序列相似性分析），主观人为地为序列加上蛋白质产物名称及功能注释。也就是说，它们不是通过实验来确定的。以 UniProt 下属的 KnowledgeBase 数据库为例，它是由众多蛋白质专家人工校正注释的高质量 Swiss-Prot 和由计算预测得到各种蛋白质功能信息的 TrEMBL 两部分组成，是目前最大的二级蛋白质序列数据库。一级数据库的注释信息非常有限，因此二级数据库中的功能与结构注释在分析中的作用便显得格外突出。但必须注意的是，二级数据库中的信息有些时候也会产生误导，特别是一些由程序自动计算得到的结果。

除了一级与二级数据库外，更多的专业数据库被开发出来以满足不同生物学研究团体对特定类型信息的需求。例如，专门研究小 RNA 的数据库或专门存储基因表达谱数据的数据库，以及专门为果蝇、线虫、拟南芥等基因组研究提供各类信息的专业数据库等。这些数据库虽然在序列数据方面与一级数据库有些重叠，但由于各研究领域的专

家更侧重于为这些专业数据库提供相应的注释，因此它们为公共序列数据库提供了非常有价值的补充。

（二） 如何查找与研究相关的生物学资源

面对众多的生物学资源，刚刚接触生物信息学的新手常常不知如何开始相关的学习和研究，更不知道如何才能找到与自己研究相关的生物学资源。针对上述问题，常用的方法如下。

1) 利用公共搜索引擎。一般来说，数据库在建立时都会在自己的网页代码中设立相关的关键词。因此，我们可以利用与研究相关的关键词在搜索引擎中进行资源的搜索。然而，由于关键词使用的不唯一性及不同公共搜索引擎对多个搜索关键词之间的默认组合关系不同（如对于 `alcoholicdisease` 这样一个双检索词，不同的搜索引擎可能会采取短语、双检索词的交集或并集等不同形式作为其默认的组合形式），使得我们的检索结果与目的要求大相径庭。因此，利用公共引擎进行资源的搜索是最简单也是最容易引起歧义的方法。当然，如果事先了解准确的生物资源名称或简称别名时，公共搜索引擎则是一个能够快速得到确定生物信息资源网址 URL 的工具。

2) 了解重要的生物信息学门户网站。生物信息门户网站包含了大量的公共资源。美国的国家生物技术信息中心（NCBI）、位于英国的欧洲生物信息研究所（European Bioinformatics Institute, EBI），以及由瑞士生物信息研究所（Swiss Institute of Bioinformatics, SIB）维护的专家级蛋白质分析系统 ExPASy (Expert Protein Analysis System) 等都是非常重要的生物信息学门户网站。每个站点都提供了种类繁多

的数据库、分析工具、生物信息教程等内容，并且链接了大量非自身维护的有用站点与资源。它们是进行分子生物学研究最基础的批量数据来源。

3) 利用 NucleicAcidResearch 杂志每年的数据库专辑/网络服务器专辑。NucleicAcidResearch (《核酸研究》，简称 NAR) 是分子生物学研究的权威杂志。从 1994 年起，NAR 在其每年的第一辑杂志中都会介绍一些重要数据库的更新情况，提供可访问的各类数据库的网址，并附带着这些数据库的建库目的与主要内容等描述信息。这些信息为实验生物学家查找与使用特定类型的数据资源提供了极大的便利。在这一特刊发行 10 年即 2004 年时，它被正式改名为数据库专辑 (DatabaseIssue)。数据库专辑将收集的各类公共数据库分为 15 个大类多个小类 (表 2-1)，包含的数据库数量也在逐年增加。到 2017 年，数据库专辑收录的主要分子生物学数据库已经达到了 1695 个。同时，从 2003 年起，NAR 开始在每年的 7 月份发行数据库专辑的补充内容——网络服务器专辑 (WebServerIssue)，为用户提供基于网络的分子生物学数据分析及可视化软件资源。到 2017 年底，网络服务器专辑收录的链接已经超过 1950 个。它们也像数据库专辑中那样被分为 11 个大类多个小类，但内容组成与数据库有一定区别。

四、重要的生物信息站点

(一) NCBI——美国国家生物技术信息中心

NCBI 建立于 1988 年 11 月 4 日，隶属于美国国立卫生研究院 (NIH) 的美国国家医学图书馆 (NLM)，主要任务是创建公共可接

入数据库，引导在计算生物学及基因组数据分析方面的软件开发，同时发布各类生物医学信息。到目前为止，NCBI 已经成为世界级的生物信息资源中心，为生物医学及生命科学研究提供了大量的数据和众多的分析工具与平台。例如，PubMed、GenBank、BLAST、MapView 等都是 NCBI 中最常用的数据库与分析工具。

NCBI 的数据资源主要包括数据库、数据下载、数据提交及分析工具 4 个部分，另外还有一个 HowTo 页面则包含了 NCBI 主要数据库或工具的使用方法说明。NCBI 的全部资源及其简介可以从 NCBI 主页中的 AllResources 界面 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/all>) 中进行查找和了解。

(二) EBI——欧洲生物信息研究所

EBI 是隶属于欧洲分子生物学研究室 (EMBL) 的一个非营利性的学术机构，专门从事生物信息学方面的研究与服务。EBI 的主要任务包括为科研团体免费提供数据及生物信息学服务；从生物信息学的角度为推动特定科研项目的发展作出努力，为各阶层的科研人员提供高级生物信息学培训，以及帮助向工业界发布最新技术等。EBI 的网站在数据规模和承担的任务方面都与 NCBI 相当，而全部资源及工具则显示在其 ServicesAtoZ 页面 (<http://www.ebi.ac.uk/services/all>) 中。

(三) EMBnet——欧洲分子生物学信息网络

EMBnet 建立于 1988 年，由多个位于欧洲及欧洲以外的成员国节点和专业节点组成。除了上面提到的欧洲生物信息学研究所 (EMBL-EBI) 外，瑞士生物信息研究所 (SIB)、澳大利亚国家基因

组学信息服务(AGRIS)及中国北京大学的生物信息中心(PKU-CBI)都是 EMBnet 的成员。它们不仅为本国用户提供生物信息资源及生物计算服务,同时提供用户支持、培训及进行相关的生物信息研究与开发。例如,专业蛋白质分析系统 ExPASy 就是由 SIB 开发及维护的,而通用蛋白质资源数据库 UniProt (UniProt2014)则由 EMBL-EBI 及 SIB、PIR 共同进行维护。由于 EMBnet 的成员国节点与专业节点各自包含了大量的公共数据信息及自行开发的数据库和分析工具,因此它可作为生物学数据资源的补充来源,如 EMBnet 瑞士节点 (<http://www.ch.embnet.org/>)、挪威节点 (<http://www.no.embnet.org/>)和北京大学生物信息中心节点 (<http://www.cbi.pku.edu.cn/>)。

第二节 生物学数据库的数据存储格式

众多处理和收集生物信息数据的项目建立了若干种格式,其中最常见的包括平面文件格式、XML 格式、JSON 格式和关系型数据库。

一、生物信息学的平面文件格式——Flat File

平面文件格式 (Flat File) 就是我们平常所说的纯文本文件的另一种说法。Flat File 数据库由包含纯文本的文件构成,这些文本通常使用 ASCII 码集合中的字符,但一些包含 ASCII 码扩展集或 Unicode 集合中的字符的文本也被认为是平面文件。Flat File 格式中的数据通常被结构化为一组数据 Entry,或称记录或条目。Entry 可认为是一组具体数据实体的描述符。举例来说,在通用蛋白质资源数据库 UniProt 中,Entry 包含的数据为单个蛋白质的序列,相对于其他的数据而言,它包括一组描述符,是对于该蛋白质的描述及该蛋白质特征的列表。

在 Flat File 数据库中，正文行中每列对应一种明确定义的格式。

Flat File 数据库的 Entry 通常都连续地排列在一份或多份文本中。这些排列并没有一个明确的规则：在一些数据库中所有 Entry 存放在单一文本中，另一些数据库中每个 Entry 有着自己单独的文件。一些较大的数据库则采取两者结合的方式，将 Entry 集合在若干个较大的文件中，以避免计算机文件系统及其相关工具的限制。

Flat File 格式最主要的优势在于它的通用性。绝大多数用于计算的机器都有现成的软件能够读入、显示和查找文本文件。自定义的编写能够对文本文件进行简单操作的程序也相对简单，不需要某一方面的专业知识。

虽然 Flat File 格式最初可以追溯到 UNIX 操作平台用于数据仓库的标准，但它现在可被认为是独立于平台的。Flat File 格式在机器与机器之间的传输中也相对较方便，如通过 FTP，甚至电子邮件。

目前，很多人认为 Flat File 在存储空间的需求上并不存在优势。定义一些其他有效的文件格式是可能的，这些格式至少应该与 Flat File 的空间利用率相当，甚至更小，如关系型数据库中的表格，或是 XML 数据库中的 XML 文件。当数据通过网络进行传输时，传输速度成为数据处理中的一个瓶颈，所以文件格式的紧凑性成为一个重要问题。

除了它的通用性，Flat File 能够被很多工具处理。大多数 UNIX 命令行工具的设计思想是对文本文件进行基于行的处理。这些工具被广泛地运用于对生物信息中 Flat File 格式的数据进行有效的处理。同

样的，包括 BLAST (Altschuletal., 1990) 和 ClustalW (Higginsand Sharp, 1988) 在内的各种分析工具被设计用于获取 Flat File 格式的数据并从中获益。

二、生物信息学中的 XML 格式

可扩展标记语言 XML 是一种在文本文件中组织数据的语言。万维网联盟 (<http://www.w3c.com/>) 已经定义并建议将 XML 作为一个通用的独立平台结构化文件。在过去的 10 年中，XML 已经成为在计算机系统与应用程序之间交换数据的首选语言。一个 XML 文件代表一个嵌套的信息树。树中的每一个节点能包含像一串子节点或者一些属性这样的数据，并且一个 XML 文件始于根节点。一个 XML 文件有一个文本，在文本中每一个节点的内容及其子节点被一对相互封闭的标签划定。

XML 作为一种数据格式被广泛地用于生物信息学中。越来越多的生物数据库已经不再是仅仅把 XML 格式的数据作为备选数据格式与 FlatFile 格式平行提供给用户，而是彻底基于 XML 文件构建数据库管理系统并使用 XML 的查询语言 XQuery/XPath 进行各种应用程序的编写，如 LRRML 等数据库。

XML 文档的结构是根据一种文件类型定义 (DTD) 组织的，而文档 DTD 是由 XML 文档的作者自行定义的。一个 DTD 定义了一类遵从一系列规则的 XML 文档。这些规则中包括如一个节点中有多少个、怎样类型、怎样组织的子节点。一个 DTD 是通过一个文件类型声明与 XML 文档联系在一起的，这个声明指出了这个 XML 文档是

依附于结构由该 DTD 定义的文档类；一个 DTD 是通过 XML 确定其特殊性的，在这个 XML 文档里可能直接包含了关于类型的声明。为了方便，DTD 是以独立文件的形式进行存储和调用的。

由于 XML 设计依照的是国际标准，所以它具备作为计算机通用语言的主要优点。几乎现在每种编程环境中都包括了读取和存取 XML 格式数据的工具及库。

文档对象模型 (DOM) 是 XML 文档的一种概念表征。它是一个数据以树状存储于 XML 文档的软件模型。从 XML 文档“翻译”成一个 DOM 的过程是依照标准化程序且容易理解的。许多复杂度、性能、标准支持不同的实现方式都已问世。

与 XML 相似，DOM 是通用的，而且那些对 DOM 对象进行操作的软件归根结底是在处理 XML 数据。一些最常见的软件工具，如网络浏览器，提供了 XML 的无缝整合和 DOM 水平的编程支持。相似的，绝大部分的文档管理系统、搜索引擎都可以以 DOM 兼容的方式从 XML 文件中索引、搜索、回收信息。

XML 也是在软件应用中广泛使用的语言。最经常见到的就是以 XML 为基本格式的简易对象存取 (SOAP) 协议，该协议用于以网络服务为基础的数据传输。为 workflow 管理系统开发的工具也是另一个生物信息学应用中使用 XML 格式的例子。

三. 生物信息学中的 JSON 格式

JSON 是一种开放的标准文件格式和数据交换格式，它使用人类可读的文本来存储和传输由属性-值对和数组 (或其他可序列化的值)

组成的数据对象。**JSON** 是一种独立于语言的数据格式。它源于 **JavaScript**, 但许多现代编程语言都包含用于生成和解析 **JSON** 格式数据的代码。**JSON** 文件名使用扩展名 **.json**。

JSON 的基础数据类型如下。

数字 (number): 一个有符号的十进制数, 可以包含小数部分, 可以使用指数 **E** 表示法, 但不能包括非数字, 如 **NaN**。格式不区分整数和浮点。**JavaScript** 对所有的数字值都使用双精度浮点格式, 但是实现 **JSON** 的其他语言可能会对数字进行不同的编码。

字符串 (string): 由零个或多个 **Unicode** 字符组成的序列。字符串用双引号分隔, 并支持反斜杠转义语法。

布尔值 (boolean): **true** 或 **false** 之一。

数组 (array): 由零个或多个元素组成的有序列表, 每个元素都可以是任何类型。数组使用方括号表示法和逗号分隔的元素。

对象 (object): 键为字符串的键-值对的集合。对象用于表示关联数组, 其中每个键在对象中都是唯一的。对象用花括号分隔, 并使用逗号分隔每对对象, 而在每对对象中, 字符冒号“:”将键与值分隔开来。

null: 空值。

JSON 有两种数据格式: 对象和数组。**对象**: 用大括号表示, 由键-值对组成, 每个键-值对用逗号分隔开。其中, **key** 必须作为字符串而且是双引号, **value** 可以是多种数据类型。**数组**: 用中括号表示, 每个元素之间用逗号分隔开。

四. 生物信息学中的关系型数据库

关系型数据库是由根据特定的关系模型组织的一系列数据。非正式地来讲, 关系型数据库的基本组成单位是表: 一组行, 每行代表一个 Entry; 每行又包含相同数量的列; 每列代表该 Entry 的一个属性, 具有特定的数据类型。正式地来讲, 关系型模型以关系来进行数据的组织, 作为一组放在 n -元组的元素, 每个元素在这个 n -元组中都属于一个特定的集合。

一般来说, 很多表都会定义其中的一个列作为每一个 Entry 的唯一标识符 (ID)。同时也有一些表把多个列联合起来作为 Entry 的唯一 ID。每张表都应该有这样的 ID 列作为链接索引以提高表中 Entry 被其他表引用的性能。

关系型数据库通常包括许多张表, 这些表通过关系和限制连接。这是确保考虑数据一致性的一种手段。举例来说, 在一个基因数据库中基因是以物种联系的, 一个稳定的约束需要任何一个基因组序列都必须连接到数据库中的某个物种。这样的约束可以使用户避免输入一段序列后没有指出该序列所属的物种 (前提是该物种存在于数据库中)。

关系型数据库模型是为包容复杂关系定义和数据联系而设计的。这样的目的是保证数据尽可能真实地反映它记录的域的结构。将数据放入关系型数据库的特定域中的过程叫做数据库建模, 它是一个包含着许多权衡的复杂过程。数据库建模的第一步就是定义表和表中每列的格式。在定义关系和数据规范化的过程中包括了更为复杂的步骤。

规范化的目的是移除数据库中的所有冗余数据，举例说就是当数据需要复制时，复制是在一张表中进行还是几张表中进行。规范化过程已经存在许多已经定义过的等级，这些等级逐级变得完善，从实践角度规范化的目的就是在冗余和性能中权衡出最佳的情况。最理想的结果一般由数据库系统类型、使用频率或最常用登录数据库方法这几个因素决定。

数据库建模的结果是形成一个数据库结构纲目，它是表和表在数据库中关系的标记。一个具体的数据库结构纲目定义是数据库中每一张表中的每一列的所有细节。它同样定义了数据库中的表和列之间建立的关系与限制。

实现数据关联的系统常被界定为关系型数据库管理系统（RDBMS）。当前有多个成熟的软件产品，包括商业的和开源版本，提供不同层次的功能。当今数据库服务器单机软件套装的标准是通过常见的网络协议对客户端进行数据服务，使用户通过简单易懂的 SQL 语句进行添加、删除或查询存储的数据。由于开发人员对关系数据库系统开发的成功，已经为用户带来效能上的利益。一系列关系型数据库管理系统（如 Oracle、MySQL、MicrosoftSQLSever 等）在近三十年来一直是各行业计算部门使用的主流数据库系统。其中的 MySQL 是开源的，非常适合中小型生物数据库的搭建。

生物信息学关系型数据库的具体实例有 Ensembl 数据库和 GeneOntology 数据库。Ensembl 数据库是由 EBI 和 WellcomeTrustSangerInstitute 联合开发的基因注释数据库，其中真核

生物基因组数据主要集中在脊椎动物。这些数据是可通过直接访问 MySQL 服务器获取的，但由于复杂性和所涉及的大量的 Ensembl 结构纲目，使用者常被建议通过专用 Perl 的 API 访问。GeneOntology 数据库也是一个基于 MySQL 分布的关系型数据库，该数据库将其所包含基因组术语数据库整理成了本体结构——一种条目之间基于特定标准形成的关系网络。GeneOntology 数据库结构建立在细胞成分、生物过程和分子功能标准，以及“等价”或“属于”所代表的关系界定等因素之上。GeneOntology 数据库包含关联基因产物的功能的直接信息及存在于其他公共数据库中的信息，如具体序列。

第三节 生物学数据库的检索

一、NCBI 的 Entrez 系统

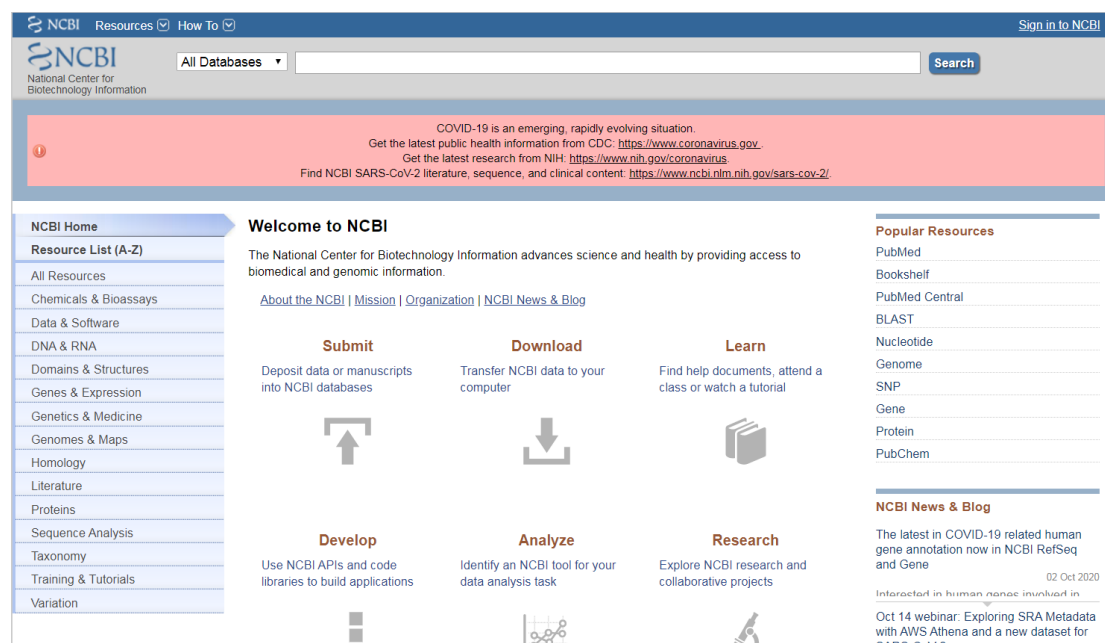
Entrez 系统是由 NCBI 开发并提供维护的，它是目前应用最为广泛的生物学数据库检索系统之一。它充分利用了众多公共数据库各个记录之间本身就存在的逻辑关系，从而从多种类型数据的文本信息中找到所需的信息。

Entrez 检索

Entrez 提供全局检索 (Global Search)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/>)，如图所示。此页面列举了全部可供查询的 Entrez 数据库。其中第一类(Literature)包括书籍、PubMed 收录的文献、PubMedCentral 收录的文献全文、MeSH 和 NLM 书目。用户在页面上方输入框中输入关键词后点击“Search”，该页面将返回查询结果在每个数据库中的数量。在搜索结果页面中，点击特定数据

库所在位置即可检索该数据库中的搜索结果。该检索方法可对检索词进行多个数据库的宽泛检索，但检索结果不精确。精确检索须针对特定数据库，采用特殊方法进行查询。



The screenshot shows the NCBI homepage with a search bar at the top. Below the search bar, there is a red banner with COVID-19 information. The main content area is divided into several sections: 'Welcome to NCBI' with a navigation menu on the left, 'Submit', 'Download', and 'Learn' in the center, and 'Popular Resources' and 'NCBI News & Blog' on the right. The navigation menu includes 'All Resources', 'Chemicals & Bioassays', 'Data & Software', 'DNA & RNA', 'Domains & Structures', 'Genes & Expression', 'Genetics & Medicine', 'Genomes & Maps', 'Homology', 'Literature', 'Proteins', 'Sequence Analysis', 'Taxonomy', 'Training & Tutorials', and 'Variation'. The 'Submit' section includes 'Deposit data or manuscripts into NCBI databases'. The 'Download' section includes 'Transfer NCBI data to your computer'. The 'Learn' section includes 'Find help documents, attend a class or watch a tutorial'. The 'Develop' section includes 'Use NCBI APIs and code libraries to build applications'. The 'Analyze' section includes 'Identify an NCBI tool for your data analysis task'. The 'Research' section includes 'Explore NCBI research and collaborative projects'. The 'Popular Resources' section includes 'PubMed', 'Bookshelf', 'PubMed Central', 'BLAST', 'Nucleotide', 'Genome', 'SNP', 'Gene', 'Protein', and 'PubChem'. The 'NCBI News & Blog' section includes 'The latest in COVID-19 related human gene annotation now in NCBI RefSeq and Gene' and 'Oct 14 webinar: Exploring SRA Metadata with AWS Athena and a new dataset for SARS-CoV-2'.

在 NCBI 主页的搜索框旁边同样存在一个下拉菜单，这个下拉菜单可以令用户选择某一个数据库。许多数据库都能够直接链接至 NCBI 主页，这个链接或者能在右上方的“常用资源”中找到，或者能在下方的列表中看到。所有 Entrez 中的数据库主页都有到 NCBI 主页的链接。一个链接到子数据库主页的简单方法就是在 NCBI 主页地址后面加上该数据库的名字。例如，Gene 数据库的主页地址就是 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>。在单个数据库主页进行的搜索都可以相应地使用更为精确的搜索方式，如使用布尔操作符将一个或多个搜索域连接起来达到精确搜索。

Entrez 的查询关键字可以是一个单词，也可以是短语、句子、数据库标识符、基因标记或者名字等几乎所有内容。通常来说，过于简

单搜索会产生不可计数的结果甚至一个结果也没有。Entrez 中有一些内置的特征可以帮助建立更具效率的搜索，包括布尔操作符、查询语句及数据库包括的所有可用的标签。以上内容在编辑检索式时都可以通过手动输入方式完成，同样也可以在网络界面中通过限制、过滤及高级搜索来建立更加精确的搜索。更多的关于这些方面的特征将在下文中阐述。

Entrez 中的布尔操作符提供了一种精确查询的方法，使用该方法后会产生定义明确的结果集。Entrez 中使用的所有布尔操作符及其用途如下。

AND: 找到同时包括操作符两端短语的文档，是两个搜索的交集。

OR: 找到包括操作符两端任意一个短语的文档，是两个搜索的并集。

NOT: 找到包括操作符左边短语的文档后去掉包括操作符右边短语的文档，是左边短语对右边短语的差集。

Entrez 要求布尔操作符 AND 以大写形式输入。另外两个操作符不做此要求，但是最好 3 种操作符都以大写形式输入。

Entrez 将所有布尔操作符视为由左至右的序列。将个别表达式用括号括起来会改变该表达式的优先级。括号中的部分会被当作一个单位优先进行处理，其他部分随后进行处理。例如，下面的搜索语句中，response element 和 promoter 的结合会先产生一个结果集，然后这个结果集与 g1p3 共同取一个交集。

g1p3 AND (response element OR promoter)

通常来说，用空格连接的单个搜索都被认为是用 AND 操作符将所有单词并列起来的。tp53 mouse 这个查询结果就是 tp53 的查询结果与 mouse 查询结果的交集。每个 Entrez 数据库还有一个专门的索引列表，每当某个短语与列表中的短语相匹配，Entrez 就将使用该短语而非两个或多个独立单词的交集。例如，短语 proteinkinasec 就被 Entrez 视为一个短语而非 3 个用 AND 连接的单词。不同的数据库可能会有不同的列表及不同对待列表的方式。在某些地方使用引号将搜索词连接起来会强制使用词组搜索而非不同搜索后的交集。绝大多数 Entrez 数据库对短语 insulin dependent 的搜索结果会根据是否加了引号而发生变化。尽管词组搜索非常实用，但是引号的使用依然需要非常谨慎，因为使用引号以后只能获得文本与引号内容完全匹配的文档。将单词用引号包住可避免将一些固定词组拆开引起麻烦，如 Medical Subject Headings 或者 Organism (Taxonomy)。

为了便于检索，每个 Entrez 数据库都建立了各具特点的索引集，包括了从不同方面提取出的信息，这些方面就是通常所说的域。这些域中有些可以随意书写，但是有些域是控制得相当严格的，如数据库标识符 (accession 和 PMID)、MeSH 和 Organism。Entrez 默认使用全局模式进行搜索。这通常会产生大量的搜索结果，同时也会产生不在期望中的结果。例如，在核酸数据库中以 horse 作为关键字进行搜索会产生很多条记录，然而有许多结果甚至与“马”这个动物毫不相关。如果本来的目标是取得与 horse 这个物种相关的记录，将检索句中加入一个特定的域可能会获得更好的效果。Entrez 的数据库中可以在高

级搜索的页面上利用查询生成器选择列举出的特定的域。如图 2-10 所示，在所有 Entrez 数据库中，输入框下方都有“高级搜索”选项，点击即可进入高级搜索页面。部分数据库还包括“限制”等选项。

一次搜索完毕后搜索框中随即会出现一个“保存搜索”的选项，这个选项可以使用户在 My NCBI 的账户中保存这次搜索。My NCBI 提供了自动进行检索的功能，它的功能和特点在帮助手册中有更为详尽的描述（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3843/>）。

Entrez 的基因高级搜索中，Organism 域是被展开的。单词 horse 是被放置在 Organism 选项中的。这项限定之后，就只有以马（Equuscaballus）为物种的基因才会被显示出来。使用查询构造器可以将域信息添加到查询中，除此之外手动添加方括号“[]”将域名括起来也可以实现域的添加。

一些特定的域可以确定值的范围。常见的例子就是出版日期、修改日期、登记号、分子质量及序列长度。这些例子中下限和上限是用冒号“:”分开的。

Entrez 数据库的限制页（Limit）中同样有可以预先选择的常用或实用的选项。

在 PubMed 及传统的生物分子数据库中，MeSH 和物种域是占有特殊地位的。MeSH 和物种域中的关键字都是严格的控制性词汇，而且这些关键字在 PubMed 及生物分子数据库中是以层次进行分类的。每个 PubMed 的记录都被分配了一个与该文章主题相关的 MeSH 术语集。PubChem 数据库记录中的一部分也都加入了 MeSH 的注释。

PubMed 的帮助文件中给出了更多关于 MeSH 系统重要性的细节。另外，几乎所有的生物分子数据库记录都会与其所在的物种及其系统分类学信息相关联，也就是说每个记录都会连接到 NCBI Taxonomy (NCBI 分类学) 数据库中。由于这两个系统是如此重要，所有查询在可能的情况下都自动地被映射成这两个库中的关键字。搜索词也可能被拓展出其他词汇或者翻译成另外的表示形式。某些特定的数据库中其他的域也可能会有与上述两个域相同的映射功能。

Entrez 的表达中还有一些其他的特殊案例。输入作者名时，完整输入作者姓，再写入不加标点的作者名缩写（如 LipmanDJ）就可以自动地被映射到作者名域搜索。输入一个可被某个特定数据库识别的标识符也可以绕过普通索引而直接得到想要的结果。可以这样使用的标识符包括登记号 (Accession)、序列标记的 GI 号、PubMed 标识符 (PMID) 和基因标识符。另外，定冠词或非定冠词、连词和介词等虚词会被 Entrez 搜索自动忽略。这些词也就是所谓的忽略字，在数据库记录内容中频繁出现但是并没有提供有用的信息。标点也是一个典型的被 Entrez 忽略的例子，有时这会引发某些特定搜索词的缺失。而将这些有问题的用词用引号包住会解决上述问题。

Entrez 允许在搜索词结尾添加单个“*”用来代表任意字符，词干与“*”之间不应有空格，这种情况通常被称为模糊查询。例如，Protein 数据库中搜索词 hors* 可以搜索到 hors、hors4、horse、horse's、horseradish 和 horst 等结果。模糊搜索在所有域中都被支持，这在无法确定单词拼写时尤为实用；而且它也可以用于将一个标识符范围收

集到一起。注意，模糊检索仅使用检索词的前 600 个匹配结果。

Entrez 数据库高级搜索页都可以建立起复杂而高度精确的查询语句。Entrez Protein 数据库作为一个独立的搜索界面，这个页面可以组建复杂的搜索式。搜索框中可以同时使用搜索构造器和历史搜索来建立更为复杂的查询。点击历史搜索中的条目可以出现以下几个选项：合并搜索、移除历史条目、载入结果、显示查询，在 MyNCBI 中还有保存查询。

搜索构造器第一行左方的下拉菜单显示的是作为搜索限定条件的各个域。从第二行起，新增的下拉菜单包含三个布尔操作符，用以连接不同条件。点击最右方的 Show Index List 链接会打开一个按字母排序的列表，列表中是选定的域中所有的名词，每页显示 200 条。若已在框中输入词汇，则点击“Show Index List”时，弹出列表会自动匹配接近的词。每一行输入框的右方有“+”、“-”两个按钮，点击“+”则会新增一条搜索，点击“-”则会删除当前的搜索。搜索构造器中每一行的输入内容都会自动进入主搜索框内，当设立好所有搜索条件时，点击“Search”进行搜索。

不同的 Entrez 数据库是单独使用历史搜索功能的，而且在浏览器被关闭或者条目被删除之前历史搜索会一直跟踪使用者的每一次搜索行为。在不使用 8h 后，历史搜索中的条目会被自动删除。历史搜索中的条目可以被随意结合到新的搜索中以提高精度。

Entrez 页面左上方和右上方的“Display Settings”及“Sendto”菜单可以修改记录的显示和下载选项。“Display Settings”菜单中含有关于

格式、每页显示数和排序的选项（这 3 个选项在多个数据库中都取代 **Display Settings** 单独存在），选项中可用的格式和排序及默认显示方式依据根据不同的数据库有所不同。当搜索结果只有一个的时候默认显示方式因具体数据库而异。每个页面的显示记录数默认为 20 条，排序方式为随机方式。这些选项都可以在“**My NCBI**”中修改，具体方式在 **My NCBI** 的帮助手册中有介绍。

“**Send to**”菜单可以使用户将结果发送到“**My NCBI**”中的“我的收藏”“**NCBI 剪贴板**”，或者发送到本地文件。根据特定的数据库可能会有更多选项。当需要将记录发送到本地文件时，记录的格式和排序可以由用户自行指定。缺省形式下“**Display Settings**”和“**Send to**”选项都是对所有记录生效的，除非用户在记录左方的复选框中指定个别记录有效。

剪贴板是 **NCBI** 网站中存储搜索记录的临时性位置。每个 **Entrez** 数据库的剪贴板都是相互独立的，剪贴板的容量是 500 条记录。在剪贴板中存储的记录将在 8h 后失效。当剪贴板中有内容时，**Entrez** 数据库中的主页右上角会出现一个连到剪贴板内容的链接。剪贴板的视图与当前数据库的页面相同，也具有相同的“**Display Settings**”和“**Send to**”菜单及同数据库中的其他功能。用户可以在剪贴板中通过点击每条记录后面的删除选项来移除不需要的条目，也可以使用记录前面的复选框，然后点击“移除选中条目”选项达到目的，这个选项也可以在未选择任何条目的情况下清空剪贴板。

“我的收藏”是“**My NCBI**”服务中的一部分，这是一个对记录进行

永久存储的空间。

每个 Entrez 数据库都提供了各种过滤器,用以将搜索结果减少至特定的子集。过滤后的搜索结果在 Entrez 页面右侧的栏中顶部“Manage Filters”下方,该功能需要登录才能使用。具体的过滤器因数据库不同而不同。点击一个过滤器的链接后,页面将仅仅显示符合过滤器要求的结果。点击一个过滤器右侧的加号可以将这个过滤器加到搜索框中。将过滤器添加到搜索框后点击“Search”会重新进行搜索,结果将仅包括过滤器过滤后的部分。

此外, Entrez 还提供多个记录的查询方式——Batch Entrez (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/batchentrez>)。通过上传包含有核酸或蛋白质数据库的 GI 号或 accession numbers 的文本文件,可一次显示所有查询条目,这为一些高通量数据的查询提供了便利。

二、使用专门的检索工具

近年来,一些专门用于数据库的检索工具应运而生。它们有一个别称叫做元数据库(meta-database),即“描述数据库的数据库”。最早期的一个此类工具是脱胎于 NAR Database Issue 的 MetaBase,现在处于停用状态。下面将介绍两个元数据库,以及如何运用它们来检索所需数据库及工具信息。

(一) Omictools

Omictools (<https://omictools.com/>) 是一个社区型生物信息数据平台。在缺乏同行的评定时,研究者们很难判断一个资源的好坏,包括存在哪些优势或劣势,数据可用性,当前状态等。Omictools 为生物

信息学的用户提供平台，在其上可对数据库中的软件或资源进行评价，以便后来的研究者进行考察。Omictools 允许用户提交新的数据库或软件，并接受某领域专家来手工审核数据库的内容，未登录的用户每个月只能访问 10 次 Omictools 数据库的页面。目前为止，Omictools 已经拥有 92 名审核志愿者，超过 9000 名注册用户及超过 20000 条的数据库及软件信息，每个月都有新的用户评论。

Omictools 可通过以下几条途径进行检索。

第一种方式是利用位于主页的快速文本检索框进行检索。用户可在检索框中填入想要查询的词，检索词将与 Omictools 数据库中所有数据库及软件的名称和描述进行匹配，并返回识别到的结果。Omictools 允许不完整的输入，但错误的输入或空格位置将导致查询不到所需结果。Omictools 也不支持同义搜索，如搜索 circRNA 和 circularRNA 的结果会有所不同。在返回结果页，用户可进一步进行筛选。筛选条目包括资源分类、操作系统、编写所用的程序语言、操作界面和生物学技术，用户可点击相应下拉菜单选择要查询的项，进一步缩小结果范围。

第二种方式是利用首页的分类条目。Omictools 提供两种分类方式，分别基于数据库及软件涉及的研究技术和所在研究领域。在每个主要条目之下还有子条目，用户可一步步点击所需条目，即可得到与碱基识别相关的数据库或软件。

(二) DATO

DATO (<http://bis.zju.edu.cn/Dato>) 是目前规模最大的生物信息学

数据库在线查询平台。DATO 收集了所有在 PubMed 中有记录的数据库及工具,并对名称、描述等信息进行了人工校对,以保证其准确性。用户不需要登录即可访问网站全部内容。

由于数据库的快速更新,某一领域的研究者在选择及查询数据库时,常常无法准确找到集中其所需的信息的数据库或文献资源。如果研究者想要查询目前最新最全面的信息,他们不仅需要遍寻近期最新的相关文献,还要在多个数据库中选择和比对,并花费时间来判断数据的可信性、筛选高质量数据等。解决这一问题的一个办法是同行评价引导,然而科研用户通常活跃度很低,如 Omictools 中绝大部分条目都没有用户评价。为了帮助用户选择, DATO 同样提供评价功能,更进一步地, DATO 整合了期刊质量、引用数量、访问情况等信息,以帮助用户做出判断。

DATO 的主界面包含搜索栏和全球地图,显示所有收录数据库的地理信息概况。在搜索栏最左侧的下拉菜单中选择按特定项搜索,并在右侧搜索框内输入搜索内容,点击搜索按键,所得内容会即时反馈在下方。点击地图上的数字,则会进一步按当前所选地区展开。地图上的“G”标识代表链接可用,“B”标识代表此数据库或工具无法访问或正常使用。用户可点击搜索按钮左侧按钮来切换模糊搜索或精确搜索。点击“Advanced”按钮,或点击网页最上方的“Search”选项卡,可以进行高级搜索。

搜索框右方的“+”号可以增添一行搜索条件,点击搜索按钮后, DATO 将会返回满足所有条件的结果。可以点击下方列表的表名对列

表进行排序，这样用户可以方便地按照发表时间、被引数量、链接情况等¹进行筛选。点击数据库或工具所对应的 PMID 则会直接跳转至该文章的 PubMed 页面。

除检索功能以外，DATO 还提供基于数据库内容的统计信息，包括期刊信息、国家及地区发表数据库情况、数据库引用信息、数据库关系网络等。点击网页最上方的“Statistics”选项卡，并在左方下拉菜单中选择对应项，即可查看相关的统计数据。例如，从过去 10 年来的 mesh term 的词云可以看出，随着时代变迁，生物信息学家的研究兴趣发生了哪些变化，以及热门领域的发展趋势等。

第三章 序列比对原理

第一节 序列比对相关概念

序列比对 (sequence alignment) 就是运用某种特定的数学模型或算法, 找出两个或多个序列之间的最大匹配碱基或残基数, 比对的结果反映了算法在多大程度上提供序列之间的相似性关系及它们的生物学特征。序列比对是序列分析和数据库搜索的基础, 也可以用来寻找保守基序。

通过比较两条或多条序列之间是否具有足够的相似性, 从而判定它们之间是否具有同源性。进行多个蛋白质或核酸序列的比对, 可以找出序列中具有保守生物学功能的共同基序 (motif), 还可以找出新测定序列中对了解其生物学功能有帮助的基序。

一、序列比对类型

生物分子序列比对主要用于发现潜在的同源序列, 为所查询序列进行功能预测及三维结构建模奠定基础。从比对的序列数量来说可以分为双序列比对和多序列比对。双序列比对从比对范围来说又可分为全局比对 (global alignment) 和局部比对 (local alignment)。全局比对考虑序列的全局相似性, 局部比对考虑序列片段之间的相似性。

观察两条 DNA 序列: AGCACACA 及 ACACACTA, 表面上看起来这两条序列没有太高相似性, 但如果两条序列分别加入一条短横线, 就会发现这两条序列有很多相似之处。因为序列的差异是由突变引起的, 常见的突变有替换 (substitution)、插入 (insertion) 和删除 (deletion), 其中后两种情况都可以在比对中引入横线来表示。

```

AGCACAC-A
| | | | |
A-CACACTA

```

我们引入字符编辑操作（editoperation）的概念来解决字符插入和删除问题，通过编辑操作将一个序列转化为一个新序列。用字符“-”代表空位（gap），并定义下述字符编辑操作：

Match (a, a) —— 字符匹配。

Delete (a, -) —— 从第一条序列删除一个字符 a，或者在第二条序列相应的位置插入空位。

Replace (a, b) —— 以第二条序列中的字符 b 替换第一条序列中的字符 a， $a \neq b$ 。

Insert (-, b) —— 在第一条序列插入空位字符，或删除第二条序列中对应字符 b。

很明显，在比较两条序列 s 和 t 时，在 s 中的一个删除操作等价于在 t 中对应位置上的插入操作，反之亦然。两个空位字符不能匹配，因为这样的操作没有意义。通过编辑操作计算的两条序列的距离称为编辑距离（editdistance）。

（一） 双序列比对

双序列比对就是对两条序列进行编辑操作，通过字符匹配和替换，或者插入和删除字符使两条序列长度相同，并且使其编辑距离尽可能小，使尽可能多的字符匹配。

在进行序列比对时，可根据实际情况选用代价函数或得分函数。

1) 两条序列 s 和 t 的比对得分（或代价）等于将 s 转化为 t 所用

的所有编辑操作的得分（或代价）总和。

2) s 和 t 的最优比对是所有可能的比对中得分最高(或代价最小)的一个比对。

3) s 和 t 的最小编辑距离应该是在得分函数 p 值（或代价函数 w 值）最优时的距离。进行序列比对的目的是寻找一个得分最高(或代价最小)的比对。

（二）全局序列比对

全局序列比对是对给定序列全长进行比较的方式。在待比较的两个序列中引入空位（gap），使得序列的全长都得到比较。通过全局比对，我们想得到的是一个分数最高的比对。具体算法与最长公共子序列问题很类似。

运用全局比对的主要优势在于对具有高度同源性的序列进行优化，这在以已知三维结构的同源性序列为基础对未知序列的三维结构进行预测的模型构建过程中是十分有用的。

（三）局部序列比对

在局部序列比对中，仅能获得特定序列在数据库中配对最好的亚区。两条 DNA 长序列可能只是一些局部的区域内具有很高的相似度，或者可能只在很小的区域内（编码区）存在关系；不同家族的蛋白质往往具有功能和结构上相同的一些区域，因此在生物学中局部比对比全局比对更具有实际的意义。

二、相似、同一与同源

序列比对的目的是之一是让人们能够判断两个序列之间是否具有

足够的相似性，从而判定二者之间是否具有同源关系。值得注意的是，相似性和同源性在某种程度上具有一致性，但它们是完全不同的两个概念。在序列比对中需要区分以下几个相互区别的基本概念。

（一） 相似性、同一性、同源性

相似性(similarity)是指两序列间直接的数量关系,如部分相同、相似的百分比或其他一些合适的度量。同一性(identity)是指两序列在同一位点核苷酸或氨基酸残基完全相同的序列比例。相似性和同一性都是量的概念,一般用百分数表示。同源性(homology)是指从某个共同祖先经趋异进化而形成的不同序列,也就是从一些数据中推断出的两个基因在进化上具有共同祖先的结论,它是质的判断。基因之间要么同源,要么不同源,绝不像相似性那样具有多或少的数量关系。例如,比较家鼠和小龙虾的同源的胰蛋白酶的蛋白质序列,发现它们具有41%的相似性,切不可说成具有41%的同源性。具有很高的相似性并不等于具有同源性。但在大多数情况下相似性可以表明两序列间的同源性。当我们发现两个基因或蛋白质具有很高的序列相似性时,会推测它们之间具有一段共同的进化历程,从而判断它们会具有相似的生物学功能,但是,这个推断在成为结论之前必须经过实验的验证。

（二） 直系同源、旁系同源

在考虑序列相似性的时候,还必须认识另外两个概念:直系同源(ortholog)和旁系同源(paralog)。分子进化不仅使不同的物种发生差异,在某个物种的基因组内部也可能发生进化事件。来自共同祖先的基因称为同源基因。直系同源基因(orthologousgene)是指在不同

物种中有相同功能的同源基因，它是在物种形成过程中形成的；而旁系同源基因（paralogous gene）是指一个物种内的同源基因。直系同源基因和旁系同源基因统称为同源基因（homolog）。一般情况下，一个生物物种的基因组中，两个基因或可读框在各自全长的 60% 以上范围内，同一性不少于 30% 时，称为同源基因。研究直系同源基因之间或旁系同源基因之间的功能关系，可以为基因组分析提供很大的帮助。直系同源基因由共同的祖先演化而来，从而具有序列相似性。而旁系同源是种内基因倍增的结果。当序列相似性高时，直系同源可以暗示功能性同源；而旁系同源一般会有相似但并不相同的功能。然而，在实践中区分直系同源和旁系同源单从序列信息出发并不容易，尤其当两个物种有许多旁系同源基因时。

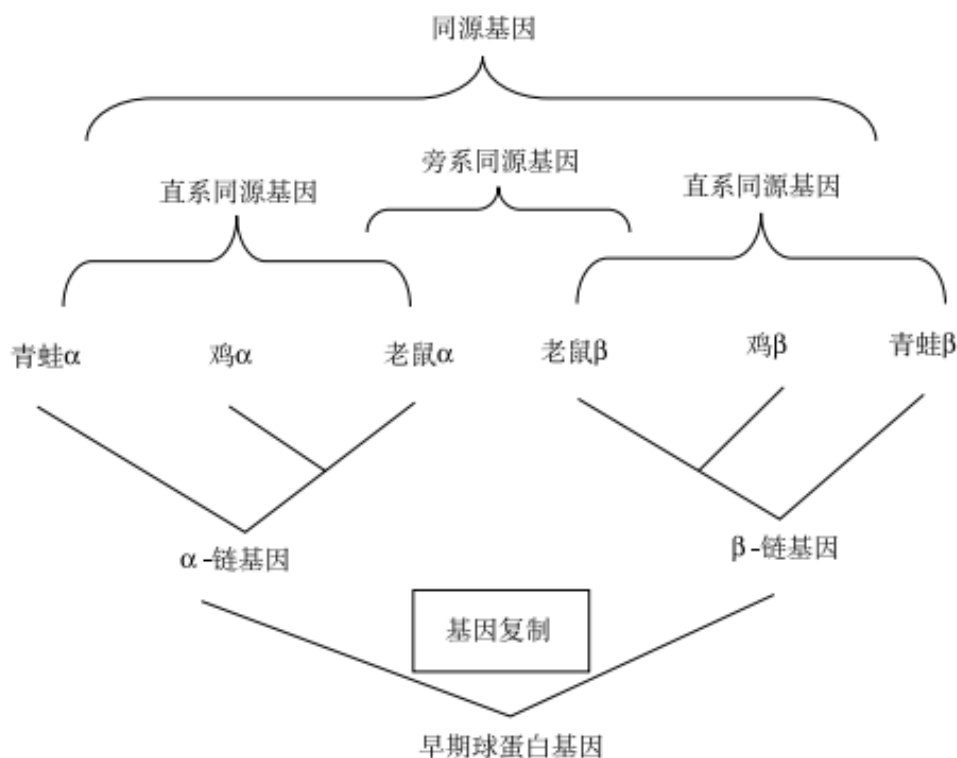


图 3-2 同源基因分类

第二节 序列比对打分方法

一、序列比对打分目的

序列分析的目的在于揭示核苷酸或氨基酸序列编码的高级结构或功能信息。对于序列比对的结果，通常用打分矩阵来计算其分值，以得到一个评价优劣的标准。前面公式都是简单相似性评价模型，没有考虑“同类字符”与“非同类字符”替换的差别。实际上，不同类型的字符替换，其代价和得分差别很大，尤其是对于蛋白质序列。某些氨基酸可以很容易地相互取代而不用改变它们的理化性质，通俗地说，保守的替换比随机替换更可能维持蛋白质的功能。因此，理化性质相近的氨基酸残基之间替换应该比理化性质相距甚远的氨基酸残基替换得分高，保守的氨基酸替换得分应该高于非保守的氨基酸替换。这就引出打分矩阵（scoringmatrix）的概念。打分矩阵是序列比较的基础，选择不同的打分矩阵将得到不同的比较结果，而了解打分矩阵的理论依据将有助于在实际应用中选择合适的打分矩阵。

二、打分矩阵

序列比对过程中，只考虑残基的同一性，即两个序列之间完全相同的匹配残基数目。可以把这种只考虑残基同一性的矩阵理解为一个打分为 1 和 0 的打分矩阵（表），即相同残基的打分为 1、不同残基的分数值为 0。这种矩阵通常称为稀疏（sparse）矩阵，即大多数矩阵单元的值为 0。显然，这种单一的相似性打分矩阵具有很大的局限性。改进打分矩阵的表征性能，找出那些潜在的具有生物学意义的最佳匹配，提高数据库搜索的灵敏度，而又不至于降低信噪比，是序

列比对算法的核心。

相似性打分矩阵就是为解决上述问题而产生的。相似性打分矩阵的构建，是基于远距离进化过程中观察到的残基替换率，并用不同的打分值表征不同残基之间相似性程度。恰当选择相似性打分矩阵，可以提高序列比对的敏感度，特别是在两序列之间完全相同的残基数比较少的情况下。必须说明，相似性打分矩阵有其固有的噪声，因为它们在两个具有一定相似性的不同残基赋予某个相似性分值的同时，也引进了比对过程的噪声。这就意味着随着微弱信号的增强，随机匹配的可能性也会增大。

（一） DNA 打分矩阵

两个核酸序列的比对较为简单。序列中嘌呤被嘧啶替换或反之，称为颠换（transversion），如 A→C、G→T；嘌呤或嘧啶自己互换称为置换（transition），如 A→G、C→T。可对核苷酸的颠换与置换给予不同的评分。如果不考虑字母替换，可以用单位矩阵作打分矩阵或取代矩阵。也可用其他打分矩阵。

（二） 氨基酸序列打分矩阵

20 种氨基酸彼此之间的替换远比核苷酸复杂。大量研究资料表明，不同氨基酸残基之间的相似性差别很大，蛋白质分子进化历程中，不同残基之间相互替换的概率也迥然不同。根据氨基酸 R 基团的极性、带电性和化学结构等性质，可以将它们划分为不同的相似组。比如，Dayhoff 提出了一种较为简单的处理方案，就是将 20 种氨基酸分为 6 组（第一组包括 C，第二组包括 S、T、P、A、G，第三组包括

N、D、E、Q，第四组包括 H、R、K，第五组包括 M、I、L、V，第六组包括 F、Y、W），同一组的残基一律等量齐观，这样把 20 种符号简化为 6 种，往往在不需要精确分析时能获得理想的结果。另一种更为常用的方法是统计自然界中各种氨基酸残基的相互替换率，常用的有下面介绍的 PAM 矩阵和 BLOSUM 矩阵。

1. PAM 矩阵（Dayhoff 突变数据矩阵）

PAM 矩阵是第一个广泛使用的最优矩阵，由 Dayhoff 等在 20 世纪 60 年代后期提出。PAM 矩阵基于进化原理，建立在进化单点可接受突变（point accepted mutation, PAM）模型基础上。Dayhoff 等研究了 71 个相关蛋白质家族的 1572 个突变，发现蛋白质家族中的氨基酸替换并不是随机的。1 个 PAM 是一个进化的变异单位，即每 100 个残基中有 1 个可接受单点突变。这并不意味着经过 100 次 PAM 后，每个氨基酸都发生变化，因为其中一些位置可能会经过多次改变，甚至可能变回原先的氨基酸，另外一些氨基酸则可能不发生改变，也就是说有些变异是互相抵消的。PAM 有一系列的替换矩阵，每个矩阵用于比较具有特定进化距离的两条序列。Dayhoff 等手工比较了当时数目有限的同源蛋白质序列，取实际观察所得的替换频率与随机背景序列的相应频率比值的对数，用统计方法得到对应 PAM1 的数据，再外插到 PAM250。矩阵中值大于 0 的元素所对应的两个残基之间发生突变的可能性较大，小于 0 的元素所对应的两个残基之间发生突变的可能性较小，而等于 0 的元素所对应的两个残基之间发生突变的可能性是随机的。矩阵的对角线是各个残基向其自身突变，所以其值都是

正值。除了对角线外，还有一些元素大于 0，说明对应的两种残基可以发生突变。

序列分析的难点是要确定那些仅有 20%相似性的序列之间是否具有同源关系，因此 PAM250 突变数据矩阵成为很多序列分析软件的缺省矩阵。因为 PAM250 突变数据矩阵在 20%的水平上反映出两个序列之间的相似性。使用与比对序列的实际进化距离更接近的相似性矩阵应该更为有效，但在实际使用中却无法实现，因为这意味着需要事先知道两个序列之间的进化距离，而导致先入为主的错误。因此，在实际进行序列比对时，应该选择各种不同的相似性分数矩阵进行多次比对，并对比对结果进行分析比较，才能得到比较合理的结果。残基差异百分率与进化距离 PAM 值之间对照如表 3-1 所示。实际计算中针对不同的演化距离，使用从 PAM 100 到 PAM 500 不等的打分矩阵。亲缘关系近者用 PAM 100 到 PAM 150，亲缘关系远者用更高值的矩阵，相当于容许更高的噪声背景。

2. BLOSUM 矩阵

BLOSUM 矩阵 (blocks substitution matrix) 可以使用关系较远的序列来获得矩阵元素。突变数据矩阵的产生基于相似性较高 (通常为 85%以上) 的序列比对，那些进化距离较远的矩阵 (如 PAM 250) 是从初始模型中推算出来而不是直接计算得到的，其准确率受到一定限制。而序列分析的关键是检测进化距离较远的序列之间是否具有同源性。因此，突变数据矩阵在实际使用时具有一定的局限性。

为了克服上述弊病，Henikoff 夫妇从蛋白质模块数据库 BLOCKS

中找出一组替换矩阵，用于解决序列的远距离相关。在构建矩阵过程中，通过设置最小相同残基数百分比将序列片段整合在一起，以避免由于同一个残基对被重复计数而引入的潜在偏差。在每一片段中，计算出每个残基位置的平均贡献，使得整个片段可以有效地被看成是单一序列。通过设置不同的百分比，产生了不同矩阵。由此，高于或等于 80% 相同残基的序列组成序列模块可用于产生 BLOSUM 80 矩阵；而大于或等于 62% 的聚合序列则用于构建 BLOSUM 62 矩阵，依此类推，产生其他打分矩阵。Henikoff 夫妇经过试验确认了 BLOSUM 62 的最佳性能，在实践中，BLOSUM 62 矩阵也渐渐成为许多蛋白质比对工具的标准。BLOSUM 矩阵的相似性是根据真实数据产生的，而 PAM 矩阵是通过矩阵自乘外推而来的。

在 BLOSUM 矩阵中，BLOSUM 编号数字越大，序列间的进化关系就越近（与 PAM 矩阵相反）。BLOSUM 矩阵是基于来源比 PAM 矩阵更加丰富的序列局部比对结果建立的。由于保守区域组块的比对含有各种不同进化距离的序列，所以，使用 BLOSUM 矩阵分析高度保守的残基可能会造成结果偏倚。

三、空位罚分

空位罚分包括两部分：空位起始罚分和空位延伸罚分。一般空位起始罚分高，而空位延伸罚分相对较低。所谓起始空位，是指序列比对时，在某一序列中插入一个空位，使两个序列之间有更好的匹配；所谓延伸空位，是指在引入一个或几个空位后，继续引入下一个连续的空位，使两个序列之间有更好的匹配。空位延伸罚分值可以与空位

起始罚分值相同，也可以比空位起始罚分值小。因此，序列比对最终结果的分数值是两个序列之间匹配残基的总分值与空位罚分的总和。

第三节 序列比对算法

一、 dotplot 算法

dotplot 算法是最古老的一种序列比对算法，该算法通过点阵作图的方法表示，能很直观地看出两条序列之间的相似性。

（一）算法步骤

1. 构建点阵矩阵

在一个矩阵中，将两条序列的碱基（或残基）分别沿 x 轴和 y 轴排列，依次比较两条序列的每个碱基（或残基），如果两个碱基（或残基）相同则在矩阵中填充点，这样就形成一个点阵矩阵。

2. 获得相似性片段

在点阵矩阵中，将位于对角线方向上相邻的点连接起来，这些直线所对应的矩形区域就是这两条序列的相似性片段。

（二）算法特点

由于算法思想所限，dotplot 算法获得的相似性片段实际上是相同片段，而且该算法不能提供相似片段在统计学意义上的相似性。

二、 动态规划算法

动态规划算法（dynamic programming algorithm）是最精确的一种序列比对算法，分为全局动态规划算法和局部动态规划算法。经典的全局动态规划算法由 Needleman 和 Wunsch 于 1970 年提出，称为 Needleman-Wunsch 算法，用于发现两条序列的全局水平上的相似性。

经典的局部动态规划算法由 Smith 和 Waterman 于 1981 年提出，称为 Smith-Waterman 算法，用于发现两条序列在局部水平上的相似性。

（一）算法步骤

1. 计算得分矩阵

使用迭代方法计算出两个序列的相似分值，存于一个得分矩阵中。在得分矩阵的计算过程中，Needleman-Wunsch 算法与 Smith-Waterman 算法计算方法相同。

2. 寻找最优的比对序列

根据第 1 步计算获得的得分矩阵，从最佳路径的终点根据上面的得分矩阵元素计算公式，利用回溯法寻找得到的路径就是一条最优路径，该路径代表了两条序列的最优比对结果。在此注意，在全局的动态规划序列比对算法中，最佳路径的终点是在最后一行最后一列的位置；而在局部的动态规划序列比对算法中，最佳路径的终点是在元素值最大的位置。

（三） 算法特点

动态规划算法的优点是比对非常精确；缺点是运行时间长，并不适合于数据量庞大的序列数据库搜索。

三、 BLAST 算法

BLAST 算法是由 Altschul 等在 1990 年提出的，其采用了一种短片段匹配算法和一种有效的统计模型来找出目的序列和数据库之间的最佳局部比对效果。它的基本思想是通过产生数量更少但质量更好的增强点来提高速度。

（一）算法步骤

- 1) 编译一个由查询序列生成的长度固定的字段编译列表。
- 2) 在数据库中扫描获得与编译列表中的字段匹配的序列记录。
- 3) 以编译列表中的字段对为中心向两端延伸以寻找超过阈值分数 S 的高分值片段对 (high-scoring segment pair, HSP)。

在 BLAST 算法过程中,有一个最重要的统计显著值为期望值(E值),它描述了在一次数据库搜索中随机条件下期望发生的得分大于 S 的不同比对的数目。该值对 BLAST 搜索中假阳性结果进行估计。

（二）算法特点

BLAST 算法是一种近似算法,特点是速度快且比较精确,因此是一种常用的比对算法。值得注意的是,动态规划算法与 BLAST 算法适用于不同的比对情况,动态规划算法适用于较少量序列之间的比对,而 BLAST 算法适用于从一组大量序列中搜索与查询相似的序列。

第四节 序列比对工具

序列比对工具,即序列比对数据库搜索工具,常用的有 EBI 的 FASTA 工具和 NCBI 的 BLAST 工具,它们是当前两大数据库搜索工具。

一、FASTA 工具

FASTA 是 FAST-ALL 的缩写,与前面介绍的序列储存格式 FASTA 无关,是一种可用于核酸和蛋白质序列的快速序列比对数据库搜索工具。该工具的算法是由 Pearson 与 Lipman 在 1988 年设计的,其程序

版本在不断进行更新升级，可以下载使用，也可在线进行比对。英国 EBI 的 FASTA 工具被广泛使用，FASTA 工具是一个程序集合，主要包括 FASTA、FASTX/Y、FASTF、FASTS 和 TFASTX/Y。

二、BLAST 工具

BLAST 工具是一种有效的序列数据库搜索工具，通过 BLAST 序列比对算法，从核酸或蛋白质序列数据库中找出与待检序列具有一定程度相似性的序列。例如，给定一个人类视黄醇结合蛋白 `rbp4` 序列，可以通过 BLAST 数据库搜索工具，在核酸或蛋白质序列数据库中找出与该序列相似的一系列序列集合。BLAST 工具实际上是一个程序集合，包括基本 BLAST 工具和高级 BLAST 工具。

（一）基本 BLAST 工具

基本的 BLAST 工具包括 `blastn`、`blastp`、`blastx`、`tblastn` 和 `tblastx` 等，其中，`blastn` 将一个 DNA 查询序列不同方向的两条链与一个 DNA 数据库进行比较；`blastp` 将一个蛋白质查询序列与一个蛋白质数据库进行比较；`blastx` 将一个 DNA 序列用所有可能的阅读框翻译成 6 个蛋白质，然后将它们逐一与一个蛋白质数据库进行比较；`tblastn` 将一个 DNA 数据库中的每一条序列翻译成 6 种可能的蛋白质，然后将要查询的蛋白质序列与翻译的蛋白质逐一进行比较；`tblastx` 将查询 DNA 及数据库中的 DNA 都翻译成 6 种可能的蛋白质，然后进行 36 次蛋白质-蛋白质数据库搜索。以下以 NCBI 的 Quick BLASTP 为例介绍基本 BLAST 工具的比对步骤，并对比对的结果进行解析。比对步骤如下。

1. 输入待检序列 可以输入待检序列的 **accession number** 或 **gi**，或者是该序列的 **FASTA** 格式；也可以接受序列文件上传。

2. 设置程序参数 **Database**: 可以选择 **nr**、**refseq_protein**、**swissprot**、**pat**、**pdb** 或 **env_nr** 数据库。其中，**nr** 是非冗余蛋白质序列数据库，该数据库包括 **GenBank CDS translations**、**RefSeq Proteins**、**PDB**、**Swiss-Prot**、**PIR** 和 **PRF** 的全体数据库的非冗余数据。

Organism: 将搜索限制到指定的物种。

Entrez Query: 可以对搜索用条件表达式来限制。

算法参数:

Expect threshold: 期望阈值，默认值为 10。

Word size: 字长，默认为 3，也可以设置为 2，这样搜索的结果将增加。

Matrix: 序列比对的打分矩阵，默认为 **BLOSUM 62**。

Gap costs: **BLAST** 采用线性空位罚分方式，为开放罚分和延伸罚分。默认的开放罚分值为 11，延伸罚分值为 1。

3. 比对结果解析 比对结果分为以下 4 个部分。

1) 该搜索的详细情况，包括 **BLAST** 搜索的类型、所搜索的数据库的描述、查询内容和分类连接 (**taxonomy reporter**)。

2) 显示的是数据库中与查询序列相匹配的项的简明图形。每一条彩色带表示数据库中与查询序列相匹配的蛋白质或核酸序列区域，不同颜色表示不同高低的得分。

3) 与查询序列相匹配的数据库中的序列列表。每一条序列包括

其 Score (Bits)、E-value 及该条序列在相应数据库中的链接。

4) 查询序列与目标序列之间的双序列比对情况。

(二) 高级 BLAST 工具

常用的高级 BLAST 工具有 PSI-BLAST、PHI-BLAST 和 MEGABLAST 等。

1. PSI-BLAST

PSI-BLAST (position specific iterated BLAST) 是位点特异性迭代 BLAST, 用来寻找远缘相关的蛋白质序列, 对于蛋白质的相似序列的寻找比常规 blastp 更敏感。

PSI-BLAST 工具的比对步骤为: ①用 blastp 在目标数据库中进行比对搜索; ②从第①步获得的结果构建多序列比对, 根据多序列比对构建一个位点特异性矩阵 PSSM; ③用第②步获得的 PSSM 矩阵再一次搜索目标数据库; ④位点特异性反复比对后用缺失比对的参数检验每个匹配的统计显著性; ⑤反复执行②~④步, 一般要重复 5 次, 而当新的结果不再出现或者程序明确指出不会再有新的结果出现时, 可以停止比对循环。

NCBI 的 PSI-BLAST 与 blastp 使用同一界面, 不同的是, 要注意 PSI-BLAST 有一个参数 PSI-BLAST Threshold, 在 PSI-BLAST 比对步骤的第②步中, 为了构建 PSSM 矩阵, 需要选择小于某个期望值的序列进行多序列比对, PSI-BLAST Threshold 就是这个期望值。

2. PHI-BLAST

PHI-BLAST (pattern hit initiated BLAST) 叫模式识别 BLAST,

PHI-BLAST 能找到与查询序列相似的符合某种模式 (pattern) 的蛋白质序列。例如, 有一个人类视黄醇结合蛋白 `rbp4`, 到数据库中寻找符合模式 `GXW [YF] [EA] [IVLM]` 的相似蛋白质序列。

3. MEGABLAST

MEGABLAST 是一种快速的局部核酸序列比对工具, 适用于基因预测、发现和分析单核苷酸多肽性等方面的工作。MEGABLAST 可以有效地识别相似性比较高的序列, 对于相似性达到 95% 以上的序列比对搜索结果, 是一种比 `blastn` 更为快速而准确的比对工具。例如, 当 `Word size` 值设到 16 或以上时, MEGABLAST 比 `blastn` 快 10 倍, 可以接受成批序列的数据库搜索任务。

第五节 多序列比对

一、多序列比对概述

(一) 多序列比对目的

多序列比对就是对 3 条以上 (包括 3 条) 序列进行的比对。进行多序列比对的目的是为了发现构成同一基因家族的成组序列之间的共性, 发现这些共性对于研究分子结构、功能及进化关系都有着非常重要的作用, 在阐明一组相关序列的重要生物学模式方面也起着重要的作用。例如, 通过多序列比对, 可以发现与结构域或功能相关的保守序列片段; 又如, 通过多序列比对, 可以发现蛋白质序列之间的系统发育关系, 从而更好地理解这些蛋白质之间的进化关系。

(二) 多序列比对定义

多序列比对就是对多条序列插入空位, 使得插入空位后的全局比

对结果具有相同的长度，并且比对结果中不能出现一列全为空位。

（三）多序列比对应用

多序列比对是分子生物学中重要的分析方法，可应用于发现新序列与已知序列家族的同源性，也可应用于蛋白质序列的二级和三级结构预测、发现蛋白之间的系统发生关系，以及蛋白质家族中结构或功能的相似片段获取等。

二、多序列比对算法

（一）动态规划算法

多序列比对的动态规划算法与双序列比对的动态规划算法思想相同，只是将维数由二维改变为多维。算法也是分为两个步骤：首先进行打分矩阵的计算，然后在打分矩阵中回溯寻找获得一条路径，该路径代表多序列比对结果。在该算法中的打分矩阵为多维矩阵。

（二）渐进式算法

渐进式算法是大多数多序列比对工具采用的算法，基本思想是基于相似序列通常具有进化相关性这一假设。该算法中，首先进行双序列比对，先将多个序列两两比对构建距离矩阵；然后进行指导树构建（guide tree, GT），根据距离矩阵计算产生指导树；最后进行渐进式比对，对关系密切的序列进行加权，然后从最紧密的两条序列开始，逐步引入邻近的序列并不断重新构建比对，直到所有序列都被加入为止。

（三）迭代算法

迭代算法的核心是使用比对记分函数反复添加一个附加的序列

到已知比对中。具体方法是：首先在所有的双序列比对中找出距离值最小的一组，组成最优比对；然后反复地找出与最优比对距离值最小的序列，与最优比对的表头文件进行匹配，并且根据所得的结果相应地 修改最优比对和表头文件。

（四） 统计概率算法

常用的统计概率算法是隐马尔可夫模型（hidden Markov model, HMM）。在该模型中，HMM 是描述大量相互联系状态之间发生转换概率的模型，本质上是一条表示匹配、缺失或插入状态的链，当用于多序列比对计算时，可用来检测序列比对结果中的保守区。序列比对结果中的每一个保守残基可以用一个匹配状态来描述，空位的插入可用插入状态描述，残基缺失状态则表示允许在本该匹配的位置发生缺失。因此，应用隐马尔可夫模型进行多序列比对，就是需要把所有的位置都用匹配、插入或者缺失这 3 种状态中的一种表示。

三、多序列比对工具

（一） ClustalX/W 工具

ClustalX 和 ClustalW 是两个使用最广泛的多序列比对工具，均采用渐进式多序列比对算法，不同的是，ClustalX 具有图形界面，而 ClustalW 是文本界面。ClustalX/W 的源代码、程序都可以免费获得，而且很多网站提供基于不同操作系统的版本。本章只介绍 ClustalX 的使用方法。采用 ClustalX 的比对步骤如下。

1. 加载要比对的序列文件

在“File”菜单的“Load Sequences”项加载要比对的序列文件。

该序列文件存放的是要进行多序列比对的所有序列，序列格式可以支持 NBRF/PIR、EMBL/Swiss-Prot、FASTA (Pearson, NCBI)、GDE、Clustal、MSF (GCG) 和 RSF (GCG) 等多种格式。

2. 多序列比对

在“Alignments”菜单下选择“Do Complete Alignment”进行完整的序列比对。此时会出现一个交互式对话框，可以对比对的参数进行修改。该程序的比对也可拆分为两步执行：选择“Alignments”菜单下的“Produce Guide Tree”进行渐进式比对的前两个步骤，即进行双序列比对和构建指导树；选择“Alignments”菜单下的“Do Alignment from Tree”，可根据产生的指导树进行最后一步的渐进式比对。

3. 比对结果输出

在“File”菜单下可选择多序列比对结果的输出格式，可支持的输出格式有 CLUSTAL、NBRF/PIR、GCG/MSF、PHYLIP、GDE、NEXUS、FASTA。

(二) Clustal Omega 工具

Clustal Omega 是 Clustal 家族的最新成员。与 ClustalX/W 相比，Clustal Omega 显著提高了可扩展性，支持多线程运行，可在几小时内比对数十万条序列。此外，根据一系列的评估测试，Clustal Omega 的比对结果优于先前的版本。目前，Clustal Omega 只发行了命令行工具版本，没有图形化界面，但其也提供了网络服务器方便用户在线处理小规模的对任务。

(三) T-Coffee 工具

T-Coffee 是一种核酸或氨基酸的多序列比对工具，但是它更适合于对蛋白质序列进行对比。其算法由 Jaap Heringa 等于 2000 年设计，过程通常分为生成基本信息库、扩展库、生成指导树、渐近式比对 4 个阶段。与常用的多序列比对工具 Clustal 相比，T-Coffee 增加了序列位置等信息，使用起来更为方便。另外，T-Coffee 是一种比 Clustal 准确率和敏感性更高的多序列比对工具，但是速度较慢。然而，在对相似性较高的相关序列比对中，T-Coffee 如果选择快速模式，可以比 Clustal 的比对速度更快。T-Coffee 官方网站是 <http://tcoffee.vital-it.ch/>，可以在线进行多序列比对，也可以从该网站下载软件本地使用，并提供 UNIX、LINUX、MacOSX、Microsoft Windows、Cygwin 等运行于多个平台的版本。

（四）MultAlin 工具

MultAlin 是 Florence Corpet 开发的一种核酸和蛋白质多序列比对工具。该工具采用算法的基本思想是启发式聚类（**hierarchical clustering**），首先将序列进行双序列比对，然后根据双序列比对获得的分值进行分层次的聚类，在聚类的基础上进行多序列比对，最后根据多序列比对中的双序列比对的分值建立指导树。这个过程不断循环直到分值上升，此时多序列比对结束。MultAlin 可以在 <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> 上在线执行，可支持多种序列格式，使用起来比较方便，但是该工具运算时间长，并且运算空间要求比较高，所以仅仅适用于序列比较少且序列长度比较短的情况。

（五）MAFFT 工具

MAFFT (multiple alignment using fast fourier transform) 是一种非常快速的多序列比对工具, 其算法基于快速傅里叶变换, 把比对序列表示成向量序列, 把序列信息看成信号, 用 Fast Fourier Transform 进行“信号处理”, 从而得到多序列比对结果。该工具的显著特点是速度快, 尤其对于高度保守的序列更为明显, 而在准确度方面却与 T-Coffee 工具相当。MAFFT 工具可以下载使用, 目前可支持多种操作系统, 如 Windows 和 Linux 等, 也支持在线使用。

第四章 蛋白质结构预测与分析

蛋白质结构决定功能，此即蛋白质科学的首要法则。事实上，没有任何一种其他类型的生物大分子可能完全行使蛋白质分子经过数百万年进化所积累的所有生物学功能。因此，研究分析蛋白质的结构意义重大。研究蛋白质结构，有助于了解蛋白质如何行使其生物功能，认识蛋白质与蛋白质（或其他分子）之间的相互作用，这无论是对于生物学，还是对于医学和药学，都是非常重要的。对于未知功能或者新发现的蛋白质分子，通过结构分析，可以进行功能注释。通过分析蛋白质的结构，确认功能单位或结构域，可以为遗传操作提供目标，为设计新的蛋白质或改造已有蛋白质提供可靠的依据，同时为新的药物分子设计提供合理的靶分子及结构。

第一节 蛋白质结构组织层次

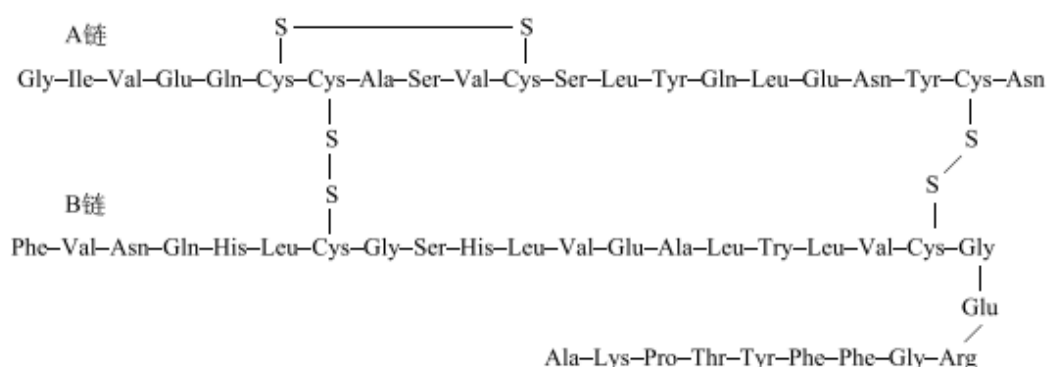
蛋白质分子是一类结构极其复杂的生物大分子，其分子结构的多样性和复杂性是功能多样性的基础。丹麦生物化学家 Linderstram 首先将蛋白质结构划分为一级结构、二级结构和三级结构；随后，英国科学家 Bernal 又使用四级结构来描述复杂的蛋白质结构。随着实验技术的发展，在二级结构和三级结构之间又发现了超二级结构和结构域，从而揭示了蛋白质结构丰富的组织层次。

一、蛋白质结构特征

（一）一级结构

蛋白质的一级结构（primary structure）是指多肽链的氨基酸残基的排列顺序，它是由氨基酸个体通过肽键共价连接而成的。氨基酸是

构成蛋白质一级结构的基本单位,天然蛋白质中的常见氨基酸共有 20 种。若两个不同蛋白质的一级结构具有显著相似性,则称它们很可能彼此同源 (homology)。一级结构是蛋白质结构层次体系的基础,它是决定更高层结构的主要因素。

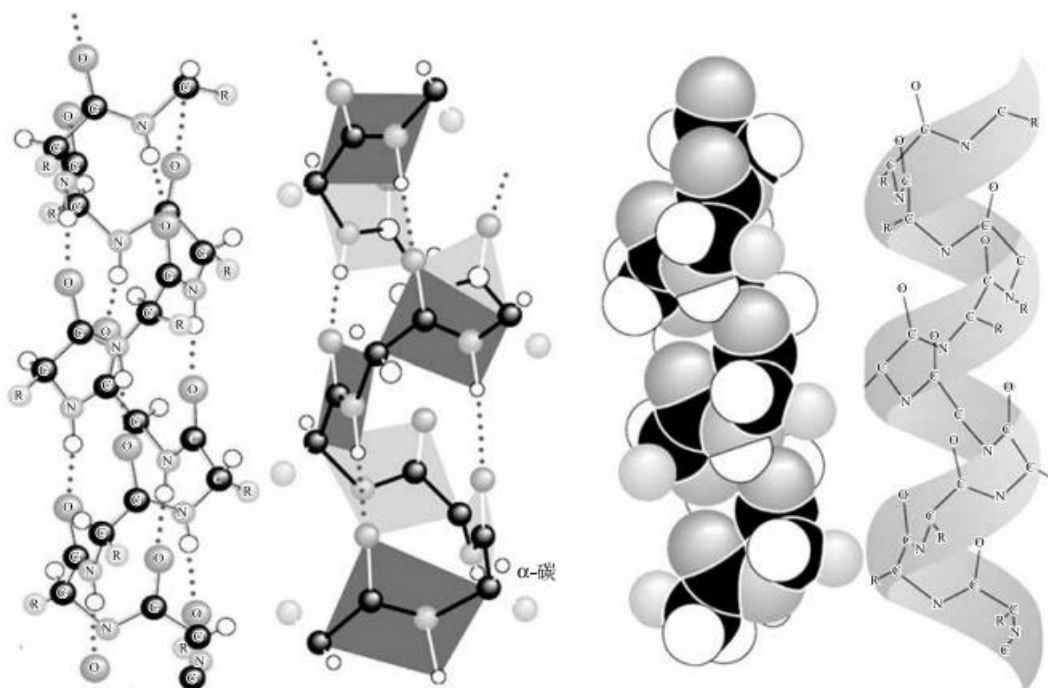


(二) 二级结构

蛋白质二级结构 (secondary structure) 是指多肽链主链原子借助于氢键沿一维方向排列成具有周期性的结构构象,是多肽链局部的空间结构 (构象),主要有 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角、无规卷曲等形式。

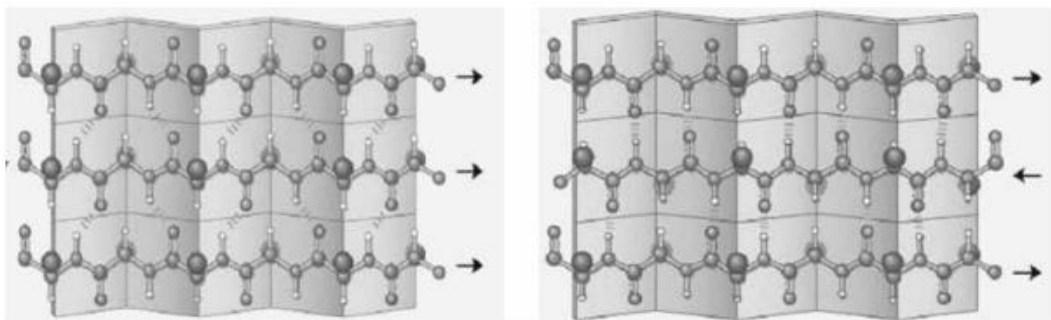
1. α 螺旋

α 螺旋 (α -helix) 是蛋白质中最常见、最典型、含量最丰富的结构元件,是一种重复性结构。其结构特征为: ①主链骨架围绕中心轴盘绕形成右手螺旋; ②螺旋每上升一圈是 3.6 个氨基酸残基,螺距为 0.54nm; ③相邻螺旋圈之间形成氢键; ④侧链基团位于螺旋的外侧。不利于 α 螺旋形成的因素主要是: ①存在侧链基团较大的氨基酸残基; ②连续存在带相同电荷的氨基酸残基; ③存在脯氨酸残基。



2. β 折叠

β 折叠 (β -pleated sheet) 结构是 1951 年由 Pauling 等首先提出来的，在许多蛋白质中存在。折叠可以有两种形式，一种是平行式 (parallel)，另一种是反平行式 (antiparallel)。在平行 β 折叠中，相邻肽链是同向的，而在反平行 β 折叠中，相邻肽链是反向的。 β 折叠中每条肽链称为 β 折叠股，它可以设想为一个二重螺旋或二重带，每螺圈含两个残基。其结构特征为：①若干条肽链或肽段平行或反平行排列成片；②所有肽键的 C—O 和 N—H 形成链间氢键；③侧链基团分别交替位于片层的上、下方。



3. β 转角

β 转角 (β -turn) 常发生于多肽链 180° 回折时的转角上, 通常由 4 个氨基酸残基构成, 借 1、4 残基之间形成氢键, 可以形成一个紧密的环, 使 β 转角成为比较稳定的结构。目前发现 β 转角多数存在于球状蛋白质分子表面, 它是一种非重复性结构。

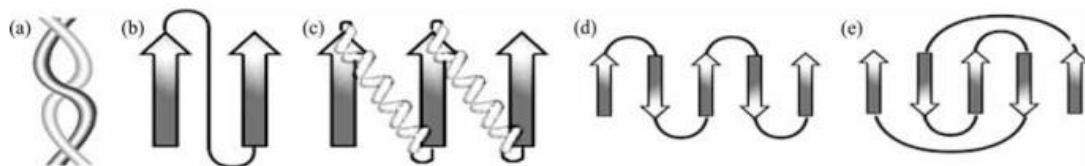
4. 无规卷曲

无规卷曲是主链骨架无规律盘绕的部分, 泛指那些不能归入明确的二级结构 (如折叠片或螺旋) 的多肽区段。无规卷曲常出现在 α 螺旋与 α 螺旋、 α 螺旋与 β 折叠、 β 折叠与 β 折叠之间。它是形成蛋白质三级结构所必需的, 酶的功能部位常常处于这种构象区域。

(三) 超二级结构、结构域

超二级结构 (supersecondary structure) 和结构域 (domain) 是介于蛋白质二级结构与三级结构之间的空间结构。

超二级结构是指相邻的二级结构单元组合在一起, 彼此相互作用, 排列形成规则的、在空间结构上能够辨认的二级结构组合体, 同时充当三级结构的构件 (building block), 其基本形式有 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ 和 $\beta\alpha\beta$ 等。如下图。



结构域是在超二级结构的基础上形成的三级结构的局部折叠区，它是相对独立的紧密球状实体，通常由 50~300 个氨基酸残基组成，其特点是在三维空间可以明显区分和相对独立，并且具有一定的生物功能。模体 (motif) 是结构域的亚单位，长度可以从几个氨基酸到几十个氨基酸，通常由 1~3 个二级结构单位组成，一般为 α 螺旋、 β 折叠和环 (loop)。较大的蛋白质分子一般含有 2 个以上的结构域，其间以柔性的铰链 (hinge) 相连，以便相对运动。

(四) 三级结构

三级结构 (tertiary structure) 是指整条多肽链的三维结构，包括骨架和侧链在内的所有原子的空间排列。三级结构是在二级结构的基础上进一步盘绕、折叠，通过氨基酸侧链之间的疏水相互作用、氢键、范德瓦耳斯力和静电作用形成并维持的。如果蛋白质分子仅由一条多肽链组成，三级结构就是它的最高结构层次。

(五) 四级结构

四级结构 (quaternary structure) 是指在亚基和亚基之间通过疏水作用等次级键结合成为有序排列的特定的空间结构。亚基 (subunit) 通常由一条多肽链组成。构成四级结构的每条肽链，称为一个亚基 (subunit)。亚基通常由一条多肽链组成，虽然具有二级、三级结构，但是在单独存在时并没有生物学功能，只有完整的四级结构才具有生

物学功能。

二、蛋白质结构分类系统

蛋白质结构分类是蛋白质结构研究的一个重要方向，是功能分类和功能进化研究的重要依据。近年来，已知蛋白质结构的数量迅速增加，这为蛋白质结构分类提供了新的更加丰富的数据基础。同时，蛋白质结构预测、蛋白质折叠及蛋白质工程研究，需要更加深入和系统的蛋白质结构分类知识。因此，不断发展出了一系列按层次体系对蛋白质结构进行分类的新方法、新程序，并将应用这些方法所获得的分类知识构建成数据库，免费开放使用。蛋白质结构分类数据库是三维结构数据库的重要组成部分。蛋白质结构分类可以包括不同层次，如折叠类型、拓扑结构、家族、超家族、结构域、二级结构、超二级结构等。网络公开的蛋白质分类数据库很多，此处简单介绍两个主要的蛋白质结构分类数据库——SCOP2 和 CATH。

（一） SCOP2 数据库

英国医学研究委员会（Medical Research Council, MRC）的分子生物学实验室和蛋白质工程研究中心于 2014 年 2 月正式发布了蛋白质结构分类数据库 SCOP（structural classification of proteins）的全面升级版 SCOP2。该数据库在搜集、整理、分析 PDB 数据中已知的蛋白质三维结构的基础上，详细描述了已知结构的蛋白质在结构、进化事件与功能类型 3 个方面的关系。鉴于目前结构自动比较程序尚不能可靠地鉴别所有的结构和进化关系，数据库的构建除了使用计算机程序外，主要依赖于人工验证。由于蛋白质结构种类繁多、大小不一，

有的只有一个结构域，有的则有许多结构域，构建结构分类数据库是一项十分复杂的工作。对于某些蛋白质，有时需要同时从单个结构域和多个结构域水平加以考虑。SCOP2 把 SCOP 中仅基于蛋白质结构的树状等级分类系统发展成为同时考虑结构、进化事件与功能类型 3 个方面的单向非循环网状分类系统。在这个网状系统中，两个蛋白质之间存在的多条路径可以表示出二者之间在不同方面的关系。在 SCOP2 数据库里搜索新序列、新结构，可以得到与之相似的已知结构和功能的蛋白质，从而预测新序列、新结构的功能。SCOP2 数据库可以通过主页上的搜索栏和整体数据浏览功能进行数据访问，网址为 <http://scop2.mrc-lmb.cam.ac.uk/>。

SCOP2 把所有已知三维结构的蛋白质分成 4 个层次，最高层次为结构类型 (class)，每个结构类型又分为不同的折叠 (fold)，每个折叠再分为不同超家族 (superfamily)，最后，每个超家族分为不同家族 (family)。不同分类层次，反映不同程度的结构相似性。

家族：SCOP2 数据库的第一个分类层次为家族，其依据为序列同一性程度。通常将序列同一性在 30% 以上的蛋白质归入同一家族，即它们之间有比较明确的进化关系。当然，这一指标也并非绝对。某些情况下，尽管序列的同一性低于这一标准，如某些珠蛋白家族的序列同一性只有 15%，但也可以从结构和功能相似性推断它们来自共同祖先。

超家族：如果序列相似性较低，但其结构和功能特性表明它们有共同的进化起源，则将其视为超家族。

折叠：无论有无共同的进化起源，只要二级结构单元具有相同的排列和拓扑结构，即认为这些蛋白质具有相同的折叠方式。在这些情况下，结构的相似性主要依赖于二级结构单元的排列方式或拓扑结构。

结构类型：包括 α 螺旋结构域、 β 折叠结构域、 α/β 结构域（主要由“ β - α - β ”结构单元或平行的 β 片层结构组成）、 $\alpha+\beta$ 结构域（主要由反向平行的 β 片层结构和独立的 α 螺旋结构组成）、多结构域蛋白、细胞膜和细胞表面蛋白，以及多肽（不包括免疫系统的有关蛋白）、“小”蛋白、卷曲螺旋蛋白、已经获得低分辨率蛋白质结构的蛋白、多肽和多肽片段、人工设计的蛋白质和非天然蛋白序列。

（二） CATH 蛋白质结构分类数据库

CATH 是另一个著名的蛋白质结构分类数据库，与 SCOP2 类似，CATH 也是自上而下把已知蛋白质结构分为 4 个层次：类型（class）、构架（architecture）、拓扑结构（topology）和同源性（homology）。CATH 这个名称也是来源于这 4 个层次名称的首字母，它由英国伦敦大学 UCL 开发和维护。CATH 数据库的构建既使用计算机程序，也进行人工检查，但人工检查内容比重低于 SCOP2。CATH 数据库的分类基础是蛋白质结构域。CATH 的第一个层次把蛋白质分为 4 类，即 α 主类、 β 主类、 α - β 类（ α/β 和 $\alpha+\beta$ 类）和低二级结构类。低二级结构类是指二级结构成分含量很低的蛋白质分子。CATH 数据库的第二个层次分类依据为由 α 螺旋和 β 折叠形成的超二级结构排列方式，而不考虑它们之间的连接关系。形象地说，就是蛋白质分子的构架，如同建筑物的立柱、横梁等主要部件，这一层次的分类主要依靠人工方法。

第三个层次为拓扑结构，即二级结构的形状和二级结构间的联系。第四个层次为结构的同源性，它是先通过序列比对，然后再用结构比较来确定的。CATH 数据库的最后一个层次考虑了序列（sequence）水平上的相似性，在这一层次上，只要结构域中的序列同源性大于 35%，就被认为具有高度的结构和功能相似性。对于较大的结构域，则至少要有 60% 与小的结构域相同。

CATH 数据库可以通过 UCL 的生物分子结构和模拟实验室的网络服务器来查询，网址为 <http://www.cathdb.info/>。通过 UCL 生物分子结构和模拟实验室的网络服务器还可以查询 PDBsum 数据库。PDBsum 数据库提供对 PDB 数据库中所有结构信息的总结和分析。每个总结给出了与 PDB 库中条目相关的简要信息，如分辨率、R 因子、蛋白质主链数目、配体、金属离子、二级结构、折叠图和配体相互作用等。这不但有助于了解 PDB 数据库中包含的结构信息，而且提供了获取一维序列、二维序列模体和三维结构信息的统一的用户界面。随着计算机图形技术的发展，这种图文并茂的网络资源会越来越多，新一代的计算机软件可以使用户更方便地利用这些信息资源。

第二节 蛋白质结构的测定与理论预测

一、蛋白质结构的实验测定

根据蛋白质的状态，测定蛋白质三维结构的方法分为三大类：① X 射线晶体衍射图谱法（X-ray crystallography）和中子衍射法测定晶体中的蛋白质分子构象；②核磁共振法（nuclear magnetic resonance, NMR）测定溶液中的蛋白质构象；③电子显微镜二维晶体三维重构

(电子晶体学, [electron crystallography, EC](#))。

(一) X 射线晶体衍射图谱法

X 射线衍射可以确定原子精度的结构。对于有机分子和蛋白质, 可以给出几百到上万个原子的相对坐标。衍射方法的空间分辨率是由 X 射线源的波长决定的。测得的原子位置的精度还受到晶体衍射能力的限制。蛋白质晶体的特点是晶胞中含有很多水分子, 它们是无序的, 与水溶液的液体状态类似。它们经常占到晶胞的 50%~70%, 这保证了蛋白质的结构与溶液中的结构非常相似。有实验表明, 蛋白质在晶体中仍然可以进行正常的催化反应, 而且蛋白质晶体非常脆弱, 很小的温度升高(几摄氏度)就可以使晶体融化, 这说明晶格堆积的能量很小, 这样小的能量一般不会使蛋白质的结构产生本质的重大改变。多年的实验结果表明, 晶体结构均有很强的生物相关性, 非常可靠。到目前为止, 尚未发现任何重要的反例。二维核磁共振技术发明以来, 同样证明溶液结构与晶体结构有很强的一致性。因此, 测定晶体结构是蛋白质结构测定的最重要的手段之一。最近几年, 由于结构基因组学的大量投入, 蛋白质晶体学的实验方法得到了飞速的发展, 自动化程度越来越高, 如很多实验室现在配备有结晶机器人。然而, 生产足够量的、可溶的、稳定的、有生物功能和活性的蛋白质是晶体学目前最大的难题。

(二) 核磁共振法

核磁共振是指核磁矩不为零的核, 在外磁场的作用下, 核自旋能级发生塞曼分裂, 共振吸收某一特定频率的射频([radio frequency, RF](#))

辐射的物理过程。

近年来，NMR 法测定小蛋白质的三维结构得到了成功的应用。NMR 法不需要制备蛋白质晶体的基本过程，但这种方法仅限于分析长度不超过 150 个氨基酸残基的小蛋白质。NMR 法测定蛋白质三维构象的特点是：①可测定溶液中接近于生理状态的蛋白质构象；②可测定小分子和蛋白质作用的动力学过程；③可测定蛋白质可变形的尾部的构象，它往往和蛋白质的活性功能紧密相关；④NMR 法是一种非损伤性测定法，对样品无破坏作用。

（三） 电子显微镜二维晶体三维重构

冷冻电子显微镜技术（cryoelectron microscopy）是 1968 年由 de Rosier 和 Klug 提出的，他们第一次利用此技术对 T4 噬菌体的尾部进行了结构解析，此后经过 10 年的努力，该技术在 20 世纪 80 年代趋于成熟。它的研究对象非常广泛，包括病毒、膜蛋白、肌丝、蛋白质核苷酸复合体、亚细胞器等。电子显微镜在结构生物学中的应用近年来变得越来越重要，成为解析大型蛋白质复合体、病毒乃至细胞器的三维纳米分辨率结构的有力手段；同时，电子显微镜二维晶体学在膜蛋白的三维精细结构解析上也有特殊的优势。尤其是最近几年随着计算机图像处理技术和显微镜设备的不断发展，冷冻电镜三维重构技术已经成为继 X 射线和 NMR 技术后，生物大分子结构研究的另一种重要方法。该技术可以直接获得分子的形貌信息，即使在较低分辨率下，电子显微学也可给出有意义的结构信息。它不仅适于捕捉动态结构变化信息，还适于解析那些不适合应用 X 射线晶体学和核磁共振技术

进行分析的样本，如难以结晶的膜蛋白、大分子复合体等。而且，冷冻电镜三维重构技术易与其他技术相结合可得到分子复合体的高分辨率结构信息。同时，电镜图像包含的相位信息使其在相位确定上要比 X 射线晶体学直接和方便。

二、蛋白质结构比对

(一) 蛋白质结构比对的目的是意义

结构比对就是对蛋白质三维空间结构的相似性进行比较，它是蛋白质结构分析的重要手段之一。与蛋白质序列比对相比，蛋白质结构比对算法要复杂得多。一个标准的蛋白质结构比对结果包括以下信息：①产生一个参数来衡量蛋白质结构之间的相似性；②产生两个蛋白质的序列比对结果，同一比对位置上的氨基酸意味着它们在空间结构上具有相似性；③产生结构叠加后的蛋白质结构文件(PDB 文件格式)，可以根据叠加后的结构文件通过合适的蛋白质结构图形显示软件，具体观测两个蛋白质结构的相似性。

蛋白质结构比对通常可应用于以下几个方面。

1) 结构比对可用于探索蛋白质进化及同源关系，特别是那些结构相似而序列不相似的弱同源蛋白，结构比对是分析它们之间进化关系的重要手段之一。

2) 结构比对能够改进序列比对的精度。结构比对往往被当作是序列比对的金标准 (gold standard)。人们通过对大量结构比对的结果进行分析，有助于开发序列比对的新算法。

3) 结构比对能够对蛋白质结构预测提供帮助。目前一些蛋白质

结构预测方法，如 FUGUE 和 3D-PSSM 等折叠识别方法都是通过结构比对来获得相应模板蛋白质结构上的一些保守信息，并把这些信息应用于折叠识别中衡量待测序列和模板结构的相容性。结构比对也是评价蛋白质结构预测模型优劣的一个主要工具。

4) 结构比对为蛋白质结构分类提供依据。例如，CATH 数据库是用一种半自动化的方式对蛋白质结构进行分类，分类过程中用到了结构比对算法 SSAP。另外，FSSP 数据库则是采用结构比对方法 DALI 对蛋白质结构进行自动分类。

5) 蛋白质结构的比对还为一些以结构为基础的蛋白质功能注释方法提供帮助。蛋白质通过其特定的三维结构行使其生物学功能，有相似结构的蛋白质往往具有相似的或进化上有联系的功能。

(二) 蛋白质结构比对的基本原理

进行蛋白质结构比对最直接的方法就是通过蛋白质空间结构图形显示软件，采用手动的办法将一个蛋白质结构移到另外一个蛋白质结构上，然后观测两个结构相似的部分。这种方法仅局限于两个结构非常相似的蛋白质，而对那些仅享有部分共同子结构的蛋白质，该方法很难奏效。因此，更实用的结构比对方法往往需要采用一些较复杂的策略。目前，已开发的蛋白质结构比对方法中最常用的策略就是启发式的方法：首先对两个蛋白质结构定义结构相似的部分（equivalent set，或称共同子结构）；然后通过多次迭代策略来调整共同子结构，直到找出优化的结构比对，即找到两个蛋白质空间上最大的重叠部分。一系列方法已被用来定义初始共同子结构，如动态规划法、距离矩阵

比较法和最大共同子图检测法等。对初始共同子结构进行优化采用的方法有动态规划法、蒙特卡罗模拟、模拟退火、遗传算法和优化路径的组合扩张方法等。

在共同子结构寻优及评价两个蛋白质最终结构比对的相似性的过程中，都需要一个打分函数来定量衡量两个蛋白质的共同子结构部分的相似性。打分函数主要分为两类：①分子间距离；②分子内距离。分子间距离常用的是分子间均方根偏差（root mean square deviation, RMSD 或 cRMS），它表示的是两个优化叠加的子结构中对应的原子对间的距离差值的平方的平均值，再开方。

所谓刚体转化，就是将蛋白质 A 的结构（即待比对蛋白）经过平移（translation）和旋转（rotation）操作，叠加到蛋白质 B（即目标蛋白）的结构上，使得 cRMS 最小（即优化叠加）。必须指出的是，比对那些序列相似性很低的蛋白质结构的时候，通常不考虑侧链，因为这些侧链的相似性往往很低。有时为了提高计算效率，很多结构比对算法中只考虑蛋白质骨架上的原子或只考虑 C_{α} 。

常用的分子内距离打分函数是分子内均方根距离，它衡量的是两个子结构中对应的距离矩阵的相似性。

（三）常用结构比对方法

一个好的结构比对方法必须高度自动化，而且具有非常快的运算速度，只有这样才能满足我们对大量蛋白质结构聚类的要求，或搜索结构数据库中与目标蛋白结构相似的蛋白质的需要。迄今为止，已有超过几十种的结构比对方法被相继开发，其中一些优秀的方法（如 CE、

DALI 及 TM-align 方法) 已得到了广泛的应用。

1. DALI 方法 DALI 方法是采用分子内距离的方法, 它的主要策略是通过将结构相似的氨基酸片段拼接成一个完整的结构比对 (Holm and Sander, 1993)。

2. CE 方法 CE 方法也属于分子内距离比较的方法。与 DALI 相似, CE 也是通过结构比对上的氨基酸片段连续地拼接成整个结构比对。

3. STRUCTURAL 方法 STRUCTURAL 方法采用分子间距离的方法实现两个蛋白质的结构比对。

4. SSM 方法 SSM (secondary structure matching) 方法也是采用分子间距离的方法来实现两个蛋白质的结构比对。

5. TM-align 方法 TM-align 方法采用类似于分子间距离的方法来实现两个蛋白质的结构比对, 其主要特色是使用 TM-score 来描述两个子结构的相似性。

三、蛋白质结构预测

蛋白质结构预测的理论基础是蛋白质的高级结构主要由蛋白质一级序列决定。与通过蛋白质组学和基因组学技术获得的海量蛋白质序列数据相比, 实验测定的蛋白质结构数据还远远不能满足人们对蛋白质功能研究的需要。因此, 通过生物信息学的手段开展蛋白质结构理论预测具有非常重要的学术意义和实际应用价值。迄今为止, 蛋白质结构预测已走过 40 多年的历程, 已取得长足的进步, 许多预测方法相继被开发, 并被频繁地应用在生命科学研究中的诸多领域。按照

预测的任务划分,蛋白质结构预测主要可分为二级结构预测和三级结构预测,先二级结构预测,再三级结构预测。

(一) 二级结构预测

蛋白质二级结构指的是蛋白质主链的折叠产生由氢键维系的有规则的构象,包括三种最主要的二级结构元件(secondary structure element)—— α 螺旋(H)、 β 折叠(E)和无规卷曲(C)。二级结构预测主要就是要预测一个蛋白质序列中每个氨基酸所处的二级结构元件(即H、E或C),虽然一些二级结构预测方法也对不经常出现的其他二级结构元件进行预测。对经大量实验测定的蛋白质序列与结构的统计分析表明,不同氨基酸及其所处的局部氨基酸片段(sequence context),其形成特定二级结构的倾向性是不同的。二级结构预测的基本原理就是通过对结构已经测定的蛋白质的序列及其二级结构对应关系的统计分析,学习和归纳出一些预测规则,用待测蛋白质的二级结构预测。蛋白质二级结构预测开始于20世纪60年代中期,经过科学家的不懈努力,迄今为止,文献上已报道了几十种不同的预测方法,在预测精度方面也取得了较为满意的结果,目前一些主流的蛋白质二级结构预测方法的预测精度可接近80%。

可以将已开发的二级结构预测方法的发展大致分为3代。第一代方法指的是1980年以前开发的方法,主要特点是采用简单的统计方法,基于对单个残基形成不同二级结构的统计,代表性的方法有Chou-Fasman方法,总体上预测准确性不超过60%。第二代方法指的是1980~1992年开发的方法,主要特点是采用更为复杂的统计方法

（如信息论的考虑）和预测中对残基所处的周围氨基酸片段的考虑，代表性的方法有 GOR III，总体精度不超过 65%。第三代方法指的是 1992 年以后开发的预测方法，这代方法的显著特点是采取更为先进的机器学习方法（如神经网络），将多序列比对作为预测的输入，代表性的方法有 PHD 和 PSIPRED 方法，总体上这代方法预测精度大大提高，普遍可超过 70%。总体上看，第一代方法和第二代方法总体精度还不够好，比随机预测好得有限；只有到了第三代方法，二级结构预测的精度才令人满意。

目前，随着二级结构预测的日趋成熟，蛋白质二级结构预测进入实用阶段，应用范围进一步扩大。二级结构预测的意义和应用价值在于：①根据二级结构预测的结果，可迅速对预测蛋白可能的空间结构有大致了解，可用于对预测蛋白结构的初步分类、预测蛋白中不同结构域或功能域的界定；②二级结构预测结果还频繁地用于蛋白质序列和结构分析中的其他生物信息学问题，如好的二级结构预测结果有助于提高蛋白质序列比对的精度，好的预测结果还可用来预测蛋白质的功能位点；③二级结构是联系一级结构和三级结构的桥梁，所以二级结构预测可为三级结构预测提供一个很好的起始条件。

1. 蛋白质二级结构预测方法

（1）DPM（双重预测方法）。先预测蛋白质的结构分类再预测序列的二级结构，分为 4 步：从氨基酸组分预测蛋白质结构分类，用简单算法初步预测二级结构，比对两个独立预测，最后优化参数得到二级结构。

(2) DSC 算法。将二级结构预测分为两步，首先预测基本概念，然后利用简单线性统计方法结合概念预测二级结构，其准确率较高。

(3) PHDsec。基于多序列比对结果，使用神经网络算法预测二级结构，是第一个预测准确率超过 70%的方法。

(4) SOPMA。采用 GOR、Levin 同源预测方法、DPM、PHD 和 CNRS 的 SOPMA 这 5 种相互独立的方法预测，输出并汇集整理“一致预测结果”。

(5) MLRC 算法。集 GOR4、SIMPA96 和 SOPMA 为一体，处理蛋白质二级结构预测结果，并估计分类的后验概率。

(6) Jpred。运用 Jnet 神经网络算法预测二级结构。

2. 蛋白质结构域识别方法

结构域对应独立折叠的一段连续氨基酸序列，通常由一个基因外显子编码，并具有特定功能。一般是构成蛋白质亚基的紧密球状区域，在蛋白质中具有相对独立三级结构。在较大的蛋白质中，结构域之间通过较短的多肽柔性区互相连接，形成二级结构与三级结构之间的一个过渡层次。一般每个结构域由 100~200 个氨基酸残基组成，构成独特空间构象，实现特定生物化学功能，是蛋白质工程化设计的基本单位。结构域识别方法主要包括：根据蛋白质空间结构信息利用机器学习方法获取结构域信息的方法、通过对具有代表性三级结构的蛋白质建立隐马尔可夫模型方法、分析蛋白质序列构象熵值判定结构域边界的方法、运用神经网络从蛋白质序列获取结构域边界方法和基于经验的人工划分方法等。

3. 基于基序的方法

基于基序 (motif) 的方法通过识别功能相关的蛋白质中保守的三维基序, 并建立这些保守的基序和保守的蛋白质功能间的映射关系用于预测目标蛋白质的某些生物化学功能。

(1) STE 程序和数据库储存了酶活性位点保守基序信息。此数据库用位点匹配程序寻找关键的功能位点残基作为保守残基。但是这些数据分析发现, 即使高度同源的蛋白质, 有些程序认证的功能位点残基也不保守, 即不属于结构基序。因此, 需要仔细分析这些信息以寻找新蛋白质的未知功能。

(2) TESS 程序。采用了几何散列算法, 通过模板研究和重叠, 从蛋白质的高级结构中寻找保守的必需残基。

(3) 模糊功能形态 (FFF)。从三维信息角度认证与生物学功能相关位点的保守性。其用主链 α 碳原子坐标进行匹配。

(4) SPASM。同时用主链 α 碳原子和侧链基团作为分析对象, 并列寻找保守残基, 并用于搜寻结构数据库中能匹配的已知功能蛋白。

(5) 分子识别策略分析。是基于已知功能域四周原子的叠合认证保守性预测蛋白质功能。

(6) 蛋白质侧链的保守模式分析。类似于前述的 TESS、FFF 和 SPASM, 分析重复出现的氨基酸侧链的保守性。这种方法只需新蛋白质的结构数据和与之关联的多重序列比对。

严格来说, 二级结构预测还仅仅属于蛋白质结构性质的预测, 离三级结构预测的目标尚远。目前, 属于这一范畴的其他预测问题还有

蛋白质的表面可及性预测、膜蛋白的跨膜区预测、蛋白质序列中氨基酸在空间结构中是否存在接触的预测等。研究发现，许多蛋白质中部分序列片段在生理条件下不能形成固定的二级结构，即不能折叠成稳定的三维构象。这种区域通常称为蛋白质混乱区（disordered region），它对蛋白质的功能具有重要的影响，如蛋白质混乱区经常被用来调控蛋白质-蛋白质相互作用。蛋白质混乱区的预测也属于蛋白质结构性质的预测，是近几年来蛋白质生物信息学中的一个热点课题。

（二） 三级结构预测

蛋白质三级结构预测方法主要可分为三类：同源模建、折叠识别和从头计算。同源模建（homology modeling）是发展最为成熟的蛋白质结构预测方法，迄今已有 20 余年的历史。其基本原理是基于蛋白质序列和结构的进化关系，即两个蛋白质如果具有足够的序列相似性，则它们具有相似的空间结构。因此，通过寻找与待测序列同源的、结构已测定的蛋白质，并将其作为模板，可实现对待测蛋白质的结构预测。蛋白质折叠识别（fold recognition）又称穿线法（threading method），是过去十几年研究最为活跃的结构预测方法。其主要原理是蛋白质空间结构比序列更为保守，即两个序列相似性很低的蛋白质也有可能存在很高的结构相似性（弱同源性）。因此，可以通过寻找与待测序列弱同源的蛋白质作为结构模板进行结构预测。从头计算法（ab initio method）的原理是蛋白质的天然构象对应其能量最低的构象，通过构造合适的能量函数及优化方法，可以实现从蛋白质序列直接预测其三维结构。从头计算法的物理化学意义明晰，不依赖于模板，有可

能预测到全新的蛋白质结构，但由于很难找到精准的能量函数，以及多变量优化中存在的大量的局部最小值，因此，从头计算法目前未达到很实用的程度，常作为补充与其他算法综合使用。

1. 同源模建

蛋白质结构同源模建（又称同源模拟、同源建模）的理论基础是相似的蛋白质序列对应相似的蛋白质结构。随着实验测定的蛋白质结构数据的增加，人们发现如果两个蛋白质享有足够的序列相似性，绝大多数情况下它们的三维结构也非常相似，从而进一步印证了这个理论。如果一个蛋白质的空间结构已被实验测定，则可以以该结构为模板来预测另一个序列与之相似的蛋白质的空间结构。经过 20 年左右的努力，不同的同源模建方法相继被开发，而且随着计算机计算能力的提高，同源模建已实现高度自动化。总体上，同源模建一般可分为以下几个步骤：①模板的选择；②待测序列与模板序列的比对；③模型的建立；④模型的评估和循环精修。

（1）模板的选择。模板的选择是同源模建第一个关键步骤。通常，模板的选择是通过 BLAST 对蛋白质结构数据库 PDB 的同源性搜索来实现。一般情况下，当序列和候选模板蛋白具有 30% 以上的序列同一性（sequence identity）时，候选模板是较为合理的；一些情况下，序列相似性（sequence similarity）较高，模板的同一性要求也可降低至 25% 左右。除了序列同一性作为合适的参数来评判序列与模板的匹配程度外，一些统计参数（如 BLAST 中的 E-value）也可用来判断序列与模板的匹配程度。模板选择中，如搜索到许多可用的模板，

则既可以挑选其中最佳的一个模板（单模板同源模建），也可以选择同一性排名前 3~5 名的蛋白质共同作为模板（多模板同源模建）。至于单模板同源模建与多模板同源模建的质量孰优孰劣，必须根据具体的实例来确定。最简单的判断方法是两者皆尝试，从中选取质量较高的模型。另外一个模板选择原则是，在可能的情况下，模板的结构实验测定的质量尽量高，如 X 射线衍射法测定的结构分辨率越高越好。

（2）待测序列与模板序列的比对。一旦模板确定后，下一步就是要对待测蛋白及结构模板的全长序列进行序列比对。通常，当待测蛋白与模板享有很高的序列同一性时，不同的序列比对方法总能产生相同的比对。然而，当待测蛋白与模板的序列同一性不够高时，不同的序列比对方法产生的比对会有较大差异，这种情况下往往需要对不同序列比对的结果进行一一尝试，甚至手工局部微调序列比对结果，以便获得质量更高的模型。如果选择了多模板同源模建，则需要做待测蛋白及模板的多序列比对。

（3）模型的建立。同源模型的建立是同源模建的核心部分，这一步一般是由模建软件自动完成，无需用户手动操作，它包括以下几个子步骤：①待测蛋白的主链模建；②loop 区的模建；③侧链安装。主链模建非常容易，待测蛋白中比对上的氨基酸的主链可以从模板中相应位置氨基酸的主链拷贝得到。通常，待测蛋白与模板的比对伴随着插入或删除造成的空位，这使得序列中的某些区域在模板中没有与之比对上，主链需要进行调整和修补，即 loop 区模建。loop 区模建

常用的方法有数据库搜索方法和系统构象搜索。总体来说，loop 区模建是同源模拟中的一个难题，特别是对于较长氨基酸片段的 loop 区，很难保证模建的结果是可靠的。侧链安装的主要原则是借鉴结构已经测定的蛋白质的侧链构象，或从能量角度和空间位阻角度出发预测目标蛋白中残基的侧链构象。大量实验已测定的蛋白质结构表明，氨基酸往往倾向于某几种的侧链扭转角。对这些侧链构象进行收集，并根据出现频率加以排列，这就是所谓的构象库。实际上目前的侧链构象预测方法主要利用构象库（rotamer）的概念。例如，目前比较流行的侧链安装程序 SCWRL (<http://dunbrack.fccc.edu/scwrl4/index.php>) 就是采用蛋白质骨架相关的侧链构象库。

（4）模型的评估和循环精修。结构建模中获得的初始模型不可避免地含有结构不合理的部分，如不合适的键角和键长、过近的原子接触等。采用合适的能量函数对模型进行能量最小化，能够消除结构中不合理的部分。对于同源模建获得的模型必须进行必要的模型评估。模型评估并不能评判所建模型与真实结构之间的相近程度，但是可以从几何学、立体化学和能量分布 3 个方面评估一个模型的自身合理性。在前面模板选择和序列比对部分提到的模型质量就是指这里的模型评估结果。最常见的模型评估手段是利用软件自动绘制蛋白质主链二面角的 Ramachandran 图，判断处于 Ramachandran 图中许可区域的氨基酸的比例是否高于 85%，检查分子中的键长、键角和过近接触等，通过判断这些立体化学性参数的异常来判断所建模型的好坏。另外一种策略，就是先对实验测定的蛋白质结构进行统计，得到一些

打分函数；然后比较预测模型中的打分，实现对预测模型的评估。迄今为止，除了建模软件自带的一些模型评估方法，一系列独立的方法已被开发出来，专门用来做模型评估，如 PROCHECK、Verify3D、ModFold、MetaMQAP、ProQ 等。

通过模型评估发现的存在于模型中的整体或局部的问题，往往需要追溯到选择模板或序列比对的步骤上去解决。尝试调整模板或序列比对，重新构建模型，重新评估，这样循环操作，直至获得满意的模型。仅对模型骨架和侧链的局部优化（长度小于 20 个氨基酸），可以使用 ModLoop 软件，指定调整区域起始与终止的氨基酸位置，便可得到一系列的优化后的结果。

总体上看，同源模建技术已经相当成熟。文献上已报道了几十种同源模建方法，一些方法开发者提供了可免费下载的版本或界面友好的服务器，极大地方便了用户的使用。目前，同源模建仍存在着一些瓶颈，如找不到合适的模板、待测序列与模板的序列比对不准确及 loop 区的模建不准确，然而，从本质上来说，还是可用的模板不够多。随着越来越多的蛋白质的空间结构被实验测定，将会为同源模建提供更多的结构模板，完全有理由相信蛋白质同源模建将会发挥更大的作用。

2. 折叠识别

(1) 折叠识别基本原理。蛋白质折叠识别方法，是从蛋白质结构数据库中识别与待测序列具有相似折叠类型，进而实现对待测序列的空间结构预测。自然界中蛋白质折叠类型的数目有限，许多蛋白

质虽然享有很低的序列相似性，但它们仍可能具有相同的折叠类型，这就是折叠识别的理论依据。现在普遍认为，折叠类型的总体数目会在几千以内。近年来，虽然许多新蛋白质的结构不断被解析，但折叠类型数目的增长趋于平缓。

折叠识别一般可以分为 4 个步骤进行。第一步，建立蛋白质结构模板数据库。蛋白质结构模板数据库通常可以以 PDB 数据库或者 SCOP 数据库中的蛋白质结构数据作为基础，选取具有代表性的一些蛋白质结构，尽量让模板数据库中的结构覆盖目前已测定的绝大部分折叠类型。第二步，设计合适的打分函数来衡量待测序列与模板数据库中结构的相容性。第三步，对打分函数得到的结果进行统计显著性分析。这一步一般需要将序列与结构之间的相容性打分转化为具有统计意义的参数，如 Z-score 和 E-value 等。第四步，对结构模板数据库中通过计算得到的具有统计显著性的蛋白质结构排序，折叠识别方法一般会给出多个可能具有结构相似性的蛋白质结构模板。一个理想的折叠识别方法还需给出待测序列与模板蛋白的序列比对。一旦模板及比对确定下来，同样采用同源模建的结构模拟步骤实现对待测蛋白的三维结构模建。

(2) 折叠识别方法的发展历史。折叠识别按其发展过程可以分为两代方法。第一代折叠识别方法通常指的是 2000 年以前开发的方法，更多情况下被称为穿针引线法 (threading)。其主要思路是：在计算待测序列与模板序列比对时，考虑待测序列与模板的结构相容性。换句话说，与传统的序列比对相比，模板的结构信息得以考虑，最经

典的两个策略是分子平均势能函数被使用及不同氨基酸倾向于出现在不同结构环境。虽然，第一代折叠识别算法在方法学上具有很大突破，但总体上并不实用。第二代方法指的是 2000 年后开发的折叠识别算法，主要特点是：序列之间的进化信息被充分考虑；不同信息通过复杂的数学算法被有效整合成一个杂化的打分函数；许多方法还提供在线服务器；蛋白质折叠数据库被不断更新；打分函数的统计参数意义更加明显。这些特点均使第二代折叠识别方法越来越实用。为便于理解，第二代折叠识别方法可大致归纳为 3 种类型。第一类方法是在构建序列和模板的比对时，除了考虑待测序列的进化信息外，模板的结构信息也得考虑，代表性的方法有 3D-PSSM 和 FUGUE。第二类方法是采用机器学习的方法将序列信息和结构信息整合成一个折叠识别系统，代表性的方法有 pGenThreader。第三类方法是基于 profile-profile 比对原理，对待测序列和模板分别构建 profile，然后再进行 profile-profile 比对，原则上能更大程度考虑序列之间的进化信息，代表性的方法有 FFAS03。蛋白质折叠识别已经成为蛋白质结构预测的主要方法之一，特别是第二代折叠识别算法已经相对成熟。同源建模与折叠识别在预测蛋白质结构上比较类似，两种方法又被统称为基于模板的结构预测方法。蛋白质折叠识别方法的成熟，大大扩大了同源建模的应用场合，拓展了蛋白质结构预测的实际应用范围。

3. 从头计算法

从头计算法的原理是蛋白质的天然构象对应其能量最低的构象，因此通过构造合适的能量函数及优化方法，可以实现从蛋白质序列直

接预测其三维结构的目的。由于很难找到精准的能量函数，以及多能量优化过程中存在大量的局部最小值，目前从头计算法还远未像前两种方法那样成熟实用，它一直是蛋白质结构预测中最具挑战性的课题。从头计算法的物理化学意义明晰，不依赖于模板，有可能预测到全新的蛋白质结构，所以一直受到许多研究人员的青睐。最近，从头计算法已取得很大的突破，对一些含氨基酸数量为 100~200 的较小的蛋白质，有可能预测得到高精度的三维结构。所以，当采用同源模建和折叠识别无法实现对待测蛋白的空间结构预测时，可以考虑采用从头计算法来获得结构模型。虽然单纯运用从头计算方法得到的模型还不能可靠地用于分子对接和药物分子设计，但预测得到的一些低分辨率的结构模型结果可用来作蛋白质功能注释，新的算法也增强了我们对蛋白质折叠机制的认识。鉴于从头计算法涉及较多的物理化学原理和数学方法，为便于理解，不对具体的能量函数及能量优化方法展开论述，只是通过介绍一个较为流行的软件来加深读者对从头计算法的理解。

4.综合法

一些近几年新开发出来的蛋白质结构预测软件不仅限于使用某一种算法，而是综合上述 3 种算法中的同源模建和从头计算，或折叠识别和从头计算，还有一些甚至同时综合了这 3 种算法。这些新方法往往可以在依靠单独一种算法得不到高质量结构模型的情况下发挥出理想的作用。同时，模板的选取也在全长模板的基础上出现了局部多模板拼接算法，即在使用同源模建法和折叠识别法都无法得到理想

的全长模板的情况下，寻找与待测蛋白局部匹配的一组片段模板，每一个片段模板既可以通过同源模建法得到也可以通过折叠识别法得到，这些片段模板拼接起来可以基本覆盖待测蛋白。而待测蛋白中个别未被模板覆盖的区域则可以使用从头计算法来补充。I-TASSER 就是其中典型的代表。

（三） 不同蛋白质预测方法的评价与选择

本节介绍的 3 种蛋白质三级结构预测方法及蛋白质二级结构预测方法，基本上反映了目前蛋白质结构预测的总体情况。虽然蛋白质结构预测还远未完善，方法学上仍然需要新的突破，但蛋白质结构预测的应用正日益扩大。例如，基因编码蛋白质的结构预测可加快功能基因组的研究；药物靶标蛋白的结构预测可加快新药的开发。

在实际应用中，为一条蛋白质序列选择具体的蛋白质结构预测方法时，并没有一个绝对的规律来判断究竟哪一个方法最适合。往往需要多尝试几种方法，从中选择较为合适的。这里我们给出一个大致的判断流程。首先，如果在 PDB 数据库中存在与待测蛋白序列同一性大于等于 30% 的全长模板，就可直接使用同源模建法 Swiss-Model 的全自动模式或序列比对模式建模；如果没有，则考虑折叠识别法，如 pGenThreader。然后，看折叠识别法找出的模板自评估质量是否达到“high”以上，如果达到，则可以使用该模板（单模板或多模板）建模；如果模板质量不高，则须再次判断待测蛋白质序列的长度是否在 200 个氨基酸之内。如果待测蛋白质序列长度小于 200 个氨基酸，则可以使用从头计算法，如 QUARK；反之，则推荐使用综合法 I-TASSER。

必须指出的是，并不是所有结构未知的蛋白质序列都可以通过预测得到较理想的结构模型。对于很多序列来说，无论用何种方法都无法预测得到质量较高的结构模型。

第三节 蛋白质对接

一. 蛋白质相互作用

蛋白质相互作用是指在生化作用或静电力作用下，两个或多个蛋白质分子之间产生物理性接触。无论在细胞水平上还是系统水平上，极少有单体蛋白质分子独自行使功能的情况。复杂多样的分子过程都是由分子机器控制和执行的，而分子机器本身就是大量蛋白质分子在相互作用的有序组织下构建而成的。蛋白质相互作用的研究在探寻细胞信号转导途径、复杂蛋白质结构的建模及理解蛋白质在各种生物化学过程中的作用方面都是非常必要的。

蛋白质相互作用有不同的分类原则。从组成复合体的单体类型角度可以分为同源相互作用和异源相互作用。同源复合体中的所有单体都是同一种蛋白质，很多酶、载体蛋白、支架蛋白和转录调控因子都以同源复合体的形式行使功能；异源复合体中包含不同的蛋白质单体，在细胞信号传导通路中最为常见，这种异源相互作用只可能出现在不同蛋白质单体的结构域之间。从相互作用稳定程度的角度可以分为稳固相互作用和瞬时相互作用。同源复合体中各个单体之间的相互作用往往都是稳固相互作用，而信号传导通路中涉及的蛋白质之间往往都是瞬时相互作用，即一个蛋白质短暂地与另一个蛋白质结合，在行使完功能之后再与之分离。从相互作用力的角度可以分为共价相互

作用和非共价相互作用。共价相互作用主要是由二硫键和电子共同维持的，较为少见；非共价相互作用可以由氢键、离子键、范德华力或亲疏水作用维护，是蛋白质相互作用的主要形式。

二. 蛋白质对接及分析软件

蛋白质相互作用研究方法多种多样。免疫共沉淀和酵母双杂交系统等生物化学方法仅可以鉴定特定的蛋白质是否相互作用，而不能确定空间上如何相互作用；X射线晶体衍射和核磁共振等结构生物学技术可以高分辨率地展示蛋白质之间在空间上是如何结合的，但实验操作十分困难且昂贵。本节重点介绍利用计算机预测蛋白质的相互作用模式，即蛋白质对接。蛋白质对接的基本过程是已知两个蛋白质结构，搜索这两个蛋白质理论上可能产生的数百万个结合构象，再利用生物信息学评价标准过滤排除不合理的结构，然后对每一个入围的构象都用精细的能量函数打分，最终确定能量最低的构象。因此，对接的准确程度直接取决于两个因素：搜索结合构象的全面性和能量函数的合理性。搜索结合构象及排除不合理构象主要考虑分子表面几何形状互补性和静电互补性，搜索范围越大对计算资源的要求就越高。能量函数的定义要体现出各类非共价效应、亲疏水效应、溶质熵效应，以及他们各自的权重。

理论上对接可分为刚性对接、半柔性对接和柔性对接3类。刚性对接是指在计算过程中，参与对接的分子构象不发生变化，仅改变分子的空间位置与姿态。刚性对接计算量相对较小，适合处理多数蛋白质结合的问题。半柔性对接是指对接过程中仅指定的片段构象允许发

生一定程度的变化，如某些氨基酸的骨架和侧链允许任意活动。半柔性对接方法兼顾计算量与模型的预测能力，也是应用比较广泛的对接方法。柔性对接在对接过程中允许整个研究体系的构象发生自由变化，由于变量随着体系的原子数呈几何级数增长，因此柔性对接方法的计算量非常大，消耗计算机时很多，对应软件的开发远远没有达到实用的程度。这里简单介绍 4 个蛋白质对接及分析软件。必须强调的是，蛋白质对接只能是在已知两个蛋白质有相互作用的前提下，用来预测它们在空间上是如何相互作用，而不能预测两个蛋白质是否有相互作用。

ZDOCK (<http://zdock.umassmed.edu>) 是由美国马萨诸塞州立大学和波士顿大学联合开发的一种刚性对接软件。用户只需在网页上上传两个 PDB 格式的蛋白质结构文件，或只输入其 PDB ID（如果是 PDB 数据库中的结构）。之后可以可视化地在每个结构上选取必需参与结合的氨基酸或不允许参与结合的氨基酸。大约经过十几分钟至数小时不等的时间，对接结果被发送至用户邮箱，用户可以从中提取根据能量函数打分排任意前几名的结果。

GRAMMX (<http://vakser.bioinformatics.ku.edu/resources/gramm/grammx>) 是由美国堪萨斯大学 Vakser 课题组开发的一种刚性对接软件。操作过程与 ZDOCK 十分相似，在网页上上传 PDB 格式的蛋白质结构文件，或只输入其 PDB ID，同时可指定每个结构上必需参与结合的氨基酸，但无法指定不允许参与结合的氨基酸。GRAMMX 除二聚对接以外可以进行同源多聚对接，即只输入一个蛋白质结构和一

个自然数 n ，GRAMMX 可以返回一个由此蛋白质聚合形成的同源 n 聚体。

HADDOCK (<http://haddock.science.uu.nl/services/HADDOCK/>) 是由荷兰乌特勒支大学 Bonvin 课题组开发的一种半柔性对接软件。不同于绝大多数对接软件，HADDOCK 在考虑几何形状互补和能量分布的基础上还着重参考了生物化学和生物物理学实验中得到的相互作用数据，如核磁共振滴定实验中得到的化学位移扰动数据、基因定点突变实验数据等。近几年 HADDOCK 的功能不断被扩增，现在除蛋白质对接以外，还可以执行蛋白质-DNA 对接、蛋白质-RNA 对接、蛋白质-化合物对接。

PDBePISA (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>) 是一个在线的交互式的分子相互作用探测分析工具。对于输入的蛋白质复合体，无论是对接结果还是晶体结构，PDBePISA 都可以详细地计算出复合体相互作用面上的原子数及比例、相互作用面上的氨基酸数及比例、相互作用面积及比例、溶剂化自由能、相互作用面上的氢键、二硫键、盐键、共价键的位置及其作用强度。

第四节 蛋白质折叠与疾病

一、蛋白质折叠的意义

在自然界的各种生物体中，蛋白质是构成生物体系的基础，它执行着各种各样的生物功能。正如 26 个字母可以组成数以万计的英文单词一样，组成蛋白质的 20 种氨基酸构成了自然界中几乎所有的蛋白质。到目前为止，由于氨基酸组成的数量和排列顺序不同，仅人体

中的蛋白质就多达 10 种以上。20 种氨基酸以肽键的形式连接成肽链，而肽链则会组装或折叠成特定的三维空间结构。其中，有些蛋白质的结构比较复杂，是由多条肽链组成的，每一条肽链称为一个亚基，在亚基之间又存在特定的空间关系，所以蛋白质分子具有非常特定而又复杂的空间结构。对每一种蛋白质分子来说都有自己独特的氨基酸的组成和排列顺序，并由这种氨基酸排列顺序决定它特定的空间结构，这就是众所周知的 Anfinsen 原理。也正是因为蛋白质的一级序列折叠形成正确的三维空间结构才使得蛋白质具有正常的生物学功能。如果这些生物大分子的折叠在体内发生了故障，形成错误的空间结构，不但将丧失其生物学功能，甚至会引起疾病。目前，由蛋白质异常的三维空间结构引发的疾病包括疯牛病、阿尔茨海默病、囊性纤维病变、家族性高胆固醇症、家族性淀粉样蛋白症、白内障及某些肿瘤等，这类疾病也可以统称为构象病。

二、蛋白质折叠研究的概述

具有完整一级结构的多肽链如何从其伸展状态折叠成具有特定结构的、有活性的蛋白质？这是一直以来困扰科学家的问题。

1963 年，美国科学家 Anfinsen 发现还原变性的牛胰核糖核酸酶在不需其他任何物质帮助的情况下，仅通过去除变性剂和还原剂就可以折叠回原来的天然结构，并且其特有的功能也不会丧失，由此他们提出了蛋白质折叠的“热力学假说”（thermodynamic hypothesis），Anfinsen 也由此获得了 1972 年的诺贝尔化学奖。他们认为，一些小型珠蛋白的天然折叠结构是热力学的稳定态，即通常的自由能全局最

小 (global minimum) 的状态。蛋白质的一级结构序列所提供的全部信息可以完全且唯一地决定分子的天然结构, 也就是说, 蛋白质的一级结构决定了高级结构。Anfinsen 的“热力学假说”得到了许多体外实验的证明, 的确有许多蛋白质在体外可进行可逆的变性和复性, 尤其是一些小分子质量的蛋白质。长期以来, 这个思想构成了从物理规律出发研究蛋白质折叠问题的基本出发点。但随着对蛋白质折叠研究的广泛开展, 人们发现许多蛋白质在体外的变性、复性过程并非完全可逆, 有的变性多肽链的复性效率很低, 而且多肽链在体外的复性速率大大低于在体内的折叠速率。因此, 蛋白质在折叠过程中实际上受到许多因素的限制。

1968 年, 美国分子生物学家 Cyrus Levinthal 提出了有关蛋白质折叠的利文索尔悖论 (Levinthal's paradox): 一条蛋白质序列, 其空间可能构象有天文数字之多, 在这庞大的构象集合中找出其唯一的自然状态将是非常困难的。例如, 一个由 100 个氨基酸组成的肽链, 假设每个氨基酸仅有 3 种不同构象, 其就有 3100 种可能的构象, 再假定此蛋白质在寻找总能量最低的构象状态时每尝试一次耗用 10^{-3} s, 那么该蛋白质要逐一尝试所有构象去寻找其唯一的天然态所需要的时间就是 333 年! 然而, 人们在体外所观测到的蛋白质的折叠时间为数毫秒至数秒——因此, Levinthal 认为蛋白质的折叠必然是按照某一特定的路径, 才能在如此短的时间内完成折叠过程, 他强调了在蛋白质折叠的过程中动力学控制对于折叠的重要性。

那么如何调和热力学和动力学在折叠过程中的作用呢? 1995 年,

Wolynes 等提出了蛋白质折叠漏斗概念，这一观点认为蛋白质体系有很多复杂的自由度，其自由能作为自由度的函数构成了一个所谓的能量面。他们认为漏斗的顶部代表蛋白质的完全不折叠态，此态的自由能和熵均为最大，漏斗的底部唯一的结构为蛋白质的天然态(折叠态)。蛋白质从非折叠态到天然态的过程即折叠过程中，熵不断减少，从而引起其自由能的升高，并通过能量的降低来补偿，使得折叠过程中自由能也不断地减小，从而到达其最小的状态，即热力学的稳定态。自由能面存在着很多的能垒，即一些自由能局域极小的竞争状态，这些竞争状态不会影响天然态的稳定存在，但会影响折叠的动力学过程，表现为折叠过程中一些亚稳的中间状态。同时，在某一次折叠过程中，蛋白质并不是在能量面上进行随机搜索，它所经历的构象仅占全部构象的很少部分。也就是说，折叠是沿着某一特定的路径进行的，从而保证了折叠动力学上的可及性。与 Levinthal 不同的是，这一路径不是唯一的，而是一系列折叠路径的集合，蛋白质的折叠取决于这个集合的整体因素，而不是特定元素。因此，蛋白质折叠可以说是热力学和动力学因素共同作用、相互协调的结果。

三、蛋白质折叠机制的理论模型

随着对蛋白质折叠问题的进一步研究，人们发现许多相似氨基酸序列的蛋白质具有不同的折叠结构，而另外一些不同氨基酸序列的蛋白质却折叠成相似的空间结构。那么，蛋白质的氨基酸序列究竟是如何确定其空间构象的呢？有关蛋白质折叠机制的研究提出了以下 5 种可能的理论模型（胡红雨和鲁子贤，1994）。

1. 框架模型 框架模型（framework model）认为蛋白质的局部构象依赖于其局部的氨基酸序列。其折叠是分段进行的，即一部分氨基酸序列组成一个单位进行折叠，形成不稳定的二级结构单元，称为“flickering cluster”；随后这些二级结构逐步靠近、接触，从而形成稳定的二级结构框架；最后，二级结构框架相互拼接，肽链逐渐紧缩，形成了蛋白质的三级结构。

2. 疏水塌缩模型 疏水塌缩模型（hydrophobic collapse model）把疏水作用力看成是蛋白质折叠过程中起决定性作用的力的因素。在形成任何二级结构和三级结构之前，首先发生很快的非特异性的疏水塌缩。

3. 扩散碰撞黏合机制 扩散-碰撞-黏合机制（diffusion-collision-adhesion model）认为蛋白质的折叠起始于伸展肽链上的几个位点，在这些位点上生成不稳定的二级结构单元或者疏水簇，主要依靠局部序列的近程或中程（3~4个残基）相互作用来维系。它们以非特异性布朗运动的方式扩散、碰撞、相互黏附，导致大的结构生成并因此增加了稳定性。进一步的碰撞形成具有疏水核心和二级结构的类熔球态中间体的球状结构。球形中间体调整为致密的、无活性的、类似天然结构的高度有序熔球态结构。最后，无活性的高度有序熔球态转变为完整的、有活力的天然态。

4. 成核凝聚生长模型 根据成核-凝聚-生长模型（nuclear-condensation-growth model），肽链中的某一区域可以形成“折叠晶核”，以它们为核心，整个肽链继续折叠，进而获得天然构象。所谓“晶核”

实际上是由一些特殊的氨基酸残基形成的类似于天然态相互作用的网络结构，这些残基间不是以非特异的疏水作用维系的，而是由特异的相互作用使这些残基形成了紧密堆积，它的形成是折叠起始阶段的限速步骤。

5. 拼版模型 拼版模型 (jig-saw puzzle model) 的中心思想就是多肽链可以沿多条不同的途径进行折叠，在沿每条途径折叠的过程中都是天然结构越来越多，最终都能形成天然构象；而且沿每条途径的折叠速度都较快，与单一途径折叠方式相比，多肽链速度较快。此外，外界生理生化环境的微小变化或突变等因素可能会给单一折叠途径造成较大的影响，而对具有多条途径的折叠方式而言，这些变化可能给某条折叠途径带来影响，但不会影响另外的折叠途径，因而不会从总体上干扰多肽链的折叠，除非这些因素造成的变化太大，以致从根本上影响多肽链的折叠。

四、分子伴侣与蛋白质折叠

分子伴侣这一概念是 Laskey 等首先开始使用的。1978 年, Laskey 在研究非洲爪蟾核小体形成时发现必须在一种细胞核内的酸性蛋白——核质素 (nucleoplasmin) 存在时, DNA 与组蛋白才能组装成核小体。在生理离子强度下, 体外把 DNA 与组蛋白混合在一起, 二者不能自我组装, 而是发生沉淀。如果把组蛋白与过量核质素先进行混合, 然后再加入 DNA, 则可形成核小体结构, 而且最终形成的核小体中没有核质素。据此, Laskey 称核质素为“分子伴侣”。因此, 分子伴侣是一种能引导蛋白质正确折叠的蛋白质, 它能够结合和稳定另外一种

蛋白质的不稳定构象，并能通过有控制的结合和释放，促进新生多肽链的折叠、多聚体的装配或降解及细胞器蛋白的跨膜运输等。当蛋白质折叠时，它们能保护蛋白质分子免受其他因素的干扰。分子伴侣是从功能上定义的，凡具有这种功能的蛋白质都是分子伴侣，它们的结构可以完全不同。迄今为止发现的分子伴侣大多属于热激蛋白（heat shock protein, HSP）的范畴，大致可分为 4 类非常保守的蛋白质家族，即核质素家族、HSP60 家族、HSP70 家族、HSP90 家族，广泛存在于动物、植物和微生物中。

五、蛋白质错误折叠与疾病

在体内保证蛋白质正确折叠的过程一般分为两步。首先是识别错误，发现或找到哪些蛋白质受到了损伤；其次是决定错误能否更正，能更正的蛋白质会在分子伴侣的帮助下恢复正常结构，不能更正的则通过蛋白酶降解后清除。如果保证蛋白质正常折叠的这一保护机制发生障碍，就可能出现错误折叠的蛋白质分子，从而引起一些疾病。对于这类疾病，蛋白质分子的氨基酸序列没有改变，即蛋白质多肽链具有正确而完整的一级结构，但在折叠过程中发生了异常或错误，形成了错误的空间构象和三维结构，这就会导致蛋白质分子生物学功能丧失，甚至引起疾病，这类疾病就是所谓的“构象病”或“折叠病”。目前已知的“构象病”包括疯牛病（prion disease）、阿尔茨海默病（Alzheimer's disease）、帕金森症（Parkinson's disease）等。这类疾病属于神经退行性疾病（neurodegenerative disease）的范畴，它是神经系统中一类与衰老相关联的退行性疾病。由蛋白质折叠异常所引起的

疾病还有囊性纤维病变、家族性高胆固醇症、家族性淀粉样蛋白症、某些肿瘤、白内障等。目前蛋白质错误折叠与疾病的关系已成为分子生物学新的热点研究问题。

(一) 蛋白感染因子导致的疾病

蛋白感染因子导致的疾病 (prion disease) 能引起人和动物之间的可转移性神经退行性疾病, 如人的震颤病 (Kuru)、克雅氏症 (Creutzfeldt-Jacob diseases, CJD)、吉斯综合征 (Gerstmann-Straussler-Scheinker, GSS) 和致死性家族失眠症 (fatal familial insomnia, FFI), 以及动物的羊瘙痒病 (Scrapie)、牛海绵脑病 (bovine spongiform encephalopathy, BSE, 俗称疯牛病) 和鹿、猫、水貂等的海绵脑。

(二) 淀粉样蛋白导致的疾病

由淀粉样蛋白导致的疾病 (amyloid disease) 大致分为两类——阿尔茨海默病和帕金森症。这两类疾病的共同点是正常的蛋白质错误折叠成淀粉样肽, 并聚合成不溶性的淀粉样沉积在组织内, 称为淀粉样蛋白变性。研究表明, 老年痴呆症的发生与淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 的剪切和结构转换为 β 淀粉样多肽 (beta-amyloid, A β) 并以多肽链间的 β 折叠形成纤维状沉积物有关。在帕金森症患者脑中也有被称为 Lewy 小体的蛋白质沉积物, 这些蛋白质沉积物包含有 α -synuclein 蛋白形成的纤维。理解这些蛋白质, 如 A β 、 α -synuclein 等为何在脑中会发生错误折叠, 可能是治疗这些神经退行性疾病的关键问题。

第五章 基因组学

截至 2020 年 12 月 23 日，一共有 386072 个基因组测序计划，其中 307651 个基因组已经完成测序并向公众发布 (<https://gold.jgi.doe.gov/gold.cgi>)。雄心勃勃的基因组 10K 计划，更是致力于测序 10000 个脊椎动物物种，并覆盖脊椎动物的所有属。因而，全面基因组时代的来临将给生物医学、遗传基因组学、功能基因组学及比较基因组学的研究带来新的契机。

一个完整的注释包括在基因组中鉴定出其各类功能元件，如编码蛋白质的基因、RNA 基因、重复序列和假基因等，并确定这些元件所对应的生物学功能（如果存在的话）：①确定蛋白质编码基因及其外显子-内含子结构（也称为基因结构），并推断其生物学功能；②进行 RNA 基因的预测，并推断其功能和相互作用靶标分子；③确定基因组中重复序列的含量和分类；④进行假基因的识别和分类等。目前，人们的注意力多集中于蛋白质编码基因的注释，已经开发了各种各样的预测方法。但即使如此，对于大多数真核生物来说，我们仍无法确定每个基因的正确的外显子-内含子结构。同时，随着基因组学相关研究的深入，RNA 基因、重复序列、假基因等元件的重要性正被人们日渐重视，新的预测方法也在不断地推出。

第一节 生物信息学的发展历史

“基因组”（genome）是指生物体的单倍体细胞中所有遗传物质的总和，包括细胞核内的 DNA 和各种细胞器中的 DNA，是生物体内全部遗传信息的集合。基因组学（Genomics）由美国科学家 Thomas

H.Roderick 在 1986 年首先提出，是从整体水平研究生物体全部遗传物质的结构、组成、功能及进化的生命科学前沿学科。按其研究内容，基因组学可分为结构基因组学（Structural genomics）、功能基因组学（Functional genomics）和比较基因组学（Comparative genomics）等。结构基因组学以研究生物全基因组 DNA 的序列组成和基因数目、功能和分类为目标；功能基因组学以研究全基因组水平的基因表达和调控为目标；比较基因组学则基于结构基因组学和功能基因组学信息，以研究不同物种或群体间基因组变化与进化关系为目标。

一、基因组学的产生及研究进展

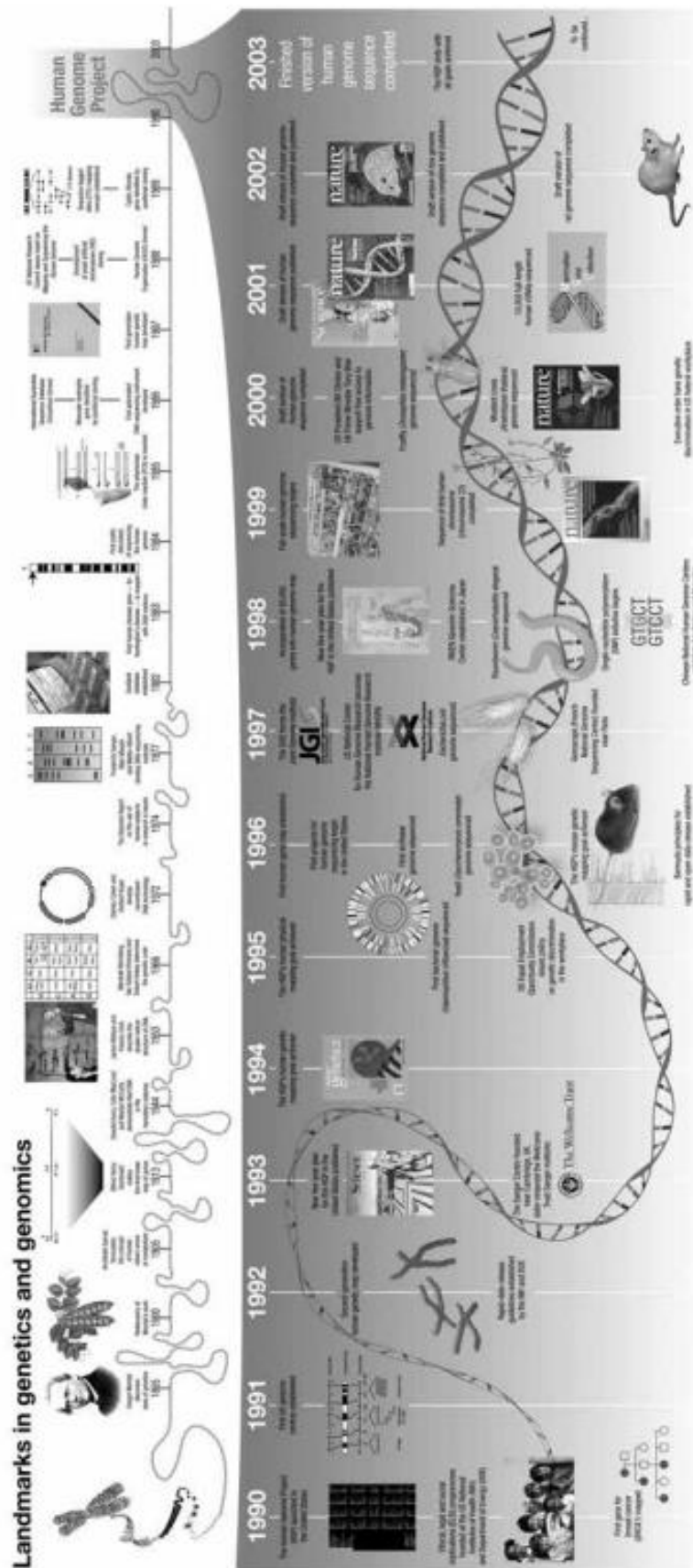
（一）基因组学的产生

DNA 测序技术不断革新和发展，以 Sanger 测序法为代表的第一代测序技术发展到了以 Illumina Solexa、Roche 454 和 ABI Solid 为代表的第二代高通量测序技术，以及以单分子测序和纳米测序为代表的第三代高通量测序技术。DNA 测序片段长度和测序通量不断提高，测序成本显著降低。高通量测序技术的诞生在基因组学研究领域具有里程碑意义，基因组学因此得到迅猛发展。

DNA 测序技术已经被广泛应用到生命科学各个领域。根据 GOLD 数据库（<https://gold.jgi.doe.gov/gold.cgi>）显示，目前有 40 多万个生物已经完成或正在进行基因组测序。除了各种基因组测序计划（如人类基因组计划、千人基因组计划）和大规模的全基因组重测序外，还衍生出转录组学（Transcriptomics）、蛋白质组学（Proteomics）、代谢组学（Metabolomics）、表观遗传学（Epigenomics）、表型组学

(Phenomics) 等一系列组学研究分支。

(二) 基因组研究的成就



(三) 基因组研究的局限

尽管已有多个物种的基因组被测序,但在这些基因组中通常有一半以上基因的功能是未知的。而功能基因组研究中所采用的策略,如基因芯片、基因表达分析等,都是从细胞中 mRNA 表达的角度来考虑,其前提是细胞中 mRNA 的水平反映了蛋白质表达的水平,但事实并不完全如此。

第二节 蛋白质编码基因的注释

一、蛋白质编码基因的注释策略

蛋白质编码基因的注释大致可分为 3 种策略。第一种是基于证据的基因注释,即根据已有的实验证据(如 cDNA)、表达序列标签(EST)和蛋白质序列进行蛋白质编码基因的注释;第二种策略是从头开始的基因预测,即只根据基因组的 DNA 序列对蛋白质编码基因进行预测;第三种策略是重新基因预测,即通过与其他物种的基因组进行比较,从而预测一个新基因组中的蛋白质编码基因。由于不同策略具有各自的优缺点,因此,目前成功的做法是将这 3 种策略的预测结果进行整合,得到比较理想的注释结果。

(一) 基于证据的基因注释

基于证据(evidence-based)的基因注释系统,是将已有的 cDNA 序列或者蛋白质序列与基因组进行比对,从而得到基因结构的一种注释策略。根据 cDNA 或者蛋白质序列是否由一个基因自身转录或者翻译而来,可以将序列比对分为顺式比对(cis-alignment)和反式比对(trans-alignment)两种方法。

1. 顺式比对

顺式比对是使用被注释基因组的 cDNA 或者蛋白质序列与基因组序列进行比对后得到的最好的比对位点，而这个位点常常被认为就是转录或者翻译形成 cDNA 或者蛋白质的基因。通常，顺式比对是使用全长 cDNA 与基因组进行比对，这也是目前基因注释的黄金标准。

常用的顺式比对程序如 AAT、SIM4、Splign、BLAT、GMAP 和 Exonerate 等，不仅能将 cDNA 序列与基因组序列进行顺式比对，而且可以识别出内含子剪切位点。不过这些程序还存在着无法准确地刻画基因的非翻译区（untranslating region, UTR）部分和寻找正确的转录起始及终止密码子等缺点。通过是表达序列标签（EST）序列试图阐明基因结构的软件有 Est2genome、PASA 和 TAP 等。其中，PASA 可以将聚类的转录产物片段（全长 cDNA 和 EST）拼接成最大比对片段，从而得到完整的或者部分的基因结构，并获得更多的可变剪切的信息。

2. 反式比对

反式比对是使用 cDNA 或者蛋白质序列与基因组进行比对得到同源位点。

BLAT、Exonerate 和 GeneWise 是常用的反式比对工具。GeneWise 是目前最主要的反式比对的程序，可以得到比较准确的基因结构，并且能够容忍一些测序错误，它是 Ensembl 自动基因注释系统的核心组成部分，已经完成了许多脊椎动物基因组的初始注释分析。GeneWise 预测结果相对比较保守，虽然会失掉一些真正的外显子，但是大部分

预测出来的结果还是十分准确的。

单纯的基于证据的基因注释系统有两个主要的弱点：①许多数据库中的数据质量良莠不齐，会导致错误信息的不断传递；②如果数据库中不含有足够相似程度的序列，那么可能什么结果也得不到。此外，即使有较好的序列相似性比对，比对上的区域（可能的外显子）并不见得十分精确，因此，不能准确地确定其基因结构，同时在这个过程中小的外显子很容易被忽略掉。

（二） 从头开始的基因预测

从头开始的基因预测包括两个主要步骤，即蛋白质编码基因特征的识别和基因结构的生成。软件识别的蛋白质编码基因的特征大致可以分为组成特征（**content sign**）和信号特征（**signal sign**）。蛋白质编码基因的组成特征一般有：高 GC 含量、密码子组成、六联核苷酸（**hexamer, 6-mer**）组成和碱基出现周期等，在这些信号中，六联核苷酸组成被认为是最能区分编码区和非编码区的特征。信号特征一般包括核糖体结合位点、内含子供体和受体剪接位点、内含子分支点、起始密码子和终止密码子、CpG 岛等。蛋白质编码基因特征可以通过多种方法被识别。这些特征被识别后，可以通过动态规划算法（**dynamic programming**）或者广义隐马尔可夫模型（**generalized hidden Markov model, GHMM**）来生成基因结构。广义隐马尔可夫模型既可以用于蛋白质编码基因特征的识别，还可以用于基因结构的产生，从而被许多从头开始基因预测软件所采用。

（三） 重新基因预测

重新基因预测的策略是利用对照基因组 (informant genome) 与目标基因组的比对信息来进行基因预测。由于人们对生物体转录和翻译知识的认识有限, 还不能完全仅通过基因组序列内的特征来模仿生物的转录和翻译过程, 从而对蛋白质编码基因进行准确识别, 因此人们考虑整合其他蛋白质编码基因的信息。随着基因组测序项目的不断进行, 越来越多的基因组被测序, 人们认识到可以利用自然选择所提供的蛋白质编码基因的信号来分析新的基因组。研究表明, 两个或多个物种中的直系同源序列的突变频率和模式提供了宝贵的注释信息。蛋白质编码基因由于具有相对比较重要的生物学功能, 因此在进化中大多数经受着负选择的作用, 这就产生了两个指示编码蛋白质基因的重要信号: ①由于沉默突变往往发生在密码子的第 3 位上, 因此序列比对的空缺呈现以 3 为倍数的模式; ②为了保证 ORF 编码的准确性, 插入和缺失的序列长度也是 3 的倍数, 如果有移码突变发生, 这个可读框也常常被附近其他的插入和缺失修复, 衡量这种现象的一个指标称为读框连贯性 (reading frame consistency, RFC)。通过整合从头开始基因预测所识别的特征与基因组比对所得到的自然选择信号, 可以识别出较保守的蛋白质编码基因, 这就是重新基因预测的主要策略。

Twinscan、SGP2 和 SLAM 是一些利用双基因组比对信息的重新预测软件, Twinscan 和 SGP2 是第一批在性能上超越 Genscan 的程序。EXONIPHY、N-Scan 和 CONTRAST 是一些利用多基因组比对信息的重新预测软件。其中, CONTRAST 在人类和果蝇基因组分析过程中, 通过使用多序列比对获得较大性能的提高, 是目前分析人类和

果蝇基因组最好的基因预测程序，并且有可能在线虫、植物和真菌基因组分析过程中也获得同样好的结果。

二、 蛋白质编码基因注释的整合信息

（一） 人工整合

传统的整合方法是已有的预测结果提交给专家手工完成，这样的人工注释在注释高质量的、已测序完毕的基因组中起着重要的作用。

（二） 自动整合

自从人类基因组草图发布以后，通过计算的方法（如证据权重和动态规划算法）自动整合不同证据的注释系统开始得到发展，如 Ensembl、OTTO 和 NCBI 系统。自动整合的方法很多，最简单的是在每一个位置上选择最好的证据，这种方法需要首先构建一个从最可靠的到最不可靠的证据的等级结构。

三、 蛋白质编码基因的功能注释

预测出来的蛋白质编码基因包含着大量的未知功能信息。为了更深入全面地了解这些数据的意义，保证基因组数据的一致性和完整性，并推动对未知物种的探索，人们开发了各种生物信息学数据库。这些数据库涉及核酸和蛋白质序列、功能基因组学、蛋白质组学和生物大分子结构等方面的核心信息。生物信息学根据这些已有的证据，利用计算的方法来预测新测序物种的基因，并推测这些基因的功能。对预测的未知功能基因进行高通量功能注释主要是利用已知功能基因等信息来对新基因的功能做出推断。目前常用的主要方法是序列相似性比较法，除此之外，进化分析、亚细胞定位、结构基因组的研究与蛋

白质组的研究等方法对于未知基因功能的注释也有非常重要的帮助。

序列相似性分析基于“同源=功能相似”的假设。该方法将功能未知基因与数据库中的已知功能基因进行序列相似性比对,通过设立同源性指标(如 identity、E-value 等)寻找具有同源关系的已知基因,从而确定预测基因的功能。常用的数据库主要包括 NCBI 的 NT、NR (非冗余蛋白质序列数据库)、UniProt、InterPro、KEGG、KOG 等。

第三节 RNA 基因的注释

RNA 基因是指不编码蛋白质的基因,又称为非编码基因(non-coding gene, ncRNA),其编码产物为一条功能 RNA 分子。最近几年的研究表明,ncRNA 数量众多,是真核生物转录组的主要组成部分;此外,它们在高等生物的多种基因调控过程中发挥着重要作用,如 X 染色体失活、基因组印迹、转录激活过程中的染色质修饰、转录干扰及转录后基因沉默等。因此,注释 RNA 基因已成为基因组注释的一个重要组成部分。

最早发现的 RNA 基因是转运 RNA (transfer rRNA, tRNA) 和核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA),这两类 RNA 对蛋白质合成过程至关重要。虽然随着实验技术的提高和计算工具的出现,有越来越多的 RNA 类别被发现。近年来,长非编码 RNA (lncRNA) 和环状 RNA (circRNA) 也渐渐走入了人们的视线。但为了结果可信,目前基因组水平上的 RNA 基因注释仍局限于寻找如上所述的几类结构已知的 RNA 基因家族的同源物。

对于完备的 RNA 基因注释,至少要回答两个问题:①鉴定基因

组中的 RNA 基因的编码区域；②推断其功能转录本，预测其功能，并寻找其相互作用伙伴。但相对于蛋白质编码基因的注释，RNA 基因的注释还处于起步阶段，对于大的基因组计划，一般只回答了第一个问题的一些子集，即预测作用机制比较清楚的 RNA 家族的同源物。

根据是否需要依赖基因组序列以外的信息，RNA 基因的预测方法分为两类，一类是基于相似性（homology-based）的预测方法，一类是从头开始的预测方法。

目前，最全面的 RNA 家族序列和比对信息的数据库之一是 Rfam 数据库。为表征已知 RNA 基因家族的序列和结构特征，Rfam 数据库对已测序基因组中的数百万条 ncRNA 记录进行整合，获得了上千个基因家族的多序列比对结果，进一步对这些结果进行序列和结构特征的建模，获得特定 RNA 家族的协方差模型（co-variance model, CM 模型）。目前，Rfam 数据库中含 2000 多个 CM 模型，可以使用 Rfam 数据库提供的 INFERNAL 软件包对这些 CM 模型与靶序列进行比对，寻找与特定模型有序列和结构相似性的区域，通过打分、排序和去除阈值以下的匹配，达到了较高的灵敏度和特异度；不足之处是计算复杂度非常高。另外，一些只针对特定类别 RNA 的预测软件，也有较好的表现。

第四节 重复序列的注释

重复序列（repetitive sequence, 或称 repeat）在真核生物基因组中广泛存在，不同基因组中所占比例变异很大。

重复序列可简单地分为串联重复序列（tandem repeat）和散布的

重复序列（**dispersed repeat**）两种。串联重复序列是指重复单元相邻出现的重复序列，多出现于染色体的着丝粒区和端粒区等。根据重复单元的长度大小，可分为微卫星序列（**microsatellite**）、小卫星序列（**minisatellite**）和卫星序列（**satellite**）。散布的重复序列，大多是转座元件（**transposable element, TE**），是指可以通过转座（**transposition**）过程在基因组内不同位置间移动的 DNA 片段。根据不同的转座机制，有的转座元件进行“剪切和粘贴”（**cut-and-paste**），转座之后，原有位置的拷贝转移到新的基因组位置上去；有的进行“复制和粘贴”，在新的基因组位置上复制一份拷贝。这些特性决定了转座元件的进化意义。首先，它们可以影响基因组大小；并且，它们是基因组变异的一个重要来源。

串联重复序列的结构较简单，相应地，串联重复序列的识别也相对容易。在识别串联重复序列的软件中，**Tandem Repeats Finder** 应用最为广泛，它可以识别重复单元达 2kb 的串联重复序列，并通过概率模型对候选序列进行评估和打分，达到较高的灵敏度和特异度。根据重复单元的长度大小，被识别出的串联重复序列可直接分类为微卫星、小卫星和卫星序列。

转座元件的识别和分类是一件具有挑战性的工作。首先，转座元件插入基因组之后，新的拷贝经历了不同的进化历程，如累积点突变和插入缺失突变，并经历不同的重组事件，使得转座元件变得片段化和分歧化，难以被目前流行的序列相似性的方法所识别。其次，转座元件有优先插入其他转座元件区域的偏好，从而形成镶嵌型结构

(nested structure)，这使得确定转座元件的边界变得复杂 (Bergman and Quesneville, 2007)。最后，在重复序列含量非常高的基因组中，预测转座元件所需的计算资源是非常可观的，时间和内存的耗费都非常大。

根据是否依赖已知 TE 的信息，TE 的鉴定方法分为两种。一种是基于相似性 (homology based) 的方法，通过比对输入序列与已知 TE 的相似性，对输入序列进行 TE 识别；另一种是从头开始的方法，依据基因组序列内部的自身重复性，重构出转座元件的祖先序列。

基于相似性的方法依赖已知 TE 的数据库，预测结果比较准确，并且可根据已知 TE 的类别为预测的转座元件分类。目前的 TE 数据库中，Repbase 是比较权威的一个，它收录了多个真核物种超过 9000 条的重复序列，每一条都标注了人工检查后的注释信息，并且代表了一个重复序列家族或亚家族的一致序列。但 Repbase 比较偏重于收集动物的 TE，尤其是哺乳动物；而 TIGR 植物重复序列数据库整合了 GenBank 中 12 个属的植物重复序列，数量非常大，含有超过 21 万条序列，同时附有简单的分类信息。因而，TIGR 植物重复序列数据库非常有助于植物基因组中的转座元件识别。进行已知 TE 的预测时，可直接使用 BLAST 等经典序列比对软件，但更专业的重复序列相似性比较软件是 RepeatMasker。

从头开始的重复序列预测方法多种多样。按输入序列分类，有的从已拼接的基因组序列出发进行 TE 预测，如 RepeatScout 等，这类软件的优点是时间复杂度低，但会显著受到序列拼接质量的影响；有

的从测序片段 (read) 出发, 如 ReAS 和 RECON 等, 虽然计算复杂度高, 但较少受到拼接错误的影响。若按算法分, 则类别非常多样, 如自身比对算法 (self comparison), PILER 和 RECON 分别使用 PALS 和 BLAST 进行自身比对, 对所得 hit 划分为不同的家族 (family), 通过多序列比对获得一致序列。尤其是 PILER 软件, 它针对不同类别 TE 的模式特征, 设计了对应的多种算法。

第五节 假基因的注释

假基因是基因组中与真基因序列相似但缺乏功能的 DNA 序列。按照形成机制的不同, 假基因可以分为非加工假基因 (non-processed pseudogene) 和加工假基因 (processed pseudogene) 两类。非加工假基因又称为复制型假基因 (duplicated pseudogene), 是通过基因组 DNA 复制或者不平衡交换产生的, 多位于其同源功能基因的附近; 加工假基因又称反转座假基因, 来源于反转座事件, 由 mRNA 反转录成 cDNA, 然后整合到基因组中。

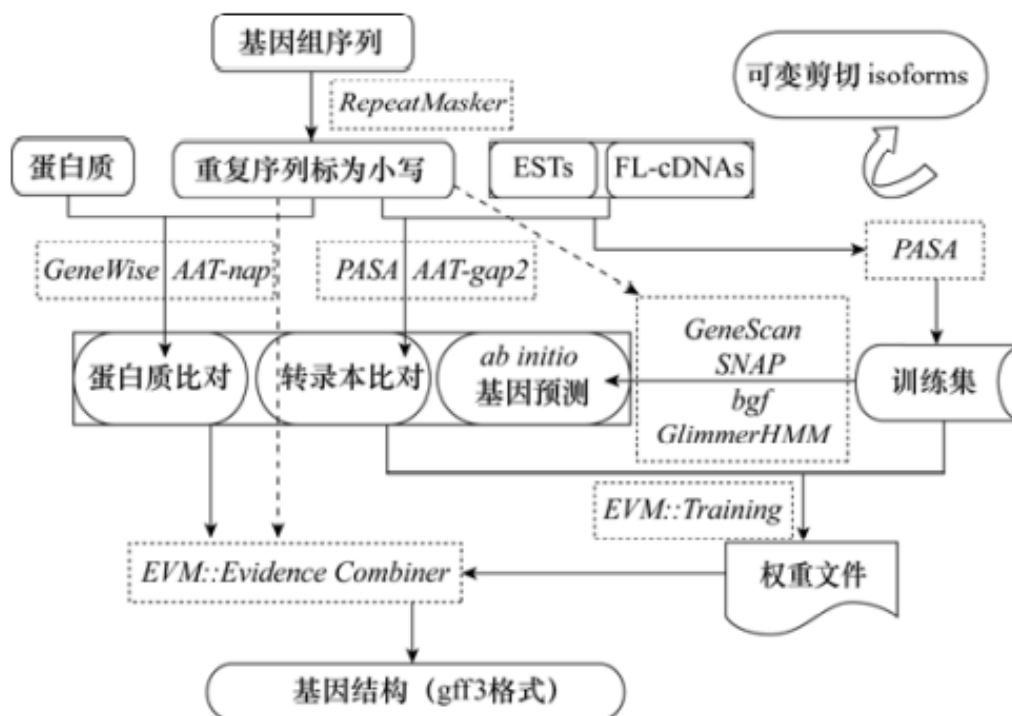
第六节 案例分析: 黄瓜基因组的注释

黄瓜是一种重要的园艺作物, 具有重要的经济价值, 其基因组包含 7 对染色体, 大小仅有 300 多 Mb, 由于其性别分化模式多样, 黄瓜已成为植物性别决定研究的一个主要的模式植物。

一、蛋白质编码基因的注释

黄瓜全基因组序列的注释过程, 使用 EVM 整合从头开始基因预测和基于证据的预测结果, 预测了黄瓜基因组的蛋白质编码基因, 并使用 InterPro、KEGG、KOG 和 UniProt 等数据库对预测的蛋白质编

码基因的功能进行了注释。



(一) 基于证据的基因注释

1. 转录物比对

黄瓜基因组使用的转录物数据库有：黄瓜 EST（农科院提供）和 mRNA（NCBI 下载）、甜瓜 EST（来自 MELOGEN 数据库）和 TIGR 植物转录数据库 PlantTA。黄瓜数据库包括 66680 个 EST singleton、23627 EST contig 和 260 个 mRNA；甜瓜数据库包括 10614 个 EST singleton 和 6023 EST contig；TIGR 包含 251 个植物物种的 3895049 个 unigene。我们使用的 cDNA/EST 比对软件是 PASA 和 AAT-gap2。由于甜瓜和黄瓜同源性很高，我们将甜瓜和黄瓜的 EST 数据整合在一起作为 PASA 的输入。AAT-gap2 使用 TIGR 植物转录物数据作为输入进行同源比对。

2. 蛋白质比对

黄瓜基因组使用了 UniProt (<http://www.uniprot.org/>) 数据库中蛋白质数据。UniProt 是由欧洲生物信息学研究所 (EBI) 将两大蛋白质数据库 Swiss-Prot 和 TrEMBL 整合为一体建立的, 其中 Swiss-Prot 中的蛋白质经过人工检验, 质量比较高, 而 TrEMBL 存放着由计算预测的结果。在黄瓜基因组的注释中使用 UniProt 13.2 版本, 其中, Swiss-Prot 包含 387331 个植物蛋白, TrEMBL 包含 515655 个植物蛋白, 因此, 一共使用了 902986 个植物蛋白。比对使用软件 AAT-nap 和 GeneWise 完成。由于 GeneWise 的运行时间相对较长, 我们在用 GeneWise 进行蛋白质比对前, 先使用 BLASTx ($E\text{-value} < 1 \times 10^{-4}$) 将蛋白质比对到基因组上, 然后将比对上的区域前后扩展 10kb, 再使用 GeneWise 对这些区域进行比对。

(二) 从头开始的基因预测

黄瓜基因组使用了目前 4 个比较常用的从头开始基因预测软件——BGF、GlimmerHMM、SNAP 和 GENSCAN。其中, BGF、GlimmerHMM 和 SNAP 程序使用 PASA 构建训练集进行参数训练, 而 GENSCAN 则使用程序自带的拟南芥模型进行基因预测。在运行这 4 个程序前, 基因组序列中的重复序列被 RepeatMasker 程序过滤掉, 即将基因组中的转座元件序列用“N”代替。

(三) EVM 基因预测自动整合系统

在黄瓜基因组的预测中使用 EVM 将 4 种从头开始基因预测、蛋白质和转录物的同源比对结果进行整合。EVM 在预测基因之前, 根

据 PASA 构建的训练集寻找生成最优基因结构模型的证据权重组合，之后根据训练得到的权重，整合多种预测结果，最终得到黄瓜基因组蛋白质编码基因的基因结构。之后对预测的基因进行一系列过滤，删除不完整的基因结构，如含有提前终止密码子的基因结构及与转座元件有显著相似的基因结构，最终得到了 25344 个编码蛋白质的基因。

（四） 基因功能注释

1. 寻找同源基因

使用 BLASTp 在 UniProt 数据库（版本为 13.2）里进行数据库相似性搜索，其中满足条件 $E\text{-value} < 1 \times 10^{-6}$ 和 $\text{identity} > 35\%$ 的基因对比被认为是黄瓜的同源基因。一共有 76.7%（19450/25344）的黄瓜基因在其他基因组上发现具有同源基因。

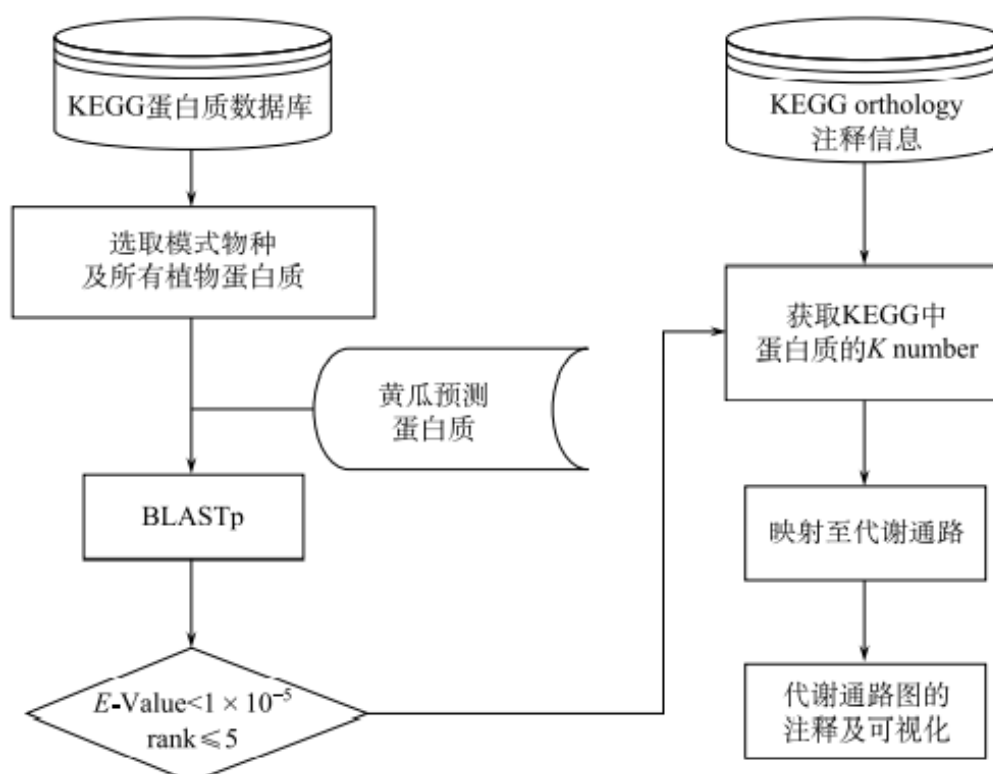
2. 结构域和 GO 注释

使用 InterPro 数据库的 InterproScan 程序对预测基因进行结构域注释，一共有 17122 个（67.6%）基因至少含有一个结构域，其中 Pfam 结构域注释最多。由于 InterPro 的结构域提供 GO（gene ontology）注释，其中 47.6% 的基因因为含有 InterPro 结构域注释而获得 GO 注释，可用于今后的基因功能分类工作。

3. 代谢通路注释

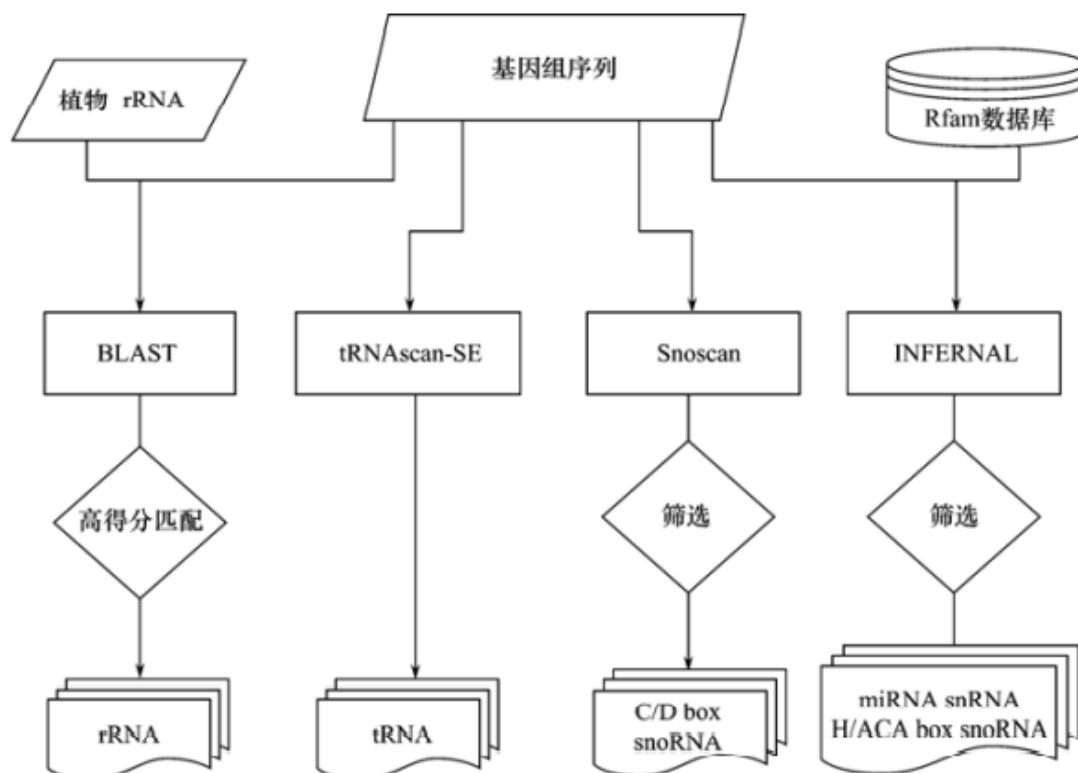
首先，以黄瓜蛋白质序列为查询序列，以 KEGG GENES 中的所有植物和其他模式物种的蛋白质为数据库作 BLASTp 分析。进一步筛选符合条件的黄瓜蛋白：① $E\text{-value} < 1 \times 10^{-5}$ ；② 比对上的 KEGG GENES 中的蛋白质必须拥有 KO 入口号；③ $\text{rank} \leq 5$ ，即与每个黄瓜

蛋白所匹配的 KO 入口号的个数小于或等于 5。每个 KO 记录为一组同源基因，根据 KO 系统中各直系同源组所参与的代谢通路确定黄瓜蛋白的功能及其在代谢通路中的定位。我们将已预测的 25344 个黄瓜蛋白映射到 KEGG 数据库中，40.7%（10327 个）的蛋白质的功能被注释出来，共参与了 231 个代谢通路反应。



二、 RNA 基因的注释

在黄瓜基因组的 RNA 基因注释中，采用 BLAST 软件进行 rRNA 基因的预测，tRNAscan SE 软件进行 tRNA 基因的预测，Snoscan 软件用于 C/D box snoRNA 的预测，INFERNAL 软件与 Rfam 数据库（版本日期：20081104，共含 603 个 CM 模型）中的 miRNA 模型、snRNA 模型和 H/ACA box snoRNA 模型进行比对，分别进行 miRNA、snRNA 和 H/ACA box snoRNA 的预测。



(一) rRNA 预测

使用 BLAST 软件预测 rRNA 基因, 由于黄瓜的 rRNA 序列未知, 我们从 NCBI 下载 4 条模式植物的 rRNA 序列作为库, 其中, 5S rRNA、5.8S rRNA 和 18S rRNA 来自拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 基因组, 28S rRNA 来自于小麦 (*Triticum aestivum*) 基因组。将黄瓜基因组序列与植物 rRNA 基因库进行 BLASTn 比对, 满足条件 $E\text{-value} \leq 1 \times 10^{-10}$ 、 $\text{identity} \geq 90\%$ 且 $\text{matching length} \geq 100\text{bp}$ 的匹配 (hits) 组成了 rRNA 预测集, 共得到 292 个 rRNA 基因片段, 总长度达 112 966bp。

(二) tRNA 预测

tRNA 基因使用 tRNAscan-SE 软件预测, 参数设为默认, 共预测了 681 个 tRNA 基因和 18 个 tRNA 假基因。

(三) snoRNA 预测

对于两类 snoRNA，使用 Snoscan 软件进行 C/D box snoRNA 基因的预测，训练集使用软件自带的酵母 rRNA 序列和酵母 rRNA 甲基化位点信息，选取分值大于或等于 25 且具有甲基化位点注释信息的结果，并根据物理位置进行去冗余，最终得到 C/D box snoRNA 基因的预测集。H/ACA box snoRNA 基因的预测使用 INFERNAL 软件，将黄瓜基因组序列与 Rfam 中 83 个 H/ACA box snoRNA 相关的 CM 模型进行序列和结构比对，满足条件 $\text{score} \geq \log_2(\text{contig length})$ 的结果组成了 H/ACA box snoRNA 基因的预测集，共预测了 157 个 C/D box snoRNA 基因和 81 个 H/ACA box snoRNA 基因。

（四） miRNA 和 snRNA 的预测

miRNA 基因和 snRNA 基因的预测方法与 H/ACA box snoRNA 的预测方法相同，即使用 INFERNAL 软件，将黄瓜基因组序列与 Rfam 数据库中该类 ncRNA 基因相关的 CM 模型（miRNA 模型 46 个，snRNA 模型 10 个）进行序列和结构比对，满足条件 $\text{score} \geq \lg_2(\text{contig length})$ 的结果分别组成了 miRNA 基因和 snRNA 基因的预测集，得到 171 个 miRNA 基因和 192 个 snRNA 基因。

三、重复序列的注释

（一）串联重复序列的注释

黄瓜基因组中，使用 Tandem Repeats Finder 软件进行串联重复序列的预测，除 Maximum Period Size 设为 2000bp 外，其他参数默认。根据重复单元的长度对预测集进行简单分类，重复单元为 1~6bp 的称微卫星序列，重复单元为 7~100bp 的称为小卫星序列，重复单元

大于 100bp 则称为卫星序列。黄瓜基因组中，共鉴定了 72 291 个串联重复序列元件，其中包括 6244 个微卫星序列、59447 个小卫星序列及 6600 个卫星序列。串联重复序列在拼接好的黄瓜基因组序列中占 4.31%。

（二）转座元件的注释

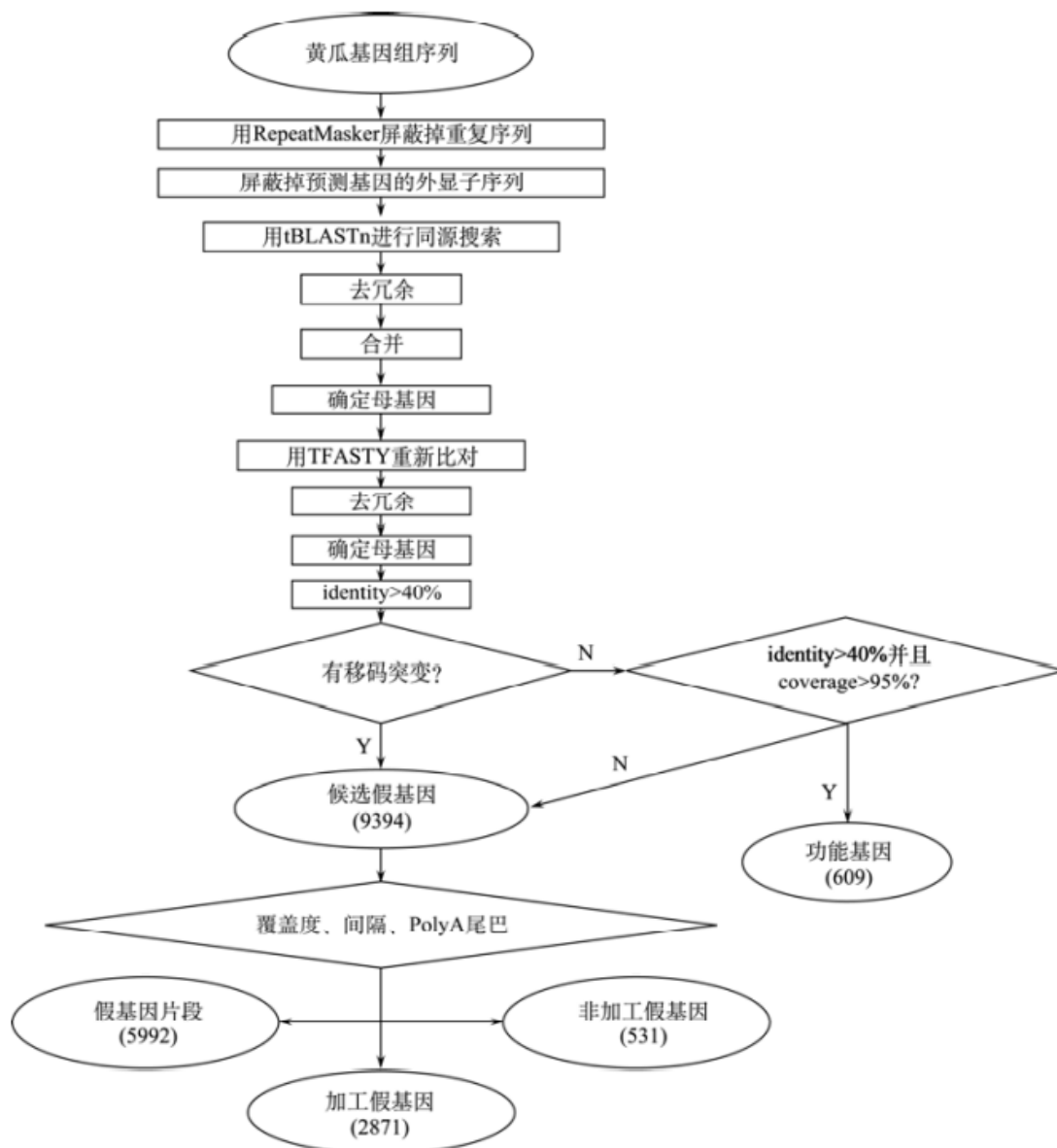
在转座元件注释中，使用了 4 个各具特点的 *de novo* 预测软件，构建了一个黄瓜特异的 *de novo* TE 库，然后对其进行逐级分类，最后，整合已知 TE 数据库、黄瓜特异的 *de novo* TE 库和 TE 蛋白库，对全基因组序列进行了 DNA 和蛋白质水平上的 TE 注释。

四. 假基因的注释

参考 PseudoPipe 有关假基因的分析方法，按照下图所示的流程对黄瓜基因组中的假基因进行识别和分类。

黄瓜基因组中通过同源搜索得到的片段有 609 个被视为功能基因，1709 个基因与其对应蛋白质序列的同一性小于 40%而被认为是假阳性，将这些去除后共得到 9394 个片段，这些片段是 4403 个蛋白质（占黄瓜基因组所有蛋白质的 17.3%）的同源物，说明绝大多数基因是没有假基因的。而在人和小鼠等哺乳动物中，假基因几乎与基因一样多，人类基因组中目前发现 28237 个假基因（35000 个基因）；小鼠基因组中目前发现 15 064 个假基因（22000 个基因）；作为植物的拟南芥假基因数目则比较少，目前发现 4260 个（25000 个基因），说明不同物种假基因数目存在很大差别。黄瓜基因组发现的这 9394 个假基因中，加工假基因有 2871 个、非加工假基因有 531 个、假基因

片段有 5992 个, 可以发现, 加工假基因数目远远大于非加工假基因。



第六章 转录组学

第一节 转录组学概述

转录组学从 RNA 水平研究 基因表达情况,系统性地揭示细胞中基因转录调控规律,对于探究生命活动的相关机制具有重要意义。

一、 转录组学的产生

转录组学 (transcriptomics) 一词最早在 20 世纪 90 年代提出,它的研究对象是全基因组尺度下所有转录本 (transcript), 又称转录产物, 即转录组 (transcriptome)。

转录本作为联结基因和蛋白质的重要桥梁,一定程度上反映了特定时空下基因的表达情况,对于分子生物学和遗传学研究具有重大意义。广义上,转录组是指细胞中所有 RNA 分子的总和,包括 mRNA、rRNA、tRNA 和 ncRNA 等,但有时也特指 mRNA。本章探讨的转录本无特殊说明则专指 mRNA。

二、 转录本测定研究

RNA 测定是转录组学研究的重要内容。单一转录本测定的相关技术在转录组学这一概念出现之前就已存在。最开始基于实验的技术如 Northern blotting 和 RT-PCR, 两者都具有相当高的精准性,但其通量低、价格昂贵,不利于大规模转录组分析。

1980 年之后,低通量的 Sanger 测序技术开始使用 EST (mRNA 反转录而成的 cDNA) 文库测定转录本。随后出现的基于 Sanger 测序的技术有所改善,其中包括 SAGE (基因表达系列分析, serial analysis of gene expression)、CAGE (基因表达加帽分析, cap analysis gene

expression)、MPSS (大规模平行测序, massively parallel sinature sequencing)。这些技术提供更高通量的结果, 并且具备一定程度的转录本定量能力。然而由于第一代测序技术本身的原因, 此类 RNA 测定技术价格仍相对较高, 并且在读段 (reads) 匹配率和转录本异构体鉴定等方面存在不足。

基于杂交的基因芯片技术, 将荧光标记的 cDNA 制成微阵列探针来测定样本中特定转录本的含量。基因芯片技术具有较高的通量和相对不那么高的价格, 在 20 世纪 90 年代中后期曾经得到大范围应用。但芯片技术也存在一些公认的缺陷: 需要参考转录组信息, 交叉杂交产生的背景噪声, 低表达丰度基因检测困难, 以及荧光信号动态检测范围有限等。

基于第二代测序技术的 RNA-seq 给转录组学研究带来了历史性的变革。自 2008 年 Nagalakshmi 等首次使用 RNA-seq 技术揭示了酵母基因组的转录概况以来, RNA-seq 在生物学研究中得到日益广泛的应用。

三、RNA-seq 的应用和最新进展

(一) 差异表达分析

基因表达具有时空特异性, 即在不同组织细胞、不同时间下会出现差异。在不同实验条件处理下, 基因表达也会有不同的响应模式。差异表达分析的目的是找出不同条件下表达上调、下调或者保持稳定的基因, 探究实验条件如何影响基因表达并调控相关生物学过程的机制。差异表达分析在转录组学研究领域应用相当广泛。常见的研究方

向包括研究实验处理，野生型、突变型，正常组织、癌变组织，环境刺激响应，免疫应答过程的比较等。Yang 等对油菜进行了全基因组测序，并通过分析 RNA-seq 数据发现在异源多倍体油菜的亚基因组之间存在同源异体表达优势，其中差异表达的基因比中性基因具有更多的选择潜力。研究指出，同源异体表达优势促进了油菜中的硫代葡萄糖苷和脂质代谢基因的选择，十字花科基因组中的这些同源性表达优势有助于预测多倍体作物基因组中自然选择的定向效应。需要注意的是，差异表达分析只是为研究者筛选出部分基因，而这些基因是否真正参与调控过程以及相关的机制仍需要后续的分析。

（二） 可变剪切

可变剪切或选择性剪切，是指基因转录后的 mRNA 前体经过不同的 RNA 剪切方式连接外显子形成成熟 mRNA 的过程。由于可变剪切的存在，一个基因可能会产生多条转录本，即异构体 (isoform)。异构体大大增加了蛋白质的多样性，但同时也使得探究基因调控机制变得更加复杂。而 RNA-seq 技术可以方便地识别可变剪切位点，鉴定转录本异构体，为研究选择性剪切提供了方法和思路。哺乳动物大脑中的选择性剪切现象十分普遍。为了研究神经发育过程中可变剪切的功能作用，Zhang 等分析了来自发育中的大脑皮层神经祖细胞(NPC)和神经元的 RNA-seq 数据，发现了数百个优先改变关键蛋白质结构域（特别是细胞骨架蛋白）的差异性剪接外显子，并且可以引起致病突变。Ptbp1 和 Rbfox 蛋白相互拮抗调节神经元特异性外显子，控制 NPC 和神经元之间的转换。研究表明，动态可变剪切方式控制着大脑

皮质发育中细胞的分化命运。

（三） 共表达网络

共表达网络是研究基因之间相互关系的常用手段。一般认为，细胞中具有相同功能的基因往往会呈现出相似的表达模式，共表达网络利用这种规律将基因按照相关性连接起来，以模块网络的方式研究基因功能。Mathias 等系统性地分析了 17 种主要癌症类型的蛋白质编码基因的全转录组，其中 2172 个基因被注释为肿瘤标志物相关基因。为了研究影响患者生存的关键预后基因，他们为每个癌症类型构建了癌症特异性共表达网络，并探究了预后基因与肿瘤标志物相关基因之间的功能关系。

（四） 转录调控网络

转录因子（transcription factors）是一类特殊的蛋白质，可以通过结合到基因的特定区域来调控转录过程。转录因子在包括细胞分裂、生长、分化及死亡的整个细胞生命周期中都发挥着重要作用。探究转录因子与基因表达之间的调控机制有助于深入理解转录过程。单一的 RNA-seq 分析无法得到动态的转录因子调控网络，需要借助 ChIP-seq 技术。Song 等使用脱落酸处理拟南芥幼苗来模拟研究转录调控对渗透压胁迫的响应，通过多个时间点的 RNA-seq 数据分析，结合 21 个脱落酸相关的转录因子 ChIP-seq 数据，构建了拟南芥对脱落酸胁迫的转录调控层次网络。该研究揭示了转录因子动态结合和调控网络层次结构的关键因素，阐明了差异基因表达模式与脱落酸反馈调控之间的关系。通过推测观察到的典型脱落酸途径调控特征，他们还确定

了一个新的调节脱落酸和盐响应性的转录因子家族，并证明了其在调节植物对渗透压抗逆方面的效用。

第二节 试验设计和测序流程

一、RNA-seq 试验设计

RNA-seq 实验最终的目的是为需要解决的生物学问题提供思路和证据。缜密的试验设计和规范的实验操作是研究取得成功的首要条件。在进行 RNA-seq 实验前需要考虑以下几个问题：

（一）生物学重复

没有生物学重复难以排除随机误差影响，并且会给测序后的数据分析带来困难，使得统计推断的可靠性大大降低。而过多的生物学重复则会增加实验成本，造成不必要的浪费。选择合适的生物学重复需要结合具体问题，一般可以为 3~5 个。如果对结果的假阳性控制要求较高，则可以在经费允许范围内适当增加重复个数。

（二）样本提取

样本提取的原则是控制干扰变量及避免人为误差。由于基因表达的时空特异性，在样本提取的时候要注意提取时间和组织细胞的控制，以及提取后样本的妥善保存（及时冷冻等）。

（三）测序深度

测序深度应该根据实验的具体要求而定。对于有参考基因组的情况，如果不进行可变剪切或新转录本的分析 and 检测，那么一般每个样本最少只需要 5M 的有效 reads 就可以满足要求（ENCODE 推荐）；如果需要鉴定新转录本或者没有参考基因组，那么就需要适当增加测

序深度；对于 small RNA 同样要适当提高测序深度，一般需要 30M 以上的有效匹配 reads。

（四） 文库构建

构建文库分为链特异性文库和非链特异性文库。非链特异性文库无法区分打碎的片段转录自正义链还是反义链；而链特异性文库在建库时保留了转录本的方向信息用以区分转录本来源，避免互补链干扰。链特异性文库相较于非链特异性文库有诸多优势，如基因表达定量和可变剪切鉴别更准确等，但相对价格也会更高一些。

（五） 测序策略

测序策略包括单末端（single-end）或双末端（pair-end）测序。单末端测序只在 cDNA 一侧末端加上接头，引物序列连接到另一端，扩增并测序。而双末端测序则会在 cDNA 片段两端都加上接头和测序引物结合位点，第一轮测序完成后，去掉模板链，然后引导互补链在原位置重新产生并扩增，以获得第二轮测序所需模板，并进行第二轮合成测序。单末端测序通常更快一些，价格比双末端测序低，一般情况下足够对基因表达水平进行定量。双末端测序则会生成对的 reads，有利于基因注释和转录本异构体的发现。

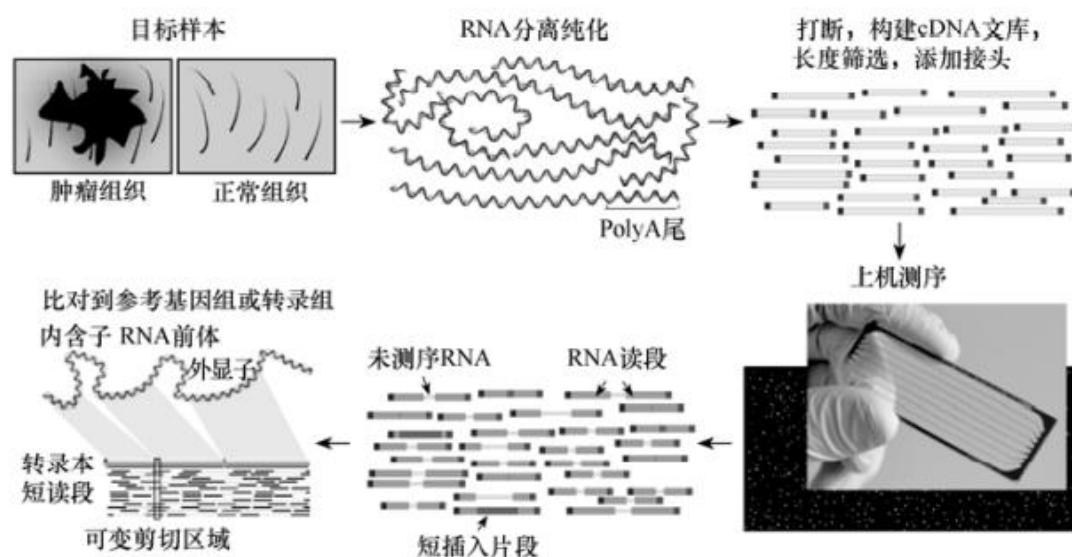
（六） 测序平台

测序平台选择往往依赖于实验及后续分析的需要，考虑如测序读长、最大测序通量、测序准确率等指标。

二、 RNA-seq 文库制备

RNA 测序简单流程如下图所示：选择感兴趣的样本提取 RNA，采

用合适的策略（PolyA 富集或者 rRNA 移除）分离纯化 RNA，然后随机打碎成短片段并反转录为 cDNA，选择合适长度的片段添加接头构建文库，扩增并测序。其中 cDNA 文库制备的 3 个关键步骤如下。



（一）总 RNA 提取

将 RNA 从特定组织中分离并与脱氧核糖核酸酶混合，降解样本中的 DNA。然后用凝胶和毛细管电泳检测 RNA 降解量，评估 RNA 样本质量。提取的 RNA 品质会影响随后的文库制备、测序和分析步骤。

（二）RNA 分离纯化

根据实验目的不同，可以采用 PolyA 富集目标片段或者移除 rRNA 的方式。成熟的 mRNA 具有 3'端 PolyA 尾，故可以通过将 RNA 与连接到磁珠上的 PolyT 低聚物混合来进行富集。PolyA 富集忽略了非编码 RNA 并且会引入 3'偏倚，而使用 rRNA 移除策略可以避免这些问题。rRNA 移除的原理是 rRNA 占细胞中总 RNA 的比例超过 90%，故移除 rRNA 可以将大部分无关的转录本去除，留下感兴趣的目标序

列。

（三） cDNA 合成

RNA 无法直接测序，因此分离纯化后的 RNA 需要打碎成片段并逆转录为 cDNA。其中打碎过程可以采用酶、超声波处理或喷雾器等方式来进行。RNA 的片段化降低了随机引物逆转录的 5' 偏倚和引物结合位点的影响，缺点是 5' 端和 3' 端转化为 DNA 的效率降低。逆转录过程会导致方向性缺失，但通过化学标记可以保留原转录本的方向信息（链特异性文库）。对产生的短片段进行末端修复、加接头，然后按照长度排序分类，选择适当长度的序列进行 PCR 扩增纯化，检测文库质量后上机测序。

cDNA 文库制备是 RNA-seq 的前置关键步骤。高质量的 mRNA 是构建 cDNA 文库的首要条件，而 mRNA 极易被 RNA 酶降解，故在进行总 RNA 提取时应注意防止样品引入 RNA 酶 污染。许多测序公司都开发了大量专业的试剂盒用于总 RNA 提取，且提供 cDNA 库制备的详细策略方案。文库制备方式和测序策略会影响 RNA-seq 数据质量和分析结果，是 RNA-seq 实验能否成功的关键。

第三节 转录组数据核心分析

一、 测序数据存储格式

第二代测序得到的是长度为 50~250bp 的短片段，称为 reads。通常测序仪输出的原始测序结果以 FASTQ 文件进行存储。FASTQ 格式是一种用于存储生物序列（通常是核苷酸序列）及其相应测序质量得分的文本文件。为了简洁起见，序列字母和质量得分都用单个

ASCII 字符表示。该格式最初由 Wellcome Trust Sanger 研究所开发，用于捆绑 FASTA 序列及其质量数据，但最近已成为存储高通量测序仪输出的实际标准。FASTQ 文件中，一个 read 通常由四行组成：第一行以@开头，之后为序列的标识符及描述信息（与 FASTA 格式的描述行类似）；第二行为 read 的序列信息；第三行以“+”开头，可以再次添加序列描述信息（可选）；第四行为质量得分信息，与第二行的序列相对应，长度必须与第二行相同。

二、 测序数据质量控制

测序结果的好坏会影响后续数据分析的可靠性，故在测序完成后需要通过一些指标对原始测序结果进行评估，如 GC 含量、序列重复程度、是否存在接头等。评估 Illumina 测序结果的常用工具为 FastQC (Andrews, 2010)，另一个工具 NGSQC (Dai et al., 2010) 适用于所有测序平台。

三、 reads 比对

比对指的是将 reads 匹配到参考基因组或转录组的相应位置上，无参考基因组的处理过程将在后文详细描述。根据比对策略的不同，分为非剪接比对 (unspliced aligning) 和剪接比对 (spliced aligning)。

(一) 非剪接比对

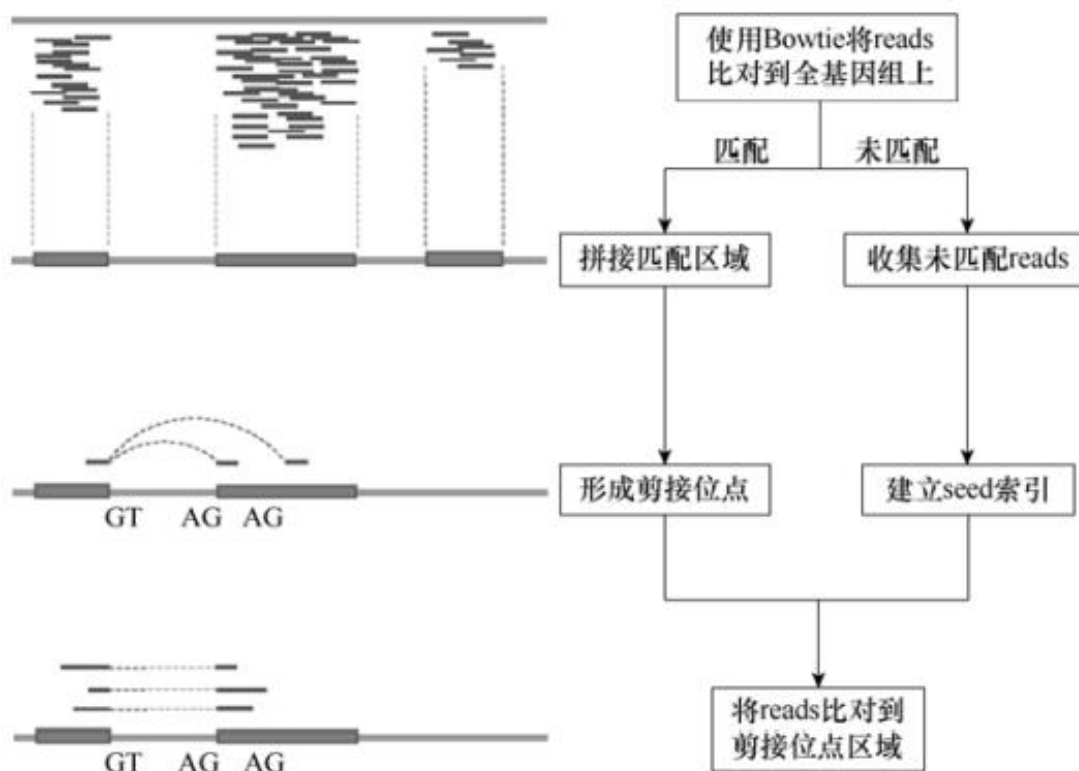
剪接方式中 reads 比对的区域是连续的，不考虑由于剪接形成的缺口，适用于比对到参考转录组的情况。非剪接比对代表工具有 Bowtie (Langmead et al., 2012) 和 BWA (Li et al., 2009) 等。Bowtie 是一种短序列快速比对程序，使用数据压缩技术 Burrows-Wheeler 变

换对参考基因组建立索引。这种存储利用高效的数据结构允许 Bowtie 使用大约 2GB 的存储容量读取哺乳动物整个基因组的 reads。当研究的对象是人、小鼠或拟南芥等注释信息相对完善的物种，或者只关注已知基因或转录本的表达情况，就可以选择非剪接比对方式直接将 reads 匹配到所有转录本异构体上。如果需要研究可变剪切及鉴定新转录本则应选择剪接比对方式。

（二）剪接比对

剪接比对考虑到 reads 匹配的基因区域可能会被内含子隔开而不连续，故在剪接位点附近的 reads 可能会部分比对到剪接点两侧外显子上。剪接比对适用于匹配到参考基因组的情况，常用工具有 TopHat (Trapnell et al., 2009)、STAR (Dobin et al., 2013) 和 HISAT (Kim et al., 2015) 等。另外有一些工具在剪接比对的基础上专门对鉴定 SNP 进行了优化，如 GSNAP (Wu et al., 2010) 和 MapSplice (Wang et al., 2010) 等。

TopHat 是最初用于剪接比对的工具之一，经过改进现在已经更新至 TopHat2 (Kim et al., 2013)。它的工作原理如下图所示。



(三) 比对文件格式

Reads 比对的结果文件为 SAM (sequence alignment map) 文件, SAM 格式由标题和对齐结果组成。标题部分必须处于对齐部分之前, 以“@”符号开始, 与对齐部分区分开来。对齐结果部分由 11 个必需字段及相应的可选字段组成。SAM 文件的二进制形式是 BAM 文件, 相当于压缩的 SAM 文件。SAMtools (Li et al., 2009) 软件可以对比对结果文件进行分析和编辑。比对结果的可视化可以使用基因组浏览器 IGV (integrative genomics viewer) (Thorvaldsdóttir et al., 2013)、Genome Maps (Medina et al., 2013) 和 Savant (Fiume et al., 2010) 等。

(四) 比对结果评估

① Reads 匹配百分比可以用来评估总测序精确度和 DNA 污染程

度。②Reads 随机性分布:以 reads 在参考基因组上的分布来评估 RNA 打断的随机性程度, reads 在参考基因上分布 比较均匀说明打断随机性较好。③匹配 reads 的 GC 含量与 PCR 偏差有关。比对结果的评估工具有 RSeQC(Wang et al., 2012)和 Qualimap(Okonechnikov, 2015) 等。

四、 基于第二代测序的转录本定量

(一) reads 计数

Reads 计数根据对多重比对 reads 处理方式的不同分为两种策略:

①只选择唯一匹配 reads 计数。这种方式会将多重比对的 reads 舍弃, 一般用于估计基因水平的 reads 匹配数。常用的工具有 HTSeq-count (Anders et al., 2015) 和 featureCounts (Liao et al., 2013), 需要比对结果 SAM 文件和包含基因注释信息的 GTF 文件作为输入。②保留多重匹配的 reads。利用统计模型将多重比对的 reads 定位到对应的转录本异构体上, 如 Cufflinks (Roberts et al., 2011)、StringTie (Pertea et al., 2015) 和 RSEM (Li et al., 2011) 等工具。

(二) RNA 定量标准化

Reads 数受到基因长度、测序深度和测序误差等影响, 需要归一化处理之后才能用于差异表达分析。常用的标准化策略有 RPKM、FPKM 和 TPM 等。RPKM (reads per kilobase of exon model per million reads) 即每 100 万 reads 比对到每 1kb 碱基外显子的 reads 数目。

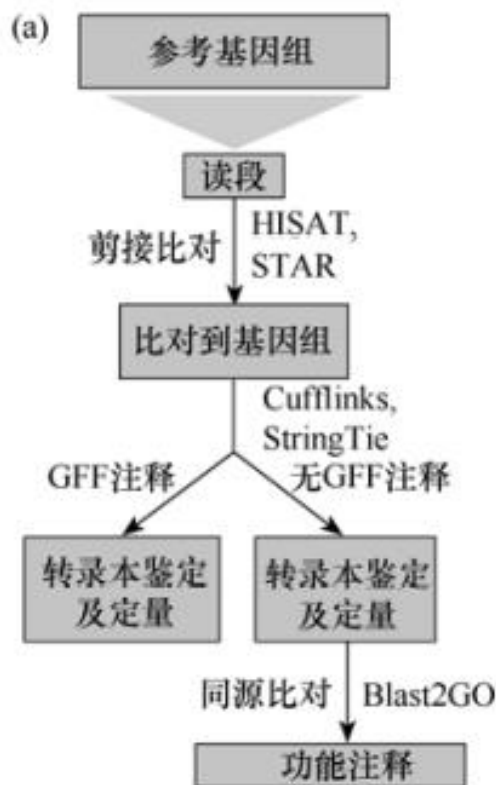
另一类来自差异表达分析软件 DESeq (Anders et al., 2010) 和 edgeR (Robinson et al., 2010) 的归一化算法考虑了可能出现的异常

高表达值的情况。这两种方法的核心思想是表达量居中的基因或者转录本在所有样本中的表达量值都应该是相似的。

五、 转录组核心分析策略选择

(一) 参考基因组

在可以获得物种参考基因组的情况下，如果需要研究可变剪切事件和识别新转录本，则应将 reads 比对到参考基因组上。比对过程可以选择剪接比对软件如 TopHat、HISAT 及 STAR 等。然后可以使用 Cufflinks 和 Stringtie 等软件进行转录本拼接，与基因组注释 GFF 文件进行比较鉴定新转录本。利用 Blast2GO (Conesa et al., 2005) 等工具可以对新转录本进行功能注释。下图给出了基于参考基因组的主要分析流程。



(二) 参考转录组

可以获得物种全转录组的情况下，如果只关注已知转录本的表达，则可以将 reads 通过 Bowtie 等非剪接比对软件直接匹配到参考转录组上，然后利用 RSEM、Kallisto (Bray et al., 2015) 等工具进行转录本定量。下图给出了基于参考转录组的主要分析流程。



(三) 无参考基因组

在没有参考基因组的情况下，可以使用从头组装的方法处理 RNA-seq 数据。常用的从头组装工具有 SOAPdenovo-Trans (Xie et al., 2014)、Oases (Schulz et al., 2012)、Trans-ABYSS (Robertson et al., 2010) 及 Trinity (Grabherr et al., 2011) 等。其中较为常用的 Trinity 由 3 个模块组成：Inchworm、Chrysalis 和 Butterfly。将 reads 通过 Bowtie 重新比对到组装成的转录本上，然后利用 HTSeq-count 或 RSEM 等进行 reads 计数估算表达量，同时可以通过 Blast2GO 等对转录本进行功能注释，作为 Unigene 参考注释信息。下图给出了无参考

信息的从头组装 RNA-seq 分析流程。



第四节 功能分析

一、 差异表达分析

差异表达分析指的是基于一些统计学模型，对不同样本处理下的基因表达差异进行分析，区分这种差异源于处理效应还是随机误差。样本的选取对差异表达分析结果影响较大，故当样本齐次性较差或者样本数量较大时，需要先对样本进行相关性分析，剔除异常样本，也可以使用主成分分析（principal component analysis, PCA）选取样本。对选定的样本进行归一化、建模和统计检验是差异表达分析的主要过程。差异表达分析的结果一般用差异倍数（fold change）和统计检验显著性值来描述。

（一） 差异来源

差异表达分析的目的是找出不同条件下样本中表达出现显著差异的基因。不同条件可以理解为不同实验处理，由此引起的差异称为处理差异；而同一实验条件下的不同样本之间由于个体差异、技术误差等存在也会有差异，称为组内差异。故直接比较组间差异时包括了组内差异和处理差异。最终检验处理效应的显著性时，应该由组间差异减去组内差异。而计算组内差异需要生物学重复，如果没有重复样本，那么差异表达分析结果的可靠性会下降。

（二） 模型选择

一般测序实验的生物学重复和样本数比较小，故难以采用非参数检验直接进行差异分析。而参数检验基于样本总体分布信息，故需要假设一个合适的模型来描述这种分布。

1. 高斯分布

最初使用高斯分布描述表达水平，然而基因表达量不可能是负值，故严格意义上并不符合正态分布。

2. 泊松分布

Marioni 等研究发现，RNA-seq 技术重复条件下的测序方差与泊松分布的方差相吻合。而后 Simon 等发现在生物学重复情况下，低表达基因方差符合泊松分布；而随着表达量升高，实际方差要远大于泊松分布的方差。

3. 负二项分布

Simon 等指出泊松分布模型可能严重低估了个体差异带来的误差。在此基础上提出的负二项分布的方差 $v = \mu + \alpha\mu^2$ ，可以通过调整

散度因子 α 的值来调节模型的离散度,使其符合实际情况中基因表达方差远大于均值的情况。DESeq 和 edgeR 都采用负二项分布来描述 reads 频数分布情况。

4. β 负二项分布

β 二项分布可以拟合比对过程中的多重比对 reads 分配误差,与负二项分布相结合而成 β 负二项分布。Cuffdiff 采用的就是这种分布。

(三) 常用工具比较

工具	版本	标准化方式	模型假设	统计检验
edgeR	3.18.1	TMM/Upper quartile/RLE	负二项分布	Exact test
DESeq2	1.16.1	DESeq sizeFactors	负二项分布	Wald test/LRT
baySeq	2.10.0	quantile/TMM/total	负二项分布	empirical Bayesian
NOIseq	2.20.0	RPKM/TMM/Upper quartile	非参数	Condition vs. null
Limma	3.32.10	TMM	voom 转换	Empirical Bayes
Cuffdiff2	2.2.1	Geometric/quartile/FPKM	β 负二项分布	t-test
EBSeq	1.16.0	DESeq median normalization	负二项分布	empirical Bayesian

差异表达分析可以初步筛选出由处理条件引起表达差异的基因。根据设置的显著性值和差异倍数阈值不同,得到的差异表达基因也差之甚远。同时考虑到多重检验的问题,差异表达分析得到的显著性 p 值需要通过 BH (Benjamini&Hochberg) 方法校正为 q 值。一般以 p 值校正后的 FDR 取 0.05、差异倍数绝对值取 2 为界限,但是如果产生的结果过多或过少,则可以调整这两个阈值来得到期望的结果。差异表达分析得到的结果为相互独立的基因,直接对这些基因单独分析称为单基因分析,这种方法具有许多弊端。单基因分析在差异表达基因较多时工作量会非常大,且由于忽略了基因之间的相互作用关系,揭示具体生物学过程的结果将变得不可靠。如何对差异表达分析得到

的基因进行系统性整合挖掘是下游分析的关键。

二、 聚类分析

聚类分析将表达模式相似的差异表达基因聚在一起，以基因集的形式进行后续分析。常用的聚类方法有 K 均值算法、层次聚类、SOM（自组织映射）及 FCM（模糊 C 均值）等。在介绍聚类算法之前需要明确距离这一概念。数学上有多种计算距离的方法如欧氏距离、曼哈顿距离、马氏距离、余弦相似度及汉明距离等。在结构性聚类中选择合适的距离计算方式是首要步骤。聚类的原则是最小化类间相似性，最大化类内相似性。

（一）K 均值

K 均值(K-means clustering)是聚类算法中较为经典的方法之一。由于其高效性，故常用于基因表达数据的聚类。假设差异表达分析后筛选得到的基因数量为 n (x_1, x_2, \dots, x_n)，K 均值聚类的目的是根据表达模式（向量）将 n 个基因划分到 k 个基因簇中，使得类内平方和最小。首先随机选择 m_1, m_2, \dots, m_k 共 k 个基因分别代表每个基因簇的中心，然后计算每个剩下的基因到选定的 k 个基因即中心的距离（通常采用平方误差，也可以使用其他距离）。

（二）层次聚类

层次聚类（hierarchical clustering）按照方向不同分为聚集型和分裂型。从子节点开始逐渐汇聚到根节点称为聚集型层次聚类；从根节点开始逐步发散状分裂称为分裂型层次聚类。应用较为广泛的是凝聚型层次聚类。其策略是将每个基因作为一个初始簇，然后成对计算

基因之间的距离，将相互距离最小的两个基因合并作为一个新簇，重新计算新簇与所有原始簇之间的距离，不断重复这个过程直至所有基因都包含在一个簇中。

（三）自组织映射

自组织映射 (self-organize map, SOM) 是一种神经网络聚类算法，可以通过一种无监督式学习将 n 维输入空间降维映射到 2 维平面。SOM 的思想来自人脑神经元的自组织排列，即人脑中特定外界信号敏感的神经元组织形式不是先天形成的，而是后天不断接受外界信息输入后训练而成。SOM 模拟人脑中不同区域神经元对应不同功能的特点，通过最优参考矢量集合来对输入模式进行聚类。SOM 训练通过对网络输入随机选取的训练样本，寻找对输入模式响应最强烈的输出神经元，称为获胜神经元；然后以获胜神经元为中心更新邻近区域神经元权值，再输入随机样本进行训练获胜神经元邻域范围缩小至一定值。

三、富集分析

富集分析即用已知的基因功能注释信息作为先验知识，对目标基因集进行功能富集。富集分析相较于单基因分析具有很多优势：基因集结合基因功能作为先验知识，使得功能分析更加可靠；将海量的基因表达信息映射到关键的富集功能基因集合，有利于系统揭示生物学问题。常用的基因注释信息数据库有 Gene Ontology (GO)、Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes orthology (KEGG) 等。

（一）基因富集分析

基因富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA) (Subramanian et al., 2005) 的原理及实现: 首先计算基因表达量与样本表型相关性, 按照相关性从高到低排序得到基因列表 L , 然后遍历列表 L , 如果基因包含于特定功能基因集 S 中, 则富集分数 ES 增加, 反之减少; 增加或减少的幅度根据基因表达量与样本表型的相关性大小而定。给样本随机分配标签, 打乱样本顺序, 计算富集分数并重复此过程, 得到富集分数 ES 的理论分布 ES_{null} , 以此估计观测值 $ES(S)$ 的显著性 p 值。结果显著则说明功能基因集 S 中的基因在基因列表 L 中集中分布于顶部, 即基因集 L 显著富集于 S 所属的特定功能条目。后来研究人员针对 GSEA 也提出了一些改良的方法如基因富集参数分析 PAGE、基因集分析 GSA 等, 这些方法通过修改富集分数的计算方式改进了 GSEA。需要注意的一点是, GSEA 的方法主要是为芯片数据开发的, 应用到 RNA-seq 分析时需要对基因表达量进行标准化处理。

(二) Fisher 精确检验

Fisher 精确检验也是富集分析常用的方法之一。Fisher 精确检验使用超几何分布, 该方法的原理是: 首先获取物种全部基因作为富集背景, 假设共有 N 个基因, 其中有 M 个基因与某一特定功能密切相关; 然后选定差异表达基因或者聚类后的模块基因, 假设共有 k 个基因, 其中 x 个基因属于上述特定功能。

富集分析常用的工具除了 GSEA, 还有 DAVID (Sherman et al., 2009)、IPA (Krämer et al., 2013) 及 clusterProfiler (Yu et al., 2012) 等。富集分析可以研究不同基因集可能蕴含的生物学功能, 将由 RNA-

seq 产生的大量基因缩小到关键的几个功能和通路范围，从中选取感兴趣的重要功能基因进行后续分析，并通过相关实验进行验证。

四、 共表达网络

共表达网络为研究基因间相互作用和基因表达的调控关系提供了一种思路。共表达利用生物细胞中功能相关的基因在特定环境下协调表达的特点，即表达模式相似的基因被认为可能具有相似的功能。一般通过计算基因之间的相关系数矩阵，设定阈值筛选相关性，然后以网络的形式展现。图中每个点代表基因，连接两个基因的边代表相关性。相关性系数计算部分可以通过 R 语言实现，主要有皮尔逊相关系数、斯皮尔曼相关系数及偏相关系数等；另外也有复杂的基于网络拓扑重叠结构来衡量相似性的方法如 TOM 等。除了相关性系数，也可以使用距离衡量相似程度。

（一） WGCNA 构建共表达网络

权重基因共表达网络分析（**weighted gene co-expression network analysis, WGCNA**），是一种基于相关性系数构建共表达网络的方法。WGCNA 的工作原理如下。①样本相关性聚类。根据表达量和表型数据对所有样本聚类，检查是否有异常样本。②计算基因两两之间的相关性。

（二） 网络模块挖掘

研究共表达网络时常常会使用图论中的一些方法定义网络拓扑结构，包括节点、度、度 分布、聚集系数、直径、平均路径长度等。基因相互作用网络符合无标度网络分布，即网络中大部分基因只与很

少的基因连接，而只有极少数基因会与非常多的基因连接，这些基因称为 hub 即核心基因。WGCNA 可以利用连通性值进行排序，找出最大的前几个基因即核心基因；也可以根据已知的基因，找出与之相关性较强（TOM 值较大）且自身连通性较高的基因进行分析。另外的模块分析方法如 MCODE（Bader et al., 2003）是一种基于图论的网络模块挖掘算法，MCL（Hwang et al., 2006）是模拟网络随机流的无监督聚类方法，Qcut（Ruan and Zhang, 2008）是一种无参数基于划分的模块识别算法。

五、拓展分析

（一）可变剪切

基因转录后形成的前体 RNA 还需要经过一系列转录后修饰如可变剪切等才能成为最终的信使 RNA。由于可变剪切的存在，基因水平的表达与转录本水平的表达水平有差异。同一基因可能会产生不同的转录本异构体，如何计算不同异构体的表达水平和不同样本中的差异是一个难题。

（二）基因融合

基因融合是指两个或两个以上不同基因的编码区全部或部分连接在同一套调控序列中而构成的嵌合基因，染色体易位、插入、缺失等都可以引起基因融合。由于基因融合的存在，同一条染色体上的转录本片段也无法完全确定共线性。大量的研究表明，融合基因在肿瘤发生中起重要作用。利用 RNA-seq 可以对基因融合事件进行一定程度的分析。在进行 reads 比对时，大部分 reads 落入一个完整的外显

子中，少部分会匹配到已知的剪接位点区域。除了这两部分，对剩余的 reads 再进行分析，确认它们是否匹配到了来自不同基因的外显子连接位置。这个思路可用于初步分析基因融合事件，但是由于第二代测序读长限制，获得的结果会存在很大的噪声。一个替代方案是选择双末端测序的成对 reads 来进行分析。如果大量成对的 reads 匹配到不同基因的外显子，则很有可能发生了基因融合。

（三） 多组学数据

RNA-seq 结合其他基因组水平的数据有利于多维度体现基因表达对生物学过程的调控机制。

第五节 RNA-seq 数据分析案例

一、 系统配置和数据预处理

（一） 系统配置

本案例主要分析步骤采用 Linux 和 Windows7 操作系统。官网下载 VMware Workstation 12 安装包和 Ubuntu-16.04 镜像文件。按照文档安装 VMware，然后使用 VMware 安装虚拟机。虚拟机具体配置情况：64 位，内存 4GB，硬盘 160GB；Windows7 配置情况：64 位，内存 16GB，硬盘 1TB。

（二） 数据获取

本案例使用的测序数据来自 NCBI GEO，检索号为 GSE80568，测序平台为 HiSeq2500，单末端测序（SE）。数据集包括拟南芥幼苗的 RNA-seq 和 ChIP-seq 数据，原用于分析构建拟南芥抗渗透压胁迫下的转录调控网络。考虑到运行时间问题，本实验只选取 GSE80565

中的两组数据，每组两个生物学重复。其中实验组为脱落酸（ABA）处理 8h 的拟南芥幼苗，对照组为乙醇 EtOH 处理 8h 的拟南芥幼苗。

基因组数据来自拟南芥数据库 TAIR，包括拟南芥染色体基因组序列和注释文件。将染色体序列合并成一个全基因组序列，使用 Cufflinks 自带的 gffread 工具将 GFF 注释文件转换为 GTF 格式，以便于后续分析。

（三）数据预处理

1. 提取 fastq 文件

用 fastq-dump 工具从 SRA 文件中提取 fastq 序列文件。

2. 质量评估

使用 FastQC 检测原始测序数据质量。

3. 质量控制

使用 fastx_trimmer 截去 reads 前 12 位碱基。

二、比对和拼接

（一）比对

本案例采用有参基因组策略，使用 HISAT2 将 reads 比对到基因组上。

1. 建立基因组索引

提取可变剪切和外显子信息并建立索引（人和小鼠的索引库可以在 HISAT2 官网下载）。

2. reads 比对

使用 HISAT2 进行 reads 比对，处理 4 个样本大约 10min。

3. SAM 文件处理

使用 `samtools` 对 SAM 文件排序并转换为 BAM 文件，总共耗时约 45min。

4. 比对结果可视化

使用 IGV (`integrative genomics viewer`) 工具展示比对结果。IGV 运行依赖 Java 环境，故需要提前安装 JDK。排序后的 BAM 文件才能使用 IGV 展示，且需要输入 `index` 文件和基因组文件。BAM 文件可以在上一步获取，使用 `samtools` 对其建立索引。

5. 比对结果质量评估

使用 `Qualimap` 检测评估比对结果质量。`Qualimap` 运行依赖 Java 和 R，需提前安装。

(三) 拼接

如果仅仅关注已知基因表达情况，不需要鉴定新转录本则可以跳过此步骤。

1. 有参转录本拼接

使用 `stringtie` 进行转录本拼接，耗时约 5min。

2. 转录本整合

将 4 个样本的 `gtf` 文件路径写入文件 `gtflist.txt`，使 `--merge` 整合 4 个 `gtf` 文件。

3. 转录本注释文件比较

使用 `gffcompare` 对整合后转录本注释文件与参考注释比较，获得可能的新的转录本信息。

三、计算表达丰度

(一) 计算 FPKM

使用 `stringtie` 计算基因和转录本的 FPKM。

(三) reads 计数

使用 `HTSeq-count` 从比对结果中提取所有基因匹配的 reads 数目，耗时约 20min。

五、差异表达分析

本案例采用 R 语言和 DESeq2 进行差异表达分析。建议安装 RStudio 便于编程操作。具体 R 语言运行命令脚本可在网站获取，网址见本节开头。

1. 计算差异表达基因

DESeq2 计算得到 588 个显著差异表达基因（筛选条件为 $\log_2\text{FoldChange}$ 绝对值大于 2，校正后 p 值小于 0.01）。

2. 差异显著基因聚类

使用 `pheatmap` 对 588 个显著差异的基因进行聚类。可以看到有两个较为明显的区块，左边方框中基因在脱落酸处理条件下表达量高于空白对照，而右边方框中的基因相反。这些基因对于拟南芥响应脱落酸胁迫的调控过程可能起到重要作用。

五、富集分析

(一) GO 富集

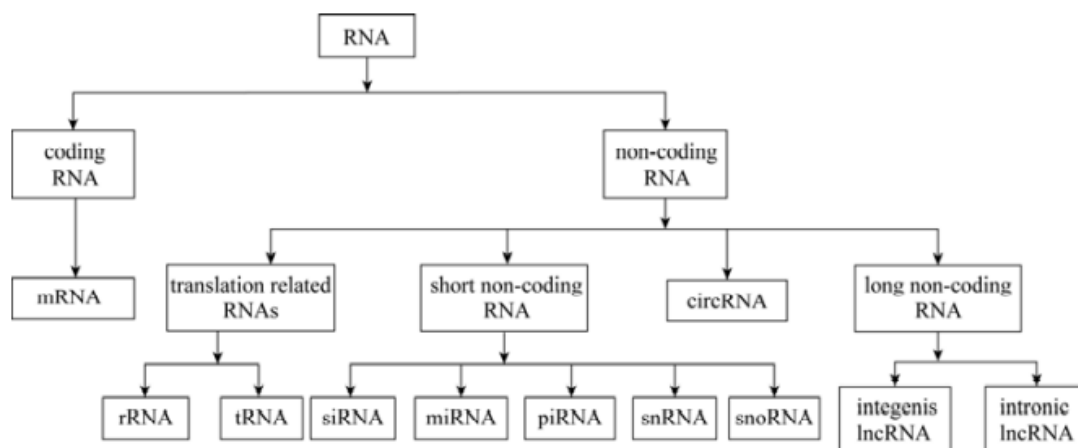
使用 `clusterProfiler` 进行 GO 富集，需要在 R 中安装 `org.At.tair.db` 拟南芥信息库。由于 `clusterProfiler` 不识别 TAIR ID，故需要先将基因

第七章 非编码 RNA

第一节 非编码 RNA 概述

一、非编码 RNA 的特征

非编码 RNA 按照碱基长度一般分为两类：第一类为短链 RNA (small ncRNA, sncRNA), 长度一般小于 200nt, 包括 miRNA、piRNAs、siRNAs、snRNA (small nuclear RNA), sno-RNA (small nucleolar RNA) 等；第二类为长链 RNA, 长度一般大于 200nt, 包括长非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 等, 环状 RNA (circular RNA, circRNA) 也是一类特殊的长链非编码 RNA。



在这些非编码小 RNA 中, miRNA 主要在转录后负调控目标基因的表达, 是最重要的一类调控小 RNA。目前 miRBase (release 21) 已报道的人类 miRNA 为 2588 个, 预期这类 RNA 的总数目还会增加, 而且癌症的发展也和 miRNA 有关, 这种相关性可以用于根据 miRNA 的特性分类人类癌症。lncRNA 也是当前的研究热点, 它和许多染色质重塑复合物相关, 通过定位这些复合物到特定的基因位点来改变 DNA 的甲基化和组蛋白的状态, 在表观遗传调控中起着重要作用。

lncRNA 不仅在转录水平，在转录后水平上也能调节蛋白质编码基因的表达，从而广泛地参与包括细胞分化、个体发育在内的重要生命过程，其异常表达与多种人类重大疾病的发生密切相关。lncRNA 存在带 PolyA 尾和不带 PolyA 尾两种形式，具有跨物种的低保守性、组织特异性表达和丰度低等特点。lncRNA 的种类远远超过编码 RNA，保守估计哺乳动物基因组序列中 4%~9% 的序列产生 lncRNA 转录本，而相应的蛋白质编码 RNA 的比例仅是 1%~5%。RNA 的调控网络可能决定我们大多数复杂的特性，并在疾病中发挥重要作用，组成了一个物种内和物种间遗传变异调控的未知世界。

二、非编码 RNA 的识别

非编码 RNA 的大规模鉴定主要有理论预测的方法和实验的方法。理论预测主要借助计算机，从已有的非编码 RNA 中提取特征信息，然后以特征信息做全基因组搜索，比较成功的如 snoScan、snoGPS、tRNAScan、mirScan、RNAz 和 RNAmotif 等。理论预测方法简便快捷，但是最终的确定还是依赖于实验。实验的方法是构建非编码 RNA 的 cDNA 文库，克隆测序或者直接测序（直接分离纯化非编码 RNA 后测序）以及全基因组 tiling array 芯片技术。在长非编码 RNA 的专用商业芯片推出之前，可以对已有的芯片进行探针重注释，从而识别长非编码 RNA 的表达情况。

三、非编码 RNA 的功能预测

非编码 RNA 摆脱“junk DNA”的名头还不久，大部分非编码 RNA 的功能尚未被实验所证实。由于非编码 RNA 缺乏翻译产物，相对于

mRNA 又显得数量庞大，目前对非编码 RNA 的功能预测主要还是理论手段。常见方法总结如下。

1) 通过互作、共表达、共定位等信息，得到与非编码 RNA 相关的一组基因及其他互作因子 (miRNA 等)，并进行功能富集。由于相似的特征并不直接说明功能相关，所以使用这一方法时应注意结合多种因素以增强可靠性，并注意统计检验。

2) 收集尽可能全的功能注释数据与相关性数据，建立编码-非编码网络，划分功能模块，并为模块内的非编码 RNA 赋予功能。有些非编码 RNA 并没有足够进行功能富集的互作伙伴，但通过模块法可以预测其功能。

3) 通过非编码 RNA 的序列，通过算法预测其与其他 RNA 或蛋白质等的结合情况，再通过所得已知因子来推测非编码 RNA 的功能。由于 ceRNA 是 lncRNA 的一类重要功能角色，此类方法常常用于预测 lncRNA 与 miRNA 的匹配关系并推断功能。

目前常用的非编码 RNA 功能预测平台包括 ncFANs (已整合进 noncode)、ChIPBase (<http://deepbase.sysu.edu.cn/>)、starBase (<http://starbase.sysu.edu.cn/>)、LncRNADisease (<http://cmbi.bjmu.edu.cn/lncrnadisease>)、DIANA-LncBase (http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=lnccbasev2) 等，此外一些较大的综合数据库也提供预测功能。lncRNA 相关常用资源如下表。

预测软件	特 点	网 址
Noncode	目前最全面的 lncRNA 资源。提供 17 个物种（截止到 2017 年 11 月）的非编码 RNA 数据，并提供序列比对等多种功能	http://www.noncode.org/
LNCipedia	包含人类超过 14 万条 lncRNA 的注释信息，包括二级结构、编码潜能、miRNA 结合位点等	https://lncipedia.org/
LncRNASNP2	收集整理了超过 14 万人类 lncRNA 和超过 11 万小鼠 lncRNA 上各数百万条的 SNP 信息，提供 lncRNA 突变功能，相关疾病、癌症样本表达等多种信息	http://bioinfo.life.hust.edu.cn/lncRNASNP2/
CANTATAdb	提供 10 种模式植物 lncRNA 的表达、序列比对、编码潜能等综合信息	http://yeti.amu.edu.pl/CANTATA/
HUGO-lncRNA	提供已经官方定名的 lncRNA Symbol	http://www.genenames.org/rna/LNCRNA
NPInter	收集了 22 个物种非编码 RNA 之间和非编码 RNA 与生物分子（DNA/RNA/蛋白质等）的互作关系	http://www.bioinfo.org/NPInter/
EVLncRNAs	实验证实的 lncRNAs，包含 77 个物种 1543 个 lncRNA 的信息	http://biophy.dzu.edu.cn/EVLncRNAs/
LncATLAS	lncRNA 的亚细胞定位信息	http://lncatlas.crg.eu/
AnnoLnc	用于注释人类 lncRNA 的 webservice，输入为 lncRNA 的 FASTA 序列	http://annolnc.cbi.pku.edu.cn/

四、非编码 RNA 的编码潜能

目前，通过对核糖体测序（Ribo-seq）等数据的全面分析，越来越多的非编码 RNA 被证实有编码潜能。非编码 RNA 有编码潜能的这一发现使得 mRNA 与非编码 RNA 之间的界限变得模糊，非编码 RNA 可能需要一次重新定义，而实验手段也需要一次革新。

五、非编码 RNA 的注释

NONCODE 是一个专用于非编码 RNA（不包括 tRNA 和 rRNA）

的集成知识数据库。数据来源于发表的文献、RNA-seq 数据、microarray 数据、dbSNP 数据和 GWAS 数据，目前共收集和整合了 17 个物种（人类、小鼠、牛、大鼠、鸡、果蝇、斑马鱼、线虫、酵母、拟南芥、黑猩猩、大猩猩、马来亚猩猩、恒河猴、鸭嘴兽、猪等）ncRNA（特别是 lncRNA）的相关信息。不仅可以查询到 ncRNA 基因的定位、序列等基本信息，还可以查询表达谱、外泌体表达谱、保守信息、功能预测、疾病关联和 RNA 结构等注释信息；并提供 RNA 序列的 Blast 分析和 lncRNA 的鉴定。



第二节 非编码 RNA 的分类

一、根据 ncRNA 在细胞内的分布不同分类

1. 细胞核仁小 RNA

自从 20 世纪 60 年代末 Weinberg 等在哺乳动物中发现了第一个核仁小分子 RNA（small nucleolar RNA, snoRNA）U3 以来，这一领域的研究进展引起了人们的广泛关注。核仁小分子 RNA 是一类小分

子非编码 RNA，且多富集于核仁，代谢稳定。典型的 snoRNA 具有如下主要特征：分子大小为 60~400nt；具有类似核仁提取物的性质（抗盐性）；需要与特定蛋白质结合形成核糖核蛋白体（ribonucleoprotein particles, snoRNP），并以此形式存在和行使功能；snoRNA 分子具有多种与蛋白质相互作用的保守序列元件。

2. 细胞核小分子 RNA

细胞核小分子 RNA（small nuclear RNA, snRNA）是真核生物转录后加工过程中 RNA 剪接体（spliceosome）的主要成分，其长度在哺乳动物中为 100~300 个核苷酸。snRNA 一直存在于细胞核中，与核内蛋白质共同组成 RNA 剪接体，在 RNA 转录后加工中起重要作用。它参与真核生物细胞核中 RNA 的加工。snRNA 和许多蛋白质结合在一起成为小核核糖核蛋白（small nuclear ribonucleoproteins, snRNP），参与信使 RNA 前体（pre-mRNA）的剪接，使后者成为成熟 mRNA。snRNA 共分为 7 类，由于含 U 丰富，故编号为 U1~U7。snRNA 只存在于细胞核中，其中 U3 存在于核仁中，其他 6 种存在于非核仁区的核液里。除 U6 由 RNA 聚合酶 III 转录外，其他的都是由 RNA 聚合酶 II 催化转录的，具有修饰的碱基，并在 5' 端有一个三甲基鸟苷酸（TMG）的类似“帽”结构，3' 端有自身抗体识别的 Sm 抗原结合的保守序列。sn-RNA 的特点如下：①稳定，半寿期常与核糖体相近；②含量丰富，如 U1 分子在每个核中的含量可有 10⁶ 个；③普遍性，在动物、植物细胞中均含有 snRNA；④高度保守，如人和爪蟾的 U1 snRNA 有 90% 的序列相同。

通常 snRNA 不是游离存在,而是与蛋白质结合成复合物 snRNP。snRNA 不参与蛋白质合成活动,而是在 RNA 加工方面具有重要作用。U3 snRNA 与核仁内 28S rRNA 的成熟有关,而 U1 则是在核液中与前体 mRNA 的剪接加工有关。snRNA 中的蛋白质部分具有核酸酶和连接酶活性,能把转录在内含子-外显子接点处切断,并把两个游离端连接起来。

3. 细胞质小分子 RNA

细胞质小分子 RNA (small cytoplasmic RNA, scRNA) 分布在细胞质,主要在蛋白质合成过程中起作用。

4. Cajal 小体

Cajal 小体 (Cajal bodies, CBs) 是 CBs 特异性小 RNA,存在于细胞核中,能与 U 族 snRNA 碱基配对,可能对 U1、U2、U4 及 U5 进行位点特异性 2'-O-核糖甲基化,并参与假尿嘧啶形成。

二、根据 ncRNA 长短不同分类

根据 ncRNA 长短不同,国际上通用的分类方法通常分为两类。常见的种类如下表所示。

类型	亚类	缩略词
短链非编码 RNA	microRNAs	miRNAs
	piwi interacting RNAs	piRNAs
	tiny transcription initiation RNAs	tiRNAs
	small interfering RNAs	siRNAs
	promoter-associated short RNAs	PASRs
	termini-associated short RNAs	TASRs
	antisense termini associated RNAs	aTASRs
	small nucleolar RNAs	snoRNAs
	transcription start site antisense RNAs	TSSa-RNAs
	small nuclear RNAs	snRNAs
	retrotransposon-derived RNAs	RE-RNAs
	3'UTR-driven RNA	UaRNAs
	x-ncRNA	x-ncRNAs
	human Y RNA	hYRNAs
	unsuslly small RNAs	usRNAs
长链非编码 RNA	small NF90-associated RNAs	snaRNAs
	vault RNAs	vtRNAs
	long or large intergenic ncRNAs	lincRNAs
	transcribed ultraconserved regions	T-UCRs
	pseudogenes	None
	GAA-repeat containing RNAs	GRC-RNAs
	long intronic ncRNA	None
	antisense RNAs	aRNAs
	promoter-associated long RNAs	PALRs
	promoter upstream transcripts	PROMPTs
	stable excised intron RNAs	None
long stress-induced non-coding transcripts	LSINCTs	

1. 短链非编码 RNA

短链非编码 RNA 是一类转录本序列比较短，一般不超过 40nt 的非编码 RNA。**sncRNA** 分子虽小，却参与了包括细胞增殖、分化、凋亡、细胞代谢以及机体免疫在内的几乎所有生命活动的调节和控制，在生命体内扮演着至关重要的角色。短链非编码 RNA 的调节作用发生异常，则有可能导致生命体代谢活动紊乱，甚至导致疾病（如癌症）的发生。

2. 长链非编码 RNA

长链非编码 RNA 是一类转录本长度超过 200nt 的非编码 RNA 分

子，它可在多层面上（表观遗传调控、转录调控及转录后调控等）调控基因的表达。lncRNA 最初被认为是 RNA 聚合酶II转录的副产物，是一种“噪音”，不具有生物学功能。然而，近年来的研究表明，lncRNA 参与了 X 染色体沉默、染色体修饰和基因组修饰、转录激活、转录干扰、核内运输等过程，其调控作用正在被越来越多的人研究。

三、根据 ncRNA 的功能和表达特征分类

1. 看家 ncRNA

看家 ncRNA [housekeeping (infrastructural) ncRNAs] 表达通常比较稳定，其表达水平受体内外环境变化的影响不明显，他们具有对细胞存活至关重要的一系列功能，如 snRNA、SRP RNA 等。

2. 调节或调控 ncRNA

调节或调控 ncRNA (regulatory ncRNAs) 可分为转录调控子、RNA 分布调控因子、转录后调控因子、蛋白质功能调节因子等。这类 RNA 一般在组织发育或细胞分化的特定阶段表达，或者是对外界环境的应激表达，随后调控一系列的生物过程。

3. 兼具看家功能和调节功能的 ncRNA

这类 RNA 主要是核仁小分子 RNA (snoRNA)，是一类广泛分布于真核生物细胞核仁的小分子非编码 RNA，具有保守的结构元件。snoRNA 主要作用为修饰 rRNA、tRNA 和 snRNA，最近研究表明 snoRNA 可形成 sdRNA。一些 sdRNA 类似于 miRNA，与 argonaute 蛋白相关，影响到翻译过程。另外一些较长的片段，和 hnRNP 形成复合物并影响基因的表达，显示了 snoRNA 具有看家 RNA 稳定表达

的特性，又具有调节 RNA 的调节作用。

snoRNA 依据结构单元可划分为三大类：box C/D snoRNA、box H/ACA snoRNA 和 MRP RNA。其中 box C/D 和 box H/ACA 是已知 snoRNA 的主要类型，以碱基配对的方式分别指导核糖体 RNA 的甲基化和假尿嘧啶化修饰。研究发现，snoRNA 除了在核糖体 RNA 的生物合成中发挥作用之外，还能够指导 snRNA、tRNA 和 mRNA 的转录后修饰。此外，还有相当数量的 snoRNA 功能不明，被称为孤儿 snoRNA (orphan snoRNA)。在哺乳动物的孤儿 snoRNA 中，印迹 snoRNA (imprinted snoRNA) 是最为特殊的一群，由基因组印迹区编码，具有明显的组织表达特异性。原核生物古细菌中类 snoRNA 的鉴定表明了这些非编码 RNA 家族成员的古老起源；而哺乳动物中大量的 snoRNA 反转座子的存在更为人们探索 snoRNA 在基因组中扩增和功能进化提供了新的思路。

第三节 microRNA

microRNA (miRNA) 是一类内源性的、长度为 21~25 个核苷酸的小 RNA，其在细胞内具有多种重要的调节作用。每个 miRNA 可以有多个靶基因，而同一个靶基因也可以被几个 miRNA 共同调节，形成复杂的调节网络。据推测，miRNA 调节着人类三分之一的基因。

一、microRNA 的生物合成

miRNA 是一种小的内源性、长度为 21~25 个核苷酸的单链 RNA (ssRNA)，由发夹状初始转录产物经过加工后形成，它的序列存在于发夹状茎环结构中的茎上。这种茎环结构通常是由 70 多个核苷酸

组成的不完全的发夹结构，上面有一些凸起和环状结构。茎部形成双链 RNA，但不是严格互补，可存在错配和 GU 摆动配对。通过与靶基因的 3'UTR 配对，促进 mRNA 的降解或者 mRNA 翻译抑制，从而抑制靶基因的表达。在动物中，miRNA 初级转录产物为 primary miRNA (pri-miRNA)。pri-miRNA 在核内被 Drosha (2 类 RNase III 酶) 加工为前体物 precursor miRNA (pre-miRNA)，然后在 exportin-5 (EXP-5) 介导下运输到胞浆，在细胞质中进一步由 Dicer 酶 (RNase III 型蛋白) 加工成为成熟的 miRNA 并加载到 Argonaute 蛋白生成效应物 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC)。在植物体内 miRNA 的合成有些不同，植物中没有发现对应的 Drosha 及其辅酶因子 (DGCR8/Pasha) 的同系物，这表明在植物细胞中没有依赖于 Drosha 加工过程。基因研究显示，Dicer like 1 (DCL-1) 专一负责 miRNA 的加工。exportin-5 同系物 HASTY (HST) 介导 miRNA 从细胞核到细胞质。miRNA 在细胞核或细胞质中加载 Argonaute 家族蛋白质 (AGO)。

二、 microRNA 的生物信息学分析方法

对目的 miRNA 的生物信息学分析，能为其功能研究提供重要线索。miRNA 基因的常规生物信息学分析策略如下。

1. 获取 microRNA 的序列信息

当前最常用的 miRNA 权威数据库是 miRBase (<http://www.mirbase.org/>)，该数据库提供 miRNA 注册、序列查询、基因组定位、相关文献查询和靶基因预测等功能，目前已更新到 21.0 版，涵盖 223 物种，包含 28 645 条 miRNA 发夹前体，35828 条成熟

miRNA。

miRBase: the microRNA database

miRBase provides the following services:

- The miRBase database is a searchable database of published miRNA sequences and annotation. Each entry in the miRBase Sequence database represents a predicted hairpin portion of a miRNA transcript (termed *mir* in the database), with information on the location and sequence of the mature miRNA sequence (termed *miR*). Both hairpin and mature sequences are available for searching and browsing, and entries can also be retrieved by name, keyword, references and annotation. All sequence and annotation data are also available for download.
- The miRBase Registry provides miRNA gene hunters with unique names for novel miRNA genes prior to publication of results. Visit the help

2. microRNA 新基因的预测和鉴定

生物信息学预测是利用 miRNA 在不同物种间的保守性、miRNA 前体具有的发卡结构 (hairpin)、miRNA 与靶基因的互补性等特征设计算法，从而预测发现大量潜在的 miRNA。近年来，基于高通量测序数据的挖掘算法成为 miRNA 新基因鉴定的最主要的方法。一条候选的 miRNA 新基因一般需要满足以下条件。

1) 前体具有典型的发卡结构：通过 blast 将候选 miRNA 新基因匹配到基因组，找到其前体大致的位置；从基因组中切割出可能的前体序列，通过 RNAsarp 或 RNAfold 软件进行二级结构折叠，需要满足发卡结构，且候选 miRNA 应该位于茎区。

2) 能找到加工过程中 miRNA/miRNA*二聚中间体：将高通量测序数据匹配到前体序列上，除了能找到 miRNA，还要能同时找到表达值较低的 miRNA*，两者互补，位于茎区，二聚体一般 3'端有 2 个碱基的突出，5'端有 2 个碱基的缩进。

3) 在 AGO 蛋白中富集: 因为 miRNA 只有载入特定的 AGO 蛋白才能发挥调控功能, 候选的 miRNA 新基因在 AGO 富集的小 RNA (sRNA) 高通量测序列数据的读数应该明显高于对照。

4) Dicer 或 DCL1 酶加工依赖性: 由于前体需要经过 Dicer 酶(动物)或 DCL1(植物)加工才能生成 miRNA 成熟体。因此, 在 Dicer 或 DCL1 突变株中, miRNA 表达量应显著下降, 甚至为 0。

3. miRNA 靶基因的预测和鉴定

RISC 复合体在 miRNA 的指导下识别靶基因, 如果 miRNA 与靶基因几乎完全互补, 则切割靶基因, 如果互补程度较低, 则抑制靶基因翻译。由于 miRNA 与其靶基因并非完全匹配, 这给确定 miRNA 靶基因带来了一定的难度。目前的 miRNA 靶基因预测的主要原理如下。

1) 种子序列的互补性: miRNA 5'端第 2 到第 8 个核苷酸(种子序列)与靶基因 3'UTR 的 7nt 序列完全互补配对。

2) 序列保守性: miRNA 结合位点在多个物种之间如果具有保守性, 则该位点更可能为 miRNA 的靶位点。

3) 热动力学因素: miRNA: target 对形成的自由能越低, 其可能性越大。

4) 位点的可结合性: target 二级结构影响与 miRNA 的结合形成双链结构的能力。

5) UTR 碱基分布: miRNA 结合位点在 UTR 的位置和相应位置的碱基分布同样影响 miRNA 与靶基因位点的结合和 RISC 的效率。

6) miRNA 与靶基因组织分布的相关性。

第四节 lncRNA

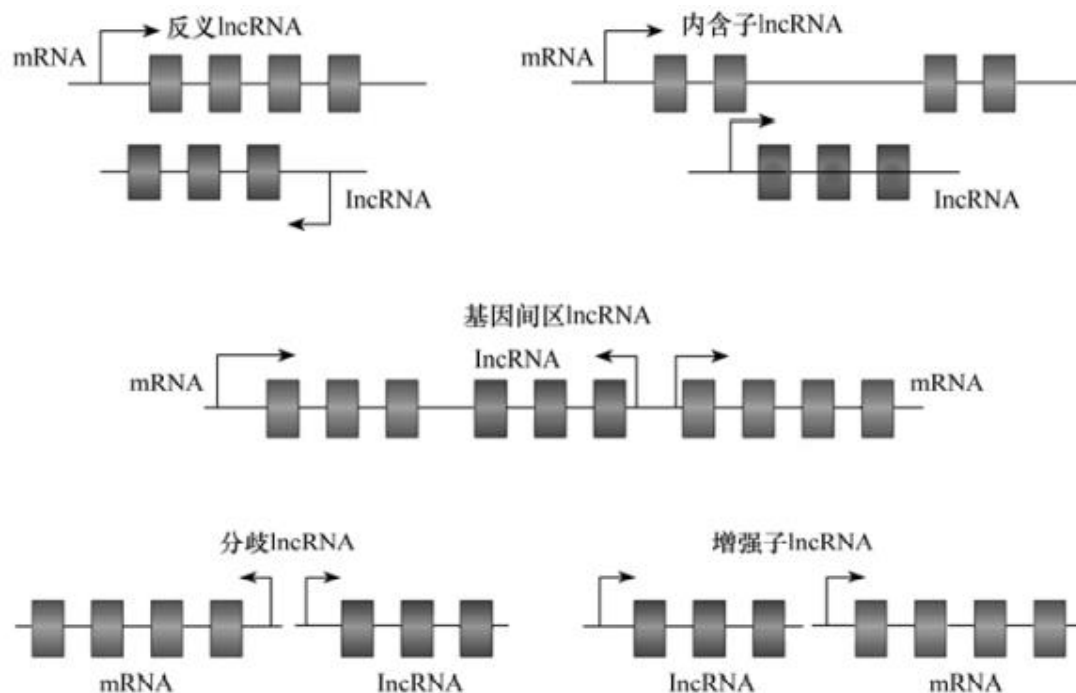
长非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 是一类转录本长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA 的统称,也是目前已知最大的一类非编码 RNA,具有十分重要的功能。lncRNA 在动植物基因组中普遍存在,如在哺乳动物中超过 50% 的转录本不具有蛋白质编码性。虽然 lncRNA 不编码蛋白质,但以 RNA 的形式参与多种重要生物学过程的调控。

一、lncRNA 的产生和分类

了解 lncRNA 产生和分类是进一步解析 lncRNA 功能的基础。首先,受到细胞类型和发育阶段特异的刺激, lncRNA 的产生具有细胞类型和发育阶段特异性。lncRNA 在产生过程上大体与 mRNA 类似,但也有异于 mRNA 形成的地方。根据 lncRNA 基因组上与蛋白质编码基因的位置关系, lncRNA 可以分成多种类型,如下图所示, Marko 等描绘了 lncRNA 的主要产生位置及类型,具体可以分成以下五大类:

- ①反义 lncRNA (antisense lncRNA), 主要产生于蛋白质编码基因的反义链;
- ②内含子 lncRNA (intronic lncRNA), 主要产生于蛋白质编码基因的内含子区域;
- ③基因间区 lncRNA (intergenic lncRNA, 也称 lincRNA), 主要产生于两个蛋白质编码基因的中间区域;
- ④分歧 lncRNA (divergent lncRNA), 主要产生于蛋白质编码基因附近相反的方向;
- ⑤增强子 lncRNA (enhancer lncRNA), 主要产生于蛋白质编码基因的增强子区域。lncRNA 主要分布于核内和胞浆内,核内 lncRNA 占大多数,有些 lncRNA 可能同时存在于核内和胞浆内。不同类型

lncRNA 根据分布位置的不同，其发挥的作用也不同。

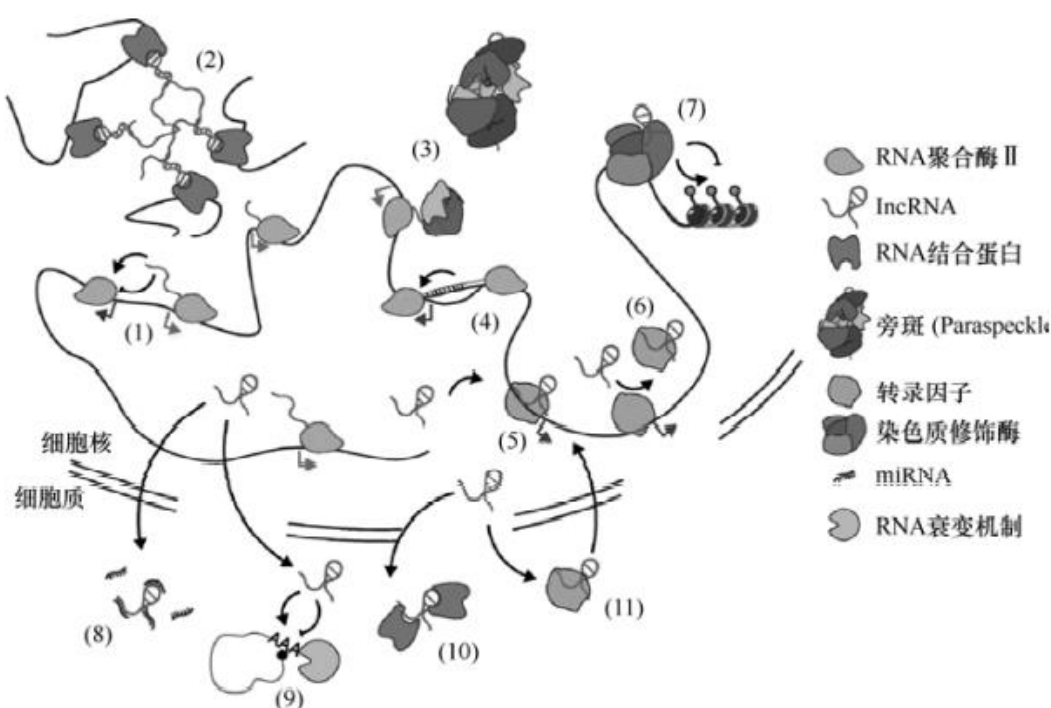


二、 lncRNA 的功能

在已报道的 lncRNA 功能中，大部分 lncRNA 主要参与染色质修饰复合物的形成、核结构域的形成以及调控转录增强子活性，其余的 lncRNA 主要参与干扰转录机制或维持核斑点结构。目前已发现的 lncRNA 的作用机制主要涉及以下 8 种：①lncRNA 可以作为顺式(cis-)和反式(trans-)作用因子调控基因表达，并且这两种方式可以组合出现；②通过改变染色质重塑和组蛋白修饰，从而调控基因表达；③lncRNA 调控选择性剪接；④生成小的双链内源性干扰 RNA(siRNA)；⑤调控蛋白质活性；⑥lncRNA 可以作为大分子复合物或细胞组分的支架 RNA 或组成部分；⑦改变蛋白质定位；⑧生成小的单链 ncRNA，如 miRNA。

下图是 Francesco 等整理的常见的 lncRNA 功能示意图，包含 11

种调控作用：1 参与邻近基因转录的激活或抑制；2 参与染色体间的互作；3 参与形成核结构（如杂斑）；4 参与端粒区域 R-loop 结构的形成；5 引导转录因子到特定的位置；6 作为转录因子的“诱饵”；7 作为染色质修饰复合物的支架；8 作为 miRNA 的“海绵”吸附 miRNA，抑制 miRNA 的功能；9 调控 mRNA 的降解；10 调控 RNA 结合蛋白的细胞定位；11 调控 DNA 结合蛋白的细胞定位。



lncRNA 可以和蛋白质相互作用，包括转录因子、组蛋白以及其他蛋白质等；lncRNA 可以和 RNA 相互作用，包括 mRNA、miRNA 以及其他 lncRNA 等；lncRNA 特异性地与 miRNA 结合，影响 miRNA 的表观遗传修饰作用；lncRNA 可作为竞争性内源 RNA (ceRNA) 与其他具有相似 miRNA 调控模式的编码基因进行交互作用，进而互相影响彼此的表达；lncRNA 还可以和 DNA 相互作用。

因此，和 lncRNA 有关的异常有可能和疾病有关系，lncRNA 也

正在成为了解疾病发生发展的新型分子，也正在成为疾病生物标志物和药物靶标的潜在分子。此外，lncRNA 的降解也与人类多种疾病（如癌症和心血管疾病等）密切相关，同时，降解的过程中也可以产生小 RNA，这些小 RNA 可能靶向其他 RNA，进而调控其功能。虽然在 lncRNA 功能方面已取得了大量的研究成果，但是仍有许多问题尚未解决。

三、lncRNA 在线数据库和分析软件

1. LNCipedia

作为一个综合性的人类 lncRNA 数据库，包含 56946 个基因及 127802 个转录本的注释信息，其中整合了多个数据库及 2482 篇文献的数据，并赋予了统一的 ID。网址为 <https://lncipedia.org>。

2. CANTATAdb

提供了 36 种植物和 3 种藻类的共计 239 631 个 lncRNA 的注释信息，是利用 RNA-Seq 数据结合生物信息学预测方法识别的。网址为 <http://cantata.amu.edu.pl>。

3. CPC

基于序列特征和支持向量机方法衡量 RNA 蛋白质编码潜能性的在线工具，同时提供了本地版本的下载，目前广泛应用于 lncRNA 识别。网址为 <http://cpc.gao-lab.org>。

4. lncSLdb

通过文献挖掘、整理而成的含 8 个物种 lncRNA 亚细胞定位信息的在线资源库，主要包含 3 种定位类型，即细胞核、细胞质以及同时

定位到这两个位置。网址为 <http://bioinformatics.xidian.edu.cn/lncSLdb/index.jsp>。

5. RNAfold

利用最小自由能或配分函数预测 RNA 或 DNA 二级结构的在线工具。网址为 <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>。

6. RNAInter

提供了全面的 RNA 互作信息，互作类型有“RNA-RNA”“RNA-蛋白质”“RNA-DNA”“RNA-复合物”和“RNA-组蛋白修饰”，包含了 154 个物种共 41322577 条 RNA 的互作信息，其中有 7577354 条 lncRNA 相关的互作信息。网址为 <http://www.rna-society.org/rnainter>。

7. IntaRNA

能够快速而准确地预测动植物或细菌中两个 RNA 分子是否能够互作的在线工具，同时提供了本地版本的下载。网址为 <http://rna.informatik.unifreiburg.de/IntaRNA/Input.jsp>。

第五节 circRNA

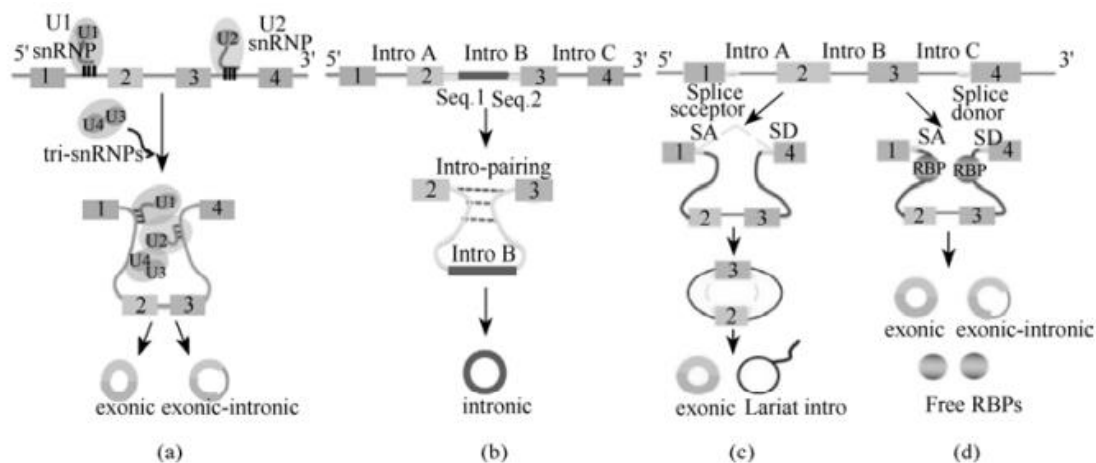
环状 RNA (circRNA) 是区别于传统线性 RNA 的一类新型内源性 RNA，以共价键形成闭环状结构。

与线性 RNA 不同，circRNA 并不存在 5'端及 3'端的终点，也没有 PolyA 尾巴。而经典的 RNA 检测方法只能分离具有 PolyA 尾巴结构的 RNA 分子，这也是 circRNA 在以往的研究中通常被忽略的一个原因。近年来，随着 RNA 测序 (RNA-seq) 技术的广泛应用和生物信

息学技术的快速发展,人们发现 **circRNA** 广泛且多样地存在于真核细胞中。其调控的复杂性,以及在疾病发生中的重要作用越来越受到大家的重视。

一、 **circRNA** 的生物合成

研究表明, **circRNA** 通常由一种非经典的可变剪切方式(反向剪切, **back splicing**)产生。根据 Liu 等的总结,现有的 **circRNA** 形成过程主要有以下 4 种。



(1) 剪接体依赖的环化途径 [图 (a)]: 大多数真核环状 RNA 是由选择性剪接(可变剪接)产生的。

(2) 内含子配对驱动环化途径 [图 (b)]: 很多 **circRNA** 的形成依赖于一个反向互补的 **motif** 促进环化。

(3) 套索驱动环化途径 [图 (c)]: 在经典的跳过外显子的可变剪接过程中, 会生成一个套索状的副产物。

4) 蛋白因子结合环化途径 [图 (d)]: 有一些 **RBP** (RNA 结合蛋白) 可以结合内含子区特定的靶序列, 使得供体-受体序列在空间上靠近, 从而促进环化。

二、circRNA 的特性

人们已经发现了 circRNA 的许多特性。circRNA 含量丰富，在细胞中多有发现，人类细胞中的 circRNA 甚至能达到 25000~100000 种，数量远超线性 RNA。不同物种间的 circRNA 通常具有一定的进化保守性，但也有一些 circRNA 不保守。circRNA 由 DNA 转录而来，但一般不翻译成蛋白质。虽然不易被 RNase 降解，只要 siRNA 对应的靶序列在 circRNA 中存在但 circRNA 仍然可被该 siRNA 降解。不过当 siRNA 作用于线性 RNA 的末端时，拥有共同靶序列的 circRNA 可能并不会被沉默，这也许是空间结构上的原因。circRNA 主要在细胞质中被发现，而不出现在核糖体中。circRNA 的结构稳定，与 mRNA 相比可以持续存在较长时间。与线性 RNA 合成的速度相比，circRNA 合成速度其实非常慢。但由于封闭环状结构，使得其对核酸外切酶免疫，因此稳定性远远超过线性 RNA。某些 circRNA 的表达丰度可以超过对应的 mRNA 10 倍以上。随着时间的积累，细胞内 circRNA 可以达到很高的浓度，特别是神经细胞，因为没有分裂稀释，浓度更高。

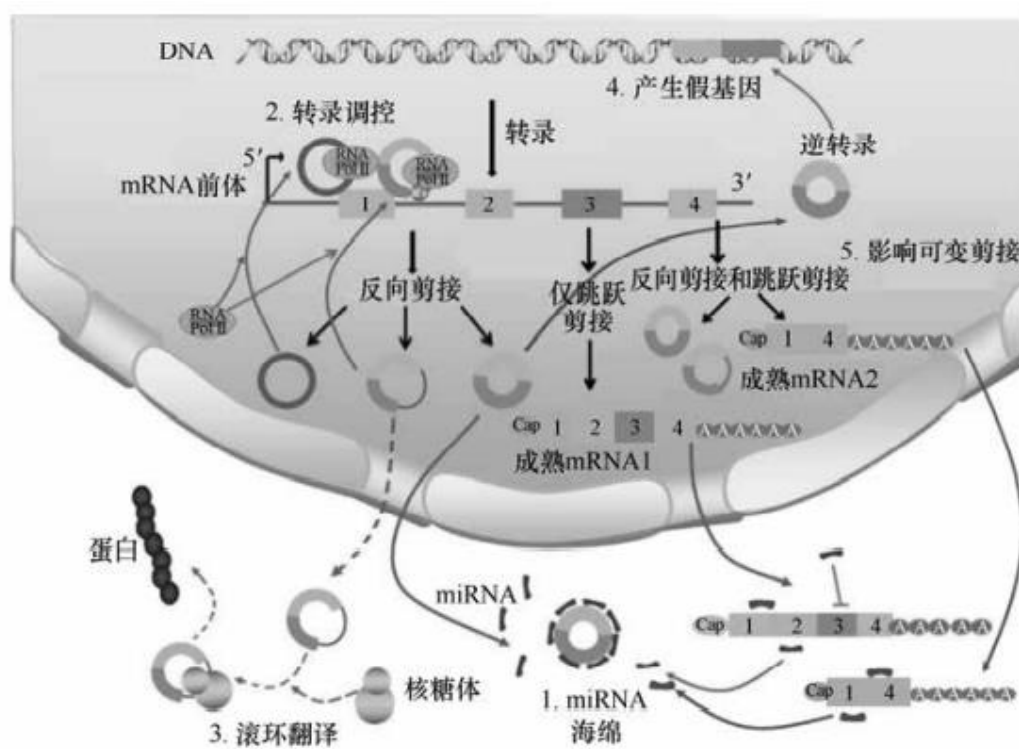
三、circRNA 的分类

circRNA 分子根据其在基因组中的来源及其构成序列的不同，一般可分为 5 类：即外显子来源的环状 RNA 分子（exonic circRNA, ecircRNA）、内含子来源的环状 RNA 分子（intronic circRNA, ciRNA）、由外显子和内含子共同组成的环状 RNA 分子（exon-intron circRNA, EIciRNA）、反义链来源的环状 RNA 分子，以及基因间区来源的环状 RNA 分子。目前报道的 circRNA 大部分是来自外显子的 ecircRNA，

主要定位在细胞质中，在转录后起调控作用；而含有内含子的 ciRNA 和 EICI RNA 则定位在细胞核中，调节其亲本线性 mRNA 的转录。

四、 circRNA 的主要功能

目前的研究表明， circRNA 具有 miRNA 的海绵吸附、调控亲本基因表达、翻译蛋白质、产生假基因、影响选择性剪接等功能。由于 circRNA 在疾病发生的起始和发展阶段发挥重要作用，因此可以作为潜在的靶向治疗生物标志（biomarker）。



1) circRNA 发挥竞争性内源 RNA (ceRNA) 的作用，象海绵一样吸附 microRNA。2013 年，两个研究团队在 Nature 上发文报道，CDR1 基因起源的环状 RNA (ciRS-7) 可以结合吸附 miR-7，从而降低 miR-7 的活性，接上调 miR-7 相关靶基因的表达。由于环状 RNA 的稳定性，在机体内潜在对 microRNA 的吸附能力要强于线性 mRNA

和 lncRNA。

2) circRNA 顺式调控亲本基因的表达。含内含子序列的环状 RNA (ciRNA、EIciRNA) 一般常驻细胞核内, 与 RNA 结合蛋白相互结合, 调节亲本基因 mRNA 的表达。另一方面, 环状 RNA 形成过程中内含子间竞争性互补配对可以与线性 RNA 之间达成一种平衡, 影响 mRNA 的表达, 甚至蛋白质翻译。

3) circRNA 作为模板, 通过滚环扩增 (rolling circle amplification) 机制翻译蛋白质。绝大多数的 circRNA 属于非编码 RNA, 但有些 circRNA 可以编码并表达蛋白质或多肽。Irene Bozzoni 等发现 circRNA (Circ-ZNF609) 可直接翻译蛋白质, 该蛋白质参与了肌肉发生过程; Sebastian Kadener 等在果蝇大脑中也发现了大量的环状 RNA 翻译蛋白质或多肽。

4) circRNA 产生假基因。Li Yang 等发现, 一些假基因可由 circRNA 反转录转座而来, 并在哺乳动物基因组中遗传, 有可能通过提供增加的转录因子 CTCF 结合位点重塑了基因组结构。

5) circRNA 影响选择性剪切。circRNA 的合成可以和 pre-mRNA 剪接竞争, 导致线性 mRNA 表达降低, 还可通过排除特定的外显子改变加工的 mRNA 的组成。

五、circRNA 在线数据库和分析软件

1. deepBase v2.0

包含了大约 15 万的 circRNA 基因 (人、鼠、果蝇、线虫等), 构建了最全面的 circRNA 的表达图谱。网址为

<http://deepbase.sysu.edu.cn/>。

2. circBase

收集和整合已经发布的 circRNA 数据构建的数据库。网址为 <http://www.circbase.org/>。

3. CircNet

提供了新 circRNA 的鉴定；整合 circRNA-miRNA-mRNA 的互作网络；circRNA 亚型的表达水平；circRNA 亚型的基因组注释；circRNA 亚型的序列。网址为 <http://circnet.mbc.nctu.edu.tw/>。

4. CircPro

提供一个 pipeline, 整合 Ribo-seq 和 RNA-seq 数据来预测 circRNA 及其编码潜能。网址为 <http://bis.zju.edu.cn/CircPro/>。

5. miARma-Seq

一个综合分析软件, 可以发现任何测序物种的 mRNA、miRNA 和 circRNA, 并可以区分表达量, 预测 miRNA 的 mRNA 靶基因或功能分析, 可在 3 种不同的操作系统中运行。网址为 <https://sourceforge.net/projects/miarma/>。

第六节 其他小分子 RNA

小分子 RNA (small RNA) 是 20~40 个核苷酸的非编码 RNA 分子, 出现在大多数真核生物中, 在转录或转录后调节基因的表达, 主要包括 miRNA 和 siRNA 等, 本节主要讲述除 miRNA 之外的其他小分子 RNA。

一、小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)

（一）siRNA 的生物合成

siRNA 也叫干扰 RNA，是一种小 RNA 分子(21~25 个核苷酸)，由 Dicer (RNAase III 家族中对双链 RNA 具有特异性的酶)加工双链 RNA(dsRNA)而成。siRNA 是 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)的主要成员，激发与之互补的目标 mRNA 的沉默(Okamura and Lai, 2008)。RNA 干扰机制中的关键分子 dsRNA 的常见来源有以下几类：细胞内源性基因的双向表达；具有反向重复结构的细胞内源性基因表达形成的发夹状 RNA (shRNA)；转基因表达的 mRNA 异常聚合；转座子转录；RNA 病毒基因组或病毒感染复制过程中的中间 RNA 产物；实验方法通过质粒载体或病毒载体转染表达的 dsRNA 或 shRNA 等。

（二）siRNA 的主要功能

小干扰 RNA 为双股 RNA，在生物学上有许多不同的用途。目前已知 siRNA 主要参与 RNA 干扰 (RNAi) 现象，以带有专一性的方式调节基因的表达。此外，也参与一些与 RNAi 相关的反应途径，如抗病毒机制或是染色质结构的改变。其生理意义在于生物的抗御机制，调控细胞分化与胚胎发育，维持基因组的稳定，以及 RNA 水平上的调控机制。

（三）siRNA 的应用

RNAi 除可以用作基因沉默外，还可以用于基因功能分析。

二、 ta-siRNA

反式作用干扰小 RNA (ta-siRNA) 是由 miRNA 介导生成长度为

21 个核苷酸的小 RNA，为植物特有的内生性 sRNA。ta-siRNA 的产生需要由 miRNA 的剪切引发，之后通过 siRNA 途径形成。ta-siRNA 来自于 TAS 基因的转录本，通过特异的 miRNA 引导的相位切割产生 21nt 的 ta-siRNA。miRNA 引导的切割在 ta-siRNA 的生成过程中是不可或缺的。在 ta-siRNA 产生过程中，TAS 家族基因会与特异的 miRNA 相匹配。

植物中绝大多数的靶基因被 miRNA 切割后都会降解，只有少数 miRNA 才可以激发 ta-siRNA 的合成。目前的研究提出了 3 种激发模型。第一种是以 miRNA390-TAS3 为代表的“Two-hit”模型。该模型要求很苛刻，一般植物 miRNA 都是与 AGO1 结合切割靶基因，但该模型要求激发 miRNA 与 AGO7 结合，且在靶基因上有两个结合位点，并且只有下游结合位点发生切割。第二种以 miRNA173-TAS1/TAS2 为代表的“One-hit”模型，该模型对激发 miRNA 的长度有要求，必须是 22nt。目前发现的绝大多数激发 ta-siRNA 合成的 miRNA 或 siRNA 都符合这种模型。第三种模型认为除了 22nt 的 miRNA 可以激发以外，不对称的 miRNA/miRNA*二聚体也可以激发 ta-siRNA 的合成。

当 TAS 基因的初级转录本被 miRNA 切割后，并没有降解，在 SGS3 和 RDR6 的作用下复制形成 dsRNA，之后 DCL4 在 miRNA 剪切位点处开始以 21nt 为单位进行连续相位切割 dsRNA，形成一系列在 3'端具有 2 个悬挂碱基的双链 siRNA。随后，双链 ta-siRNA 中的一条链与 AGO 蛋白形成复合物，介导其他基因的切割降解。

ta-siRNA 介导的基因表达调控参与了植物生长期的转换、逆境适

应、花叶等侧生器官背腹性发育等重要生物过程，是 miRNA 调控机制的重要组成部分。目前研究发现，一些蛋白质编码基因也可以生成 ta-siRNA，并且有的 ta-siRNA 也可以激发靶基因形成下一级的 ta-siRNA。

三、 piRNA

与 Piwi 蛋白相作用的 RNA 称为 piRNA。piRNA 在基因组中显示出与众不同的定位类型，主要成群地分为长 20~90kb 的基因簇，其中的长片段的小分子 RNA 只能来源于单链。相似的 piRNA 在人类和小鼠中均有发现，大部分基因簇出现在同一染色体位置上。虽然 piRNA 的功能仍然需要研究阐明，但是生殖细胞中的 piRNA 富集现象和 Piwi 突变导致的男性不育表明 piRNA 在配子形成的过程中起作用。

(一) piRNA 的生物合成

piRNA 的生成有两个主要途径：初级合成路径和次级 piRNA 扩增乒乓循环路径。初级 piRNA 倾向于在核酸 5'端含有一个尿苷，而次级 piRNA 在 5'端有 10nt 序列和初级 piRNA 互补，并且在第 10 个核苷酸位置倾向于包含有意义的腺苷。

(二) piRNA 的主要功能

piRNA 主要存在于哺乳动物的生殖细胞和干细胞中，通过与 Piwi 亚家族蛋白结合形成 piRNA 复合物 (piRC) 来调控基因沉默途径。对 Piwi 亚家族蛋白的遗传分析以及 piRNA 积累的时间特性研究发现，piRC 在配子发生过程中起着十分重要的作用，还能维持生殖系和干

细胞功能，调节翻译和 mRNA 的稳定性。

四、其他常见小分子 RNA

(一) tmRNA

tmRNA (transfer-messenger RNA, tmRNA) 是一类具有类似 tRNA 和 mRNA 分子双重功能的小分子 RNA，它在一种特殊的翻译模式-反式翻译模式过程中发挥重要作用。它是一类普遍存在于各种细菌及细胞器（如线粒体、叶绿体等）中长 260~430 个核苷酸的稳定小分子 RNA。tmRNA 主要包括 12 个螺旋结构和 4 个“假结”结构，同时还包括 1 个可译框架序列的单链 RNA 结构。tmRNA 中 H1 由 5'端和 3'端两个末端形成，与 tRNA 的氨基酸受体臂相似。

(二) snoRNA

核仁小分子 RNA (snoRNA) 是一类小分子非编码 RNA，且多富集于核仁，代谢稳定。典型的 snoRNA 具有如下主要特征：分子大小为 60~400nt；具有类似核仁提取物的性质（抗盐性）；需要与特定蛋白质结合形成核糖核蛋白体 (ribonucleoprotein particles, snoRNP)，并以此形式存在和行使功能；snoRNA 分子具有多种与蛋白质相互作用的保守序列元件。

(三) snRNA

小核 RNA (snRNA) 是真核生物转录后加工过程中 RNA 剪接体 (spliceosome) 的主要成分，参与 mRNA 前体的加工过程。另外，还有端体酶 RNA (telomerase RNA)，它与染色体末端的复制有关；以及反义 RNA (antisense RNA)，它参与基因表达的调控及 RNA 剪接

和 RNA 修饰等。

第八章 蛋白质组学

第一节 蛋白质组学概述

“蛋白质组学”(Proteomics)和“蛋白质组”(Proteome)是澳大利亚科学家 Marc Wilkins 及其同事在 20 世纪 90 年代初提出的,与“基因组学”(Genomics)和“基因组”(Genome)相对应,意为“一个基因组、一种生物或一种细胞、组织所表达的全套蛋白质”。

(一) 蛋白质组学的产生

蛋白质是生理功能的执行者,是生命现象的直接体现者,对蛋白质结构和功能的研究将直接阐明生命在生理或病理条件下的变化机制。蛋白质本身的存在形式和活动规律,如翻译后修饰、蛋白质间相互作用及蛋白质构象等问题,仍依赖对蛋白质的研究来解决。蛋白质组学的研究可望提供精确、详细的有关细胞或组织状况的分子描述。因为诸如蛋白质合成、降解、加工、修饰的调控过程只有通过蛋白质的直接分析才能揭示。

因此,蛋白质组学应运而生,它以细胞内全部蛋白质的存在及其活动方式为研究对象。可以说蛋白质组学研究的开展不仅是生命科学研究进入后基因组时代的里程碑,也是后基因组时代生命科学研究的核心内容之一。

(二) 蛋白质组学研究的新进展

从近年来已发表的蛋白质组学研究相关论文分析,蛋白质组学技术已经广泛应用于蛋白质鉴定、蛋白质翻译后修饰和蛋白质-蛋白质互作等领域,近年来主要在以下 5 个方面取得显著进展。

1. 蛋白质的分离与鉴定

由于在蛋白质组学和比较蛋白质组学研究中采用了“蛮力 (brute force)”的鉴定技术, 极大促进了差异表达蛋白质的研究。其中双向凝胶电泳技术 (two-dimension electrophoresis, 2-DE) 广泛地应用于可溶性蛋白质和细胞膜外表面蛋白质的分离和鉴定上。一般在第一相中采用固相化 pH 梯度胶条 (IPG), 第二相采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 获得分辨率达到数千点的蛋白质图谱, 然后运用生物质谱技术进行蛋白质的鉴定。但对溶解性较差的细胞膜蛋白, 可采用色谱技术和分步提取技术进行分离。一维电泳和二维电泳结合 Western blotting 技术, 或是利用蛋白质芯片和抗体芯片及免疫共沉淀技术也能鉴定蛋白质。

2. 蛋白质互作或蛋白质复合体研究

不断有新的技术应用于蛋白质-蛋白质互作或者蛋白质复合体的分析研究上。例如, 在第一相中采用蓝色非变性聚丙烯酰胺凝胶 (blue native PAGE) 技术分离蛋白质复合体, 第二相利用 SDS-PAGE 技术进一步分离复合体中的蛋白质, 可进行大规模的蛋白质互作分析。对低丰度的蛋白质复合体, 有效的策略是先应用转基因技术对生物体进行表位标记 (epitope tagging), 然后进行亲和沉淀纯化。

3. 蛋白质翻译后修饰分析

翻译后修饰是蛋白质功能调节的重要方式, mRNA 表达产生的蛋白质要经历翻译后修饰, 如磷酸化、糖基化等修饰。对蛋白质翻译后修饰的研究对阐明蛋白质的功能具有重要作用。当前, 蛋白质翻译后

修饰的鉴定技术主要有标记技术、质谱技术、特定抗体技术、特定染色剂技术等。

4. 蛋白质功能鉴定研究

蛋白质功能鉴定研究如分析蛋白酶的活性及确定酶所催化的底物，蛋白质-蛋白质互作及配基-受体的结合分析等。可以利用基因敲除或基因反义技术分析基因产物——蛋白质的功能。另外对蛋白质的亚细胞定位研究也在一定程度上有助于对蛋白质功能的了解，如 Clontech 的荧光蛋白表达系统就是分析蛋白质在亚细胞定位的一个较常用技术。

5. 蛋白质复合体整体结构分析

应用限制性蛋白质酶水解技术，结合交叉连接（cross-linking）或同位素交换技术（isotope exchange）进行蛋白质复合体的结构分析。

第二节 蛋白质的大规模分离鉴定技术

理想的蛋白质分离方法首先要具备超高分辨率，能够将成千上万个蛋白质包括它们的修饰物同时分离，并与后续的鉴定技术有效衔接。这种理想的分离方法还应当对不同类型的蛋白质，包括酸性、碱性、疏水、亲水、相对分子质量小、相对分子质量大的蛋白质均能有效分离。

二维凝胶电泳是利用蛋白质的等电点和分子质量对蛋白质进行分离，是一种十分有效的手段，它在蛋白质组分离技术中起到了关键作用。

一、蛋白质二维电泳质谱技术

（一）蛋白质二维电泳技术

二维电泳和质谱技术联用已成为近年最流行、最可靠的蛋白质分离与鉴定技术平台。

（二）质谱技术

生物质谱技术在离子化方法上主要有两种软电离技术，即基质辅助激光解吸电离（matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI）和电喷雾电离（electro-spray ionization, ESI）。MALDI 是在激光脉冲的激发下，使样品从基质晶体中挥发并离子化；ESI 使分析物从溶液相中电离，适合与液相分离手段（如液相色谱和毛细管电泳）联用。MALDI 适于分析简单的肽混合物，而液相色谱与 ESI-MS 的联用（LC-MS）适合复杂样品的分析。

软电离技术的出现拓展了质谱的应用空间，而质量分析器的改善也推动了质谱仪技术的发展。生物质谱的质量分析器主要有 4 种：离子阱（ion-trap, IT）、飞行时间（time of flight, TOF）、四极杆（quadrupole）和傅里叶变换离子回旋共振（Fourier transform ion cyclotron resonance, FTICR）。它们的结构和性能各不相同，每一种都有自己的长处与不足。它们可以单独使用，也可以互相组合形成功能更强大的仪器。MALDI 通常与 TOF 质量分析器联用，分析肽段的精确质量，而 ESI 常与离子阱或三级四极杆质谱联用，通过碰撞诱导解离（collision-induced dissociation, CID）获取肽段的碎片信息。

离子阱质谱灵敏度较高，性能稳定，具备多级质谱能力，因此被广泛应用于蛋白质组学研究，不足之处是质量精度较低。与离子阱相

似，傅里叶变换离子回旋共振（FTICR）质谱也是一种可以“捕获”离子的仪器，但是其腔体内部为高真空和高磁场环境，具有高灵敏度、宽动态范围、高分辨率和质量精度（质量准确度可很容易地小于 1mg/L），这使得它可以在一次分析中对数百个完整蛋白质分子进行质量测定和定量。FTICR-MS 的一个重要功能是多元串联质谱，与通常的只能选一个母离子的串级质谱方式不同，FTICR-MS 可以同时选择几个母离子进行解离，这无疑可以大大增加蛋白质鉴定工作的通量；但是它的缺点也很明显，如操作复杂、肽段断裂效率低、价格昂贵等，这些缺点限制了它在蛋白质组学中的广泛应用。

二、一维（二维）色谱-质谱技术

（一）一维电泳（色谱）-质谱技术（HPLC-MS）

1. 一维 SDS-PAGE 电泳（色谱）-质谱技术

一维 SDS-PAGE 电泳结合 MALDI-TOF-MS 技术，或者蛋白质复合物经酶切后用 LC-MS-MS 技术进行分析均被前人的研究证明是有效的蛋白质分离与鉴定策略。前者的技术流程是先从生物样本中获得蛋白质混合物，然后采用免疫沉淀或免疫亲和的提取方法，获得某种蛋白质的复合体；再应用 SDS-PAGE 技术对蛋白质复合物进行分离、染色、胶上原位酶切后，用 MALDI-TOF-MS 分析肽质量指纹谱并鉴定蛋白质；后者是对蛋白质复合物直接进行蛋白酶切，对获得的肽混合物进行 LC-MS-MS 分析，通过测定肽片段的序列鉴定蛋白质。

2. 一维 IEF 电泳-质谱技术

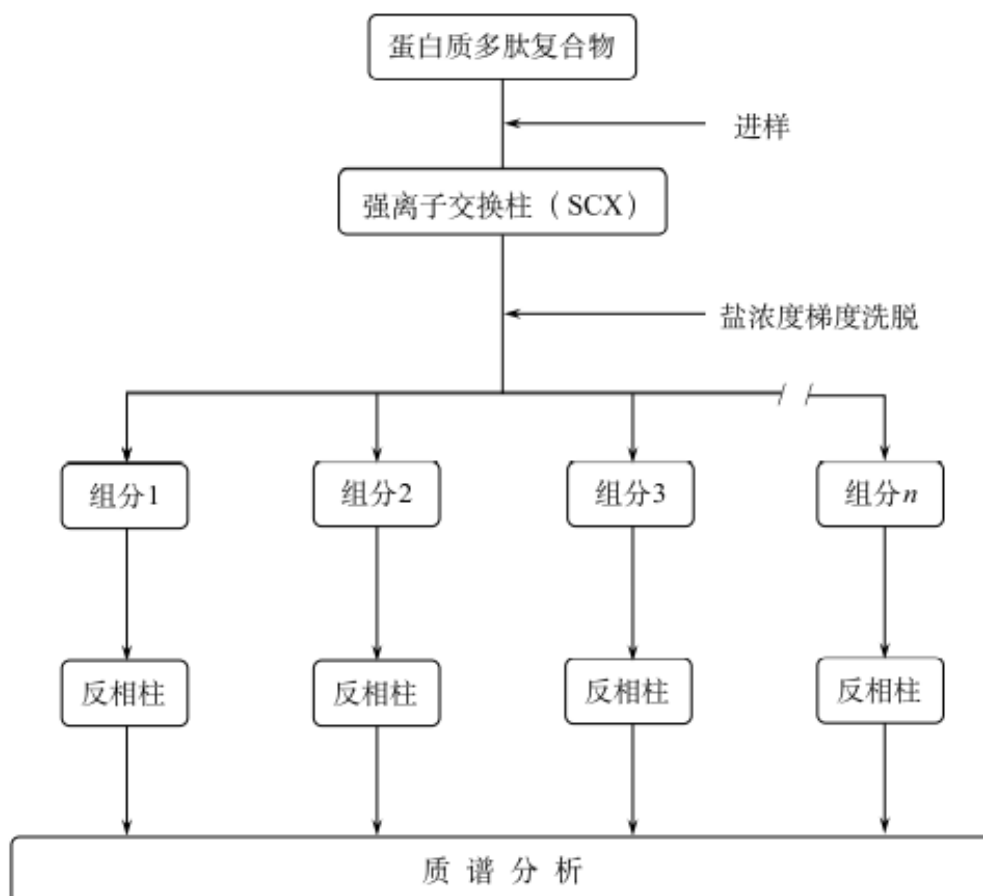
目前，采用的以 2DE-MS 为基础的蛋白质分析策略，第一维等电

聚焦电泳是根据等电点的不同而分离蛋白质，第二维 SDS-PAGE 电泳是依据相对分子质量的不同再次分离蛋白质。在 SDS-PAGE 电泳中，可以通过标准分子质量标记物，获得被分离蛋白质的相对分子质量信息。但与质谱技术测定肽段分子质量的方法相比，SDS-PAGE 上检测蛋白质相对分子质量的误差大、分辨率差。更重要的是，很难获得翻译后修饰蛋白质相对分子质量变化的准确信息。如何精确测定全细胞蛋白质的相对分子质量，一直是蛋白质组技术方法研究中的难题。最近，研究人员报道了一种采用 IPG 胶条进行等电聚焦电泳，然后采用 MALDI-TOF-MS 对胶条进行表面直接分析的方法。

（二）二维色谱-质谱技术（2D-HPLC/MS）

采用液相色谱的方法分离蛋白质和多肽有诸多优点：①速度快，一般几个小时可完成全部分离过程，而 2-DE 的蛋白质分离一般需 1~2d；②由于在溶液状态下，样品处理方便、快速，避免了 2-DE 从胶上回收样品的繁复操作，分析过程易于自动化和与质谱联接；③对各种蛋白质均适用，包括疏水性、酸性、碱性、分子质量大于 100kDa、小于 10kDa 的蛋白质等。

从组织、细胞或其他生物样本获得的蛋白质混合物，用蛋白酶（通常是胰蛋白酶）裂解，得到的多肽混合物样品进行二维色谱分离。质谱分析一般采用电喷雾串联质谱，通过测定肽段序列的分子质量对蛋白质进行鉴定。二维色谱-串联质谱（2D-HPLC/MS）分析策略的流程如下图。



二维色谱分离蛋白质有多种组合模式，第一维色谱一般是离子交换色谱，也可用凝胶过滤色谱，第二维通常是反相色谱。由于反相色谱采用有机溶剂作流动相，避免了盐等添加剂对后续质谱分析的影响。为了提高二维色谱的分离速度和分辨能力，第二维的反相色谱分离系统一般采用较短的色谱柱和较高的流速。整个分离系统采用一根离子交换柱与两根反相色谱柱，通过多通道阀进行柱切换的模式操作。当蛋白质或多肽组分从离子交换色谱柱上洗脱并进入第一根反相色谱柱时，第二根反相色谱柱上的组分正被洗脱进入检测系统。两根反相色谱柱的轮流切换，使得被分离物可以富集在柱的顶端。适当调整柱切换速度与流速，可以达到每分钟一个循环，获得一个色谱图。为了

减小死体积，采用细内径（0.127mm）的管路并尽可能减少管路的长度。

荧光差异凝胶电泳技术（difference gel electrophoresis, DIGE）是对 2-DE 在技术上的改进，结合了多重荧光分析的方法，在同一块胶上共同分离多个分别由不同荧光标记的样品，并第一次引入了内标的概念。两种样品中的蛋白质采用不同的荧光标记后混合，进行 2-DE，用来检测蛋白质在两种样品中表达情况，极大地提高了结果的准确性、可靠性和可重复性。在 DIGE 技术中，每个蛋白质点都有它自己的内标，并且软件可全自动根据每个蛋白质点的内标对其表达量进行校准，保证所检测到的蛋白质丰度变化是真实的。DIGE 技术已经在各种样品中得到应用，主要用于功能蛋白质组学。

三、同位素亲和标签技术

同位素亲和标签（isotope coded affinity tag, ICAT）技术是近年发展起来的一种用于蛋白质分离与鉴定的新方法。ICAT 方法的关键是 ICAT 试剂的应用。该试剂由 3 部分组成。中间部分被称为连接部分，分别连接 8 个氢原子或重氢原子，前者称为轻链试剂，后者称为重链试剂。中间部分一头连接一个巯基的特异反应基团，可与蛋白质中半胱氨酸上的巯基连接，从而实现了对蛋白质的标记，另一头连接生物素，用于标记蛋白质或多肽链的亲和纯化。当采用 ICAT 技术进行蛋白质的定量分离与鉴定时，首先要对蛋白质进行标记，然后进行蛋白质酶切，对蛋白质酶切后的多肽混合物进行亲和色谱分离，混合物中仅仅被同位素标记的肽段能够被色谱柱保留，并进入质谱进行分析，

其他大量肽段都不被色谱柱保留。通过比较标记了重链和轻链试剂肽段在质谱图中信号的强度，可以实现对差异表达蛋白质的定量分析，采用串联质谱技术测定肽段的序列，可以检测到肽段的分子质量并鉴定出蛋白质。ICAT 的优点在于其可以对混合样品（来自正常和病变细胞或组织等）直接测试；能够快速定性和定量鉴定低丰度蛋白质，尤其是膜蛋白等疏水性蛋白质等；还可以快速找出重要功能蛋白质（疾病相关蛋白质及生物标志分子）。

四、表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱技术

表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱技术（surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight-mass spectra, SELDI-TOF-MS）简称飞行质谱技术。飞行质谱技术的基本原理是，将样品经过简单的预处理后直接滴加到表面经过特殊修饰的芯片上，利用激光脉冲辐射使芯池中的分析物解吸形成荷电离子，根据不同质荷比，这些离子在仪器场中飞行的时间长短不一，由此绘制出一张质谱图来。该图经计算机软件处理还可形成模拟谱图，同时直接显示样品中各种蛋白质的分子质量、含量等信息。比较两个样品之间的差异蛋白质，也可获得样品的蛋白质总览。SELDI 技术分析的样品不需用液相色谱或气相色谱预先纯化，因此可用于分析复杂的生物样品。而且，SELDI 技术可以分析疏水性蛋白质、等电点过高或过低的蛋白质及低分子质量的蛋白质（<25kDa），还可以发现在未经处理的样品中许多被掩盖的低丰度蛋白质，增加发现生物标志物的机会。SELDI 技术只需少量样品，在较短时间内就可以得到结果，且试验重复性好，适合临床诊断及大

规模筛选与疾病相关生物标志物，特别是它可直接检测不经处理的尿液、血液、脑脊液、关节腔滑液、支气管洗出液、细胞裂解液和各种分泌物等，从而可检测获得样品中目标蛋白质的分子质量、等电点、糖基化位点与磷酸化位点等信息。

五、蛋白质芯片技术

蛋白质芯片技术（protein microarrays）是一种高通量的蛋白质功能分析技术。与 DNA 芯片（DNA 微阵列）的原理相类似，蛋白质芯片在固体支持物上采用了高密度的网格来固定整个蛋白质组，从而得以对特定样品中的表达蛋白进行大规模的分析。蛋白质芯片的类型包括抗原芯片、抗体芯片，以及各种各样以蛋白质、底物或核苷酸为捕获基团的芯片。它们可以用来进行蛋白质表达谱分析，研究蛋白质与蛋白质的相互作用，甚至 DNA/RNA-蛋白质及配体-蛋白质之间的相互作用。

六、通过数据库搜索鉴定蛋白质

利用数据库匹配的方式进行肽段鉴定时都遵循一个基本假设，即被研究物种的所有蛋白质序列都是已知并存储于数据库中的。因此，这种方法只在一些进行了完全测序且基因组注释比较完善的模式生物中应用得比较好，而在非模式生物中的应用则非常有限。

ExPASy（expert protein analysis system, <http://www.expasy.org>）是由瑞士生物信息研究中心维护的一个整合全面的蛋白质组学信息的网络服务器，提供了众多的蛋白质序列、序列特征、结构、功能注释等方面信息与分析工具，在其蛋白质组学工具中就包含了 Mascot、

ProFound 等多种与质谱数据相关的肽段质量指纹数据分析工具。

第三节 蛋白质的翻译后修饰

蛋白质在翻译合成后，需要经过一些功能基团的共价修饰才能获得相应的活性、结构与功能，这个生物学过程称为蛋白质翻译后修饰（posttranslational modification, PTM）。目前已知的蛋白质翻译后修饰类型超过 200 种，常见的类型包括磷酸化、糖基化、泛素化、乙酰化和硫酸盐化等。蛋白质的翻译后修饰通过改变分子大小、疏水性及蛋白质的整体构象等对蛋白质生物学功能的正常行使产生影响。它可以直接影响到蛋白质之间的相互作用，以及蛋白质在不同的亚细胞区域的分布。

一、基于序列的蛋白质翻译后修饰预测

利用计算机辅助从蛋白质序列中预测可能的翻译后修饰情况对于蛋白质组数据的生物学注释是非常必要的。

发生翻译后修饰的底物蛋白质具有被特定修饰酶所识别的序列基序，这些序列基序通常只包含 5 个残基，倾向存在于没有固定三维结构的非球形区域（nonglobular regions）内，并且，区域内包含的都是一些有极性的、小的或者骨架柔韧性较大的残基，这样，蛋白质翻译后修饰位点才易于与修饰酶互相接近。但是，如果预测只考虑修饰识别序列基序的话，由于其长度过于短小，就容易在序列模式匹配中产生过多的假阳性。

为了减少假阳性的出现，在预测中除了修饰位点的序列基序特征外，我们还要考虑修饰位点周边环境序列的特点，并尽可能地利用一

些统计学方法来增加预测的准确性。

二、在蛋白质组学分析中鉴定翻译后修饰

翻译后修饰也可以通过实验得到的质谱指纹数据进行鉴定。在 ExPASy 蛋白质组学服务器工具页面上列出了很多根据质谱分子质量数据来确定翻译后修饰的程序，可以用来搜索序列中已知的翻译后修饰位点，并且在数据库片段匹配时根据修饰的类型将额外的质量进行整合。

第四节 蛋白质分选

除线粒体和植物叶绿体中能合成少量蛋白质外，绝大多数的蛋白质均在细胞质基质中的核糖体上开始合成，然后运至细胞的特定部位，这一过程称蛋白质分选（protein sorting），也被称为蛋白质定向转运（protein targeting）。

对于大多数真核生物蛋白质来说，新合成的蛋白质前体必须转运到特定的膜结合区域并经过蛋白质水解过程才能形成成熟的功能蛋白，这些特定的区域包括叶绿体、线粒体、细胞核、过氧化物酶体等。为了实现蛋白质的转运，新生的蛋白质序列中必须具备特定的肽信号，它们能够指导蛋白质向特定的区域转运。一旦蛋白质在细胞器之内转运完成，蛋白酶就会将信号序列去除，以产生成熟的蛋白质（另一个例子是发生翻译后的修饰）。即使在原核生物中，蛋白质也可以被定向转运到内膜或外膜、细胞内的周质间隙或细胞外，其蛋白质的分选机制与真核生物类似，也是依赖于信号肽的出现。

蛋白质分选信号序列的特征一致性很弱，它们一般都是在在一个或

多个具有正电荷的残基后面紧跟有一个疏水核区域，但是在序列长度和残基构成上的变化很大。

蛋白质亚细胞定位的计算预测方法可以粗略地分为两类。第一类方法主要利用蛋白质的氨基酸序列中的信号特征（**signal**），同时还需要诸如表达谱数据、系统发育图谱、数据库记录描述内容中的上下文及 **GO** 注释词条等额外信息。还有一些方法只利用序列进行对库的同源性搜索或者查找与之共同出现（**co-occurrence**）的蛋白质结构域。

SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 是一个基于网络的亚细胞定位信号预测程序。它也是最早使用神经网络进行蛋白质分选信号预测的程序之一。从第二版 **SignalP** 开始，预测中又加入了另一种机器学习方法——隐马尔可夫模型来增加预测的准确性。其中，神经网络算法包含了两种不同的分数，一种是为识别出的信号肽打分，另一种是为蛋白酶的断裂位点进行打分；而隐马尔可夫模型则用来区分信号肽及将蛋白质插入膜中的 N 端跨膜锚定片段。

TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 是进行真核生物蛋白质亚细胞定位预测的程序。它使用了神经网络方法，主要对蛋白质序列的 N 端是否存在下列几种前导肽进行预测：叶绿体转运肽（**chloroplast transit peptide**）、线粒体靶肽（**mitochondrial targeting peptide**）及分泌途径信号肽（**secretory pathway signal peptide**）。

PSORT (<http://www.psort.org/>) 是一个 1992 年就开发出来的亚细胞定位预测程序，它最先采用了决策树（**decision tree**）的方法进行预测，即计算一组来源于定位信号序列的参数并将之与从文献中总结的

一系列定位规则进行比较。这些规则大部分关注的是现有的各种能够将蛋白质定位于特定细胞区域的序列基序，还有一部分规则主要记录了特定信号序列基序的氨基酸组成内容。

第五节 蛋白质相互作用

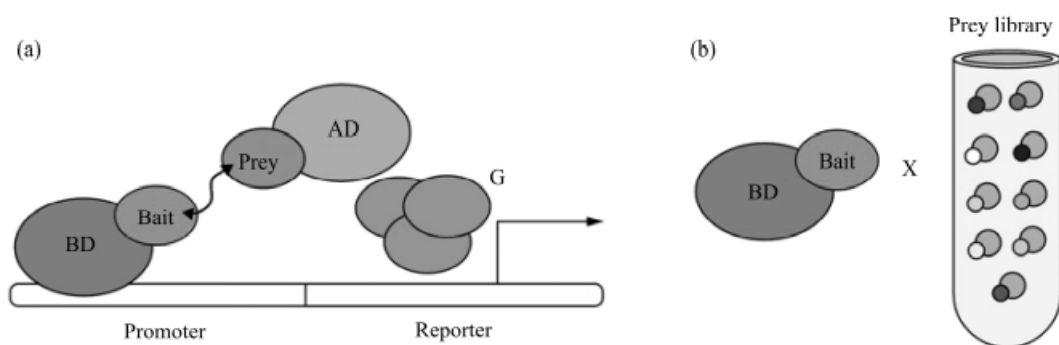
细胞中的大部分功能是由蛋白质来执行的，蛋白质间的相互作用是细胞实现功能的基础。细胞进行生命活动过程的实质就是蛋白质在一定时空下的相互作用，因此，描绘出蛋白质间的相互作用是蛋白质组学又一个重要的研究内容。蛋白质之间的相互作用不仅包括那些能够形成稳定复合物的强相互作用，也包括那些可能只在瞬时发生的弱相互作用，其中，参与形成复合物的蛋白质要比那些只出现瞬时相互作用的蛋白质表现出更为紧密的表达共调控性质。蛋白质-蛋白质相互作用的研究在探寻细胞信号转导途径、复杂蛋白质结构的建模及理解蛋白质在各种生物化学过程中的作用方面都是非常必要的。

一、 利用实验鉴定蛋白质互作

通过实验鉴定蛋白质的相互作用主要包括遗传学方法、生物化学方法和生物物理方法，其结果可以在原子、互作双组分、互作多组分（复杂互作）及细胞水平等 4 个方面得到表现。原子水平的实验，如 X 射线晶体衍射及核磁共振技术可以精确地显示互作原子或残基之间的结构关系；互作双组分实验，如酵母双杂交则只能检测出哪些蛋白质之间发生了互作，但无法描述其中细节；同样，互作多组分实验，如亲和层析-质谱能够检测出参与形成复合物的多个蛋白质组分，但也只能止步于组分鉴定阶段；而细胞水平实验，如荧光免疫则可以

蛋白质的细胞定位进行确定。

蛋白质互作研究中最经典的方法无疑是酵母双杂交（yeast two hybrid, Y2H）系统。它采用了一套必须要转录因子（transcription activator）才能激活的报告基因表达体系（如下图）。由于转录因子同时具有 DNA 结合结构域（DNA binding domain, BD）及转录激活结构域（trans-activation domain, AD），于是，人为地将转录因子的这两个结构域分隔开来，将可能发生相互作用的两个基因的 cDNA 分别与其中 BD 的 DNA 及 AD 的 DNA 进行融合以产生诱饵蛋白（bait protein）及其潜在的猎物蛋白（prey protein）。当诱饵蛋白和猎物蛋白能够发生互作结合时，转录因子的两个结构域也能够结合在一起行使其功能，从而导致报告基因的表达。当然，还可能利用这一套系统在一个 cDNA 文库中筛选与诱饵蛋白发生互作的蛋白质，即将 cDNA 文库中所有的 cDNA 作为可能与待研究蛋白质发生互作的猎物蛋白同 AD 进行融合，然后利用其能否与诱饵蛋白互作导致报告基因的表达进行筛选。这种方法通常用来发现和研究目前还不太了解的蛋白质的相互作用及功能。



在检测蛋白质之间的相互作用方面，酵母双杂交系统具有非常高

的灵敏度，即使是微弱的、瞬间的蛋白质相互作用也能够通过报告基因的表达敏感地检测到，但是这种方法也存在着一些局限性。首先，它不是一种直接检测蛋白质相互作用的方法，而某些蛋白质自身的转录激活功能使得 AD-猎物蛋白融合基因与 BD-诱饵蛋白融合基因表达产物无需特异地结合就能启动转录系统，从而产生假阳性结果（虚假的相互作用）。其次，酵母双杂交系统对相互作用的蛋白质在细胞内的定位要求非常严格，只有定位于细胞核内的相互作用蛋白才能确保报告基因的激活，而定位于细胞质内或细胞膜上的蛋白质则很难采用该技术进行分析。最后，酵母双杂交系统只能检测两个组分的互作情况，因而那些必须有多个蛋白质共同参与的相互作用利用这一方法也是检测不到的。

与酵母双杂交系统相比，遗传学方法属于小规模蛋白质互作实验，它通过观察两个互作候选基因(X-Y)的突变体表型来进行研究。

遗传学方法虽然可以推断蛋白质之间的互作，但却不能提供直接的证明。相反，一些通过蛋白质之间具有亲和力(特异性结合的倾向)特性的物理方法则能够为蛋白质互作提供直接的证据。通常情况下，这种亲和方法是将一种分子进行固定，利用它作为诱饵来诱捕那些与之互作的蛋白质，随后将这些蛋白质进行纯化及鉴定。

亲和层析是将诱饵分子固定于某一种载体介质，如琼脂糖柱子中。目的蛋白通过它表面上的生物功能位点，特异并可逆地结合在诱饵分子上。将蛋白质提取物加入柱子中，并利用低盐缓冲液进行洗脱，与诱饵有相互作用的蛋白质（因为结合在一起）被留在柱子中，其他的

则被缓冲液洗脱，而那些结合的蛋白质可以利用高盐的缓冲液随后被洗脱下来。通过改变缓冲液的盐浓度，就可能鉴别哪些蛋白质与诱饵的结合能力较弱而哪些结合能力很强。目前一种叫做 GST-pulldown 的亲层析方法比较流行，它的诱饵蛋白是谷胱甘肽 S 转移酶(GST)的融合表达蛋白。

免疫共沉淀反应是另一种亲和方法，它是利用抗体能够特异性地与蛋白质复合物中某一组分进行反应而使蛋白质复合物沉降下来。该方法在能够保存蛋白质与蛋白质相互作用的条件下制备细胞的溶解液。

前面提到过的微型化的蛋白质芯片 (protein chip or protein microarray) 是高通量地利用亲和技术进行蛋白质互作的研究。蛋白质芯片的制备与 DNA 微阵列使用了相似的方法，即利用机械手将少量的液态样品点在玻片等固体基质的载体上。而对互作蛋白的捕获可以在很大的范围内进行 (如利用表面化学反应可捕获所有相关的蛋白质)，也可以在很小的范围，甚至是特异结合的范围内进行 (如利用抗体)。

二、蛋白质互作的预测

蛋白质相互作用预测的生物信息学方法总结起来可以分成 4 类：
①基于基因组信息的方法；②基于进化关系的方法；③基于蛋白质序列的从头预测的方法；④基于蛋白质三维结构信息的方法。其中，基于基因组信息的预测方法中包括邻接基因 (gene neighborhood)、基因/结构域融合事件 (gene/domain fusion event)、系统发育谱 (phylogenetic

profile) 及镜像树 (mirror tree) 等方法; 基于进化信息的预测方法包括突变关联 (correlated mutation)、保守的蛋白质相互作用 (interologs) 及进化速率关联 (correlated evolutionary-rate) 等方法。

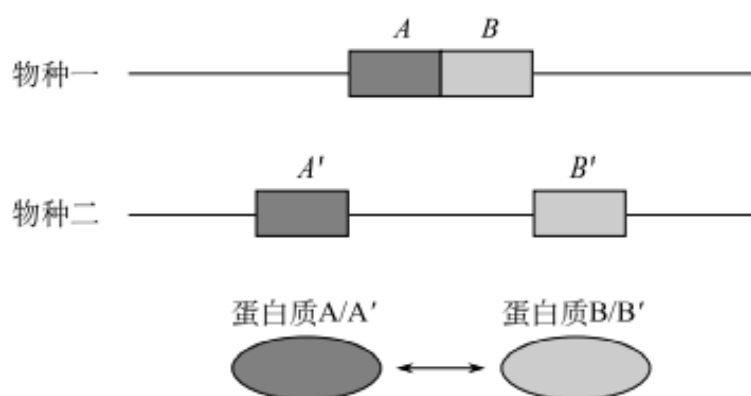
(一) 根据邻接基因进行互作蛋白的预测

一般说来, 基因次序在不同的原核生物基因组中的保守性很差。如果确实不同基因组中发现了具有同样邻接关系的基因, 则它们很可能属于同一个操纵子 (operon)。这是因为在原核生物基因组中, 功能相关的基因承受着相同的选择压力, 倾向于在基因组中连在一起, 构成一个操纵子。操纵子中编码的蛋白质通常是功能相关或具有物理互作关系的。这种基因之间的邻接关系在物种演化过程中具有一定的保守性, 可以作为基因产物之间功能关系的指示标识。这一预测规则支持了大多数原核生物基因组的互作蛋白的预测。但对于真核基因组来说, 利用基因次序进行互作蛋白的预测不如基因表达中的共调控蛋白有说服力。

(二) 根据基因/结构域融合事件进行互作蛋白的预测

基于基因融合事件的互作蛋白预测方法的理论基础是, 对于一个特定物种中包含了融合结构域 AB 的蛋白质家族来说, 经常会发现它与其他物种中相互分离的两个基因 A' 和 B' 相对应。这类蛋白质就被称为“复合”蛋白 (即融合蛋白), 而它们包含的每一个结构域都被称为“成分”蛋白。这一预测主要是在具有完整基因组序列的物种中进行基因融合事件的鉴定, 因为这样才能发现不同物种中相对应的“同源”蛋白。如果一个“复合”蛋白特定地与另一个物种中的两个“成分”蛋

白相似，即使这两个“成分”蛋白的编码基因并不一定相邻，但这两个“成分”蛋白很可能发生相互作用以执行与 AB 相同的功能(如下图)。反过来说，如果两个祖先基因 A 和 B 编码了相互作用的蛋白质，那么在进化的过程中为了加强这种互作的有效性，在其他基因组中这两个基因很有可能融合在一起。

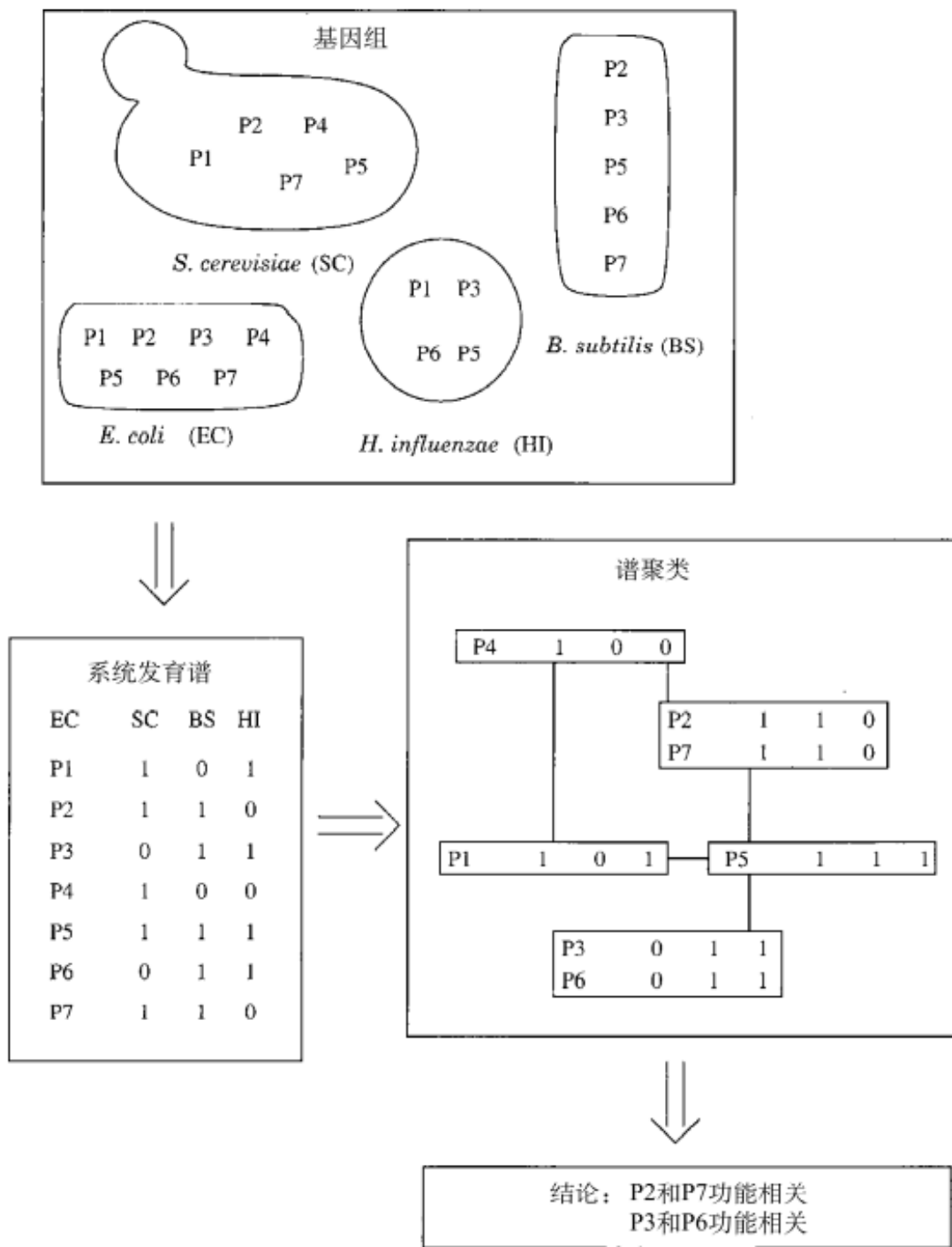


这一方法更进一步的解释是当两个成分蛋白作为结构域在一个蛋白质中融合时，它们必须位置非常地接近，以执行同样的功能。如果这两个结构域存在于两个不同的蛋白质中时，为了维持相同的功能，它们相互靠近及相互作用的特性也必须维持下来。因此，研究基因/蛋白质的融合事件，就可以对蛋白质-蛋白质的相互作用进行预测。这种利用基因融合事件来揭示其成分蛋白之间的功能相互关系的预测方法被称为“Rosetta stone”方法。这种预测原则被证实是相当可信的，它已经被成功地应用到从原核到真核生物中大量蛋白质互作的预测中。

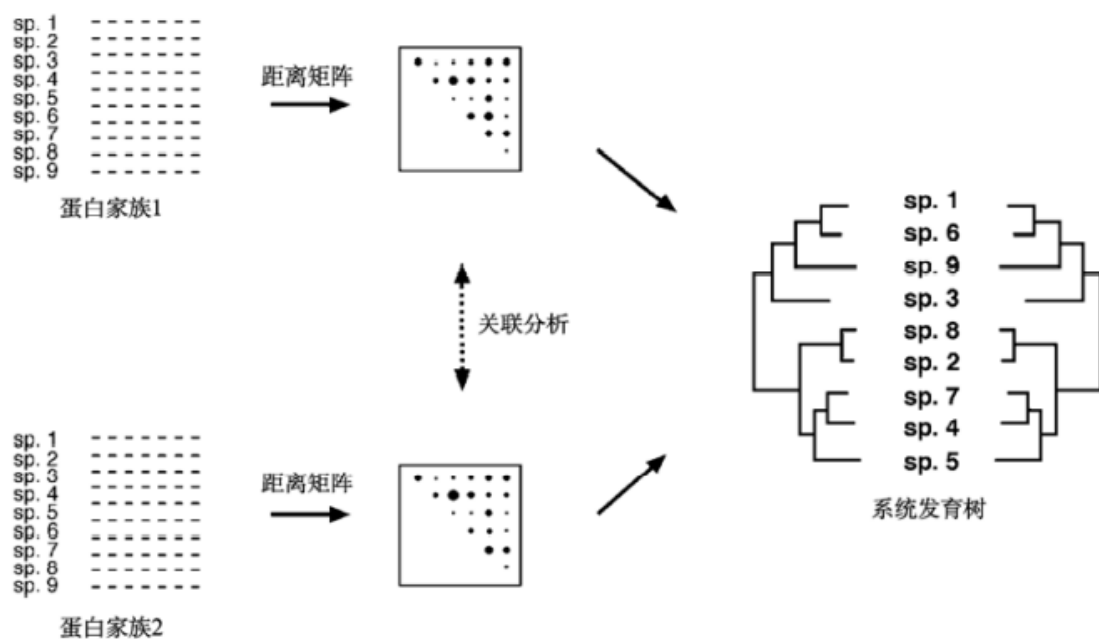
研究表明，基因融合事件在代谢蛋白（metabolic protein）中尤为普遍，利用此方法进行预测的局限性在于只能够预测在进化过程中发生融合的蛋白质之间的功能关联，不能判断发生融合的蛋白质是否真正发生了物理上的直接接触。

（三） 根据系统发育谱进行互作蛋白的预测

根据系统发育谱的预测方法就是查找不同基因组中直系同源物共同出现及共同缺失（**co-presence and co-absence**）的情况，即在完全测序的基因组中鉴定每一个蛋白质在每一个基因组中出现及丢失的情况，这样就得到一个系统发育谱。当比较不同蛋白质的系统发育谱时，那些具有相同或相似谱形的蛋白质很可能具有功能上的相关性（图 8-4）。但是，这种根据基因共缺失或共出现的互作蛋白预测方法同样不能确定功能相关的蛋白质之间是否存在物理上的直接接触，而且其预测准确性依赖于完成测序的基因组的数量及系统发育谱构建的可靠性。



镜像树 (mirror tree) 是一种基于系统发育分析的更加量化的互作蛋白预测方法。根据观察，互作蛋白的进化距离相似性水平要显著高于那些没有互作关系的蛋白质的进化距离，这表明互作蛋白受其功能约束，因而其进化过程应该保持一致。



(四) 根据序列的同源性进行互作蛋白的预测

已知的蛋白质互作图谱能够为新测序完成的基因组中蛋白质互作的预测提供必要的信息。如果某个基因组中的一对蛋白质是互作蛋白，那么它们在另一个基因组中的同源蛋白也可能发生类似的互作。这种同源蛋白对被称为互作物 (interologs)。这种预测方法依赖于确定正确的直系同源蛋白并且要利用现有的互作蛋白数据库。

(五) 利用多种方法进行互作蛋白的预测

为了产生比较可信的蛋白质互作预测结果，用户一般都需要利用多种不同的方法进行预测以减少偏差和错误。

STRING (search tool for the retrieval of interacting gene/proteins, 互作基因/蛋白搜索工具, <http://string-db.org/>) 是一种综合利用了邻接基因、基因融合及系统发育谱等证据来进行蛋白质互作预测的数据库及网络服务器。最新版本的 STRING 除了计算预测外，还整合了大量实验获得的共表达数据及从文献中挖掘到的蛋白质互作信息。经过分

析，STRING 可以给出包括直接及间接的蛋白质-蛋白质相互作用的所有证据。直接互作是指蛋白质之间发生物理互作的情况，而间接互作是指那些功能相关的在同一（代谢）途径中拥有相同底物的酶类或者指在同一遗传途径中相互具有调控关系的蛋白质。STRING8 包含了来源于 630 个基因组的 250 万个蛋白质的相关信息。

使用 STRING 进行计算预测分析时，查询序列首先会根据 COG（cluster of orthologous group）信息进行直系同源物的分组，然后序列会在数据库中搜索已知的保守基因连锁模式（查找邻接基因）、基因融合情况及系统发育谱。STRING 利用一个权重记分系统来评估各个基因组中上述 3 种类型蛋白质相关的显著性，以及从实验中获得的互作数据和文献挖掘的信息。为了降低假阳性并增加预测的可信度，3 种计算类型的相关蛋白质还会在一个内部参考数据集中做再次的检查。STRING 的最终结果是返回一个互作蛋白（功能相关蛋白）列表，针对每一个功能相关蛋白都会提供所得到的计算预测、实验获得及文献挖掘方面的证据，以及一个简单的蛋白质互作（功能相关性）分数。根据其中参与的多个功能相关伴侣情况，STRING 还能够以交互的形式提供图形化显示的蛋白质结合互作网络及特定的详细信息。

第九章 系统生物学

第一节 系统生物学基本概念

一、 历史的机遇

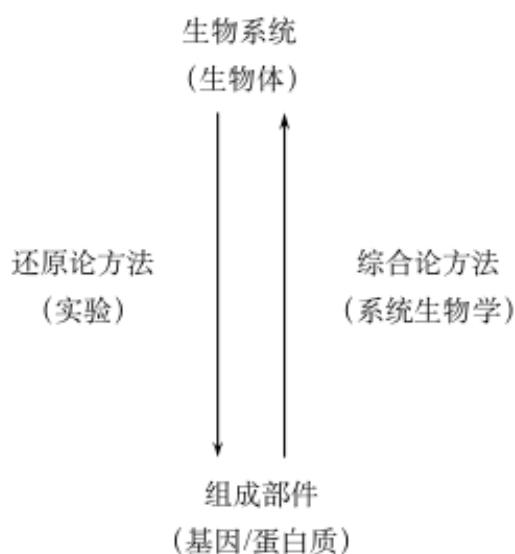
随着人类基因组计划及其他多种模式生物基因组计划的顺利进行，我们已得到越来越多的基因组序列，其他诸如蛋白质组学、转录组学、代谢组学、定位组学等计划也正如火如荼地进行。这些计划的开展并不标志我们对生物学系统的彻底理解，相反，它们催生了称为“系统生物学”的学科的形成。人们认识到，基因与蛋白质很少单独起作用，它们倾向于组成相互作用网络来行使生物学功能。特别是我们看到这样的局面：鉴定了基因组大部分基因之后，我们仍然无法仅仅凭序列信息来推断基因的功能。对功能的研究必须分析其相互作用的网络，或者更准确地说，把基因组或蛋白质组看做一个系统来进行分析。

系统生物学是生物信息学的最新前沿领域之一，目的是通过整合大量包括基因、蛋白质和代谢物组成成分之间的相互作用理解细胞中复杂的生物系统。系统生物学的出现，是生物信息学领域的一个重大变化。系统生物学不是像过去研究分子生物学那样一次研究一个基因或蛋白质，而是研究生物学系统所有元素的行为和关系，通过系统的整合、图形显示这些数据，最终实现动力学模拟，提供扰动和监视系统的高通量技术，建立新的计算方法，达到对细胞内复杂生物过程进行系统研究的目的。

二、 生物还原论与生物综合论

还原论成为 20 世纪后半叶生物学发展的主流。按照还原论的方法，为了研究生物系统某一方面的功能，只需寻找并鉴定出与此功能直接相关的基因或蛋白质即可。从某种意义上说，它是从整体机能到分子机制。

基因组计划揭开了综合论研究方法的序幕。综合论方法研究基因和各种生物大分子是怎样通过网络调控方式形成一个生物系统的。虽然还原论方法研究生物学问题取得巨大成功，但在后基因组时代我们需要综合全部生物信息重构生物体，综合论研究思路将成为生物学研究的主流。系统生物学往往是从一个简单分子模型开始，研究分子之间的非线性相互作用可以产生什么样的系统特点，通过将描述这些作用的方程参数化，最终实现对系统特点的真实估计。



三、什么是系统生物学

人类基因组计划促使我们接受这样的观点，即生物系统包含两类信息：编码执行生物功能分子机器的基因，识别基因表达、调控相互作用的网络。这些信息遵循如下层次： $\text{DNA} \rightarrow \text{mRNA} \rightarrow \text{蛋白质} \rightarrow \text{生物}$

分子相互作用→通路→网络→细胞→组织→生物体→种群→生态系统。生物信息具有多层次性、信息通过复杂网络执行、鲁棒性、网络中存在枢纽节点等性质。这里要注意的是，每个层次信息都对理解生命系统的运行提供有用的视角。因此，系统生物学的重要任务就是要尽可能地获得每个层次的信息并将它们进行整合。

根据美国系统生物学研究所创始人胡德（Leroy Hood）的定义，系统生物学是研究一个生物系统中所有组成成分（基因、mRNA、蛋白质等）的构成，以及在特定条件下这些组分间的相互关系的学科。也就是说，系统生物学不同于以往的实验生物学——仅关心个别的基因和蛋白质，它要研究所有的基因、所有的蛋白质、组分间的所有相互关系。显然，系统生物学是以整体性研究为特征的一种大科学。同一时期，北野宏明也提出了系统生物学的研究目标在于系统层次上理解生物分子行为到生物系统特征功能之间的关系，需要建立一系列的原则与方法。

对于多细胞生物而言，系统生物学要实现从基因到细胞、组织，甚至到个体的各个层次的整合。我们知道，系统科学的核心思想是“整体大于部分之和”；系统特性是不同组成部分、不同层次间相互作用而“涌现”的新性质；对组成部分或低层次的分析并不能真正地预测高层次的行为。如何通过研究和整合去发现与理解涌现的系统性质，是系统生物学面临的一个根本性的挑战。

系统生物学整合性的另一层含义是指研究思路和方法的整合。经典的分子生物学研究是一种垂直型的研究，即采用多种手段研究个别

的基因和蛋白质。首先是在 DNA 水平上寻找特定的基因，然后通过基因突变、基因剔除等手段研究基因的功能；在基因研究的基础上，研究蛋白质的空间结构、蛋白质的修饰及蛋白质间的相互作用等。基因组学、蛋白质组学和其他各种“组学”则是水平型研究，即以单一的手段同时研究成千上万个基因或蛋白质。而系统生物学的特点，则是要把水平型研究和垂直型研究整合起来，成为一种“三维”的研究。此外，系统生物学还是典型的多学科交叉研究，它需要生命科学、信息科学、数学、计算机科学等各种学科的共同参与。

四、系统生物学基本框架

我们的最终目的是理解相应系统中观察到的整体变化的分子及其相互作用。为此，我们必须整合各种水平的整体性质的测量和生物系统的数学模型。系统生物学的基本工作框架如下所述。

（一）系统结构鉴定

系统结构鉴定首先是对选定的某一生物系统的所有组分进行了解 and 确定，描绘出该系统的结构，包括基因相互作用网络和代谢途径，以及细胞内和细胞间的作用机制，以此构造出一个初步的系统模型。多细胞有机体机构的识别不仅需要鉴定基因调控网络、代谢网络的结构，还需要在细胞水平精确理解整个生物的物理结构。这一步可以达到两个目的：描述统治系统行为的相互作用；精确预测给定扰动下系统的行为。

（二）系统行为分析

系统生物学一方面要了解生物系统的结构组成，另一方面要揭示

系统的行为方式。相比之下，后一个任务更为重要。也就是说，系统生物学研究的并非一种静态的结构，而是要在人为控制的状态下，揭示出特定的生命系统在不同的条件和时间下具有什么样的动力学特征。一般是通过系统地改变被研究对象的内部组成成分（如基因突变、基因删除等）或外部生长条件（生长条件、温度、激素或药物刺激），然后用大规模发现工具观测在这些情况下系统组分或结构所发生的相应变化（包括基因表达、蛋白质表达和相互作用、代谢途径等），并把得到的有关信息与模型进行整合。

（三） 系统控制

把通过实验得到的数据与根据模型预测的情况进行比较，并对初始模型进行修订，使其预测结果与实验观察更加一致。

（四） 系统设计

根据修正后的模型的预测或假设，设定和实施新的改变系统状态的实验，重复（二）和（三），不断地通过实验数据对模型进行修订和精炼。系统生物学的目标就是要得到一个理想的模型，使其理论预测能够反映出生物系统的真实性。

第二节 复杂网络及特征

复杂网络是在拓扑层次上，对大量真实复杂系统的抽象简化，它比规则网络和随机网络复杂得多，是研究复杂系统的结构和行为的关键。

（一） 复杂网络的统计特征

在网络中，两点间的距离被定义为连接两点的最短路径所包含的

边的数目，把所有节点对的距离求平均，就得到了网络的平均距离（averagedistance）。另外一个参数叫作集聚系数（clusteringcoefficient），专门用来衡量网络节点聚类的情况。例如，在朋友关系网中，你朋友的朋友很可能也是你的朋友；你的两个朋友很可能彼此也是朋友。集聚系数就是用来度量网络的这种性质的。用数学的语言来说，对于某个节点，它的集聚系数被定义为它所有相邻节点之间边的数目占可能的最大边数目的比例，网络的集聚系数 C 则是所有节点集聚系数的平均值。

研究表明，规则网络具有大的集聚系数和大的平均距离，随机网络具有小的集聚系数和小的平均距离。

研究还发现，大量真实网络的节点度服从幂律分布，这里某节点的度是指该节点拥有相邻节点的数目，或者说与该节点关联的边的数目。

（二）网络的拓扑分析

通过计算网络上的统计指标可以得到复杂网络中更有意义的节点。基于生物大分子的互作关系或统计学上的相关性，可构建相应的复杂网络模型。根据网络中节点的相应指标可对其进行有目的的分析。对于无向无权图来说，节点的度表示和此节点有连接的节点数量，是网络研究中最基本和最广泛使用的度量标度，许多指标在计算中都要利用节点度的信息来描述网络中的高阶拓扑关系。在网络分析中可以根据节点的度筛选出中心节点（hubs），以蛋白质互作网络为例，节点度较高表明该蛋白质分子能跟更多的蛋白质发生互作，因此在生物体

内发挥着更重要的作用。网络分析中另一个重要的指标是介数中心性 (**betweenness centrality**)，它反映了网络中任意两点间所有最短路径中经过目标节点的路径数目占最短路径总数的百分比，刻画了目标节点连接网络中任意两点的能力，更高的介数中心性表明该节点在复杂网络中扮演着桥梁的作用，常用来寻找瓶颈节点 (**bottlenecks**)。这类节点并不一定有很高的度，因此无法通过寻找中心节点的方式找到这些瓶颈节点。

然而，越来越多的研究开始聚焦到网络中由多个节点组成的功能组件而非单独的某个节点。这种高阶的连接模式更好地反映了复杂生物网络的自组织性。大量研究表明，在生物体内发挥作用的并非单个生物大分子或者单独的某个基因，而是由多个节点共同组成的模体 (**motif**) 在发挥着生物学功能。模体被定义为复杂网络中某种异于随机网络的相互连接模式，是复杂网络中的简单功能组件。模体普遍存在于不同类型的网络中。例如，在基因调控网络中，基因 X 的表达产生的转录因子可以促进基因 Y 的翻译，则当基因 X 被翻译成蛋白质时，基因 Y 也会被翻译；在神经元网络中，类似的结构是由于神经元 X 激活了神经元 Y。除了保留网络局部特征的模体外，网络还具有社区结构 (**community**)。社区结构是指网络中普遍存在的社区中节点连接紧密、社区间节点连接稀疏的现象。例如，在蛋白质互作网络中，功能类似的蛋白质可能形成一个紧密相连的“社区”。启发式的社区发现算法可以对图结构数据进行有效的聚类，已广泛应用于蛋白质互作网络挖掘、单细胞聚类等领域。

（三） 生物中的复杂网络

尽管最近才被引入，复杂网络的研究已经稳步增长。由于其良好的解释性与强大的模型表达能力，网络结构在对现实世界的建模中受到了广泛的应用。生物体的内在复杂性和系统组织性使得复杂网络为系统生物学的研究提供了一个特别有前途的框架。生物的复杂网络建模涵盖了从细胞内的分子相互作用到细胞间通讯以及生物体与物种之间的联系。随着实验和经验数据的急剧累积，建立多尺度的模型来模拟观察到的生物反应与表型是一个挑战。

在细胞水平上，将不同代谢物、蛋白质和基因之间相互作用模式中观察到的结构规律转化为观察到的表型下的组织原则是一项关键任务，可以在网络科学的背景下显著解决，它为大规模的数学和计算分析提供了框架。具体而言，模式生物代谢网络的基因组尺度重建可以表示为复杂的网络，以阐明其结构和功能之间关系的不同方面。当前生物复杂网络的研究主要集中于转录调控网络、蛋白质相互作用网络以及代谢网络。

生物体的巨大复杂性更多地是由于基因表达的精细调控，而非基因含量的差异。转录网络是调控细胞基因表达的关键系统。转录因子（transcription factor, TF）响应细胞环境的变化，调节靶基因（target gene, TG）的转录，将功能蛋白相互作用与遗传基因组 DNA 中编码的遗传信息联系起来，从而控制基因在生物发育过程中的时空表达。这些调节因子以复合物的形式与转录位点起始点附近的特定顺式元件结合，通过 RNA 聚合酶稳定增加或减少 mRNA 产生的速率。

TF 和 TG 之间的相互作用可以表示为一个有向图。当调控元件和靶基因之间发生调节相互作用时，两种类型的节点（TF 和 TG）通过有向边连接。

蛋白质之间的相互作用对于维持活细胞的分子系统正常工作至关重要。蛋白质相互作用对于细胞间的通讯、微环境变化的感知、蛋白质的运输和修饰等生物过程具有重要意义。复杂网络理论在描述复杂系统时具有普遍性和集成性，适合研究蛋白质之间的相互作用。在复杂网络分析中，每个蛋白质被表示为一个节点，蛋白质之间的物理相互作用由网络中的边表示。蛋白质研究中的一大热点是蛋白质功能的预测。在蛋白质相互作用网络中共享连接的蛋白质往往具有相似的功能。经验观察表明，70%~80%的蛋白质和与其互作蛋白质至少共享一种功能。这样，通过分析已知蛋白质的邻域，就可以推断出它们一阶邻居蛋白质的一些功能。

新陈代谢主要由基因、环境和营养决定。它由酶催化的化学反应组成，产生必需的成分，如氨基酸、糖和脂质，以及合成和利用它们来构建细胞成分所需的能量。由于化学反应被组织成代谢途径，其中一种化学物质通过酶和协同因子转化为另一种化学物质，因此这种结构可以自然地建模为一个复杂网络。通过这种方式，代谢网络是有向图和加权图，其顶点可以是代谢物、反应和酶，以及两种表示代谢物流动和催化反应的边。京都基因与基因组百科全书（KEGG）数据库就记载了大量的代谢网络信息。

第三节 系统生物学基本技术与方法

一、测量技术

(一) 全面测量

为了掌握研究的整个生物体，需要获取一组全面的数据。目前，已有方法能在 mRNA 水平进行全面测量，从而得到基因表达谱。测量蛋白质表达水平及其相互作用的方法也取得了进展（酵母双杂交、质谱等）。同时，很多干扰基因转录的方法也已发明，如使特定基因功能失效的基因敲除及对线虫特别有效的 RNA 干扰技术。此外，还有正在进行蛋白质的高精度时空定位数据的获取。

(二) 系统生物学测量

系统生物学研究需要全面的数据，并要严格控制产生数据的质量，以供仿真、建模及系统鉴定使用。将传统的实验自动化，从而实现高质量、高通量的实验输出。系统、全面、精确的测量是系统生物学实验的基本特征。精确定量的重要性不言而喻。全面性进一步分为以下 3 类。①组分的全面性。诸如基因、蛋白质等成分必须得到全面测量，否则测量的有效性就值得怀疑。②时空完备性。传统生物学实验往往倾向于仅测量特定时间发生前后系统的变化，而精细时间序列和特定空间分布下获得系统行为对系统生物学则更加重要。③内容的全面性。对诸如转录水平、蛋白质相互作用强度、磷酸化、甲基化、乙酰化、定位等特征的全面测量至关重要。“系统”意味着测量所得的数据必须一致、完整。

(三) 定量的高通量测量技术

人类基因组计划不仅改进了我们系统扰动细胞的能力，也给我们提供了系统地表征细胞响应的技术，如 DNA 测序仪、微阵列技术、高通量蛋白质组学，当然还有诸如四维显微自动获取细胞系及线虫早期胚胎形成、超高分辨率荧光显微镜等许多正在发展的技术。由于这些技术可实现整体分析，因此成为生物系统性质、动力学等快速、准确分析的首选方法。

二、系统生物学实验方法

为了适应不断增长的全面、精确测量的要求，需要开发一系列新技术、新仪器，以供自动化程度高、精确度高的测量手段所需。首先，常规实验的自动化程度需要大幅度提高，否则高通量实验就是一种噩梦般的劳动。其次，需要采用尖端技术（如纳米技术、飞秒技术等）来设计下一代实验装置。有朝一日，我们也许可以测量基因和蛋白质的活动。细胞系的鉴定是分析基因表达调控网络必须完成的主要工作之一。四维显微成像系统允许我们收集恒定时间间隔的多层共焦图像，但是还需要更高的自动化程度。结合整体原位杂交和正在发展的单细胞表达谱，我们在不久的将来会实现对基因调控网络的完全鉴定。

三、系统结构的鉴定

（一）网络结构的鉴定

1. 自下而上的方法

自下而上的系统生物学由分子之间的相互作用属性开始，研究这些相互作用如何导致生物体的功能行为。这些相互作用影响或作用于生物系统的过程，使生物体可以依时序发育，或者通过修复损伤或补

偿耗散维持其状态；基于独立的实验数据来构建网络模型，如通过文献和一些专门的实验获取感兴趣的特定网络数据。自下而上的方法适合于大多数基因及调控网络已经得到较好理解的情况，特别适合于已经了解部分结构而只需进行完善的情形。当大多数参数已经可用，研究的主要目的就是建立一个仿真模型，用于分析参数改变时系统的动态特性。

2. 自上而下的方法

自上而下的系统生物学由分子水平的实验数据开始，将生物系统的相关分子视为整体，在数据分析过程中，得到关于生物体分子组成及功能的新假设。

（二）参数鉴定

鉴定网络结构固然重要，网络中参数的鉴定同样重要。因为所有计算结果必须与实际实验结果一致，鉴定出来的网络必须对系统响应、行为特征进行量化分析和仿真。大多数情况下，可以基于实验数据估计参数，这些方法包括穷举搜索、遗传算法、模拟退火等。精确测量、估计参数在许多情况下是必需的，但也有无需精确估计的情况。

四. 系统行为分析

一旦我们理解了系统的结构，接下来的重点就是关注系统动态行为。为了获得系统层次的理解，需要理解系统的鲁棒性、稳定性和回路功能背后的机制。仿真在系统生物学中扮演重要的角色，因为网络行为十分复杂、组分众多，直接理解网络行为几乎是不可能的，一般通过施加扰动，改变网络的参数和结构，从而分析网络动态行为，因

此, 建立精确的模型是必需的。仿真不仅是理解系统行为的基本工具, 也是设计过程的基本工具。由于仿真是生物系统研究的可行方法, 因此需要开发高度实用化、精确、用户界面友好的仿真系统。仿真器和相关软件需要大量计算, 常常需要在计算机集群上运行。这些仿真系统必须能够仿真单个和多个细胞的基因表达、新陈代谢、信号转导等过程。很多情况下, 仿真系统还需要能够模拟像染色体结构这样的更高层次。系统生物学仿真需要开发和整合一系列软件, 如存储实验数据的数据库、细胞与组织仿真系统、参数优化软件、分叉和系统分析软件、假设生成器和实验设计专家软件及数据可视化软件, 如分叉分析、代谢控制分析、敏感性分析流平衡分析、代谢控制分析等方法已用于系统动态分析。

五、 系统生物学计算：数据与工具

(一) 计算数据日益重要

尽管核酸、蛋白质序列数据仍然是最大、最有用的数据, 但人们对其他类型的数据产生了极大兴趣, 这种兴趣主要源自于功能基因组学和系统生物学。例如, **DIP**、**BIND** 和 **MIP** 储有蛋白质-蛋白质相互作用信息, **TransFac** 和 **SCPD** 为蛋白质-DNA 相互作用, **KEGG** 和 **BioCyc** 为代谢途径数据库。

这些爆炸性数据给我们提出两个挑战: ①如何以适当的格式系统地储存这些信息; ②如何保持数据及时更新。研究者可能收集大量基因、分子相互作用、通路等生物信息, 但没有一个科学家能熟悉细胞中巨大的、复杂的相互作用信息, 所以说数据对系统生物学尤为重要。

（二）整体分析日显重要

有了表达谱、分子相互作用和大量其他数据，我们的任务是发展强有力的分析和实验策略整合、分析这些数据进行生物学发现。迄今，人们的注意力主要集中在基因表达方式的分析方法。通过选择不同生物条件和时间下有明显变化的基因，基因表达数据可用于特殊生物过程中基因的识别。在这类实验中，成百上千个基因的表达水平随测试条件变化。

（三）计算模型越来越重要

由于高通量技术的发展，产生了大量定量的生物学数据，生物学从描述性学科逐步转向预测性学科。计算机系统用于储存、分类或压缩迅速增长的数据，我们需要把数据组合成一网络模型，预测网络行为和实验可测结果。

（四） 计算模型的类型

研究人员已提出大量细胞模型，如化学动力学模型，试图把细胞过程表达成不同的化学反应系统。与上述涉及化学反应系统的模型相反，另一类模型则把遗传网络模拟为分立的电路。

（五） 模型细节的选择

一个模型涉及一些关键选择，如包含哪一基因及哪一基因产物。基因可在转录、翻译水平调控，翻译后蛋白质还存在一系列修饰形式，通过可变剪接，一个基因可编码一系列不同的 mRNA。一些非遗传分子（如代谢物）可能影响网络；更进一步，一些相互作用限定于核仁、细胞膜、高尔基体及其他细胞器。所以一个完整的模型应包含分子如

何实施可变剪接、修饰蛋白质产物及不同细胞器之间如何相互作用。

第四节 基因表达调控网络

一、 基于 DBRF 方法从稳态基因表达数据推测基因网络

(一) 基于差异表达调控识别方法推测基因调控网络

基于差异表达 (difference-based regulation finding, DBRF) 的调控识别从基因表达水平的差异推测可能的基因网络。首先通过野生型和突变型基因表达的差异, 推测直接和间接的基因调控关系, 然后去除间接调控关系。

(二) 网络模型

将一个基因调控网络描述为包含 N 个节点 a_n ($n=0, 1, \dots, N$)、具有权重的节点间有向边、对每个节点都成立的表达函数方程 g_n 的结构图。节点代表基因, 有向边代表调控关系。有向边权重因子的正负代表作用于目标基因的激活或抑制。基因 a_n 的表达水平由一个非线性 Sigmoidal 函数 g_n 决定, 该函数用于描述基因表达。

二、 海胆 cis-基因调控网络

迄今为止, 海胆 *endo16* 基因有最完整 cis-基因调控系统, 这一系统用计算机或其他电路控制。大量转录因子的多种输入整合后输入 RNA 合成机。*endo16* 在胚胎内皮层表达, 它首先出现在胚胎内皮层, 然后是原肠消化道, 最后在中肠密集, 在前肠、后肠中消失。

第五节 代谢网络

(一) 网络的遗传和环境扰动

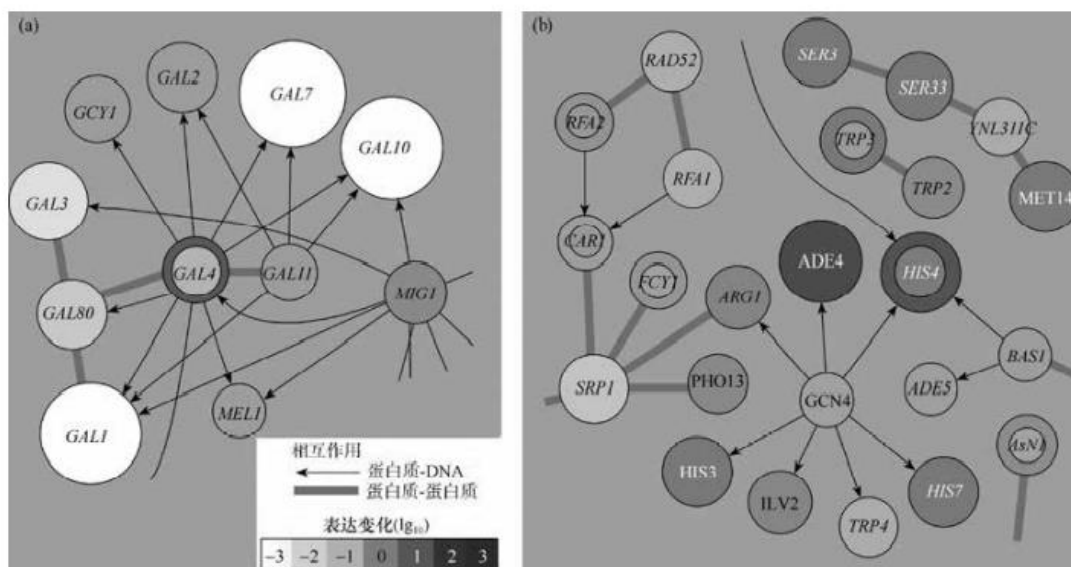
我们希望确定半乳糖中分子相互作用是否足以说明来自对 GAL

通路扰动的基因表达的变化。为此，我们构建了 9 个遗传扰动酵母株，每一个删除一个不同基因，与野生型（无基因删除）一起，这些菌株在 2% 半乳糖有（+Gal）和无（-Gal）条件下稳定生长。在 20 种扰动（10 株×2 培养基）下，用全酵母基因组微阵列监视相对野生型（+Gal）mRNA 表达的变化。997 个 mRNA 显示出在一个或多个扰动下浓度发生变化，对应的扰动基因分成 16 个不同的类，在同一类的基因中显示了相似的响应。特别是编码代谢细胞和合成通路的基因处于同一类，显示了酵母细胞中关联信息通路的网络。

（二） 网络模型的构建和可视化显示

为了显示这些信息通路的性质，我们构建了一个连接其他代谢过程的半乳糖利用的分子相互作用网络。为此，关注 3026 个物理相互作用。这些相互作用定义了一个分子相互作用网络的模型。网络中每一个节点表示一个基因，有向线段表示第一个基因编码的蛋白质通过 DNA 结合能影响第二个基因的转录，无向线段表示基因编码的蛋白质有物理相互作用。

每一个扰动下的表达数据可视化加入网络。例如，下图左显示半乳糖存在时 *gal4Δ* 删除的结果，每一个节点的灰度表示其相应基因的 mRNA 表达的变化。当获取到其他信息时，也可添加进网络。下图右说明增加蛋白质富含信息下的可视化显示，主要关注氨基酸生物合成对应的网络区。通过比较每一节点显示的 mRNA 和蛋白质表达响应，我们可以确定 mRNA 是否与蛋白质数据相关。



(三) 观察与预测的比较

按前述系统生物学框架，我们希望确定是否观察到的 20 种扰动的表达变化与分子相互作用网络预测的变化一致。

(四) 通过附加扰动修正模型

用预测与观察表达响应差异可以修正模型。

第六节 信号转导途径

一、细菌化学趋向：一个鲁棒的信号转导模型

(一) 化学趋向的行为和分子生物学

化学趋向响应的生理学相对来说较好表征。细菌在化学梯度下通过偏向随机行走、向前游动和随机再定位的变化而移动。为了游动，细菌逆时针转动其鞭毛马达。当它移动时，细菌感觉的是化学梯度的吸引或排斥，增加吸引或减少排斥导致沿确定方向的持续游动。

(二) 作为系统的性质模拟“鲁棒性”

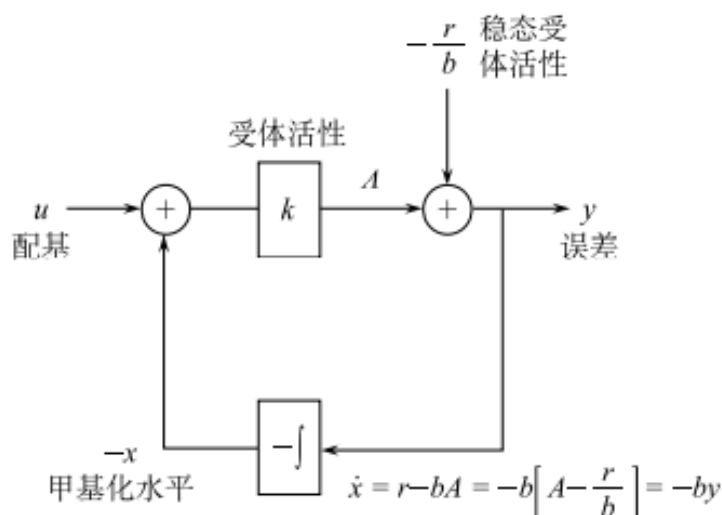
化学趋向网络的一个有趣的系统性质是它对不同吸引浓度适应

的鲁棒性。这里，鲁棒性意指系统的输出对其输入或生物化学参数的个别选择不敏感。特别是，鲁棒适应指的是系统输出对输入变化的响应不依赖整体输入值。这样，E.coli 细胞通过改变它们的翻动频率（输出）响应对吸引浓度（系统输入）的变化。然而，由于鲁棒性适应，引诱物的均一解总是导致不同的引诱物浓度产生相同的翻动频率。

（三）细菌趋向性的完全适应和积分负反馈机制

细菌趋向性表现出完全适应性。实验表明：随诱导物剂量的持续作用，输出首先有短暂升高，接着是一段适应期，之后返回到刺激前的活性水平 Y_0 。于是，活性的稳态水平 Y_{ss} 渐近趋于 Y_0 ，并且在诱导物浓度大范围变化的情况下都能观察到这一现象。

控制工程师很熟悉鲁棒性是积分负反馈的典型特征。什么是积分负反馈机制呢？现用下图来进行说明。带增益 k 的方块表示网络获得输入，并得到输出 A 。 A 和期望的稳态输出之间的差值为误差 y 。对 y 积分并将它的负数反馈到系统中。反馈项 $x = \int y dt$ ，因此 $\dot{x} = y$ 。稳态下， $\dot{x} = 0$ ， $y \rightarrow 0$ ，且与输入 u 和增益 k 无关。所以，只要系统是稳定的，不论输入 u 和增益 k 是多少，误差值都会趋于 0。变量 x 表示受体的所有甲基化状态。 x 的改变，即等于甲基化的速率 r 减去去甲基化的速率。假设 CheB 只对被激活的受体复合物去甲基化，利用这个假设我们将去甲基化速率写成一个关于受体活性水平 A 的函数。



(四) 生物学网络的正向工程

迄今为止讨论的例子涉及构建自然发生的生物系统的力学模型。然而，前述的系统生物学框架同样可以用于按照预定模型构建合成系统，但有一个差别：前一情形，改变模型去适应生物学系统（即反向工程）；而后一情形，改变生物学系统去检验模型（即正向工程），合成生物学（第十章）就是正向工程。

二、光传导中的单光子响应和钙介导反馈的重现性

下面讨论光传导中的单光子响应的鲁棒性问题。在视网膜中，杆状光感受细胞和锥状光感受细胞一起感光，再将信息传给大脑中的视皮层。视感细胞有非常特殊的几何结构。特别是感光细胞的外节片段由许多膜盘组成，这些膜盘都装载于光传导信号级联成分中。

杆状光感受细胞在感受一个单光子时产生一个固定的响应。早期，Baylor 和他的同事注意到单光子响应有惊人的重现性。

将整个途径分成多个模块，单光子响应由受体激活与关闭控制。单个受体由单光子激活，被激活的受体被视紫红质激酶（RK）磷酸

化，接着与抑制蛋白结合而关闭。被激活的视紫红质 (R^*) 激活多个 G 蛋白，G 蛋白再刺激 cGMP (环磷鸟苷) 磷酸二酯酶 (PDE)。被激活的 PDE (PDE^*) 降解第二信使 cGMP，使其浓度降低，导致 cGMP 门控通道关闭，流量发生变化。两个由钙起作用的反馈循环值得注意。钙经过 cGMP 通道进入细胞，因此细胞内的钙浓度是一个关于流量 J 的函数。在一个循环中，用于合成 cGMP 的鸟苷酸环化酶 (GC) 受到鸟苷酸环化酶活性蛋白 (GCAP) 这种钙结合蛋白的调节。另一个循环中，视紫红质激酶受到该结合蛋白恢复蛋白的调节。

三、 动态平衡和信号转导中的双相响应调节与正反馈及其应用

动态平衡还可进一步分成两类：①某个变量(如调节蛋白的浓度)可能会因为外部扰动引起瞬间的变化，但仍会维持在一定的水平，我们称该变量处于稳态，这种调节方式称为自动调节；②某个外部参数影响一个变量时，采用补偿的方式使变量最终返回稳定状态，这种调节适应称为动态平衡适应。

通常认为动态平衡适应调节的系统总是稳定的或自动调节的，所以自动调节是动态平衡系统的基本特征。下面介绍双相调节与正反馈结合的自动调节机制。其基本意思如下：第一种分子的激活促进第二种分子的激活；同时，第二种分子在活性低时会促进第一种分子激活，而在活性高时会抑制第一种分子激活。

(一) 双相调节-正反馈偶联理论

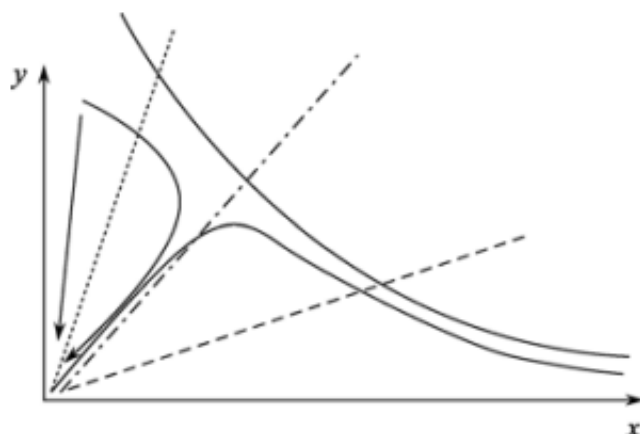


图 9-17 正反馈与双响应相结合的系统与简单负反馈系统的行为之间的主要区别

(二) 结合蛋白质的 TATA 框和转录调控

TATA 框是许多高表达真核基因启动子中主要的元件，位于转录起始位点上游 25~35bp 的区域。TATA 框的突变往往会引起转录速率的急剧下降。TATA 框是 TATA 结合蛋白 (TBP) 的结合位点。TBP 以单体形式与 TATA 框和其他调控因子相结合。同时，TBP 能够自己结合进行低聚，低聚体包括四聚体和八聚体。我们还不清楚 TBP 低聚反应是否会阻止它与 DNA 的结合，但是负责与 DNA 结合的 TBP 表面确实有两种低聚体形式。所以，可能是通过 TBP 低聚体与 TATA 框相结合来阻止 TBP 单体的调控作用。

TBP 在转录起始中的重要作用表明它的表达被紧密调控。对 TBP 启动子中调控元件的研究揭示出一个 TATA 框和两个控制元件的存在，其中 TATA 框是基础转录所必需的，而两个控制元件是用于结合另一个转录元件——TBP 启动结合因子 (TBFP)。两个控制元件中，一个是位于 TATA 框上游有较高亲和力的结合位点，具有激活转录的作用；另一个是位于 TATA 框和转录起始位点之间有较低亲和力的结

合位点，具有抑制转录的作用。我们推测在第二个位点上的 TBFP 是起反作用的，因为它阻碍了 TBP 结合到 TATA 框上。TBP 可能对 TBFP 起正调控作用，所以呈现出 TBP 转录对 TBFP 浓度呈双相相关关系与 TBFP 转录对 TBP 浓度的正相关的结合。TBP 转录还受到包括 Ras 在内的外部信号的调控，所以 TBP 转录会受到外部参数的调节。由于 TBP 的表达需要维持在一定的水平范围，甚至在有激活信号（如 Ras）的情况下也一样，所以用双相调节-正反馈偶联解释最佳。如果使用负反馈调控，TBP 表达将无上限。

（三） 细胞质内 Ca^{2+} 浓度的调节

由 Ca^{2+} 激活的 Ca^{2+} 释放是通过内质网中对三磷酸肌醇（IP3）和 Ryanidine 受体（RyR）敏感的 Ca^{2+} 通道来调节的。IP3R 的开放概率是一个关于细胞质内 Ca^{2+} 浓度的双相曲线函数，在 Ca^{2+} 浓度低时，通道被活化；在 Ca^{2+} 浓度高时，通道被去活化。在这种情况下，当受体的 4 个单体中都出现高亲和力激活和低亲和力抑制的 Ca^{2+} 结合位点时，双相调节产生。IP3R 的开放概率受 IP3 的浓度和 ATP 调节。增加 IP3 将使最优值位置正移，并且使开放概率的最大值增大。IP3 的作用在于它能变构地降低 Ca^{2+} 对抑制位点的亲和力，但是保持对激活位点亲和力不变。通过降低 Ca^{2+} 对激活位点的亲和力可以使最优值位置负移，从而增加 ATP 的浓度。

（四） MAPK 浓度的调节

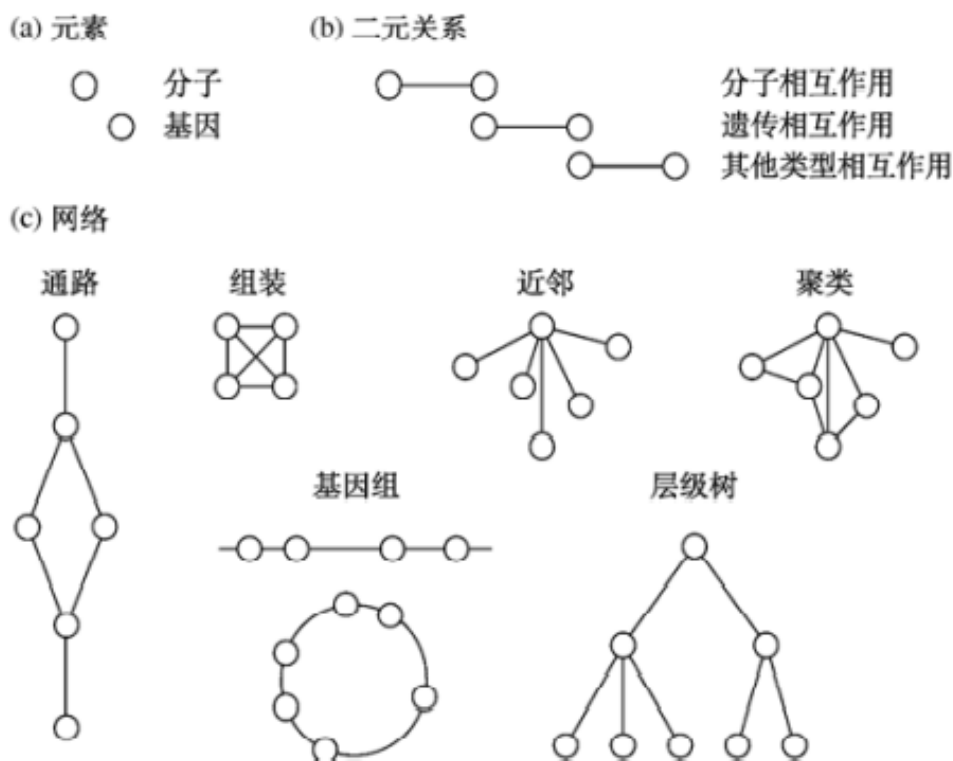
有丝分裂原激活的蛋白激酶（MAPK）级联是由 3 个顺序起作用的激酶组成的。级联中最后一个成分 MAPK 在酪氨酸和苏氨酸残基

处双磷酸化后被级联的第二个成分 MAPKK 激活。MAPKK 在苏氨酸和丝氨酸残基处双磷酸化后被级联的第一个成分 MAPKKK 激活。两个磷酸化反应是通过激酶和它的作用物的完全分裂而分开的。从理论上和实验上，得到 MAPKK 和 MAPK 活性的分布特性导致信号转导输出是基于这些激酶浓度的双相相关性。简单地说，在酶的底物浓度高时，由于激活酶的饱和性，没有被激活的酶底物（MAPK）不能使第二个酶作用物磷酸化。

第七节 蛋白质蛋白质相互作用网络

一、蛋白质相互作用网络的基本概念及性质

网络是一个图，是节点和连接节点的边的集合。节点可以是分子、基因或蛋白质，边是分子相互作用、遗传相互作用或其他的两个元素之间的关系。



除正规网络结构外，网络从结构上还可分为随机（指数式）网络和无标度网络。传统的随机网络（如 ER 模型），尽管节点连接是随机设定的，但大部分节点的连接数目会大致相同，即节点的分布方式遵循泊松分布，有一个特征性的“平均数”。连接数目比平均数高许多或低许多的节点都极少，随着连接数的增大，其概率呈指数式迅速递减。故随机网络亦称指数网络。而无标度网络是 1998 年 Barabasi 等在研究 WWW 网络结构时意外发现的：WWW 网络基本上是由少数高联通性的页面连接组成的，80%以上页面的连接数不到 4 个，而占节点总数不到 1/10000 的极少数节点，却和 1000 个以上的节点连接。网络的连接分布不见随机网络具有的“平均数”特征，而是遵循了“幂次定律”分布，即：任何节点与其他 k 个节点相连接的概率正比于 $k^{-\lambda}$ [$P(k) \sim k^{-\lambda}$]，于是他们把这种网络称为“无标度网络”。可见，无标度网络是不均匀的，大多数节点只有一个或两个连接，但少数节点有大量连接，从而保证系统是全部连通的。这种高联通度的节点（蛋白质）称为 Hub，它作为网络中的枢纽，在生物的进化与维系相互作用网络的稳定性等方面有着不可替代的作用，这些蛋白质往往参与重要的生命活动，并发挥关键的生物学功能。

二、蛋白质相互作用网络实例

（一）幽门螺杆菌蛋白质相互作用网络

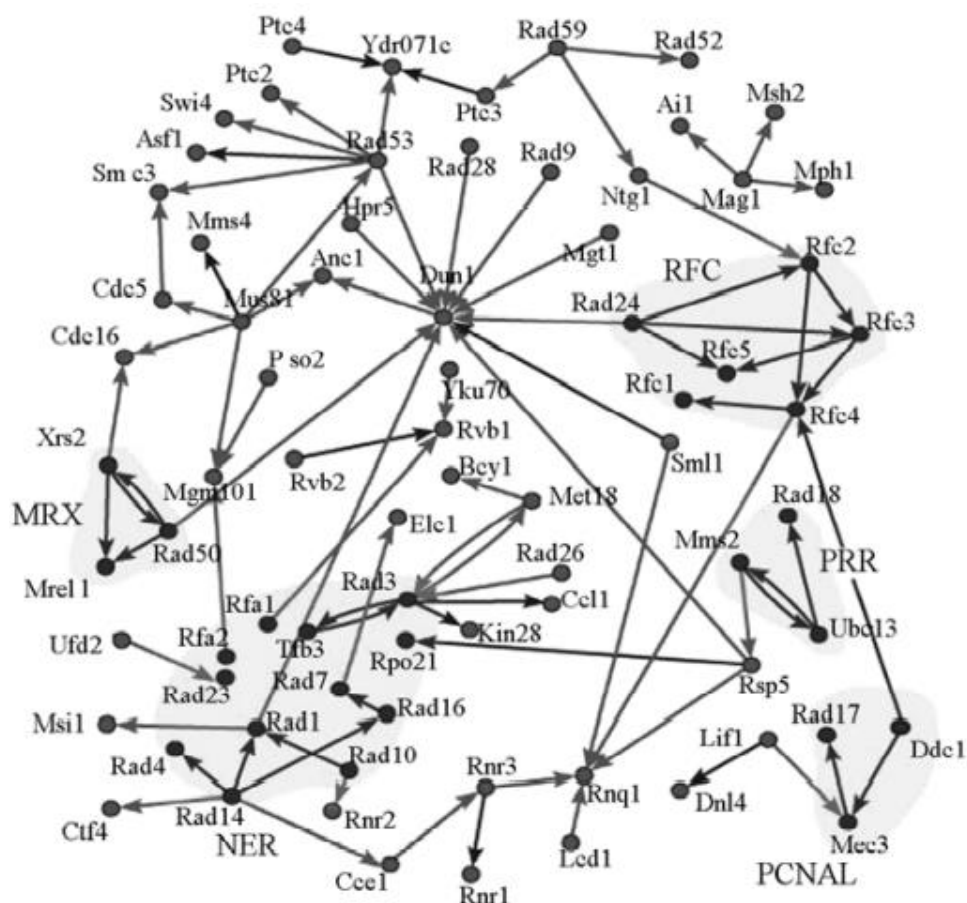
人类胃肠道病原菌幽门螺杆菌是螺杆菌的一个种类，其基因组序列早就测序完毕，大约包含 1590 个潜在的蛋白质或 ORF。Rain 等使用酵母双杂交策略从编码基因组多肽文库中筛选了 261 个蛋白质，共

计有 1200 个相互作用（大约占全蛋白质组相互作用的 46.6%）。他们发展了称为 PIMRider 的软件，可以实现图示及基于网络图的功能分析。

初步分析表明，功能相关的基因编码的蛋白质容易发生相互作用。例如，与细菌趋向性相关的几个蛋白质 CheA、CheW、CheY 及 TlpA 处于一个局部自网络中，CheA 与 CheW 和 CheY 相互作用、TlpA 与 CheW 相互作用。其他如 HypE 和 HypF、ScoA 和 ScoB、RpsR 和 RpsF、MoaE 和 MoaD、FtsA 和 FtsZ 等功能上相关的蛋白质对之间也有相互作用。

（二）酵母蛋白质相互作用网络

下图是 DNA 损伤修复相关蛋白质相互作用网络，涉及细胞周期过程、转录、蛋白质降解和 DNA 修复本身等过程。网络整体上由已知和新相互作用子集构成，包括 86 个 DNA 损伤修复相关蛋白。蓝色箭头表示已知的相互作用，红色箭头表示新发现的相互作用。Ho 等的工作表明，与 DNA 损伤修复相关蛋白质确实包含了许多蛋白复合体。例如，RFC（复制因子 C）复合体由 Rfc1、Rfc2、Rfc3、Rfc4 和 Rfc5 间相互作用组成；PCNAL 复合体由 Mec3、Rad17 和 Ddc1 组成，其主要功能是传递损伤信息；PRR（后复制修复）复合体由 Mms2、Ubc13 和 Rad18 组成；MRX 复合体由 Mre11、Rad50 和 Xrs2 组成，主要负责介导同源双链修复；NERo 复合体也在已知的核酸切割修复中出现，涵盖了多个小的复合体 NEF1（Rad1-Rad10-Rad14）、NEF3/TFIIH（Rad3-TFB3-Kin28-Ccl1）和 NEF4（Rad7-Rad16）。



(三) 线虫蛋白质相互作用网络

秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditiselegans*) 是第一个进行全序列分析的多细胞生物, 是研究蛋白质相互作用网络的理想模式生物, 已测序列长 97Mb, 含有 19099 个编码蛋白质的基因。Li 等 (2004) 采用高通量酵母双杂交系统技术检测 4000 种蛋白质的相互作用, 同时用亲和纯化试验进一步检验双杂交数据。目前, 蠕虫相互作用组 (WIS) 含有约 5500 种蛋白质的相互作用。

(四) 果蝇蛋白质相互作用网络

黑腹果蝇 (*Drosophilamelanogaster*) 是高等真核生物遗传学研究的经典材料, 基因组大小为 180Mb, 有 13601 个编码蛋白质的 ORF。

Giot 等 (2003) 用酵母双杂交系统研究果蝇的蛋白质相互作用,

对 13601 种 ORF 进行 PCR，并且对果蝇胚胎期和成蝇期的 cDNA 文库中的各种 cDNA 片段分别插入诱饵载体和猎物载体，获得庞大的克隆。随后进行双杂交测试，选出二倍体带有标记的阳性克隆，进行序列分析，得到 7048 种蛋白质，共计 20405 种相互作用，并将其绘制出一张复杂的网络图。

（五） 人类蛋白质相互作用网络

人基因组大小为 3.1647Gb，估计含有约 2 万个基因。Raul 等借助高通量酵母双杂交系统技术从约 8100 个用 PCR 扩增出的 ORF 产物中检测到相互作用约 2800 个。

三、基于相互作用网络的功能分析

有了相互作用网络之后，重要的任务就是如何在网络层面理解生物学过程及生物分子的功能。已有一些工作试图从网络的基本组成单元——网络模体、网络主题的研究等方面探讨生物学功能，本节将对这些内容作一概括性介绍。

网络模体用来描述网络中比随机网络更多出现的连接模式，是复杂网络的基本构件。可以对网络模体（motif）定义如下：“网络模体是网络中不同位置重复出现的节点组合的特殊拓扑结构”。网络模体概念可以拓展到由多种相互作用组成的整合网络，这种模体表征局部网络近邻中不同生物学相互作用的关系。同一类模体组成的更加复杂的结构称为网络主题（theme），网络主题与特定的生物学功能相关。如果把网络主题约化为一个节点而形成的简约图就是主题图（thematicmap）。

(一) 蛋白质相互作用网络模体分析

Lee 等 (2006) 研究了酵母的 4738 个蛋白质、1129 个相互作用形成的网络, 发现网络中大多数保守模体可分为 3 节点、4 节点, 共计 8 种形式的网络“模体”。如果定义进化上完全保守的模体数占总模体数的百分比为网络模体保守分数, 发现同一模体下, 不同模式的进化是有差异的。

(二) 整合生物网络模体、主题分析

生物学过程往往涉及诸如蛋白质相互作用、遗传相互作用、转录-调控、序列同源及表达相关等形式的多种相互作用。如果单独研究每一种网络, 可能会丢掉许多涉及它们之间结合产生的过程或功能, 我们有必要发展包含多种相互作用的整合生物网络, 并研究它们的模体特征。

第八节 虚拟细胞

虚拟细胞亦称为人工细胞或电子细胞, 它是在实验数据及理论的基础上, 结合生命科学、计算机科学、数学等学科的原理和技术, 对细胞的结构和功能进行分析和整合, 构建的一种对细胞内外部生命活动现象及过程进行模拟和预测的虚拟系统, 以期探索细胞生命活动的潜在规律。因此, 虚拟细胞亦称人工细胞或人工生命。解析并建立一套细胞工厂和生物纳米机器将成为科学家奋斗的目标。

一般认为, 虚拟细胞主要由 4 部分组成: 控制界面, 计算机存储、分析和控制系统, 数学计算系统, 反应界面。其构建过程一般要经过生物数据收集、整理, 数据的计算分析, 向虚拟细胞数学模型的转化,

以及虚拟细胞的测试和维护。虚拟细胞构建是十分复杂的，不同的细胞、不同的虚拟对象和实现的功能，其构建的形式有很大差异，需要反复验证和不断完善。以虚拟细胞为平台和工具，借助于强大信息处理能力的计算机辅助人脑进行工作，不但可以使人们更好地掌握和利用细胞生命活动的规律和知识，创造人工生命，加速生命科学和信息科学的发展，改变人类生活和生存环境，而且必将成为医学、生物学、药学、营养学、生态、环境、农业等学科研究和产业领域中不可替代的工具。

目前世界上比较著名的有两种虚拟细胞：①E-CELL，一种原核细胞能量代谢的模型，是 Masura Tomita 于 1997 年领导的研究小组在日本 Keio 大学成功地建立的世界第一个虚拟细胞模型；②Virtual Cell，一种真核细胞钙转运的模型，是美国康涅狄格大学 Leslie M. Loew 和 James C. Schaff 领导的研究团队于 1999 年建立的。由于虚拟细胞的强大功能和应用前景，虚拟细胞模型如雨后春笋不断地被研究人员开发出来。

第九节 生物学网络的构建、分析与可视化

一、Cytoscape 简介

Cytoscape 是由美国西雅图系统生物学研究所开发并于 2002 年发布的开源软件，主要用于分子互作网络可视化和复杂网络分析。目前软件的最新版本是 3.5.1。Cytoscape 可以运行在各种操作系统平台上。官方网址：<http://cytoscape.org/>。

相比于其他网络可视化软件，Cytoscape 的优势体现在：操作丰

富，包含大量插件，支持多种格式的导入与导出，并且能良好支持生物数据专用的文件格式（如 SBML）。Cytoscape 在系统生物学领域的应用尤为突出，并且可以应用于生物学之外的领域，它还提供了官方 JavaScript 库用于网页开发。而同样有类似特性的软件包括 R 和 Gephi。但是它们相对于 Cytoscape，不足在于：R 主要面向统计计算，要进行网络分析和可视化，需要安装一些第三方的软件包，并且它完全由命令行输入代码操作，需要使用者有一定编程基础；而 Gephi 并非针对生物学网络开发的软件，相对于 Cytoscape 功能较少，开发成熟程度也较差。

相比之下，R 同样具有丰富的软件包和精细的图像导出预设，熟练使用后可以实现更加复杂的互作网络生成和分析，在学术研究领域也是比较好的选择；Gephi 更加轻便、简化，适合生物学互作关系网络研究的初学者，此外它具备更加美观的预设和内建的统计分析模块。

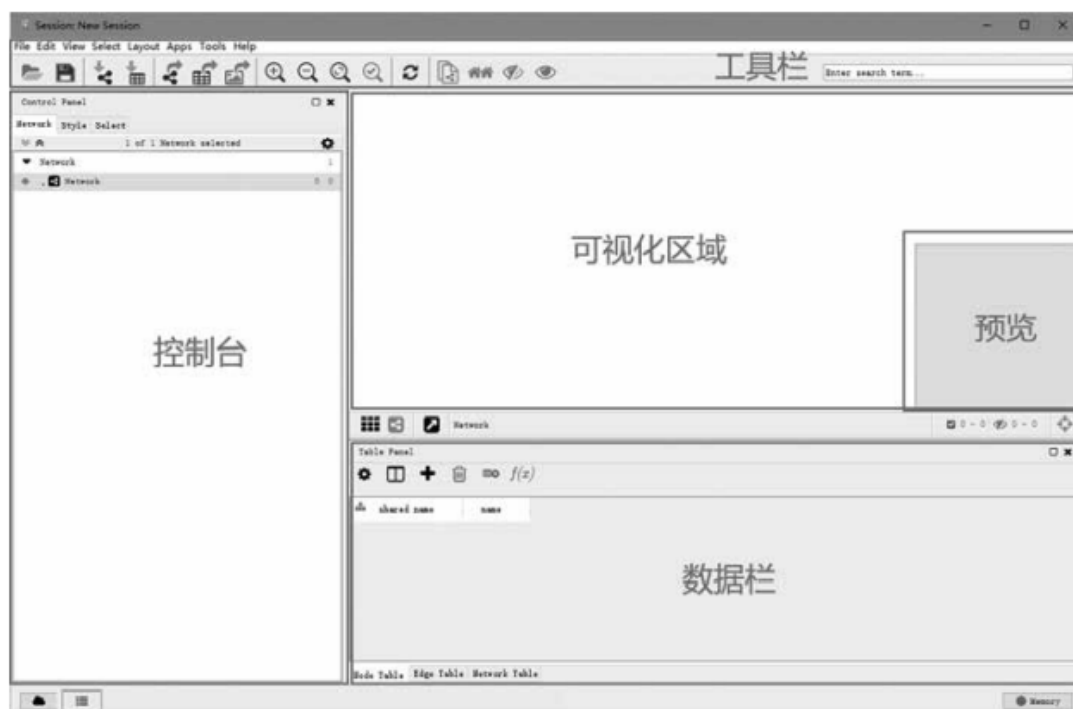
由于 Cytoscape 是开源软件，由核心开发团队和众多开发者共同开发维护，随着软件版本的更新，相信 Cytoscape 的功能会越来越丰富与强劲。

二、Cytoscape 基本操作

（一）认识界面

Cytoscape 在 2013 年发布 3.0 版本后，发生了较大的变化。以最新版本 3.5.1 为例，目前 Cytoscape 软件的界面更加模块化。界面顶端是菜单和工具栏，用于执行各种对网络和文件的操作。占据界面左侧的是控制台，可以管理、调整并筛选网络中的节点和连线。界面最突

出的区域是可视化区域，用于展示和移动网络可视化。可视化区域的下方是数据栏，以列表的形式展现网络中节点与连线的具体信息。



(二) 基本网络操作

1. 节点和连线的操作

在可视化区域右键点击唤出快捷菜单，实现节点和连线的创建（Add）。在可视化区域中可实现节点的移动（左键拖动），节点和连线的删除或剪切（Delete 键或 Ctrl+X），视图的放大缩小（鼠标滚轮）。

2. 节点和连线的样式改变

在可视化区域右键点击唤出快捷菜单，对选中节点和连线的样式进行单独设置。在控制面板的 Style 栏中实现网络全局、映射调整和对选中节点和连线的样式进行单独设置。

3. 网络分析

在菜单栏中选择 NetworkAnalyzer，运行网络分析，在数据栏生

成新的列展示网络节点和连线的具体属性，计算节点的度与连线的加权。

4. 子网络的构建

选择感兴趣的节点，使用菜单栏或工具栏的选项构建子网络，选择相应层级的邻接节点构建多层子网络。

（三）文件操作

1. 导入网络文件

通过菜单栏或工具栏导入文件，选择文件位置，选择数据格式和属性，导入网络视图。在导入网络的过程中，可以通过对话框与 Cytoscape 交互，调整输入数据的分隔格式。Cytoscape 对不同文件的格式有良好的适应性，可以导入用各种符号分隔的数据表。

2. 导入表格

通过菜单栏或工具栏导入表格文件，这些表格文件多为网络节点或连线的属性注释。选择文件位置，选择数据格式和属性，导入数据栏，用于后续操作。同样，也可以用与导入网络过程中类似的对话框与 Cytoscape 交互，调整输入数据的分隔格式。

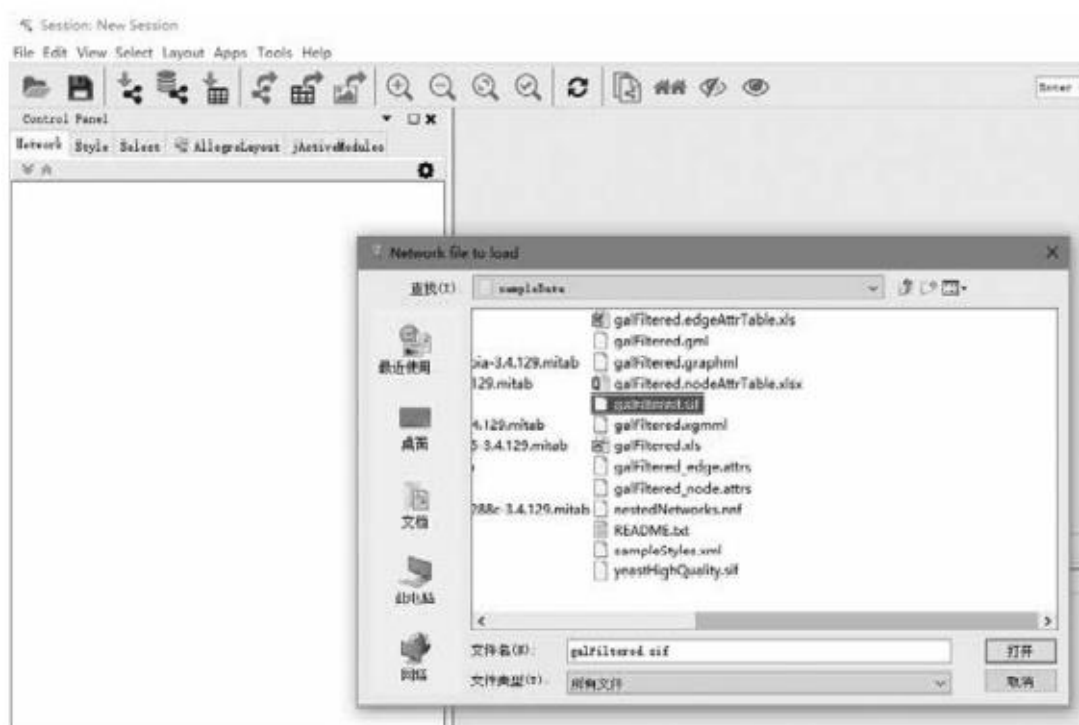
3. 导出网络图像

将所需导出的网络视图调整为适当大小，确保不超出可视化区域边缘。利用菜单栏或工具栏导出图像，选择文件导出位置和图像格式（支持 JPEG、PDF、PNG 等格式）。

三、Cytoscape 实现互作网络可视化

我们使用 Cytoscape 安装目录中的示例数据构建一个简单的蛋白

质互作网络。在 `sampleData/` 目录中找到 `galFiltered.sif`，在 Cytoscape 中使用“导入网络”操作。点击顺序为：`File`→`Import`→`Network`→`File`。观察数据栏可知该文件表示酵母蛋白的两两互作。

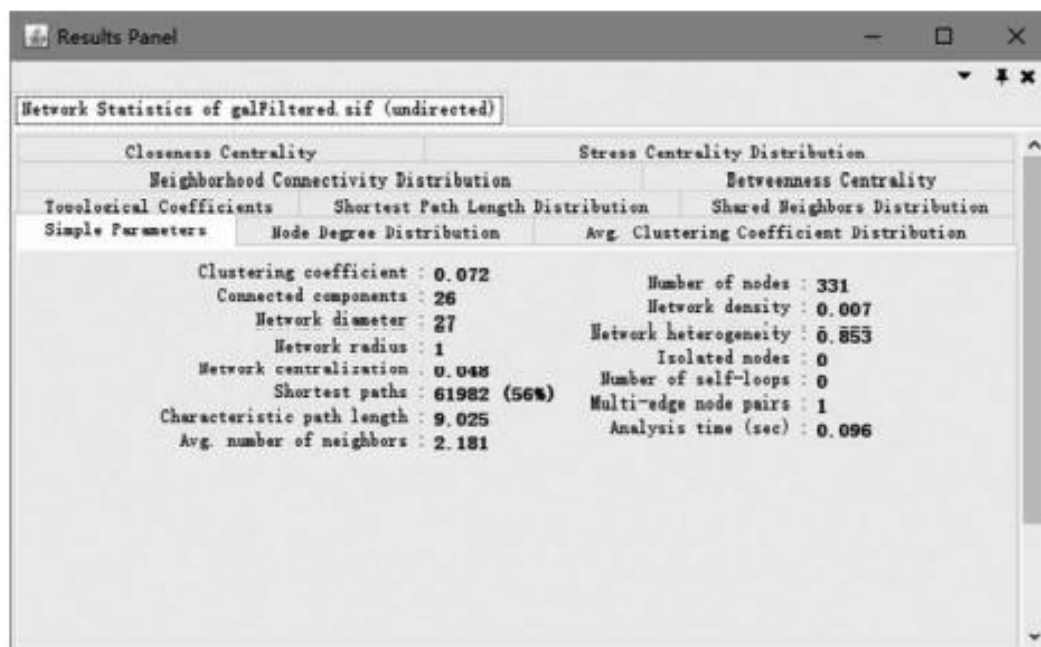


在可视化界面即可查看导入的网络，使用菜单栏的 `Layouts` 菜单调整网络布局。使用控制面板 `Style` 页面对网络的节点、连线及整体进行手动调整。

也可以使用“导入表格”操作加入附加表格文件，作为网络的属性，映射到对应的节点或连线上。在弹出的对话框中完成正确的映射后，观察 Cytoscape 下方数据栏，即可找到增加的节点或连线属性，可以根据此在控制面板的 `Style` 页面对网络的节点、连线及整体进行批量调整。

如果没有附加表格，也可以直接通过网络分析工具创建网络的基本统计属性。点击顺序为：`Tools`→`Network Analyzer`→`Network`

Analysis→Analyze Network。增加基本统计属性后也可以此为参数设置网络的 Style。

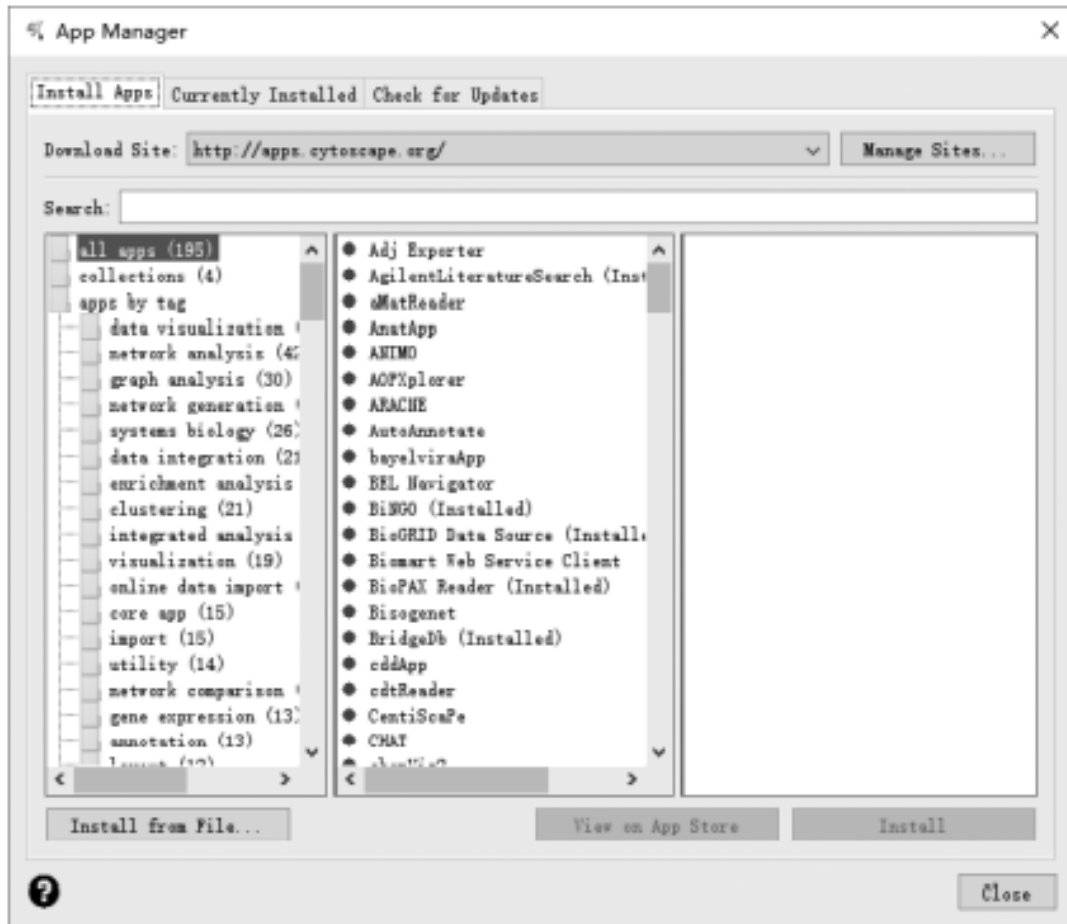


完成上述工作后，再手动对网络的节点位置进行微调，移开重叠的节点。也可以参照视频教程，结合<http://www.cls.zju.edu.cn/binfo/textbook/video/Cytoscape/>中的数据进行较大规模网络的构建。

四、 Cytoscape 插件

Cytoscape 具备丰富的插件支持。例如，用于 GO 富集分析的 BiNGO，以及用于文献挖掘的 AgilentLiteratureSearch。

可以在菜单中打开插件管理器，搜索所需的插件进行下载安装，也可以通过来自网络或其他位置的 jar 文件安装，安装后即可在菜单栏插件列表中点击运行。Cytoscape 在丰富的插件支持下，功能变得更加强大，也更受多个领域研究人员的青睐。



第十章 合成生物学

第一节 合成生物学

一、合成生物学的定义

合成生物学是指按照一定的规律和已有的知识, ①设计和建造新的生物零件、装置和系统; ②重新设计已有的天然生物系统为人类的特殊目的服务。

二、合成生物学的工程本质

合成生物学区别现有生物学其他学科的主要特点, 即“工程化”。合成生物学家力图通过工程化方法, 将复杂的人工生物系统合理简化、设计和重新构建, 用以探索人工生物系统的应用。

合成生物学的工程化研究涉及最关键的 3 个工程化概念: 对生物系统的标准化、解构和抽提。标准化包括建立生物功能的定义、建立识别生物部件的方法及标准生物部件的注册登记、构建具有统一接口(如统一的酶切位点等)的生物部件库等; 解构指将复杂系统分解成简单的要素, 在统一框架下分别设计; 抽提则包括建立装置和模块的层次, 允许不同层次间的分离和有限的信息交换、开发重设计和简化的装置与模块等。生物系统的层次化结构设计是合成生物学工程化本质的典型体现。具有一定功能的 DNA 序列组成最简单的生物部件(part), 不同功能的生物部件按照一定的逻辑和物理连接组成复杂的生物装置(device), 不同功能的 device 协同运作组成更加复杂的生物系统(system), 含有多种不同功能 system 的生物体彼此通讯、互相协调组成更复杂的多细胞生物系统。

1) 生物部件 (part): 基因线路中最简单、最基本的标准化模块称为生物部件。Part 是指具有特定功能的核苷酸、蛋白质或者 DNA 序列,能够通过标准化组装方法与其他 Part 组装成具有更复杂功能的模块。Part 按照其功能可以划分为终止子、蛋白质编码基因、报告基因、信号传递组件、引物组件、标记组件 (tag)、蛋白发生组件、转化器、启动子等类别。常用的转录调控 Part 主要有 LacI-Plac、cI-P1 及 TetR-Ptet 对等。

2) 生物装置 (device): 有了上述标准化的 Part, 就可以利用转录激活因子、转录抑制子、转录后机制 (如 DNA 修饰酶) 和 Riboregulator 等构建稍微复杂些的生物装置/设备。

3) 生物系统 (system): 为了得到更加复杂的调控行为, 可将装置按照串联、反馈或前馈等形式进行连接, 组成更加复杂的级联线路或者调控网络, 即所谓的生物系统。

三、合成生物学的研究内容

(一) 生物分子的合成与模块化

合成生物学的研究重心是具有截然不同于自然系统特性和功能的崭新生物系统的开发和工程化, 因此, 它离不开各种标准化生物分子的研制和开发, 这方面的研究主要包括以下几个部分。

1. 蛋白质的人工合成与模块化

合成生物学的某些设计, 需要功能新颖且相对独立、可以被自由组装的蛋白质模块, 对蛋白质的需求远比自然界能够提供的种类多得多。因此需要人工构建和开发崭新的标准蛋白质模块, 如人工设计多

锌指 DNA 结合蛋白等。

2. 核酸分子的人工合成

核酸分子的人工合成包括 DNA 和 RNA 序列的人工合成。合成基因可以用来重设计目标基因序列、编码区域或者调控重要信号（蛋白质初始化、核糖体结合位点、启动子等），为适应特殊宿主或模拟生物体而改变密码子用法等。而人工构建的具有特定功能的 Riboregulator 则可以实现翻译水平的调控。

（二）生物底盘的简化与模块化

各种人工构建的生物模块难免会被植入生物体中进行繁殖和培养。生物体自身的各种代谢通路、信号转导通路和各种内源噪声对于人工模块功能的执行无疑是一种干扰。同时，天然生物基因功能的多效性和冗余性也给各种模拟算法的有效应用带来了障碍。因此，许多合成生物学家致力于生物底盘的简化和模块化，力图净化宿主细胞的代谢内环境，其中尤以最小基因组^①和必需基因的研究成果最为显著。

（三）基因线路的设计与构建

20 世纪中期，F.Jacob 和 J.Monod 提出了调节基因表达的操纵子模型，F.Jacob 认为细胞的行为是通过目的性的调控实现的，而他的这一思想被认为是合成生物学的主要研究内容之一——“基因线路”的雏形。

遗传线路（genetic circuit），俗称“基因线路”（genecircuit），在合成生物学中是指由各种调节元件和被调节的基因组合成的遗传装置（genetic device），在给定条件下可调、可定时定量地表达基因产物。

（四）合成代谢网络

目前合成代谢网络主要是利用转录和翻译控制单元调控酶的表达以合成或分解代谢物。此类系统中主要是以代谢物浓度作为控制元件的输入。

（五）多细胞系统研究

基于细胞间交流的多细胞系统的开发，主要是研究多细胞间的同步基因表达、信号交流、异步功能配合等。利用人工构建的群体效应机制，目前研究者已经开发了许多具有崭新功能的细胞系统，如能够达到高细胞浓度的双稳态开关系统等。

（六）数学模拟和功能预测

考虑到构建实际系统的高成本和耗时性，利用计算模型的辅助，通过各种数学工具抽提模拟单元的动力学特性和网络连通性，提供系统变量的描述等则是为实验提供预测信息、指导实验优化、降低实验成本的主要方法。

四、合成生物学引发的思考

概括而言，合成生物学被科学家、非政府组织和媒体所广泛关注的道德、社会、法律方面相关的问题大体可归结为：伦理道德规范、对环境无控制的排放、生物恐怖主义、生物垄断及人工生物体的创造等。

所幸的是，合成生物学界从未对合成生物可能对人类造成的威胁避而不谈，相反，相应的道德规范和防范措施已经成为所有国际会议的主要议题之一，几乎任何一篇对于合成生物学的综述都指出需要道德规范的探讨、国际调控和付诸实际的行动。第二届合成生物学国际

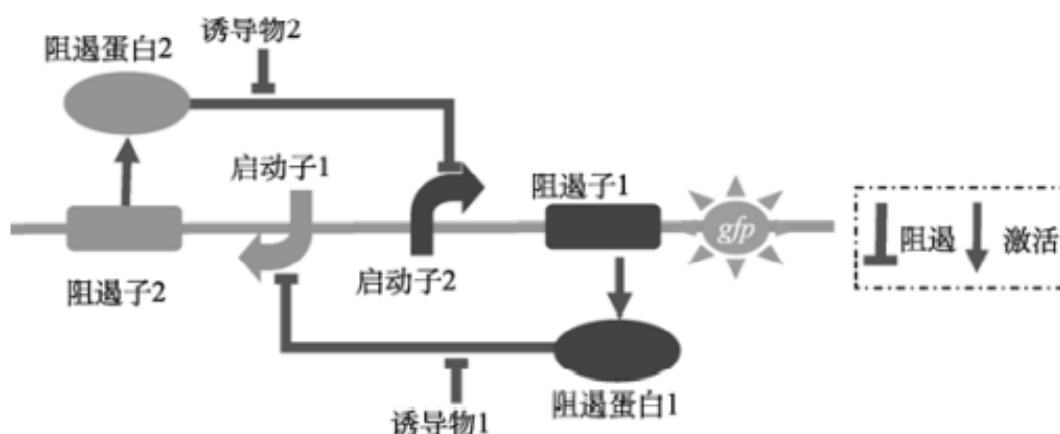
会议也已经发表宣言支持科学界采用维护人类安全行为的策略。可以预见，未来合成生物学仍然会在人类激烈的争论中继续前进。

第二节 合成生物学基础研究经典实例

一、在大肠杆菌中构建双稳态开关

(一) 基因线路设计

下图中有两种不同的启动子，启动子 1 和启动子 2 分别控制着阻遏子 2 和阻遏子 1 基因序列的表达状态；阻遏子 2 和阻遏子 1 基因表达的产物会分别阻遏启动子 2 和启动子 1 的启动。阻遏子 2 下游报告基因的表达产物可以作为输出信号表征系统当前所处的状态。由于上下游基因的启动和相互阻遏，整个系统共有两种稳定的输出状态。①状态 A：启动子 1 启动而启动子 2 关闭的状态，此时，启动子 2 下游的报告基因无法开启，系统无特定的输出产物；②状态 B：启动子 2 启动而启动子 1 被关闭的状态，此时，启动子 2 下游的报告基因同时被开启，可以检测到报告基因的产物。



系统的两个外部输入信号——诱导子 1 和诱导子 2 加入可以实现系统在两种状态之间的转换，是人工控制状态切换的手段。当系统

稳定于 A 状态时，通过加入诱导子 2，可以解除阻遏子 2 对启动子 2 的阻遏作用，使得阻遏子 1 表达，阻遏启动子 1，终止阻遏子 2 的表达，一段时间以后系统从 A 状态翻转至 B 状态，即使解除诱导子 2 的输入，系统依然会稳定于状态 B。同理，加入诱导子 1 作用一段时间，也可以使系统从状态 B 切换到状态 A。如果将诱导子 1 和诱导子 2 的加入看做是对开关的“拨动”，那么每次拨动，系统就会稳定于相应的状态，而不需要其他外界信号来维持。

（二）基因线路实现

为了实现上述设计的基因线路逻辑功能，必须选择恰当的基因功能模块。作者共选取了 3 种启动子-阻遏子-诱导子方案。

（三）数学模型建立

为了更好地研究双稳态开关系统的性状，预测和指导实验，Collins 等建立了数学模型模拟系统的行为。

（四）功能检测

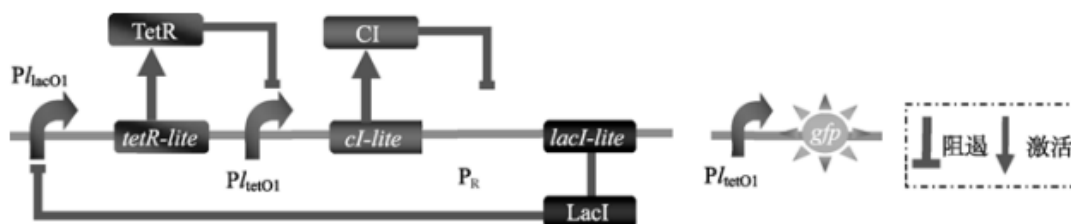
所有的双稳态开关都被转入大肠杆菌 JM2.300 菌种中验证其功能。6 种双稳态开关（4 种 pTAK 载体及 2 种 pIKE 载体的双稳态开关）。

二、构建 Repressilator 基因振荡器

如果将 3 个表达产物相互阻遏的基因模块串联成一个环状结构，利用基因模块间的彼此阻遏和解阻遏即可实现振荡器的功能，这就是 Elowitz 等构建的首例基因振荡器。该振荡环实现了在没有外加输入作用下，生物系统中基因表达按照特定周期变化的功能。

(一) 基因线路设计

由 Elowitz 等设计完成的 Repressilator 的基因线路如下图所示。



上述振荡器的状态转换可具体表述如下。当 P_{lacO1} 启动子启动时，产生的 TetR-lite 蛋白会阻遏下游 P_{tetO1} 启动子，CI-lite 蛋白无法产生， P_R 启动子的阻遏被解除， P_R 下游的基因顺利表达，产生 LacI-lite 蛋白并阻遏下游 P_{lacO1} 启动子， P_{lacO1} 启动子的状态从“开启”转换为“关闭”，下游基因停止产生 TetR-lite 蛋白， P_{lacO1} 启动子的阻遏被解除，状态由“关闭”转换为“开启”，下游基因产生 CI-lite 蛋白去阻遏 P_R 启动子，导致 P_R 启动子的状态从“开启”转换为“关闭”； P_R 启动子的被阻遏使得 LacI-lite 蛋白无法继续产生， P_{lacO1} 启动子的阻遏被消除，其状态由“关闭”翻转为“开启”，下游基因表达 TetR-lite 蛋白阻遏 P_{tetO1} 启动子。如此往复，实现整个振荡器周而复始的状态转换。

作为输出信号，荧光蛋白的表达量可以表征系统的状态。当系统状态在 3 个阻遏基因顺序开启的过程中振荡的时候，TetR 蛋白的浓度也会发生振荡，其对启动子 P_{lacO1} 阻遏作用的强弱出现相应的振荡，导致下游绿色荧光蛋白（GFP）的表达量也随着 TetR 浓度的变化而变化，即随着 Repressilator 的周期变化而变化。

(二) 功能检测

从下图中可以看到，细胞的荧光值按照大约 150min 的周期进行

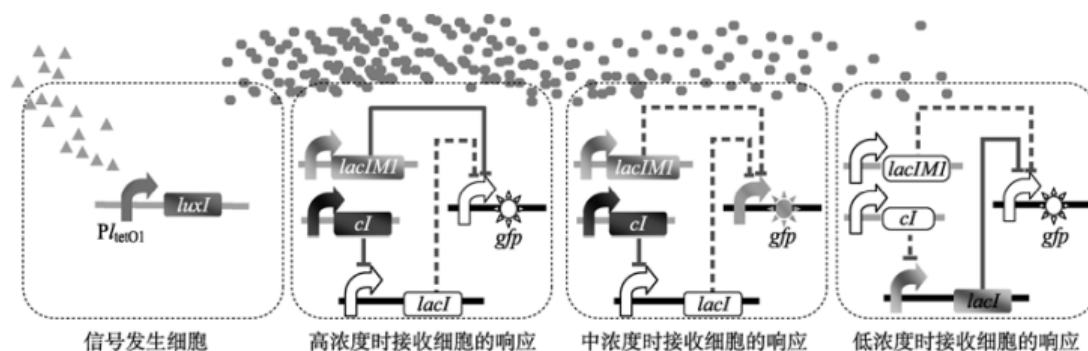
振荡，统计得到细胞振荡的平均周期为 (160 ± 40) min，不同于细胞分裂的周期。由于荧光蛋白的降解周期大于振荡器的振荡周期，荧光蛋白还未完全降解时系统即进入下一振荡循环，因此系统的荧光值呈现振荡上升趋势。

三、逻辑门功能基因线路

逻辑门功能基因线路的构建方式还有很多种，已有的文献和成功实例也很多，随着合成生物学的飞速发展，逻辑门已经成为了基因线路中最为基础的部件之一。

四、人工多细胞图案系统

为了深入研究和模拟信号分子的介导机制，Basu 等设计了可以在中心细胞一定范围内形成发光带的人工多细胞图案系统。下图为发光带系统基因线路图。

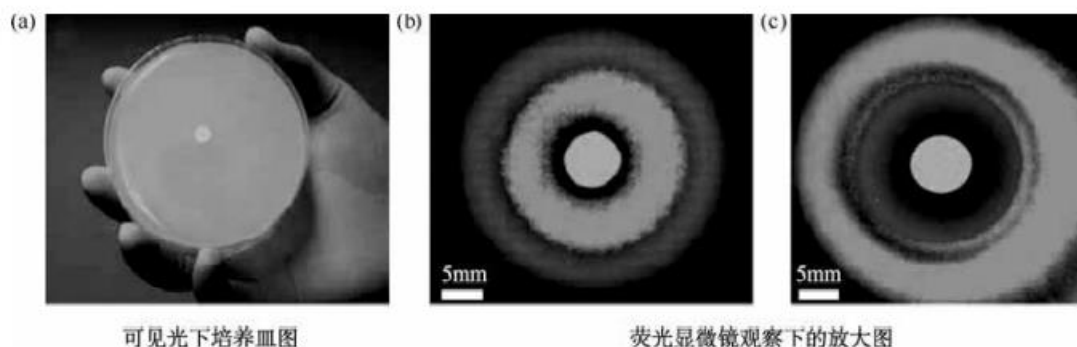


信号发生器细胞在接收到外界信号以后，开启 *luxI* 基因表达，催化信号分子 AHL 的生成。这种信号分子可以穿越细胞膜扩散到环境中。由于扩散形成的浓度梯度，距离发生器越远的地方，AHL 信号分子的浓度越低。

信号接收器细胞表达 LuxR 蛋白，这种蛋白质能与 AHL 信号分

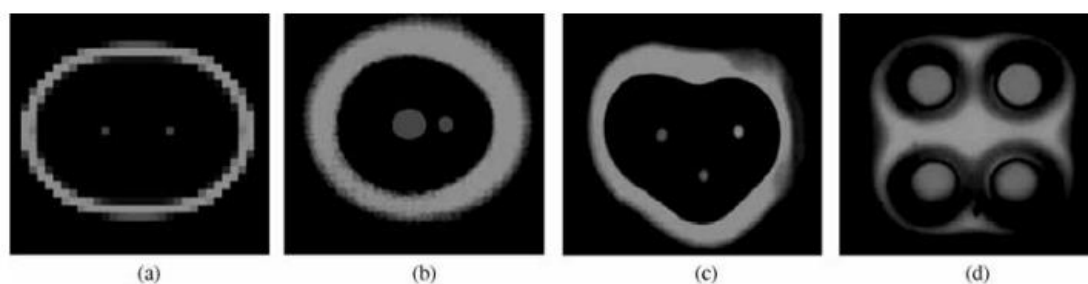
子结合，开启下游 λ 噬菌体 cI 基因和修饰过的乳糖操纵子 lacIM1 基因的表达。当接收器距离发生器细胞过近时，由于 AHL 信号分子浓度较高，导致 CI 蛋白和 LacIM1 蛋白过量表达，LacIM1 蛋白阻遏荧光蛋白的启动子，此区域内无荧光蛋白产生。相反，当接收器距离发生器过远时，由于信号分子过少，CI 蛋白和 LacIM1 蛋白都只有极少量表达，无法阻遏下游基因，野生型的 lacI 基因顺利表达，其产生的 LacI 蛋白阻遏荧光蛋白的表达，此区域内仍无荧光蛋白产生。只有当接收器离发生器距离适当的时候，适量的信号分子浓度引起适量的 CI 蛋白和 LacIM1 蛋白的表达，由于 CI 对于下游启动子的阻遏作用明显比 LacIM1 要强烈，所以野生型 lacI 基因基本不能表达，同时，lacIM1 基因表达的量也不足以阻遏下游荧光蛋白的表达，因此会在这个特定区域内形成环状荧光带。

如果在不同响应阈值的接收细胞中接入不同颜色的荧光蛋白并按设定顺序涂抹在琼脂固体培养基上，则可得如下图所示的实验结果。其中，下图 (a) 为可见光下的培养皿图，图 10-10 (b) 和图 10-10 (c) 为在荧光显微镜观察下的放大图。



如果在多个区域同时放置信号发生细胞，就可以形成如下图中多

种不同形状的颜色区域。下图中 (a) 为有 2 个信号发生器区域的实验结果图；下图中 (b) 为有 2 个信号发生器区域的浓度不一致时的实验结果图，左侧浓度高的信号发生器区域相应的环状荧光带的半径要大些；下图中 (c) 为有 3 个信号发生器区域的实验结果图；下图中 (d) 为有 4 个高浓度信号发生器区域的实验结果图。



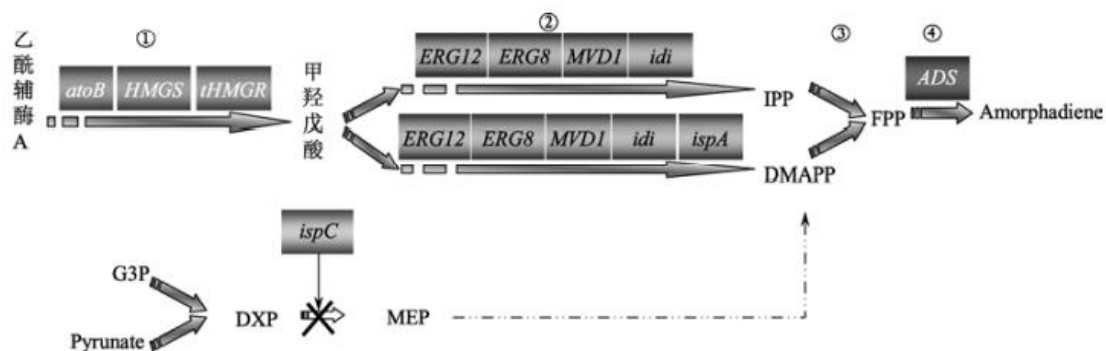
第三节 合成生物学应用研究经典实例

一、合成青蒿素的微生物工厂

疟疾是发生最频繁的人类寄生虫病，对于全球卫生事业的冲击仅次于结核病，每年在全球约有 5 亿宗病例，导致超过 100 万人死亡。世界卫生组织曾指出疟疾平均每 30s 杀死一个 5 岁以下的儿童。由于疟原虫快速产生的抗药性，许多广为人知的高效抗疟药物氯喹 (chloroquine)、奎宁 (quinine, 又称为金鸡纳霜) 和甲氟喹 (mefloquine) 等都已经基本失效，在某些地方，甚至发现有的疟原虫对目前所有价格低廉的一线药物都有交叉抗药性。为此，全世界范围内掀起了研制新型抗疟疾药物的热潮。继氯喹、奎宁、甲氟喹等药物之后，主要来源为植物提取的青蒿素是目前最有效的抗疟特效药。

Keasling 和他的研究小组首先在大肠杆菌中设计了一条合成青蒿素前体紫穗槐二烯 (Amorphadiene) 的生物合成途径，整条生物合

成途径共分为以下几步。①将大肠杆菌中常见的化学物质乙酰辅酶 A 转变成甲羟戊酸；②将甲羟戊酸转化成焦磷酸异戊酯（IPP）或二甲（基）丙烯焦磷酸酯（DMAPP）；③将 IPP 或者 DMAPP 转化成法尼基环焦磷酸酯（FPP）；④利用 ADS 基因编码的产物，将 FPP 转化成 Amorphadiene。IPP 和 DMAPP 是所有类异戊二烯的通用前体物，只要再引入恰当的催化酶基因，Keasling 等开发的新菌株就可作为其他类异戊二烯化合物的生物合成平台。由此可见，这项研究成果具有极其巨大的应用潜力。



他们的工作大概可以分为以下几部分。

1) 净化大肠杆菌的代谢内环境。Keasling 等引入了 *ispC* 基因，利用其产物将大肠杆菌原有的 DXP 途径切断，从而斩断所有未知因素对于 DXP 途径生物合成 IPP 和 DMAPP 的影响，净化大肠杆菌的代谢内环境。

2) 合成和优化编码 Amorphadiene 合酶的基因 ADS。为了克服在原核生物中实现植物基因的表达这一困难，提高萜类合酶和 Amorphadiene 的表达量，Keasling 课题组合成和优化了 ADS 基因，使其在大肠杆菌中大量表达。通过合酶的高表达，克服微生物萜类合

成的瓶颈。

3) 将酿酒酵母中的甲羟戊酸途径转入大肠杆菌。为了提高细胞内 FPP 的浓度, 将酿酒酵母中编码甲羟戊酸途径的 8 个基因做成操纵子转入大肠杆菌中并使其表达。同时为简化操作的复杂性, 将这 8 个基因分成两类操纵子, 上游操纵子通过三步酶促反应将普遍存在的前体物乙酰辅酶 A 转化成为甲羟戊酸; 下游操纵子将甲羟戊酸转化成为 IPP 和 (或) DMAPP。

4) 平衡和优化合成途径。人工构建的合成 Amorphadiene 多步反应的许多中间产物 (包括 IPP), 在高浓度时可导致菌体中毒。因此, 必须协调 IPP 有关的基因以平衡其合成与消耗, 确保在其能够杀伤大肠杆菌以前及时转化为 Amorphadiene。

2006 年, 在此项成果的基础上, 研究人员修改了他们的最初方案, 将酿酒酵母菌引入这项研究中来。利用工业酿酒酵母中工程化的甲羟戊酸途径、取自黄花蒿的 Amorphadiene 合酶和细胞色素 P450 氧化还原酶 (cytochromeP450monooxygenase, CYP71AV1) 共同作用来生产高浓度更直接的青蒿素前体衍生物——青蒿酸。

相比于常规的青蒿植物提取, 4.5%干重的酵母能够生产 1.9%的青蒿酸和 0.16%的青蒿素, 耗时仅 4~5 天, 而植物提取却要几个月。此外, 相比于植物提取青蒿素, 微生物合成青蒿酸的方法不会受到诸如气候等因素的影响, 制造出的青蒿素比从青蒿中提取的青蒿素纯度更高, 且更加可靠和廉价。此外, 这种新改良的大肠杆菌和酵母菌还可被改造用来生产其他类异戊二烯类化学物质。任何一家公司均可以

对这些工程菌做相应的改造，加入一定数量的与目标产物合成有关的基因，即可得到任何一种类异戊二烯物质，用于其他疾病的治疗和其他物质的生产。由此可见，Keasling 等的研究成果无疑是合成生物学在实际应用方面的一个里程碑，被评为当年的“世界十大科技进展”之一。

二、大肠杆菌成像系统

Voigt 课题组开发的这种微生物成像系统包含一种人工合成感应激酶，使大肠杆菌菌落能够发挥生物胶片的功能，通过光照产生分辨率高达 100 兆像素/平方英寸的二维化学图像。不仅如此，这种对于微生物基因表达的空间调控，能够“印制”出复杂的生物元素，可用于研究微生物特定空间和时间控制下磷酸化步骤的信号转导途径等多种复杂的代谢通路。为此，年仅 30 岁的助理教授 Voigt 被 MIT 的《技术评论》杂志授予 2006 年 35 岁以下 35 名 (TR35) 重大技术创新奖。

Voigt 课题组的“大肠杆菌成像系统”主要包括 3 个主要部分。

1. 光感应器

大肠杆菌本身并没有感光系统，无法对光照刺激作出响应。因此，研究者将取自集胞藻 (Synechocystis) 的藻胆青素 (phycocyanobilin, PCB) 合成基因 (ho1 和 pcyA) 构建在质粒上转入大肠杆菌，这两个基因表达的产物能够将血红素转化为藻胆青素 (藻胆青素是藻胆蛋白光敏色素的生色团，能够接受光照刺激)。有了含有这两个基因的质粒的帮助，大肠杆菌就有了能够感受光照刺激的 PCB，也就具有了感受光照刺激的功能。

2. 应答调节器

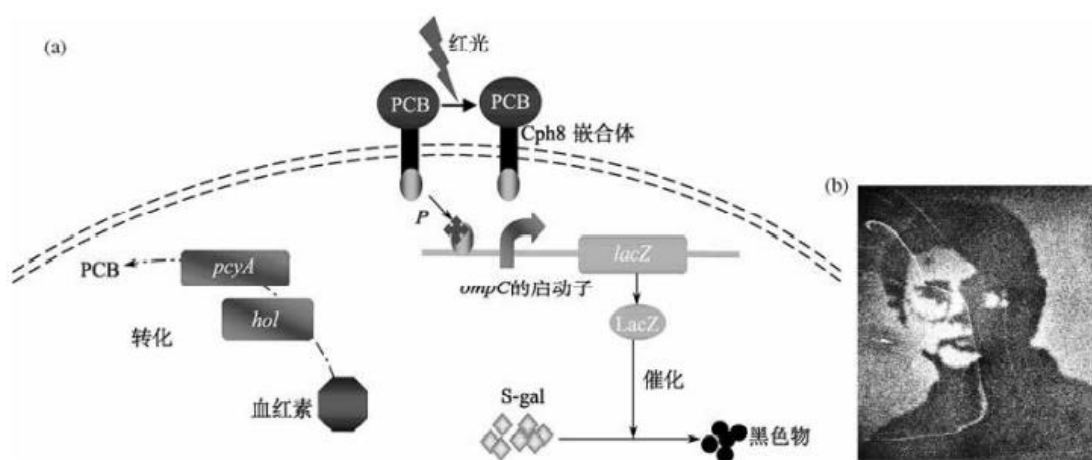
除了感受光照刺激, 还需构建应答调节器以便执行基因表达调控的功能。大肠杆菌中的“渗透压感应器”EnvZ-OmpR 双组分系统能够调节孔蛋白 (porin) 作为对渗透压刺激响应。EnvZ-OmpR 系统由 EnvZ 和 OmpR 两种蛋白质组成, 前者是一种组氨酸激酶, 在高渗环境下能发生自身磷酸化, 起感应器的作用; 后者是反应调节子, 含有天冬氨酸残基, 能接受来自 EnvZ 的磷而被磷酸化, 磷酸化的 OmpR 可作为转录因子而将来自 EnvZ 的信号输出, 对 ompC 基因的启动子进行调控。研究者通过特殊的处理手段将 EnvZ-OmpR 双组分系统与光敏色素脱辅基蛋白 Cph 进行交联, 组成 Cph-EnvZ 嵌合体光感应系统, 并优化其连接肽链的长度, 挑选出响应最强烈的 Cph8 嵌合体作为最终实际应用的感应系统。

3. 成像器

为了使这个感光系统产生“可视化”的图像效果, 研究人员选用了特殊的大肠杆菌菌种, 同时引入了 lacZ 基因。将 lacZ 基因与大肠杆菌染色体上的 ompC 基因做成融合基因, 由 OmpR 蛋白控制这个融合基因的表达。lacZ 基因编码的 LacZ 蛋白能够催化 S-gal (一种稳定的可溶于水的 DNA 染色剂) 产生黑色化合物。

由此, 整个成像系统的所有部分构建完成, 如下图 (a) 所示。当有外界光照刺激时, 感光蛋白接受光照刺激并阻遏 EnvZ 蛋白的自磷酸化过程, EnvZ 蛋白通过使 OmpR 蛋白也无法磷酸化, 从而将 ompC 基因的启动子关闭, 作为融合基因的 lacZ 基因也无法表达, 此区域

中无黑色化合物产生；相反，无光照的区域，EnvZ 的自磷酸化过程顺利进行，通过 OmpR 蛋白的磷酸化开启 *ompC* 基因的启动子，*lacZ* 基因顺利表达，编码的 LacZ 蛋白催化事先加入培养基中的 S-gal 染色剂产生黑色化合物，此区域为黑色。由此可见，有光照的区域为菌落原有的颜色，无光照的区域呈现黑色，随着照射在菌落上光照区域形状的不同，培养基会呈现不同的图像，如下图（b）所示。



第十一章 分子进化与系统发育

第一节 分子进化与系统发育

一、分子水平的进化

分子水平的进化主要是指在生物进化过程中，构成生物体的大分子物质，如蛋白质、核酸的演变过程。由于分子生物学的迅猛发展，许多生物大分子的结构已经基本了解。在对某些同源蛋白质（或核酸）进行比较时，发现不同生物间同源蛋白质（或核酸）在结构上存在差异。分子进化是发生在生物分子层次上的进化，是生物进化层次中最基础层次上的进化。在分子水平上，进化过程涉及在 DNA 中发生插入、缺失、倒位、替换等变异。如果发生变异的 DNA 片段编码某种多肽，那么这类变异就可能使多肽链中的氨基酸序列发生变化。

（一）分子进化的特点

生物进化过程中生物大分子的演变，包括前生命物质的演变、蛋白质分子和核酸分子的演变，以及细胞器和遗传机构（如遗传密码）的演变。分子进化的研究可以为生物进化过程提供佐证，为深入研究进化机制提供重要依据。在生物大分子的层次上来观察进化改变时，看到的是一个非常不同于表型进化的过程。分子进化有两个显著特点，即进化速率的相对恒定性和进化的保守性。

1. 生物大分子进化速率相对恒定

研究发现，以核酸和蛋白质一级结构分子序列中的核苷酸或氨基酸的替换数作为进化改变量，进化时间以年为单位，生物大分子随时间的改变（即分子进化速率）几乎是恒定的。

2. 生物大分子进化的保守性

生物大分子进化的保守性是指功能上重要的大分子或大分子的局部在进化速率上明显低于那些功能上不重要的大分子或大分子局部。

(二) 分子进化的中性学说

20 世纪 60 年代以后，随着分子生物学和分子遗传学的发展，许多生物大分子的一级结构逐渐清晰，使得估计进化过程中 DNA 和氨基酸等分子替换的速率及遗传变异模式成为可能。通过比较不同生物的某些功能相同的蛋白质或核酸的氨基酸或核苷酸序列的差异，人们发现，亲缘关系近的差异较小，亲缘关系远的差异较大，与物种的表型进化情况基本一致。人们又陆续发现蛋白质中氨基酸的置换是随机而非模式性的；DNA 在哺乳动物种系的总变异速率远远高于形态上的变异速率，并远远超出人们预期的大约 0.5 核苷酸/（基因组·年）；蛋白质电泳表明物种内存在大量的变异，即广泛的种内多态性，且这些多态性并无可见的表型效应，与环境条件亦无明显相关。以上这些都是新达尔文主义与综合进化理论所难以解释的。

Kimura（1968）根据核酸、蛋白质中的核苷酸及氨基酸的置换速率，以及这些置换所造成的核酸及蛋白质分子的改变并不影响生物大分子的功能等事实，提出了分子进化中性学说。分子进化的中性学说认为多数或绝大多数突变都是中性或近中性的，即无所谓有利或不利，自然选择对它们不起作用，因此对于这些中性突变不会发生自然选择与适者生存的情况。生物的进化主要是中性突变在自然群体中进行随

机的“遗传漂变”的结果，而与选择无关，这些突变全靠一代又一代的随机漂变而被保存或趋于消失，从而形成分子水平上的进化性变化或种内变异。King 和 Jukes (1969) 用大量的分子生物学资料进一步充实了这一学说。

中性学说揭示了分子进化的基本规律，是解释生物大分子进化现象的重要理论。中性学说强调遗传漂变和突变压在分子进化中的作用，是对综合进化论的重要补充和修正。中性学说一方面承认自然选择在表型进化中的作用，另一方面又强调分子水平上进化现象的特殊性。

(三) 基因组计划与分子进化

人类基因组计划 (HGP) 由美国科学家于 1985 年率先提出，于 1990 年正式启动。美国、英国、法国、德国、日本和中国科学家共同参与了这一耗资达 30 亿美元的基因组测序计划。人类基因组计划最主要的目的是测出人类基因组 DNA 的 30 亿碱基对的序列，发现所有人类基因，找出它们在染色体上的位置，破译人类全部遗传信息，解码生命，了解生命的起源，了解生命体生长发育的规律，认识种属之间和个体之间存在差异的起因，认识疾病产生的机制，以及长寿与衰老等生命现象，从而为疾病的诊治提供科学依据。

基因组计划已经基本完成，人类已经进入“后基因组学” (post-genomics) 时代。当前，基因组学研究重心已开始从揭示生命的所有遗传信息转移到在分子整体水平上对基因功能的研究，这种转向的一个标志是产生了功能基因组学这一新学科。随着生物学技术和计算技术的发展，逐渐形成了一种新的全局方法——基因组表达图谱 (转录

分析,如在 mRNA 水平上通过 DNA 芯片技术检测大量基因的表达模式)和大规模蛋白质图谱(蛋白组分析)方法。在使用全局方法进行研究时,研究人员同时检测大量基因的表达水平,从而在整体水平上获得关于基因功能及基因之间相互作用的信息,通过对不同物种、不同进化水平的生物的相关基因之间进行比较分析,揭示基因在生命系统中的地位和作用,解释整个生命系统的组成和作用方式。

(四)研究分子进化的意义

生命的起源和发展需要经过两个过程。第一个过程是生命起源的化学进化过程(发生在地球形成后的 10 多亿年之间),即由非生命物质经过一系列复杂的变化,逐步变成原始生命的过程。第二个过程是生物进化过程(发生在 30 亿年以前原始生命产生到现在),即由原始生命继续演化,从简单到复杂,从低等到高等,从水生到陆生,经过漫长的过程直到发展为现今丰富多彩的生物界,并且继续发展变化的过程。在长期的自然选择过程中,微小的有利变异得到积累变为显著变异,从而产生了适应特定环境的生物新类型,这就是生物进化的原因。而以核酸和蛋白质为代表的生物大分子,在生物进化过程中起到“参与者”与“见证者”的作用;通过研究核酸和蛋白质这些生物大分子在物种间的变异速率,探讨进化过程,对研究生命起源具有重要意义。

二、分子系统发育分析的基本概念

(一) 分子系统发育树的基本概念

从生物大分子的信息推断生物进化的历史,或者说“重塑”系统发生(谱系)关系,是分子系统学的任务。假如生物大分子进化速率是

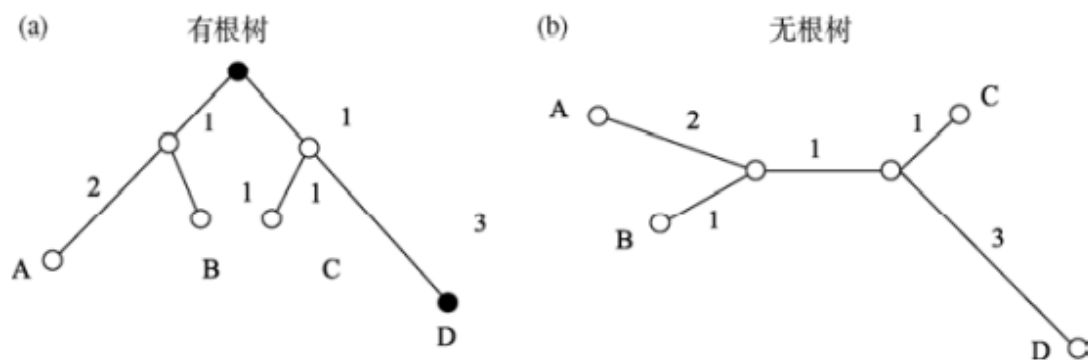
相对恒定的，那么大分子进化改变的量只与大分子进化所经历的时间呈正相关。如果我们将不同种类生物的同源大分子的一级结构作比较（假定这些大分子的结构顺序已知），其差异量（氨基酸或核苷酸替换数）只与所比较的生物由共同祖先分异以后所经历的独立进化的时间成正比。用这个差异量来确定所比较的生物种类在进化中的地位，并由此建立系统树，称为分子系统树。建立分子系统树的理论前提是生物大分子进化速率相对恒定。

在研究生物进化和系统分类中，常用一种类似树状分支的图形来概括各种（类）生物之间的亲缘关系，这种树状分支的图形称为系统发育树。通过比较生物大分子序列差异的数值构建的系统树称为分子系统树。分支的末端和分支的联结点称为结（node），代表生物类群，分支末端的结表示仍生存的种类。系统树可能有时间比例，或者用两个结之间的分枝长度变化来表示分子序列的差异数值。

（二） 有根树和无根树

系统发育树可分为有根树和无根树两类。下图（a）所示的是一棵有根树，而下图（b）显示的是一棵无根树，图中的 A、B、C、D 为所研究的分类单元。有根树是具有方向的树，包含唯一的节点，将其作为树中所有物种的最近共同祖先。最常用的确定树根的方法是使用一个或多个无可争议的同源物种作为“外群”（outgroup），这个外群要足够近，以提供足够的信息，但又不能太近，以致不能和树中的种类相混。把有根树去掉根即成为无根树。所谓“无根”，是指树系中代表时间上最早的部位（最早的共同祖先）不能确定，只反映分类单元之

间的距离而不涉及谁是谁的祖先的问题。一棵无根树在没有其他信息（外群）或假设（如假设最大枝长为根）时不能确定其树根。无根树是没有方向的，其中线段的两个演化方向都有可能。树系的末端代表现代生存的物种，称为顶结，也称为外结或顶端；树内的分支点叫内结；两结之间的连接部分称为分枝或枝，也可称之为节或连接。达到并终止于顶结的枝叫周枝，未达到顶结的其他的枝称为内枝。系统发育树的枝长表示进化距离的差异，通常进化树的标尺代表了每 1000 个核酸或蛋白质分子中的突变速率。



在一个无根的双分叉（每个内结有 3 个分枝）的树系中，假如顶结数目为 N ，那么内结数目为 $N-2$ ，分枝（节）的数目为 $2N-3$ （其中内枝数目为 $N-3$ ，周枝数目为 N ）。

（三） 物种树和基因/蛋白树

基于单个同源基因差异构建的系统发生树称为基因树（genetree）比称为物种树（speciestree）更为合理，因为这种树代表的仅仅是单个基因的进化历史，而不是它所在物种的进化历史。物种树最好通过综合多个基因数据的分析结果而产生。

构建分子系统树，是在进行序列测定获得原始序列资料后，由计

计算机排序，使各分子的序列同源位点一一对应，然后计算相似性或进化距离。在此基础上，使用适当的计算机软件根据各生物分子序列的相似性或进化距离构建系统树。

第二节 分子系统发育树的构建方法

利用生物大分子数据重建系统进化树，目前最常用的有 4 种方法，即距离法、最大简约法、最大似然法和贝叶斯法。其中，最大简约法主要适用于序列相似性很高的情况；距离法在序列具有比较高的相似性时适用；最大似然法和贝叶斯法可用于任何相关的数据序列集合。从计算速度来看，距离法的计算速度最快，其次是最大简约法和贝叶斯法，然后是最大似然法。

一、基于距离的系统发育树构建方法

基于距离的系统发育树构建方法的基本思路是：首先获取分类群间进化距离的度量，然后再依据距离度量来重建一棵系统发育树，并使得该树能最好地反映已知序列之间的距离。这类方法有非加权分组平均法（UPGAM）、Fitch-Margoliash 法（FM）、最小进化法（ME）、最小二乘法（LS）和邻接法（NJ）等。在此，我们仅介绍非加权分组平均法、最小二乘法和邻接法的计算方法。

（一）非加权分组平均法

在所有的基于距离的系统发育树的重建方法中，非加权分组平均法(UPGMA)是最简单的一种方法。这种方法最早由 Sokal 和 Michener (1958) 提出，并经过 Sneath 和 Sokal (1973) 的改良而最终形成的。

UPGMA 的基本思想是首先通过两两比对，计算出遗传距离；然后对

遗传距离进行合并，重新计算出遗传距离，并将其作为进化树的分枝长度；最后根据分枝长度绘制进化树。UPGMA 主要适用于在基因替代速率恒定时，尤其是用基因频率数据来构建分子系统发育树时。该方法是建立在沿着树的所有分支的突变率相等的假设之上的，因此在不同分支间进化速率有较大差异或有同源序列的平行进化时常得出错误的拓扑结构。

（二） 最小二乘法

如果进化谱系间的核苷酸替代速率不同，利用 UPGMA 法常常会给出错误的拓扑结构。在这种情况下，应该使用一些能容许各个分支核苷酸替代速率有所不同的方法，最小二乘 (LS) 法便是这样一种方法。

最小二乘法的基本思想是将成对距离矩阵作为给定数据，通过匹配那些尽可能近的距离来估计一棵树上的枝长，即对给定的和预测的距离差数的平方和最小化。预测距离是沿连接两个物种的通路的枝长总和计算的。距离差数平方和的最小值是树与距离相拟合的测度，它可以用作树的分值。

（三） 邻接法

邻接法 (NJ) 也是一种利用距离进行分子系统发育分析的方法，它由 Saitou 和 Nei 在 1987 年首先提出。在构建系统发育树时，由于该方法取消了非加权分组平均法关于分子钟速率相等的假设，所以该方法在进化分支上允许发生趋异的次数可以不同，该方法通过确定距离最近（或相邻）的成对分类单元来使系统树的总长度尽可能达到最

小。与非加权分组平均法相比，邻接法在算法上相对复杂，它跟踪的是树上的节点而不是分类单元。

二、最大简约法

最大简约法是一种常用的系统发生学分析的方法，根据离散性状 [包括形态学性状和分子序列 (DNA 和蛋白质等)] 的变异程度，构建生物的系统发育树，并分析生物物种之间的演化关系。在最大简约法的概念下，生物演化应该遵循简约性原则，所需变异次数最少 (演化步数最少) 的演化树可能为最符合自然情况的系统树。在具体的操作中，分为非加权最大简约分析 (或称为同等加权) 和加权最大简约分析，后者是根据性状本身的演化规律 (如 DNA 不同位点进化速率不同) 而对其进行不同的加权处理。

在最大简约分析中，只有在两个以上分类单元中存在差异的性状或位点才能为构建系统发育树提供有效的信息，对于 DNA 序列来说，这样的位点称为简约性信息位点。对于简约性信息位点，至少要在两个以上分类单元中存在差异，并且至少要有两个以上不同的状态。因此，数据集中在所有分类单元中状态恒定的位点和只出现一次的变异的位点都是非简约性信息位点。

对一组数据的分析可能得到多棵同等简约树，即这些系统树具有同样的演化步数，在后续的分析中应构建这些同等简约树的合意树，并侧重分析保持率较高的分支。另外，加权简约分析在某种程度上可以提高最大简约法的效力，并可能更真实地反映生物的自然演化过程。由于趋同演化现象的存在，最大简约法有时会使原本具有不同进化过

程的生物被归为一支，因此，一般而言，最大简约法大多使用于相近物种之间演化关系的分析。

（一） 最大简约法的基本思想

对于系统发育树最直接的计算方式就是沿着各个分枝累加特征变化的数目，而简约的含义即为代价最小，所以，利用最大简约法构建系统发育树的过程，就是一个对给定分类单元所有可能的树进行比较的过程。针对某一个可能的树，首先对每个位点祖先序列的核苷酸（或氨基酸）做出推断，然后统计每个位点用来阐明差异的核苷酸（或氨基酸）的最小替换数目。在整个树中，所有简约信息位点的最小核苷酸替换数的总和称为树的长度或树的代价。通过比较所有可能的树，选择其中长度最小、代价最小的树作为最终的系统发育树，即最大简约树（*maximum parsimony tree*）。

最大简约法在分析过程中最大的优势在于可以相当准确地推断出祖先序列。推断祖先核苷酸序列，对于单个核苷酸来说是微不足道的，可是对于基因或基因组，从了解进化过程来看，具有非常重要的作用。利用最大简约法推断出祖先序列，不仅可以填补分子进化研究中的空白，还可以从现存的后代序列中客观推断出中间状态，这也是最大似然法对进化理论的最大贡献。利用最大简约法构建系统发育树的一般步骤是：①序列比对；②写出所有可能的树；③分析信息位点；④将每棵树的位点上的字符替换数相加，寻找最小替换的树。

（二） 最大简约树的搜索策略

当所分析的序列数或者物种数（ m ）比较小时，如一般情况下 m

<10 ，就可以直接计算出所有可能树的长度并确定最大简约树，这类寻找最大简约树的方法称为穷举式搜索。但是，树的数量会随着序列或者物种数目的增长而呈指数增长，当 m 很大时就基本不可能检查所有的树。此时有两种方法用来搜索最大简约树，一个是分支界限法，另一个是启发式搜索法。

1. 分支界限法

分支界限法最早由 Hardy 和 Penny 于 1982 年引入简约分析，该方法的基本思想是：树长明显超过预先检测的树被忽略掉，通过估计一群可能有更短树长的树来决定最大简约树，它包含两个基本步骤。①为最大简约树的树长设定一个上限 L ， L 的值可以采用随机选择的任何一棵初始树的长度；②树的生长过程，即在描述部分物种之间关系的树中每次增加一个分支。在分析过程中，如果发现比建立初始上限的树替换数更小的树， L 的值将随之修正。

与穷举搜索法一样，分支界限法能够保证在分析完成时没有遗漏的更加简约的树；它还有比穷举搜索快的优点，所以能够分析多达 20 条序列，但是该方法当 m 在 20 左右或者 20 以上时耗时较长。

2. 启发式搜索法

当序列数或物种数比较大的时候，由于所能生成的树的数目会呈指数级增长，这时再采用穷举搜索几乎不能完成。因而必须采用近似而更加有效的算法，但是这样的算法不一定能找到最大简约树。常采用的方法为启发式搜索法。

启发式搜索法并不逐个分支地构建所有可能的树，而是通过子树

分支交换，把它们嫁接到该步分析汇总找到的那棵树的其它位置上，从而产生一棵拓扑结构与初始树相类似的树。首先构造出一棵初始树，从初始树开始搜索更短的树。在第一轮分析中，初始树产生出若干棵新树，其中所有比初始树短的新树都在第二轮中被剪枝和嫁接。不断重复这个过程，直到某一轮通过剪枝和嫁接无法产生与前一轮等长或更短的树。

在启发式搜索中，采用的方式是逐步加入来寻找最大简约树。基本思路是：首先建立 3 个物种的初始树，接下来将第 4 个物种插入初始树的 3 个分支中的一个，用 MP 法计算树长；对另外 2 个分支也采用同样的方法进行计算，记录 3 个树长中的最小值；然后，有最小树长的 4 个物种树将用于下一个物种的插入；不断重复这一过程，至包含所有物种的树产生为止，这时就是临时的 MP 树。接下来采用分支交换策略来找到一个树长更小的树，满足一定条件则停止交换，此时得到的树就是最大简约树。

三、最大似然法

最大似然 (maximum likelihood, ML) 法是一种比较成熟的参数估计的统计方法。该方法在当样本很大时，可以获得参数估计的最小方差。最大似然的参数估计方法最早是由高斯提出来的，而后由费舍尔于 1912 年重新提出，并证明了这一方法的性质。利用最大似然法构建系统发育树，最早是由 Cavalli-Sforza 和 Edwards (1967) 年提出的，最初用于构建基于基因频率的系统发育树。Felsenstein (1988, 1993) 将该方法引入基于核苷酸的系统发育树的构建，然后又拓展到

氨基酸序列数据。

利用最大似然法构建系统进化树基于两条基本假设：不同的性状进化是独立的；物种发生分化后的进化是独立的。最大似然法试图避免其他方法的局限性。与距离法不同的是，最大似然法试图充分利用所有资料而不是将资料减缩为距离的集合；与最大简约法不同之处在于其进化概率模型采用了标准的统计方法。所以，最大似然法的计算量也是最大的。

最大似然法是一类完全基于统计方法的系统发育树构建方法。在 ML 法中，以一个特定的替代模型分析既定的一组序列数据，使所获得的每一个拓扑结构的似然率均为最大，挑出其最大似然值最大的拓扑结构，并将其选为最终树。所考虑的参数不是拓扑结构而是每个拓扑结构的枝长，并对似然值求最大来估计枝长。单个位点的似然值是指在核苷酸替代模型中该位点每个可能被取代或再现的概率之和，进化树的似然值就是所有位点似然值的乘积。最大似然法的核心是在比对中充分考虑每个核苷酸的概率。例如，转换出现的概率大约是颠换的 3 倍。设一个 3 条序列的比对中，如果发现其中有一列为一个 C、一个 T 和一个 G，则认为 C 和 T 所在的序列之间的关系很有可能更接近。

四、贝叶斯推断法

贝叶斯推断 (BI) 法是最近几年发展起来的一种构建系统发育树的统计学方法。与最大似然法相比，贝叶斯推断法的优势主要在于其一方面运行速度较快，能够处理较大的数据集；另一方面可以提供了

衡量可信性的有效参数——后验概率 (PP)，后验概率最大的树即为最优的系统发育树。

因为后验概率不仅涉及所有的树，而且每一棵树还整合了枝长和替代模型参数值的所有可能组合，所以不可能采用常规的分析方法解决。最常用的是 MCMC 法，其基本思想是构造出一条马尔可夫链，该链的状态空间为统计模型参数和不变的后验分布参数，然后通过计算机模拟获得后验概率。实际计算时，通常是同时建立多个马尔可夫链，每隔若干代抽取 1 棵树，当其全部由动态进入静态后，再运算若干代，然后忽略动态下的抽样，仅对静态下的抽样计算合意树，分支出现的频率即后验概率，该方法同时还给出模型参数的平均数、方差和置信区间。贝叶斯推断法将先前的系统发育树构建和评估这两个过程合二为一，最后得到的树不仅反映了系统发育关系的最佳估计，而且提供了有关分支的确切支持强度。

第三节 系统发育树构建及应用

一、 构建系统发育树的步骤

利用生物大分子序列进行系统发育树的构建，一般分为 4 个步骤：①选择适合的分子序列；②多序列比对；③选择适合的建树方法；④系统发育树的评估。

(一) 选择适合的分子序列

系统发育树可以用 DNA、RNA 或蛋白质序列数据来构建。通常情况下，对于系统发育分析，DNA 序列所包含的信息量要比蛋白质序列多。所以，利用 DNA 序列比利用蛋白质序列将更加精确地获取

系统发育树，原因包括多个方面：

1) 基因的编码区可以发生同义或非同义替换事件，利用 DNA 序列不仅可以获取引起氨基酸改变的非同义替换的信息，更能获得不引起氨基酸改变的同义替换的信息。

2) 通过比较非同义替换 (d_N) 和同义替换率 (d_S) 可以显示出基因序列是经历了正选择还是纯化选择。纯化选择表现为氨基酸序列的改变会受到限制，而反映在 DNA 序列上是 $d_N < d_S$ ，由于大部分蛋白质序列要维持功能的稳定性，故经历纯化选择作用的比较多；正选择在 DNA 序列上的表现为 $d_N > d_S$ ，正选择更容易引起蛋白质序列的改变，并促进基因形成新的功能。

3) 非编码区由于受到较小的进化选择压力，会发生更多的中性突变，也可用于系统发育树的构建。

4) 利用 DNA 序列还可以对转换和颠换的速率进行估计。

(二) 多序列比对

多序列比对不仅是生物信息学的核心问题之一，也是系统发育分析中的一个基础步骤和关键环节。多序列比对的结果将直接影响系统发育分析的结论。如果对一组序列进行了错误的比对，依然可以生成一棵系统发育树，但是这样建立的系统发育树没有任何生物学意义。因此在为系统发育分析准备多序列比对时，有一些问题也需要特别注意。

若采用的是基因的编码序列构建系统发育树，由于核苷酸序列翻译成氨基酸序列时是按照三联体密码的形式进行的，因此这类核苷酸

序列比对后产生的空位数目也应该是 3 或 3 的倍数。如果产生的空位不是 3 或 3 的倍数，说明多序列比对的结果不正确，或没有生物学意义。对这类数据最好的办法是按照氨基酸序列比对，然后根据氨基酸比对的结果，相应调整核苷酸序列比对结果。

进行系统发育树的构建，根据二级或三级序列结构进行对比比直接利用一级序列进行比对的可信度要好，这主要是因为复杂结构的保守性高于简单特征（核苷酸、氨基酸）的同源保守性；此外，通过复杂结构的比对程序还可以搜索到一些特殊的关联位点，这些位点是进化的功能区域。例如，核糖体基因的二级结构通常为茎环（stemloop）结构，茎区多为保守的，而环区则高度可变。若在进行比对的类群中有相应的二级结构，则应该根据二级结构来进行比对。

当序列分歧度很大或者有大的插入/缺失（indel）片段时，如何处理这些区域中 indel 状态的位点将取决于进化模型的所有要素（包括核苷酸转换或颠换速率），而且相关的参数在前导树与比对推导的进化树中应该保持一致。所以，在进行多序列比对时，一方面，比对参数应该随着进化的分支动态变化，以保证降低碱基错配的概率；另一方面，比对参数应该随时调整，以防止过多近似序列导致的信息量不足。

（三）选择适合的建树方法

本章前面介绍了几种构建系统发育树的方法，其中最大简约法主要适用于序列相似性很高的情况；距离法在序列具有比较高的相似性时适用；而最大似然法和贝叶斯法可用于任何相关的数据序列集合。

从计算速度来看，距离法的计算速度最快，其次是最大简约法和贝叶斯方法，然后是最大似然法。在实际应用中，既要考虑计算速度，又要考虑分子数据的特点和方法的应用范围。

在构建系统发育树的所有方法中，距离法是一种纯数学算法，通过序列两两之间的差异决定发育树的拓扑结构和枝长，它将发育树的构建和最优树的确定融合在一起，构建发育树的过程也就是寻找最佳树的过程。距离法的计算速度比较快，然而值得注意的是，距离法在将原始数据转换成距离矩阵时难免会丢失一些进化信息。

最大简约法和最大似然法是从数学角度在评价树的最优标准的基础上找到使目标函数最优的树。最大简约法能快速分析出序列之间的系统发育关系，所构建的系统发育树中的短分支更接近于真实。但当 DNA 序列的进化速率在不同分支上相差很大或亲缘关系太远时，最大简约法的单一突变图谱可能会得出似是而非的结论。由于没有考虑核苷酸的突变过程，使得长分支末端的序列由于趋同进化而显示较好的相似性，趋同现象违背了简约法则，导致的结果是对“长枝吸引”的敏感。

最大似然法充分考虑了所有可能的突变路径，能完全利用数据的系统发育信息。然而，最大似然法构建的系统发育树的核心在于对核苷酸替代模型的选择，不同位点的核苷酸替代速率不一致，在核苷酸替代一般模型中包含了反映进化过程的参数，但是并非是替代模型越复杂，结果就越理想。此外，由于计算每个树的似然值算法的复杂性，以及基于最优标准算法的复杂性，使得最大似然法在分类群较多时十

分费时，这也是其应用的最大障碍。

贝叶斯推断法的分析结果取决于所有可能参数值，寻找对参数的最广泛的支持，因而可以得到比最大似然法更好的结果，尤其是相对参数的数据量较少时，往往可以得到比最大似然法更加可靠的结果。然而，贝叶斯推断法的后验概率对先验概率十分敏感，而先验概率分布与进化模型参数（分支长度、拓扑结构和核苷酸替代模型）息息相关，所以其值完全依赖于数学上的计算，没有考虑生物学背景知识，因此该方法具有一定的主观性，在客观证据十分确凿的情况下就不宜再使用。

（四）系统发育树的评估

在系统发育树的构建过程中，我们可以根据各种构建系统发育树方法的特点选择合适的方法。一棵用距离法、最大简约法或最大似然法构建的系统发育树可以看做是一个点估计，对这个点估计最好加上一个可靠性测度。

1. 重复抽样检验

评价系统发育树中每一分支的可靠性，在统计学上用重复抽样的方式来排除随机误差的影响。目前主要有两种重复抽样检验方法来检验系统发育树的可靠性：自展检验和折刀法。

自展检验是一种现代统计技术，该方法利用计算机随机地进行重复采样，以确定采样误差和一些参数估计的置信区间。该方法用来推断系统发育树的可靠性，可以与任何一种系统发育树构建方法联合使用，但在树的构建方法上必须是一致的。

自展检验的基本原理是：从原始数据集中的重新抽样替换来产生伪数据集，这样的数据集称为自展样本；然后用这样的伪数据集来构建系统发育树，称为自展树；重复上述过程，产生成百上千的重新抽样的伪数据集，并同时生成对应的自展树；最后检验自展树对最终系统发育树各个分支的支持率。具体做法是：将最终系统发育树与各个自展树进行比较，其中在各个自展树中都有出现或大量出现的那些部分将具有较高的置信度。产生相同分组的自展树的数目常常被标注在系统发育树的相应节点旁，表示该树中每个部分的相对置信度。

如果不同位点具有一致的系统发育信号，自展样本将不会发生什么冲突，导致所有的或大部分分支都具有较高的自展支持率；如果数据缺乏信息或者不同位点包含相冲突的信号，自展样本间将有较多差异，导致大多数分支的自展支持率比较低。自展值越高表示对相关分支的支持越强。

折刀法与自展法的不同之处在于抽样的方式。该方法是由 Muller 和 Ayala 提出的，Lanyon 对该方法进行了改进，基本思想为：每次去掉一个可变分类单元 (OUT)，然后再对剩余的所有 OUT 进行分析。由此可见，折刀法产生的新数据小于原始数据。

2. 内枝检验

了解一棵树的可靠性是检验其每个内部分枝的可靠性。内枝检验是通过检验内枝长度是否显著大于零而评价构建的系统发育树的一种检验方法。内枝检验的基本思想是：若一棵树的拓扑结构是正确的，则表明正确拓扑结构的所有分枝长度估计的期望值为 0 或者正值，而

不正确的拓扑结构中至少有一个内部分枝长度为负值，且该分枝产生了序列间的一个不正确分区。因此，如果一棵树的内部分枝被确定是负值，那么该树的拓扑结构很可能就是错误的。

系统发育树的内枝检验方法能方便地应用于由距离法构建的系统发育树，因为只有正确树的所有内部分枝才可能是正值。但在最大简约法和最大似然法构建的系统发育树中，不管拓扑结构如何，所有内部分枝都是正值，因此就很难建立一种检验无效假设的分析方法。

二、常见系统发育树的软件简介

(一) PHYLIP

PHYLIP 是目前应用较多的免费构建系统发育树的软件包，是由美国华盛顿大学的 Joseph Felsenstein 教授开发的。该软件 1980 年首次发布，其可以在 DOS、UNIX、Windows 和 Macintosh 等多个平台下安装并应用。PHYLIP 由 35 个独立的程序组成，这些程序都能实现特定的功能，基本上包括了系统发育分析的所有方面。PHYLIP 主要包括几个程序组：分子序列组、距离矩阵组、基因频率组、离散字符组、进化树绘制组。

分子序列组：蛋白质序列组，如 `protpars`、`proml`、`promlk`、`protdist`；核苷酸序列组，如 `dnapenny`、`dnapars`、`dnamove`、`dnaml`、`dnamlk`、`dnainvar`、`dnadist`、`dnacomp`。

距离矩阵组：`fitch`、`kitsch`、`neighbor`。

基因频率组：`gendist`、`contrast`、`contml`。

离散字符组：`pars`、`mix`、`penny`、`move`、`dollop`、`dolpenny`、`dolmove`、

clique、factor。

进化树绘制组：[drawgram](#)、[drawtree](#)、[consense](#)、[treedist](#)、[retree](#)。

Phylip 软件包的文档是非常详细的，对于每个独立的程序，都有一个独立的文档，详细地介绍了该程序的使用及其说明。此外，Phylip 软件包还包括程序的 C 语言源代码。

利用 Phylip 构建系统发育树，首先须根据分析数据，选择适当的程序，若分析的是 DNA 数据，就在核酸序列分析类中选择程序，如 [dnapenny](#)、[dnapars](#)、[dnamove](#)、[dnaml](#)、[dnamlk](#)、[dnainvar](#)、[dnadist](#)、[dnacomp](#) 等；若分析的是离散数据，如突变位点数据，就在离散字符组里面选择程序，然后再选择适当的分析方法，如对于系统发育树的构建方法可以选择简约法(DNAPARS)、似然法(DNAML、DNAMLK)、距离法(DNADIST)等。选择好程序后，执行，读入分析数据，默认的读取数据的源文件为 `infile`，选择适当的参数，进行分析，结果自动保存为 `outfile`、`outtree`。`outfile` 是一个记录文件，记录了分析的过程和结果，可以直接用文本编辑器（如写字板）打开。`outtree` 是分析结果的树文件，可以用 Phylip 提供的绘树程序打开查看，也可以用其他的程序来打开，如 [treeview](#)。

Phylip 的下载地址为：<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>。

（二） PAUP

PAUP 是最著名的进行系统发育分析的商业软件。该软件最初的版本叫 PAUP，主要是应用简约法进行系统发育分析。2001 年，Swo

fford 教授推出整合了最大似然法和距离法的 PAUP4.0，并于 2002 年推出光盘版的 PAUP4.0Beta。目前 PAUP4.0 有好几个版本，这些版本分别适用于 Macintosh、Windows 和 Portable 等操作平台，具有一个简单的、菜单式操作的界面。

利用 PAUP 进行系统发育树的构建，默认的数据输入格式为 Nexus。此外，PAUP 也可以输入 PHILIP、GCG-MSF、NBRF-PIR 和 HE NNIG86 等其他格式的数据文件。使用 PAUP 构建系统进化树的程序都有多种选项：MP 选项包括任意特征权重方案的说明；距离法中可以选择 NJ、ME、FM 和 UPGMA 等模式。有关这些方法和模型的详细说明可以从“帮助”中获得。将参数设为“estimate”，执行“describtree”命令，可以评估任何系统发育树的参数。

PAUP 的下载地址为：<http://paup.sc.fsu.edu/>。此外，PAUP 还有一个可视化版本 AWTY，网址为 http://king2.sc.fsu.edu/CEBProjects/awty/awty_start.php。

（三） MEGA

MEGA 是目前应用较多的构建系统发育树和分子进化遗传分析的免费软件包之一，由美国亚利桑那州立大学的 Kumar 教授开发并于 1994 年首次发布。MEGA 的下载地址为：<http://www.megasoftware.net/>。该软件最初为 DOS 版本，随后有适合 Windows、Mac 和 Linux 的版本可下载。过去 20 多年来，该软件经历了 9 次主要升级，目前 MEGA 的最新版本为 2018 年 5 月发布的 MEGAX。MEGA4 是其中最为经典的版本，在分子进化和系统发育研究中得到了广泛的应用。

MEGA5 新增了 TBR 和 SPR 来进行种系发生的重建，新增了最大似然法建树功能。MEGA6 新增了 Timetree 功能，可基于 Reltime 方法估计进化树分歧点的发生时间。MEGAX 的主要功能模块包括：通过网络进行数据的搜索、多序列比对、序列编辑、DNA 或蛋白质的替代模型预测、遗传距离的估计、系统发育树的构建、选择压分析、进化假说检验等。该软件能够对核酸（DNA 和 mRNA 等）序列和氨基酸序列及遗传距离进行系统发育树的构建。在建树的方法上，其提供了最常用的距离法（UPGMA、ME 和 NJ）、最大简约法（MP）和最大似然法（ML），对所获得的树均可进行自展检验及标准误估计可靠性检验。MEGA 突出的特点是菜单化操作方式，操作简单方便，极易掌握，可以满足一般进化分析的需要。

MEGA 的下载地址为：<http://www.megasoftware.net/>。MEGA5 新增了 TBR 和 SPR 来进行种系发生的重建。MEGA6 新增了 Timetree 功能，可基于 Reltime 方法估计进化树分歧点的发生时间。目前 MEGA 的最新版本为 2017 年 8 月发布的 MEGA7.1.0，此版本不再支持 32 位系统，优化了对 64 位处理器的支持，并可以使用更多内存。目前有适合 Windows、Mac 和 Linux 的版本下载。

（四） TREE-PUZZLE

TREE-PUZZLE 是对分子序列采用最大似然法构建系统发育树的软件包，包含有可以在 Windows、Linux 和 Macintosh 等多个平台下运行的版本。该软件包应用 quartetpuzzling（一种最大似然估计方法）构建系统发育树，还可以计算特定树的序列间最大似然距离和分

枝长度。该软件包支持所有常见的核苷酸序列和蛋白质序列进化模型。此外，该程序还包括数个统计测试。该程序具有详细使用手册及程序源代码。TREE-PUZZLE 的下载地址为：<http://www.tree-puzzle.de/>。

（五）MrBayes

MrBayes 是一种采用贝叶斯方法进行系统发育树构建的软件。该软件以 NEXUS 格式输入数据，数据可以是核苷酸序列或氨基酸序列，也可以是限制性位点序列或以 0、1 表示的形态数据。MrBayes 软件可以通过不同方法汇总模型参数的后验分布，包括系统发育树的布局和分支长度，该软件还可以推导位点进化速率。MrBayes 软件的下载地址为：<http://mrbayes.sourceforge.net/>。

（六）PhyML

2003 年，Guindon 等根据最大似然法原理，采用更加简便的爬山算法来同时估计树的拓扑结构和树的分枝长度。与传统的最大似然法相比，该方法更加简便、快速和有效。基于此算法，Guindon 等推出了利用该算法计算最大似然系统发育树的 PhyML 程序，并于 2005 年推出了 PhyML 的网络在线运行版。该软件能够利用 DNA 序列或氨基酸序列构建最大似然树，在构建最大似然树的软件中是速度比较快的。PhyML 在线版的地址为：<http://atgc.lirmm.fr/phyml/>。

三、系统发育分析示例

在本节中将用两个例子来说明系统发育分析的具体过程。数据为来自 13 个脊椎动物物种线粒体基因组中细胞色素 b 基因编码的氨基酸序列，其一是采用本地计算机上的 MEGA 软件构建系统发育树，

其二是利用网络上在线运行的软件构建系统发育树。

脊椎动物中的线粒体 DNA (mtDNA) 包含有 13 个编码蛋白质的基因。mtDNA 的全序列在很多生物中都已经获得。mtDNA 序列及其基因编码的氨基酸序列是目前研究生物系统发育、种群遗传变异和分化, 以及难以用外部形态特征来区分的近缘种、种下分类单元鉴定等方面应用最为广泛的分子序列之一。mtDNA 的细胞色素 b (Cytb) 基因是一种编码蛋白质的基因, 是目前结构和功能研究得最清楚的基因之一。Cytb 基因在碱基组成上具有偏好性, 且具有种间差异。Cytb 基因中同时存在较快和较慢进化的密码子位点, 以及保守区域和突变区域, 从而使得 Cytb 基因可以应用于系统分类研究。1989 年, 第一对关于脊椎动物 Cytb 基因部分片段的扩增引物出现后, Cytb 基因被广泛地应用于系统分类学研究, 目前认为它是对物种种上和种下分类阶元进行系统进化研究得较好的序列。本研究选取来自哺乳动物、爬行动物、鸟类和鱼类共计 13 个物种的 Cytb 基因编码的氨基酸序列构建系统发育树。

(一) 利用 MEGAX 构建系统发育树

MEGA 由于其菜单化操作方式, 操作简单方便、极易掌握, 是目前应用最多的进行系统发育树构建的软件之一。本例拟利用 MEGAX 软件对脊椎动物中线粒体细胞色素 b 基因构建系统发育树。

1. 序列获取

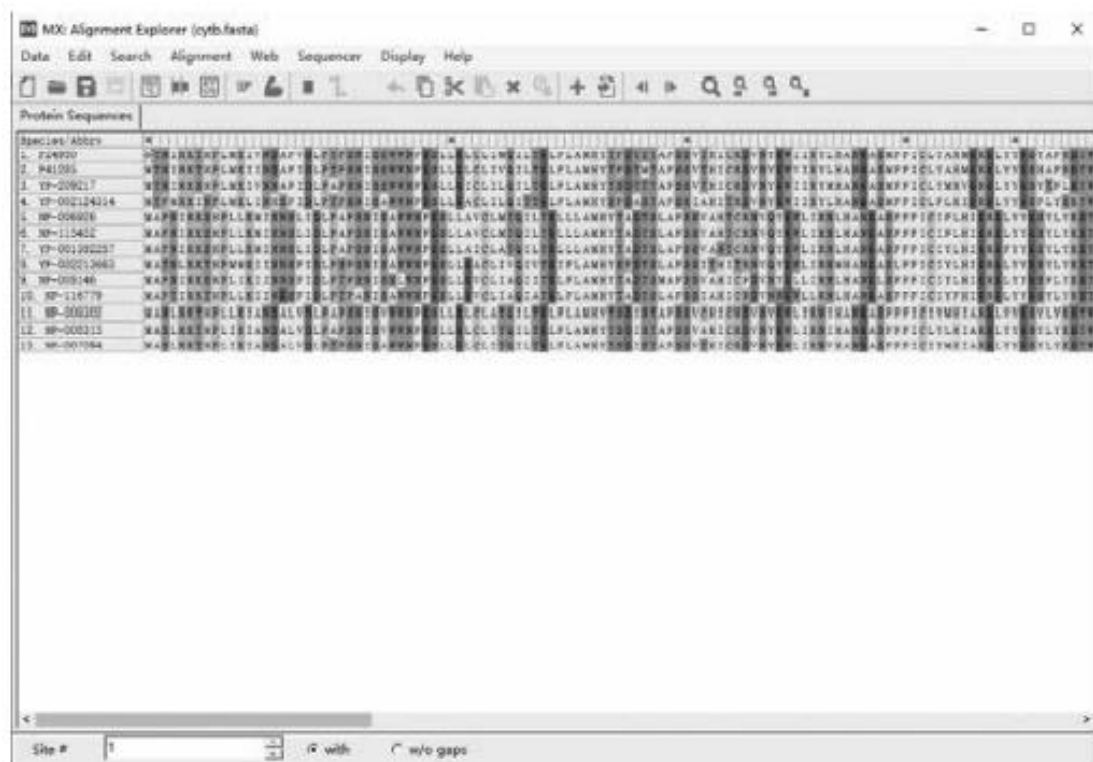
来自 13 个物种的脊椎动物的线粒体细胞色素 b 基因编码的氨基酸序列均用 Entrez 检索方式获取。

在 NCBI 中分别获取相应的蛋白质序列，并将序列按照 FASTA 格式保存到新建的纯文本文件中，然后将纯文本文件名修改为“cytb.fasta”。

2. 使用 MEGAX 进行多序列比对

MEGA 软件的“Alignment Explorer”模块集成了用于进行多序列比对的程序“ClustalW”，利用该程序可以实现多序列比对。

打开 MEGA 软件，选中 cytb.fasta 文件，将该文件拖到 MEGA 软件中，会弹出“Alignment Explorer”模块对话框，如下图所示。



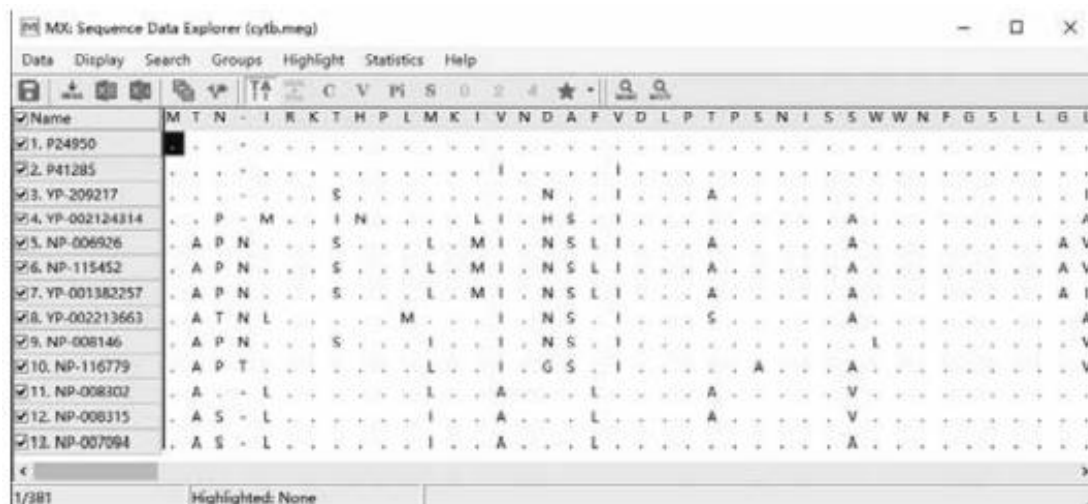
在“Alignment Explorer”模块对话框中选择“Alignment”→“Align by ClustalW”命令，会弹出如下图所示的进行多序列比对参数设置的“ClustalW Options”对话框。参数一般采用默认设置即可，单击“OK”按钮，即可进行多序列比对。



多序列比对结束后，在“Alignment Explorer”模块对话框中选择“Data”→“Export Alignment”→“MEGA Format”命令，将多序列比对的结果输出，输出的文件名为“cytb.meg”。

3. 使用 MEGAX 进行系统发育树的构建

关闭“Alignment Explorer”模块对话框。选中 cytb.meg 文件，将该文件拖到 MEGA 软件中，MEGA 软件一方面会自动打开“Sequence Data Explorer”模块对话框，另一方面会显示全部菜单，如下图所示。



序列输入 MEGA 软件，就可以进行进化树分析。MEGA 软件提供了 5 种构建系统发育树的方法，并同时可以对系统发育树进行检验。这 5 种方法分别是：邻接法（NJ）、最小进化法（ME）、非加权组内平均法（UP-GMA）、最大简约法（MP）和最大似然法（ML）。此处仅以构建 NJ 树为例，介绍操作过程。在 MEGA 的主窗口中选择“Phylogeny”→“Construct/Test Neighbor-Joining Tree”，选择多序列比对后的输出文件“cytb.meg”，将弹出如图 11-19 所示的“Analysis Preferences”对话框，用于进行系统发育树构建中参数的设置。在此处，“Test of Phylogeny”选择“Bootstrap method”；“No. of Bootstrap Replications”设置为 500 次；计算距离的替代模型“Model/Method”选择泊松校正（Poisson correction），随机数种子由系统默认；“Gaps/Missing Data Treatment”采用“Pairwise deletion”模型。设置完成，单击“OK”按钮，开始计算。

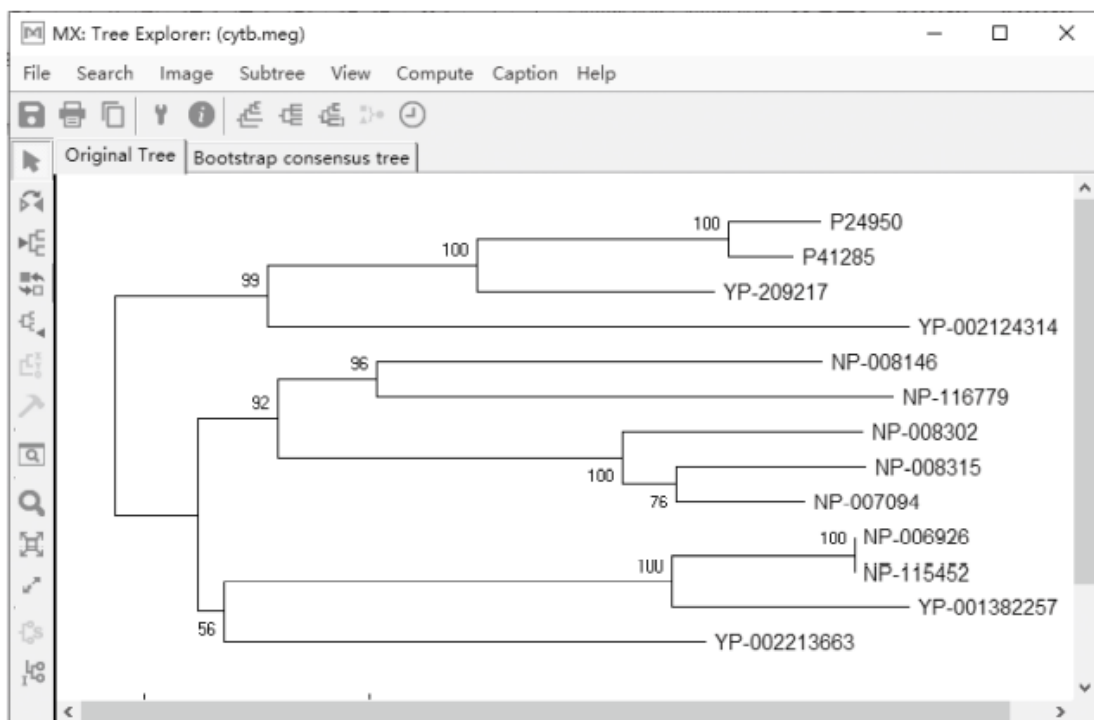
MX: Analysis Preferences

Phylogeny Reconstruction

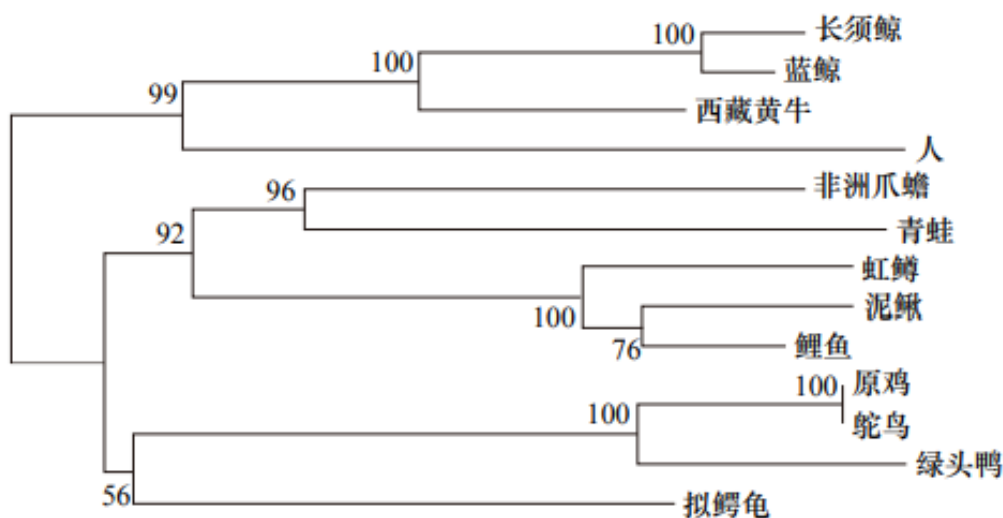
Option	Setting
ANALYSIS	
Scope	→ <i>All Selected Taxa</i>
Statistical Method	→ <i>Neighbor-joining</i>
PHYLOGENY TEST	
Test of Phylogeny	→ <i>Bootstrap method</i>
No. of Bootstrap Replications	→ <i>500</i>
SUBSTITUTION MODEL	
Substitutions Type	→ <i>Amino acid</i>
Model/Method	→ <i>Poisson model</i>
RATES AND PATTERNS	
Rates among Sites	→ <i>Uniform Rates</i>
Gamma Parameter	→ <i>Not Applicable</i>
Pattern among Lineages	→ <i>Same (Homogeneous)</i>
DATA SUBSET TO USE	
Gaps/Missing Data Treatment	→ <i>Pairwise deletion</i>
Site Coverage Cutoff (%)	→ <i>Not Applicable</i>
SYSTEM RESOURCE USAGE	
Number of Threads	→ <i>3</i>

? Help X Cancel ✓ OK

计算所耗用的时间与序列的数目及序列中信息位点的含量成正比，计算完成后，会弹出“Tree Explorer”窗口（如下图）。该窗口有两个结果，一个是原始树（original tree），另一个是 bootstrap 验证过的一致树（bootstrap consensus tree），树枝上的数字表示 bootstrap 检验中该树枝的支持率（百分比）。

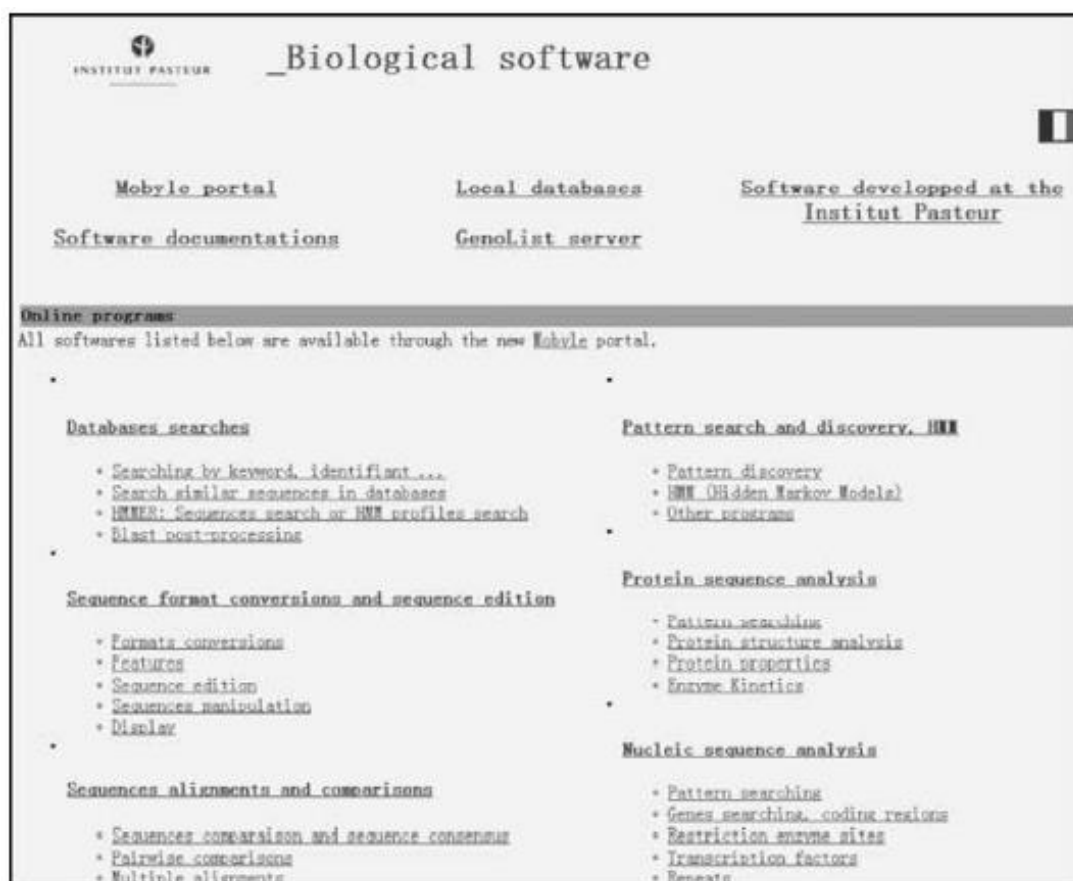


在得到了系统发育树后，可以根据需要对其进行编辑和美化。双击序列名可以更改序列的名称，最终得到的系统发育树如下图所示。值得注意的是，这种单纯的基于某一个或一种 DNA 序列或蛋白质序列构建的系统发育树只能提供物种进化的部分信息，而不能完全代表物种进化的全过程。



(二) 利用在线分析软件构建系统发育树

随着互联网的普及，很多研究机构提供了很多对生物学数据进行在线分析的工具，如在前面所述的 PHYLML，即可以通过在线分析构建系统发育树。在这方面，法国巴斯德研究所作出了卓越的贡献，在其构建的在线生物信息分析平台 MobyLe 中系统集成了进行数据库搜索、序列格式转换和序列编辑、序列比对和比较、系统发育分析、蛋白质序列分析、核酸序列分析和结构分析等在线分析软件，如下图所示。在系统发育分析模块中，该平台提供了简约法程序、距离矩阵法程序、最大似然法程序、距离计算和系统发育树的操作与可视化等在线分析工具。



MobyLe 的地址为：<http://mobyLe.rpbs.univ-paris-diderot.fr/>。

在此，我们利用 MobyLe 的在线生物软件分析平台来对上例中脊

椎动物线粒体细胞色素 b 基因构建系统发育树。

- 1.利用 ClustalW 进行多序列比对;
- 2.利用 PhyML 在线分析软件进行系统发育树的构建;
- 3.系统发育树的展示。

第十二章 统计学习与推理

第一节 统计学习与推理基础

一、Fisher 经典参数统计理论

Fisher 经典参数统计理论隐含如下 3 个假定。

1) 为了从数据中找到一种函数依赖关系, 研究人员要对分析的问题有非常清楚的了解, 并知道产生数据随机性质的物理规律和欲求的函数仅与有限个参数有关, 因而能够定义一个与参数成线性关系的函数集, 它包含了对所求函数的最佳逼近, 且描述函数集的自由参数个数较少。但是, 大规模多变量问题的计算机分析将导致“维数灾难”现象的发生; 在含有几十个或者几百个变量的实际多维问题中, 要定义一个相当小的函数集, 且函数集中包含对欲求函数的较好逼近, 这是一种天真的想法。

2) 大多数实际问题的随机分量所隐含的统计规律是正态律并得到中心极限定理的支持。中心极限定理指出: 在很宽的条件下, 大量随机变量之和可以用正态律来逼近。但是, 有些实际问题的统计成分并不能仅用经典的统计分布函数来描述, 实际分布经常是有差别的。

3) 这一理论体系下的归纳手段即最大似然法, 它是估计参数的有效工具。但是, 对于某些特定问题, 最大似然法不是最好的参数估计方法。

在经典参数统计理论中, 信号 (y_i) 分解为确定性和随机性两个组分之和。确定性部分是由某个函数的值定义的, 这个函数除了有限几个参数是已知的; 噪声部分是由一个已知密度函数定义的。如一元

线性回归的数学模型

$$y_i = \alpha + \beta x_i + \varepsilon_i, \quad i = 1, 2, \dots, n$$

式中， ε_i 为其他随机因素对 y_i 的影响的总和，一般假设它们是一组相互独立并服从同一正态分布的随机变量。给定一组观察数据，待估计的一元线性回归方程为

$$\hat{y} = a + bx$$

式中， a 、 b 分别为参数 α 、 β 的估计。

Fisher 把判别分析、回归分析和密度估计问题等表达为特定参数化模型的参数估计问题，并提出了估计所有模型未知参数的方法——最大似然法。可见，经典参数统计理论是样本数目趋于无穷大时的渐近理论，其最大特点是对函数依赖关系给出了显性的表达式，因而可解释性好。

二、经验非线性方法

经验非线性方法的典型代表是人工神经网络 (ANN)。ANN 模仿动物神经网络行为特征，进行分布式并行信息处理，具有自学习和自适应的能力。对一批相互对应的输入-输出数据，ANN 依靠系统的复杂性，通过调整内部大量节点之间相互连接的权重，完成学习(训练)，其中间过程是一个黑箱。ANN 具有很好的非线性逼近能力，克服了经典参数统计理论中参数估计方法的困难，但存在模型结构难以确定(缺乏一种统一的数学理论，更多地依赖于使用者的技巧)、可解释性差(没有一个显性的表达式)、易于出现过度训练和训练不足、陷入局部最小等诸多缺陷。

与经典参数统计理论一样，ANN 也基于经验风险最小并要求训练样本充分大。用 ERM 准则代替期望风险最小化并没有经过充分的理论论证，只是直观上合理的想当然的做法。实际上，即使可以假定当 n 趋向于无穷大时经验风险趋近于期望风险，在很多问题中的样本数目也离无穷大相去甚远。在有限样本的条件下，训练误差小并不总能得到好的预测效果，某些情况下，训练误差过小反而会导致推广能力的下降，即真实风险的增加，这就是过拟合或过学习问题。如图 12-1 所示，设 A、B、C 为训练样本，过平面上 3 点总能找到一条抛物线使训练误差为 0；D 为待测点真值，显然，基于 ERM 学习得到的“最优”函数预测值 D_2 反而不如简单线性方程预测值 D_1 。

可见，在有限样本情况下，经验风险最小并不一定意味着期望风险最小；学习机器的复杂性不但与所研究的系统有关，而且也要和有限数目的样本相适应。需要一种能够指导在小样本情况下建立有效的学习和推广方法的理论。

三、小样本统计学习理论

统计学习理论正是研究小样本统计估计与预测的理论。

(一) VC 维

统计学习理论定义了一系列有关函数集学习性能的指标，其中最重要的是 VC 维：对 1 个指示函数集，如果存在 h 个样本能够被函数集中的函数按所有可能的 2^h 种形式分开，则称函数集能够把 h 个样本打散；函数集的 VC 维就是它能打散的最大样本数目 h 。VC 维表示机器的学习能力，VC 维越大，学习机器越复杂，但置信范围也随

之增大。目前尚没有通用的关于任意函数集 VC 维计算的理论，只对一些特殊的函数集知道其 VC 维。对于给定的学习函数集，如何用理论或实验方法计算其 VC 维是当前统计学习理论中有待研究的一个问题。

（二） 推广性的界

对各种类型的函数集，统计学习理论系统地研究了其经验风险与期望风险之间的关系，即推广性的界。关于两类分类问题，结论是对指示函数集中的所有函数（包括使经验风险最小的函数）。

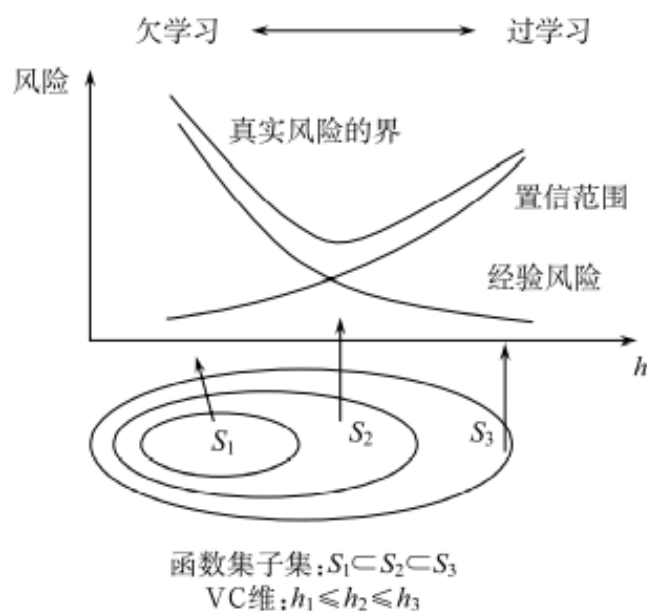
这一结论从理论上说明了学习机器的实际风险（期望风险）由两部分组成：一部分是经验风险（训练误差），另一部分称为置信范围，它和学习机器的 VC 维 h 及训练样本数 n 有关。

它表明在有限训练样本下，学习机器的 VC 维越高（复杂性越高），置信范围越大，导致真实风险与经验风险之间可能的差别越大。这就是出现过学习现象的原因。

（三） 结构风险最小

从上面的结论可以看出，ERM 准则在样本有限时是不合理的，需要同时最小化经验风险和置信范围。其实，在传统方法中，选择学习模型和算法的过程就是调整置信范围的过程，如果模型比较适合现有的训练样本（相当于 h/n 值适当），则可以取得比较好的效果。但因为缺乏理论指导，这种选择只能依赖先验知识和经验，造成了如 ANN 等方法对使用者技巧的过分依赖。统计学习理论提出了一种新的策略，即把函数集构造为一个函数子集序列，使各个子集按照 VC 维的大小

(即 Φ 的大小) 排列, 在每个子集中寻找最小经验风险, 在子集间折中考虑经验风险和置信范围, 以取得期望风险的最小。这种思想称为结构风险最小化 (SRM), 即 SRM 原则 (如下图)。



实现 SRM 原则可以有两种思路。第一种思路是在每个子集中求最小经验风险, 然后选择使最小经验风险和置信范围之和最小的子集。显然这种方法比较费时, 当子集数目很大甚至无穷时不可行。因此, 有第二种思路, 即设计函数集的某种结构使每个子集中都能取得最小的经验风险 (如使训练误差为 0), 然后只需选择适当的子集使置信范围最小, 则这个子集中使经验风险最小的函数就是最优函数。

(四) 小样本与转导推理

很多实际问题的目标仅仅是求出未知函数在目标点 (如测试集) 的值。经典参数统计理论体系采用归纳和演绎两步解决这个问题: 第一步 (从特殊到一般, 即归纳), 利用一定的归纳原则从一个给定的函数集解决一个一般性问题; 第二步 (从一般到特殊, 即演绎), 从

一般性问题出发, 计算目标点的值。当拥有信息量只够解决欲求问题, 却不足以解决一个一般性问题时, 用一个给定的函数集来直接估计目标点上的函数值, 从而形成了一种新的从特殊到特殊的推理方法——转导推理。

转导推理即小样本集推理的主要原则是: 如果对欲求解的某一问题只拥有有限的信息, 那么应该直接求解问题, 而绝不能求解一个更一般的问题来作为一个中间步骤, 因为可能所拥有的信息足以直接求解问题, 但不足以解决一个更一般的中间问题。

统计学习理论基于结构风险最小原则建立了一套有限样本下机器学习的理论框架和通用方法, 较好地解决了小样本、非线性、高维数和局部极小点等实际问题, 成为 20 世纪 90 年代末发展最快的研究方向之一。支持向量机 (SVM) 正是统计学习理论的具体成果与实现。

四、 基于概率的方法

基于概率的方法主要包括贝叶斯 (Bayes) 推理及隐马尔可夫模型 (HMM), 其中贝叶斯推理需利用来源于经验和历史资料的先验信息。

第二节 统计模型与参数推断

对给定的统计模型, 参数估计方法有矩估计、线性最小二乘估计、非线性最小二乘估计 (麦夸脱法)、加速单纯形法、最大似然法等。

一、 参数估计量的评选标准

(一) 无偏性

参数估计量的期望值与参数真值是相等的, 这种性质称为无偏性,

具有无偏性的估计量称为无偏估计量。估计量的数学期望值在样本容量趋近于无穷大时与参数的真值相等的性质称为渐进无偏性，具有渐进无偏性的估计量称为渐进无偏估计量。

（二）有效性

无偏性表示估计值是在真值周围波动的一个数值，即无偏性表示估计值与真值间的平均差异为 0，近似可以用估计值作为真值的一个代表。同一个参数可以有許多无偏估计量，不同的估计量具有不同的方差，方差最小说明最有效。如果一个无偏估计量相对于其他所有可能无偏估计量，其期望方差最小，那么称这种估计量为一致最小方差无偏估计量。

（三）相合性

用估计量估计参数涉及一个样本容量大小问题，如果样本容量越大，估计值越近真值，那么这种估计量是相合估计量。

（四）充分性与完备性

充分性指估计量充分利用样本中每一变量的信息，完备性指估计量是充分的、唯一的无偏估计量。

二、最小二乘估计

最小二乘法是参数估计常用的方法之一，其基本思想是保证由新估参数得到的理论值与观察值离均差的平方和值为最小。其具体方法是：为使离差平方和 Q 为最小，可通过求 Q 对待参数的偏导数，并令其等于 0，以求得参数估计量。

三、最大似然估计

最大似然法包括两个步骤，首先建立包括有该参数估计量的似然函数，然后根据实验数据求出似然函数达极值时的参数估计量或估计值。

（一） 似然函数

对于离散型随机变量，似然函数是多个独立事件的概率函数的乘积，该乘积是概率函数值，它是关于总体参数的函数。

（二） 最大似然估计

所谓最大似然估计就是指使似然函数值为最大以获得总体参数估计的方法。为了计算上的方便，一般将似然函数取对数，称对数似然函数，取对数后似然函数由乘积变为加式。

四、几种参数估计方法的比较

最大似然法要求已知总体的分布才能获得估计量，估计结果大多具有无偏性、有效性和相合性等优良的估计量性质，但并不意味着该法估计的结果就一定最好。例如，最大似然法估计平均数尽管是无偏估计，但其估计的方差是有偏的，在样本容量小时不能很好地反映总体变异。矩估计和最小二乘法对分布没有严格的要求，矩估计局限在与矩有关的估计量且有时不具优良的估计量性质，最小二乘法在估计线性回归模型参数时因其灵活方便多被采用。

第三节 聚类分析、主成分分析与 Fisher 判别

一、 聚类分析

聚类分析是数理统计中研究“物以类聚”的一种多元统计方法，即将一批样品或变量按照它们在性质上的亲疏程度进行分类。根据分类

对象的不同，它可分为 Q 型和 R 型两大类，Q 型是对样本进行分类处理，R 型是对变量进行分类处理。

分类的方法很多。一类方法是事先不用确定分多少类，在样品距离的基础上定义类与类之间的距离，首先将 n 个样品自成一类，然后每次将具有最小距离的两类合并，合并后重新计算类与类之间的距离，将此过程一直继续到所有样品归为一类为止，这种聚类方法称为系统聚类或层次聚类。另一类方法是事先要确定分多少类(K 均值聚类)，或将样品初步分类（动态聚类或快速聚类），然后根据分类函数尽可能小的原则，对已分类别进行调整，直到分类合理为止。此外，还有不打乱样本秩序条件下的有序样本的最优分割法、基于模糊数学的模糊聚类等。

（一） 数据变换

由于不同指标（变量）一般都有各自不同的量纲和数量级单位，为使数据具有可比性，需对数据进行变换处理。

（二） 聚类分析中的距离（相似性）尺度函数

距离尺度函数的选择取决于研究者想发现哪种类型的关系。1. 几何距离

几何距离可以衡量研究对象在空间上的距离远近关系，空间上相近的物体运用几何距离可以判断为同一类，而空间上较远的物体则判断为不同类。常见的几何距离函数有明氏距离。明氏距离在考查两物体的相似性时没有考虑不同分量量纲差异的影响，所以用明氏距离作相似性尺度时应该先对数据进行标准化处理，消除不同分量之间的量

纲差异。

2. 线性相关系数

几何距离比较适合于衡量样本间的相似性，或者基因在样本空间（如不同组织间）的相似性。当基因表达数据是一系列具有相同变化趋势的数据时，运用几何距离会丢失重要信息。采用皮尔森相关系数可衡量基因表达模式的相似性。

3. 非线性相关系数

某些在功能上有相关关系的基因虽然在表达上不具有严格的线性相关关系，但在时间点的波动趋势上却是相似的。两基因的表达具有同升或同降变化趋势，但明显不具有线性相关关系，在这种情况下可以用非线性相关关系模式来衡量基因间的距离。非线性相关关系模式一般用斯皮尔曼秩相关系数进行衡量。

4. 互信息

线性与非线性相关系数都只能衡量基因间的单调相关关系，而一些基因之间存在非单调的表达关系。对于这种非单调的表达相似关系，可以用互信息进行衡量。

在信息论中，熵是接收的每条消息中所包含信息的平均量，又被称为信息熵、信源熵、平均自信息量。这里，消息代表来自分布或数据流中的事件、样本或特征。在信息世界，熵越高，则能传输越多的信息，熵越低，则意味着传输的信息越少。

（三） 聚类分析中的聚类算法

聚类算法主要包括：分割算法（如 k 均值聚类、SOM 聚类等）、

分层算法（如层次聚类等）、基于密度算法、基于网格算法等。

1. 层次聚类

层次聚类算法是将研究对象按照它们的相似性关系用树形图进行呈现。进行层次聚类时不需要预先设定类别个数，树状的聚类结构可以展示嵌套式的类别关系。

层次聚类按层次的形成方式可以分为凝聚法和分裂法。凝聚法是自下而上的聚类方法，从单个点作为个体簇开始，每一步合并两个最邻近的簇。分裂法是自上而下的聚类方法，从一个包含所有点的簇开始，每一步分裂一个簇，直到仅剩下单点簇为止。

在层次聚类中，类的合并和分解按照一定的距离函数度量。在对含非单独对象的类进行合并或分裂时，常用的类间度量方法有：最小距离、最大距离、平均距离和质心距离。最小距离以两类间距离最近的两对象的距离作为两类的距离；最大距离以两类间距离最远的两对象的距离作为两类的距离；平均距离遍历两类中所有对象之间的距离，然后取平均值作为两类的距离；质心距离为分别计算两类的质心，然后以质心间的距离作为两类的距离。

2. k 均值聚类

k 均值聚类是根据聚类中的均值进行聚类划分的分割算法，适用于各种数据类型，受初始化问题的影响较小，算法简单，运算速度较快。具体的分析流程如下：①初始化类中心，随机选定 k 个类中心，例如可选取 k 个研究对象作为类中心；②计算每个对象与这些类中心的距离，并根据最小距离重新对相应对象进行划分；③重新计算每类

样本的均值，作为更新的类中心；④循环上述流程 2~3 次，直到每个聚类不再发生变化。

k 均值聚类可以看作是个优化问题，它的优化目标是 minimized 类内样本两两间的距离之和 $w(C)$ 。

k 均值聚类算法的聚类结果依赖于初始化的类中心，选取不同的类中心可能会有不同的聚类结构。可以采用多个初始化方式，选定具有最小 $w(C)$ 对应的聚类结果作为最佳的类结构。另外， k 均值聚类需预先指定类别个数，但是很多情况下实际上不知道真正的类别数，一些启发式的方法可以帮助确定 k 的取值。例如，假设有 8 个研究对象，遍历 8 个对象可能的聚类类别数，计算各种情况下的 $w(C)$ 值，选择 $w(C)$ 值下降最快时的 k 值作为最佳类别数。

3. 自组织映射聚类

自组织映射聚类 (SOM) 也属于分割算法，需要预设类别个数。在 SOM 神经网络中，若预设类别个数为 6，输出层的神经元 1~6 以栅格方式排列于二维空间，输出层的神经元有初始权重，根据输入样本向量与输出层神经元的距离，找到具有最短距离的神经元作为兴奋神经元，其他神经元根据与该兴奋神经元的距离确定不同的兴奋度；然后根据兴奋度的不同对神经元权重进行调整，完成一个学习过程；随着样本的继续输入，不断进行这种学习过程；最后神经元可以根据输入样本向量的特征，以拓扑结构展现于输出空间。

4. 双向聚类

一组基因表达上的相似性可能只限制在某些实验条件内，运用所

有实验样本对基因进行聚类会因为引入噪音而影响基因表达相似性的度量，而样本的相似性也常常不需要运用所有基因来计算，因而采用双向聚类来识别基因表达谱矩阵中同质的子矩阵，运用特定的基因子类识别样本子类。

双向聚类方法寻找疾病样本和致病基因簇之间的对应关系，该方法按样本和基因两个方向同时进行迭代聚类。

总之，聚类分析方法在基因表达谱数据中有重要的应用，即使没有类别结构的随机样本也可以得到类别结构。聚类分析应用于基因表达谱数据，为复杂疾病的亚型识别、致病机制及分子标记的识别提供了有效的工具。

二、主成分分析

（一）基本原理

主成分分析（PCA）是把多个指标化为少数几个综合指标的一种统计分析方法。在多指标（变量）的研究中，往往由于变量个数太多，且彼此之间存在着一定的相关性，因而使得所观测的数据在一定程度上有信息的重叠。当变量较多时，在高维空间中研究样本的分布规律就更麻烦。主成分分析采取一种降维的方法，找出几个综合因子来代表原来众多的变量，使这些综合因子尽可能地反映原来变量的信息量，从而达到简化的目的。其中，每一个综合因子是原来变量的线性组合，而且彼此之间互不相关；第一主成分是所有线性组合中方差最大者；第二主成分是与第一主成分不相关的所有线性组合中方差次大者，依此类推。

三、Fisher 判别

判别即根据观察数据对所研究的对象进行分类。按判别准则来分有 Fisher 判别和 Bayes 判别；按判别的组数来分有两类判别和多类判别；按区分不同总体所用的数学模型来分有线性判别和非线性判别；按判别时处理变量的方法来分有逐步判别和序贯判别等。Bayes 推理和支持向量机分类本章后续将有介绍，此处仅介绍线性 Fisher 两类判别。

基于 Fisher 准则，判别的结果应使两组间区别最大，使每组内的离散性最小。

第四节 贝叶斯推理

贝叶斯决策就是在不完全情况下，对部分未知的状态用主观概率估计，然后用贝叶斯公式对发生概率进行修正，再利用期望值和修正概率作出最优决策。基于贝叶斯定理的朴素贝叶斯模型是应用最为广泛的分类模型之一，其所需估计的参数很少，对缺失数据不太敏感，算法也比较简单，因此用途甚广。

一、贝叶斯定理

贝叶斯定理：设试验 E 的样本空间为 S、A 为 E 的事件； B_1, B_2, \dots, B_n 为样本空间 S 的一个划分且 $P(B_i) > 0$ ($i=1, 2, \dots, n$)，贝叶斯公式为

$$P(B_i|A) = \frac{P(A|B_i) P(B_i)}{P(A)} = \frac{P(A|B_i) P(B_i)}{\sum_{j=1}^n P(B_j) P(A|B_j)}, i=1, 2, \dots, n$$

二、朴素贝叶斯分类器

设每个样本具 $m+1$ 个属性, A_i ($i=1, 2, \dots, m$) 为条件属性, C 为决策属性; a_{ik} 表示第 A_i 个属性的第 k 个取值; c_j 是 C 的一个取值, 表示第 j 类。另外, 用 $|A|$ 表示集合 A 中元素的个数。所有样本数据的集合为 $\Omega=A_1 \times A_2 \times \dots \times A_m$, 则每个数据样本也就是 Ω 中的元素表示为一个 m 维特征向量 $X=(x_1, x_2, \dots, x_m)$, 这里 x_i 表示属性 A_i 的取值。 $T \subseteq \Omega$ 是训练集样本的集合。 (X, c_j) 表示样本 X 属于 c_j 类, 则分类问题就是决定 $p(c_j|X)$ 。

第五节 隐马尔可夫模型

一、马尔可夫及隐马尔可夫模型

马尔可夫模型是一种能用数学分析方法研究自然过程的方法, 该方法推动了概率论的新分支——随机过程论的发展。

马尔可夫性即无后效性, 它的直观解释是: 在已知系统目前的状态(现在)的条件下, 它未来的演变(将来)不依赖于它以往的演变(过去)。具有马尔可夫型的离散状态随机过程称为马尔可夫链, 这种过程也称为无记忆的单随机过程。假设这种单随机过程的取值(状态)是离散的, 则又可以将它称为无记忆的离散随机过程。相对马尔可夫过程, 人们又提出了一种状态及其行为都为不可测(随机)的双随机过程。从外界来看, 这种过程的状态是随机且不可见(隐藏)的, 而行为是可见而不可测的, 因此, 这种双随机过程也被称为隐马尔可夫模型(HMM)。通常, HMM 对应的状态也被假设为离散的, 且其演变也是无记忆的, 因而也被称为无记忆的离散双随机过程。

一个隐马尔可夫链 $\{X_t, Y_t\}$ 包含两部分: 一个潜在的、不可观察

的有限状态马尔可夫链 $\{X_t\}$ 和一个外显的、可观察的随机过程 $\{Y_t\}$, Y_t 的分布依赖于 X_t 。HMM 是用概率统计的方法来描述时变信号的过程。它是一个动态的统计模型, 可以用有限状态机来描述。有限状态机可以从一种状态转移到另一种状态, 每个状态转换有不同的概率。某状态是否转移到下一状态取决于该状态的状态转移概率, 而在某一状态下能看到哪一个观测值, 也取决于该状态的观测概率。

二、隐马尔可夫模型的数学描述

通常隐马尔可夫模型 (HMM) 是一个五元组 $(\Omega_X, \Omega_O, A, B, \pi)$ 。其中:

1) 状态的有限集合 $\Omega_X = \{q_1, \dots, q_N\}$, N 代表隐马尔可夫模型中的状态数。虽然在 HMM 中状态数是隐含的, 但在实际应用中它是有确切物理含义的。

2) 观察值的有限集合 $\Omega_O = \{v_1, \dots, v_M\}$, M 代表每个状态中可以观察到的符号数。

3) 状态转移概率 $A = \{a_{ij}\}$, $a_{ij} = P(q_{t+1}=j|q_t=i)$ $1 \leq i \leq N, 1 \leq j \leq N$ 。

4) 输出概率 $B = \{b_{jk}\}$, $b_{jk} = P(o_t=v_k|q_t=j)$ $1 \leq k \leq M, 1 \leq j \leq N$ 。

5) 初始状态分布 $\pi = \{\pi_i\}$, $\pi_i = P(q_1=i)$ $1 \leq i \leq N$ 。

基于这些特征参数, HMM 产生观察序列 $O = (o_1, o_2, \dots, o_T)$ 的过程如下所述。

1) 根据初始状态概率分布 π , 选择一个初始状态 $q_i=i$ 。

2) 置观察时间 $t=1$ 。

3) 根据当前状态下观察符号的概率分布 B , 选择 $o_t=v_k$ 。

4) 根据状态转移概率分布 A , 从当前状态 $q_t=i$ 转移到下一个状态 $q_{t+1}=j$ 。

5) 置 $t=t+1$, 如果 $t < T$ (观察时间序列为 $t=1, 2, \dots, T$), 则回到第 3) 步, 否则结束。

综上所述, 一个 HMM 完全可以由 2 个模型参数 N 、 M 及 3 个概率分布参数 A 、 B 、 π 来确定。为了方便起见, 通常将隐马尔可夫模型定义为 $\lambda = (A, B, \pi)$ 。依据观察符号的概率分布特点 (离散还是连续), HMM 可分为离散隐马尔可夫模型和连续隐马尔可夫模型。

四、基于 HMM 的基因识别程序及 HMM 的优缺点

目前已经开发出不少基于 HMM 的基因识别程序, 典型的有 VEIL、HMMgene、GeneMark.hmm、Geneie 及 GENSCAN。VEIL 用于人类基因寻找, 它与 HMMgene 的主要区别是未使用高阶状态; Geneie 将神经网络结合到一个 HMM-like 模型中; GENSCAN 更类似于 HMMgene, 但在拼接位点使用了一个不同类型的模型。

GeneMark.hmm: 该程序是在原来 GeneMark 基础上融入了 HMM 算法框架, 同时使用了核糖体结合位点模型提高了转录起始密码的预测性。用包括 10 个完整细菌基因组在内的几套测试资料对该系统进行评估, 表明其在基因预测的准确程度上明显优于 GeneMark。

Geneie 是一个稳健的 HMM 系统, 综合了来自诸如信号传感器 (拼接位点、起始密码子等)、信号存储传感器 (外显子、内含子、基因间序列等)、mRNA 阵列、序列表达标签 (EST) 等不同来源的信息。采用了模块化编程思想, 每种状态的模块进行单独训练, 新的状

态模块可以很容易地添加到系统中，从而使系统的适用范围和灵敏度得到很大提高。

GENSCAN 用明确的 HMM 状态构建的基因组序列结构模型，信号的检测则采用加权矩阵、加权排列和最大化独立分解技术 (MDD)。使用者普遍认为基于模型的 GENSCAN 识别效果不错。

HMMgene 在同一序列上能够识别几个完整或部分基因，也可以用于预测结合位点和启动/终止密码子。如果已知序列的某些特征，如 EST 采样、蛋白质和重复元素，可以把这些区域锁定为编码区和非编码区，加入这样的约束条件后可以识别出最佳的基因结构。

GeneHackerPlus 的核心也利用了 HMM 技术。从某种意义上讲，它是一种“局部”模型，即在一段编码区内从转录控制区开始到终止密码子结束，在识别潜在的编码区和精确定位转录起点方面效果不错。

HMM 在生物序列分析中的应用非常广泛，不仅可以模拟蛋白质家族对数据库进行搜索，产生多序列比对，还可以用于基因寻找、蛋白质二级结构预测和跨膜片段预测等。HMM 是一种功能非常强大的模型，优于许多其他的统计学模型。它以概率理论作为基础，可互相结合成更大的 HMM。模型本身很形象化，易于理解，建模时可结合先进的生物学知识，还可利用这些知识约束模型的训练过程。但其也存在一些缺点，如下所述。

- 1) 训练所用的样本数有限。由于 HMM 是一个统计模型，抽样样本存在差异，使得训练结果往往不能代表一般情况，存在偏差。

- 2) HMM 是一个线性模型，不能描述蛋白质序列中的高阶相关

性。这些关系包括非相邻氨基酸之间的氢键，以及链与链之间的氢键、二硫键等对蛋白质结构的影响。在蛋白质的折叠中，序列上相距很远的氨基酸在物理上可以很近，这不能由现行模型来预测。

3) 只有当事件独立时，模型产生一个序列的概率才是产生各个独立氨基酸的概率的乘积。因此，只有当序列中出现某氨基酸与相邻的氨基酸无关时，才能这样获取数据。实际上相邻序列之间的相关性是非常明显的。例如，疏水性氨基酸经常会连续出现，在蛋白质高级结构中它们会聚集在蛋白质的内部以避开水分子。

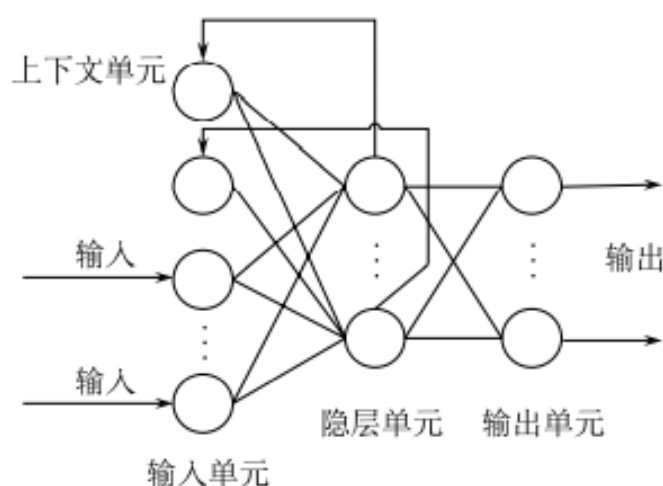
第六节 动态神经网络

人工神经网络(ANN)是一种模仿动物神经网络行为特征，进行分布式并行信息处理的算法数学模型。这种网络依靠系统的复杂程度，通过调整内部大量节点之间相互连接的关系，从而达到处理信息的目的。人工神经网络具有自学习和自适应的能力，可通过预先提供的一批相互对应的输入-输出数据，分析掌握两者之间潜在的规律，最终根据这些规律，用新的输入数据来推算输出结果，这种学习分析的过程被称为“训练”。

神经网络模型种类繁多，按是否含有延迟或反馈环节可以分为静态神经网络和动态神经网络，含有延迟或反馈环节的神经网络称为动态神经网络。静态神经网络只能用于处理文字识别、空间曲线的逼近等与时间无关的问题，如BP网络、RBF网络、样条函数网络、子波函数网络等；动态神经网络则可以处理与时间有关的对象，如时间序列建模和预测、动态系统辨识、语音识别等。典型的动态神经网络有

Elman 网络、Hopfield 网络、ART 网络、递归神经网络 (RNN)、NARX 神经网络、PID 神经网络、局部反馈总体前馈网络、细胞神经网络等。

本书主要介绍较典型的 Elman 动态神经网络 (如下图)。该网络是 J.L.Elman 于 1990 年首先针对语音处理问题而提出来的, 是一个具局部记忆单元与局部反馈连接的前向神经网络。其前馈连接包括输入层、隐含层、输出层, 连接权重可通过学习修正; 反馈连接由一组结构单元构成, 用来记忆前一时刻的输出值, 连接权值固定。这种反馈连接的结构使得其训练后不仅能识别与产生空域模式, 还能识别与产生时域模式。该网络除普通的隐含层外, 还有一个特别的隐含层, 称为关联层 (或联系单元层); 关联层从隐含层接收反馈信号, 每一个隐含层节点都有一个与之对应的关联层节点连接。关联层的作用是通过联结记忆将上一个时刻的隐层状态连同当前时刻的网络输入一起作为隐层的输入, 相当于状态反馈。隐层的传递函数仍为某种非线性函数 (一般为 Sigmoid 函数), 输出层与关联层为线性函数。



一、基于 MATLAB7.0 的 Elman 神经网络实现

(一) `newelm`

功能：生成一个 Elman 神经网络。

(二) `traingdx`

功能：采用自适应学习速率动量梯度下降反向传播算法对网络进行训练。

(三) `learngdm`

功能：动量梯度下降权值和阈值学习函数。

(四) `init`

功能：初始化神经网络函数。

(五) `train`

功能：神经网络训练函数。

(六) `sim`

功能：对网络进行仿真。

(七) `tansig`

功能：正切 sigmoid 传递函数。

(八) `logsig`

功能：对数 Sigmoid 传递函数。

(九) `purelin`

功能：纯线性传输函数。

二、Elman 神经网络应用示例——内含子与外显子识别

数据集来源于 HMR195 数据集

(<http://www.imtech.res.in/raghava/genebench/datasets.html>)，并选取长

度为 42bp 以上的外显子（899 个）和内含子（751 个），从中各随机抽取 100 个作为独立测试集，其余为训练集，分别提取 1~3 长度的核苷酸组成成分作为序列的表征值（共 84 个）。基于 MATLAB7.0 的代码如下：

```
net=newelm (minmax (p), [51, 1], {'tansig', 'purelin'}); %创建一个 Elman 神经网络，隐含层的神经元个数为 51 个，1 个输出层神经元，隐含层激活函数为 tansig，输出层激活函数为 purelin，其中 p 为训练样本数据。
```

```
net.trainparam.epochs=3000; %设置网络的最大训练次数为 3000 次
```

```
net.trainparam.goal=0.0001; %设置网络训练后的目标误差
```

```
net=init (net); %对创建的网络进行初始化，设置权值和阈值的初始值
```

```
net=train (net, p, t); %使用训练函数对创建的网络进行训练，t 为给定训练样本数据 p 对应的类别，用 1 和 -1 表示两种类别
```

第七节 深度学习

深度学习是机器学习的一个子领域，其核心是“表征学习”，即模型在没有明确的专家先验经验指导下，可以自动学习并提取输入数据的特征。低层特征（如图像数据中的边缘）会向前移动到下一层，在该层中提取更高层、更抽象的特征（如形状），并随后进行进一步的整合、聚类、回归、分类等下游任务。因此，深度学习被认为能发现训练数据中的内在层次结构与互作关系，可用于各类生物信息任务，

也是目前人工智能领域的主要工具。

然而，深度学习在能够表征提取复杂数据特征的同时，需要大规模的数据用于训练，在诸多小样本领域往往泛化（**generalization**）性能不佳。21 世纪以来，随着第二代测序、单细胞测序、空间组学等高通量生物数据生产技术的高速发展，生物研究逐渐出现了从传统假设驱动到数据驱动的研究范式转变。这些不断增长的复杂数据描述了生物体从分子到环境的各尺度信息，也大大缓解了深度学习训练数据不足、训练标签可靠性不佳的问题。

此外，由于生命科学中的许多问题需要对实体（如基因、蛋白质）之间的复杂相互作用进行解码，通过结合这些多模态（**multimodal**）、多维度、多尺度的海量生物数据，深度学习方法被认为对生物医学具有变革性的影响。

一、深度学习理论基础

（一）深度学习框架

深度学习框架是一种界面、库或者工具，它让我们在不必深入了解底层算法的前提下，能够更加快速方便地构建所需的深度学习模型。现有的框架预先用更高效快速的低级语言和算法实现了深度学习所需的基本组件（如全连接层、卷积层等），让数据科学家能够更加快速地构建与迭代模型，同时也为用户提供了强大的社区支持。

目前，学术界与工业界主流的深度学习框架为 TensorFlow、Keras 和 PyTorch。TensorFlow 是 Google 于 2015 年开源的深度学习框架，其底层由高效的 C++ 和 CUDA 代码构成，其接口支持 Python、C+

十、Java、Go、R 等计算机语言，易于在不同设备上进行模型的部署。Keras 用 Python 编写，是构建在 TensorFlow 之上的高级 API。Keras 以其计算速度快、用户友好和易于访问而闻名，旨在尽可能减少用户操作，并使其模型真正容易被用户理解，大大降低了深度学习应用的门槛。Keras 模型可以很容易地部署到 web、iOS 和 Android 上。目前 Keras 整套架构已经封装进了 TensorFlow，在 TF.keras 上可以完成 Keras 的所有事情。PyTorch 是 Facebook 人工智能研究院团队于 2017 年开源的 Python 包，与 Tensorflow 有相似之处，因此与其有着激烈的竞争。PyTorch 主要用于研究和生产部署，因其特有的自动微分架构在学术界具有强大的优势，但由于其前期缺乏对移动端的支持，在商用领域普及度不及 TensorFlow。

近年来，国内许多企业也开源了其研制的深度学习框架。飞桨（PaddlePaddle）基于百度 2013 年自主研发的深度学习平台 Paddle，在深度学习框架方面覆盖了搜索、图像识别、语音语义识别理解、情感分析、机器翻译、用户画像推荐等多领域的业务和技术支持。2019 年，百度还推出了多平台高性能深度学习引擎 PaddleLite（PaddleMobile 的升级版），为 PaddlePaddle 生态完善了移动端的支持。华为于 2020 年 3 月开源了一款支持端边云全场景的深度学习训练推理框架（MindSpore），旨在为开发者提供友好、高效的体验，提供昇腾 AI 处理器原生支持及软硬件协同优化。同期，旷世也开源了其工业级深度学习框架天元（MegEngine）。架构上天元被划分为计算接口、图表示、优化与编译、运行时管理和计算内核 5 层，可极大简

化算法开发流程，尤其适用于大模型算法训练。计图（Jittor）出自清华大学，开发团队来自清华大学计算机系图形学实验室，是国内第一个由高校开源的深度学习框架。与主流的深度学习框架 TensorFlow、PyTorch 不同，Jittor 是一个完全基于动态编译（just-in-time）、使用元算子和统一计算图的深度学习框架。Jittor 前端语言为 Python，使用了模块化的设计，类似于 PyTorch、Keras；后端则使用高性能语言编写，如 CUDA、C++。

（二）深度学习模型

1. 前馈神经网络

前馈神经网络，又称深度前馈网络、多层感知机，是人工神经网络中最为基础的模型。前馈神经网络的目标是近似某个函数 f^* ，模型的学习过程可以视作一组基函数对某个复杂函数的逼近过程。

前馈神经网络采用一种单向多层结构，由一个输入层、一个或多个隐藏层，以及一个输出层构成，除输出层外，每个层与下一层连接。

2. 卷积神经网络

卷积神经网络（CNN）由若干个卷积和池化操作组成，是一种专门用来处理具有类似网格结构的数据的神经网络，如时间序列数据（一维网格）和图像数据（二维网格）。卷积是一种特殊的线性算子，卷积运算通常用星号表示：

$$s(t) = (x * w)(t)$$

上式中，卷积的第一个参数（函数 x ）通常叫做输入；第二个参数（函数 w ）称为核函数，输出被称作特征映射。卷积操作过程中发

挥作用的功能组件为核函数，又称卷积核。卷积核在神经网络的运算过程中以一个带有固定参数的矩阵表示，通常为 $m \times n$ 的二维矩阵，这一大小的区域又称为卷积核的感受野。在图像领域的应用中，卷积层基于其稀疏连接和共享权重的特性，能够有效地利用数据的隐式结构，具有优异的特征提取能力，具体表现为在图像识别中能很好地发现物体的轮廓和颜色的深浅等，并随着层数的加深将信息抽象成人眼无法判别的高维全局特征。

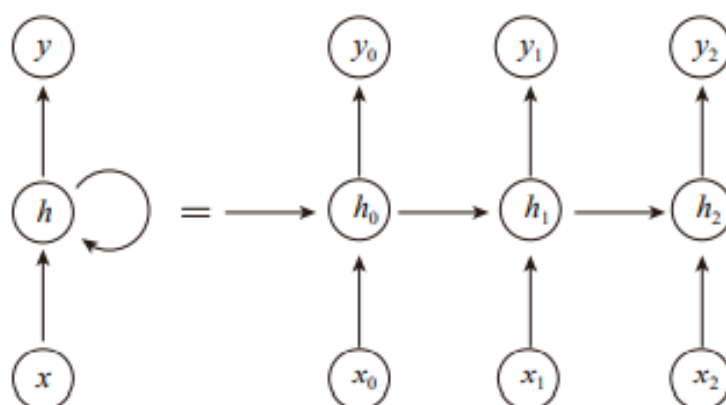
卷积网络利用卷积层捕捉图像中的局部信息，并使用池化层将卷积核提取的局部信息融合。池化层使用池化函数来提取输入的特征。池化函数使用某一位置的相邻输出的总体统计特征来代替网络在该位置的输出。常见的池化函数有最大池化、平均池化、加权平均池化等。以最大池化为例，该函数以相邻矩形区域内的最大值作为该点的输出。

3. 循环神经网络

循环神经网络（RNN）是一类用于处理序列数据的神经网络，其中节点之间的连接沿时间序列形成一个有向图。这允许它表现出时间动态行为。从前馈神经网络衍生出来的 RNN 可以利用其隐藏状态来处理可变长度的输入序列。RNN 的目的是用来处理序列数据。其在自然语言中贡献巨大，中文分词、词性标注、命名实体识别、机器翻译、语音识别都属于序列挖掘的范畴。序列挖掘的特点就是某一步的输出不仅依赖于这一步的输入，还依赖于其他步的输入或输出。在序列挖掘领域传统的机器学习方法有隐马尔可夫模型（HMM）和条件

随机场 (CRF)，近年来又开始流行深度学习算法 RNN 以及基于注意力机制的 Transformer 模型。

与前馈神经网络和卷积神经网络一样，递归神经网络利用训练数据进行学习。RNN 与上述网络的区别在于它的“记忆”，其模型结构从先前的输入中获取信息，从而影响当前的输入和输出。传统的深度神经网络假设输入和输出是相互独立的，而递归神经网络的输出依赖于序列中的先验元素。从理论上讲，RNN 可以利用任意长序列中的信息，但在实践中，RNN 仅限于回顾几个步骤。



不同于传统的深层神经网络在每一层使用不同的参数，RNN 在所有步骤中共享相同的参数 (U , V , W)。这一操作大大加快了模型的计算效率，即在每个步骤中执行相同的任务，只是使用不同的输入。这大大减少了需要学习的参数的总数。

RNN 在 NLP 领域表现出更为卓越的性能，其衍生的变体如长短记忆网络 (LSTM)、门控循环单元网络 (GRU) 在 NLP 领域都有出色的表现，并被整合到流行的应用程序中，如 Siri、语音搜索和 Google 翻译。

二、深度学习在生物信息学中的应用

（一）深度学习与基因组学

深度学习目前已在基因组学、转录组学、蛋白质组学（如 AlphaFold 预测蛋白质三维结构等）、代谢组学等组学中取得了重大进展。

（二）深度学习与生物网络

生物数据的增加和各种生物分子相互作用数据库的形成使我们能够获得多样化的生物网络，它们为进一步了解生物系统、发现复杂疾病和寻找治疗药物提供了丰富的原材料。但是，数据的增加也增加了生物网络分析的难度。因此，需要能够处理大量复杂数据的算法来更好地分析这些网络结构的数据并挖掘它们的有用信息。

使用深度学习技术进行网络数据计算的早期模型是 DeepWalk，其使用图中节点与节点的共现关系来学习节点的向量表示，并通过随机游走(RandomWalk)在图中进行节点采样。在 DeepWalk 的基础上，Node2vec 和 Metapath2vec 等算法陆续被开发出来，目前已提出了许多应用于网络数据结构的深度学习算法。

最近，大量关于图数据结构方向的研究极大地推动了图数据结构的分析技术。图神经网络是一种相对较新的深度神经网络，可以从图数据中学习层次非线性和邻域信息，包括蛋白质功能预测、药物发现和开发中的多药预测、代谢途径预测、药物-靶点预测、药物特性预测、药物-药物相互作用预测和疾病诊断。

许多研究提出了基于神经网络处理方法计算节点邻居信息加权

平均的模型。这些使用神经网络处理图数据结构的模型统称为图神经网络（GNN）。GNN 的概念最早于 2005 年由 Gori 等提出。后来，针对图数据结构开发了许多 GNN 方法，包括图自动编码器（GAE）、图卷积神经网络（GCN）和图循环神经网络（GraphRNN）等。

（三）深度学习与生物医学影像

生物医学影像是深度学习应用的另一热门领域。相较于普通图像，生物医学影像处理任务往往具有数据集规模极小、标注成本高、类别复杂度较低、样本不均衡、关键任务（missioncritical）与长尾（longtail）问题突出、可解释性要求较高的特点，因而该领域具有较高的开放性与挑战性，且涉及大量临床数据收集、处理、应用部署的伦理问题。目前，深度学习已经大规模应用于大多数用于患者临床治疗的生物医学图像，如磁共振成像（MRI）、X 线、电子计算机断层扫描（CT）、正电子发射断层扫描（PET）和组织病理学成像。此外，诸如消化道内镜影像、皮肤镜影像、眼底镜影像等光镜领域目前也有一些涉及深度学习的工作，且部分已经进行了临床试验或已批准上市，用于辅助临床医生进行决策。

（四）深度学习与生物文本挖掘

目前，生物医学文本语料库规模正在高速增长，截至 2021 年，仅 PubMed 数据库中已超过 3000 万条摘要，大量非结构化文本中蕴含着丰富的未被合理利用的生物学信息。生物医学文本挖掘的目标就是自动挖掘大规模的生物医学文本以获取相关信息，然后将其构建为可管理的类似数据库的数据结构。生物医学文本挖掘主要包含以下五

类任务：命名实体识别（NER）与规范化（NEN）、生物医学文本分类、关系提取（RE）、路径提取和假设生成。生物医学命名实体识别和规范化以及文本分类是其他任务的基础，它们是关系抽取等其他下游任务的必要步骤。而路径提取和假设生成通常在关系抽取之上进行。上述任务的实现长期以来一直依赖于传统的机器学习技术，但目前深度学习在该领域已经取得了显著的优势地位。

为了使用深度学习算法来对生物医学文本进行分析，首先需要将文本中的词转换为数字的向量以进行输入，该过程称为词嵌入。词嵌入过程中，每个单词或词组被映射为实数域上的向量，其结果就生成了词向量。

Word2vec 是首先普及使用神经网络学习词嵌入的想法的模型，并在当时的许多自然语言处理任务中取得了 SOTA 结果。新一代深度词嵌入的典型代表为 Google 开发的 Transformers（BERT），BERT 是一种引入了自注意力机制的多层双向编码器。

BioBERT 是一个专门用于生物医学文本挖掘的训练模型。它使用原始 BERT 模型的权重进行初始化，然后在所有 PubMed 摘要与 PMC 全文语料上进行了迁移学习，最终在几个重要任务（生物医学 NER、生物医学关系和生物医学问答）上得到了超过 BERT 的表现。

生物医学命名实体识别（BioNER）的目标是从文本中识别出关于生物医学的感兴趣实体。

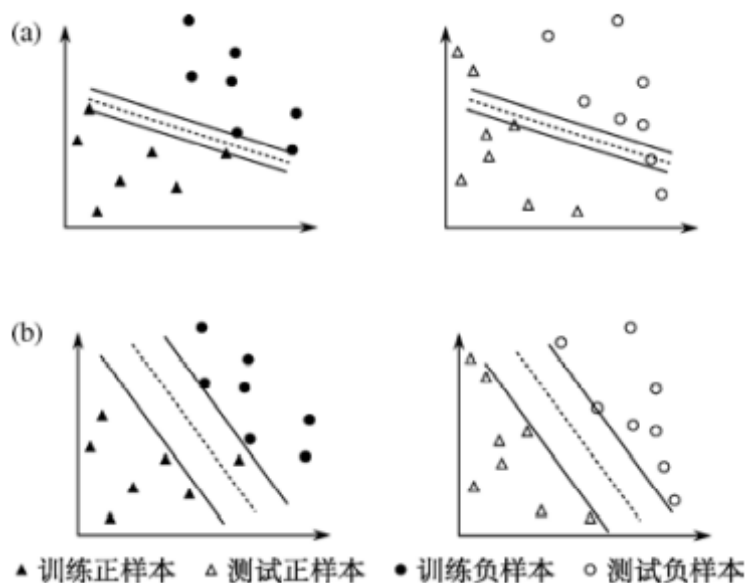
在深度学习方法爆发之前，最先进的 NER 系统是使用预先设计好特征集的 CRF 模型。

第八节 支持向量机

支持向量机是基于统计学理论（SLT）的通用机器学习方法，由 Cortes 和 Vapnik 于 1995 年首先提出来，是近年来机器学习研究的一项重大成果。

一、支持向量机分类

对线性可分的训练数据集，支持向量机分类根据结构风险最小化原则，在特征空间构造最优分类面，使得对未知样本的分类误差最小，而且要使两类之间的距离最大，如下图所示。确定最优分类面的一组样本即为支持向量。



二、支持向量机回归

支持向量机回归（SVR）与 SVC 相似，但 SVR 所求超平面是使所有样本点到超平面的距离为最小。对于线性回归问题，给定样本集 (x_i, y_i) ，其中 $i=1, \dots, n$; $x \in \mathbb{R}^d$; $y \in \mathbb{R}$ ，问题变为寻求一个最优超平面，使得在给定精度 ε ($\varepsilon \geq 0$) 条件下可以无误差地拟合 y ，即所

有样本点到最优超平面的距离都不大于 ε ；考虑到允许误差的情况，可引入松弛变量 ξ 和 $\xi^* \geq 0$ ，以及惩罚参数 $C > 0$ ，其寻优问题转化为相应的二次规划问题。

三、SVM 训练算法

SVM 的优异性能在许多实际问题的应用中尽管已得到验证，但因训练算法速度慢、算法复杂而难以实现，以及检测阶段运算量大等缺陷限制了其进一步的广泛应用。传统的利用标准二次型优化技术解决对偶问题的方法可能是训练算法慢的主要原因。首先，SVM 方法需要计算和存储核函数矩阵，当样本点数目较大时，需要很大的内存。其次，SVM 在二次型寻优过程中要进行大量的矩阵运算，多数情况下，寻优算法是占用算法时间的主要部分。

大多数解决对偶寻优问题算法的一个共同思想是循环迭代。将原问题分解成若干子问题，按照某种迭代策略，通过反复求解子问题，最终使结果收敛到原问题的最优解。根据子问题的划分和迭代策略的不同，又可以大致分为以下两类。

（一） 块算法

块算法是基于这样一个事实，即去掉 Lagrange 乘子等于零的训练样本不会影响原问题的解。对于给定的训练样本集，如果其中的支持向量是已知的，寻优算法就可以排除非支持向量，只需对支持向量计算权值（即 Lagrange 乘子）即可。实际上支持向量是未知的，因此“块算法”的目标就是通过某种迭代方式逐步排除非支持向量。

（二） 固定工作样本集方法

固定工作样本集的方法和块算法的主要区别在于：块算法的目标函数中仅包含当前工作样本集中的样本，而固定工作样本集方法虽然优化变量仅包含工作样本，其目标函数却包含整个训练样本集，即工作样本集之外的样本的 Lagrange 乘子固定为前一次迭代的结果，而不是像块算法中那样设为 0。固定工作样本集方法还涉及一个确定换出样本的问题（因为换出的样本可能是支持向量）。这样，这一类算法的关键就在于找到一种合适的迭代策略，使得算法最终能收敛并且能较快地收敛到最优结果。

四、SVM 的优缺点

SVM 基于 SRM 原则并要求分类间隔最大，避免了过拟合，因此其泛化推广能力优异。其算法最终将转化成二次型寻优问题，理论上得到的是全局最优点，解决了在神经网络方法中无法避免的局部极值问题。SVM 的最终决策函数仅由少数支持向量确定，计算复杂度取决于支持向量数目，而与样本空间维数无关，避免了“维数灾难”。

SVM 的主要缺点包括以下 3 点。

- 1) 可解释性差。
- 2) 对大训练样本计算复杂度高。
- 3) 其核函数的选择缺乏先验的理论指导，是经验性的。

五、基于 Python 的 LIBSVM 简介

LIBSVM 是由台湾大学林智仁 (LinChih-Jen) 教授等开发设计的一个简单、易于使用和快速有效的软件包 (Chang and Lin, 2001)，可免费获得 <http://www.csie.ntu.edu.tw/~cjlin/libsvm>。它提供了 LIBSVM

的 C++ 语言的算法源代码，以及 Python、Java、R、MATLAB、Perl、Ruby、LabVIEW、C#.net 等各种语言的接口，可方便在 Windows 或 UNIX 平台下使用，且研究者可根据自己的需要进行改进（如设计使用符合自己特定问题需要的核函数等）。另外还提供了 Windows 平台下的可视化操作工具 SVM-toy，并且在进行模型参数选择时可以绘制出交叉验证精度的等高线图。

（一）LIBSVM 的一般操作步骤

- 1) 按照 LIBSVM 软件要求的格式准备数据集；
- 2) 可选择地对数据进行规格化；
- 3) 选择最优核函数；
- 4) 采用 grid.py（分类）或 gridregression.py（回归）自动寻找最优核函数参数 C、g 和 p（其中参数 p 仅用于回归）；
- 5) 以最优参数 C、g 和 p 对训练集训练并建立模型；
- 6) 利用获取的模型进行测试与预测。

（二）LIBSVM 使用的数据集格式

该软件使用的训练数据和检验数据文件格式如下：<label><index1>: <value1><index2>: <value2>...

其中，<label>是训练数据集的目标值，对于分类，它是标识某类的整数，两类时为 ± 1 ，多类时为 0, 1, ..., n；对于回归，label 为任意实数。<index>是以 1 开始的整数，可以是不连续的；<value>为实数，即我们常说的自变量或特征值。测试集中的 label 只用于计算准确度或误差，未知时可填任意数，亦可空着。在程序包中含有

训练数据实例：`heart_scale`，以便参考及练习。

(三) 子程序使用方法

主要用到 5 个子程序：`svmscale`（数据规格化），`svmtrain`（训练建模），`svmpredict`（使用已有的模型进行预测），`grid.py`（对分类问题，基于 Python 自动寻找核函数最优参数 C 、 g ），`gridregression.py`（对回归问题，基于 Python 自动寻找核函数最优参数 C 、 g 、 p ）。

第九节 MATLAB 的应用实例

MATLAB 是美国 MathWorks 公司出品的商业数学软件，是用于算法开发、数据可视化、数据分析及数值计算的高级技术计算语言和交互式环境（<http://www.mathworks.com>）。其基本数据单位是矩阵，它的指令表达式与数学、工程中常用的形式十分相似，故解算相同的问题用 MATLAB 要比用 C、FORTRAN 等语言简捷得多。MatLab 具有工作平台与编程环境友好、程序语言简单易用、科学计算与数据处理能力强大、图形处理功能出色、模块集合工具箱应用广泛、程序接口与发布平台实用等诸多优点。

随着生物信息学的快速发展，MATLAB7.0 以上版本提供了一个用于生物信息分析的生物信息工具箱，它具有简单易学、操作方便且功能强大等特点，即使不懂编程也能用它进行生物信息的分析研究。利用生物信息工具箱，可执行成对序列或多序列的比对，进行序列转换，绘制序列图谱，进行蛋白质分析和氨基酸序列分析，创建并分析系统发生树，进行微阵列数据分析等。

第十三章 生物信息学编程基础

第一节 Linux 操作系统

一、Linux 简介

Linux 源于古老的 UNIX 系统，其最初的版本是 1991 年 Linus 在 Minix 的基础上开发的，在其出现开始的十几年内它的发展十分迅速，尤其随着网络的不断普及，全世界的程序人员对于这个操作系统越来越有兴趣，于是不断协同工作使 Linux 的版本不断更新、功能不断完善。

Linux 最基本的优点就是经济，因为 Linux 的内核是完全免费的，其用户或厂商能够自行地搭配其他应用程序的特性，目前世界上已有超过百种的不同组合。当然，光是经济这个优点还是不够的，其能够为广大科学家青睐，是有多方面原因的。首先，其性能稳定，能执行多用户、多任务、多线程操作，而每一个进程的内存占用相对于 Windows 来说更合理，因此即使处理很大规模的数据也不容易出现死机的情况。其次，Linux 程序的兼容性非常好，它几乎与现今的所有主流 UNIX 实现交互式的兼容，同时它也支持大多数的文件系统，如 FAT 和 NTFS 等。最后，其强大的命令行终端与方便的图形界面相结合，在可视化的条件下还可以很便捷地使用命令行实现批量的任务。

Linux 的发行版有很多，根据软件包管理方式的不同可以分为两类：一种是使用 RPM 方式，包括 RedHat、Fedora、SuSE，另一种则是使用 dpkg 方式，包括 Debian、Ubuntu 等。各个版本的操作在大体上是相同的，但在一些细节方面也存在不同。其中最有名的是 Red Hat

Linux，它几乎已经成为 Linux 的代名词，因为其方便简易的安装和操作使用，用户可以免去繁杂的安装和设置工作，尽快开始使用 Linux 的强大功能。Red Hat Linux 主要分为两个系列：一个是收费的企业版 Red Hat Enterprise Linux；另一个是 Fedora 社区开发的免费的 Red Hat Fedora Core，其主要定位于桌面用户，适用于一般的计算环境，但也有一些缺陷，如 yum 源太少，最新推出的版本为 Fedora33。

另一个常用的版本是 Ubuntu Linux，它是一个基于 Debian 的 Linux 操作系统。Debian 是一个广受称道、技术先进且有着良好支持的发行版。Ubuntu 在其技术上改进，旨在可以为桌面和服务器的提供一个最新且一贯的 Linux 系统。Ubuntu 囊括了大量从 Debian 发行版精挑细选的软件包，同时保留了 Debian 强大的软件包管理系统，以便简易地安装或彻底地删除程序。与大多数发行版附带数量巨大的可用、可不用的软件不同，Ubuntu 的软件包清单只包含那些高质量的重要应用程序。Ubuntu 提供了一个健壮、功能丰富的计算环境，既适合家用又适用于商业环境。项目花费了大量必要的时间，努力精益求精，每 6 个月就会发布一个版本，以提供最新、最强大的软件，现在最新的版本是代号为 Ubuntu20.04 (2020-04-23)。尽管 Linux 的发行版众多，但他们使用的内核都是由 <http://www.kernel.org> 发布的，选择的软件几乎都是知名软件，此外还有一些标准规范开发者，使发行版之间的差异不至于过大，所以对我们而言选择哪一种 Linux 发行版并没有太大影响。

二、 Linux 常用命令行操作

在使用 Linux 之前，我们需要获得 Linux 操作系统，可以选择安装虚拟机或者购买云服务器进行远程连接。这里先强调 Linux 与 Windows 的几点不同之处：①Linux 的命令和文件都是区分大小写的；②Linux 的目录结构是单根的，没有盘符的概念；③Linux 文件中的换行方式是\n，而 Windows 下是\r\n；④Linux 中输入密码屏幕上没有任何显示，不会显示*号。

正如前面提到的，Linux 是强大的命令行操作与方便的图形化界面的结合。以下的用法均是在 Ubuntu12.04 中运行的结果，与其他版本的 Linux 可能存在差异。

在进入 Linux 系统之后，我们可以看到一个不亚于 Windows 的图形界面，称为 GNOME 桌面环境，可以像 Windows 一样有双击操作、下拉菜单操作等。在上方工具栏的系统工具一项中有一个名为“终端”的工具，点开之后是命令行操作的窗口，是一个类似于 DOS 界面或者 Windows 下 cmd 界面的交互窗口。我们知道，交互窗口都会有提示符。例如，我们以 Test 用户登录以后就会出现下列提示符：

```
[Test@localhost~] $
```

我们可以来逐个分析一下这个提示符。

[] 内是用户登录的信息，其中包括：

先是当前登录的账号，如 Test，最初进入终端的时候，登录的账号就是登录系统时的账号。但是这并不是一成不变的，用户可以根据自己的需要来登录不同的账号。登录其他账号的方法很简单，su 命令就可以实现：

```
[Test@localhost Documents] $su-Test2
```

Password:

```
[Test2@localhost~] $
```

上例显示 `su` 命令不仅使登录权限切换到指定的账号，系统的当前目录还自动切换到对应账号的主目录。如果我们直接使用不带任务参数的 `su` 命令，其作用就是使当前用户具有管理员的权限，但并不改变当前目录。

然后是所在主机名，登录本机的话就是 `@localhost`，`localhost` 是本地的默认的主机名，当用户只是进行本地操作的时候，一般主机是不会变化的。当然，你也可以改变本地的主机名，或者远程登录别的机器，此时的主机名就会起变化。改变主机名需要管理员权限。

```
[root@localhost Test] hostname myhost.mydomain
```

```
[root@myhostTest]
```

最后是当前所在的目录，如例子中的 `~` 表示当前用户的主目录，也就是 `/home/Test/` 这个目录。Linux 的目录结构与 Windows 的存在很大的差异，在 Linux 中，最开始的“`/`”表示 Linux，所有的文件、目录都是位于根目录之下，有点像 Windows 下的“我的电脑”，然后根目录下面又有许多目录，可以执行不同的功能，一般来说，`/dev` 用于存放设备文件，`/home` 下面是各个用户的文件，`/lib` 用于存放库文件等。

[] 后面的 `$` 是标准的命令提示符，表示用户在当前状态下可以输入命令。此外，命令提示符还可以是 `#`，作用与 `$` 类似，但 `#` 表示当前权限为管理员。其实，讲到这里，我们可以注意到一点，那就是一

直提到的权限问题，Linux 下十分重视权限，文件处理都会涉及权限问题，这与 Linux 本身的文件系统有关。

在 Windows 条件下，文件的打开情况是由其后缀名所决定的，即使是最一般的文本文件，也要跟个.txt，以便于记事本打开。而 Linux 下的文件则完全不同，它并不注重后缀名，或者说 Linux 的文件后缀名更多情况下是没有用的，我们常常看到一些 Linux 的文件也有.txt 或者.fasta 结尾的，但其实那些只不过是用户自己用来标识的文件类型。Linux 下常见的文件类型主要有文本文件、链接文件、目录，这可以通过命令来查看。

```
[Test@localhost Documents] ls-l
total 48
drwxr-xr-x 2 root root 4096 2009-04-01 12: 12 bin
drw-r- -r- - 5 Test Test 1024 2009-04-02 13: 09 files
-rw-rw-r—1 Test Test2 2585 2009-01-08 08: 50 temp.in
lr-xr-xr-x 1 root root 1731 2009-04-01 12: 40 view->/bin/view
```

首字母或符号表示文件的类型：“d”表示文件夹，如 bin 和 files 是两个文件夹，“-”表示是文本文件，而“l”表示是一个链接文件，有点类似于快捷方式，如这个文件夹下的 view 文件其实是指向/bin/view 文件的快捷方式。之后是 3*3 共 9 个字母表示的是对于 3 种不同用户：文件所有人、所在群组、其他用户的权限，分别用 r、w、x 来表示可读、可写、可执行，如果没有这个权限就用“-”来表示。例如，bin 文件夹是 `drwxr-xr-x`，它就表示对于所有用户都是可读、可执行的，但

只对于所有人有写的权限。后面的第一个 `root/Test` 就是表示其所有人。第二个表示的是所在群组，一个群组里面有多个用户，一个用户也可以同时属于多个群组，这样可以使我们很方便地对文件的操作权限进行设置。

从上面的介绍，我们可以看出 Linux 的终端其实非常类似于 DOS 下面的命令行，而事实上，Linux 下所用到的一些常用的命令与 DOS 非常地相似，下表列出一些最常用的命令。

Linux 命令符	DOS 命令符	功能	Linux 命令符	DOS 命令符	功能
<code>ls</code>	<code>dir</code>	显示文件及目录	<code>mv</code>	<code>move</code>	移动文件
<code>cd</code>	<code>cd</code>	改变当前目录	<code>cp</code>	<code>copy</code>	复制文件
<code>mkdir</code>	<code>md</code>	新建目录	<code>less</code>	<code>type</code>	阅读文件
<code>rmdir</code>	<code>rd</code>	删除目录	<code>echo</code>	<code>echo</code>	输出字符串
<code>rm</code>	<code>del</code>	删除文件			

所谓的命令也就是一些可执行的文件，因此，我们也可以通过访问路径下的可执行文件来执行一些命令，甚至我们自己也可以编写一些命令来执行。对于每一个命令来说，一般都会有参数，包括执行对象、一些限定等，如上面提到的 `ll` 命令其实就是带参数的 `ls-l` 命令的缩写而已。如果想知道各个命令的用法及各参数的设置方法，可以通过许多帮助手段。有一个对于初学者非常好的命令 `man`，它可以提供命令的在线手册。例如，输入 `manls`，我们就可以轻松地知道 `ls` 这个命令如何使用，应该用哪一些参数才能达到我们的目的。如果是内置命令，就需要使用 `help` 命令来查阅帮助；还可以通过互联网搜索获得答案。

这里还要重点提一下的是关于文件的压缩，因为大部分从网站上

下载的软件都是打包压缩的文件，我们需要知道这些压缩文件如何使用。在 Windows 中常用的压缩软件是 ZIP 和 RAR，它们同样也有 Linux 的版本；但是还有两个在 Linux 下更加常用的压缩工具——GZip 和 BZip2，它们可以将单个文件压缩，默认生成后缀为.gz 和.bz2 的压缩文件，但是无法独自处理多个文件，为此，还需要一个打包工具——Tar。Tar 工具的作用只是将文件打包，而压缩过程是由 GZip 或者 BZip2 来实现的。这看起来似乎很繁琐，其实适当的参数设置可以使 tar 命令执行的同时也调用压缩工具一起，实现打（解）包（解）压缩一步实现。例如，我们从网上下载了一个 DNS 的工具 httpd-2.2.11.tar.gz，如何将其安装呢？从文件名应该可以看出它是打包之后用 GZip 来压缩的。我们这里用到 tar 的三个参数：z 表示先用 GZip 解压后再解包（相应地，j 对应 BZip2），v 表示列出解包的文件列表，f 表示解包到文件夹里。运行命令：

```
[Test@localhost Download] tar-zvf httpd-2.2.11.tar.gz
```

我们可以看到当前目录下多了一个 httpd-2.2.11 的文件夹，里面包含了解包的所有文件。当然，解压后还要来安装，下面只是提供最常见的安装方法，但是由于各个软件编码各异，安装方式也会不同，一个具体文件的安装方法请参照程序提供的 README 文件或是 INSTALL 文件。可使用 ./configure--help 查看帮助信息。

```
[Test@localhost Download] cd httpd-2.2.11
```

```
[Test@localhost httpd-2.2.11] ./configure
```

```
[Test@localhost httpd-2.2.11] make
```

```
[Test@localhost httpd-2.2.11] sudo make install
```

最后介绍一个文件编辑器——vi。vi 被称为编辑器的常青树，它兼容于更大的 Linux 系统，具有强大的文本处理功能。利用 vi 可以在终端上直接打开一个文件进行编辑，除了可以像一般文本编辑一样直接进行文本的写入、删除等操作，还可以直接进行快捷的 Command 操作；同时，其底部命令行还可以用于保存、查找等其他繁琐的操作（类似 DOS 下的 WPS）。不过由于 vi 下的命令很多，要学习起来并不轻松，用户可以在进入 vi 后输入“: help”来得到在线的帮助。注意保存并退出 vi 的命令是先按 Esc 后输入“: wq”并按回车，不需保存则输入“: q”即可。

三、在 Linux 下使用 SAMtools

以下载、编译、安装和运行 SAMtools 这款生物学软件为例，讲解如何使用 Linux 操作系统完成生物信息学分析，以下操作以 Ubuntu16.04 为例演示。SAM 是一种存储大规模核酸比对结果的压缩文件格式，SAMtools 则是操作这种文件格式的一系列工具。

（一）SAMtools 的下载与安装

为了加速下载软件包的速度，先配置好国内镜像源：访问中国科学技术大学提供的 Ubuntu 源 <http://mirrors.ustc.edu.cn/help/ubuntu.html>。配置好软件源后执行 `apt-getupdate`，然后就能执行必要的软件包安装了，这里通过下述命令可以安装好 SAMtools 的依赖库。

（二）SAMtools 的编译与运行

四、使用 conda 管理软件和安装环境

1. 为什么我们需要 conda

conda 是 Continuum Analytics 公司开发的开源包管理工具，适用于主流操作系统和多种编程语言。conda 的发行版本有两个，一个是 Miniconda，仅包含 conda 的各种基础功能；另一个是 Anaconda，在 Miniconda 的基础上添加了科学计算常用的一些软件包。许多生物信息学分析软件都提供了使用 conda 安装的选项，非常方便。下面我们就以 Miniconda 在 Ubuntu16.04 操作系统上的安装和操作为例，向大家介绍 conda 的安装和使用。

2. conda 的安装

首先，通过搜索引擎找到 conda 的官网 <https://docs.conda.io/en/latest/miniconda.html>，找到 linux 版本的安装文件下载链接。需要注意的是，不同处理器架构的电脑需要使用不同版本的安装包，对于主流的 x86 架构处理器，下载后缀为 x86_64.sh 的文件即可。

3. conda 的使用

开始使用 conda 前，推荐国内的读者先配置镜像。由于 conda 的软件仓库是国外的网站，在国内访问时经常会出现网速缓慢的情况。针对这种情况，国内的许多大学都提供了镜像服务。

配置好镜像源之后，就可以开始使用 conda 了。conda 以环境为单位管理软件资源和依赖关系，在使用时可以根据需要创建相应的环境来进行软件安装，不同环境之间的软件不会相互影响，避免了软件冲突之类的情況发生。conda 创建环境的命令如下：

```
conda create -n env_name list of packages
```

其中，`-n` 代表 `name`；`env_name` 是需要创建的环境名称；`list of packages` 则是列出在新环境中需要安装的软件包。例如，配置一个用于 RNA-seq 分析的环境，需要安装 3.7 版本的 Python 和 3.6 版本的 R，在命令行中输入：

```
conda create -n RNAseq r-base=3.6python=3.7
```

运行好之后，`conda` 会自动收集软件的依赖关系，列出需要下载的所有软件，并询问是否执行，此时输入 `y` 即可继续。

环境配置好后，在命令行中输入：

```
conda activate RNAseq
```

即可切换到名为 `RNAseq` 的环境，如果想查看当前环境下安装的包，可以在命令行中输入：

```
conda list
```

如果想退出环境，可以在命令行中输入：

```
conda deactivate
```

在环境配置好后，如果还有想要安装的其他软件包，可以在命令行中输入：

```
conda install package_name
```

这里的 `package_name` 是包的名字。如果想卸载某个软件包，可以在命令行中输入：

```
conda remove package_name
```

需要注意的是，许多软件的名称和它在 `conda` 上的名字并不一样，

在安装前，需要到软件的网站或者搜索引擎上查找正确的安装命令。

五、容器化技术介绍

软件的正常运行有赖于正确的环境配置，包括操作系统的设置和各种依赖库和组件的安装，由于生物信息学分析软件的开发往往由小团队完成，很难有精力保证软件可以在各种硬件和软件配置的设备上运行。开发者常常会说：“它在我的机器可以跑了”，言下之意就是，其他机器很可能跑不了。环境配置如此麻烦，换一台机器就要重来一次，费时费力。很多人想到，能不能从根本上解决问题，使软件可以自带环境配置？

虚拟机就是带环境配置的一种解决方案。它可以在一种操作系统里面运行另一种操作系统，如在 Windows 系统里面运行 Linux 系统，而应用程序对此毫无感知，因为虚拟机看上去跟真实系统一模一样。对于底层系统来说，虚拟机就是一个普通文件，不需要了就删掉，对其他部分毫无影响。虽然用户可以通过虚拟机还原软件的原始环境。但是，这个方案有几个缺点：①资源占用多，虚拟机会独占一部分内存和硬盘空间。它运行的时候，其他程序就不能使用这些资源了。哪怕虚拟机里的应用程序真正使用的内存只有 1MB，虚拟机依然需要几百 MB 的内存才能运行。②冗余步骤多，虚拟机是完整的操作系统，一些系统级别的操作步骤往往无法跳过，如用户登录。③启动慢，启动操作系统需要多久，启动虚拟机就需要多久，应用程序往往需要等几分钟才能真正运行。

由于虚拟机存在这些缺点，Linux 发展出了另一种虚拟化技术：

Linux 容器 (LXC)。Linux 容器不是一个完整的操作系统，而是与系统其他部分隔离开的一系列进程。运行这些进程所需的所有文件都由另一个镜像提供，对于容器里面的进程来说，它接触到的各种资源都是虚拟的，从而实现了与底层系统的隔离。由于容器是进程级别的，相比虚拟机有很多优势：①启动快，容器里面的应用直接就是底层系统的一个进程，而不是虚拟机内部的进程。所以，启动容器相当于启动本机的一个进程，而不是启动一个操作系统，速度就快很多。②资源占用少，容器只占用需要的资源，不占用那些没有用到的资源；虚拟机由于是完整的操作系统，不可避免要占用所有资源。另外，多个容器可以共享资源，虚拟机都是独享资源。③体积小，容器只要包含用到的组件即可，而虚拟机是整个操作系统的打包，所以容器文件比虚拟机文件要小很多。总之，容器有点像轻量级的虚拟机，能够提供虚拟化的环境，但是成本小得多。

目前最流行的 Linux 容器解决方案是 **Docker**，它提供了简单易用的容器使用接口。简单来说，**Docker** 将应用程序与该程序的所有依赖打包在一个文件里面。运行这个文件，就会生成一个虚拟容器。程序在这个虚拟容器里运行，就好像在真实的物理机上运行一样，因此免去了环境配置的麻烦。在使用时，既可以自行打包 **Docker** 镜像，也可以使用其他人发布的 **Docker** 镜像，可以非常方便地在不同设备上部署服务。对于生物信息学来说，**Docker** 主要有两个用途：①快速部署生物信息学软件；②开发生物信息学软件时提供测试环境和打包服务。

Docker 是一个开源的商业产品，有两个版本：社区版（CE）和企业版（EE）。企业版包含了一些个人开发者通常用不到的收费服务。

Docker CE 的安装可以参考官方文档 <https://docs.docker.com/engine/install>。

第二节 生物信息学中的编程语言

一、Perl

1. Perl 简介

Perl 的主要站点是：<http://www.perl.com>，目前由著名书商 O'Reilly 大力支持。Perl 的 CPAN 程式库网站是：<http://www.cpan.org>，如果我们要解决某一方面问题时，都会先到 CPAN 程式库，看看是否有前辈已经开发出相关的模块。若有，就可以直接套用，或继承之，做局部修改，即可轻松解决问题。

Perl 能做的工作比较多，包括处理文本数据、网络编程、数据库处理、XML 处理、系统维护、图像处理等。很多人使用 Perl 来避免编写繁琐的 C、C++ 或 Java 程序。如果你的程序要求高效率，你可以把费时部分用 C 写，然后与 Perl 结合使用。

Perl 开发的成功软件有：Webmin、AWstats、MRTG、Spamassassin、Movable Type、Slashcode 等。很多时候，Perl 在开发中只是其中的一个工具。虽然最终产品没有丝毫 Perl 的痕迹，但 Perl 的作用是不可抹杀的。

目前，著名网站 <http://www.amazon.com>、<http://www.bbc.com>、<http://slashdot.org>、<http://imdb.com>、<http://macromedia.com> 使用 Perl 做

CGI 网站；众多华尔街的金融机构使用 Perl 来做金融数据的处理；生物工程科学在很大程度上使用 Perl；网络上成千上万的系统管理员都在依靠 Perl 让他们的工作更容易、更有效。

2. Perl 基础

(1) 字符串 (string)

length: 得到字符串的长度

printf: 格式化字符串

substr: 得到字符串子串

比较字符串

运算符	返回值
eq	左边和右边相等，则返回真
ne	左边和右边不相等，则返回真
cmp	左边小于、等于、大于右边，分别返回 -1, 0, 1
lt	左边小于右边，则返回真
gt	左边大于右边，则返回真
le	左边小于或等于右边，则返回真
ge	左边大于或等于右边，则返回真

(2) 数组 (array)

创建数组

```
@array=(1,3,5);
@array= 1. . 5;
@array=("one","two","three");
@array=qw(one two three);
```

合并数组

```
@a1=(1,3,5);
@a2=(2,4,6);
@a3=(@a1,@a2);
print join(",@",@a3);
push(@a1,@a2)
print join(",@",@a1);
```

确定数组长度

```
@array=(1,3,5);
$length1=$#array+1;
$length2=@array;
$length3=scalar(@array);
```

在数组中循环

```
@array=(1,3,5);
for($i=0; $i<=$#array; $i++){
    print$array[$i],"\t";
}
foreachelement(@array){
    print $element,"\t";
}
```

数组反向

```
@a1=(1,3,5);  
@a2=reverse @a1;
```

数组排序

```
@a1=(1,3,5,7,2,4);  
@a2=sort @a1;
```

删除数组元素

```
@array=(1,3,5);  
delete $array[1];
```

清空数组

```
@array=(1,3,5);  
$#array=-1;  
@array=();  
@array=undef;
```

(3) 哈希表

创建哈希表

```
%hash=();
%hash=(
    'fruit','apple',
    'drink','bubbly',
);
%hash=();
%hash=qw(
    'fruit' 'apple'
    'drink' 'bubbly'
);
%hash=();
%hash=(
fruit=>'apple',
drink=>'bubbly',
);
$hash{fruit}='apple';
$hash{drink}='bubbly';
print hash{drink};
```

添加哈希表元素

```
%hash=(%hash,'key','value');
%hash=(%hash,key=>'value');
```

合并哈希表

```
%h3=(%h1,%h2);
```

在哈希表中循环

```
%hash=();
%hash=(
    fruit=>'apple',
    drink=>'bubbly',
);
while(($key,$value)=each(%hash)){
```

```
    print "$key=>$value\n";
}
foreach key(keys %hash){
    print "$key=>$hash{$key}\n";
}
print map"$_=>$hash{$_}\n",keys %hash;
```

哈希表排序

```
foreach key(sort keys %hash){
    print "$key=>$hash{$key}\n";
}
```

删除哈希表元素

```
delete($hash{drink});
```

(4) 正则表达式

m//:

默认情况下,m// 运算符尝试匹配指定的模式和 \$_ 中的文本

```
while(<>){
    if(m/good/){
        print "It contains word 'good'";
    }
    else{
        print "It doesn't contain word 'good'";
    }
}
```

也可以用=~运算符指定 m// 运算符查找的字符串

```
while($line=<>){
    if($line=~m/good/){
        print "It contains word 'good'";
    }
    else{
        print "It doesn't contain word 'good'";
    }
}
```

s///: 用一个字符串替换另一个字符串

```
$text="Pretty old.";
$text=~s/old/young/ig;
print $text;          #string 'young' substitute 'old'
```

与 m// 和 s/// 一起使用的修饰符

e: 指出 s/// 的右边是要计算的代码

g: 全局查找

i: 忽略字母大小写

x: 忽略模式中的空白, 并允许进行注释

tr///: 用一个字符替换另一个字符

```
$text="Tom";
$text=~tr/o/i/;
print text;          #character 'i' substitute 'o'
```

与 tr/// 一起使用的修饰符

c: 对查找列表求补

d: 删除没有替换的字符

s: 删除重复的替换字符

```
$arrayref=@array;
```

```
print join(",",$arrayref);
```

对哈希表的引用及反引用

```
%hash=();
%hash=(
    fruit=>'apple',
    drink=>'bubbly',
);
$hashref=%hash;
foreach $key(sort keys %$hashref){
    print "$key=>$hash{$key}\n";
}
```

对子程序的引用及反引用

```
sub subroutine{
    print "Hi!";
}
$coderef=&subroutine;
&$coderef;
```

(5) 子程序 (subroutine)

- 定义子程序

```
sub SUBNAME
{
    code;
}
```

- 调用子程序

```
&SUBMANT(argument1,argument2. . );
```

(6) 包 (package)

- 创建包及包函数

```
package package1;
sub subroutine1;
sub subroutine2;
. . .
```

- 调用包

```
require '/path/package1.pl';
package1::subroutine1();
```

(7) 内置函数 (built-in function): 数据处理

- abs: 绝对值 & sqrt: 平方根 & exp: 计算 e 的幂

```
$a=-4;
$b=abs $a;
$c=sqrt $b;
$d=exp $c;
print $b,"\$n",c,"\n",$d;
```

- cos: 余弦 & sin: 正弦 & atan2: 反正切 & POSIX 函数

```
$angle=45;
$conversion=3.1415926/180;
$radian=$angle*conversion;           #angle is c
radian
print $radian,"\n",cos $radian;
```

- each: 哈希表键 / 值对 & keys: 得到哈希表键 & values: 得到哈希表值


```
%hash=();
%hash=(
  fruit=>'apple',
  drink=>'bubbly',
);
@key=keys %hash;
@value=values %hash;
print "@key\n@value";
```
- grep 和 map: 在元素中循环和寻找元素 (语法 :map/grep BLOCK LIST)


```
@a=(1..10);
map {$_* = 2} @a;
print "@a";
@a=(1..10);
@b=grep {$_>5} @a;
print "@b";
```
- join: 数组加入字符串中 & split: 字符串拆分为数组


```
@a=(1,3,5);
$b=join(" ", @a);
print $b;
$a="h-e-l-l-o";
@b=split ("-", $a);
print "@b";
```
- lc: 转换为小写 & uc: 转换为大写


```
print lc 'HELLO', "\n";
print uc 'hello', "\n";
```
- lcfirst: 第一个字符转换为小写 & ucfirst: 第一个字符转换为大写


```
print lcfirst 'HELLO', "\n";
print ucfirst 'hello', "\n";
```
- Math::Complex: 复数


```
创建新复数 :5+2i
use Math::Complex;
$c=Math::Complex->new(5,2);
print $c;
```
- rand: 创建随机数


```
while(read(FH,$newtext,1)){
    print newtext,"***";
}
```

- readline: 逐行读取输入

```
open (FH,"file. txt") or die "Cannot open the file";
while($newtext=readline(FH)){
    print $newtext,"***";
}
```

- getc: 读取一个字符

```
open (FH,"file. txt") or die "Cannot open the file";
while($char=getc FH){
    print $char,"***";
}
```

- eof: 测试文件尾

```
open (FH,"file. txt") or die "Cannot open the file";
until(eof FH){
    read (FH,newtext,1);
    print newtext,"***";
}
```

- 统计文件的行数

```
open (FH,"file. txt") or die "Cannot open the file";
$row=0;
while(<FH>){
    $row++;
}
print $row;
```

(9) 模块(module):LWP::Simple 和 LWP::UserAgent(获取 Web 页面)

```
#!/usr/bin/perl
use LWP::UserAgent;
$ua=new LWP::UserAgent;
$ua->proxy('http','http://10.71.115.253:3128');
$response=$ua->get("http://www. google. com");
print $response->content();
```

(10) 模块 (module):DBI 与 DBD:mysql(数据库操作)

```
use DBI;
use DBD::mysql;
```

- DBI: 是很多数据库的一个通用接口
- DBD: 是相应数据库的驱动程序, 如 MySQL 的驱动程序是 DBD::mysql
- 连接数据库:

```
$dbh=DBI->connect("dbi:mysql:database","username","password",{RaiseError=>1});
```

- 准备数据库操作语句:

```
$sth=$dbh->prepare("select * from table");
$sth->execute(); #search
$string="insert into table values ('value1','values2',. . .)";
$dbh->do($string); #insert
$string="update table set Field1='value1',Field2='value2',... where condition";
$dbh->do($string); #update
$string="delete from table where condition";
$dbh->do($string); #delete
```

- 函数:

```
fetchrow_array: 返回数组中的一行
fetchrow_arrayref: 返回数组引用中的一行
fetchall_arrayref: 返回数组引用中的整个结果集
my $rows=$sth->fetchall_arrayref();
$sth->finish();
my $stablerows=Tr(th({-bgcolor=>"#dddddd",-align=>"left"},
["ID","Name","Sex","Age"]));
foreach my $row(@$rows){
    $stablerows.=Tr(td({-bgcolor=>"#dddddd"},$row));
}
print hl("Student Database"),table({-border=>0,-cellpadding=>
5,-cellspacing=>0},$stablerows),"Your query yielded ",b( scalar(@$rows) )," records. ";
```

- 关闭数据库:

```
$sth->finish();
$dbh->disconnect();
```

3.BioPerl 概况

BioPerl 是 Perl 的扩充, 专门用于生物信息的工具与函数集。

BioPerl 在生物信息学的使用加速了生物信息学、基因组学及其他生命科学研究的发

首先, BioPerl 继承了 Perl 强大的正则表示式比对和字符串操作

能力，Perl 非常擅长于切割、扭转、绞、弄平、总结，以及其他的操作文字文件。而生物资料大部分是文字文件，如物种名称、种属关系、基因或序列的注解、评注和目录查阅，甚至 DNA 序列也是类文字的，因此，Perl 为 BioPerl 带来的优势显而易见。

其次，BioPerl 继承了 Perl 能容错的特点。生物资料通常是不完全的，错误或者说误差从数据产生的时候可能就产生了。另外，生物数据的某项值栏位可以被忽略，可能是空着的；或是某个栏位也就是某个值，被预期要出现好几次（举例来说，一个实验可能被重复地操作）；或是资料以手动输入，所以有错误。BioPerl 并不介意某个值是空的或是有奇怪的字符。其中的正则表示式能够被写成取出并且更正相应的一般错误。

BioPerl 部分功能模块见下表。

应用	模块
1. 序列操作	
对序列进行统计	SeqStats, SeqWord
确定限制性内切核酸酶位点	Bio: : Restriction
识别氨基酸裂解位点	Sigcleave
多样性序列功能	OddCodes, SeqPattern
转换坐标系	Coordinate: : Pair, RelSegment
2. 搜索相似序列	
运行远程 BLAST	using RemoteBlast.pm
分析 BLAST 和 FASTA 结果	Search, SearchIO
分析 BLAST 结果	BPlite, BPsilite, and BPbl2seq
分析 HMM 结果	HMMER: : Results, SearchIO
运行本地 BLAST	StandAloneBlast
3. 序列比对	SimpleAlign
4. 在基因组 DNA 寻找基因和其他结构	Genscan, Sim4, Grail, Genemark, ESTScan, MZEF, EPCR
5. 开发机器可读性的序列注释	

表征序列注释	SeqFeature, RichSeq, Location
表征序列注释	Annotation: : Collection
表示大的序列	LargeSeq
表示改变的序列	LiveSeq
表示相关联的序列——突变体, 多态性	Allele, SeqDiff
在序列注释中加入特征数据	SeqWithQuality
序列 XML 表征——生成和分析	SeqIO: : game, SeqIO: : bsm1
使用 GFF 表示序列	Bio: DB: GFF
6. 操作序列簇	Cluster, ClusterIO
7. 在 BioPerl 中表示非序列数据: 结构、树和图谱	
使用 3D 结构对象并读取 PDB 文件	StructureI, Structure: : IO
树对象和系统发生树	Tree: : Tree, TreeIO, PAML
图谱对象操作遗传图谱	Map: : MapI, MapIO
文献对象搜索文献数据库	Biblio
图形对象以图形代表序列对象	Graphics

二、Python

1. Python 简介

Python 是一门优雅而健壮的编程语言，也是一门动态地面向对象的编程语言。它为其他语言提供了强大的整合支持，并且有数量巨大的标准库。虽然 Python 被分类为脚本语言，但实际上一些大规模软件的开发计划也广泛使用它，所以称它为一种高级动态编程语言更为合适，因为脚本语言泛指仅做简单编程任务的语言。另外，Python 还可以作为一种“胶水语言”对 C 或其他语言提供良好的支持。

另外，Python 也支持多线程编程和垃圾回收机制，所以说，Python 不但可以开发小型项目，对于大型项目，Python 也能既快又好地完成。因此，现在越来越多的生物学家和生物信息学家从运用其他语言转向运用 Python。

2. Python 安装及开发运行环境的搭建

在此主要介绍如何在 Windows 和 Linux 平台下搭建 Python 的开

发及运行环境，然后用一个将一条 DNA 链转换为反向链的例子说明如何运行 Python 程序，最后简单介绍几种常用 Python 集成开发环境（IDE）。得到所有 Python 最简单直接的方法就是直接访问它的官方网站，即 <http://www.python.org/>。

3. Python 在生物信息学中的应用

(1) Python 中生物信息学常用的模块

NumPy: 一个用 Python 进行科学计算的基础包，可以进行多维度的矩阵计算，并整合了 Fortran 的所有功能。如要在 Python 中进行运算操作，这个包是必不可少的。官方网址是 <http://www.numpy.org/>。

SciPy: 常常和 NumPy 一起安装，是 NumPy 的补充，增加了处理函数，在线性代数和多线程图片处理上有增强。官方网址是 <http://www.scipy.org/>。

RPy: 这是 Python 对 R 语言的接口。通过 RPy 可以在 Python 中方便调用各种 R 语言的对象，运行任意 R 函数（包括图形函数）。官方网址是 <https://rpy2.bitbucket.io/>。

Matplotlib: 一个 Python 用于 2D 画图的库，这个库可以轻松使数据输出成可以达到出版水平的图表。不仅如此，输出的图表可以是动态的，也可以直接输出到网络服务器上。官方网址是 <http://matplotlib.org/>。

(2) 基于 Python 语言编写的生物信息常用程序

PyMOL: 是一个开源的分子可视化软件，是最为强大的分子可视化处理软件。安装了 PyMOL（不必安装 Python），可以方便地以多种

方式查看或编辑分子的三维结构，支持 PDB 文件；另外还可以进行简单的分子结构比对，运用简单的命令输出高质量的分子模拟图。这个软件是 Python 编写的在生物信息学中运用最多的程序。官方网址是 <http://www.pymol.org/>。

Modeller: 通过计算空间位阻进行蛋白质三维结构比对的程序，但这个程序需要安装 Python。通过已知的蛋白质序列可以进行多种模式的比对。Modeller 提供了多种现成脚本，根据需要改变其中的参数可以达到用户要求。另外，还有多个图形用户界面程序对 Modeller 提供支持，可以供用户查看比对结果。官方网址是 <http://salilab.org/modeller/>。

三、其他编程语言

1. R

R 是一种灵活易用的语言，专为统计计算和图形展示所设计。R 语言以极其丰富的程序包及其简单、高效、完善的特征受到了大量生物统计学家的青睐。R 语言包含大量生物信息学研究相关的程序包，涵盖了数据预处理标准化、差异表达、网络分析等一系列流程，由于 R 语言的用户群庞大，相对较小的研究领域也可能找到对应的 R 包。Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) 汇集了各类与基因组分析相关的 R 包，用户可通过运行 `install.packages("BiocManager")` 加载安装脚本，并用 `BiocManager::install()` 命令进行安装。图像可视化也是 R 语言的强项，如 `ggplot2` 等 R 包可以直接输出符合 SCI 标准的统计图像。

R 语言的官方网址是 <http://www.r-project.org>，用户可以连接距离自己最近的镜像以达到最快的访问速度。

2. Java

简单地说，Java 是一种面向对象的、分布式的、健壮的、平台无关的、安全可靠的、解释的、高性能的、多线程的、动态的语言。Java 是一种庞大的程序开发语言，涉及的内容很多，这里不再赘述。中国用户可从 https://www.java.com/zh_CN/download/ 下载 Java 运行时环境（JRE），并从 <http://www.oracle.com/technetwork/cn/java/index.html> 下载所需开发工具包（JDK）等。

3. 生物信息学编程能力训练平台

由于篇幅所限，这里将不再展开叙述各编程语言的基础知识，读者可自行寻找相关教程进行学习。

第三节 SQL 及数据库编程

一、数据库和数据库技术

1. 数据库

在信息技术飞速发展的今天，作为信息技术主要支柱之一的数据库技术在社会各个领域中有广泛的应用。对信息进行收集、组织、存储、加工、传播、管理和使用都以数据库为基础，利用数据库可以提供及时的、准确的、相关的信息，满足各种不同的需要。它能够科学地组织和存储数据，高效地获取和处理数据，更广泛、更安全地共享数据。

数据是数据库存储的基本对象。我们称描述事物的符号记录为数

据，它可以是数字，也可以是文字、图像、声音等。数据库则是数据的集合，其中的数据按一定的数据模型组织、描述和存储，具有较小冗余度、较高的数据独立性和易扩展性，并为各种用户共享。

2. 生物数据库

现阶段，生物数据库种类繁多，涉及生物学研究的各个方面，而且每年都有非常多的数据库不断地出现。《核酸研究杂志》是收录数据库研究论文的杂志，迄今为止它收录了 1641 个在线分子生物数据库 (<https://www.oxfordjournals.org/nar/database/cap/>)。生物数据库数量之多，也源于生物数据库在生物学研究中的重要作用，它方便了我们进行生物学试验。

举个简单的例子，假设我们发现了一新的蛋白质，该蛋白质的氨基酸序列我们已经知道了，现在要研究它的功能。此时，我们可以先在 NCBI (美国生物技术信息中心，网址是 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中的蛋白质数据库中进行序列比对。通过序列比对，从 NCBI 数据库中找出与我们的蛋白质序列相似性较高的蛋白质，我们可以称之为同源蛋白。获得的同源蛋白功能是已知的，根据同源蛋白功能的相似性，我们就可以大致推测出我们所要研究的蛋白质的功能，然后有目的地进行试验，对它的功能进行验证。除 NCBI 中的蛋白质数据库外，我们还可以通过 PDB 数据库获得蛋白质的空间结构信息 (<http://www.rcsb.org>)，通过 KEGG 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg>) 可以查询蛋白质所参与的各种代谢通路信息。总之，生物数据库实现了全球生物数据的共享，方便了生物学研究，对于生物学的发展有着

重要的作用。

3.数据库技术支持

要创建发布数据库中数据的网站，需要以下技术要素。

RDBMS 数据库程序（如 MSAccess、SQLServer、MySQL）

服务器端脚本语言（如 PHP 或 ASP）

SQL

HTML/CSS 和 RDBMS 数据库程序，负责编写服务器端数据库；PHP 或 ASP 和 HTML/CSS 共同负责编写可供交互的动态网页，提供客户端查询数据库的窗口。

RDBMS 数据库程序，指的是关系型数据库管理系统。RDBMS 是 SQL 的基础，同样也是所有现代数据库系统的基础，如 MSSQL Server、IBMDB2、Oracle、MySQL 及 Microsoft Access。RDBMS 中的数据存储在被称为表（table）的数据库对象中，表是相关的数据项的集合，它由列和行组成。

对于服务器端脚本语言（script language），它负责服务器端和客户端的交互，即它首先接收客户端的需求，然后服务器运行相应的脚本语言，返回结果给客户端。服务器的脚本语言，如 PHP（超文本预处理器）和 ASP（动态服务器网页）。

SQL 即结构化查询语言，它是一门由 ANSI(美国国家标准学会)推出的标准计算机语言，用来访问和操作数据库系统。SQL 语句用于取回和更新数据库中的数据。

HTML（超文本置标语言）用来制作网页；CSS（层叠样式表）

是 W3C 定义和维护的标准,是一种用来为结构化文档(HTML 文档)添加样式(字体、间距和颜色等)的计算机语言。使用 W3C 标准可以保证网页在不同的浏览器中显示同样的效果,即可以解决浏览器间的不兼容问题。

二、 MySQL

MySQL 是一种 RDBMS 数据库程序,也被称为数据库服务器。选择 MySQL 作为数据库服务器的理由如下所述。一方面,MySQL 运行速度非常快,它要快于其他大多数的数据库服务器;另一方面,它是开源的软件,即开放源代码的,任何的 bug(缺点)都将很快被纠正。MySQL 是开源的,我们可以免费地获取和拥有它。此外,MySQL 可以用于许多平台,大多数的 UNIX 操作系统、Linux、Windows,以及一些不很流行的操作系统,如 IBMOS/2。

在真正使用 MySQL 前,我们有必要了解相关的一些基本概念。

(1) 表、行和列与列类型: MySQL 是 RDBMS 数据库程序,即它处理的对象是关系数据库。关系数据库由表构成。我们将数据库比作文件柜中的一个抽屉,那表就如同抽屉中的文件夹。表由行和列构成。每一列都为每一行包含了一个值,表中不存在缝隙或短列。我们可以将表想象成一电子表格,行为单独的实体,列标记了实体的属性。

(2) 键: 键是特殊的列,通过它可以实现实体间的链接。主键是某些规则必须遵守的唯一标识符。①主键必须总是具有值(不能为空);②主键的值不会变;③对于表中的每一条记录具有唯一值。只有满足这 3 点的字段才能成为表的主键。往往一个表,我们会给分配一个主

键，如添加一个 id 号，就像人的身份证号一样，一条记录对应一个 id 号，id 列即主键。(3) 表关系：表关系在 RDBMS 中表现为表与表之间的数据如何相关联，它有 3 种类型：一对一 (one-to-one)、一对多 (one-to-many) 和多对多 (many-to-many)。一对一的关系，指的是表 A 中的一个且只有一个项目牵涉到表 B 中的一个且只有一个项目，如公民与他的身份证号码间的关系。在我们的数据库中，一般不会出现这样的两个表，如两个表是一一对一的关系时，我们往往将会把它们合成一个表。一对多的关系，指的是表 A 中的一个项目牵涉到表 B 中的多个项目。一对多在我们的数据库中比较常见。在这种关系中，对于表 A 中任何指定的行，在表 B 中都有多个行与之相配。反过来，对于表 B 中任何指定的行，在表 A 中只有一行与之匹配，如上面外键的例子。多对多的关系，指的是表 A 中的多个项目牵涉到表 B 中的多个项目。对于多对多关系的两个表，我们往往加上一个桥联表(连接两个表的表)将多对多转化为两个一对多关系。以上 3 种关系在数据库设计中起着重要的作用。

数据库设计与范式

数据库设计，就是建立数据库的结构，又称数据建模。一个成功的数据库往往都是经过精心设计的，这样可以避免数据库的冗余，使我们的数据库精干而高效。在设计时使用规范化过程，是减少冗余的较好方法。规范化，就是在数据库设计当中要遵循某些规则，这些规则被称为范式。

第一范式 (1NF)。第一范式主要包含三个原则。第一条原则是一

个表要描述一个对象，如我们上面的 `journal` 表描述的是学术期刊的信息。第二条原则是一个表要求有一个主键。主键经常是一个自动递增（`autoincrement`）的整数列。例如，`journal` 表和 `paper` 表都有一个 `id` 列，它就是各自表的主键。第三条原则是每一列都必须只包含一个值。也就是说，每个属性必须包含单独一个值，而非一组值。

第二范式（2NF）。满足第二范式，首先数据库必须满足 1NF 的所有要求。其次，确定具有重复值的任何列，将这些列移到一个单独的表中，并通过主键-外键一对多的关系与原来的表关联起来。

第三范式（3NF）。第三范式要求在满足了第二范式（2NF）后，每个非键列（除主键外的列）都要依赖于主键。使数据库满足 3NF 的方法是确定表中不与主键直接相关的列，相应地创建新表，再通过主键-外键与原表链接起来。

当然，除了以上 3 种范式，还有其他的，如 Boyce-Codd 范式（BCNF）、第四范式（4NF）等。但有了上述的 3 种范式，对于我们的数据库设计已经足够了，即它们已经可以使我们的数据库消除冗余、高效运行。

三、PHP

1. PHP 简介

最初的 PHP 可追溯到 1995 年，现在已经由 1.0 发展到现在的 8.0.3 版本（2021-03-04 发布）。PHP 的一般特性包括它的实用性、可选择性、开源与低成本。

2. PHP 安装使用

PHP 的执行结果往往都是显示在浏览器中的，所以 Apache 是必需的。Apache 是 Apache HTTP Server 的简称，它是一个开源的网页服务器。除了 Apache 可以作为我们数据库的网页服务器外，微软的 IIS 也可以作为数据的网页服务器。

3.PHP 与 MySQL

我们说 Apache+PHP+MySQL 是黄金搭档，它们三者的结合，无论是开发数据库，还是进行其他的动态 Web 站点，都有着强大的优势。Apache、PHP 和 MySQL 都是免费的，而且不管是什么操作系统，都可以很好地使用它们。对于 PHP 和 MySQL，在 PHP 中提供了对 MySQL 的支持。PHP 内置至少 48 个 MySQL 函数。PEAR（PHP 扩展与应用库）包中的 MDB2，为 MySQL 数据库操作提供了面向对象的 API（应用程序编程接口），更加方便了 PHP 对数据库的操作，也更加拉近了 PHP 和 MySQL 的关系。

第四节 并行计算

一、概述

90 年代以来，并行计算得到了飞速的发展，并行计算机的体系结构也趋于成熟。国际大型研究计划对计算的需求也直接促进了并行计算的发展。

二、硬件

并行计算的载体是能够进行高性能计算的硬件平台，这些平台经历了近 30 年的发展，面貌发生了巨大的变化。20 世纪七八十年代是向量巨型机的时代，它们能够使用同一指令来计算大量的数据，如

Cray-1 就是最有名的向量巨型机。

今天，这些向量巨型机已经退出了历史的舞台，只会偶尔出现在如“侏罗纪公园”这样的电影中。它们奇异的外观，总能唤起人们无限的遐思。后来出现了大规模并行处理机 (Mpp)，是由上万个处理机构成的一个系统。它是并行计算机发展过程中的主力。今天世界前 500 位的超级计算机包括了大量的 Mpp，其中也有由我国曙光和联想公司开发的超级计算机。Top500 的排行榜也间接反映了各国在世界计算格局中的地位，强大的计算能力将带来科学研究和社会发展的巨大优势。

除了上面说的 Mpp，另一类计算机体系也获得了巨大的成功，那就是十分流行的集群。它们的出现带来了更高的有效性、更好的可扩展性和更便利的使用方式。它们在高性能计算机中占有越来越大的比重。从 Top500 的排行中，我们可以发现，集群已经是当今世界高性能计算机的主流结构。

第一台集群出现于 1994 年，是由 16 台家用计算机通过以太网连接起来的。集群的规模可从单机、少数几台联网的微机直到包括上千个节点的大规模并行系统。常用的大型机群采用安装在机柜中的机架式或刀片式服务器，并有专门配备的 UPS 及空调。由于集群设置的简易性、很好的扩展性和广泛普及的能力，许多需要进行复杂计算的科学实验室开始配备这种高性能计算机。在生物信息学的研究中，大量数据的复杂计算往往是不可避免的，所以生物信息学常常需要借助集群进行计算。

最后简单介绍下一般集群的主要结构和组成：1) 硬件：联网的多台服务器。2) 操作系统：Linux 系统 (RedHat、Debian、SuSE 等)。3) 编译器：gcc/g++/g77、PGI、Intel 等。4) MPI 系统：MPICH、LAM-MPI 等。5) 网络文件系统：NFS、PVFS、Lustre 等。6) 资源管理与作业调度：PBS、Condor、LSF 等。7) 常用数学库：BLAS、FFTW、LAPAC、KScaLAPACK 等。

三、 软件

仅拥有高性能的计算机并不能直接进行并行运算，还需要有相关编程语言、软件的支持。并行程序语言、库、应用程序编程接口 (API) 和并行编程模型已经被开发出来用于并行计算机，它们大致上可以按处理内存的假设分成 3 类：共享存储、分布式存储和共享分布式存储。共享存储编程语言使用主动分配内存变量来完成通信，而分布式存储编程语言使用消息传递机制。POSIX Threads 和 OpenMP 是两类现在使用最广泛的 API，而 MPI 是使用最广泛的消息传递体系的 API。MPI 是并行计算事实上的标准，它的轻便性与广泛的适用性使它成为并行计算最重要的程序设计模式。

此外，Mosix 和 OpenMosix 是两种用于使 Linux 集群各节点自动平衡负载的技术，两者的差别在于 OpenMosix 是基于 GNU 公共许可证的发行版，而 Mosix 是专有软件。它们都是作为内核补丁安装的，一旦安装好，进程就会自动在各节点间迁移，以完成平衡负载。

四、 并行算法设计

并行算法设计是并行程序的灵魂。一个并行程序编写前需要进行

并行算法设计，通过种种技术将任务并行化，并比较各种方法之间的优劣。

五、 云计算

云计算具有以下特点。

1) 超大规模。“云”具有相当的规模，Google 云计算已经拥有 100 多万台服务器，Amazon、IBM、微软、Yahoo 等的“云”均拥有几十万台服务器。企业私有云一般拥有数百上千台服务器。“云”能赋予用户前所未有的计算能力。

2) 虚拟化。云计算支持用户在任意位置、使用各种终端获取应用服务。所请求的资源来自“云”，而不是固定的有形的实体。应用在“云”中某处运行，但实际上用户无需了解也不用担心应用运行的具体位置。只需要一台笔记本或者一部手机，就可以通过网络服务来实现我们需要的一切，甚至包括超级计算这样的任务。

3) 高可靠性。“云”使用了数据多副本容错、计算节点同构可互换等措施来保障服务的高可靠性，使用云计算比使用本地计算机可靠。

4) 通用性。云计算不针对特定的应用，在“云”的支撑下可以构造出千变万化的应用，同一个“云”可以同时支撑不同的应用运行。

5) 高可扩展性。“云”的规模可以动态伸缩，满足应用和用户规模增长的需要。

6) 按需服务。“云”是一个庞大的资源池，可以按需购买，即云可以像自来水、电、煤气那样计费。

7) 极其廉价。由于“云”的特殊容错措施可以采用极其廉价的节

点来构成“云”，“云”的自动化集中式管理使大量企业无需负担日益高昂的数据中心管理成本，“云”的通用性使资源的利用率较之传统系统大幅提升，因此用户可以充分享受“云”的低成本优势，经常只要花费几百美元、几天时间就能完成以前需要数十万美元、数月时间才能完成的任务。

云计算是分布式计算技术的一种，是指通过网络将庞大的计算处理程序自动分拆成无数个较小的子程序，再交由多部服务器所组成的庞大系统经搜寻、计算分析之后将处理结果回传给用户。通过这项技术，网络服务提供者可以在数秒之内，达成处理数以千万计甚至亿计的信息，达到和“超级计算机”同样强大效能的网络服务。搜寻引擎也属于最简单的云计算技术服务，用户只要输入简单指令即能得到大量信息。未来如手机、GPS 等移动设备都可以通过云计算技术，发展出更多的应用服务。更高级的云计算不仅做资料搜寻、分析的功能，更可计算诸如分析 DNA 结构、基因图谱定序、解析癌症细胞等问题。

第十四章 新一代测序技术及其应用

第一节 测序技术概述

一、 第一代测序技术：传统的 Sanger 测序

1977年, Frederick Sanger 提出了著名的测序方法——双脱氧终止法 (Sanger 测序法)。这个以 Sanger 命名的测序方法被广泛应用并不断发展。例如, 鸟枪法和毛细管电泳技术的应用大幅度提高了其测序的速度和精度。Sanger DNA 测序技术经过了 30 多年的不断发展与完善, 现在已经可以对长达 1000bp 的 DNA 片段进行测序, 而且对每一个碱基的读取准确率高达 99.999%。在高通量基因组鸟枪法测序操作中, 使用 Sanger 测序法的费用大约为 0.5 美元/1000 个碱基。1987 年, ABI 公司推出了 ABI370 系列的自动测序仪。人类基因组计划(HGP) 主要是依靠 Sanger 测序方法完成。可见, Sanger 测序法一直以来因可靠、准确、可以产生长的读长而被广泛应用。但是它的致命缺陷是测序速度相当慢, 例如人类基因组耗时 13 年, 这显然不是理想的速度, 人们需要更高通量的测序平台。SAGE 和 MPSS 技术实现了较高通量的测序, 可以快速高效地、接近完整地获得基因组的表达信息, 可以定量分析已知基因及未知基因的表达情况; 但是由于技术复杂及所需要的配套软、硬件昂贵而没有得到大规模的应用。

二、 第二代测序技术：高通量微阵列芯片测序

1996 年以来, 人类基因组计划的发起极大地推动了测序技术的应用和发展, 同时, 新的测序技术也不断涌现, 新的测序平台不断出现。下一代测序技术 (也叫第二代测序技术、高通量测序技术) 是一

种高通量测序技术，是对传统测序技术的革命性改变。第二代测序技术利用大量并行处理的能力，一次读取成千上万个短 DNA 片段。2003 年，454LifeSciences 公司首先建立了高通量的第二代测序技术，随后推出了 454 测序仪（后被 Roche 公司收购）；2006 年，Illumina 公司推出 Solexa 测序仪；2007 年，ABI 推出 SOLiD 测序仪。目前这 3 种测序平台已经成为新一代测序技术的主流，技术具备并行处理大量读长能力，具有高准确性、高通量、高灵敏度和低运行成本等突出的优势，应用越来越广泛，技术也越来越成熟。根据平台不同，读取长度为 13~450bp；不同的测序平台在一次实验中，可以读取高达 100Gb 的碱基数，这样庞大的测序能力是传统测序仪所望尘莫及的。

	扩增方法	合成方法	每 Mb 价格	仪器价格	是否能双末端测序	错误产生	读长
454	乳胶 PCR	并行焦磷酸合成测序法	约 \$60	\$500,000	是	Indel	250bp
Solexa	桥式 PCR	桥式合成测序法	约 \$2	\$430,000	是	Subst.	36bp
SOLiD	乳胶 PCR	基于磁珠的并行克隆连接 DNA 测序法	约 \$2	\$591,000	是	Subst.	35bp
Polonator	乳胶 PCR	利用连接酶测序	约 \$1	\$155,000	是	Subst.	13bp
HeliScope	单分子测序	并行单分子合成测序法	约 \$1	\$1,350,000	是	Del	30bp

三、 第三代测序技术及其应用

第三代测序技术是指单分子测序技术。DNA 测序时不需要经过 PCR 扩增，实现了对每一条 DNA 分子的单独测序，所以其被称为真正的单分子测序。第三代测序技术也叫从头测序技术，即单分子实时 DNA 测序。第三代测序技术原理主要包括：单分子荧光测序和纳米孔测序。

（一） 单分子荧光测序

代表性的技术为美国螺旋生物（Helicos）的 SMS 技术和美国太

平洋生物的 SMRT 技术。脱氧核苷酸用荧光标记，显微镜可以实时记录荧光的强度变化。当荧光标记的脱氧核苷酸掺入 DNA 链时，其荧光就同时能在 DNA 链上探测到。当其与 DNA 链形成化学键的时候，其荧光基团就被 DNA 聚合酶切除，荧光消失。这种荧光标记的脱氧核苷酸不会影响 DNA 聚合酶的活性，并且在荧光被切除之后，合成的 DNA 链和天然的 DNA 链完全一样。

（二） 纳米孔测序

代表性的公司为英国牛津纳米孔公司。新型纳米孔测序法是采用电泳技术，借助电泳驱动单个分子逐一通过纳米孔来实现测序的。由于纳米孔的直径非常细小，仅允许单个核酸聚合物通过，而 A、T、C、G 单个碱基的带电性质不一样，通过电信号的差异就能检测出通过的碱基类别，从而实现测序。目前，Nanopore 平台的测序仪主要包括 MinION、GridION 和 PromethION。

第三代测序技术通过合成互补链技术可对数百万个 DNA 片段进行测序，有着更快的数据读取速度，是第二代测序技术的强劲对手，于此同时，测序的成本也是逐年降低，所以大量的动植物基因组测序以及重测序工作目前都会结合第三代测序技术，从而将获得越来越多的动植物高质量基因组数据。

因为以上两种第三代测序技术各有优劣，所以通常同时采用 PacBio 和 Nanopore 两种技术进行基因组的测序工作。

系统平台	太平洋生物公司		牛津纳米孔公司	
	Sequel	MinION	GridION	PromethION
检测指标	荧光		电导率	
应用	全基因组组装、突变检测、结构变异检测、全长转录本测序、靶向测序、宏基因组测序		DNA、扩增子、cDNA 及 RNA 测序	
最大片段长度	300kb	最长片段>4Mb		
输出（每个流动池）	75Gb	10-30-50Gb	100-200-300Gb	
测序时长	20h	1min 至 72h		
设备价格	大约 525000 美元	9300 美元	69 955 美元	24 流动池： 335 455 美元 48 流动池： 530 000 美元
优点	长片段能够帮助解决序列模棱两可的问题，不需要 DNA 扩增，测序周期特别快		测序速度快，占地面积不大，便携，实时数据分析	
缺点	测序仪昂贵，占地面积大，错误率较高		错误率较高	

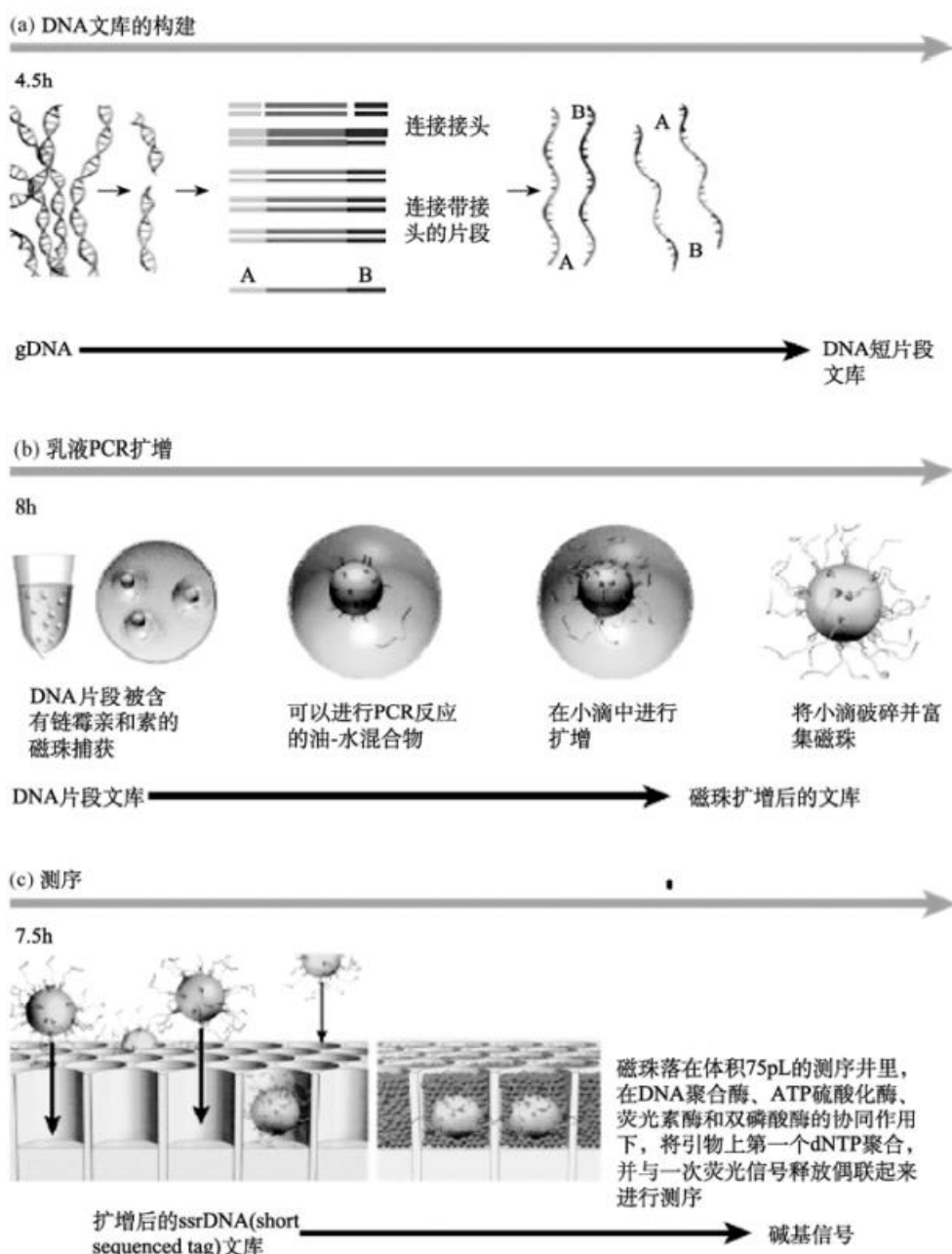
第二节 第二代测序原理

Sanger 测序是先将基因组 DNA 片段化，然后克隆到质粒载体上，再转化大肠杆菌。对于每个测序反应，挑出单克隆并纯化质粒 DNA。每个循环测序反应产生以 ddNTP 终止的荧光标记的产物梯度，在测序仪中进行高分辨率的电泳分离。当不同分子质量的荧光标记片段通过检测器时，四通道发射光谱就构成了测序轨迹。在第二代测序技术中，片段化的基因组 DNA 两侧连上接头（adaptor），随后运用不同的步骤来产生几百万个空间固定的 PCR 克隆阵列。每个克隆由单个文库片段的多个拷贝组成，之后进行引物杂交和酶延伸反应。由于所有的克隆都在同一平面上，这些反应就能够大规模平行进行。同样地，每个延伸所掺入的荧光标记的成像检测也能同时进行，以获取测序数据。延伸和成像的持续反复构成了相邻的测序阅读片段。

1. Roche454 测序仪

Roche/454FLXPyrosequencer 主要技术原理是大规模并行焦磷酸

合成测序：即在 DNA 聚合酶的催化下，dNTP 加入 DNA 的 3'端，并释放出一分子焦磷酸，该分子焦磷酸又与腺苷-5'-磷酸硫酸（APS）结合生成 ATP，最后荧光素酶催化氧化荧光素的裂解，同时发出荧光，从而进行测定。



1) 文库制备：首先随机切割样品基因组，获得大量 DNA 片段。

GSFLX 系统支持各种不同来源的样品,包括基因组 DNA、PCR 产物、

BAC、cDNA、小分子 RNA 等等。大的样品例如基因组 DNA 或者 BAC 等被打断成 300~800bp 的片段；对于小分子的非编码 RNA 或者 PCR 扩增产物，这一步则不需要。然后在 3'端和 5'端接上接头进行扩增反应，具有接头的单链 DNA 片段组成了样品文库（上图 a）。

2) 乳液 PCR 扩增：单链 DNA 文库被固定在特别设计的 DNA 捕获磁珠上。这些小珠子的表面有很多可以与文库中 DNA 片段末端互补的寡核苷酸片段，因此可以和特异的 DNA 片段配对连接。乳液 PCR 利用的是油水混合物，可形成油包水的稳定乳浊液，从而可以将珠子分开，并且保证每个珠子仅与特定的片段连接，珠子内同样含有 PCR 所需的反应物。经过一小时扩增之后，每个珠子表面可有多余 1000000 个的拷贝可用于后续测序（上图 b）。

3) 测序：将得到的携带有 DNA 扩增片段的珠子放入 PTP 板上，由于 PTP 孔直径较小，每个孔只允许结合一个磁珠。将 PTP 板置于 GSFLX 中，开始测序。每当有核苷酸加到 DNA 片段上，荧光素酶就会催化相关反应释放出相应强度的荧光信号，通过信号转换后可以准确快速的获得模板的碱基序列（上图 c）。

尽管 GSFLX 测序系统有比较高的准确率，一般在 99%以上，但是该测序方法也有不足之处。如果被测序片段中含有几个连续的相同碱基，在测序时就会连续发出同样的光信号，由于没有终止的原件来终止反应，信号会不断发出，这样就无法得知究竟有多少重复碱基，只能凭经验猜测，这就是误差的来源。

2. Illumina Genome Analyzer

Illumina Genome Analyzer 是一种基于单分子簇的边合成边测序技术，基于专有的可逆终止化学反应原理。测序时将基因组 DNA 的随机片段附着到光学透明的玻璃表面（即 Flowcell），这些 DNA 片段经过延伸和桥式扩增后，在 Flowcell 上形成了数以亿计 Cluster，每个 Cluster 是具有数千份相同模板的单分子簇。然后利用带荧光基团的四种特殊脱氧核糖核苷酸，通过可逆性终止的 SBS 技术对待测的模板 DNA 进行测序（下图）。与 454 测序相比，该测序过程中核苷酸的添加是可以控制的，这样就提高了连续相同碱基测序时结果的可信度。

1) 文库制备：将基因组 DNA 打成几百个碱基（或更短）的小片段，在片段的两个末端加上接头（adapter）。

2) 测序：将上述 DNA 文库片段加到 Flowcell 的表面，这些玻璃的表面被分成八个独立的区域，而且在其内表面有可以和 DNA 片段互补配对的特异性寡核苷酸序列，这样，当 DNA 片段与玻璃接触时，DNA 片段一端就会因序列互补配对而结合到玻璃上，而另一端序列也会与其他寡核苷酸序列结合，这样就形成了 DNA 桥。经过扩增之后，会在玻璃的表面形成很多分子簇，然后将此玻璃放入测序仪中进行测序。在测序体系中，含有 DNA 聚合酶和四种不同荧光标记的 dNTP，但是这些核苷酸的 3'-OH 端经过化学修饰而失活，不能和其余的核苷酸反应，这样就保证了每次只有一个核苷酸参与反应，提高了测序的准确性。然后，去掉核苷酸上的发光组分，并再通过化学修饰使 3'端活化，参与下一步的测序反应。

3) 数据分析：统计每轮收集到的荧光信号结果，就可以得知每

3. Applied Biosystems SOLiD™ Sequencer

SOLiD 测序仪一次测序可产生 3~4Gb 的数据。ABSOLiD 测序仪特点之一就是每张玻片能容纳更高密度的微珠，将富集模板片段的微珠在玻片上进行高度可控的排列，在同一系统中轻松实现更高的通量。

1) 文库制备：SOLiD 测序仪支持两种测序文库：片段文库（fragment library）或配对末端文库（mate-paired library）。片段文库就是将基因组 DNA 打断，两头加上接头，制成文库。配对末端文库是将基因组 DNA 打断后，与中间接头连接，再环化，然后用 EcoP15 酶切，使中间接头两端各有 25~27bp 的碱基，再加上两端的接头，形成文库。

2) 微乳液 PCR 扩增：在微反应器中加入测序模板、PCR 反应元件、微珠和引物，进行乳液 PCR（emulsion PCR）。PCR 扩增反应结束之后，变性模板，富集带有延伸模板的微珠，去除多余的微珠。微珠上的模板经过 3' 修饰，可以与玻片共价结合，从而制成高密度测序芯片。

3) 连接测序：SOLiD 测序仪没有采用常用的聚合酶，而用了连接酶。通用引物与模板片段两端的接头序列互补结合，然后连接酶将一个被荧光标记的 8bp 长的核酸探针片段连接到引物末端。探针的 5' 端分别标记了 4 种颜色的荧光染料。探针 3' 端第 1、2 位构成的碱基对是表征探针染料类型的编码区，而 3~5 位的“n”表示随机碱基，6~8 位的“z”指的是可以和任何碱基配对的特殊碱基。每次连接反应掺入

一种 8 碱基荧光探针，SOLiD 测序仪记录下探针第 1、2 位编码区颜色信息，随后的化学处理断裂探针 3'端第 5、6 位碱基间的化学键，并除去 6~8 位碱基及 5'端荧光基团，暴露探针第 5 位碱基 5'磷酸，为下一次连接反应做准备。单向 SOLiD 测序包括 5 轮测序反应，每轮测序反应含有多次连接反应。

4) 采集荧光：每次连接反应完成之后，就可以采集荧光图像。比如，第一轮测序的第一次连接反应由连接引物“n”介导，由于每个磁珠只含有均质单链 DNA 模板，所以因为第一次连接反应使合成链多了 5 个碱基，所以第二次连接反应得到模板上第 6、7 位碱基序列的颜色信息，而第三次连接反应得到的是第 11、12 位碱基序列的颜色信息，几个循环之后，引物重置，开始第二轮的测序。第二轮连接引物 n-1 比第一轮错开一位，所以第二轮得到以 0, 1 位起始的若干碱基对的颜色信息。5 轮测序反应后，按照第 0、1 位，第 1、2 位...的顺序把对应于模板序列的颜色信息连起来，就得到由“0, 1, 2, 3...”组成的 SOLiD 原始颜色序列。

5) 数据分析：SOLiD 测序完成后，获得了由 4 种颜色编码组成的 SOLiD 原始序列。按照“双碱基编码矩阵”，只要知道所测 DNA 序列中任何一个位置的碱基类型，就可以将 SOLiD 原始颜色序列“解码”成碱基序列。由于 SOLiD 系统采用了双碱基编码技术，在测序过程中对每个碱基判读两遍，从而减少原始数据错误。SOLiD 系统原始碱基数据的准确度大于 99.94%，是目前新一代基因分析技术中准确度最高的。

第三节 第二代测序技术的应用

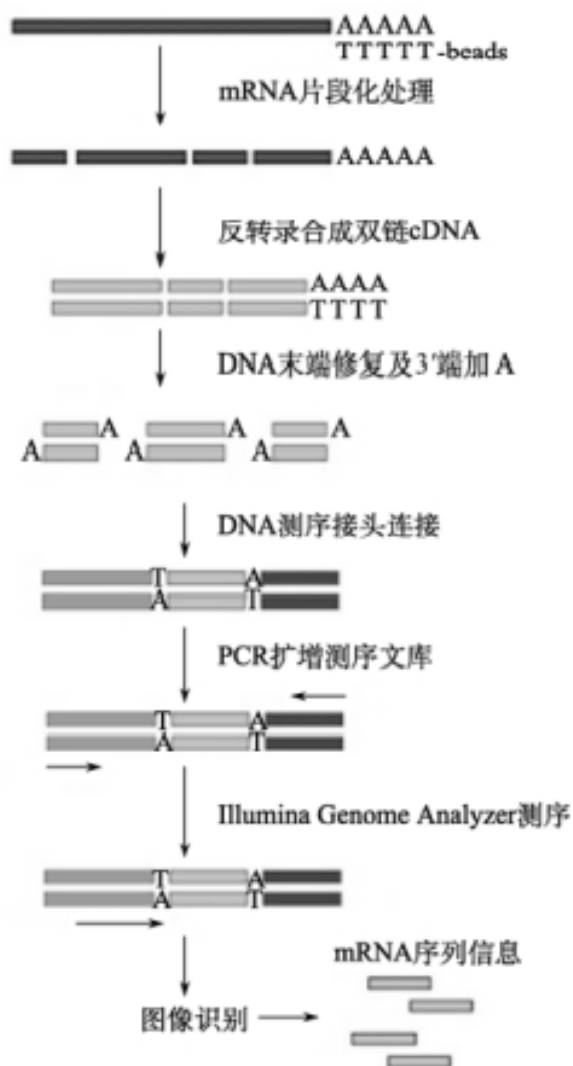
1. 全基因组测序与重测序 (DNA-seq)

新一代测序技术可以方便地得到已知或未知基因组生物样本的 DNA 片段序列, 通过序列组装就可以得到样本的全基因组图谱。全基因组重测序是对已知基因组序列的物种进行不同个体的基因组测序, 并在此基础上对个体或群体进行差异分析。高通量测序可以帮助研究者跨过构建文库这一实验步骤, 避免了亚克隆过程中引入的偏差。依靠后期强大的生物信息学分析, 对照一个参考基因组, 高通量测序技术可以非常轻松地完成基因组重测序。全基因组重测序的个体通过序列比对, 可以找到大量的单核苷酸多态性位点 (SNP)、插入缺失位点及结构变异位点。

2. 转录组测序 (RNA-seq)

转录组即特定细胞在某一功能状态所转录出来的所有 RNA 的总和, 包括 mRNA 和非编码 RNA 等。特定转录组学或全基因组表达谱分析, 目的是为了检测基因组产生的全部 RNA 转录本。在第二代测序中将特定组织或者细胞中的 mRNA 分离后制备成片段化的 cDNA 文库, 通过对 cDNA 文库进行高通量测序, 从而获得一个细胞或生物个体的全转录组信息。RNA-seq 是一种鉴定并且定量解析样品中所有 RNA 的新策略和强大工具。RNA-seq 并不是直接对 RNA 测序, 而是利用最新的高通量测序技术对 cDNA 进行测序, 从而揭示样品中包含的所有 RNA 信息。该技术具有通量高、覆盖范围广、精度高等特点。其不依赖于基因组参考序列, 使所有生物都可以成为研究对象, 同时

能够在全基因组范围内检测真核细胞中广泛存在的可变剪切现象，为转录本的结构研究、基因转录水平研究、全新转录区域研究等提供重要的研究工具。目前针对特定转录组测序有一些新的测序方法出现，如双链 RNA 测序（dsRNA-seq）和单链 RNA 测序（ssRNA-seq）。



3. 非编码 RNA 测序（smRNA-seq）

非编码 RNA 包括长非编码 RNA 和小非编码 RNA。目前的非编码 RNA 测序，主要是针对小的非编码 RNA。smRNA（如 microRNA、tasiRNA 和 piRNA 等）是生命活动重要的调控因子，在基因表达调

控、生物个体发育、代谢及疾病的发生等生理过程中起着重要的作用。实验时，首先将 18~30nt 的 smallRNA 从总 RNA 中分离出来，两端分别加上特定接头后，体外反转录成 cDNA 再做进一步处理，然后利用测序仪对 DNA 片段进行单向末端直接测序。通过对 smallRNA 大规模测序分析，可以从中获得物种全基因组水平的 microRNA 图谱，实现包括新 microRNA 分子的挖掘、靶基因的预测和鉴定、样品间差异表达分析、microRNA 聚类和表达谱分析等科学应用。

LncRNA 是一类长度超过 200nt 的非编码 RNA 分子，他们不编码蛋白质，但是可以转录并且能够和 DNA、RNA 及蛋白质结合，以 RNA 的形式在多种层面上调控基因表达（转录水平、转录后水平及表观修饰水平）。LncRNA 的转录本多数是没有 polyA 尾的，由于大部分 RNA-seq 是利用 polyA 尾来捕获转录本后构建文库，所以在 RNA-seq 中获得的序列主要是编码蛋白质的转录本，只有很少部分的 lncRNA。目前针对 lncRNA 测序最好的策略是用 rRNA 消解法构建测序文库，但是 rRNA 消解法目前还不成熟，费用也很高，所以专门针对 lncRNA 的测序很少。

4. 表观组学测序和染色质免疫共沉淀测序（ChIP-seq）

染色质免疫共沉淀（ChIP）是研究体内蛋白质与 DNA 之间相互作用的强有力工具，通常用于转录因子结合位点或表观遗传学等研究领域。ChIP-seq 首先通过蛋白质免疫共沉淀得到目的 DNA，获得的 DNA 片段加上接头后进行 PCR 扩增得到 ChIP-seq 测序文库后直接进行大规模测序。ChIP-seq 是继 ChIP-Chip 后，检测蛋白质与核酸相

相互作用的又一技术突破，实现了全基因组范围内更精确、更敏感、更经济地定位目的蛋白结合位点。ChIP-seq 被推广应用于表观组学的研究，如检测组蛋白结合位点、核小体位置及染色体结构等多个方面。除了 ChIP-seq，常用的测序方法还有：MNase-seq、DNase-seq、FAIRE-seq、ChIA-PET 和 Hi-C。

5. DNA 甲基化测序

DNA 甲基化是表观遗传学的重要组成部分，在维持正常细胞功能、遗传印记、胚胎发育及人类肿瘤发生中起着重要的作用，是目前新的研究热点之一。在哺乳动物中，甲基化一般发生在 CpG 岛的胞嘧啶 5 位碳原子上，通过使用 5-甲基胞嘧啶 (5mC) 抗体富集高甲基化的 DNA 片段等方法，对所有富集的 DNA 片段进行高通量测序，研究人员能够获得全基因组范围内高精度的甲基化状态，为深入的表观遗传调控分析提供了更有利的切入点。现有的 DNA 甲基化测序方法有以下几种。

甲基化敏感限制性酶切测序 (MRE-seq) 主要是利用甲基化敏感的限制性核酸内切酶对基因组 DNA 进行切割，未甲基化的位点可以被酶切产生不同长度的片段，然后进行测序。这种方法对酶切频率和酶切偏好性的依赖性很大。甲基化免疫共沉淀测序 (MeDIP-seq) 利用特异性识别 5-甲基胞嘧啶 (5mC) 的抗体来捕获基因组甲基化片段，富集后的片段进行高通量测序。MBD-seq 原理与 MeDIP-seq 相同，只不过用的是用特异性结合甲基化的 DNA 蛋白 MBD2 进行富集 DNA 片段。重硫酸盐测序法是一种化学转变法，其原理是经过重硫

酸盐处理后的基因组中未甲基化的胞嘧啶会转换为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶不会变化。主要有两种测序方法：全基因组重硫酸盐测序（MethyIC-seq 或 BS-seq）和简化表达重硫酸盐测序（RRBS）。伴随着测序方法的发展，研究者对甲基化的研究也越来越深入，他们发现不仅仅 5mC 会抵抗重硫酸盐的转化，5-羟基甲基胞嘧啶（5-hydroxymethylcytosine, 5hmC, 5mC 和胞嘧啶的一种中间态）也会抵抗重硫酸盐的转化。随后，一种利用抗体免疫共沉淀捕获 5hmC 序列的方法——hMeDIP-seq 被提出，但是这种方法的分辨率和质量不是很好。2013 年，研究者提出了氧化重硫酸测序和 TET 相关的重硫酸测序的方法。

第四节 生物信息学在第二代测序中的应用

在计算机算法的开发中，需要充分考虑算法的时间和空间复杂度，使用并行计算、网格计算等技术来拓展算法的可实现性。

1. 统计分析

1) 单因素两组数据统计分析。根据一种条件，筛选两组样品之间的差异基因，计算以后提供 P-value（显著性值），根据 P-value 阈值选择显著的差异表达基因。

2) 单因素多组数据统计分析。只考虑一种影响因素，筛选两组以上样品之间的差异基因。

3) 多因素数据统计分析。根据一个以上不同的条件综合评判，筛选多个条件对于两组样品造成的差异基因。

2. 聚类分析

用挑选的差异基因的表达情况来计算样品直接的相关性。一般来说，同一类样品能通过聚类出现在同一个簇（cluster）中，聚在同一个簇的基因可能具有类似的生物学功能。常用的聚类方法有层次聚类、K-mean 聚类和 DBSCAN 聚类等。

3. 机器学习及其他分析方法

由于生物数据的复杂性，根据不同的样本数据和目的结果，可以采用不同的分析方法，如主成分分析法、遗传算法、人工神经网络、支持向量机、自组织映射、置信网络、隐马尔可夫模型等。在数据挖掘过程中也可能用到两种甚至更多种分析方法。

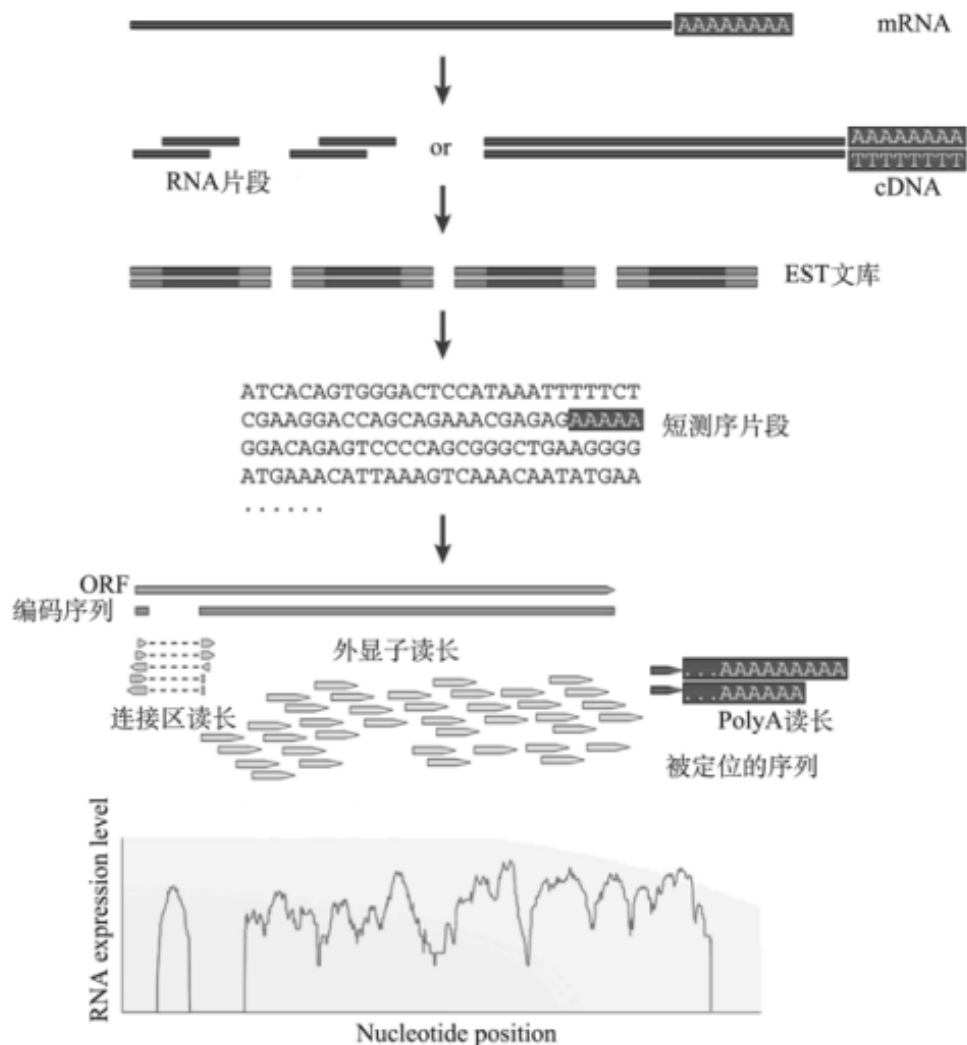
一、 NGS 数据获取

NGS 数据可以根据自己的研究需要自行设计文库并进行测序得到。2007 年，NCBI 建立了新一代测序结果的子数据，利用新一代测序技术测得的数据都可以提交到上面。目前 NGS 数据可以在 NCBI、EBI 和 DDBJ 中得到。

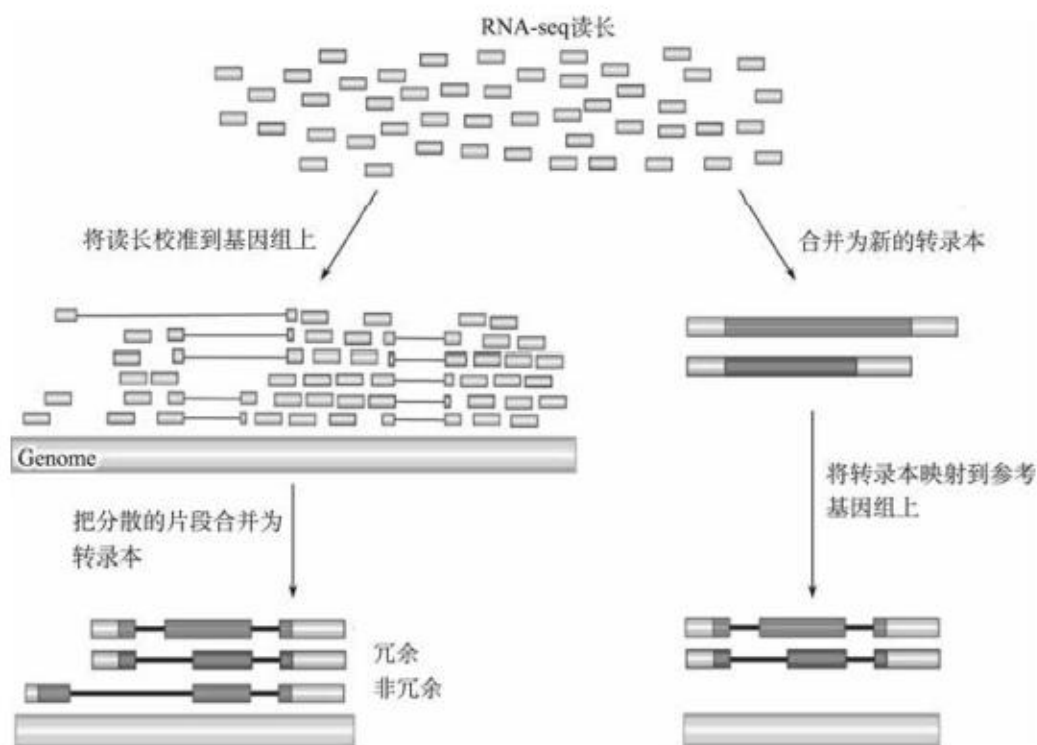
二、生物信息学在第二代测序中的应用举例

1. RNA-seq 中的生物信息学分析

1) 无参考基因组的转录组分析：测序数据产量统计，去除冗余数据，数据成分和质量评估；采用 RNA-seq 分析软件如 Cufflink 重建转录子；计算 Contig 以及 Scaffold 长度分布；Unigene 的长度分布，功能注释，GO 分类；代谢通路分析；Unigene 表达差异分析以及差异表达的 Unigene 的 GO 功能注释。



2) 有参考基因组的转录组分析：测序数据产量统计，去除冗余数据，与参考基因组序列对比后的注释信息；采用 RNA-seq 分析软件如 Cufflink 重建转录子；Reads 在基因组上的分布；测序深度分布，测序随机性评估；基因差异表达分析；新基因预测，基因可变剪切的鉴定，基因融合的鉴定，已知的和新的非编码 RNA 鉴定。

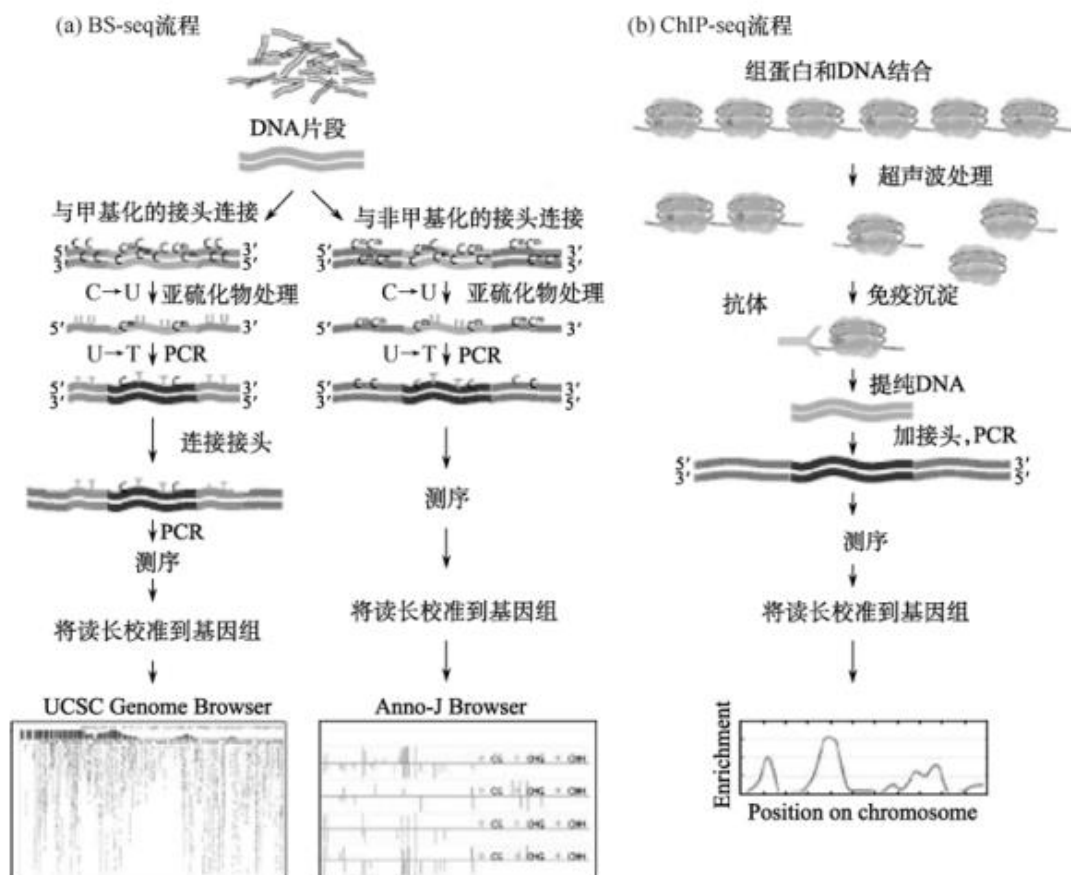


3) smallRNA 和 miRNA 测序分析: smallRNA 的分类注释, 通过与 Rfam 数据库及 GenBank 数据库比对, 鉴定 rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA 等 non-coding smallRNA; 鉴定与重复序列相关的 smallRNA、mRNA 降解片段; 长度分布统计; 与 miRBase 数据库比对, 鉴定已知的 miRNA; 对反义 miRNA (miRNA*) 预测分析; 根据测序物种 miRNA 的保守性, 对测序得到的 miRNA 进行分类分析; miRNA 差异表达分析; miRNA 定位及其在基因组上分布特征挖掘; 产生 miRNA 序列特征; miRNA 靶基因的预测等。

2. ChIP-seq 中的生物信息学分析

ChIP-seq 与参考序列比对; 统计每个样品的 Peak 片段信息、样品的 Unique mapped read 在重复区域、基因区间、基因上的分布情况和覆盖深度; 统计分析每个样品中与基因相关的 Peak 信息, 找到这

些基因；对与 Peak 相关的基因进行 GO 功能显著性富集分析；不同样本中基因的 ChIP-seq 信息差异分析；转录因子结合区域分析和 motif 挖掘；甲基化和组蛋白修饰检测、比较；不同表观遗传修饰对基因表达调控的影响。



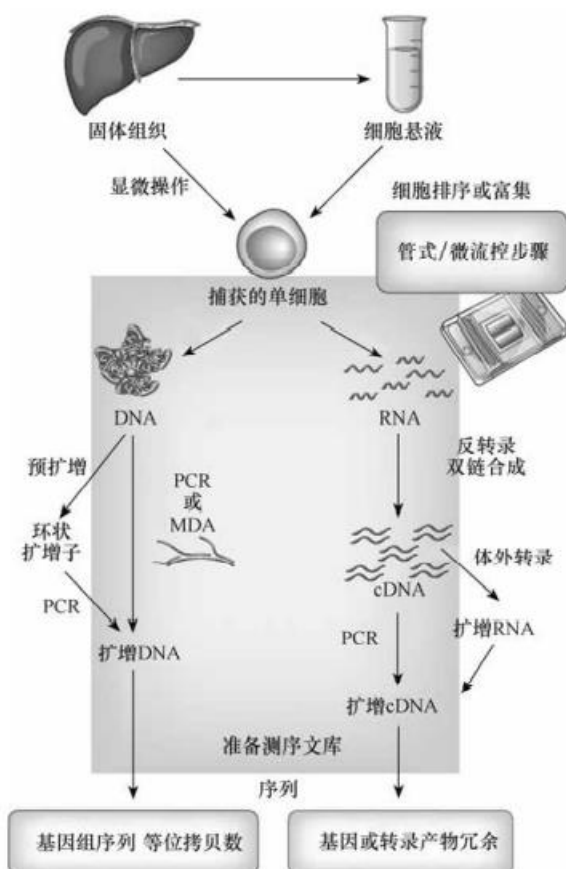
3.NGS 在功能基因组学中的应用

NGS 可以得到基因水平、转录水平和蛋白质水平的不同数据。现在研究往往只基于某一水平进行深入研究，其实利用生物信息学手段可以综合不同的水平进行研究，这样得到的结果往往更具有生物学意义。图 14-10 就是一个基于 NGS 在功能基因组学中的综合研究的很好例子，可供读者深入学习参考。

第五节 生物信息学新技术与发展趋势

一、单细胞组学

在过去的测序实验当中，提取的 DNA 都是来自大量不同细胞混合的产物，测序结果反映了细胞群体的平均信号。在某些情况下，细胞群体中的异质性将会影响研究者的精准需求。例如，如果能从单细胞水平上研究干细胞与其他细胞的差异，以及不同干细胞的分化过程，就可以使干细胞工程变得更具可预测性，单细胞组学技术将成为干细胞理论研究和干细胞治疗研发的重要技术手段之一。为了解决这个问题，近年来兴起的单细胞测序（single-cell sequencing, SCS）技术（如下图），可以在单细胞水平上检测基因组和转录组。如 George Daley 等使用单细胞测序手段揭示了干细胞多能性的更多变化。



不仅如此，单细胞组学在癌症和免疫治疗上都具有重要的意义。癌症细胞以其异质性闻名，除患者间异质性外，同一肿瘤中也存在不同亚群。不同肿瘤细胞抗原表面排布也有着异质性，这使得嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T）疗法中经过 CAR 改造的 T 细胞识别和杀伤肿瘤抗原时相应产生的免疫反应有所不同。单细胞测序可以帮助癌症内异质性的研究，也可以对肿瘤循环细胞（CTC）、早期胚胎细胞等数量不足的细胞进行研究。单细胞测序使基因表达水平的测量精度及对罕见非编码 RNA 的发现能力都得到了提升。如今，单细胞测序不仅成为研究热点，其临床应用也被国家立为重点专项，拥有广阔的发展前景。

细胞是执行生命活动的最小单位。单细胞组学的发展也预示着人类对生物机制的研究达到了一个高度，是研究精准化趋势的体现。2016 年启动的人类细胞图谱计划将对所有不同的人类细胞进行高度分类，收集包括细胞生理学、组织学、功能信息等多方面的数据。对单细胞的研究，将对未来的生物学发展做出巨大的贡献。

二、宏基因组学宏基因组测序

宏基因组学是以某一环境中全体微生物基因组为研究对象，利用生物信息学方法分析微生物群落的多样性、种群结构、功能活性和相互作用等关系。宏基因组最初应用于海洋土壤等研究领域，现在也广泛应用于医学研究，如人类与共生体肠道菌群、感染性疾病等相互关系的研究领域。最初对环境中微生物群落的研究是根据保守的 16SrRNA 进行分析，慢慢发展到对环境中全体微生物的全部基因组

测序分析。传统的微生物研究只能研究纯基培养的微生物，通过分离培养方法进行微生物群落组成鉴定，而生物界中约 99% 的微生物是不可培养的；宏基因组学突破了无法涵盖不可培养微生物的瓶颈，是微生物学研究的重大突破。

宏基因组测序的一般实验流程是：从环境样品中提取 DNA，将 DNA 克隆到合适的载体中；将载体转化到宿主细菌建立基因组文库；对文库进行测序。测序结果往往是成千上百万的短序列片段，这就需要后续的生物信息学分析。由于对 16SrRNA 的测序要比全部基因组测序便宜很多，现在还在广泛地应用。宏基因组测序属于 DNA-seq 的延伸，同样 RNA-seq 的延伸是宏转录组测序。目前宏基因组和宏转录组的研究还处于起步阶段。如何更好地提高组装精确度和效率，如何更好地对物种分类，如何构建符合生态特性的微生物互作模型，这都需要研究者更进一步的努力。

宏基因组学主要应用于海洋、土壤和医学等环境样品中。宏基因组学研究步骤主要包括：环境 DNA 提取、测序、短片段组装、基因预测、功能基因分析，物种组成分析等。高通量测序等分子生物学技术的飞速发展推动了宏基因组学应用领域的进一步拓宽，近年来已经广泛应用到人类与共生体肠道菌群、感染性疾病等相互关系的研究领域，成为探索新发传染病病原体的新思路、新方法。美国国立卫生研究所 (NIH) 建立了人类微生物组学计划 (<http://www.hmpdacc.org/>)。目前 HMP 主要包括了人类鼻腔、口腔、皮肤、胃肠道和泌尿生殖道的宏基因组样本数据和分析流程。

2017 年 9 月，人类微生物组计划已经进入第二阶段，公开了对 1631 个新样本的宏基因组测序结果。人类微生物组计划致力于研究与人体共生的微生物的菌群结构、分子过程、与健康的关系等。2016 年，美国国家微生物组计划则将视野拓展到人类之外的生态系统中，如今也正在随着技术的革新加快进程。

细胞的活动不仅取决于自身的基因组特征，也会受到其周围同类细胞、基质细胞、细胞间质、细胞外基质等因素影响，这些因素统称为细胞微环境。近年来，以癌症细胞为典型的基因组学研究已经开始考虑细胞微环境的影响。同宏基因组学类似，细胞微环境相关研究热度的提升也是生物研究更加全面化的体现。这类研究的发展，将帮助人们对不同细胞之间的相互作用得到更全面而系统的认知。

三. 三维基因组学

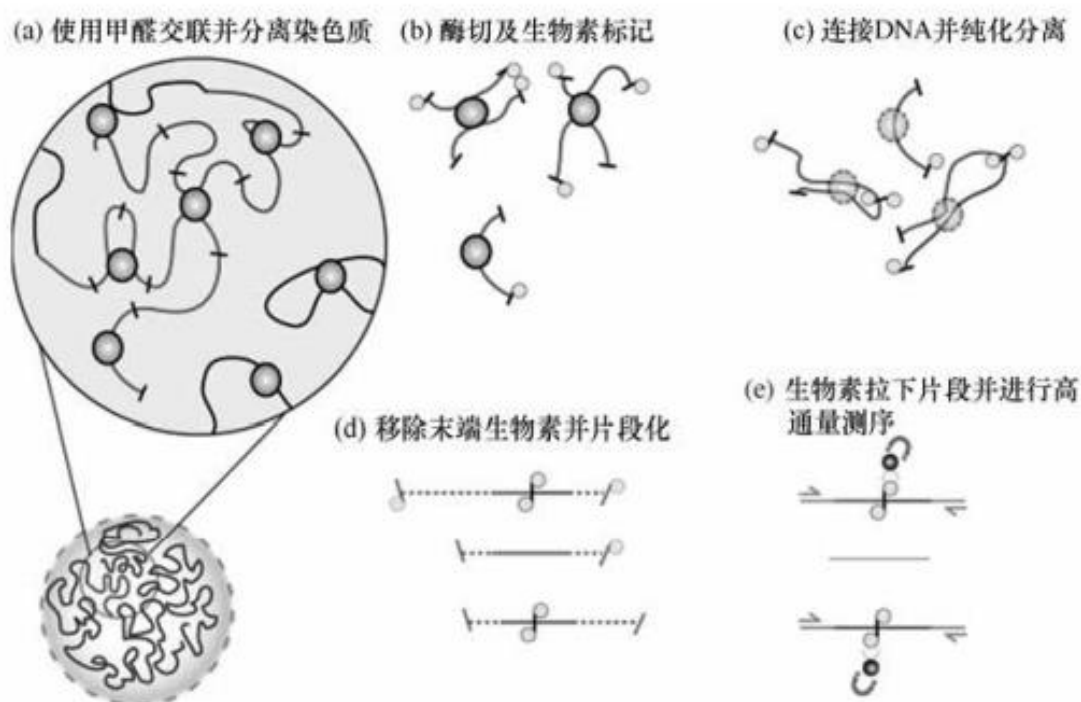
以 Hi-C 技术为代表的空间构象捕获技术的发展，推动了基因组学的第三次浪潮，也就是三维基因组学。

(一) Hi-C 技术

早期的基因组学研究往往从线性角度分析基因组。一维距离上相距很远的两个基因可能会有很频繁的互作，这是因为 DNA 与蛋白质高度浓缩折叠成染色质，这种折叠的结构在调控过程中扮演了很重要的角色。要彻底解析基因组 DNA 的转录、复制、修复等过程，就需要了解染色质 DNA 的空间聚集模式，调控元件的分布、整体结构动态等信息。

Hi-C 技术源于染色体构象捕获 (3C) 技术，其本质是利用高通

量测序技术得到全基因组的 Scaffolds 相互作用信息，并根据“同染色体互作强度高于不同染色体，近距离互作强度高于远距离”的基本原则，通过生物信息分析方法，得到全基因组范围内所有染色体的 DNA 在空间位置上的关系，并获得高分辨率的染色质三维结构信息。通过 Hi-C 技术，人们可将基因组划分为大的功能单位，即拓扑关联结构域（TAD）。TAD 可作为集合的功能元件发挥稳定的调控作用，其边界的变化与疾病相关。如下图所示，Hi-C 首先使用甲醛交联固定结合在一起的 DNA 和蛋白质等，再通过酶切、末端加生物素标记、末端连接、超声破碎，然后建库进行高通量测序。目前常用的类似技术还有 ChIA-PET 等。

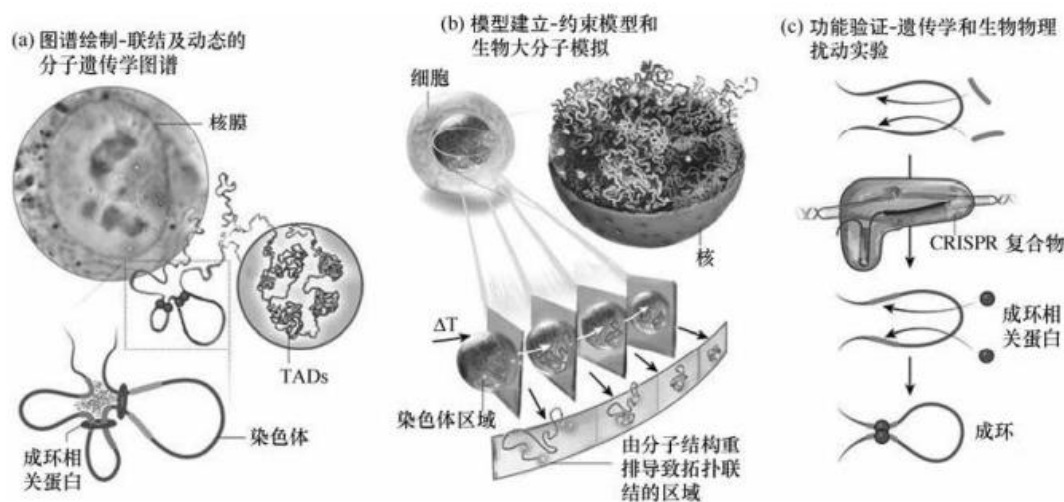


(二) 4D 核体计划

在细胞核中，染色质的空间折叠及组装是基因互相作用的决定性原因，也对基因表达有重要的影响。对于细胞不同的发展阶段，基因

的调控和表达特征都不相同，这是因为染色体折叠的结构也在不断变化。了解了染色质上不同调控元件的功能信息以后，更重要的是理解染色质的三维结构及其动态变化。通过对 3D 基因组增加时间维度，研究者们可以掌握细胞个体在特定时间的演化情况。

4D 核体计划就是结合空间（三维）和时间（第四个维度）来研究细胞核的计划（如下图）。该计划将开发和使用大量的技术来研究不同种类细胞中核和基因组的结构，包括单细胞水平的基因组互作技术、针对活细胞的成像和标记技术、整合多个不同数据集的计算技术等。4D 核体计划旨在定义一套术语和数据类型的规范，建立 4D 核组的全面综合模型，探索细胞核的结构形成原理和核组织对各类生命活动的影响。



4D 核体计划是未来生物学研究目标动态化的一个体现。人们早已尝试用时间序列数据等推断基因组的动态改变，结合了 3D 基因组的精准研究无疑更进了一步。4D 核体计划的目标是构建细胞核结构的精准的定量模型，在不同的细胞类型和条件下都能有良好的表现。

四、新技术之间的相互关系

以上各新技术之间可以互相辅助，如第三代单分子测序可以免去单细胞测序中的扩增步骤，提高测序的精确性。单细胞测序可以辅助宏基因组测序，新细菌 *Candidatus kryptonia* 就是通过这两种技术被发现的。同样，Hi-C 技术也可以帮助宏基因组测序试验中不同微生物基因组的组装。在实验方法日益强大的同时，与实验方法相配的计算方法也快速发展。可以想见，生物信息学的进一步发展，将会对生物学做出前所未有的贡献。