

基因编辑近年来广受欢迎,使得科学家们可对基因进行简单“操控”。但多年来,这一技术一直缺少一个能随时开启或关闭的按钮。现在,我国科学家终于为“基因剪刀”创建了可行的光控开关——

厉害! LED照一照“基因剪刀”就能指哪剪哪

本报记者 张佳星

通过感光元器件实现对事物的控制,“光控”在现实生活中已慢慢普及,例如手机人脸识别解锁、汽车雾灯自动开启……这次被光操控的是基因编辑。我国科学家的这一研究成果近日发表在《科学·进展》

创建关键元件 为基因编辑装上自动开关

CRISPR-Cas9基因编辑技术近年来应用广泛,被形象地称为“基因剪刀”,使得人类掌握了简便可行的基因“操控术”。然而,要更便捷地操控基因编辑,需要一个“便捷按钮”,让人们按一下就能启动,再按一下就能关闭,推动其走进“自动化时代”。尤其当基因编辑要走进临床应用,必须要具有灵活、高精度的操控方法,才能使其更具安全性。“实现光控”需要在基因编辑前装一个“光感装置”用于“引爆”,这个装置长什么样子?有哪些零件?在红细菌中有一种蛋白 BphS,它在接收到远红光的信号后会被激活,释放一个信号。而在放线菌里的蛋白 BldD,接收到这个信号后能与 DNA 序列结合。

验证上百种序列 拼出远红光操控的编辑系统

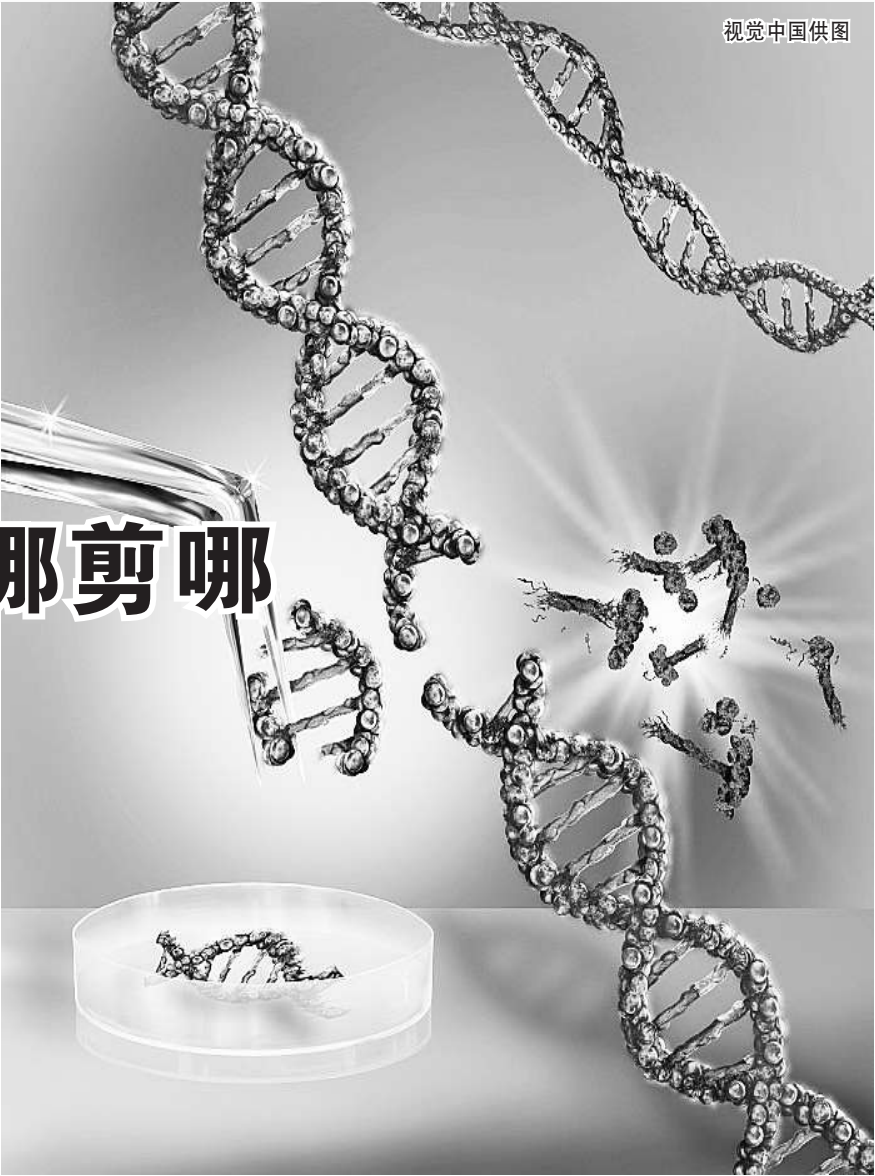
理论“图纸”和关键元器件都已准备就绪,叶海峰团队开始用合成生物学的方法对这些关键元器件进行组装。令人意想不到的,是在细胞水平的验证中,基因编辑并没有因为光的有无而产生明显的变化,远红光照射没能刺激 Cas9 核酸酶的高量表达,熄灭光源也没有阻止基因编辑工作。问题出在了哪里?按照“图纸”设计,整个流程应该是无懈可击的。叶海峰百思不得其解。“这一研究工作我们持续推进了 5 年,有的关键性问题如果不能解决将会耽误整个研究的进展。”叶海峰说,合成生物学要在活体内运转,会有很多无法排查的意外。它不像编程,跑一遍会有纠错,或者至少会提示哪个部分出现“BUG”。这次的“BUG”出现在哪里?启动基因的工作被相继验证。2017 年,2018 年,叶海峰课题组在《科学·转化医学》《美国科学院院刊》相继发表论文,证明了远红光调控转基因表达控制系统的可行性以及基因编辑 CRISPR-dCas9 酶的转录激活都是可行的。

杂志上。

“LED 发出的 730nm(纳米)的远红光可激活系统进行基因编辑工作。”论文通讯作者、华东师范大学生命科学学院、医学合成生物学研究中心研究员叶海峰对科技日报记者表示,只有在光照到的地方,基因的“编辑”“剪切”才会发生,从而真正做到指哪剪哪。

“我看到这个信息的时候,觉得非常兴奋。前一种蛋白让光和生物体‘接上头’,后一种蛋白又‘链接’上了 DNA。”叶海峰说,这种“跨界打通”意味着有很多工作可做,因为只要基因能传导到 DNA,就能推进生物学的操控。叶海峰团队以放线菌中的 BldD 蛋白为基础,将其亲和 DNA 序列与哺乳动物的转录激活子融合,创制了一个杂交型的转录激活子,这一开关成为按下基因编辑“启动键”的关键元件。这一元件的前方设置了光敏蛋白,接收光信号;后方连接上“基因剪刀”Cas9 核酸酶。这个巧妙的设计使得整个系统只有感光后,才能够启动基因编辑。光控基因编辑的“图纸”就此设计完成。

“我们试验了各种方案,但整个系统的运行却都失败了。”叶海峰说,这个结果意味着需要对策略进行根本性的调整。直到有一天,叶海峰在《自然·生物技术》上看到一篇张锋(基因编辑技术发明人之一)的文章,上面说基因编辑的 Cas9 核酸酶可以一拆为二,拆开来之后的两半再合起来也是有功能的。“受到这样的启发,我们就想可不可以把它拆成两半,一半是连续的强表达(自始至终一直表达),另一半用光驱动调控来表达。”叶海峰说,就像“钥匙”的两半拼在一起才能开锁一样。“拼”这个动作又要怎么自动实现呢?叶海峰想到了热纤维梭菌中的一对能够自发相互结合的蛋白 Coh2 和 DocS。让它们加入进来,分别与 Cas9 的两部分融合,Coh2 和 DocS 就会像“磁石”一样,将 Cas9 的两部分拼装成完整、有功能的 Cas9 核酸酶。“究竟是哪一半用光来调控诱导表达,都是有说法的。”叶海峰回忆,课题组对多种情况进行了试验,至少进行了上百种不同序列的验证,以寻找最佳光控基因编辑效果。



证,以寻找最佳光控基因编辑效果。

“我们还对整个系统进行了优化,例如质粒的浓度配比,核输入信号和核输出信号的选择及组合等,并在细胞水平进行了测试。”叶海峰说,经过严谨的优化,实验结果最终令人满意,并将其命名为“FAST 系统”。研究结果显示,FAST 系统在 LED 发射的低强度远红光照射下可以诱导细胞内的基因编辑,而在黑暗情况下保持“静默”的效果也很好。

光照时间太长 活体高效递送还需“打怪升级”

生命体是复杂的,在细胞水平运转良好的系统在活体中能不能工作,仍面临着重重挑战。为此,在进行了细胞验证后,研究团队还进行了转基因报告模型小鼠和肿瘤模型小鼠的验证工作。“让整个系统在活体中工作,会遇到新的问题,比如递送的问题。”叶海峰解释,FAST 系统由好几个质粒组成,它们进入细胞比较简单,但不能突破重重阻碍进入到组织细胞里面呢?比如高效递送到肝脏和肿瘤组织里面,就需要借助于递送系统,而且递送的效率直接决定整个系统的工作效率。“研究推进时,递送技术是又一个难题,我们最初直接通过静脉注射,效果却不是那么好。”叶海峰说,“细胞中工作的质粒在进入活体的时候受到了阻碍,因为整个系统承载的元件太多,所有元件同时递送的效率不能保证,且质粒会被机体认为是外来物而被清除掉。”想进入活体,整个系统还需要再调整。“这就好比原来坐的卡车太大了、目标明显,需要换乘一个‘特洛伊木马’潜进去。”叶海峰说。研究团队后来在合作团队的帮助下,使用另一种更小的、能够整合进细胞里的质粒进行

进一步研究表明,FAST 系统在多种细胞中均显示出可调控的基因编辑效果,并具有很好的光照强度和时间依赖性,以及高度的时空特异性,为研究 FAST 系统在动物体内的可调控基因编辑能力奠定了基础。“我们至今也不太清楚为什么直接调控表达完整 Cas9 核酸酶的系统不成功。”叶海峰说,不按程序走,这就是生命科学的神奇之处,而合成生物学正是在破解这些意外中积累起来,最终解决更大的科学命题。

递送工作。实验结果中,转基因小鼠在肝脏部位显示出了基因编辑的报告情况,表明小鼠肝脏细胞中 DNA 可通过光控编辑。实体瘤是比组织器官更致密的组织,进入其中则需要进一步升级递送系统。“为了把 FAST 系统高效递送到肿瘤组织细胞里面,我们与浙江大学专门制作 DNA 分子递送的团队合作,用纳米技术合成的材料实现了向肿瘤组织的高效递送。”叶海峰说。在肿瘤小鼠模型中的验证结果显示,将 FAST 系统递送至小鼠体内的肿瘤后,通过远红光 LED 的照射,FAST 系统能切割肿瘤致癌基因,从而显著抑制肿瘤的生长。再好的技术只有走进应用才能实现价值。“之所以希望实现光控,初心就是希望推进广泛的应用。”叶海峰说,实验也证明了远红光可以透过小鼠的皮肤进入到小鼠的肝脏内部,甚至进入到实体瘤内部。这意味着 FAST 系统有疾病治疗的应用潜力。叶海峰表示,团队仍在进一步优化光控基因表达系统,例如现在的光控系统需要光照 2 小时才能工作,而未来希望得到改进后,照射几秒就能产生效果。

封面故事

主持人:本报记者 聂翠蓉

跨越十个年龄段 小鼠大脑突触图谱诞生

《科学》
2020.7.17

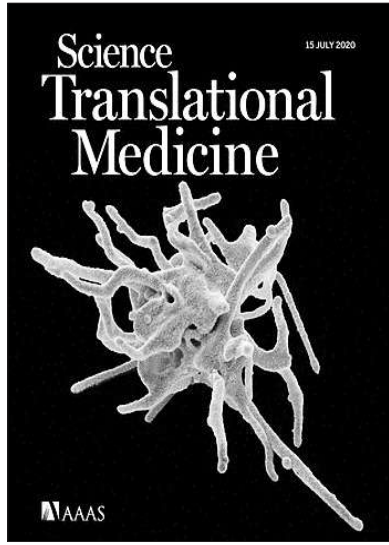
在人类大脑的新皮质里,有 100 兆个突触,每一个突触都是一个复杂的实体,内含数千种不同的信号传输蛋白。搞清不同突触的功能与变化,对于理解大脑的功能有着重要意义。来自英国、法国以及瑞典的科学家们组成的国际研究团队,选取最小 1 天、最大 18 个月 10 个年龄段小鼠,分析了它们大脑中 50 亿个“兴奋性突触”的分子与形态特征。他们选取了两种绝大多数突触都携带的神经元结构蛋白(SAP102 与 PSD95)并给它们加上了荧光标签。根据这两种结构蛋白的表达,以及突触的分子与形态特征,研究人员为 3 个类型 37 个亚型的突触找到了它们在小鼠大脑中的各自“地盘”,从而绘制出小鼠的大脑突触图谱。这项对于突触的“人口普查”,有助于我们研究不同发育阶段大脑的突出变化,也将为理解大脑发育、衰老以及脑部疾病提供重要的研究工具。



既抗血栓又防出血 新型肽纳米颗粒做到了

《科学·转化医学》
2020.7.15

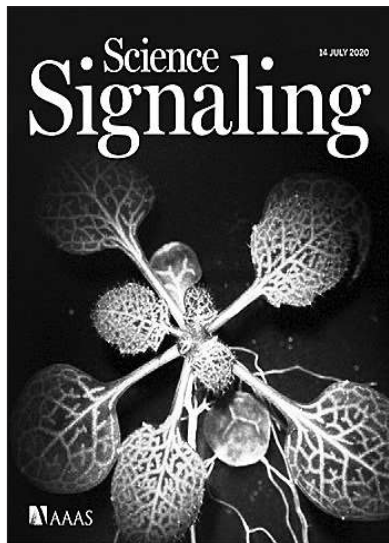
出血是现有抗血小板药物的常见副作用。目前的抗血小板药物可以防止导致心脏病发作和中风的血液凝固,但如果血管破裂,也会破坏血小板止血的能力,甚至出现大出血危及生命。美国芝加哥伊利诺斯大学研究人员杜晓平(音译)等研发出一种新药——高负载肽纳米颗粒(HLPN),既能防止血栓形成,又不会让人容易出血。在之前的一项研究中,杜晓平和同事们发现了一种在血液凝固过程中起重要作用的信号传导机制,基于这一发现,他们研发出一种针对该信号机制的肽(M3mP6),并设计了纳米颗粒 HLPN,成功地将肽导入血小板。小鼠实验表明,高负载肽纳米颗粒比氯吡格雷/阿司匹林联合用药更能抑制闭塞性血栓形成,比其他药物更能抑制血管内凝血,缺血后注射该纳米颗粒可保护小鼠免受心肌缺血再灌注损伤。这项研究展示了一种有效的体内肽传递策略,不仅可预防血栓形成,且出血风险最小。



植物发送受伤信号 离不开谷氨酸受体蛋白

《科学·信号》
2020.7.14

植物会产生系统性的钙离子波和电信号,并从伤口部位传播到远端组织,以防御食草动物和线虫的伤害。为研究植物如何产生和传递这些快速移动的系统性伤口信号,美国加州大学伯克利分校的栗旺(音译)等科学家开发了一个系统,可测量拟南芥根部损伤的系统性创伤信号传导所必需的物质;在受伤根部施加谷氨酸盐,可诱导拟南芥根芽的钙离子和电信号传导。而在培养的哺乳动物细胞中,GLR3.3 和 GLR3.6 是 pH 敏感的谷氨酸门控钙通道。这些结果表明,损伤既可导致谷氨酸从韧皮部渗漏到胞外体间隙,又可导致胞外体 pH 值升高,从而激活谷氨酸受体蛋白,产生全身钙离子波和电信号,以此来传播全身伤口信号。



5年内占比25%,10年内占比提高到50%

替代工业氮肥,我国生物固氮应用有了“小目标”

本报记者 马爱平

工业氮肥的施用满足了农作物的高产需求,同时也带来了土壤板结、水体富营养化等环境问题。如何利用生物固氮这种大自然提供的绿色氮肥减少农业生产对工业氮肥的依赖,是摆在研究者面前的重要科学问题。近日,北京大学生命科学学院王忆平课题组发表论文称,他们揭示了固氮酶相关机制并筛选出相关突变体,有望构建出高效通用的固氮酶系统。中国农业科学院生物技术研究所研究员林敏在接受科技日报记者采访时表示,如何提高固氮效率,扩大根瘤菌共生固氮的宿主范围,实现主要农作物自主固氮,完全或部分替代工业氮肥是当前生物固氮研究前沿,也是一个世界性的农业科技难题。

国际研发聚焦三种技术路线

“在自然界中,某些原核微生物在常温常压下通过固氮酶将空气中的氮素转化为氨,这一过程称为生物固氮,这类微生物称为固氮微生物。”林敏说。

从 1888 年德国微生物学家赫尔利格与维尔法思首次证明豆科植物有固氮能力至今,生物固氮研发已有 100 多年的历史。林敏解释,在农业生产系统中,根际是生物固氮及固氮菌与宿主作物相互作用的主要场所,固氮菌与宿主作物形成一个复杂的根际固氮体系。根据与宿主植物的关系,生物固氮可分为共生结瘤固氮和根际联合固氮等类型。“虽然共生结瘤固氮体系效率最高,可为豆科植物提供 100% 的氮素来源,但仅限于豆科植物,应用潜力有限。而根际联合固氮体系不能形成根瘤等共生结构,受根际生物逆境(如病虫害)和非生物逆境(如碳源不足、田间施肥氮抑制、干旱、盐碱等)不利因素的影响非常大,从而大大限制了非豆科作物根际联合固氮在农业中的应用。”林敏说。

当前,国际固氮合成生物学研究发展迅猛。随着全球生物组学、表观遗传学和合成生物学等前沿理论与技术不断交叉融合,有可能在不远的将来取得生物固氮农业应用的重大突破。

林敏表示,王忆平课题组的研究成果通过将 Nif 基因直接导入真核细胞中,用合成生物学方法,确保活性固氮酶生物合成所需的组分是稳定

的,并以适当的化学计量学方法表达。这种重建方法可能有助于预评估 Nif 蛋白在植物中的表达稳定性,并利用合成生物学攻克真核细胞器中稳定固氮酶表达的障碍,朝实现作物自主固氮的目标迈出重要一步。

“目前国际上在此领域的研究聚焦如下三种技术路线:一是人工改造根际固氮微生物及其宿主植物,构建高效根际联合固氮体系。二是扩大根瘤菌的寄主范围,构建非豆科作物结瘤固氮体系。三是人工设计最简固氮装置,创建作物自主固氮体系。”林敏说。

我国提出三阶段应用目标

虽然生物固氮研究有上百年的历史,但迄今为止未能在农业生产中广泛应用。

究其原因,林敏认为,首先,固氮体系特别是表达调控系统非常复杂。其次,两种根际固氮体系——豆科作物结瘤固氮和非豆科根际联合固氮体系,本身存在天然缺陷,其受环境影响较大,田间应用效果不稳定。合成生物学的出现为生物固氮难题的解决提供了革命性的技术途径。采用合成生物技术平台,极其复杂的固氮系统能