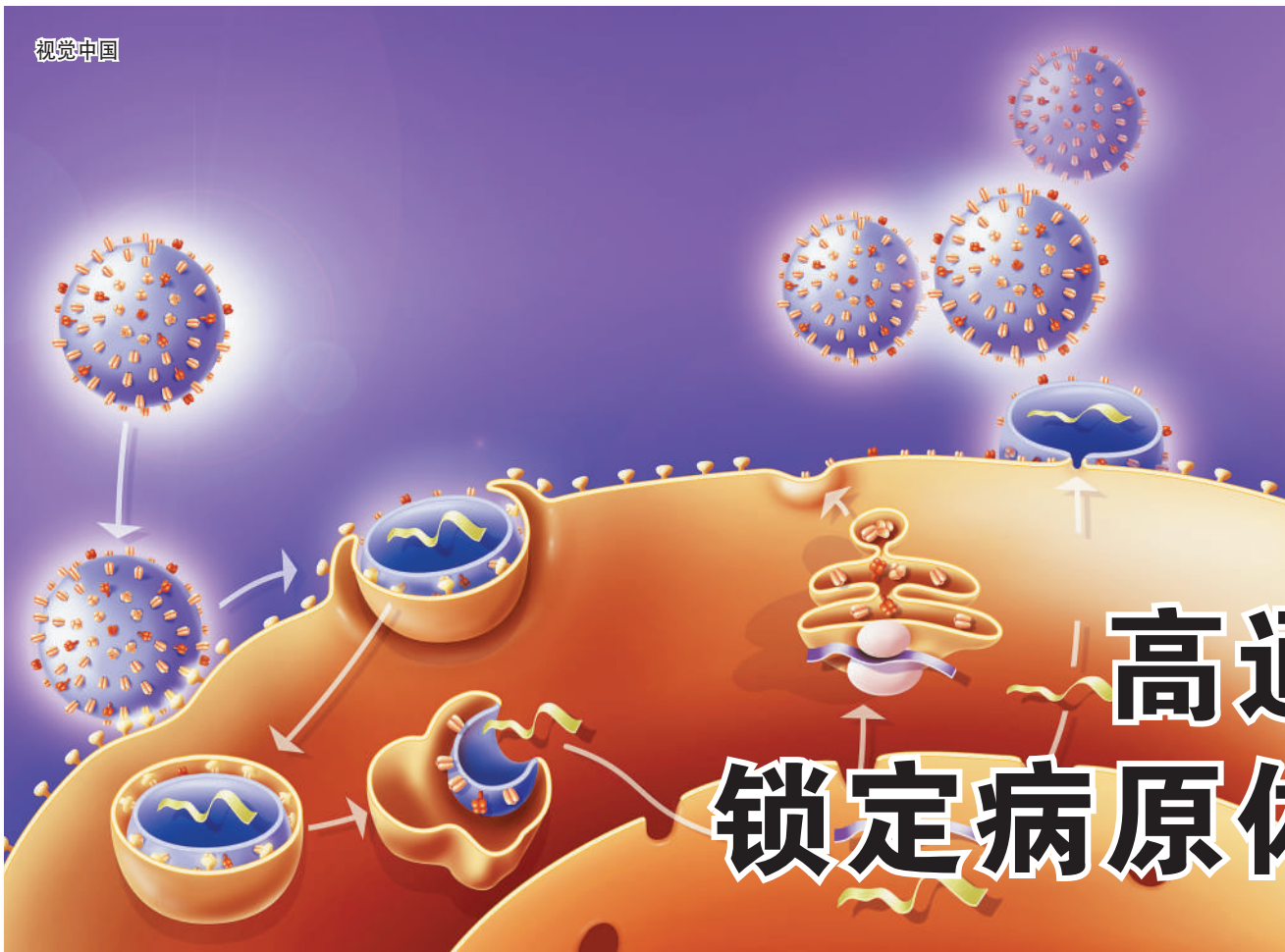


视觉中国



## 高通量测序 锁定病原体“命门”

本报记者 张佳星

《科学》杂志的历史上,刊载过一篇沉重的学术文章。2014年一篇关于通过基因组学手段监测埃博拉病毒的起源和传播的论文,在刊登时已有6名研究人员因感染埃博拉而死亡。“对埃博拉病毒的研究和控制是高通量测序技术(二代测序技术)全面应用的首次‘实战’。”日前,在中国医学科学院、北京协和

医学院主办的第二届感染性疾病精准医学高峰论坛上,参加过与埃博拉病毒一线作战的研究人员,对中国团队与埃博拉病毒“作战”的战略战术进行了揭秘。中国科学院武汉病毒研究所研究员刘耀表示,病原体能使人类群体性致病甚至致死,二代测序技术及宏基因组学能帮助人类追溯病原体、捕捉放大它们在分子水平上的变化,锁定病原体“命门”,最终赢得“人毒之战”“人菌之战”。

究员童刚的注意,“近年来发生的重大传染病疫情大部分由动物病毒跨种传播引起,此次疫情发生地距离SARS发源地小于100公里。我们通过遗传物质的测序确定致病病毒也是一类冠状病毒。”病毒类型、发生地点以及近年规律都不同程度地亮起“警报”。

《变形金刚》里的威震天被消灭多次,却在宇宙的尽头休整,一旦人们放松就伺机重生。SARS冠状病毒在2003年造成了全球性的恐慌之后,会不会上演威震天的戏码?

为了回答新发现病毒与SARS病毒同源性如何、如何传播、感染人类能力等问题,多个科研机构组成的团队共同展开研究,基于二代测序技术进行病毒分离鉴定、动物感染回归实验、回顾性检测等工作。团队将新病毒命名为猪急性腹泻综合征(SADS)冠状病毒。

“通过新旧病毒的比对,我们发现它与

SARS病毒在外壳蛋白上有86%的相似度。”童刚刚说,这说明感染蛋白可能发生了变化。也就是说,病毒获准进入人体完成感染的“敲门砖”变了。

随后,科研团队用已确定的病毒特征为“诱饵”,在广东地区近几年收集的蝙蝠标本中,寻找是否有蝙蝠携带关联病毒。在几百个样本中,团队获得了58份结果为阳性的样本,大部分来自中华菊头蝠(注:科学家们此前证实SARS病毒正是来源于中华菊头蝠)。团队进行了病毒传播路线图的绘制,发现发病的4个猪场并没有相互传染,很有可能是通过蝙蝠的粪便传播。

“我们对猪场的饲养员进行了病原体检测,没有发现人员感染。”童刚刚说,但是对于病毒组学的研究表明,该类病毒是有能力感染人类的。病毒对人体的作用,以及激发人体内的免疫反应和对病毒表达的调控,仍是一个严峻课题,有待探索。

## 测准遗传物质 新策略抓住病毒“七寸”

在2014年西非埃博拉病毒爆发期间,美国的团队最初断言病毒可能在加速进化。刘耀回忆,这一发现在当时是一个“面临强敌”的信号,它意味着传统的检测防治方法或许失效,如果埃博拉病毒是迅速变化且致命性叠加的致病原,其危险性将比人类最初认知的更高。“病毒在短时间内迅速变化并不符合进化逻辑。”刘耀说,要改变美国团队的结论,中国团队需要提供更多的事实和数据。

中国团队在非期间检测了大量临床样本,对175株埃博拉病毒进行了全基因组测序。“利用二代测序技术,很少的变异也能被‘觉察’到。”刘耀说。

二代测序的应用不是简单地将病例样本中的基因提取出来进行比对。全基因组的遗传信息繁杂而海量,测定不只包括量的叠加,还包括相互作用和影响,即测定病毒在宿主体内的进化,以体现宿主和病毒的基因组之间的相互作用与关联。宏基因组学的研究基础是人病毒的遗传物质混在“一个篮子里”,这增加了研究工作难度;此外,由于埃博拉病毒是RNA病毒,

共同提取的将是人类遗传物质中的RNA,RNA的复杂程度也加大了研究难度……

为此,研究团队设计开发了埃博拉病毒基因组的新测序策略——扩增子深度测序技术,并开发了一套全新的生物信息学分析流程。“我们设计了标准质粒进行方法验证,将测序方法的假阳性率控制在千分之一以下。”刘耀介绍,考虑到在宿主中病毒的痕量,团队还在方法的敏感性上取得了突破,做到低浓度样本下仍能检测到位点变化。

团队对于样本的生物信息学分析,在病毒暴发过程中第一次锁定了埃博拉病毒的“进攻路线图”。刘耀展示的病毒地理学联络图,显示与西非的城市热度和交通枢纽相一致。

除了进攻路线,团队还揭示了埃博拉病毒基于自身的“战术变化”——在宿主体内,埃博拉病毒曾经产生了710个单核苷酸变异点,也维持着最保守基因的不变。保守基因的发现相当于抓住了病毒的“七寸”。刘耀逆向思维,“最保守基因的突变对于病毒大都有害,可以作为最有效的抗病毒靶点。”

## 预判威胁 防患SARS“东山再起”

同类技术在SARS(严重急性呼吸综合征)同族病毒的发现与监控中,也发挥了居功至伟的作用。

几年前,广东省四个猪场出现了小猪仔急性腹泻死亡的疫情,两万多头小猪出生后6天之内迅速死亡。这引起了军事医学科学院研

## 初入临床 颠覆对罕见菌致病性认识

除了在威胁全球的重大传染病疫情的防控中发挥重要作用,二代测序技术在日常临床中的应用将有助于“认新”“控药”“测毒”等,即诊断新型病原体、确定病毒的抗原性以防止抗生素滥用、测定不同流行病的源头等。

“近一年仅我们团队在诊断病历中就发现8例诺卡氏菌病例。而在教科书中,这类菌被描述为罕见菌。”复旦大学附属中山医院感染病科主任胡必杰教授说,过往资料表明,人类对这种菌的致病性认识非常有限。

胡必杰认为,现实与教科书中的反差是由于此前的手段难以帮助医生诊断出这种致病菌。“它非常细小,在同样的培养条件下,很难被分离出来,而且需要7天才培养到可见。普通培养一般3天。”胡必杰说,菌体的“个性”使得凭经验在病例中发现它相对困难。

二代测序技术让它们重新回到医生的诊断“视野”。胡必杰表示,通过对宏基因组进行测序,可无差别地检测各种病原体,突破了传

统检测手段的限制,大大提高了病原学检出的敏感性,这种之前难以被检出的病原体也“露了馅”。24小时内诊断也能为急性感染的判断和对症迅速给出参考。

由于设备要求高、技术门槛高、平台构建需要大量资金投入,目前在临床应用领域,二代测序只是“初入”,只有条件好、资金充足的少量三甲医院在建相关平台、培养和储备技术人员。此外,不同样本的提取如何才能高效准确、遗传物质的提取质量标准如何,都尚待完善。中国食品药品检定研究院的双盲测试表明,对于同样的已知基因,不同测序公司的结果也并非完全一致。

中国工程院副院长、中国医学科学院、北京协和医学院院校长王辰院士呼吁:感染性(传染性)疾病危害严重,精准诊断是实现其精准防控的前提。针对感染这一重大医学问题,需要将基因检测与传统检测相结合,加快将最新的生物科技转化成先进生产力,应用于临床感染精准诊疗。

## 潘多拉病毒,基因世界的“匹诺曹”

### 第二看台

本报记者 孙玉松

《木偶奇遇记》中和蔼可亲的老木匠皮诺诺和匹诺曹的故事,很多人都非常熟悉。可你知道吗?在携带生命密码遗传信息的基因世界里,竟然也有皮诺诺和匹诺曹一样的“神存在”。日前,法国科学家在研究中新发现的三种潘多拉病毒,可能擅长创造全新的基因,并在病毒庞大的基因组中发现了许多“孤儿基因”。潘多拉病毒的“魔盒”是如何制造新基因的?带着好奇,记者采访了研究病毒的科学家。

直径1微米,病毒界的“大块头”

2013年,科学家分别在智利海岸河流沉积物表层和澳大利亚墨尔本附近一个淡水池塘底部泥浆中发现了两种全新的巨大病毒。科学家研究发现,它们与其他已知病毒迥然不同,只有6%的基因与地球上其他生物的基因类似,拥有一个完全独立的基因谱系,其独特性属于一个全新的分类。于是,这两株病毒分别被命名为威潘多拉病毒和潘潘多拉病毒。

“在病毒世界里,潘多拉病毒可是‘大块头’,比目前人类已知的所有病毒都要大得多。”6月24日,南开大学药物化学生物学国家重点实验室刘新奇教授开门见山地对科技日报记者说,“这类病毒直径达到1微米,基因组包含了190万到250万碱基对的DNA,体积在病毒界位居第二,基因组规模位居第一。”

刘新奇介绍说,潘多拉病毒寄居在变形虫体内,形状和细菌非常相似。此前,人类发现的大多数传统病毒的直径在10纳米到500纳米之间,人类已知的最大病毒“梅格病毒”的大小不过440纳米。“潘多拉病毒的遗传密码的大小,超过梅格的两倍。”刘新奇边说边比划道,“目前,科学家仍然不清楚为何这种细胞形态会演变成病毒,有人猜测它们可能是为生存而进行了自我进化;还有一种科学猜测,可能是从寄主那里获取遗传信息,从而使它们以不寻常的基因组存活下来。”

擅长创新,制造的基因形单影只

这种体型硕大的病毒会不会威胁人类健康?面对记者疑惑,刘新奇笑着说:“病毒能否攻击人,得看它与人类亲缘关系远近。人类基因在不断进化,病毒封存时间越长,与人类关系越远

越无害。虽然这些巨型病毒能攻击阿米巴变形虫,但是它对人类健康没有危险。”

采访中记者了解到,迄今为止,科学家一共发现了六种潘多拉病毒。这些病毒来源地散布世界各地,相距甚远,病毒的形态和功能虽然非常相似,但研究发现,每种病毒间的基因组相似度不高,编码蛋白质的基因中甚至只有一半相同。“现代生命科学一般认为,地球上所有生物有着共同祖先,大多数基因在各种生物中都有相似度很高的同源基因。”刘新奇解释说,在潘多拉病毒身上,发现了许多在其他生物中找不到的序、似乎无亲无故的基因。“这些基因好比没有父母的孩子,在DNA世界里形单影只,好比一个个‘孤儿’。”虽然科学家早已在其他生命中捕捉到了这种“孤儿基因”,但在潘多拉病毒身上,“孤儿基因”特别多,而且相互间也不尽相同。

“这些基因不是从祖先那里继承来的遗产,而是每种病毒自己的全新发明。”刘新奇认为,这一研究观点若能得到科学证实,不仅意味着潘多拉病毒特别擅长基因创新,其“创新”机制更有助于解开生物进化中新基因起源之谜。

孤儿基因,生命里的“奇迹”

翅膀蛋白控制昆虫飞行,珊瑚、水母等长有

蜇刺细胞,北极鳕鱼特别抗冻……科学证实,这些独特的功能都是由孤儿基因操纵演化而来。以往,生物学家们普遍认为,大多数的基因都可以被划到大家族中,而且每个家族都有着数百万年的悠久历史。可自从有了基因测序技术后,科学家们惊奇地发现,每个物种竟然有多达三分之一的基因总是形单影只。1998年,当科学家完成酵母基因组测序后,发现有大约1/3的酵母基因好像找不到同家族的基因,“孤儿基因”从此进入了生命科学家的视野。

每个基因都有可能在不经间被额外复制,多数复制出来的拷贝很快会消失殆尽,但也有些幸运儿得以和正版基因一起行使职能,更有甚者居然能发展出全新的功能。“基因也好像动物界常见的那样,随着一代又一代的繁衍,开枝散叶最终会成一个大大的家族。”刘新奇说道,“虽然科学家不停地追溯,试图为更多‘孤儿基因’寻找到‘祖先’。但迄今为止,其研究仍处于起步阶段。”

再回首找不到来路,那是因为我们从没有走过。刘新奇认为,如同匹诺曹由木头雕琢而成一样,孤儿基因其实是机缘巧合被自然逐渐雕琢而成的基因。“一旦揭开面纱,将有助于我们人类更好地认识生命,掌握未来。”刘新奇说道。

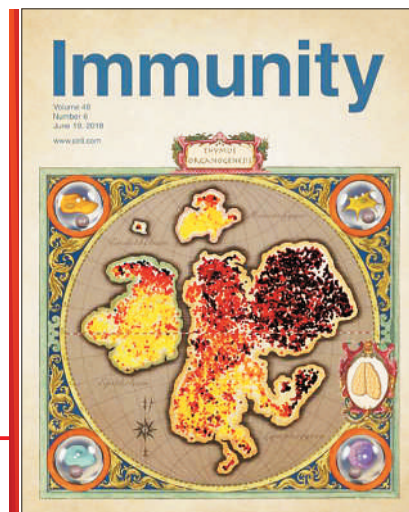
### 封面故事

## 为治疗肺癌潜在方案 多种激酶抑制剂或

《科学·转化医学》  
2018.6.20

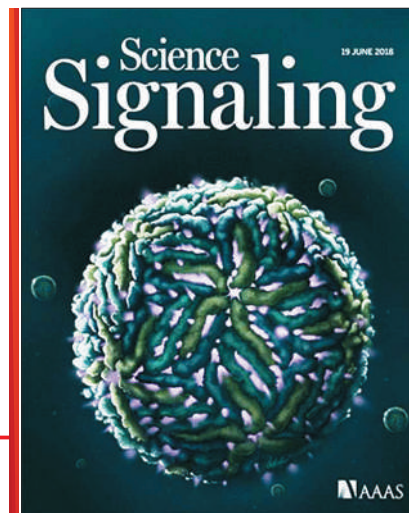
K-RAS致癌基因能在肺癌等多种癌症类型中经常发生突变,针对具有K-RAS突变的肺癌,靶向性药物作用效果往往不如人意,通常认为的原因是,受体酪氨酸激酶抑制剂作用于K-RAS蛋白上游活性部位,造成耐药性。奥地利维也纳医科大学研究人员和英国格拉斯哥大学癌症科学研究所的研究人员,各自展开的独立研究同时发现,酪氨酸激酶信号传导才是导致靶向作用失败的关键,并通过多个小鼠模型研究发现,在K-RAS突变肺癌中,同时使用多个获得批准的激酶抑制剂,能产生很好的效果,表明多激酶抑制剂可能是治疗肺癌患者的一种潜在策略。

## 胚胎胸腺细胞有关 自身免疫病与

《免疫》  
2018.6.19

胸腺发育对自适应免疫系统至关重要。美国马萨诸塞州大学医学院的艾瑞克·克恩费尔德等研究人员,应用单细胞RNA测序技术对发育到8天的胚胎胸腺细胞、T细胞受体重排紊乱等进行了观察。研究证实了T细胞在常规和非常规淋巴细胞中的身份,描述了体内胸腺上皮细胞的成熟动力学,并揭示了胸腺上皮细胞保持转录规律的内在能力。通过将细胞图谱与人类全基因组关联研究(GWAS)数据和自身免疫性疾病相关基因相结合,他们发现胚胎胸腺细胞可能是自身免疫性疾病病因的参与者。

## 抗病毒感染新机制 核糖基化成

《科学·信号》  
2018.6.19

I型干扰素信号驱动着数百种干扰素刺激基因(ISGs)的表达,这些基因对宿主和细胞防御病毒感染至关重要。为了识别限制寨卡病毒感染的干扰素刺激基因,中国科学院感染与免疫重点实验室李丽丽(音)等研究人员,对CRISPR敲除的细胞株进行了筛选,发现聚腺苷二磷酸核糖聚合酶12(PARP12)的缺失增加了病毒复制。PARP12的敲除和药理学抑制表明,抗病毒活性需要核糖基化使其泛素化和降解。这项研究确定了一种独特的抗病毒机制,可能具有临床应用价值。

(本栏目主持人:陆成宽)

(本版图片除标注外来源于网络)

扫一扫  
欢迎关注  
生物圈1号  
微信公众号