



已有大量病例为何还要重建新冠病毒? 反向遗传学让疫苗研发更高效

本报记者 谢开飞
通讯员 欧阳桂莲

在现代遗传学中,反向遗传学被认为是一种不可或缺的工具,它彻底改变了人们对病毒发病机制和疫苗研发的认识。近日,一项来自瑞士的研究使用这一工具,依靠已知新冠病毒基因序列,在酵母菌中快速构建出了活的新冠

病毒。

研究人员认为,快速构建出活的新冠病毒,可以成为向卫生部门和实验室提供传染性病毒毒株的替代方法,从而争取时间对疫情暴发做出快速反应。该研究中所用的反向遗传学技术是什么?在生物科技领域有哪些应用?这种重建病毒的最新研究如何改变对疫苗研发的认识?

快速鉴定病毒、验证相关疫苗或治疗药物的有效性。

“新冠病毒重建技术的突破,使得处于不同国家与地区的科学家,能够在各自所处的高等级生物安全实验室内,借助大肠杆菌、酵母菌等基因工程常用微生物,合成当前数据库里具有完整基因组序列的新冠病毒活毒株。”程通说,这有助于解决相关药物评价的关键资源问题,将加快针对新冠病毒的检测、治疗和预防手段的研发。

另一方面,重建病毒还为发现毒力位点与作用机制等提供了工具。通过对新冠病毒进行基因敲除、改变以及其他加工修饰,研究这些基因改造对其致病性的影响,有助于深入了解病毒致病机制,发现可用作药物靶点的新型毒力基因。

此外,通过给病毒加上荧光蛋白等可视化标记,还可实现病毒感染实时监控,从而优化现有新冠病毒的细胞与动物感染模型,为相关疫苗与药物高通量快速筛选进一步提供方便。

目前,国内外科研机构在重建病毒过程中,尚无法脱离反向遗传学范畴。科研人员大都是基于在大肠杆菌或酵母菌等基因工程类微生物内,克隆与改造病毒遗传物质,然后将提纯的病毒基因组转运到宿主细胞中进行活病毒的组装生产。

《科学》杂志曾经报道的脊髓灰质炎病毒重建,由科研人员使用无细胞体外系统完成。由于需要基于该病毒的基因组序列信息进行实验,当时就将其归属于一种特殊的反向遗传学操作方式。

由里及表 开辟疫苗研发新思路

“一直以来,科学家们研究相关基因的功能,都是通过杂交等手段,观察表型性状的变化,从而研究遗传基因的存在与变化,这种由表及里的研究方法称为正向遗传学。”厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心副教授程通告诉科技日报记者,如在医学领域,可以观察临床病人病理组织和正常组织的不同表现,从而探究产生这种表现变化的内在原因。

随着分子遗传学及相关实验技术的发展,科研人员已经能够有目的地对DNA进行重组或者定点突变。于是,在现代遗传学中,就出现了另一条由里及表的认知路线。研究人员直接从生物自身基因出发,通过对特定基因进行敲除、定点突变等人工操作后,观察突变体表型与性状变化,从而反推基因功能。由于该路线与正向遗传学正好相反,所以这个新的遗传学分支被称为反向遗传学,包括基因剔除技术、基因改造等研究。

相较于正向遗传学来说,反向遗传学有其独特的优势。

此前,美国哈佛—麻省理工博德研究所

科学家塞克·凯斯利森及其同事,就采用反向遗传学方法,对10503个生活在巴基斯坦的人基因编码区进行测序分析,识别出了约50000个突变。这种反向遗传学技术路线,相当于高效收集了正向敲除1317个基因找到的结果,相较于传统正向遗传方法,极大地提高了效率。

“与灭活疫苗、减毒疫苗等经典疫苗研发方法相比,反向遗传学操作还具有减毒途径明确、效率高、毒力回复率低等优点,是疫苗研制的新方向。”程通说。

目前,科研人员利用反向遗传学技术,已证实登革热病毒、脊髓灰质炎病毒、委内瑞拉马脑炎病毒和乙型肝炎病毒等一系列病毒的毒力相关位点,通过基因突变、缺失、重排等方法,都有可能获得理想的减毒株来研制疫苗。

据介绍,基于反向遗传学技术的疫苗研究,还可以发现在经典疫苗研发过程中难以发现的“特殊”保护性抗原,为传染性疾病的疫苗研制,以及发展新型多价或广谱疫苗提供新的方向和思路。

补充病毒资源 加速检测技术开发和药物筛选

在新冠病毒感染者病例已经大规模出现的情况下,科学家们为什么还要对其进行人工重建?程通表示,重建病毒将有助于人类了解病毒复制途径,找到其“弱点”和药物作用靶点,是研制病毒相关疫苗与治疗药物不

可或缺的技术手段。

虽然新冠肺炎病例已大规模出现,但不同地域毒株存在差异性,且出于生物安全的考虑,无法在全球范围内任意运输,导致众多科研机构因缺乏新冠病毒资源而难以

应用日益广泛 但须受到严格监管且符合科学伦理

当前,反向遗传学技术不仅在不同种类病毒研究上得到非常普遍的应用,而且在疫苗和药物研发上也展现出重要的应用价值。

程通举例说,基于反向遗传学技术改造减毒活疫苗的研究,已在包括2009甲型H1N1流感病毒、登革热病毒、禽流感病毒、水痘一带状疱疹病毒、单纯疱疹病毒、人巨细胞病毒等多种病毒中取得重要进展。

其中,2009甲型H1N1减毒活疫苗已上市并广泛接种,水痘一带状疱疹病毒、单纯疱疹病毒、人巨细胞病毒和登革热病毒等病毒的反向遗传改造减毒活疫苗,已进入临床试验阶段。

此外,基于反向遗传学技术合成的减毒病毒载体或溶瘤病毒类药物,已广泛用于基因治疗与肿瘤治疗临床研究。2015年,美国食品药品监督管理局(FDA)批准首个溶瘤病毒类药物T-VEC用于治疗晚期黑色素瘤;2017年,美国杜克大学研发的溶瘤脊髓灰质炎病毒,获得了FDA的批准,用于治疗神经胶质瘤。

除了用于重建病毒,反向遗传学技术在细菌等其他微生物,以及植物相关研究上也有广泛应用,并取得了较大进展。

“在细菌研究方面,反向遗传学技术在B群脑膜炎球菌疫苗、肺炎链球菌多价疫苗、肺炎衣原体疫苗、炭疽杆菌疫苗等多种细菌性

疾病疫苗的研制中,获得了成功应用。”程通说。其中,B群脑膜炎球菌通用疫苗的成功研制是运用反向遗传学技术研发细菌疫苗的经典案例。

B群脑膜炎球菌是流行性脑脊髓膜炎的病原菌,可导致儿童与青少年患急性化脓性脑膜炎和败血症。然而长期以来,科学家们应用传统技术研制有效和广谱的预防疫苗,一直无法获得成功。

随着基因组学和蛋白质组学技术的进步,瑞士诺华公司的研究人员应用反向遗传学技术,通过分析B群脑膜炎球菌的全基因组,并进一步通过基因组序列比较和动物模型测试筛选,研制出多价B群脑膜炎球菌通用疫苗。

2013年,诺华公司重组B群脑膜炎球菌疫苗获得欧盟批准上市,成为欧洲第一个获得批准的预防B群脑膜炎球菌疫苗,并在控制B群脑膜炎球菌流行中被证明安全有效。

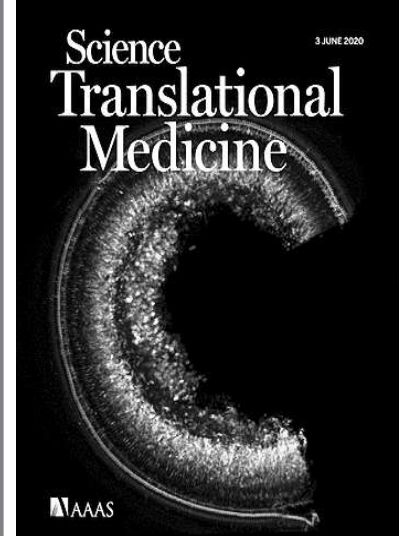
“需要特别指出,通过反向遗传学技术重建病毒,是推进相关科学研究的有力工具,但这些实验操作必须受到严格的监管,需符合科学伦理,并严格限定在合格的生物安全实验室中开展。”程通说。

封面故事

主持人:本报记者 陆成宽

这种疗法或可逆转 隐性遗传性听力受损

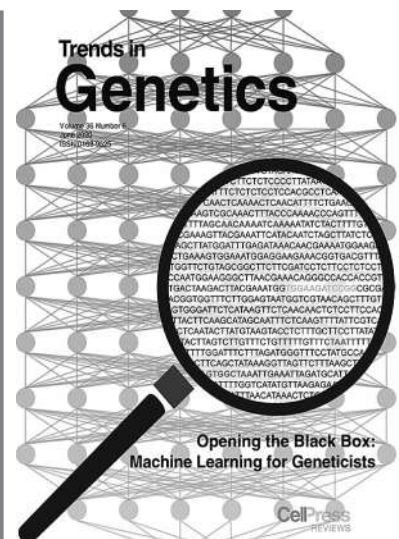
《科学·转化医学》
2020.6.3



跨膜通道样蛋白1(TMCI)基因突变可导致遗传性听力受损。目前的治疗主要集中在声音放大上,并没有针对该病因的特定疗法。美国博德研究所的叶魏魏(音译)等研究人员通过小鼠模型发现,使用碱基编辑方法能治疗跨膜通道样蛋白1位点突变引起的遗传性耳聋。研究人员在双腺相关病毒(AAV)系统中加入了胞嘧啶碱基编辑器,并将其注射到听力丧失小鼠的内耳。结果表明,这种治疗逆转了突变,改善了感觉传导,并部分恢复了小鼠的听力。

从基因组数据挖掘 可解释机器学习能帮忙

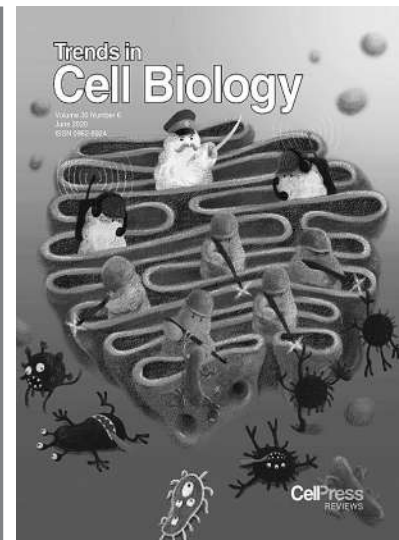
《遗传学趋势》
2020.6



由于能够在高维数据和异构数据中发现复杂的模式,机器学习(ML)已经成为理解不断增长的遗传和基因组数据的关键工具。虽然复杂的机器学习模型功能强大,但仍难以理解遗传基因相关的庞大数据。幸运的是,借助机器学习模型,我们的生物学研究能力正在不断提高。美国密歇根州立大学的克里斯蒂娜等研究人员讨论了遗传学和基因组学研究中可解释机器学习的重要性、不同的模型策略及应用案例以及面临的挑战和未来发展方向。

运送蛋白的高尔基体 竟是先天免疫信号平台

《细胞生物学趋势》
2020.6



高尔基体是一个接收站,能处理来自内质网(ER)的蛋白质并运送到其他细胞室。除了在囊泡运输和蛋白/脂质分泌方面的作用外,最近的研究表明,高尔基体还作为一个信号平台促进多种先天性免疫。此外,连接高尔基体、内质网、线粒体、核内体和自噬体的膜性网络为先天免疫信号传导和后续效应反应提供了便利。安徽医科大学第一附属医院的陶陶(音译)等研究人员,回顾了关于高尔基体在启动和激活先天免疫信号中相关作用的最新进展,并对抑制高尔基体相关先天免疫反应的微生物劫持策略进行了讨论。

关乎近六成人类遗传病 “超级编辑器”可精准编辑单个碱基

严旭倩 本报记者 王春

“基因超级编辑器”能为遗传病研究构建疾病模型和基因治疗提供有效工具。经过两年多的攻关,华东师范大学生命科学学院李大力课题组研发出系列超高活性胞嘧啶碱基编辑器(hyCBE)。这一系列新的基因编辑技术针对碱基突变引起的遗传疾病,展示出基因治疗的巨大潜力。相关研究成果近日发表在《自然·细胞生物学》杂志上。

美国国立卫生院公开数据库ClinVar显示,58%的人类遗传病是由于单个碱基突变引起的。是否有新的策略可以提高编辑活性又能扩增靶点至碱基的范围,一直是碱基编辑器优化的难点。

“这一组碱基编辑系列新工具,在实现更高编辑效率和更宽编辑窗口的同时,仍然保持了其基因编辑精准性。”李大力说。

新编辑器精确性显著提高

由于胞嘧啶碱基编辑器(CBE)主要是以单链DNA为底物,因此研究团队猜测,如果增强脱氨酶与单链DNA的结合能力,或许能够

通过延长脱氨酶的作用时间来增强其基因编辑活性。

该研究将Rad51蛋白的单链DNA结合结构域融合到Cas9与脱氨酶之间,极大地提高了CBE的编辑活性,拓宽了编辑窗口,因此将其命名为超高活性CBE(hyCBE4max);类似地还改造出具有更宽编辑窗口和更高活性的hyA3A-CBE4max,以及能更高效识别胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)碱基模块中的胞嘧啶而不引起其他胞嘧啶发生突变的hyA3A-CBE4max。

“以hyA3A-CBE4max为例,在所检测的靶点中,特定位点的编辑活性最大可提高257倍。”李大力说,“通过胚胎显微注射,能在胚胎中精确改变单个碱基,直接获得杜氏肌营养不良(DMD)小鼠模型,平均效率提高了近60倍。”

除了能快速精确构建遗传疾病动物模型,hyA3A-CBE4max在β地中海贫血的治疗中也表现出显著优势,可让单个碱基发生突变,体外实验证明有更好的治疗效果。一系列严格的实验表明,这一新编辑器具有非常高的精确性,没有检测到明显的DNA和RNA脱靶,证明了新编辑工具用于基因治疗的巨大潜力。

在同期发布的期刊评论中,美国威尔康奈尔医学院癌症生物学家指出:“这项超级编辑器为疾病建模和基因治疗提供了有效工具。”评论认为,李大力团队的研究丰富了CBE的工具箱,扩展了其应用范围,并证明了这些新工具更高效和更宽范围的碱基突变能力。

评论文章表示,新型超级编辑器除了可应用于动物模型构建和疾病治疗,还可以帮助提高CBE工具技术性改造的认知以及发现提高编辑效率的决定性因素,这将为新工具研发提供合理性设计指导,进一步推动基础研究和临床转化的发展进程。

基因治疗“利器”被寄予厚望

近年来,欧美已陆续批准了治疗腺苷脱氨酶(ADA)缺乏性重度联合免疫缺陷症、脊髓性肌萎缩症、β地中海贫血和莱伯氏先天性黑蒙症等遗传病的基因治疗药物。由于技术限制,已上市的药物存在不能长期有效或者诱发肿瘤的风险,因此科学家们不断开发新的基因改造技术,期望能够克服现有技术不足,实现一次治疗终身治愈。

以CRISPR/Cas9系统为代表的基因编辑技

术是近年来最为火热的分子生物学技术之一。李大力课题组于2013年在国际上率先建立了小鼠和小鼠胚胎的CRISPR/Cas9基因编辑技术,将基因修饰动物构建的时间由传统方法的18个月缩短到5周左右,解决了基因治疗研究中必不可少疾病模型构建所面临的难题。随后他们利用CRISPR/Cas9技术修复了动物模型中的单个碱基突变,治愈了B型血友病,证明其在遗传疾病治疗中的潜力。然而,CRISPR/Cas9技术精确修复碱基突变的效率非常低,只有1%左右,很难在更多的疾病治疗中推广。

2016年美国科学家开发的CBE技术,能在不产生DNA双链断裂的前提下,直接将目的片段一定范围内的胞嘧啶转化成胸腺嘧啶,实现C/G碱基对向T/A碱基对的转换。今年年初,华东师范大学团队发表论文,成功地利用CBE技术建立了人类造血干细胞单碱基编辑技术体系,证明CBE有治疗β地中海贫血的潜力,但存在编辑效率偏低、精准度有限等阻碍临床应用的问题。

“我们研发的超高活性碱基编辑技术基本解决了上述问题,有望成为遗传病治疗的首选碱基编辑器。”李大力说。