



视觉中国供图

线粒体 DNA 能编码 13 种蛋白质,这些蛋白质都参与到细胞的能量供应链中。而线粒体 DNA 突变可导致数十种至今无法治愈的代谢性疾病。开发可以精确纠正线粒体 DNA 的基因编辑工具,将为治疗这类疾病打开大门。

# 细胞“能量工厂”病了难根治？ 细菌毒素助“基因剪刀”精准发力

本报记者 赵汉斌

Leber 遗传性视神经病、线粒体脑肌病、乳酸酸中毒及卒中样发作综合征、神经性肌肉衰弱症,以及一些先天性心脏病……这些都是因线粒体基因突变引起的常见遗传疾病。目前,全球无数患者正在受着煎熬,却没法获得有效治疗。

人类遗传物质除了大部分在细胞核内,还

有一小部分存在于线粒体中。现在科学家们已经将基因编辑技术用于精准编辑细胞核内 DNA,但如何对线粒体内 DNA 进行精准编辑,一直无法取得突破。

不久前,《自然》杂志发表了美国哈佛大学刘如谦(David Liu)团队发表的一项最新成果,不但可实现对线粒体基因组的精准编辑,而且几乎没有脱靶效应,这为研究和治疗线粒体遗传病带来了前所未有的希望。

的,线粒体 DNA 编辑一直面临难以解决的问题。对线粒体 DNA 的精准编辑是从来没人实现过的,现在应用最广泛的 CRISPR 技术面对线粒体 DNA 也是束手无策——线粒体没有吸收 RNA 的机制,所以让 CRISPR 技术发挥作用的成分向 RNA(gRNA)根本无法进入线粒体。

“线粒体 DNA 之所以难以编辑,主要原因有两方面:一是线粒体是细胞中具有双层膜结构的细胞器,线粒体 DNA 位于线粒体内部,受到线粒体双层膜的保护,外源的基因编辑工具

很难高效进入线粒体内部;另一方面,线粒体 DNA 不同于核基因组 DNA,缺乏有效的 DNA 损伤修复机制,一旦其受到双链断裂损伤时,就会被降解,而大多数基因编辑工具是利用 DNA 损伤修复的原理进行编辑,因此在线粒体 DNA 上很难进行。”中国科学院昆明动物研究所副研究员毕蕊博士告诉记者。

孔令洁也认为,一般细胞核基因有两个拷贝,基因编辑相对容易,而线粒体基因在一个细胞中有许多拷贝,传统的基因编辑技术依赖于核酸酶,不能编辑线粒体基因。

## 从编辑基因序列到改变单个碱基

此次刘如谦团队的重大突破,在于解答了成簇规律间隔短回文重复核酶酶(CRISPR)也没法解决的历史遗留难题——对线粒体 DNA 的精准编辑。

线粒体是细胞进行有氧呼吸的主要场所,是细胞能量生成和传递的主要细胞器,被称为“能量工厂”。除了为细胞提供能量外,线粒体还参与诸如细胞分化、细胞信息传递和细胞凋亡等过程,并拥有调控细胞生长和细胞周期的能力。

基因编辑是一种新兴的对特定目标基因进行修饰的基因工程技术,已经广泛应用于从动物和植物的基因改造到人类的基因治疗等生命科学诸多领域。

“早期的基因工程技术只能将遗传物质随机插入宿主基因组,基因编辑则能定点改造想要编辑的基因。”苏州博腾生物首席技术官孔令洁博士向科技日报记者介绍,基因编辑依赖

于经过基因工程改造的核酸酶,类似于外科医生的手术刀。“目前常用的基因编辑酶主要有锌指核酸酶、转录激活样效应因子核酸酶和成簇规律间隔短回文重复核酶酶。这些核酸酶能定点改造特定的 DNA,对基因进行敲除、插入或替换。”

除了核酸酶外,刘如谦实验室发明的碱基编辑酶,可利用一种细菌毒素 DddA,将胞嘧啶转化为尿嘧啶,实现对线粒体基因组的精准编辑,以更改变基因组里的单个碱基。

相比于一段一段地更改基因序列的常规基因编辑,这种碱基编辑技术可以在基因组上造成单个碱基改变,把腺嘌呤(A)变成鸟嘌呤(G),把胞嘧啶(C)变成胸腺嘧啶(T)。“理论上碱基编辑可以改变基因组中的任何碱基,因此大大扩充了基因编辑的范围和灵活性。”孔令洁解释说。

肌麻痹等疾病就是这样发生的。

目前治疗一般是给予三磷酸腺苷、辅酶 Q10 和大量 B 族维生素等,但效果很不理想,且不能根治。线粒体基因编辑技术可能成为根治这类疾病的有效方法。

尽管近几年基因编辑有了突飞猛进的发展,但是这些进步都是在细胞核 DNA 上进行

## 有助构建线粒体疾病动物模型

DddA 是一种细菌毒素,最初由华盛顿大学的微生物学家约瑟夫·穆格团队中的一位博士后马尔科·德莫雷斯发现。2018 年,德莫雷斯发现 DddA 具有催化胞嘧啶脱氨转变为尿嘧啶的活性。而且有趣的是,与其他的脱氨酶不同,这种作用可以直接在 DNA 双螺旋上发生,不需要解旋,因而不需要 gRNA。

DddA 本身是种蛋白质,能够进入线粒体,又可以同时对双链 DNA 编辑。穆格当时就想到了只闻其名未曾谋面的同事刘如谦——因为刘如谦团队之前开发的 CRISPR 单碱基编辑器中就有用到过脱氨酶,或许 DddA 也能够在此相关的领域得到应用。

DddA 对哺乳动物细胞来说是有生物毒性的。为了避免这种毒性,研究人员想出的办法是把 DddA 一拆两半,变成两个没有活性的部分,进行编辑后让两部分重组恢复脱氨活性;然后再将设计好的 TALE 蛋白与半个 DddA 相连,这样 DddA 们就能够在编辑位点重逢了。

如何让组合好的 DddA 进入线粒体,倒是不难解决。此前的一系列研究成果表明,可以利用线粒体的蛋白质吸收机制,穿过线粒体的双层膜。DddA 作为一种胞苷脱氨酶,它能够实现胞嘧啶、尿嘧啶转换的一系列操作。

为了使 DddA 的作用不被干扰,研究团队

还要再加上尿嘧啶糖基化酶抑制剂,等到下一轮 DNA 复制,它就可以和腺嘌呤互补而不是和鸟嘌呤互补。从实验数据来看,加入抑制剂后,编辑效率提高了 8 倍。

动物疾病模型往往是药物研发必需的工具。在该线粒体基因编辑技术之前,由于不能对线粒体基因进行精准的改造,因而无法获得相应的动物疾病模型,大大阻碍了线粒体相关疾病的药物的研发。

“这一技术的应用,将使动物疾病模型建立成为可能,加快药物的研发。”孔令洁告诉记者,同时,随着基因治疗的发展,以此项技术为基础的基因治疗药物,可能成为根治线粒体疾病的有效方法。

“基因治疗是有望治愈线粒体 DNA 突变导致的疾病的重要方法。”毕蕊说,随着线粒体 DNA 编辑工具的发展,可以在局部病变组织中突变 DNA 修复成正常的野生型 DNA,对局部组织进行基因编辑,既可以避免直接对胚胎基因编辑带来的伦理问题和安全性问题,又可以直接针对病灶组织进行快速高效的基因治疗,惠及更多患者。

此前,刘如谦曾在《自然》杂志表示,这项研究因还有其他问题需要研究,距离应用到临床还有很长的路要走。但短期来看,科学家们可通过利用该技术生成动物模型,来研究线粒体突变的影响。

## 编辑线粒体 DNA 面临两大难点

“线粒体拥有自身的遗传物质和遗传体系,和细胞核 DNA 相比,线粒体只编码少数的基因,但这些基因对细胞功能至关重要。”孔令洁说,线粒体 DNA 在发生突变后,容易丧失制造三磷酸腺苷的能力,往往会对神经系统和肌肉系统造成损伤,引发母系遗传的特定疾病。线粒体肌病、多系统疾病、心肌病、进行性眼外

# 生物酶“联手”大肠杆菌 破解尼龙单体合成污染难题

本报记者 陈曦

尼龙是一种应用非常广泛的合成纤维,尼龙种类较多,其中尼龙 66 是最重要的一种。尼龙 66 的主要原料之一己二酸属于二元羧酸类尼龙单体,其合成主要依赖高污染、高能耗的多步氧化过程。

湖北大学生命科学学院、省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室李爱涛教授团队,设计了一条全新的人工生物合成途径,通过理性设计微生物菌群催化体系,用空气中的氧作为氧化剂,在水溶液中将环烷烃或环烷醇转化为相应的二元羧酸尼龙单体。这一研究成果有望解决

抗科学界和工业界近半个世纪的难题,相关论文 10 月 7 日在线发表于《自然·通讯》。

## 化学法合成尼龙单体,污染环境受制约

尼龙是聚酰胺的俗称,是世界上出现的第一种合成纤维,它的合成不仅是纤维合成工业的重大突破,同时也是高分子化学的一个重要里程碑。尼龙的种类较多,按照单体的结构可以分为脂肪族、芳香族以及脂肪-芳香族尼龙,其中脂肪族尼龙中的尼龙 66 是最重要的一种,被大量广泛应用于众多关系国计民生的重要领域,如纺织服装、医药卫生、农业食品、物流运输及军事国防等。

“尼龙 66 是由己二酸与己二胺缩合制得,而己二酸作为其中主要的单体,其合成主要依赖高污染、高能耗的多步氧化过程。”李爱涛介绍,该过程需要使用大量具有腐蚀性的硝酸,同时产生大量的一氧化氮、二氧化氮等有害温室气体,带来全球气候变化、臭氧空洞等环境问

题,因此严重制约着尼龙 66 产业的发展。

针对上述问题,近几十年来,科学家们一直在探索该类尼龙单体高效、绿色的新合成方法与工艺。例如,近期德国阿尔伯特·爱因斯坦大学的马蒂亚斯·贝勒教授团队在《科学》杂志上发表论文称,他们发明了一种全新工艺,不需要硝酸就可以生产己二酸,即采用钼金属催化体系实现了丁二烯双羧基化一步制己二酸。然而,该体系仍存在一定的局限性,比如催化剂稳定性差、成本高以及贵金属回收困难等,限制了其进一步的工业化应用。

## 3 种大肠杆菌表达 8 种酶,获得菌群催化剂

随着合成生物学的发展,人工设计的多酶级联催化,可以将多种具有不同催化活性的酶催化剂放在同一个反应体系中,在温和且环境友好的条件下将廉价的原料,通过一锅多步法合成人类需要的高附加值产品。

此外,如果直接利用表达多种酶的细胞作为催化剂,在体内催化目标反应,可以避免酶的分离纯化以及昂贵辅酶的添加,从而大大降低生产成本。基于这些原因,从头设计细胞催化剂实现体内目标级联催化反应获得了广泛的关注。

而将该方法用于己二酸的合成,有望解决困扰科学界和工业界几十年来的难题。为了实现

这一目标,李爱涛团队从头设计了一条含 8 个酶的生物合成途径,期望在同一个反应体系中经过级联催化把环己烷转化为己二酸。

研究人员尝试将 8 种酶在同一个细胞中进行表达来构建细胞催化剂,发现由于细胞负担太重,某些酶在细胞内的表达量很低,导致整个反应的催化效率很差。为了解决上述问题,他们将 8 种酶分散到 3 种大肠杆菌中进行表达,首先获得三种具有不同催化功能的细胞催化剂,然后再将三种细胞进行组合获得菌群催化剂。通过任务分工、团队协作的方式,最终实现了环己烷到己二酸的高效绿色合成。

该过程在温和条件下(常温、常压和水相)进行催化反应,使用自给自足的辅酶自循环,不需要任何外源的昂贵辅酶,成本低。同时反应过程没有任何中间产物的积累,选择性高,产物单一,后续分离纯化简单。

此外,通过“即插即用”的策略对 3 种细胞催化剂进行任意组装,可以从某个环节的中间产物出发,经过催化转化合成己二酸产品。对大肠杆菌菌群进一步设计后,还可不同碳个数的环烷烃或环烷醇合成不同尼龙单体(二元羧酸),充分证明了该方法的普适性。而且,利用大肠杆菌微生物菌群作为催化剂,还能在发酵罐上实现己二酸产物的放大制备,为实现生物法大规模合成 α, ω-二元羧酸奠定重要基础。

## 科研圈

### 利用细胞直接重编程技术 日本成功培育出肝脏祖细胞

新华社讯(记者华义)日本研究人员发明了利用人体血管内皮细胞培养肝脏祖细胞的新技术。肝脏祖细胞能分化为肝细胞等,该技术或可用于重症肝病患者的移植治疗。

来自九州大学、京都大学等机构的研究人员利用细胞直接重编程技术,向人体血管内皮细胞导入 3 个特殊转录因子,成功培养出了具有增殖能力的肝脏祖细胞。

肝脏祖细胞具有分化为肝细胞和胆管上皮细胞的能力。在肝细胞移植实验中,研究人员给罹患致死率较高的急性肝衰竭的实验鼠植入由肝脏祖细胞分化而来的肝细胞,成功将实验鼠的存活率从 20% 提高到 80%。研究人员认为,将来有望利用该技术给重症肝病患者进行移植治疗。

这一研究成果 21 日已发表在英国《自然·通讯》杂志上。

### 水稻害虫褐飞虱防治难? 共生菌让其后代不育

本报记者 金凤 通讯员 许天颖 崔滢

褐飞虱,亚洲最主要的水稻害虫,常年在我国长江流域及其以南地区频繁肆虐。南京农业大学植物保护学院洪晓月教授团队及其合作者多年研究发现,通过昆虫胚胎显微注射技术,向褐飞虱卵内注入一种共生菌的特殊株系,可导致褐飞虱的后代不育。这项成果近日在线发表于《当代生物学》杂志。

褐飞虱既能直接刺吸危害水稻植株,引起植株倒伏,又能传播水稻病毒病造成间接危害,严重影响作物产量。长期以来,稻飞虱的防控主要依赖化学防治,给水稻绿色安全生产和生态环境带来较大的压力。

### 首次建立沃尔巴克氏昆虫品系

论文第一通讯作者洪晓月告诉科技日报记者,团队首次将基于沃尔巴克氏共生菌的昆虫防治技术应用在了褐飞虱的防控上,通过往褐飞虱卵体内注入细菌,既能令其后代不育,又能阻断病毒的传播,一箭双雕。

洪晓月将沃尔巴克氏细菌比喻成微生物防治界的“硬通货”,该细菌不仅被证明在昆虫纲内有广泛易感性,而且还能诱导高强度的细胞质不亲和,引起后代不育。

“沃尔巴克氏细菌 wStri 株系在灰飞虱体内的作用明显,可以完全导致灰飞虱后代不育,而褐飞虱又是对亚洲更有威胁的稻飞虱,所以我们尝试向褐飞虱卵内注入沃尔巴克氏细菌 wStri 株系,效果显著。”洪晓月说,研究首次成功建立了具有应用潜力的、稳定携带人工转染的沃尔巴克氏昆虫品系。同时,这也是首次成功用胚胎显微注射的方式在半翅目昆虫中实现沃尔巴克氏细菌转染。

研究发现,在对宿主适合度影响轻微的情况下,新建立的褐飞虱 wStri 转染品系不仅能够诱导高强度的细胞质不亲和和表型,导致后代不育,同时能起到显著抑制褐飞虱所传播的水稻齿叶矮缩病毒的传播。

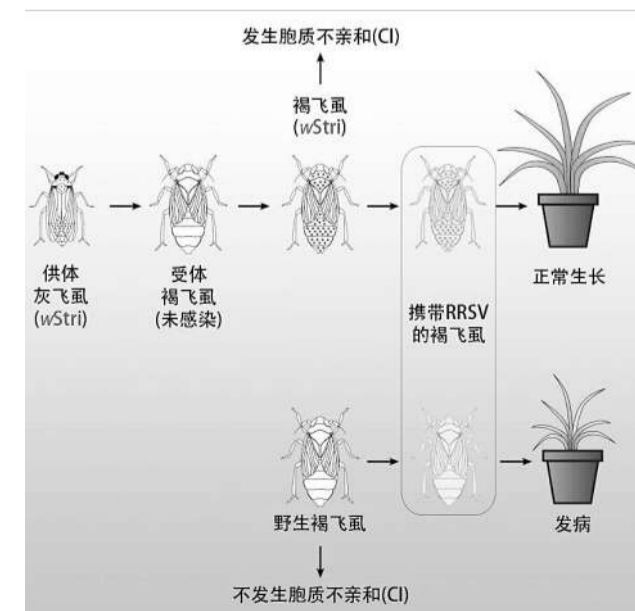
### 用绣花功夫实现虫卵之间的细菌“腾挪”

不过,实现虫卵之间的细菌“腾挪”,要求科研工作者们心细如丝。洪晓月介绍,团队通过昆虫胚胎显微注射技术,先将沃尔巴克氏细菌从灰飞虱的卵中取出,再将其注射到褐飞虱的卵内,可以说是发生在微观世界中极为精细的外科手术。

“首先,虫卵很小,肉眼几乎看不出来。褐飞虱的虫卵长约 1 毫米、宽约 0.2 毫米,灰飞虱的虫卵则更小一些,将细菌导出、导入的过程,要求实验人员具有眼明手巧的“绣花功夫”。”洪晓月说,其次,因为导入的细菌会与原先存在的细菌群体形成竞争关系,因此,团队先将影响沃尔巴克氏细菌 wStri 株系发挥作用的细菌株系清除,再找准合适的时机注射。

“此外,打针的力度、打在卵里的位置也都有讲究。”洪晓月说,最终,科研团队获得了 100% 稳定的遗传品系。

这项研究的应用,一改传统的喷洒杀虫剂的方式,通过释放褐飞虱转染品系致使后代不育,达到种群压制或是种群替换的目的,为农业害虫的防治找到了一个新方向。洪晓月介绍,该褐飞虱转染品系同时表现出符合种群压制和种群替换策略所需要的特性,具备了进一步在半现场和田间试验的价值。由于褐飞虱发生的源头在越南一带,未来在应用试验上,可以考虑将释放褐飞虱的“战场”前移至越南或是我国境内的广西、云南一带。



应用沃尔巴克氏共生细菌防治褐飞虱示意图 受访者供图



视觉中国供图