

“基因魔剪”再升级 身材迷你却可删除大段DNA

本报记者 陈曦

随着CRISPR-Cas技术的问世,人类改造、编辑生物基因密码的脚步大大加快。有了这把趁手的“基因魔剪”,人类可以对基因进行高效地定点编辑。

传统“魔剪”只能“剪”小片段DNA

CRISPR-Cas系统的类型众多,目前研究最深入应用最成熟的就是CRISPR-Cas9系统。CRISPR-Cas9的结构简单,能够很容易地进入任何细胞,并精确地作用于DNA。只需要用目标遗传密码序列对它进行编程,这一工具便能够扫描整个DNA链,找到对应部分的基因,在适当的位置将这段DNA“剪”开。

“CRISPR-Cas9系统非常适合在明确或者校正某一个基因功能突变的时候,对单个基因进行剪辑或者小片段进行修复。”南开大学生命科学学院副院长陈凌懿教授介绍,虽然Cas9可以在需要的地方进行剪切,但是只能剪一刀,因此想删除整个基因位点特别大的DNA片段时,就存在一定局限性。

“就像拆迁房子,如果小区里只有一幢危楼,那么只需要对这幢危楼进行维修或者拆除重建;但是如果平整土地,或者拆除修补危楼的时候,那就要拆除更多的房子,破坏整个小区环境了。”陈凌懿说,拆迁一幢楼不可能大

升级版能“吃掉”大片段DNA

作为“基因魔剪”的CRISPR系统是如何工作的呢?

陈凌懿介绍,CRISPR系统主要由相关核酸酶(Cas9)和向导RNA(gRNA)组成。gRNA能识别外来入侵者的特定核酸序

然而,主流的Cas9和Cas12a酶似乎更擅长单个碱基的定点编辑,在进行大规模删除DNA的时候显得“力不从心”。不过10月19日,美国研究人员在《自然·方法》发表论文称,他们开发出一种紧凑型级联CRISPR-Cas3系统,可快速准确地对大规模DNA片段进行删除。

刀阔斧,但是拆迁很多房子就需要更高效的工具了。

陈凌懿进一步解释说:“最近发现,Cas9产生的‘基因敲除’,通常通过在编码基因的开放阅读框中引入小的插入或删除突变而导致移码突变,这种方法适用于编码蛋白质的mRNA(信使RNA)。移码突变是指,3个核苷酸密码编码一个氨基酸,当删除的核苷酸数不是3的整数倍时,就会导致编码顺序发生错位而出现的突变。然而,对于非编码RNA,因为其并不编码蛋白质,所以不存在移码突变。此时,就需要采取全基因去除的方法。而哺乳动物的基因,一个基因可能很大,包括外显子和内含子,当几个外显子相距比较远的时候,如果想完整删除,就需要删除很大片段DNA。”

对于真核细胞来说,可大片段删除DNA的工具将促进对大部分非编码基因片段的询问,提高对大部分未知功能的编辑效率,因此这将成为一个强大的基因筛选工具。

列,在碱基配对成功后,Cas9蛋白会使识别位点的DNA双链断裂。随后生物体自身存在着DNA损伤修复的应急机制,会将断裂上下游两端的序列连接起来,大多数时候这种连接会引入片段或删除突变,从而实现了

细胞中目标基因的敲除。如果在此基础上为细胞引入一个修复的“模板”(供体DNA分子),这样细胞就会按照提供的模板在修复过程中引入片段插入或定点突变,以此实现基因的替换或者突变。

此次“升级版”新系统,称为CRISPR-Cas3系统,是由进行性核酸酶Cas3和其他成分组成的最小版本。该Cas3系统用来切断DNA片段,删除长段DNA。而且它的精度很高,是少有的高质量大规模编辑工具。Cas3系统只需要4个蛋白和1个crRNA,CRISPR-Cas9系统却需要6个蛋白和1个crRNA。而在基因编辑时,需要将此系统导入到目标细胞中,系统越小,越容易操作。Cas3作为最小的CRISPR系统的一部分,兼具准确性和可变性,已在铜绿假单胞菌中高效地完成了碱基对数量高达424kb的

未来在工业发酵领域应用价值大

CRISPR系统目前主要应用于肿瘤、遗传等疾病的治疗方面。此次CRISPR-Cas3系统的出现,其高效率和高精度是否能让CRISPR系统的应用更加广阔?

“在CRISPR-Cas9系统中存在的脱靶效应,在大片段删除系统中同样存在这样的风险。而且大片段删除还增加另一个风险,就是可准确地控制删除的长度。”陈凌懿对CRISPR-Cas3系统删除基因的精准性提出了质疑。科学家在实验室可以筛选出准确删除目标基因的细胞;但是在临床应用中,可能会面临更多的问题和挑战。另外,目前的工作只证明了CRISPR-Cas3系统在细菌中起作用,能否在高等生物特别是哺乳动物中应用CRISPR-Cas3系统进行大片段DNA的删除,还有待证明。

“此外,在临床上,患者进行治疗时,我们检测到某一个基因突变了,要定点把突变基因修复,这需要进行精准编辑。”陈凌懿认为,如

果大片段删除基因,就是一种大规模的破坏性治疗,不符合临床小规模、小修复的治疗原则,这种案例非常少见。而且以目前我们对编码或非编码基因的了解,大片段删除或引入还有很多未知数,因此很可能病没治好,反而增添了新病。

“虽然目前应用于临床还有一定难度,但CRISPR-Cas3还可以在工业、农业中发挥作用。”陈凌懿表示,比如工业发酵,所使用的菌种基因组越大,整个发酵过程中真正合成目标产物就越低效。“因此在进行工业发酵的时候,我们选择菌种希望越简单越好,除了菌种存活所必需的基因外,最好就一个酶。”陈凌懿说,把系统简化的时候相当于把菌种里不需要的基因去掉,在最小基因组的细菌当中,引入新的基因。这种做减法的过程就可以使用CRISPR-Cas3系统进行大片段删除来完成。如果DNA删多了,菌种可能就死掉了,只有删得合适了,才能得到基因组被简化的活菌种。

“之所以可以变身‘吃豆人’,与Cas3的DNA酶特性有关,其亚单位比Cas9多一些,有结构可以结合到DNA上。”陈凌懿解释说,就相当于只有抓住绳子末端,才可以沿着绳子往前走。虽然Cas3和Cas9识别DNA特异序列的方式是一样的,但是识别之后,剪切的方式是不一样的。Cas3系统既有手的功能,能锚定在DNA的位点上,同时又有“吃豆人”的功能,不断把DNA“吃”下去。

免疫疗法遇上多能干细胞 实体肿瘤或有了新克星

本报记者 陈曦

免疫T细胞(CAR-T)在治疗白血病、淋巴瘤等血液类疾病方面如今取得突破,但是对付实体肿瘤一直效果不尽如人意。日前,日本研究人员通过诱导多能干细胞(iPS细胞)培养出自然杀伤T细胞(NKT细胞),并分三次输入一名头颈部恶性肿瘤患者,这也是日本首次尝试利用iPS细胞治疗实体肿瘤。

临床试验主要用于治疗 进行性疾病

iPS细胞技术是将已经分化好的体细胞,如皮肤、神经细胞、心肌细胞等,通过重编程的方式,将4个转录因子转进体细胞里,从而使体细胞又重编程回到多能干细胞的的状态,也就是未分化状态。

“体细胞只有一种功能,而经过iPS技术回到未分化状态,就可以有各种潜能,通过进一步分化变成个体全部器官组织和有功能的体细胞。”天津大学药学院教授刘子川介绍,因此这项技术在临床上最早用于再生医学领域,比如用于非可逆的退行性疾病,让损伤后的细胞恢复再生能力。

目前美国官方网站公布了20项与iPS细胞技术相关的临床试验,主要针对神经和视觉相关的退行性疾病,如和神经退化相关的帕金森病,和神经退化相关的黄斑变性性眼疾,和心肌梗死相关的心脏衰竭等的治疗,此外还应用于癌症的免疫疗法。

“来自胚胎的多能干细胞(ES)技术相比,iPS细胞技术有一个重要的缺陷。”刘子川解释,因为它用重编程技术把4个转录因子转进体细胞里,其中c-Myc转录因子是致癌基因。而且iPS细胞扩增能力特别强,它的复制传代属于爆发式扩增,也可能导致基因突变。“无论是这种不稳定的增殖能力,还是基因突变以及自身携带的致癌基因,都会导致其在人体内产生畸胎瘤或肿瘤。”

另一个问题是,iPS细胞不像胚胎多能干细胞,它可以来源于身体各个不同位置的体细胞,再加上培养条件、培养代次以及处理方式不同,会导致细胞来源的异质性。虽然这种差异很小,但是还是存在的。把iPS细胞作为细胞类药物应用于治疗,如果每批治疗用的细胞有差异,那么治疗效果也会受到影响。

“虽然相比于其他细胞疗法,iPS细胞已经把异质性降到很低,但异质性还是存在,需要进一步解决。”刘子川说。

iPS细胞加免疫治疗 实体肿瘤前景广阔

正常人的免疫系统是可以识别并杀死肿瘤的,但当肿瘤细胞比较强大,我们识别不了又杀不掉的时候,人就会得癌症。免疫治疗就是把人体内的免疫细胞提取出来,通过体外增殖,而后再输入人体去攻击肿瘤细胞,目前针对白血病、淋巴瘤等血液肿瘤的CAR-T技术就是前景非常看好的细胞免疫治疗方案。

但CAR-T细胞治疗的问题是只能自体输送,它不仅取决于病人的状态,体外细胞扩增与加工也需要时间等待。而此次日本进行的移植免疫细胞治疗癌症的手术,向患者癌细胞附近血管一次注射约5000万个NKT细胞。NKT细胞是一种可对癌细胞发动高效攻击的免疫细胞,但人体内仅有少量这种细胞。研究人员从健康人的血液中采集NKT细胞并培育出iPS细胞,再使iPS细胞分化生产出大量NKT细胞后注入患者体内。

“NKT细胞作为一类先天性T淋巴细胞,之所以具有独特的抗肿瘤效果,是因为它同时具有两种免疫细胞的特征,一种是T细胞,也就是淋

巴细胞,还有一种是自然杀伤性细胞,也就是NK细胞。”刘子川介绍,NKT细胞不会区分自体 and 异体,因为它只有一种不变T细胞受体,可以针对组织相应性抗原(MHC)不明显的实体瘤,不会对其他正常组织进行进攻,所以不会产生异体移植免疫排斥反应。“而且NKT细胞还有调节作用,可以激活肿瘤患者体内自身的免疫细胞,进而增强抗肿瘤的效果。”

“NKT细胞主要存在于肝脏和骨髓里,量很小,但通过此次临床试验可以看到,治疗实体瘤需要输入大量的NKT细胞。”刘子川解释,如果单纯地在体外扩增NKT细胞,目前的技术效率没有那么高。但是iPS细胞的扩增能力特别强,通过提取出健康人的NKT细胞,经过iPS细胞技术变成多能干细胞,再分化增殖出NKT细胞,会大大提高效率,并且能够做到有需求时随时使用。

“此次临床试验时间还比较短,其最终效果还有待时间检验。”刘子川表示,而且NKT细胞虽然有一定的靶向作用,可以广泛地攻击肿瘤细胞。但是相比于安装了精准“GPS定位”的CAR-T细胞技术,iPS-NKT对于指定实体瘤的杀伤并不直接。所以随着未来对iPS-NKT细胞的深入研究,它可能更准确地打击实体肿瘤。

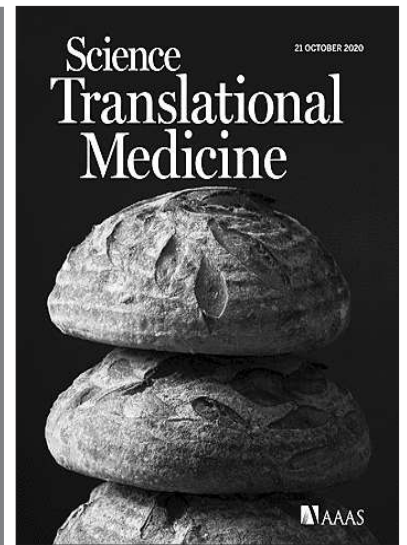
封面故事

主持人:本报记者 陆成宽

对麦粉里蛋白质敏感 或与肠道菌群有关

《科学·转化医学》
2020.10.21

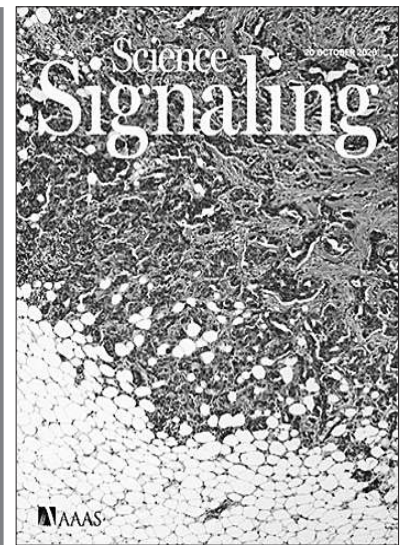
乳糜泻病人因体内缺乏一种多肽分解酶,在食用麦胶(俗称面筋)的麦粉食物后发生腹泻等症状。尽管全世界有40%的人有乳糜泻易感基因,但只有1%的人会患上这种疾病,这暗示肠道菌群等环境因素在其中起到重要作用。加拿大麦克马斯特大学的布鲁诺·拉马斯等科学家的研究表明,乳糜泻与肠道微生物群将色氨酸代谢成芳香烃受体(AhR)配体的能力受损有关。通过高色氨酸饮食激活AhR途径后,或通过药理学AhR激动剂或产生AhR配体的细菌治疗,表达腹腔疾病易感基因的小鼠的麸质诱导免疫病理得到改善。肠道菌群对AhR通路的调控可能成为治疗乳糜泻的一种有效策略。



阿司匹林除抗炎之外 还可消除肿瘤干细胞

《科学·信号》
2020.10.20

肿瘤干细胞(CSCs)是一种具有类似干细胞特性的肿瘤细胞,能够促进肿瘤进展、适应应激和对化疗的抵抗。来自印度的研究人员发现,阿司匹林靶向肿瘤干细胞的方式可能会提高基底样乳腺癌患者的化疗疗效。在侵袭性乳腺癌培养的肿瘤干细胞或乳腺癌小鼠模型中,阿司匹林通过减轻多能性因子对转录辅助因子SMAR1的抑制,抑制了药物外排泵ABCG2的合成。阿司匹林可防止阿霉素诱导的对SMAR1的抑制和肿瘤干细胞的增殖,从而增强阿霉素的细胞毒性。因此,除了目前用于炎症驱动的前恶性肿瘤和癌症的抗炎外,阿司匹林还可靶向作用于侵袭性乳腺癌的肿瘤干细胞。



科研圈

我科学家破解 草地贪夜蛾耐药基因组

科技日报讯(记者赵汉斌)草地贪夜蛾对我国粮食安全生产构成极大威胁,了解其遗传背景及其抗性对制定有效的防控策略具有重要意义。记者10月28日从云南农业大学了解到,该校盛军教授团队联合国内外研究机构,首次破解了草地贪夜蛾耐药基因组。当地时间10月27日,国际权威期刊《蛋白质与细胞》在线发表了这一成果。

草地贪夜蛾原产于美洲,寄主植物多达350多种,其中包括玉米、小麦、甘蔗、水稻、花生和辣椒等80多种经济作物。2019年1月草地贪夜蛾由缅甸传入我国,并迅速扩散至26个省市区,累计发生面积超过1600万亩。随着发生区域持续扩大,我国受害作物面积可达上亿亩。

“草地贪夜蛾寄主植物多、适生范围广、繁殖能力强、迁飞扩散速度快、突发性危害重、防控难度大,让人谈之色变。”云南农业大学校长盛军向科技日报记者介绍,他们联合华大基因、中科院动物所及美国、南非、埃塞俄比亚、肯尼亚的相关机构,对草地贪夜蛾及其抗性开展了基因组测序分析研究。

盛军团队整合多组学技术,完成了草地贪夜蛾染色体水平基因组的测序分析,这是迄今为止发布的该虫最高质量基因组。分析显示,入侵我国的草地贪夜蛾细胞色素P450、解螺旋酶等多个基因家族出现显著扩增,其中P450家族多达425个基因,是近缘种斜纹夜蛾的3倍之多,且有283个为草地贪夜蛾特有。

“通过23种农药处理,研究其耐药分子机理,我们找到了这种蛾子的耐药基因。”盛军说。