

在“小平板”上建生物元件生产“工厂”

◎赵梓杉 本报记者 刘传书

在传统方法中,生物元件是从自然界不同物种中通过功能筛选获得。而通过传统方法筛选和挖掘可用元件往往效率有限,且获得的元件功能达不到需求。因此,科学家们期望通过定向进化的方式,获得具备特定功能的生物元件。

中国科学院深圳先进技术研究院刘陈立与傅雄飞研究员团队基于对微生物在空间上生长迁徙的定量理解,开发了一种连续定向进化系统——空间噬菌体辅助连续进化(SPACE)系统。SPACE系统利用每个普通实验室都有小“平板”,将建库和筛选生物元件两个步骤结合在一起,从而实现实验装置的高度简化,成百上千的定向进化实验可以平行进行,一天时间就可以完成几十轮的进化。相关

研究成果于近日发表在国际学术期刊《分子系统生物学》上。

传统的定向进化方法一般为建库和筛选两个步骤,多轮进化往往需要进行大量的重复操作,耗费人力、物力。2011年美国哈佛大学开发了噬菌体辅助连续进化(PACE)系统,是定向进化领域的一个重大突破。利用该系统能够使蛋白质在24小时内进化60轮,效率是传统实验室进化方法的100倍左右,并且整个过程无需人为干预,大大节省了技术人员的劳动力。目前,该系统已被广泛应用于RNA聚合酶、TALEN、Cas9、碱基编辑器等重要酶类的进化改造。

然而,如果要同时进化多个目标蛋白,目前还缺少一种简便的定向进化技术;另一方面,使用PACE系统进行实验需要连续培养装置、复杂的流速控制与检测设备以及一定的操作技巧,因此普通实验室不太容易开展。

通过借鉴PACE系统中的相关设计,刘陈立与傅雄飞团队建立了SPACE系统。该系统大大提升了操作的简便性及元件突变体的筛选效率,为连续定向进化开辟了创新路径。

2019年,刘陈立团队利用细菌迁徙进化实验,揭示了具有不同迁徙速率的细菌的空间定植规律,并提出了一个简单的定量公式,包含定植范围的面积、细菌运动速度、生长速度这三大关键因素。根据该公式,在已知空间大小的条件下,便能算出迁徙进化的最优策略。在此基础上,团队向细菌迁徙运动系统中添加了新要素——噬菌体,构建了细菌—噬菌体共迁移实验体系。

通过大量定量实验与理论建模分析,团队发现噬菌体随着细菌空间迁移可以形成一个扇形的感染区域,而这个扇形区域的大小与噬菌体感染宿主并复制扩增的能力呈正相关关系。更重

要的是,与细菌迁徙进化不同,噬菌体的进化主要发生在扇形感染区域的侧边沿。

SPACE系统在PACE系统的基础上,利用细菌—噬菌体共迁移实验体系,使原本没有运动能力的噬菌体能够处于空间扩张运动过程中的细菌携带,并广泛传播。基于该共迁移实验体系与连续培养系统的相似性,该团队将原本体积庞大且需要较复杂控制的液体连续培养装置替换成了普通生物实验室中最为常见的琼脂平板。

也就是在这样一块小小的平板上,SPACE系统能利用突变体之间对优势空间的竞争,即不同强度的突变体能够在空间上出现自发的分离,从而更高效地完成筛选过程。与此同时,研究人员还可以直接通过平板表面细菌表层上肉眼可见的噬菌体感染区域的大小来对进化的成功与否进行判断,无需借助检测设备。



视觉中国供图

400亿元

我国微生物肥料年产量已达到3000万吨,年产值达到400亿元,累计应用面积超过5亿亩。

微生物肥料:让农田“减肥”又增效

解码生物经济③

◎本报记者 马爱平

“微生物菌剂让秸秆变废为宝,节省了将近20%的化肥农药,这才是我们急需的好技术。”日前,黑龙江省哈尔滨市巴彦县红光乡丰裕村党总支书记于云波看着眼前的一片片玉米地感慨道。

兼具经济效益和环境效益

所谓微生物肥料是通过微生物生命活动,使农作物得到特定的肥料效应的制品。它通过制造营养物质、协助作物吸收营养物质或产生生长激素来刺激作物生长。广义的微生物肥料是既含有作物所需的营养元素,又含有微生物的制品,它可以代替化肥,提供农作物生长发育所需的各类营养元素。

传统的化肥营养元素只有一种或几种,经常使用会造成土壤板结,使作物根际微生物群落单一,易发生病虫害等。

微生物肥料中的有益微生物能产生糖类物质,与植物黏液、矿物质和有机胶体结合在一

2022年的中央农村工作会议强调,十八亿亩耕地要实至名归,而且必须是良田。但在过去相当长一段时间内,不科学地使用化肥和植保产品,导致了土壤酸化、板结、盐渍化、有机质降低、中微量元素失衡、有益微生物菌群缺失等问题,使得土地越来越“瘦”。正因如此,具有提高土壤肥力,促进作物的生长,改善农产品的品质,兼具经济效益和环境效益等诸多优点的微生物肥料正日益受到关注。

起,可以改善土壤团粒结构,增强土壤物理性能、减少土壤颗粒的损失。在一定的条件下,还能参与腐殖质形成,有利于提高土壤肥力。

此外,微生物肥料还可以城市生活垃圾作为原料生产,或将垃圾经处理直接加工成微生物有机复合肥料;或制成菌种剂向堆肥厂供应,以加快其发酵过程,缩短堆肥周期,同时提高堆肥质量及成熟度。国家生物农药工程技术研究中心主任、武汉大学博士生导师杨自文说:“我国每年会产生40亿吨秸秆、粪污及加工有机废弃物,若通过微生物定向发酵转化利用,可以实现真正意义上的变废为宝、减肥减药。”

需求量和产业规模不断增大

长期使用农药化肥对作物和土壤带来的负面影响给予了微生物肥料发展的空间。

近年来微生物肥料的需求量快速上升。据有关数据统计,2013年,微生物肥料的年需求量仅为965万吨,到2020年已增加到1500万吨,这表明市场对微生物肥料的认知度和接受度在不断提升。与此同时,微生物肥料的市场份额也持续上升。

根据农业农村部统计数据,我国微生物肥料产品累计登记数量从2007年的149个增长至2022年2月的9990余个。随着我国微生物肥料产业的稳定发展和生产规模的不断壮大,微生物肥料的应用逐渐推广开来。据中国农业科学院农业资源与农业区划研究所研究员、农业农村部微生物肥料质检中心主任李俊介绍,我国微生物肥料年产量

已达到3000万吨,年产值达到400亿元,累计应用面积超过5亿亩。

微生物肥料产业在我国迅速发展,与国家的大力支持分不开。2013年,国务院发布《生物产业发展规划》,将微生物肥料列为高新技术产业和战略性新兴产业。国家发改委将微生物肥料列为现代农业优先发展的技术之一。随着《化肥使用量零增长行动方案》《农药使用量零增长行动方案》《开展果菜茶有机肥替代化肥行动方案》等的实施,以及绿色农用生物产品高技术产业化专项、耕地质量保护提升等项目的开展,微生物肥料产业驶入了发展的快车道。今年,国家发改委发布的“十四五”生物经济发展规划明确了功能型微生物等生物技术在土壤修复中的应用,这是国家层面对微生物肥料的再度肯定。

专家预测,在国家政策强力驱动下,“十四五”以及今后更长时期,微生物肥料产业规模每年将以10%左右的增速发展,“十四五”末微生物肥料应用面积可达6亿亩以上。

需开展微生物肥料技术攻关

“微生物肥料产业要满足农业绿色发展需求,技术创新跨越是关键,尤其是新功能菌株选育及其组合、复合工艺等的突破。”李俊认为,未来我国微生物肥料产业需要在以下几个方面开展技术攻关。

首先,应用微生物培养组学、夹心平板法等新技术手段,筛选获得新功能菌株,并研究菌株活性保持技术,从源头上保证产品功效,如近几年筛选获得的贝莱斯芽孢杆菌、甲基营养型芽孢杆菌、阿氏芽孢杆菌等优良功能菌株,其应用显著提升了产品的效果。其次,采用新的组合技术,实现功能菌株组合功效上的“叠加”与“互补”,在功能上,可选用促生与防病、腐熟与防病、土壤修复与促生、连作障碍消减与促生等组

合;在构成上,可采用细菌与真菌组合,发挥各自的特点,实现微生物肥料功能的提高与拓展。同时,复合工艺技术亟须取得新的突破,将功能菌与氨基酸、腐植酸等营养物质复合化,实现产品功能的提升与效果的稳定。

此外,还应研究建立微生物肥料的产品效果评价体系、生态效应评价体系、质量安全监督检测体系和市场推广体系。以上体系能更好地评价微生物肥料施用后对土壤物理效应、化学效应和物理效应影响。

另外,还应研究出台功能菌株的知识产权保护政策。可采用现代技术建立菌株编码的唯一性系统,以维护新菌株选育者的权益,达到产权保护的目标。

新技术缩短玉米穗腐病抗性育种时间

◎本报记者 马爱平

近年来,玉米穗腐病已成为威胁我国玉米生产的主要病害之一,其病原真菌主要是镰孢菌。已有研究表明,小麦、玉米中存在镰孢菌的抗性基因。其中,玉米中的ZmFER1基因可能具有镰孢菌病害抗性育种开发价值。

近日,中国农业科学院作物科学研究所玉米基因编辑育种研究团队,通过基因编辑靶向编辑玉米内源基因创制的突变体在多种环境下对玉米拟轮枝镰孢菌侵染具有明显抗性,为抗病育种提供了重要的种质材料与育种技术。日前,相关论文在线发表于《植物生物技术》。

玉米穗腐病尚无有效防治方法

“玉米穗腐病主要造成玉米果穗和籽粒腐

烂,玉米收获后存储不当也会引发籽粒腐烂。在我国,玉米穗腐病广泛发生于各个玉米种植区,一般年份发病率为5%—10%,重发年份可达30%—40%,局部地区甚至可达100%。”论文通讯作者、中国农业科学院作物科学研究所研究员谢传晓在接受科技日报记者采访时表示。

目前,国内外已报道70余种病原菌可引起玉米穗腐病,这些病原菌可单独或复合侵染,其中,拟轮枝镰孢菌和禾谷镰孢菌是在全球范围内危害最大的两个优势病原菌,也是我国玉米穗腐病的优势病原菌。近年来,玉米穗腐病在我国的发生频率和危害程度逐年增加,玉米一旦染病,发病率可高达50%。

“目前在生产中还没有防治玉米穗腐病的有效方法,主要采用合理的栽培措施、适期播种、防治病虫害、种子包衣剂等方式降低玉米穗腐病的危害。然而,选育和推广抗病品种是解决玉米穗腐病危害最经济有效的方法。”谢传晓说。

传统抗玉米穗腐病育种技术主要包括抗性种质资源筛选、抗性遗传规律解析、抗性位点(基因)回交转育或聚合等。国内外大量种质资源筛选鉴定表明高抗玉米穗腐病的资源相对匮乏,绝大部分种质特别是玉米骨干自交系高感玉米穗腐病。

“受环境、病原菌、抗性鉴定方法等因素影响,较难找到一致的高抗、多抗的抗性基因。因此,目前国内外育成的抗品种较少。”谢传晓说。

改良后玉米抗性得到提高

“该研究采用CRISPR/Cas9基因编辑技术,创制了系列目标基因突变体,其中获得了3个ZmFER1基因隐性纯合突变体,包括已删除CRISPR/Cas9基因编辑元件的E1(1bp插入)、E2(1bp插入)和E3(5bp缺失)。科研人员分别在

2020年北京、2021年海南、2021年北京,采用突变体与野生型种子1:1混合盲样人工接种拟轮枝镰孢菌,开展单株基因型鉴定与表型鉴定,进行了抗性分析。”论文第一作者、中国农业科学院作物科学研究所副研究员刘昌林告诉记者。

结果表明,与野生型相比,突变体均一致表现为中等抗性水平。对发病籽粒进行验证鉴定发现,与未发病籽粒相比,感病野生型发病籽粒的伏马毒素高达数千倍,符合拟轮枝镰孢菌致病特征,且病原鉴定表明,病害表型来源于接种的拟轮枝镰孢菌。调查没有发现突变对其他农艺性状有显著负面影响。

“本方法同传统育种方法相比,可以快速改良玉米骨干种质资源的抗性,降低玉米穗腐病的危害,靶标比较清楚,能显著缩短改良所需的时间。与传统回交转育相比,利用基因编辑技术改良受体玉米种质的抗病性还可以克服连锁累赘的问题。”刘昌林指出。

研究进展

研究人员揭示

蔓菁与白菜风味迥异的原因

科技日报讯(记者赵汉斌)蔓菁隶属于十字花科芸苔属,是我国青藏高原藏族和西南地区彝族群众传统种植的作物,具有药用、食用、饲用等价值。近日,中国科学院昆明植物研究所青藏高原植物进化与适应课题组,以全新的研究揭示了假基因(丧失正常功能的DNA序列)的不同进化模式对芸苔属亚种蔓菁和白菜风味差异的影响。相关研究论文发表于国际期刊《植物通讯》。

“相比于其他芸苔属蔬菜,蔓菁具有较强辛辣味。通过研究我们发现,芸苔属蔬菜的风味,主要由自身产生的芥子油苷及其水解产物的含量和类型决定。”课题组负责人、论文通讯作者杨永平研究员介绍。

课题组对青藏高原的蔓菁进行全基因组测序,并对蔓菁和已经发表的芸苔属二倍体近缘种进行比较基因组学及假基因的进化模式分析、脂肪族芥子油苷代谢分析和基因功能分析,揭示脂肪族芥子油苷代谢通路中假基因的不同进化模式造成了芸苔属亚种蔓菁和白菜的风味各异。

研究发现,假基因的数量在芸苔属近缘种间差异较大,并在染色体上呈不对称性分布,其功能主要与植物代谢合成相关。白菜基因组中假基因的进化速率快于蔓菁,研究人员推测,这是造成蔓菁和白菜风味不同的主要原因之一。

进一步对芸苔属植物的芥子油苷含量和类型进行检测后,研究人员发现蔓菁中与辛辣味有关的4种脂肪族芥子油苷代谢物含量最高,而且合成这些代谢物的上游关键基因MAM在蔓菁中发生了扩张,而这些扩张的基因在白菜中进化成为假基因。转基因试验显示,在白菜中通过表达扩张的蔓菁MAM基因,可提高其中两种代谢物的含量,在蔓菁中通过RNAi技术抑制这些基因的表达,可减少3种代谢物的含量,这表明MAM基因的扩张是蔓菁具有较多辛辣物质的主要原因。

在脂肪族芥子油苷代谢通路中,AOP2也是与蔓菁风味以及萝卜硫苷相关的关键基因,而萝卜硫苷的降解产物萝卜硫素具有抗癌作用。“前人也发现,甘蓝的3个AOP2基因中,其中两个是假基因促使了甘蓝中萝卜硫苷物质含量增高,但蔓菁中有3个功能型AOP2基因。”杨永平说。此项研究利用RNAi技术,抑制了蔓菁中AOP2基因的表达,增加了蔓菁中萝卜硫苷物质的含量,让口感不佳的蔓菁辛辣味降低,并为芸苔属作物育种提供新的参考。



青藏高原种植的蔓菁 杨永平摄

科学家开发新型荧光探针 为生物医学研究提供高性能工具

◎刁雯蕙 本报记者 刘传书

近日,中国科学院深圳先进技术研究院(以下简称深圳先进院)生物医学与健康工程研究所(以下简称医工所)生物医学光学与分子影像研究中心储军研究员课题组研发了在活细胞内具有12倍荧光变化的高性能基因编码的环磷酸腺苷(cAMP)绿色荧光探针(G-Flamp1)。该研究结合显微成像和光纤记录等技术,实时高灵敏检测了果蝇和小鼠等模式生物在特定行为过程中特定神经元的环磷酸腺苷信号的时空动力学变化,探索了环磷酸腺苷动力学与动物行为之间的内在关联。相关研究论文近日发表于《自然·通讯》。

细胞是包括人类在内的绝大部分生命体结构和功能的基本单位。细胞会不断地接受周围环境的信号,并相应地转变细胞内蛋白质、有机小分子、离子、DNA和RNA等的数量、分布和活性状态等,从而改变自身形态和生物学功能等。该过程的异常与疾病的发生发展相关。因此,科学家们往往通过检测上述关键分子的时空变化来阐明相关疾病的发生机制。

在该研究中,研究人员选取细胞内重要的第二信使分子环磷酸腺苷作为研究目标。环磷酸腺苷可传递细胞表面多种G蛋白偶联受体(GPCR)的信息,在学习与记忆、药物成瘾、运动控制、免疫、代谢等过程中发挥重要作用。

“活细胞和活体水平的环磷酸腺苷分子浓度变化的高时空分辨率荧光成像是解析环磷酸腺苷信号通路及其生物学功能的重要基础。因此,开发高灵敏的环磷酸腺苷荧光探针成为研究复杂生物过程的关键。”储军表示。

与非基因编码探针相比,基因编码探针像正常蛋白质一样,可以定位到生物体特定细胞或特定细胞亚结构,具有低毒性、低背景、可遗传等优点,在生命科学基础研究中具有无可比拟的优势。然而,现有的50多个基因编码的环磷酸腺苷荧光探针要么灵敏度低(荧光变化最大只有1.5倍),要么荧光亮度较弱,很难监测活体中微弱的内源性环磷酸腺苷变化,极大地限制了人们对生理和病理状态下环磷酸腺苷分子调控机理和功能的研究。

为了开发适用于活体检测的高灵敏度探针,研究人员将环化重排绿色荧光蛋白(cpGFP)插入细菌MlotiK1通道蛋白的环磷酸腺苷结合结构域(mCNBD)中。经过插入位点筛选、连接肽优化、荧光蛋白及感应模块优化,研究人员得到了具有高亮度、高灵敏度、合适亲和力及快响应速度等特征的高性能基因编码的环磷酸腺苷绿色荧光探针(G-Flamp1)。该探针在活细胞中的荧光变化可达12倍,是目前少数几个荧光变化在10倍以上的荧光探针之一。

随后,研究人员将该探针应用于果蝇和小鼠等模式生物中,结合双光子成像和光纤记录等技术,该探针可高灵敏检测到环磷酸腺苷信号的动态变化。

在未来研究中,研究团队将进一步提高探针性能,开发适用于不同应用场景的下一代高灵敏环磷酸腺苷探针,并利用其揭示活细胞和活体中环磷酸腺苷信号的规律、调控机制及生物学功能。