

· 主编导读 ·

本期主编导读主题：碱基编辑、脑细胞芯片、超高通量筛选、微量磷酸化蛋白质富集等技术方法，以及疫苗抗体、多肽药物、治疗用酶、生物材料、生物合成等领域的新进展。

1 技术方法

以 CRISPR/Cas9 基因编辑系统为代表的基因组编辑技术可以显著提高基因敲除及定点修饰的效率。传统的 CRISPR/Cas9 技术通过在靶点处产生 DNA 双链断裂，诱发细胞内的同源重组和非同源末端连接修复途径，进而实现对基因组 DNA 的定点敲除、替换、插入等修饰。然而，由 DNA 双链断裂引发的 DNA 修复很难实现高效稳定的单碱基突变。为了实现对单一碱基的编辑，可将 Cas9 蛋白与胞嘧啶脱氨酶组成融合蛋白。当融合蛋白在引导 RNA 的引导下靶向基因组 DNA 时，胞嘧啶脱氨酶可结合到由 Cas9 蛋白、引导 RNA 及基因组 DNA 形成的 R 环区的局部单链 DNA 处，将该局部单链 DNA 上一定范围内的胞嘧啶 (C) 脱氨变成尿嘧啶 (U)，进而通过 DNA 复制或修复，将 U 转变为胸腺嘧啶 (T)，最终将 C-G 碱基对替换为 T-A 碱基对。徐鑫等作者^[1] (2307-2321 页) 对胞嘧啶碱基编辑器、腺嘌呤碱基编辑器的基本原理、技术迭代、问题挑战进行了详细的综述。除了这两个可实现碱基转换的编辑器之外，最近还出现了能够实现碱基颠换的先导编辑器 (Prime editor)，也值得读者关注。

药物毒性与效能研究经常需要使用脑原代细胞，来体现药物对脑神经系统的影响。脑原代细胞的培养已经从二维模式发展到了三维模式。为了提高培养的通量，赵晨羽等作者^[2] (2543-2553 页)

设计了一个三维脑细胞芯片，其结构为：在 96 孔板上加载一个芯片滤网，滤网上放置由海藻酸钠和脑细胞混合制备而成的三维脑细胞凝胶颗粒。加入含有不同浓度目标药物的培养液，脑细胞就在水凝胶体系中生长。待生长结束后，移去芯片滤网，即可实现细胞和培养液分离，然后即可检测培养液中代谢物成分的变化。作者利用这一自行设计的三维脑细胞芯片，可以很方便地检测农药的神经毒性，为研究药物毒性和效能提供了一种高通量的新方式。

酶的定向进化，其核心是先创造出大量突变体，然后从中定向筛选出具备理想性状的突变体。通过定向进化的方式获得酶的突变体，关键在于提高筛选效率。酶突变体的高通量筛选方法，已经从平板筛选法和微孔板筛选法，发展到基于流式细胞仪的荧光激活细胞分选法和基于微流控芯片、分选设备的液滴微流控分选法。这些超高通量的筛选方法，可以将筛选通量从每天筛选 1 万个克隆，提高到每小时筛选 1 000 万个克隆，效率提高 1 万倍以上。筛选通量提高后，也需要高效的信号检测技术支撑。杨建花等作者^[3] (2197-2210 页) 总结了高通量筛选和信号检测技术的最新发展情况，以及在酶和细胞性能改造方面的应用，对从事酶和细胞改造的研究者都有较好的参考价值。

蛋白质磷酸化是生物界最普遍、也是最重要

的一种蛋白质翻译后修饰,最常见的蛋白质磷酸化修饰发生在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基上。其中,酪氨酸磷酸化的蛋白质虽然丰度较低,但在疾病发生发展过程中发挥着重要作用,因此需要发展能够富集酪氨酸磷酸化微量样品的新方法。在细胞内有一个 SH2 结构域,能够特异性识别磷酸化酪氨酸残基,但天然的 SH2 结构域对酪氨酸磷酸化位点的亲和力比较低。对天然的 SH2 结构域中磷酸化酪氨酸结合残基进行分子改造所获得的 SH2 超亲体,其对含酪氨酸磷酸化肽的肽段的亲和力比天然 SH2 结构域提高了 100 倍以上。利用这样一个 SH2 超亲体,就可以比较有效地富集酪氨酸磷酸化肽,并进行后续鉴定。门丽影等作者^[4] (2334-2341 页)介绍了相关技术原理和应用,可以为开展酪氨酸磷酸化蛋白质组研究提供参考。

2 疫苗和抗体

细菌类活疫苗活菌计数和相应培养基的质量检验,需要有一个比较稳定的参考品作为对照物,以保证检验结果客观公正,对不同地区、不同单位的检验工作都有参考价值。辛凌翔等作者^[5] (2554-2562 页)研制了一个针对链球菌病活疫苗计数的猪链球菌弱毒株参考品,解决了链球菌病活疫苗还没有活菌计数参考品的问题。作者组织了 3 家不同的单位进行了协作标定,并根据标定结果为参考品的活菌数赋值。作者的结果还表明,所制备的猪链球菌弱毒株参考品具有较好的均一性、运输稳定性、低温稳定性和加速热稳定性,在真空和-70℃的环境下可保持一年。这是一个很好的应用研究案例,其研究思路可为其他细菌类活疫苗参考品的研制提供参考。

口蹄疫是一种烈性传染病,接种灭活疫苗是

一种主要的预防方式,但存在灭活不彻底的风险,因此迫切需要开发新型疫苗,其中亚单位疫苗最受关注。病毒的结构蛋白可以自组装形成病毒样空心颗粒,这些颗粒含有病毒的特异性抗原表位,可以用来开发为疫苗。问题在于这些病毒样空心颗粒在组装时,由于缺乏核酸和蛋白质的相互作用,构象稳定性较低,导致疫苗抗原的免疫原性也较低。李璐莹等作者^[6] (2435-2442 页)根据口蹄疫病毒的三维空间结构,通过将衣壳亚基蛋白的个别氨基酸突变为疏水性氨基酸,来增强蛋白质分子间的作用力,获得了热稳定性提高的病毒样颗粒,为将口蹄疫病毒样颗粒开发为口蹄疫亚单位疫苗奠定了基础。

单克隆抗体市场持续高速增长,其中用于免疫检测分析和疾病早期筛查的单克隆抗体,包括新冠病毒中和抗体,都可以通过小鼠杂交瘤细胞来制备。小鼠杂交瘤单克隆抗体的快速制备受到很多因素的影响。其中,能否快速富集和筛选效应 B 细胞、提高 B 细胞与骨髓瘤细胞的融合率、实现目标杂交瘤细胞的快速筛选,是实现快速制备的技术关键。方水琴等作者^[7] (2293-2306 页)重点介绍了杂交瘤融合技术、阳性杂交瘤分选技术方面的研究进展,这两个关键环节的技术进展对提高制备效率有一定贡献。开发进一步提高杂交瘤融合率的方法、新的阳性杂交瘤快速筛选技术和实现单克隆抗体性能的快速评价,是下一步需要努力的方向。

3 多肽药物和治疗用酶

多肽或蛋白类药物如果通过口服给药,在经过胃肠道时往往容易被降解或变性,难以发挥作用。乳酸菌由于其安全性,被用来作为蛋白类药物的递送载体,它们可以定植在肠道细胞表面,

从而实现药物的黏膜投递。得益于乳酸菌基因组学和基因表达系统的发展,这一技术探索至今已有 20 多年的历史,利用的乳酸菌主要包括乳酸乳球菌、干酪乳杆菌、长双歧杆菌等,从治疗感染性疾病和肠炎性疾病,发展到治疗糖尿病和癌症,有不少成功的案例,曾珠^[8] (2272-2282 页) 对此进行了总结。乳酸菌携带蛋白类药物治疗癌症是一个令人感兴趣的新方向,其可能原理主要包括:在厌氧环境下抑制肿瘤细胞的生长;降低环境的氧化程度以减缓肿瘤细胞的增殖等。未来应用需要考虑几个问题:1) 除了对目标蛋白和乳酸菌的生物安全性进行测试以外,由于携带外源蛋白的乳酸菌是基因工程菌,这样的基因工程菌必须失去在自然环境中的增殖能力,以保证环境的生物安全;2) 目前在活体水平上,还难以对携带外源蛋白的乳酸菌在肠道中实际发挥作用的情况进行监测,需要发展相应的技术和方法。

酶作为生物催化剂,广泛用于化学品的生物转化或生物合成。利用酶分解化合物的能力,酶还可以用于治疗疾病。例如,健康细胞和肿瘤细胞的生长可能都需要某些必需化合物。其中有些化合物健康细胞能够自我合成,而肿瘤细胞则需要从外界摄取。利用这样的差别,就可以寻找能够分解这些化合物的特定酶,将体液环境中的特定化合物逐渐分解,从而达到“饿死”肿瘤细胞的效果。这类酶有 L-天冬酰胺酶、精氨酸酶、精氨酸脱亚胺酶等。再如,有些消化道不适或疾病是由于不耐受某些化合物引起的,如亚洲人群常见的乳糖不耐受症,以及一些用作抗营养因子的低聚糖不耐受症。乳糖酶和 α -半乳糖苷酶可以用于减缓由于乳糖或低聚糖不耐受带来的肠道不适症状。酶还可以通过其分解作用来清除对机体有害

的物质。例如,利用尿激酶、链激酶来分解纤维蛋白治疗血栓;利用苯丙氨酸解氨酶降低血液中的苯丙氨酸浓度来治疗苯丙酮尿症等。周蕊等作者^[9] (2256-2271 页) 比较系统地总结了疾病治疗和药物制备用酶的进展,这有助于读者了解酶的工业领域之外的用途。

食源性感染疾病是人类关注的重要问题。食源性致病菌一旦形成生物被膜,不仅难以去除,且容易造成交叉污染,并引起抗药性。除了直接用于治疗疾病,酶还可以专一性地清除食源性致病菌形成的生物被膜,从而保障食品安全。酶清除生物被膜的机制主要有 3 种。一是利用群体感应抑制酶降解生物被膜中的群体感应信号分子,如利用内酯酶、酰化酶或氧化还原酶来分解 N-乙酰高丝氨酸内酯;二是利用二鸟苷酸环化酶或磷酸二酯酶分解细菌中的第二信使——环二鸟苷酸,阻断细胞与细胞之间的交流;三是利用胞外基质水解酶靶向分解生物被膜的胞外基质(包括多糖、蛋白质或 DNA)。这些方式还可以进行组合,从而进一步加速生物被膜的瓦解。吴倩等作者^[10] (2366-2378 页) 对此进行了总结。提高酶的稳定性以及发展抗生物被膜的材料,是这一领域未来重要的研究方向。

4 生物材料

壳聚糖是甲壳素 N-脱乙酰基的产物,与纤维素具有相近的化学结构,可以理解为纤维素在 C2 位上的羟基被一个氨基所替代。壳聚糖是天然多糖中唯一的碱性多糖,其分子结构中的氨基,比甲壳素分子结构中的乙酰氨基具有更强大的反应活性,可以进行很多化学修饰反应。因此,与甲壳素相比,壳聚糖被认为是具有更大应用潜力的

功能性生物材料。陈彦伶等作者^[11] (2322-2333 页)总结了壳聚糖及其衍生物在口腔疾病防治中的应用情况。除了壳聚糖为人熟知的抗菌功能和载药功能,壳聚糖分子中的氨基能与钙离子结合,减少钙离子流失,并促进矿化。另一方面,壳聚糖复合支架材料不仅可以促进新血管形成,还可以提高成骨潜力。壳聚糖的酰化、羧基化、烷基化和季铵化等衍生产物,更增加了壳聚糖功能的多样性,在不同领域都有很大的应用潜力,需要进行系统的测试和评价。

最早的组织工程一般采用支架,细胞在支架中生长定型,然后植入人体,随后支架材料逐步降解并被人体吸收。这一技术的主要问题是支架材料的生物相容性要求较高。细胞片技术是一种无支架的组织工程技术。细胞先在特殊的培养基上生长形成一个片层,然后改变环境条件,使含有培养基质的细胞片层从培养基上脱落下来,就获得了一个可用于组织工程的细胞片。获取组织工程细胞片的技术关键有两个。一是培养基质的组成,如何能够让细胞大量增殖并黏附;二是如何调控细胞片和培养基质的黏附,使细胞片能够脱落下来。肖福安等作者^[12] (2405-2413 页)总结了多种环境因素对细胞片制备的影响。例如,温敏性材料在较高温度下表现出疏水性,在较低温度下表现出亲水性。因此,可在较高温度下,利用其疏水性特征实现细胞黏附生长;当切换到较低温度时,其表现出的亲水性特征就可使细胞片自然脱附。再如,利用酰胺缩合反应可将亲水的羧甲基纤维素钠接枝在玻璃片表面,再共价连接纤连蛋白即可促进细胞黏附生长。当细胞片形成后,可利用纤维素酶分解羧甲基纤维素钠,从而分离获得细胞片。利用基底材料对光、离子、氧化还原、pH、糖浓度不同的敏感性,还可以设计出不同的材料和策略,来实现细胞片与基底材

料的黏附和脱附。

多肽分子可以通过分子间相互作用自组装成具有纳米结构的聚集体,这样的结构可以解决多肽药物蛋白酶水解、毒性高、体内作用效果不稳定的问题,备受人们关注。多肽分子的自组装结构受到很多环境因素的影响,反过来也可以通过调控环境条件的变化,来获得具有不同自组装结构的超分子多肽,满足不同领域的应用需求。于伟康等作者^[13] (2240-2255 页)从自组装多肽是如何形成的、自组装多肽有哪些类型、哪些因素会影响多肽分子自组装等方面对超分子多肽自组装进行了总结,重点介绍了由多肽分子自组装形成的水凝胶在药物递送、组织工程修复以及抗菌方面的应用。由于影响自组装多肽分子的因素很多,如何获得结构和功效稳定的自组装多肽分子,需要在进一步的研究中加以考虑。

5 生物合成

树莓酮是天然存在于树莓等植物中的一种烷基酚类化合物的衍生物,通过苯丙烷代谢途径合成,具有较好的食用和药用价值。树莓酮在树莓等天然植物中的含量非常低,一般在 2-4 $\mu\text{g/g}$ 左右,直接提取生产成本很高。牛文清等作者^[14] (2495-2502 页)尝试利用莱茵衣藻来实现树莓酮的重组生产。由 4-香豆酰-CoA 连接酶催化 (4CL) 生成 4-香豆酰辅酶 A,再由苯亚甲基丙酮合酶 (BAS) 催化 4-香豆酰-CoA 与丙二酰辅酶 A 缩合生成树莓酮的前体对羟基苜蓿丙酮,是树莓酮生物合成途径的两步关键反应。作者利用前期在虎杖中发现的一个具有苯亚甲基丙酮合酶活性的聚酮合酶 (PKS1),构建了一个 PKS1-4CL 融合基因并在莱茵衣藻中实现功能表达,使莱茵衣藻能够生产 6-7 $\mu\text{g/g}$ 的树莓酮,略高于天然植物,但还低

于酵母和大肠杆菌生产树莓酮的水平。莱茵衣藻相对容易培养并容易实现较高的生物量，这一研究为树莓酮的光合生产探索了一条新路。

提高微生物生产化学品的能力，一般从代谢途径和调控角度去考虑。近年来的研究发现，对微生物细胞形态和结构相关的蛋白（包括细胞分裂蛋白、细胞骨架蛋白、细胞壁合成与分解相关蛋白）进行改造，也可以起到提高微生物生产化学品效率的目的。例如，通过调控细胞分裂蛋白抑制细胞分裂，或调控细胞骨架蛋白将细胞由球状变为杆状，使细胞变长、体积变大，可提高聚羟基丁酸酯（PHB）的含量；通过部分裂解细胞壁，提高细胞通透性，可提高维生素、氨基酸和多糖的产量；通过增加细胞分裂频率，产生大量微小细胞，可实现高细胞密度发酵，提高 PHB 或目标蛋白产量等。冯丽丽等作者^[15] (2211-2222 页) 对近年来微生物形态工程的进展进行了总结。需要进一步思考的问题包括：针对目标化学品的不同特征，以及这些化学品在微生物代谢途径中的不同位置 and 不同作用，怎样的细胞形态才是最适合其生产的？改造细胞形态是一个双刃剑，可能会有利于目标化学品的生产，但同时对于细胞来说是一个不适的状态，如何让细胞能够适应并将这样的性状稳定遗传？

生物水泥是近年来逐渐为人们了解的一个概念，其本质是利用微生物的功能，促进碳酸钙的形成，从而实现混凝土裂缝的微生物修复。总结目前的相关研究报道，形成碳酸钙沉淀的要素是要有二氧化碳或碳酸根离子的存在。生成二氧化碳或碳酸根离子的途径有很多，例如，尿素分解为氨和二氧化碳；甲烷氧化生成二氧化碳；甲酸参与反硝化过程生成二氧化碳等。在具体应用过程中，具有致密结构的混凝土并不是一个适合微

生物存活的环境，即便是有芽胞的能够耐受恶劣环境的细菌也难以承受。因此，为相关细菌提供某种形式的保护或封装，给予其一个生存的空间，对发挥微生物在混凝土裂缝修复中的作用十分关键。徐建妙等作者^[16] (2351-2365 页) 总结了基于芽胞的混凝土微生物修复的基本原理、作用方式以及目前的问题和挑战，这有助于读者了解微生物在建筑领域如何发挥作用。

REFERENCES

- [1] 徐鑫, 刘明军. 碱基编辑系统研究最新进展及应用. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2307-2321.
Xu X, Liu MJ. Recent advances and applications of base editing systems. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2307-2321 (in Chinese).
- [2] 赵晨羽, 厉海笛, 陈晓萍. 一种新型高通量三维脑细胞芯片的研制及农药神经毒性评价应用. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2543-2553.
Zhao CY, Li HD, Chen XP. Development of a novel high throughput brain-on-chip with 3D structure and its application in evaluation of pesticide-induced-neurotoxicity. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2543-2553 (in Chinese).
- [3] 杨建花, 苏晓岚, 朱蕾蕾. 高通量筛选系统在定向改造中的新进展. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2197-2210.
Yang JH, Su XL, Zhu LL. Advances of high-throughput screening system in reengineering of biological entities. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2197-2210 (in Chinese).
- [4] 门丽影, 徐锋, 徐平. 基于 SH2 超亲体的微量样品酪氨酸磷酸化蛋白质组学技术研究进展及应用. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2334-2341.
Men LY, Xu F, Xu P. Advances and application of enrichment technology in SH2 superbinder-based tyrosine phosphoproteomics. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2334-2341 (in Chinese).
- [5] 辛凌翔, 王秀丽, 吕文静, 等. 链球菌病类活疫苗活菌计数参考品的研制. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2554-2562.
Xin LX, Wang XL, Lv WJ, et al. Development of a reference substance for live bacterial count of

- Streptococciosis* live vaccines. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2554-2562 (in Chinese).
- [6] 李璐莹, 董虎, 卢渊录, 等. 口蹄疫病毒氨基酸改造对其病毒样颗粒稳定性的影响. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2435-2442.
Li LY, Dong H, Lu YL, et al. Effect of amino acid site modification on stability of foot-and-mouth disease virus-like particles. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2435-2442 (in Chinese).
- [7] 方水琴, 刘程, 马俊飞, 等. 小鼠杂交瘤单克隆抗体快速制备技术研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2293-2306.
Fang SQ, Liu C, Ma JF, et al. Research progress in the rapid preparation of monoclonal antibodies of mouse hybridoma. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2293-2306 (in Chinese).
- [8] 曾珠. 乳酸菌作为药物分子粘膜投递载体的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2272-2282.
Zeng Z. Advances in the use of lactic acid bacteria as mucosal delivery vectors of therapeutic molecules. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2272-2282 (in Chinese).
- [9] 周蕊, 刘欣, 曾波, 等. 疾病治疗及药物制备用酶的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2256-2271.
Zhou R, Liu X, Zeng B, et al. Advances of enzymes in the applications of disease treatment and drug preparation. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2256-2271 (in Chinese).
- [10] 吴倩, 张昭寰, 童金蓉, 等. 酶制剂清除食源性致病菌生物被膜的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2366-2378.
Wu Q, Zhang ZH, Tong JR, et al. Enzyme-based targeted disintegration of biofilms formed by food-borne pathogens: a review. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2366-2378 (in Chinese).
- [11] 陈彦伶, 张立, 张凌琳, 等. 壳聚糖及其衍生物在口腔疾病防治中的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2322-2333.
Chen YL, Zhang L, Zhang LL, et al. Advances of chitosan and its derivatives in the prevention and treatment of oral diseases. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2322-2333 (in Chinese).
- [12] 肖福安, 简雪婷, 冯晓祎, 等. 组织工程细胞片的构建. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2405-2413.
Xiao FA, Jian XT, Feng XY, et al. Construction of tissue engineered cell sheet. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2405-2413 (in Chinese).
- [13] 于伟康, 张珊珊, 杨占一, 等. 超分子多肽自组装在生物医学中的应用. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2240-2255.
Yu WK, Zhang SS, Yang ZY, et al. Application of supramolecular peptide self-assembly in biomedicine. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2240-2255 (in Chinese).
- [14] 牛文清, 韦航涛, 薛飞燕, 等. 4-香豆酰-CoA 连接酶 (4CL) 和聚酮合酶 (PKS1) 的融合蛋白在莱茵衣藻中表达促进树莓酮积累. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2495-2502.
Niu WQ, Wei HT, Xue FY, et al. Overexpression of a fusion protein of 4-coumaroyl-CoA ligase and polyketide synthase for raspberry ketone production in *Chlamydomonas reinhardtii*. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2495-2502 (in Chinese).
- [15] 冯丽丽, 王智文. 形态工程在生物基化学品生产中的应用进展. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2211-2222.
Feng LL, Wang ZW. Development of morphology engineering for production of bio-based chemicals. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2211-2222 (in Chinese).
- [16] 徐建妙, 谢卡茜, 程峰, 等. 基于芽胞的混凝土微生物原位修复技术研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2351-2365.
Xu JM, Xie KX, Cheng F, et al. Research progress in spore-based *in-situ* restoration technology of concrete with microorganisms. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2351-2365 (in Chinese).