

本期论文主要涵盖医药生物技术相关的综述及研究论文, 主要包括细菌 CRISPR-Cas 系统的综合应用、mRNA 疫苗翻译效率、利用动物细胞高表达重链抗体可变区抗体、抗体药物中双/多特异抗体的差异化研发策略、抗体技术在食源性致病菌快速检测中应用、肿瘤治疗中的生物标志物、活细菌载体、人工智能时代下的蛋白质从头设计、靶向识别新型冠状病毒上刺突蛋白 S1 亚基的嵌合型 E3 泛素连接酶的设计与功能验证、流感病毒 Mosaic-HA1 的表达和分枝杆菌不同生长周期磷酸化蛋白质定量表达比较研究等。特别对以上内容进行简要推介。

司书毅 《生物工程学报》编委

(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

细菌 CRISPR-Cas 系统的综合应用

胡祐等^[1]重点介绍了细菌的 CRISPR-Cas 系统凭借高特异性锚定靶核酸和高活性反式切割能力, 有望成为特异性好、灵敏度高的信号报告系统。可视化检测是通过肉眼即可判断结果, 无需依赖高能光源及复杂的光学检测系统, 可极大程度上简化核酸发展即时检测(point of care testing, POCT)系统。CRISPR-Cas 系统酶促底物显色法检测中常用的酶包括以辣根过氧化物酶、脱氧核酶等为代表的过氧化物酶和半乳糖苷酶。除基于比色法实现可视化检测外, 颗粒散射光谱特征的变化同样可以实现肉眼直接观察分析。AuNPs 具有优异的表面等离子共振特征, 关联 AuNPs 的聚集状态与靶序列的有无即可实现可视化检测。CRISPR-Cas 系统与可视

化技术相结合, 不仅可以提升可视化检测的特异性, 同时可大幅降低核酸检测对实验室基础设施、精密仪器及专业人员的依赖程度, 实现真正意义上的不依赖于设备的 POCT 核酸检测。陈姿亦等^[2]利用 CRISPR/Cas9 技术构建了维甲酸诱导基因 I (RIG-I) 基因敲除的 HEK293 细胞, 旨在揭示 RIG-I 基因敲除对 I 型干扰素信号通路中关键因子的影响。研究成功构建了 2 株稳定敲除 RIG-I 基因的 HEK293 细胞株(S1 和 S3), RIG-I 在 S1 和 S3 中的基因转录水平和蛋白质表达水平均显著低于野生型细胞($P < 0.05$)。S1 和 S3 细胞株的 MDA5 和 IFN β 1 基因转录水平和 S3 细胞株的 NF- κ B(p65)蛋白质水平显著低于野生细胞株($P < 0.05$); 细胞免疫荧光分析结果表明, poly I:C 转染细胞后, 与野生型相比, S1 细胞株核外存在较多的 NF- κ B(p65)蛋白。此外, poly I:C 转染细胞 48 h 后, 显著降低了野

生型和 S1 细胞株的活力($P < 0.05$), 但是不影响 S3 细胞株的活力。该研究通过 CRISPR/Cas9 系统成功构建了 2 株 RIG-I 基因敲除的 HEK293 细胞, 为进一步研究 I 型干扰素信号通路的机制提供了稳定的细胞模型。

mRNA 疫苗设计

2023 年诺贝尔生理学或医学奖授予匈牙利科学家 Katalin Karikó 和美国科学家 Drew Weissman, 以表彰他们在核苷基修饰方面的发现, 这些发现使针对新冠感染的信使 RNA (mRNA) 疫苗的开发成为可能。近年来快速发展的 mRNA 疫苗免疫技术, 可将体外转录(*in vitro*-transcription)的 mRNA 包装并递送进入细胞, 这些 mRNA 在细胞内翻译表达成抗原, 从而刺激机体产生免疫反应。该技术可以实现更加高效的疫苗研发, 成为快速应对新发传染病的新型有效方法之一。如新型冠状病毒感染 (COVID-19) 的致病病毒是严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2), 其基因组序列公布于 2020 年 1 月, 而据此研发的 mRNA 疫苗 2020 年 3 月就已率先进入人体临床试验, 2020 年 12 月再次率先获得世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 的紧急使用推荐, 响应速度前所未有。刘涛等^[3]强调了针对 SARS-CoV-2 的 mRNA 疫苗的快速研发使用, 最核心和关键的因素就是数十年的相关研究积累, 例如抗原的快速设计得益于先前对中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV) 和严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV) 的研究, 疫苗的快速产品化得益于脂质纳米颗粒封装递送 mRNA 方面的研究。当安全有效的 mRNA 封装递送技术实现通用化

和工业化后, mRNA 疫苗研发的瓶颈变为抗原的快速设计。其中, 首先是如何确定最有效的抗原, 然后是如何设计编码抗原的 mRNA 序列, 使其满足序列稳定和高效翻译表达的要求。抗原的确定受制于新发病毒及其致病机制, 只能借助先前对原型病毒的研究积累, 或者依赖最新的分子病理研究结果。而在 mRNA 序列设计方面, 可以根据以往对 mRNA 稳定性和翻译表达机制的研究, 通过总结和针对性深入研究而得到优化设计原则, 以实现计算机辅助的快速设计。

抗体药物的制备、研发与应用

重链抗体可变区抗体 (variable domain of heavy-chain antibody, VHH) 是重链抗体的可变结构域, 负责与靶标的结合。与传统抗体相比, VHH 的分子量更小、结构更简单, 而且通常没有糖基化, 具有良好的耐热性, 能在不同的酸碱条件下保持其结构和功能。因此, 越来越多基于 VHH 的应用得到发展, 如肿瘤和传染病的治疗、生物标志物检测、分子成像等。在 2019 冠状病毒病大流行期间, 研究人员已经分离出数百个用于中和严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型的 VHH^[4]。

细菌、酵母、真菌、昆虫细胞和哺乳动物细胞都能够表达 VHH。其中, 大肠杆菌是 VHH 最常用的表达宿主, 但大肠杆菌表达系统存在产量低或可能形成无功能的包涵体等问题。哺乳动物细胞是生产抗体的最佳表达系统, 悬浮适应型重组中国仓鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞系用于生产人类治疗性抗体已有几十年的历史。与重组 CHO 细胞株相比, 人胚

胎肾 293 (human embryonic kidney 293, HEK293) 细胞因其高转染效率和优秀的外源蛋白质生产能力常被用于基因的瞬时表达(transient gene expression, TGE), 更适用于抗体开发的早期阶段。谭书楨等^[5]以 Expi293F 细胞为表达宿主, 选择 ORF 作为优化对象, 通过筛选 SP 和优化密码子使多种 VHH 的产量远高于大肠杆菌的一般产量, 且 VHH 活性良好, 为哺乳动物细胞大规模生产 VHH 提供了可借鉴的经验。

双/多特异性抗体可以结合 2 个或 2 个以上不同抗原或者同一抗原的 2 个或 2 个以上不同的表位, 克服了单克隆抗体的局限性, 增加了药物的多重靶向性、选择性和功能性, 从而具有更佳的治疗安全性和有效性, 已逐渐成为新一代有效的治疗手段。截至 2024 年 3 月, 全球共获批准 13 款双特异性抗体药物上市, 2023 年全球双特异性抗体药物市场规模超 88 亿美元。随着基因工程技术的发展和产业的成熟, 双/多特异性抗体药物研究数量不断增加, 应用范围也在不断拓展, 为满足临床需求和创造临床价值奠定了基础。目前全球双/多特异性抗体已经开展了上千项研究, 主要集中在肿瘤领域, 多数处于早期临床试验阶段, 且以 T 细胞重定向、程序性细胞死亡蛋白 1 (PD-1) 及其配体 PD-L1 组合双特异性抗体为主。因此, 在研究和开发双/多特异性抗体药物时要采用差异化药物研发的策略, 从尚未被满足的临床需求出发, 选择合适的适应症, 根据疾病的致病机理和靶点生物学机制选择合理的靶点组合和结构形式, 提高药物的有效性、安全性和可成药性, 从而在日益激烈的市场竞争中占据有利地位。李栋^[6]综述了双/多特异性抗体药物的研发阶段和适

适应症、靶点组合、结构形式、作用机制, 并探讨了双/多特异性抗体药物研发的关键点和差异化研发策略。

食源性致病菌是导致食品安全问题的重要因素之一, 对国民健康造成严重危害, 实现对食源性致病菌的快速检测是目前防治食源性疾病的关键策略。抗体具有高特异性、高灵敏度的优势, 是食源性致病菌关键特异性识别元件的首选。全美淋等^[7]介绍了不同类型的抗体及其特点, 以及不同抗体技术在食源性致病菌快速检测中的应用, 并提出抗体技术与其他食源性致病菌检测方法的联用可以有效提升检测效果。最后, 对目前的研究现状与潜在问题进行了分析与总结, 对食源性致病菌快速检测技术的发展提供了理论依据与实践思路。

肿瘤治疗的生物标志物与细菌载体

恶性肿瘤治疗仍然是当前临床医学的一大难题。前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)检测、前列腺活检、磁共振成像等检测方法被广泛用于前列腺癌筛查, 但特异性低且成本和风险均较高。因此, 亟需开发特异性高、成本低、易于获取且稳定可靠的生物标志物, 并以此为基础建立新型前列腺癌无创筛查和诊断方法。近年来, 科学家陆续鉴定了前列腺特异性抗原前体(proPSA)等蛋白质类前列腺癌生物标志物, 循环肿瘤 DNA (ctDNA) 等核酸类前列腺癌生物标志物并开发了四激肽释放酶组合(four-kallikrein panel, 4K)等多标志物联合检测方法。初子斌等^[8]综述了前列腺癌生物标志物与联合检测方法用于前列腺癌诊断和预后评估

的最新进展，并对不同的生物标志物和联合检测方法进行了深入的分析 and 比较。

以细菌为基础的肿瘤治疗是一种有前景的治疗策略。华婷婷等^[9]阐述了专性和兼性厌氧菌可以选择性地在肿瘤组织中定殖，与正常组织的分布比大于 1 000:1，通过竞争营养物质、诱导肿瘤细胞凋亡和免疫激活等多种机制发挥抗肿瘤作用，是递送抗肿瘤药物的良好载体。以活细菌为载体递送抗肿瘤药物的系统生物相容性好，通过化学工程以及生物工程的简单改造，细菌就能够成为抗肿瘤药物的递送载体。细菌可以将药物递送到传统方法难到达的深度，具有靶向性强等特点。该文从底盘细菌的选择、细菌负载药物策略、抗肿瘤药物递送应用及其局限性等方面进行了详细阐述，并展望了其未来的发展方向。

在细菌作为肿瘤药物递送载体的应用中，免疫原性发挥着双重作用。一方面，细菌的低免疫原性减少机体免疫系统对细菌的识别，降低潜在的炎症因子风暴风险，使得细菌能够高效抵达肿瘤区域，实现药物的有效递送。另一方面，细菌在肿瘤区域的免疫识别则能够触发局部的抗肿瘤免疫反应，促进肿瘤免疫和细菌的清除，这展现了其治疗潜力，但活细菌介导药物的设计和开发对基础科学研究人员和监管机构都提出了一些挑战。

蛋白质的从头设计

具有特定功能和特性的蛋白质在生物医药、纳米材料等领域至关重要。蛋白质从头设计能够定制序列以生成具有所需结构的、自然界中未存在的蛋白质。近年来，随着人工智能

迅猛发展，深度学习生成模型逐渐成为强大工具，许多功能性蛋白质的设计都达到了原子级别的精度。刘南等^[10]概述了蛋白质从头设计的演进，着重介绍了其最新算法模型，并分析了存在的问题，如设计成功率低、精度不足以及对实验验证的依赖性，最后探讨了蛋白质设计的未来趋势，旨在为研究者和从业者提供有益参考。该文展望未来随着计算能力增强、算法优化以及新一代高通量实验技术涌现，研究者将获得更全面和更深入的生物数据。这将使 AI 模型的训练更充分，加深对生命过程的洞察，推动设计更复杂精准的蛋白质，使得深度学习模型能够更有效地处理复杂的生物数据。人工智能将整合表观遗传学、转录组学和蛋白质组学等生物信息，更准确地模拟生物分子交互，设计出具有特定功能的蛋白质。此外，厘清深度学习模型的“黑箱”机制，增强模型的精确性和计算过程的可解释性，将提高药物设计在酶工程、合成生物学以及蛋白工程等领域中的成功率。

基于生物技术的病原微生物检测、诊断与治疗策略

SARS-CoV-2 侵染宿主的过程中，刺突(spike, S)蛋白起着至关重要的作用，其中 S1 亚基的受体结合域(receptor binding domain, RBD)结构域与宿主的血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)受体结合，介导病毒侵入宿主细胞。因此，降解 S1 是干预 SARS-CoV-2 侵染的可行策略。代艳等^[11]开发了一种针对 S1 的靶向降解工具，首先利用三质粒慢病毒系统构建了稳定表达 S1 的 HEK 293 细胞系，发现在该细胞系中过表达线粒体 E3 泛

素连接酶 1 (mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1, MUL1)可以有效促进 S1 的泛素化修饰,并加速其通过蛋白酶体降解过程。进一步研究显示, MUL1 催化的 S1 的多泛素修饰主要是以 K48 的侧链加成方式进行。此外,将特异性靶向识别 S1 的小肽 LCB1 与 MUL1 偶联,构建了嵌合型 E3 泛素连接酶 LCB1-MUL1。研究发现,该嵌合酶活性依赖于 MUL1,并且相比于 MUL1, LCB1-MUL1 表现出更高的催化效率,将胞内 S1 的蛋白质半衰期从 12 h 缩短至 9 h。该研究阐明了 MUL1 通过催化 S1 的泛素化修饰并促进其通过蛋白酶体降解的机制,初步验证了针对 S1 蛋白设计的靶向降解嵌合酶 LCB1-MUL1 的有效性。

蛋白质磷酸化修饰在结核病致病菌——结核分枝杆菌中扮演重要角色,有望成为抗结核药的新靶点。徐丹洋等^[12]以结核分枝杆菌近源菌——分枝菌酸小杆菌为研究对象,分析其在不同生长时期的磷酸化蛋白质;从分枝菌酸小杆菌对数期和平台期样品中共鉴定并定量来自 385 个蛋白质的 573 个磷酸化肽段和 816 个磷酸化位点,构建了分枝菌酸小杆菌不同生长期的磷酸化蛋白质组数据集;进一步定量比较了该菌在对数期和平台期显著差异表达的磷酸化蛋白质,经选择性离子检测(selected ion monitor, SIM)验证了 68 个上调磷酸化蛋白质,主要参与细胞增殖和蛋白质翻译等通路,69 个下调磷酸化蛋白质,主要参与三羧酸循环的通路。差异磷酸化蛋白质在细菌生长、增殖等重要生命活动过程中显著富集,为分枝菌酸小杆菌和结核分枝杆菌蛋白质磷酸化功能的揭示提供了蛋白质组学数据支撑。

流感病毒给全球公共卫生带来了严重威胁,疫苗接种是预防流感及严重并发症的有效手段。韩菲等^[13]研究分析了北半球 2012–2022 年间人类甲型流感病毒(Influenza A virus, IAV)流行株血凝素(hemagglutinin, HA)中 HA1 亚基的氨基酸突变趋势和抗原显性位点变化情况;基于 WHO 公布的 2022 年北半球流感疫苗推荐株 A/Wisconsin/588/2019 (H1N1)和 A/Darwin/6/2021 (H3N2)的 HA1 氨基酸序列,通过马赛克(mosaic)遗传算法设计了 3 种 Mosaic-HA1 抗原并将其在 293F 细胞中进行表达、纯化。将纯化后的 Mosaic-HA1 抗原与明矾佐剂以 1:1 的体积比混合制备亚单位疫苗并免疫 BALB/c 小鼠评价免疫效果;酶联免疫吸附试验表明 Mosaic-HA1 抗原能产生同时结合两种亚型 HA1 的 IgG,其中结合 H3 蛋白、H1 蛋白的特异性效价 IgG 效价分别达到 10^5 、 10^3 以上,攻毒试验表明 Mosaic-HA1 能抵抗 H3N2 和 H1N1 流行毒株的攻击。该研究通过对不同亚型 IAV 毒株 HA1 中免疫显性位点进行重新组合,为多价亚单位流感疫苗开发提供了新思路。

REFERENCES

- [1] 胡祐, 陈中甫, 张师音, 葛胜祥. 病原核酸 CRISPR-Cas 可视化检测方法进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 3872-3887.
HU Y, CHEN ZF, ZHANG SY, GE SX. Advances in visual detection of pathogen nucleic acids by CRISPR-Cas[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 3872-3887 (in Chinese).
- [2] 陈姿亦, 吴怡蓉, 张雨婷, 高有领. 应用 CRISPR-Cas9 技术构建 *RIG-I* 基因敲除的 HEK293 细胞系[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4254-4265.
CHEN ZY, WU YR, ZHANG YT, GAO YL. Knockout of *RIG-I* in HEK293 cells by CRISPR/Cas9[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4254-4265 (in Chinese).

- [3] 刘涛, 王升启, 李伍举. mRNA 疫苗翻译效率的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 3930-3950.
LIU T, WANG SQ, LI WJ. Research progress in the translation efficiency of mRNA vaccines[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 3930-3950 (in Chinese).
- [4] Oxford protein informatics group[DB/OL]. [2024-06-01]. <https://opig.stats.ox.ac.uk/>.
- [5] 谭书楨, 董虎, 潘颂佳, 穆素雨, 陈永杰, 张韵, 孙世琪, 郭慧琛. 使用优化的信号肽和密码子在 Expi293F 细胞中高表达重链抗体可变区抗体[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4219-4227.
TAN SZ, DONG H, PAN SJ, MU SY, CHEN YJ, ZHANG Y, SUN SQ, GUO HC. High expression of variable domain of heavy-chain antibodies in Expi293F cells with optimized signal peptide and codons[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4219-4227 (in Chinese).
- [6] 李栋. 双/多特异性抗体药物差异化研发策略[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 3974-3984.
LI D. Differential discovery strategies of bispecific and multi-specific antibody drugs[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 3974-3984 (in Chinese).
- [7] 全美淋, 李飞, 刘金燕, 王婷婷, 年锐, 刘文帅, 张鸣, 池哲. 抗体技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 3985-4005.
QUAN ML, LI F, LIU JY, WANG TT, NIAN R, LIU WS, ZHANG M, CHI Z. Research progress of antibody technology in rapid detection of foodborne pathogens[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 3985-4005 (in Chinese).
- [8] 初子斌, 徐焯, 殷自强, 曹敬峰, 金成宇, 陈晓阳, 杨昭. 前列腺癌生物标志物研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 3951-3973.
CHU ZB, XU Y, YIN ZQ, CAO JF, JIN CY, CHEN XY, YANG Z. Advances in prostate cancer biomarkers[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 3951-3973 (in Chinese).
- [9] 华婷婷, 郑斌, 白洋. 活细菌作为抗肿瘤药物递送载体的研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 3861-3871.
HUA TT, ZHENG B, BAI Y. Advances in the application of live bacteria as vehicles for delivering antitumor drugs[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 3861-3871 (in Chinese).
- [10] 刘南, 金小程, 杨崇周, 王梓洋, 闵小平, 葛胜祥. 人工智能时代下的蛋白质从头设计[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 3912-3929.
LIU N, JIN XC, YANG CZ, WANG ZY, MIN XP, GE SX. *De novo* protein design in the age of artificial intelligence[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 3912-3929 (in Chinese).
- [11] 代艳, 林佳雨, 张肖雅, 逯浩睿, 饶朗. 靶向识别新型冠状病毒上刺突蛋白 S1 亚基的嵌合型 E3 泛素连接酶的设计与功能验证[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4071-4083.
DAI Y, LIN JY, ZHANG XY, LU HR, RAO L. Design and functional validation of a chimeric E3 ubiquitin ligase targeting the spike protein S1 subunit of SARS-CoV-2[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4071-4083 (in Chinese).
- [12] 徐丹洋, 高媛, 施佳辉, 姜松昊, 薛宇, 张瑶. 分枝菌酸小杆菌不同生长周期磷酸化蛋白质定量表达比较研究[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4098-4110.
XU DY, GAO Y, SHI JH, JIANG SH, XUE Y, ZHANG Y. Quantitative comparison of phospho-proteins of *Mycobacterium smegmatis* at different growing phases[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4098-4110 (in Chinese).
- [13] 韩菲, 焦鹏涛, 林润山, 李和桥, 马嘉宁, 裴汉中, 张鹤, 孙蕾, 罗廷荣, 郑敏, 范文辉, 刘文军. H1N1、H3N2 亚型流感病毒 Mosaic-HA1 的表达及对小鼠的免疫原性评价[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4042-4056.
HAN F, JIAO PT, LIN RS, LI HQ, MA JN, PEI HZ, ZHANG H, SUN L, LUO TR, ZHENG M, FAN WH, LIU WJ. Expression of influenza A H1N1 and H3N2 viruses Mosaic-HA1 antigens and evaluation of its immunogenicity in mice[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4042-4056 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)