



## 壮丽70年·奋斗新时代

编者按

作为生物体基本的结构和功能单位,细胞以各类化学反应展现生命活动的过程。过去上百年来,尽管科学家已经对细胞代谢、生命过程各种表征方法开展了深入研究,并让这些科学研究成果造福人类,但是,科学家感到,距离真正打开细胞“黑箱”,仍有很长的路要走。

2014年前后,国家自然科学基金委员会化学科学部设立重大项目“工业生物催化剂的代谢反应机制与相

关构建的研究”和“单细胞多组分时空分析”。

5年来,科学家以创新为导向、以需求牵引,分别围绕微生物细胞“辅因子”代谢过程、单细胞中多种生物活性分子时空分辨的荧光分析新方法开展研究,并积极推进基础研究成果的产业化应用。

本期自然科学基金版将回顾上述两个重大项目的研究历程,展示其取得的成绩。

## 让“辅因子”助力工业生物催化

■本报记者 甘晓

作为一种厌氧原核生物,大肠杆菌具有由肽聚糖组成的细胞壁,只含有核糖体简单的细胞器,因导致腹泻被人熟知。这种大小只有微米级、结构简单的生物,却蕴含着不可想象的能量——只要把一些具有特殊功能的基因导入大肠杆菌中表达,通过物质代谢和辅因子代谢,就能合成出我们想要的化合物。

近20年来,这些不起眼的细菌扮演了工业生物催化中“细胞工厂”这一重要角色,为生物制造翻开了新的一页。

不久前,国家自然科学基金委员会(以下简称“自然科学基金委”)重大项目“工业生物催化剂的代谢反应机制与相关构建的研究”顺利结题。项目执行3年来,科学家们着眼于与物质代谢同时进行的辅因子代谢过程,不仅推进了基于辅因子催化调控机制的科学认识,还实现了多项产业化应用。

“科技创新的选题要从产业中来。”回顾该重大项目的历程,项目首席科学家、南京工业大学原校长、中国工程院院士欧阳平凯告诉《中国科学报》。

## 瞄准“三低”掣肘

依靠大肠杆菌、酵母菌、丙酮丁醇梭杆菌等微生物复制、自组装、自调控的智能化特点,一些相对廉价易得的原料可以接近理论转化率水平,高效地合成出大量人们所需的产品。科学家们把它们称为“工业生物催化剂”。

进入21世纪,化工领域中常用化合物的生物制造线路均已被打通,这主要依赖物质合成基因的导入。但越来越多的科学家发现,删除或导入外源基因、转录因子等后,许多代谢途径的结果具有不确定性。如果仅靠物质代谢,高效率、高

收率、高浓度的工业催化过程往往难以实现。

“糖酵解途径就是一个典型的例子。”欧阳平凯介绍说。糖的无氧氧化称为糖酵解,指的是葡萄糖或糖原在无氧或缺氧条件下,分解为乳酸的同时产生少量三磷酸腺苷(ATP)的过程。但目前无论是单独还是联合强化表达糖酵解关键酶的编码基因,糖酵解的产物浓度、转化率和速率始终无法提高。

科学家发现,一些被称为“辅因子”的物质,可能在其中发挥了重要作用。

“辅因子的作用不容忽视。”欧阳平凯强调。自2011年起,他带领南京工业大学研究团队,与北京化工大学和天津大学的研究人员一起探讨工业生物催化领域存在的科学问题。

多场讨论会中,科学家分析了工业生产中“转化率低、浓度低、反应速率慢”的“三低”现象。他们认为,在科学层面“辅因子代谢”认知不足,掣肘当前工业生物催化发展。

围绕“辅因子”的科学问题,经过3年酝酿提出、组织申请,2014年,欧阳平凯领衔的这一科研团队获得自然科学基金委员会重大项目“工业生物催化剂的代谢反应机制与相关构建的研究”的支持。

在科学家看来,这个选题既面向国民经济主战场的重大需求,具有战略意义,又是科学前沿的关键问题,值得开展深入研究。

## 回到基础研究中去

面对产业面临的实际问题,回到基础科学研究中去,成为科学家解决问题的最优策略。

据介绍,该重大项目执行之初,科学家计划重点实现对“辅因子代谢与碳物质代谢的协同作用机制”的科学认识。他们将这一科学目标分解

为4个课题,分别是“新一代代谢网络模型的构建与最优途径的设计”“辅因子对基因转录和代谢流调控的作用机制”“辅因子代谢调控体系的构建与表征”及“物质代谢与辅因子代谢的适配与优化”。

在不久前举行的该重大项目结题验收会上,南京工业大学制药与生命科学院教授应汉杰说,从逻辑上来看,前两个课题着眼于基础理论,针对的关键科学问题是“辅因子与物质代谢的调控机制”;后两个课题着眼于手段方法,目标是“高效生物催化剂的构建与优化”。

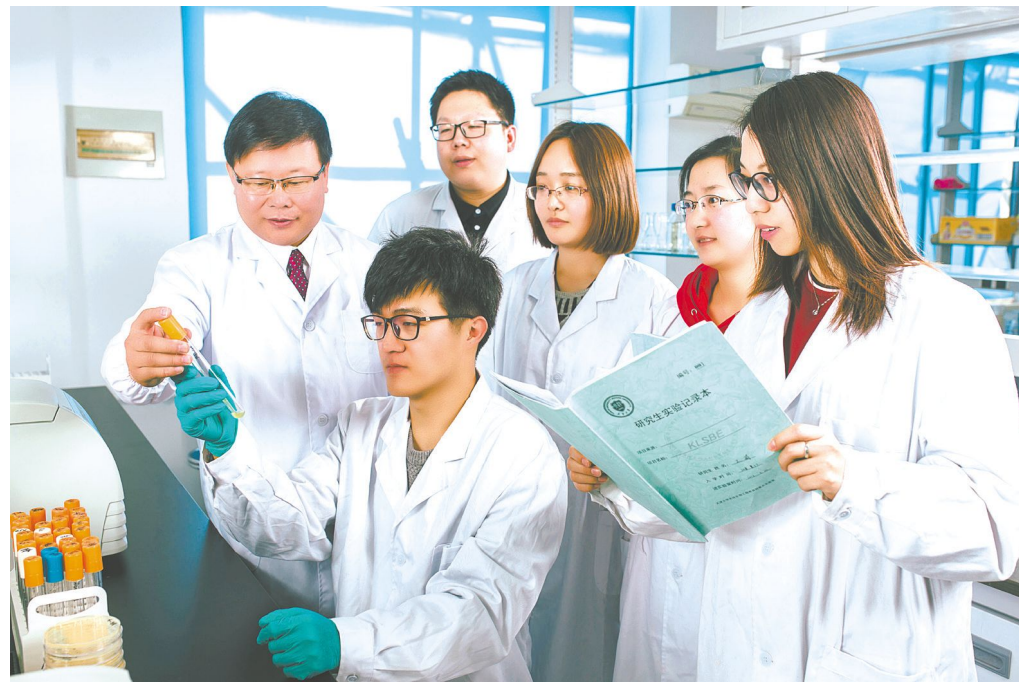
正是在这样清晰的逻辑框架下,科学研究工作逐步展开。在理论方面,研究人员在系统生物学指导下,构筑起新一代代谢网络模型。有了这一模型,研究人员可以计算出辅因子代谢调控的关键节点,有针对性地设计最优代谢途径。

例如,在谷氨酸棒状杆菌用葡萄糖产己二酸的代谢中,研究人员使用这一模型算出理论产率最高的三条途径。“计算中考虑辅因子的因素后,发现其中一条途径理论产率高达87%。”该重大项目科学家、北京化工大学校长、中国工程院院士谭天伟表示,“这说明,辅因子介入可以改变己二酸物质代谢原有的热力学体系,实现更优的代谢途径。”

此外,他们还建立起辅因子代谢调控的元件库,网站自2015年建设以来累计访问10万余次,成为研究代谢途径的有效工具。

同时,研究人员从辅因子再生、区域性调控、偏好性调控及动态调控等方面开展研究,发现了诸多新规律。例如,一项针对酿酒酵母的研究表明,将物质与能量调控策略耦合,是目标产物的代谢流最大化和快速化的重要策略。

有了基础理论的突破,高效生物催化剂的构建呼之欲出。例如,在传统丁醇发酵中,氢气和副



天津大学教授元英进(左)团队在开展研究。

产品丙酮大量产生,极大限制了反应的原子经济性和总产品价值。为此,构建了“NADH—补偿模块”“不需要另外操控丙酮等溶剂合成途径,丙酮就被彻底消除,这提高了丁醇的生产效率。”应汉杰表示。

2017年,该重大项目迎来突破。在该重大项目支持下,天津大学化工学院教授元英进团队在《科学》上发表2篇研究论文,介绍了他们在真核生物酿酒酵母2条染色体设计与合成方面的工作,为在基因组层面建立辅因子和碳物质代谢的快速优化平台奠定了基础。2018年3月,这项成果入选2017年度“中国科学十大进展”。

此外,他们还构建了一系列产物的生物合成路径,有效合成了天然产物、生物燃料、生物基化学品、医药以及燃料等。比如,高产番茄红素、7-脱氢胆固醇和脂肪醇酵母菌株研制成功。“从生产过程来说,过去需要从植物中萃取含量很低的的有效成分,例如青蒿素的提取,现在利用人工合成酵母就可以生成,减少了对环境的破坏。”元英进指出。

## 助推产业化

科技创新的选题从产业中来,自然也会回到产业中去。该重大项目执行5年来,科研人员尝试不断延伸创新链,将基础研究成果推向工业化应用。“这些成果为工业环境下通过操控辅因子实现生物制造中原子经济性和时空效率的提升提供了理论基础和实现方法,推动了一些典型工业产品的生物制造。”欧阳平凯告诉《中国科学报》。

作为聚酯生产的原料,1,3-丙二醇发展空间巨大。当前,美国杜邦公司以廉价的葡萄糖为原料的生物法生产技术路线已经形成垄断。

谭天伟介绍,在该重大项目支持下,研究人员开始探索一条以甘油为原料的全新生物高效合成1,3-丙二醇的路线。其中,关键的科学问题是碳代谢途径与1,3-丙二醇合成的定量关系。

为此,研究人员建立了基于辅因子和碳代谢全局优化的新策略,最终使目标产品的产量达到每升86克,是传统途径的1.7倍。2014年,该研究团队在山东泰安建成年产2000吨1,3-丙二醇生产线。

在生物乙醇发酵方面,应汉杰带领团队基于辅因子代谢的新理论,从微生物基因调控、新型反应体系构建两个方面着手,设计了一条全新的乙醇发酵工艺。

据介绍,采用此工艺,小试间歇式发酵和连续式发酵的产率达到了目前文献报道的最高水平。研究团队在2017年和2018年分别在广西中粮生物质能源有限公司进行了30吨级的中试和320吨级的工业化示范试验。试验表明,酵母发酵周期缩短了45%,平均糖酵转化率则提高了3.8%。

应汉杰表示,正是辅因子的调控改变了胞内的氧化还原状态,降低了副产物甘油的通量,提高了细胞的耐胁迫能力,减缓了细胞衰老,加速了葡萄糖消耗。

5年来,参与该重大项目的科学家心中已形成一幅对比鲜明的图景。一幅是大到整个世界的“生态阳光经济”——通过生物制造,利用可再生的微生物资源生产能源、化学品与新材料,实现太阳能驱动下的工业与农业可持续发展。

另一幅,则是小到肉眼看不见的微生物细胞——以辅因子观察细胞代谢的“窗口”刚刚打开。“期待未来获悉辅因子在细胞内工作的更多细节。”欧阳平凯说。

## 多组分时空分析:走进单细胞的“社会”

■本报见习记者 程唯加

1952年,美国细胞生物学家威尔逊曾提出,“一切生命的关键问题都要到细胞中去寻找答案。”

纵观近50年来荣获诺贝尔生理学或医学奖和化学奖的重大突破,70多个都与细胞生物学密切相关。

作为研究细胞生命活动规律的学科,细胞生物学在科学家的显微镜下经历了近180年的历史,但细胞对人类来说依然是“黑箱”一般的存在。如今,研究人员正在尽力通过对单个细胞进行研究来阐明细胞的“天性”。

自2014年起,在国家自然科学基金重大项目“单细胞多组分时空分析”支持下,中国科学家在有关单细胞生物学的重大科学问题上取得了一系列进展。

## 没有两个细胞是完全相同的

如果把细胞环境比作一个社会,每个细胞就是一个独立的人。

在对人类社会的科学研究中,不仅个体的特征和行为值得关注,研究所处环境中个体之间相互协调或对抗作用等关系以及群体所产生的集体行为,也相当重要。细胞研究亦是如此。

多年来,通过对细胞的研究,科学家已经对生命的生长发育、遗传变异、认知与行为、进化与适应性等若干生命科学问题有了较为清晰的认识。不过,在清华大学副教授陆跃驹看来,这些还远远不够。

“在之前的研究中,科学家探索出细胞新陈代谢、生命运动过程中的各种表征方法,如蛋白表达分析、基因转录检测(反转录PCR)等,这些方法更多的是在大样本的细胞中进行观察与测量后,得到一个平均结果。”陆跃驹告诉《中国科学报》。

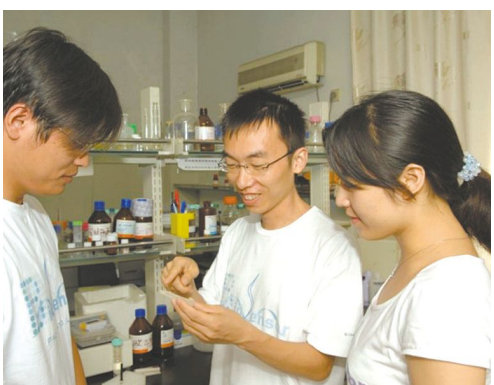
然而,没有两个细胞是完全相同的。这些平均结果掩盖了细胞之间微小的差异,这些差异可能在某些关键生命过程如细胞分化、肿瘤的发展过程中起着决定性作用。

为了获取细胞生理状态和过程中更准确、更全面的内部信息,科研人员将目光瞄准单个细胞。

“单细胞内部的生命活动,可以被认为是生物活性分子之间复杂的化学反应的结果,正是这些分子的时空分布、结构、功能及其相互作用



唐波(左)指导博士生做实验。



樊春海(中)与学生讨论细胞成像探针的合成。

方式,决定了细胞增殖、分化、凋亡以及重大疾病发生、发展、迁移等过程。”陆跃驹分析道。

但是想要研究这些生物活性分子形成的精密复杂的相互作用和调控网络并非易事。它不仅要求科学家了解其化学成分,更要理解它们之间相互作用的复杂过程,以及在细胞内部细胞器中特定位置的作用区域和时空变化。

2014年,国家自然科学基金委员会发布重大项目“单细胞多组分时空分析”申请指南,清华大学化学系教授张新荣组织的研究团队的申请获批。他们凝练出荧光探针制备与合成、新型时空分辨成像方法以及在细胞内生物分子相互作用研究等关键科学问题。

“我们希望发展建立适于单细胞中多种生物活性分子时空分辨的荧光分析新方法,驱动生命科学和基础与临床医学研究进步。”谈及科学目标,张新荣如是说。

## 新技术带你深入了解“社会”

如何实现这一目标?在张新荣看来,这需要从单细胞中多组分子分子的时空信息获取方法出发。为此,项目组将其分为“荧光探针制备与合成”“新型时空分辨成像方法”以及“细胞内生物分子相互作用”三大方向进行攻关。

要了解细胞这个独特的“社会”,首先需要的是——一台可以钻进细胞内部获取关键分子信息的“放大镜”。因此,荧光探针制备与合成至关重要。

针对单细胞中极低含量分子检测问题,山东大学教授唐波课题组综合运用共轭聚合物信号放大、无光源激发、光谱红移、核酸杂交链式放大等技术,构建了若干超灵敏的分子与纳米荧光探针,实现了细胞及活体中某些活性分子浓度皮摩尔水平的原位、动态检测。

同时,细胞中生理过程的发生和发展往往不是一类分子的孤立事件,涉及到多种分子的参与。因此课题组还开发了一系列的两组分、三组分和四组分同时检测的荧光探针,并设计了多模态探针来获取更丰富的成像信息。

“本项目的一个重要特色工作是时任中国科学院上海应用物理研究所研究员樊春海课题组基于框架核酸构建的多组分分析探针和成像方法。”张新荣介绍,框架核酸是一类人工设计的结构核酸,具有尺寸精确、结构精确、修饰精确的特点,通过精确的化学修饰,可以将多种小分子和大分子探针负载到框架核酸上,实现多组分探针的可控构建。

不过,实现探针在亚细胞区域内对胞内生物活性分子的精确定位和实时检测可并不那么容易。

“细胞核内分子密度大且背景荧光特别高,导致人们对单分子的观察非常困难。传统光学显微成像分辨率,不足以解析染色体DNA的构造。”陆跃驹告诉记者,尤其在超高分辨率的前提下,要实现持续的动态观察,对荧光探针和成像方法都提出了更大的挑战。

在活细胞超分辨成像方面,北京大学生物动态光学成像中心研究员孙育杰课题组研发了高性能探针Gmars-Q,使其在光照时进入暗态,从而延长成像时长,比已有最好探针的活细胞超分辨成像时间上一个数量级,这种超高分辨成像技术实现了纳米尺度的活细胞核内动态观测。

“Gmars-Q的独特机制打开了基于蛋白结构和动力学优化荧光蛋白的设计策略。”德国卡尔斯鲁厄理工学院教授Gerd Ulrich Nienhaus曾对此给予高度评价。

在现代分析化学的发展中,大科学装置的应用也越来越受到科学家的重视。依托中国科学院高能物理研究所和中国科学院上海应用物理研究所的两台同步辐射光源,樊春海课题组和中国科学院高能物理研究所研究员高学云课题组开展了同步辐射X射线细胞成像方法的研究。

实验团队通过搭建X射线全场三维成像平台,合成了一系列X射线成像探针,发展了细胞成像算法,实现了单细胞的X射线三维成像。为了应对单一技术无法在高分辨率下同时实现细胞的结构与功能定位的挑战,课题组又发展了X射线与超分辨荧光联用技术,实现了在纳米分辨下的细胞结构与功能融合成像的突破。

本项目在开发了一系列单细胞多组分时空分析技术的基础上,将其综合应用于相关生物学的研究。

已有研究发现DNA不仅有序列信息,还有三维结构信息。基于此,北京大学教授、中国科学院外籍院士谢晓亮课题组通过对sgRNA改造,开发了一种全新的活细胞染色质DNA的多色、稳定标记系统,实现对活细胞内基因位点的长时间连续观察追踪。

2018年,该重大项目迎来一项重磅突破。谢晓亮课题组在《科学》上发表文章,介绍他们在单细胞水平研究双倍体哺乳动物细胞的基因组结构研究方面取得的成果。利用新发展的Dip-C技术,项目组构建了人源双倍体细胞的具有超高分辨率的单细胞基因组三维结构。

“这种结构模型对研究细胞功能有着至关重要的作用,也为唐氏综合征等染色体非整倍体疾病提供了研究和干预手段。”谢晓亮说。

## 让基础研究走出实验室

对于细胞“社会”的深层解析,不仅为了阐明各种生命现象与本质,科学家更是希望借此对这些现象和规律加以控制和利用,以达到造福人类的目的。在该重大项目支持下,诸多研究展现出了良好的社会应用前景。

“许多疾病的研究和治疗最终都必须回归细胞水平。”在张新荣看来,一系列单细胞多组分时空分析技术能够有效加深人们对生命现象的本质理解,也有助于了解疾病机理,进而促进生物医药科学和相关产业的发展。

“项目研发的诊疗一体化功能纳米探针,为相关重大疾病成因、诊断提供表征手段和依据,对疾病的早期预警以及提高疾病治愈率有着重要意义。”张新荣告诉《中国科学报》,部分创制的探针已经进行了市场转化,基于探针建立的荧光成像技术也成为国家重大新药创制课题中药效评价的关键技术之一。

例如,唐波课题组研究的“超灵敏度—可逆探针”能够在活体水平上示踪炎症发生发展过程中超氧阴离子的浓度水平及动态变化过程,缩短了药物临床试验周期,提高了药物筛选效能。为即将进入临床II、III期的鼻敏胶囊、咳嗽胶囊、结肠炎栓3个中药新品种的作用靶点、药效评价研究提供了技术支持。

而基于同步辐射装置的X射线细胞显微成像技术,分辨率很容易达到数十纳米,可以在大视场下实现完整细胞的纳米分辨无损成像,与荧光显微装置相比具有巨大优势,在细胞显微成像方面也展现出了巨大的应用前景。

然而,对于人类来说,走进细胞“社会”是一个任重而道远的过程。还有无数未知的奥秘等着科学家去探索。

张新荣表示,该重大项目成果为下一步融合多种分析方法,发展全器官跨尺度高灵敏三维成像提供了基础。

“通过研发同步辐射X射线相衬—电镜融合成像,有可能在全脑三维微米精度地图引导下选取局部特征区域进行纳米精度的结构解析,大幅降低高精度神经网络各解耦的盲目性。在特定部位,也可利用荧光分子成像和质谱分子解析,进一步作功能研究。”项目组成员表示,在有关“社会”的探索与发现之旅上,中国科学家一直砥砺前行。