

# 特约评述

## 合成生物学在感染性疾病防治中的应用

蒲璐, 黄亚佳, 杨帅, 金帆

(中国科学院深圳先进技术研究院, 合成生物学研究所, 广东 深圳, 518055)

**摘要:** 合成生物学是一门综合了基因组学、分子生物学和工程学等一系列方法和原理而形成的综合性学科。随着合成生物学理论和技术的不断发展,科学家们设计和构建了越来越复杂的基因回路和元件,并开始在各种领域中使用这些系统,其中就包括生物医学领域。感染性疾病的治疗因新抗病原体药物研发速度逐渐落后于耐药性病原体出现的速度,已经成为现代医学重点关注的课题。对此,合成生物学家们开发了用于感染性疾病的合成生物学疗法。在这篇综述中,我们概述了感染性疾病及目前治疗感染性疾病的阻力;简述了利用合成生物学对抗感染性疾病的优势;回顾了CRISPR技术在感染性疾病诊断中的应用;重点介绍了合成生物学在细菌和病毒感染性疾病治疗中的应用;同时介绍了合成生物学在感染性疾病预防中的应用,包括预防性工程菌的构建、疫苗的研发和感染源的改造。通过回顾合成生物学家为研究感染性疾病的治疗及预防做出的努力,我们期望能获得新的灵感。虽然目前合成生物学疗法还处在试验阶段,但是目前合成生物学在感染性疾病防治研究中已经取得了不小的进展,可预见合成生物学将在该领域获得突破并做出贡献。

**关键词:** 合成生物学;CRISPR;感染性疾病治疗;细菌生物被膜;感染性疾病预防

中图分类号:Q81 文献标志码:A

## Application of synthetic biology in the treatment and prevention of infectious diseases

PU Lu, HUANG Yajia, YANG Shuai, JIN Fan

(Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China)

**Abstract:** Synthetic biology is bringing together engineers and biologists to design and create novel biomolecular components, networks and pathways, which were used to construct, rewire and reprogram organisms. Over the past two decades, synthetic biologists have designed and built increasingly complex circuits and constructs and begun to apply these systems to a variety of settings, including biomedicine. Multidrug-resistant infections have emerged as a

收稿日期: 2020-03-10 修回日期: 2020-03-17

基金项目: 国家自然科学基金(21774117, 31901028)

引用本文: 蒲璐, 黄亚佳, 杨帅, 金帆. 合成生物学在感染性疾病防治中的应用[J]. 合成生物学, 2020, 01(2): 134-149

Citation: PU Lu, HUANG Yajia, YANG Shuai, JIN Fan. Application of synthetic biology in the treatment and prevention of infectious diseases [J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 01(2): 134-149

major threat to hospitalized patients and are associated with the boost of mortality rate. For example, the prevalent and often inappropriate use of broad-spectrum antibiotics has caused the emergence of multidrug-resistant bacteria. The technologies of synthetic biology have contributed to the understanding of disease mechanisms and provided design of novel strategies for the treatment of a range of infectious diseases. In this review, we highlight the application of synthetic biology for diagnosis, treatment and prevention of infectious diseases. We first describe CRISPR-Cas based technology for diagnostics, such as SHERLOCK and DETECTR. We then discuss engineered phages, bacteria and the strategies of synthetic biology for combating drug resistance and bacterial biofilm. Also, synthetic biology principle of 'analysis by synthesis' as well as CRISPR technology have been applied to unravel mechanisms of viral infectious disease and to develop therapies. Finally, we summarize the applications of synthetic biology in prevention of infectious diseases, including engineered probiotic bacteria, vaccine development, and control of infectious vectors.

**Key words:** synthetic biology; CRISPR; treatment of infectious disease; biofilm; prevention of infectious diseases

合成生物学是生物科学在21世纪出现的一个分支学科。在近20年的时间里,合成生物学已经发展成为一门通过结合工程学和生物学原理,以系统合理的方法对标准化的生物元件进行重组、创造和设计,来获取具有可预测性和应用性的功能型生物装置、系统或生物体的科学<sup>[1]</sup>。随着对可用基因模块的不断开发,以及对生物分子模块的进一步了解,并结合数学建模,合成生物学家们可以借鉴基因和基因组的基本要素及其组合原理,来设计、合成和重建已存在的基因元件或构建新的基因零件来重塑生命系统<sup>[2, 3, 4]</sup>。

合成基因回路中包含了基本的信号响应调控元件,这些元件可以受特定的外源刺激或内源性代谢产物的激活,对后续基因表达进行调控<sup>[5]</sup>。这些可以控制基因的“开关”通常是触发诱导型蛋白质和DNA之间<sup>[6, 7]</sup>或是适配体和转录开启之间<sup>[8, 9]</sup>的相互作用,反过来说,信号响应调控元件与调控因子的相互作用通过调控转录翻译,响应外源性或内源性的输入信号。基因开关的标准化设计改善了不同功能基因在同一时空表达的兼容性<sup>[10]</sup>,使得复杂基因网络的构建成为可能,如多触发信号输入和时序控制<sup>[11, 12]</sup>、共同控制<sup>[13, 14]</sup>和反馈控制<sup>[15]</sup>回路元件等,同时也使得可预测功能性的复杂蛋白能够实现高精度原位的动态表达。

合成生物学的理念和方法被运用到生物医学中,为现代医学注入了新的思路和策略。合成生物学疗法的基本原理,如图1所示,是通过将人工

构建的生物分子或“编程化”的有机体等人工合成生物系统转入宿主内,重建内稳态,调节疾病引起的系统紊乱或功能异常等<sup>[16]</sup>。合成生物学已在感染性疾病、代谢性疾病、神经退行性疾病和癌症等的诊断治疗和预防上显示出巨大的潜力<sup>[17]</sup>。我们在这里着重介绍合成生物学在感染性疾病诊疗和预防中的研究进展。

## 1 感染性疾病概述及其治疗瓶颈

一般将感染性疾病<sup>[18]</sup>定义为由病原微生物引起的机体疾病,常见的如炎症或器官功能障碍等。感染性病原体的种类包括细菌、病毒、真菌等。其中细菌感染性疾病有鼠疫、百日咳、猩红热以及细菌性败血症等;病毒感染性的疾病种类较多,最常见的是流行病毒引起的感冒,另外还有病毒性肝炎、麻疹、带状疱疹等;真菌感染导致的疾病,常见的比如脚气病,就是皮肤癣菌引起的足部皮肤真菌感染<sup>[19]</sup>。病原菌更容易侵袭免疫力低下的人群,引起各种感染性疾病。

针对不同的病原体引起的感染,有相对应的诊断和治疗方案。利用抗生素、抗毒素等直接消灭病原体或消除毒素的药物治疗是感染性疾病的基本治疗手段。然而,随着抗病原体药物的广泛长期使用,病原体的耐药性日渐增强,远快于人们研制新抗病原体药物的速度。某些地区抗生素的滥用有时反而使感染概率增加或感染加重,特

别对一些自身有免疫缺陷病的患者，用抗病原体药物已经难以控制其体内的病原体感染<sup>[20]</sup>。

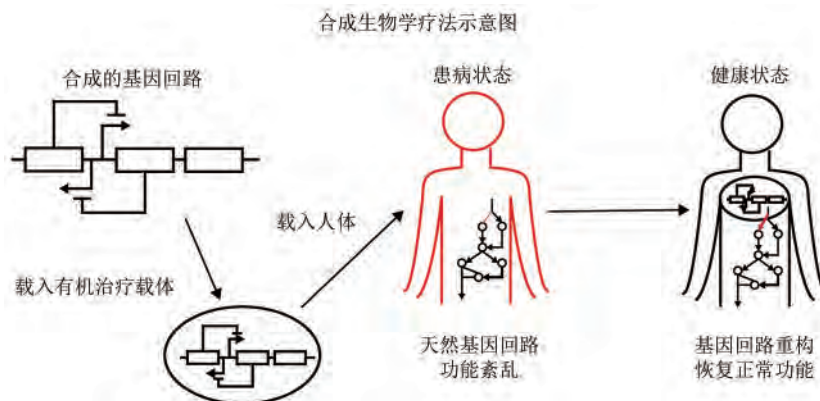


图1 合成生物学治疗原理<sup>[16]</sup>

Fig. 1 Schematic of synthetic biology therapy<sup>[16]</sup>

## 2 合成生物学对抗感染性疾病的优势

为了解决病原体造成的人类健康问题，研究者们开始尝试新的方法，合成生物学的理念也因此被应用到感染性疾病的治疗和预防中。在过去十几年里，针对感染性疾病防治的工程化合成生物学医学元件逐步迈向临床化，其中一部分现已经处于从理论、体外试验，动物实验到临床试验的过渡阶段。

相比于传统的治疗手段，依靠化学合成获取抗病原体药物，合成生物学通常通过对现有生物系统进行改造，改造的微生物可以自我繁殖，不需要建立大型化工厂，有望成为更加高效、清洁、符合市场期待的新兴技术。进入21世纪后，新抗病原体药物的研发进入瓶颈期，以“造物”为特色的合成生物学的出现正好满足了人们的期望。不同于大多数的广谱抗病原体药物，合成生物学疗法通常针对特定的目标病原体，并且可以根据病人的实际情况给出定制性的方案。此外，随着计算机科学与合成生物学相结合，通过算法、模型、机器学习等手段来设计基因回路，预测合成效果，模拟代谢路径，记录过程与结果，优化体系，使得合成效率和效果得到不断的提升，大大缩短了开发新药的时间，这些都是传统治疗手段无法比拟的。

如今，合成生物学已在感染性疾病的领域做出了初步尝试，逐渐改变了对病原体的诊断和治疗方式；在细菌感染性疾病中显示出了理想的治

疗效果和巨大的潜力；为病毒感染性疾病致病机理的研究提供了新的思路；也参与到了感染性疾病预防的研究中。

## 3 合成生物学在感染性疾病诊断中的应用

合成生物学在疾病诊断方面已展现了巨大的潜在优势。合成生物学家通过人工设计基因回路改造人体自身细胞、细菌、病毒等生命体，这些人工构建的生命体能够感知疾病特异性信号或人工信号、特异性靶向异常细胞和病灶区域，表达报告分子，达到疾病诊断的目的。有的人工改造生命体同时具备诊断和治疗的功能，会在检测到目标信号的同时，释放治疗药物。

聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）技术是目前核酸检测的主流方法。而近年来，基于规律成簇的间隔短回文重复（clustered regularly interspaced short palindromic repeats, crisPR）技术的检测手段因其快速、准确、经济、操作简便、对专业设备和基础设施要求低等特性正快速发展起来。

2014年，Collins等<sup>[21]</sup>首次将CRISPR/Cas技术引用核酸分子诊断，开发了一种低成本的能区分出寨卡病毒（Zika Virus, ZIKV）亚型的纸基传感器。这种检测方法首先是从样本中提取RNA靶标并进行扩增，然后将扩增产物滴加到含有冻干细胞组分

和生物蛋白的纸片上, 激活冻干组分发生生化反应, 纸片会发生肉眼可见的颜色变化, 从而指示 ZIKV 的存在。在此检测平台的帮助下, 可以辨别临床症状相似的 ZIKV 和登革热病毒 (Dengue Virus, DENV), 正确诊断出患者所感染的病毒类型仅需 3 h。当检测到 ZIKV 时, 将样品与冻干的 CRISPR/Cas9 混合, 利用 CRISPR/Cas9 对 PAM 区域优异的序列识别能力, 可以区分不同亚型的 ZIKV, 实现现场快速准确的毒株特异性诊断。

2016年, 张锋等<sup>[22]</sup>鉴别出可以被用来切割细菌 RNA 序列的 CRISPR/Cas13a 系统, 深入研究发现该系统不同于靶向 DNA 的 CRISPR/Cas9 或 CRISPR/Cas12a 系统, Cas13a 切割完靶标 RNA 后依然保持活性, 会继续切割非靶标 RNA, 这种非特异性切割后来被称为附属切割 (collateral cleavage)<sup>[23]</sup>。在此基础上, 张锋课题组与 Collins 课题组<sup>[23]</sup>合作将 CRISPR/Cas13a 系统与重组酶聚合酶等温扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 技术结合, 使样本中极微量的核酸能够在 37 °C 左右的温度中 0.5 h 内数量级扩增, 同时加入了一个单链 RNA 荧光报告探针, 组成新的诊断工具 “SHERLOCK” (specific high/sensitivity enzymatic reporter unlocking), 用来检测 ZIKV、DENV 或其他病原体等。如图 2 所示, SHERLOCK 的工作流程是: 靶标 RNA 经 RPA 和 T7 RNA 聚合酶转录扩增后, 激活 Cas13a 的附属切割活性, 切割底物产生荧光信号, 经检测灵敏度已达到 50 fm (1 fm = 10<sup>-15</sup> mol/L)。2018年, 张锋团队<sup>[24]</sup>再次升级了 SHERLOCK 技术, 推出 SHERLOCK v2, 新版本的检测系统中引入了 3 种来自不同种属细菌的 Cas13 蛋白和 Cas12a 蛋白 (LwaCas13a、PsmCas13b、CcaCas13b 和 AsCas12a), 能在同一样品中检测出多种病毒感染, 比如能同时检出 ZIKA 和 DENV, 从只检测 1 个靶标 RNA 进化到同时检测 4 个靶标 RNA, 发出 4 种不同颜色的荧光信号; 并利用 CRISPR type/III 中的 Csm6 酶, 设计 CRISPR 系统使得 Cas13 剪切后的序列是 Csm6 酶的靶向序列, 放大其测试信号, 进一步增强了该方法的灵敏度, 定量测量浓度最终低至 2 am (1am=10<sup>-18</sup> mol/L), 敏感度提高了 100 倍。同时, 团队还开发了一种玻璃纤维试纸条, SHERLOCK v2 组分可以在纸上冻干再水化, 90min 内就可以检测到浓

度 2 am 以上的 ZIKA 和 DENV 的单链 RNA。2019 年, Collins 等<sup>[25]</sup>开发了一种可批量应用的、可编程的 CRISPR 响应智能材料体系, 可用于便携、精确、快速、定量且时空可控地检测危险病毒病原体, 区分病原菌、人类 DNA 的基因型。张锋等<sup>[26]</sup>将 Cas13 的抗病毒活性与其诊断能力结合起来, 建立了一个强大和快速可编程的诊断和抗病毒系统, 命名为 CARVER (Cas13-assisted restriction of viral expression and read out), 靶向病人细胞中淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV), 甲型流感病毒 (IAV) 和疱疹性口炎病毒 (VSV) 的单链 RNA, 使细胞中病毒 RNA 的水平降低了约 30%, 流感病毒的感染力降低了约 45%, CARVER 技术使 CRISPR/Cas13 技术迈向靶向治疗以及抗病毒药物开发的新领域。

2018年 Doudna 等<sup>[27]</sup>发现当 Cas12a 蛋白在剪切靶向的 dsDNA 后能高效地切割非特异性单链 DNA (ssDNA), 基于此开发了 DETECTR (DNA endonuclease targeted crisper trans reporter) 技术。与 SHERLOCK 类似, DETECTR 将 RPA 与 Cas12a 相结合, 扩增产物激活 Cas12a 的附属切割活性, 切割底物产生荧光信号 (图 2)。DETECTR 技术可以准确地检测出是否有高危型人乳头瘤病毒 (Human Papilloma Virus, HPV) 感染: HPV16 (100%)、HPV18 (92%), 在单核苷酸多态性分析、癌症筛查、细菌和病毒感染检测及耐药性筛查等方面有广泛的应用潜力。

我国中国科学院上海植物生理生态研究所赵国屏院士团队王金博士<sup>[28]</sup>也发现了 Cas12a 对于靶标 ssDNA 和非靶标 ssDNA 的切割特性, 并基于此原理开发了 HOLMES (an one-hour low-cost multipurpose highly efficient system)<sup>[29]</sup> 技术。HOLMES 技术可以准确检测出诸如日本脑炎病毒 (Japanese Encephalitis Virus, JEV) 和伪狂犬病病毒 (Pseudo Rabies Virus, PRV) 等。

## 4 合成生物学在细菌感染性疾病治疗中的应用

合成生物学在细菌感染性疾病治疗中的应用, 主要集中对细菌生物被膜的治疗中。



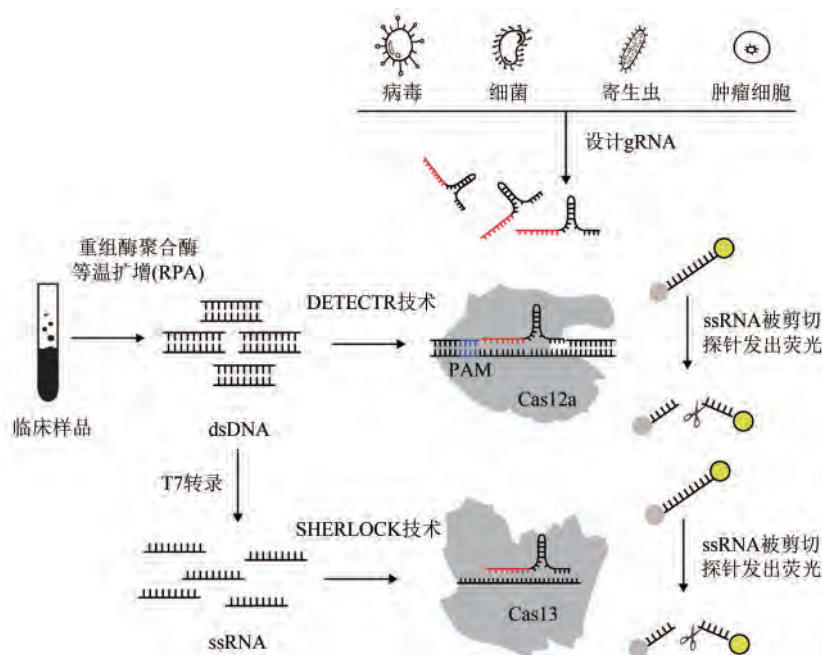


图2 基于CRISPR/Cas系统的SHERLOCK<sup>[23]</sup>、DETECTION<sup>[27]</sup>检测技术原理示意图

Fig. 2 Schematic for molecular diagnostic testing using CRISPR/Cas based technology SHERLOCK<sup>[23]</sup>/DETECTION<sup>[27]</sup>

#### 4.1 细菌感染性疾病与生物被膜

细菌感染是致病菌或条件致病菌侵入宿主体内，产生毒素和其他代谢产物所引起的局部或全身性感染。按病情的缓急程度，可以将细菌性感染分为急性感染和慢性感染。实际上，急性感染和慢性感染是细菌感染宿主两个不同过程的结果，这两种类型的感染涉及到细菌内部不同的分子机制。发生急性感染时，细菌在宿主体内处于浮游状态，快速的生长及传播；而发生慢性感染时，细菌会选择在宿主体内定殖，形成生物被膜，这个过程相对慢一点，但会造成长期持续性的感染。抗生素问世后，在相当长的一段时间里，细菌感染都受到了控制，尤其是急性细菌感染，抗生素治疗往往能收到良好的治疗效果。然而近几十年来，抗生素用量不断加大，疗效却难以令人满意，抗生素不得不更新换代，却依然赶不上耐药菌株出现的速度。随着现代医学的发展，高分子材料在医疗领域应用广泛，留置尿管、中心静脉插管、气管插管等操作引起的导管相关感染<sup>[30]</sup> (catheter related infection, CRI) 越来越常见，已经成为院内感染的主要原因，占医院感染的80%以上。造成CRI的重要因素之一是导管在

体内留置时间过长，细菌在其表面黏附定殖并形成生物被膜。细菌生物被膜也是造成长期慢性细菌感染和细菌出现抗生素耐药性的重要原因之一<sup>[31]</sup>。

细菌生物被膜<sup>[32]</sup>是细菌黏附于接触表面，分泌多糖基质、纤维蛋白、脂类等，将其自身包裹在其中而形成的大量细菌聚集体。如图3所示，生物被膜的形成<sup>[33]</sup>通常有以下几个步骤：初始阶段，少量细菌可逆地黏附在接触表面；然后细菌开始繁殖，通过菌体表面粘附性物质将彼此黏结在一起，发展形成微菌落；以微菌落为基本单位，逐渐形成成熟的生物被膜；生物被膜中的细菌游离到环境中去，寻找新的定殖表面。

细菌生物被膜是细菌为适应环境，帮助自身生存的一种生命形式。细菌生物被膜相关的细菌慢性感染难以根治的原因有以下几点：其一，细菌在宿主体内形成的生物被膜使得细菌具有很强的耐药性<sup>[34]</sup>，生物被膜内的细菌几乎对所有的抗生素都不敏感，即使依靠高于正常剂量成百倍的药物也不易彻底治愈；此外，生物被膜内的细菌能抵抗和干扰宿主的防卫机制，具有极强抗免疫系统的能力，造成持续性感染；生物被膜是细菌感染的病灶，从生物被膜中游离出来的细菌除了

能进一步扩大感染,也具有更强的毒性<sup>[35]</sup>。针对细菌慢性感染的治疗,更多的是针对细菌生物被膜的治疗,合成生物学家们通过改造噬菌体或工

程菌,使其可以瓦解生物被膜,杀死具有强耐药性的细菌,或者阻断细菌对抗生素抵抗机制,削弱这些细菌的耐药性,起到辅助治疗的作用。

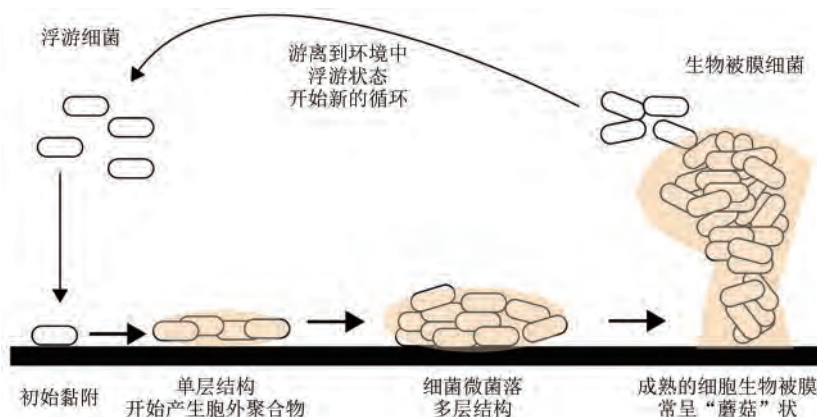


图3 生物被膜形成过程示意图<sup>[33]</sup>

Fig. 3 Schematic of biofilm formation<sup>[33]</sup>

#### 4.2 工程噬菌体在生物被膜治疗中的应用

噬菌体是侵袭细菌的病毒,有严格的宿主特异性。鉴于噬菌体是自然存在的细菌的“猎杀者”,噬菌体成为治疗细菌感染的一种选择。

在早期具有代表性的一例工程噬菌体研究中, Lu 和 Collins<sup>[36]</sup> 通过改造本身就是大肠杆菌宿敌的 T7 噬菌体,使其能合成特定的酶来瓦解细菌生物被膜,进而杀死被保护在生物被膜中的细菌。他们成功构建了能够持续表达 DspB 蛋白的裂解性噬菌体 T7-DspB, DspB 蛋白是能够水解  $\beta$ -1, 6-N-乙酰基- $\alpha$ -葡萄糖酰胺的酶,而被水解的这一物质是生物被膜胞外聚合物重要的组成成分,即 DspB 能够破坏生物被膜的外部结构。改造后的工程噬菌体 T7-DspB 在消除生物被膜的过程中采取双管齐下的攻击策略,如图 3 所示,在 T7-DspB 噬菌体开始侵袭生物被膜时,不断地增殖和表达 DspB,随着宿主菌被裂解,新生代的 T7-DspB 噬菌体和 DspB 也被释放到生物被膜中,继续感染其他细菌,同时降解生物被膜。在 T7-DspB 噬菌体感染生物被膜体外实验测试中,生物被膜中的细菌数减少量达到 99.997%,杀菌效果是使用未改造的噬菌体感染生物被膜的约 4.5 倍。

Lu 课题组<sup>[37]</sup> 于 2019 年开发了一种高通量的筛选方法,能够迅速扩大噬菌体的宿主范围,减缓细菌耐药性的产生。他们通过自然进化和结构

建模,发现了 T3 噬菌体尾丝蛋白中的宿主范围决定区域 (host-range-determining regions, HRDRs),接着通过位点定向突变对这些区域进行高通量的筛选。受到抗体特异性工程的启发,这种方法探索出尾丝蛋白深层功能多样性的同时,最小化了对整体尾丝蛋白结构的影响,从而获得了合成的“噬菌体”。研究发现,高通量突变 HRDRs 筛选出的噬菌体具有广泛的宿主适用性,这些噬菌体还通过减缓细菌耐药性的出现,在体外试验中表现出长时间对细菌生长的抑制性,并在小鼠模型中展现出相同的抑菌效果。

虽然科学家们已经在利用工程噬菌体防治生物被膜中取得一系列进展,例如在工程噬菌体治疗单一或多菌株生物被膜<sup>[38, 39, 40, 41, 42]</sup>后,生物被膜有明显消散,然而由于生物被膜的复杂结构,体外体内环境的差异性等原因,完全瓦解病人体内的生物被膜依然是亟待解决的科学问题。工程噬菌体和其他抗菌药物的联合使用,是治疗细菌感染的另一种可选方案。

Ryan 等<sup>[43]</sup> 测试了联合使用 T4 噬菌体和头孢噻肟消除大肠杆菌菌株 ATCC11303 形成的生物被膜的效果。实验结果显示,使用  $10^6$  PFU $\cdot$ mL $^{-1}$  和  $10^7$  PFU $\cdot$ mL $^{-1}$  的噬菌体可将头孢噻肟治疗大肠杆菌生物被膜的最小生物被膜清除浓度分别再降低 2 倍和 8 倍,噬菌体和抗生素的联合使用优于单独使用

抗生素消除生物被膜的效果。比起单独使用抗生素治疗，噬菌体和抗生素联合使用的效果在其他菌株，如金色葡萄球菌<sup>[44]</sup>和克雷白氏肺炎杆菌<sup>[45]</sup>等菌株的生物被膜消除中，也有明显提升的效果。通过合成生物学改造后的噬菌体联合抗生素使用，在一些情况下会展示出更好的结果。诸如环丙沙星等抗生素会破坏细菌的DNA，给细胞带来氧化压力，致使细菌启动SOS响应的DNA修复系统<sup>[46]</sup>。Lu和Collins<sup>[47]</sup>通过改造M13噬菌体，使其能表达LexA3，而LexA3可以抑制细菌SOS应

激机制的开启，如图4所示。工程噬菌体M13-LexA3显著增强了三类抗生素的杀菌效果，他们分别是喹诺酮类、 $\beta$ -内酰胺类和氨基糖苷类抗生素。在体外试验中，工程噬菌体M13-LexA3和喹诺酮的联合使用杀死耐药菌的效率比单独使用喹诺酮时的杀菌效率，提升了约5000倍。在动物实验中，单独使用氧氟沙星治疗被大肠杆菌感染的小鼠，小鼠存活率仅为20%，而由工程噬菌体M13-LexA3和氧氟沙星联合治疗的感染小鼠，存活率达到了80%。



图4 利用工程噬菌体T7-DspB消除生物被膜的策略示意图<sup>[36]</sup>。

Fig. 4 Schematic of dispersing biofilm with engineered enzymatic bacteriophage<sup>[36]</sup>.

我国上海噬菌体与耐药研究所成立于2017年<sup>[48]</sup>，2018年初启动了国内首个伦理审批的噬菌体治疗临床试验，并于同年8月成功治愈了一例超级细菌感染患者。患者是一位膀胱肿瘤术后复杂性、反复性尿路感染者，2014年因全尿路内滋生了多重耐药的肺炎克雷伯菌，在左、右肾盂和膀胱3处中建立了感染。这几处的感染既有联系，又有差异，治疗难度相当大。治疗团队利用改造后可以识别并杀死肺炎克雷伯菌的噬菌体，确定了最终的噬菌体-抗生素联合治疗方案：肾盂造瘘后通过造瘘管进行噬菌体冲洗结合抗生素静滴治疗1周，而后停用抗生素并继续噬菌体治疗1周，之后全面停药，连续观察1个月。最终，患者泌尿系统的肺炎克雷伯菌被彻底杀灭，尿路刺激症状显著改善，明显提高了患者的生活质量。

#### 4.3 工程细菌在生物被膜治疗中的应用

随着合成生物学的发展，我们能够构建出具有不同功能的工程细菌，并且将这些“智能”细菌应用到临床治疗中<sup>[49]</sup>。细菌感染是临床上致病性和死亡率的重要因素之一，也引起了合成生物

学家极大的兴趣，结合不同菌株间的竞争和同种菌株之间的联系等机制，科学家们构建出了可以自动检测病原菌，并杀死病原菌的工程菌株。

例如，Chang等<sup>[50]</sup>在实验菌株大肠杆菌Top10中，设计并合成了一套包含群体感知、杀菌和裂解装置的系统，使得大肠杆菌能够感知并杀死临床分离的致病菌铜绿假单胞菌菌株Ln7。感知装置部分基于铜绿假单胞菌I型群体感知机制设计，如图5所示，启动子TetR持续表达转录因子LasR，LasR会与铜绿假单胞菌释放的群体感知信号分子酰基高丝氨酸内酯(AHLs)3OC<sub>12</sub>HSL结合，导致启动子LuxR被LasR-3OC<sub>12</sub>HSL复合物<sup>[51]</sup>结合开启，在感知装置中作诱导启动子；LuxR启动子进一步激活系统中的杀菌和裂解装置部分，这两部分分别产生绿脓菌素S5和大肠杆菌的裂解蛋白E7；当裂解蛋白浓度达到阈值时，大肠杆菌细胞膜破裂，释放出累积的绿脓菌素S5。绿脓菌素S5是可溶蛋白，会分散到目标致病菌中，可以破坏目标菌株结构的完整性，从而杀死细菌。实验结果显示，工程大肠菌株可以杀死溶液中90%的活细菌，并且可以抑制铜绿假单胞菌生物被膜的形成，抑制率接近90%。



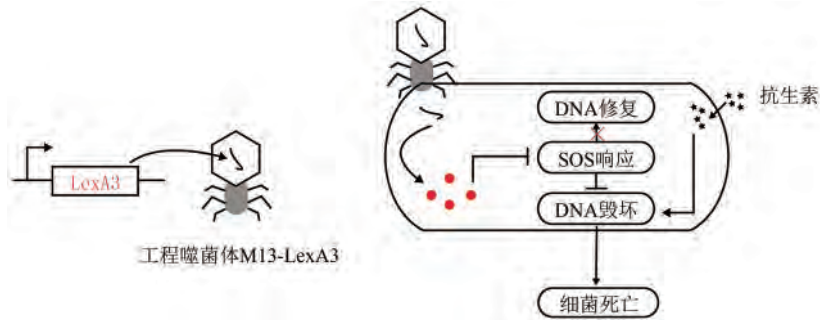


图5 利用工程噬菌体M13-LexA3增强抗生素对大肠杆菌EMG3菌株的杀菌效率示意图<sup>[47]</sup>。

Fig. 5 Schematic of combination therapy with engineered phage and antibiotics<sup>[47]</sup>.

在对抗生物被膜的研究中，本课题组<sup>[52]</sup>利用光遗传学技术优化了的含有蓝光感受器LOV结构域蛋白的光遗传学工具质粒pDawn<sup>[53]</sup>，并将之导入生物被膜模式细菌——铜绿假单胞菌的基因组，使铜绿假单胞菌在光照条件下适量表达功能性蛋白PA2133。PA2133是在铜绿假单胞菌基因组上的一段基因，它含有EAL结构域，能表达特定的磷酸二酯酶，从而水解环二鸟苷酸（cyclic diguanylate, c-di-GMP）。c-di-GMP<sup>[54]</sup>是细菌内广泛存在的一类重要的第二信使分子，调控细菌生物被膜的形成。这样构建出来的工程菌在光照条件下难以形成生物被膜，而在黑暗条件下形成的生物被膜通过光照，也会消散85%以上。

随着对人体体内微生物群的研究，益生菌也被选用为工程菌的基础菌株<sup>[55]</sup>，为控制感染提供新的思路。Chang等<sup>[56]</sup>对上述杀菌体系进行了升级，选用了益生菌菌株大肠杆菌Nissle 1917作为基础细菌进行改造，如图6所示，在原装置基础上添加了能够分解生物被膜胞外聚合物重要组成部分的酶DspB，并将承载合成基因回路的质粒，由抗生素识别标记改为了营养缺陷型识别标记，解决了水平基因转移带来的风险问题。这一工程益生菌在两种动物模型，秀丽隐杆线虫和小鼠模型中，对铜绿假单胞菌引起宿主的肠道感染都表现出了良好的预防和治疗作用。

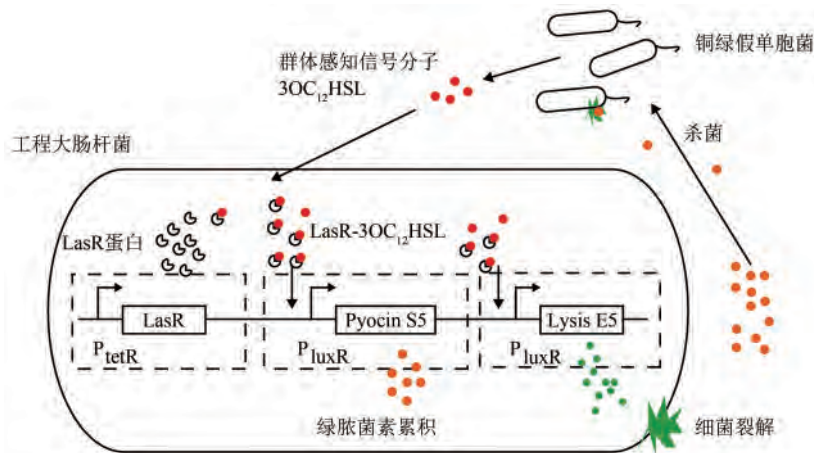


图6 感知并杀灭致病菌系统示意图<sup>[50]</sup>。

Fig. 6 Schematic of "pathogen sensing and killing" system<sup>[50]</sup>.

#### 4.4 CRISPR技术在细菌感染性疾病治疗中的应用

CRISPR系统是细菌在对抗入侵病毒和外来质粒DNA中演化出的防御机制，现在通过合成生物学技术的重新编程，可以用细菌自己的武器来对抗细菌病原体。研究人员成功地将CRISPR干扰

(CRISPR interference, CRISPRi)技术用于结核分枝杆菌感染模型，对目标基因进行有效的转录抑制，其作用机制涉及抑制细菌生长，改变其对小分子抑制剂的敏感性及破坏正常细胞形态。这是治疗多重耐药细菌的有利工具，因为尽管结核病早已可以治愈，但它仍然在低收入发展中国家死



亡原因排名前十，并且每年造成全球约170万人死亡<sup>[57-59]</sup>。

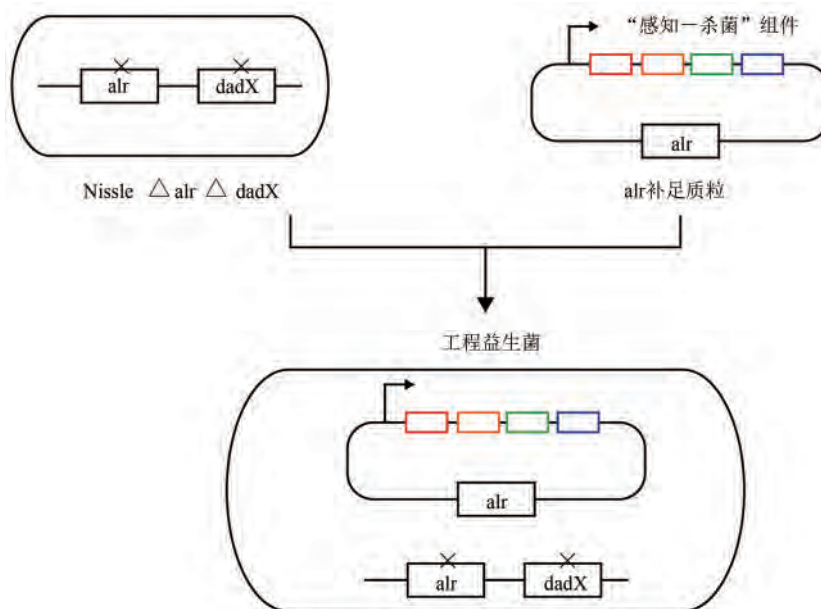


图7 治疗铜绿假单胞菌的工程益生菌大肠杆菌Nissle菌株示意图<sup>[56]</sup>。

Fig. 7 Schematic of engineered probiotic *E. coli* Nissle strain for eliminating and preventing *P. aeruginosa*.<sup>[56]</sup>

科学家们还发现CRISPR系统参与到病原体细菌如弗朗西丝氏菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌等的致病过程中，辅助破坏宿主的免疫系统或涉及细菌耐药性的产生等。这些发现使我们对CRISPR系统作为细菌生理调节功能有了新的认识，进一步研究某些细菌病原体的CRISPR系统的作用，可以让我们更详细地了解其毒性及致病机理，这可能为致病干预或治疗提供新的策略。

## 5 合成生物学在病毒感染性疾病治疗中的应用

合成生物学在病毒感染性疾病治疗中的应用，主要集中在对病毒感染性疾病致病机理的研究和基于CRISPR技术的治疗方案。

### 5.1 合成生物学在病毒感染性疾病致病机理研究中的应用

合成生物学的出现为研究病毒致病机理提供了一种新的视角。随着科学家们能够以更快的速度合成和装配病毒基因组<sup>[60]</sup>的序列，大大提高了

我们对宿主-病原体相互作用和疾病机理的认知。合成生物学的原理之一“合成分析”<sup>[61]</sup>，即通过将单个遗传组分的快速合成、装配、重组和突变与直接的功能分析结合起来，为病毒病理学致病机制的理解提供了一种新的思路。在研究病毒感染性疾病时，合成生物学家们通过重构致病病毒基因组，来研究其致病机理。例如，利用从冷冻保存的组织样品中提取的基因片段的序列信息合成H1N1病毒的基因组，H1N1病毒曾造成全球5 000万以上的人死亡。科学家们通过对重构病毒进行对基因的功能性分析，挖掘出了两种H1N1病毒致病性的主要毒力因子：一种可以在不激活胰蛋白酶情况下诱导膜融合的血凝素变体和一种可以增强病毒复制能力的改良聚合酶<sup>[60]</sup>。研究还揭示了西班牙流感病毒的超强毒性与8种基因的联合作用有关<sup>[60, 62]</sup>。这些研究可以帮助人们确定未来病毒变种的毒力分析和潜在威胁<sup>[63, 64]</sup>。

针对嵌合病毒的合成和分析对我们认识造成2002—2003年严重急性呼吸综合症(severe acute respiratory syndrome, SARS)的冠状病毒<sup>[65]</sup>做出了重大贡献。因为SARS冠状病毒的直系祖先不能在实验室模式动物中传播，所以对SARS冠状病毒发展进程的特征，尤其是对其宿主趋向性改变的

表征, 变得极具挑战性。为此, 科学家们设计并合成了一个 30 kb 包含了与人类同源的受体结合刺突蛋白的类 SARS 蝙蝠冠状病毒<sup>[66]</sup>, 这一合成的嵌合病毒能够在培养基中复制并感染小鼠。刺突蛋白是 SARS 冠状病毒表面最重要的膜蛋白, 承担了病毒与宿主细胞受体结合并担负膜融合功能, 是各种冠状病毒诱导免疫反应的主要抗原。通过动物实验, 确认了刺突蛋白是造成人畜共患冠状病毒宿主趋向性改变的主要因子之一, 并且揭露了具有更强感染力的刺突蛋白突变体病毒株。

另外, DNA 合成重建病原体还可用于生产诊断性高密度抗原组<sup>[67, 68]</sup>, 如用于分析后莱姆病综合征或对丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus, HCV) 和艾滋病病毒 (Human Immunodeficiency Virus, HIV)<sup>[69]</sup> 有体液免疫反应的抗原组。

## 5.2 CRISPR 技术在病毒感染性疾病治疗中的应用

病毒由一个核酸分子与蛋白质构成, 利用宿主的细胞系统进行自我复制, 无法独立生长和复制。一些致病性病毒, 如 HIV, 乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus, HBV) 可以在人体内长时间存在, 并且依然保持感染性且不受宿主免疫系统的影响, 造成病毒持续感染 (viral persistence)。近年来, CRISPR 技术在体外或动物模型中被用于减少或消除持续性病毒感染, 为潜伏性和慢性病毒感染的治疗带来了新的希望。

HIV 是造成人类免疫系统缺陷的一种病毒, 通过直接侵犯人体的免疫系统, 破坏细胞免疫和体液免疫, 不仅使人体难以抵御病原体侵害, 而且给特效治疗药物和疫苗的研制带来了困难。目前, 感染了 HIV 的病人主要依靠各种抗病毒药物进行治疗。但是, 这种疗法并不能完全治愈病人, 需要终身服药。HIV-1 是艾滋病病毒最常见和最致病的毒株。消灭 HIV-1 需要清除受感染细胞和组织中发生整合反应的前病毒 DNA。研究人员开发了一种联合疗法, 靶向一群受感染小鼠体内的 HIV<sup>[70]</sup>。该疗法使用一种持续的药物递送系统和基于 CRISPR-Cas9 的基因编辑技术, 前者会持续多天缓慢释放药物并抑制病毒活性, 后者则会通过切断相关的 DNA 片段, 消除被感染细胞中的病毒遗传

密码。经过连续的治疗, 研究团队使用解巢式 PCR (nested PCR)、微滴式数字 PCR (digital-droplet PCR) 及 RNAscope 技术, 发现在接受治疗后的 5 周内, 已经无法在小鼠的血液、淋巴组织、骨髓及大脑中检测到 HIV。这一试验结果有很大的发展前景, 研究人员计划将在此基础上开展进一步的研究, 改进针对病毒的药物递送, 特异性地消除潜伏的病毒感染。

通常情况下, CCR5 基因编码白细胞上的一种受体, HIV 病毒主要通过该受体进入细胞。如果个体携带两个 CCR5 突变拷贝, 那么 HIV 病毒株无法进入细胞。但这种抗 HIV 基因特别罕见: 仅 1% 的欧洲血统人口携带。我国北京大学邓宏魁教授、307 医院陈虎教授以及北京佑安医院吴昊教授研究组<sup>[71]</sup> 合作, 报道了首例利用 CRISPR-Cas9 在造血干细胞和祖细胞 (hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs) 中编辑 CCR5 基因并成功移植到罹患 HIV 和急性淋巴细胞白血病的患者案例, 移植治疗使病人的急性淋巴白血病得到完全缓解, 携带 CCR5 突变的供体细胞能够在受体体内长期存活达 19 个月, 且未引起明显的副作用, 但细胞数量较少, 对抵制 HIV 感染效果欠佳, 需进一步研究。这项临床研究初步探索了 CRISPR 的可行性和安全性。

截至 2019 年, 病毒性肝炎仍是全球和中国主要的公共卫生问题之一, 其中乙肝和丙肝影响到全球 3.25 亿人, 每年导致约 140 万人死亡。据统计, 我国乙肝病毒感染者约 8 600 万人, 丙肝感染者约 1 000 万人, 每年约 33 万人死于乙肝或丙肝感染导致的肝硬化和原发性肝癌。尽管针对 HBV 研制的有效预防性疫苗已经投入使用几十年, 但 HBV 仍然是当今全球十大死因之一, 这是由于目前的治疗药物无法清除或使 HBV 在肝细胞核内稳定存在的闭合共价环状 DNA (cccDNA) 完全失活, 在停止治疗或出现耐药性突变毒株后, HBV 可以继续以 cccDNA 为模板, 产生子代病毒, 重新活化。由此, 研究人员利用 CRISPR/Cas9 系统, 对受到感染的哺乳动物肝细胞进行基因组编辑。Chen 等<sup>[72]</sup> 设计了 8 种针对 HBV 基因型 A 的 gRNA, 在转染 HBV 质粒的 Huh7 细胞模型中鉴定出了 2 个有效的 gRNA, 并在水流动力学注射 HBV

质粒的小鼠模型种进一步证明了CRISPR/Cas9系统可以切割肝内含有HBV基因组的质粒,降低小鼠血清中HBV表面抗原水平。另一方面,CRISPR/Cas9系统也被用于对HCV的抑制中。Weiss和Grakoui等<sup>[73]</sup>通过重新编辑弗朗西丝菌Cas9蛋白,可以靶向HCV病毒,抑制HCV在人类细胞中的复制。

## 6 合成生物学在感染性疾病预防中的应用

合成生物学不仅参与感染性疾病的治疗、感染性疾病致病机理和传播机制的研究,同时在预防感染性疾病方面也取得了一些进展<sup>[64, 74, 75, 76]</sup>。

### 6.1 工程细菌在感染性疾病预防中的应用

细菌之间可以通过化学物质联系,像我们熟知的群体感知<sup>[77]</sup>。单细菌产生和分泌信号分子,这些信号分子是多种细菌共有的,或者是种特异性的。这些分子随着细菌种群的增长而积累,并能与受体结合,从而协调整个菌落范围内的基因表达或操纵其他细菌种群的行为。由此,我们除了利用工程菌结合细菌间的竞争生存机制治疗感染性疾病,也可以利用其来预防感染性疾病。霍乱弧菌产生的霍乱自动诱导因子1(CAI-1)和自动诱导因子2(AI-2),是关键毒力因子的抑制开关。March等<sup>[78]</sup>构建了一种工程益生大肠杆菌,这些菌株本身可以生产AI-2,在改造后可以持续合成CAI-1;给被霍乱弧菌感染的小鼠喂食这种工程益生菌可以显著提升小鼠的存活率。这种方法可能成为预防感染性疾病的一种经济型的策略。与抗生素不同,基于群体感知的干预并不杀死病原体,而是重塑它们的行为,这种策略因为没有选择压力的存在,不易使病原体产生抗性。

### 6.2 合成生物学在疫苗研发中的应用

免疫接种对于控制感染性疾病,保护人类和动物健康是一个非常有效的手段。合成生物学的出现对疫苗的研发有了新的突破,出现了多种不

同的研究策略,为更加理性的设计更多安全性高且易于接种的疫苗提供了新的思路。

#### 6.2.1 人工病毒在减毒疫苗构建中的应用

利用合成生物学原理,从遗传组分中进行全基因组的高通量、高精度组装和合成,为设计用作疫苗的减毒病原体提供了新的方法。例如,对高剂量选择性表达特定基孔肯雅病毒(CHIKV)结构蛋白而产生的类病毒颗粒产生免疫的灵长类动物,可以抵抗病毒血症;即使是用猴源抗体治疗的免疫缺陷小鼠也能在随后的致死剂量的CHIKV感染中存活下来<sup>[79]</sup>。

此外,DNA合成和组装也在开发针对脊髓灰质炎病毒<sup>[80]</sup>的安全活疫苗方面发挥了重要作用。脊髓灰质炎病毒可以通过病毒衣壳基因中相邻密码子对从高到低表达的系统基因逐级变化而减弱,例如,与GCA|GAG相比,GCC|GAA的表达量明显不足,尽管两者都编码Ala-Glu。这些变化降低了病毒的转译量,削弱了病毒的复制能力和传染性。这种毒性减弱的脊髓灰质炎病毒给小鼠提供了保护性免疫,并且具有一个较高的安全标准,因为所有631个基因组个体变化发生逆转并重构成感染性野生型病毒的可能性很低。这种基因组工程方法可以代表针对感染性疾病设计活疫苗的一般策略。其他有潜力的疫苗接种例子有,使用抗原产生免疫刺激脂质体<sup>[81]</sup>作为基因可编程的合成疫苗和生产热稳定的口服型的基于藻类的疫苗,用于抵抗金黄色葡萄球菌感染<sup>[82]</sup>。

我国北京大学周德敏教授课题组<sup>[83]</sup>通过合成生物学方法构建减毒活疫苗,开发了被称为“合成减毒病毒工程技术”的新策略。他们利用终止密码子可以识别非天然氨基酸的原理,将病毒复制基因的部分编码密码子突变成终止密码子,使其在感染人体细胞后,不能进行完整的蛋白质翻译,从而获得了甲型流感病毒的活病毒疫苗。所获得的病毒疫苗具有安全性和有效性。进一步突变3个以上三联密码子,使病毒由预防性疫苗变为治疗病毒感染的药物,且其药效随着三联密码子数目的增加而增强。与依赖于少数的几个氨基酸突变所获得的传统减毒活病毒相比较,合成减毒病毒的减毒效果来源于多达几百处的密码子变化所产生的累积效应,回复突变的风险极低,大大



提高了疫苗的安全性。

我国中国科学院武汉病毒研究所郑振华研究团队<sup>[84]</sup>成功利用合成减毒病毒工程技术研制出了新型的ZIKV减毒疫苗,小鼠在单次免疫刺激后就可以产生高滴度中和抗体,获得完全的攻毒保护,并且可以阻止ZIKV通过母体垂直传播给子代。弱毒疫苗的基因组中引入了2 568个同义突变,因此几乎不可能回复突变到野生型病毒。

### 6.2.2 人工细菌在减毒疫苗构建中的应用

人工减毒细菌不仅可以作为疫苗,还被证实是理想的疫苗载体。以口服方式进行免疫接种,细菌在体内可以有限增殖,一次免疫即可提供保护。细菌载体在增殖过程中能够表达多种免疫原性物质,诱导产生黏膜免疫应答,大约90%的人类和动物传染病病原体感染是起始于黏膜表面的。此外,人工减毒细菌还能表达单一的或多重抗原,从而对一种或几种病原体的感染提供保护。现已知沙门氏菌<sup>[85]</sup>、李斯特菌<sup>[86]</sup>等细菌常选被作为疫苗或疫苗载体的基础菌种。

减毒的沙门氏菌活株具有作为疫苗载体的巨大潜力,沙门氏菌基于III型分泌系统(T3SS)的跨膜通道可以用来释放跟其III型毒性因子融合的外源蛋白。Hensel等<sup>[87]</sup>研究了沙门氏菌致病性毒力岛编码的T3SS的各种效应蛋白对模型抗原的传递和免疫应答的诱导作用。这些效应蛋白SifA、SteC、SseL、SseJ和SseF跨膜后有同一个内体膜相关的亚细胞定位信息,所有效应蛋白都可以与模型抗原卵清蛋白和李斯特菌溶蛋白一起转移到宿主细胞的胞浆中。在体外试验中,SseJ和SteC融合蛋白对T细胞的刺激反应表现优于SseF融合蛋白;而在接种了沙门氏菌载体菌株的小鼠中,只有基于SseJ或SifA的融合蛋白才能引发有效的T细胞反应。由此,T3SS介导的抗原传递,选择最优的效应蛋白应是合理设计有效的沙门氏菌疫苗的关键。

### 6.2.3 酵母改造在新型疫苗构建中的应用

酵母如酿酒酵母,毕赤酵母等,因其具有完整的基因组序列信息、稳定的遗传性、易于培养和非致病性,已经成为人类公共卫生或农场畜牧业疫苗开发的理想模型系统。酿酒酵母和毕赤酵母经常用于表达具有治疗感染性疾病作用的外源

蛋白。如重组酵母乙肝疫苗<sup>[88]</sup>是一种乙肝表面抗原亚单位疫苗,它是采用转基因的方法将乙肝病毒表达表面抗原的基因进行质粒构建,转入进入酿酒酵母中,通过培养这种重组酵母菌来表达乙肝表面抗原亚单位,具有原料易得、产量大、安全、高效等特点。重组芽殖酵母<sup>[89]</sup>可以在小鼠肠道中分泌蛋白质或肽,为开发口服疫苗开辟了道路。针对病毒感染性疾病,基于酵母制备的疫苗研究还涉及针对HPV<sup>[90]</sup>、HCV<sup>[91]</sup>、肠道病毒<sup>[92]</sup>、DENV<sup>[93]</sup>、甲型流感病毒H1N1<sup>[94]</sup>等病毒病原体。针对细菌感染性疾病,基于酵母制备的疫苗研究涉及炭疽杆菌<sup>[95]</sup>、结核分枝杆菌<sup>[96]</sup>、李斯特菌<sup>[97]</sup>等细菌病原体。

## 6.3 合成生物学通过改造感染源限制疾病的传播

感染性疾病具有感染源,他们是病原体自然生存、繁殖并排出的宿主或场所。感染源的种类包括患者、病原体携带者、动物及某些场所的物品。昆虫是动物传染源中常见的感染源之一,科学家们利用带有条件显性致死合成回路的转基因病毒株抑制昆虫病媒种群,可能控制疟疾寄生虫和登革病毒的传播,并可能最终控制无法治疗的疾病的传播。Fu等<sup>[98-100]</sup>改造了这种转基因的蚊子,蚊子体内含依赖四环素的反激活因子(tTA),这种基因只在雌蚊子的间接飞行肌中表达,并且只有在抑制这种基因转录,即四环素存在的情况下才能繁殖。而四环素的缺失造成一种特异性的雌性不能飞行表型的形成。将这种转基因蚊子的卵投放到生态系统中,只有雄性蚊子会释放到环境中;雌性蚊子仍然滞留在地面,不能进食、交配或吸血,这实际上是一种致命的表型。雄性蚊子不会传播这种疾病,但它们会将这种合成回路传播到原住民,即野生型蚊子种群中。

利用第一代tTA转基因蚊子进行释放携带显性致死基因昆虫技术的野外测试早已在大开曼岛开展起来。首先,小规模投放一群转基因雄蚊证实其可以存活,与野生雌蚊交配并且产生转基因幼虫,接着大范围的试验结果显示,投放转基因雄蚊约11周后,野生蚊子的数量减少了80%。然而由于研究地点不是隔离的,且周围地区有高密度

的野生型蚊子，因此实际的抑制效率仍然极具挑战性<sup>[75, 101]</sup>。

类似的研究比如利用一个合成的基于归巢核酸内切酶的基因驱动系统传播改造的基因，将疟疾抗性基因从工程改造的蚊子传递给野外蚊子种群<sup>[102]</sup>。归巢内切酶通常在宿主基因组中产生一个单序列特异性双链断裂，然后以归巢内切酶基因(*HEG*)为模板进行同源重组修复。如此，自私的基因*HEG*在被称为“归巢”的基因转换过程中被复制到断裂的染色体上。在雄性种系启动子的控制下表达*HEG I-SceI*，可以使纯合子雄蚊高效归巢并快速产生遗传驱动，从而导致了被捕获的蚊种群的*HEG*入侵。通过工程化其他*HEG*的序列特异性，例如，*I-AniI*或*I-CreI*，利用基因驱动的概念，原则上可以用于敲入或敲除针对蚊子作为感染性疾病传染源能力的基因功能。

我国中国科学院上海植物生理生态研究所联合约翰霍普金斯大学彭博公共卫生学院<sup>[103]</sup>，发现了一种能在按蚊中进行持续跨代传播的沙雷氏菌属(*Serratia*)新菌株AS1，并成功地人工构建出能同时分泌表达5个抗疟疾基因的菌株，能够有效减少92%~93%的疟疾原虫卵囊。通过高效驱动抗疟疾效应分子快速散播到整个蚊群中，能够使按蚊成为无效的疟疾媒介，实现从源头上阻断疟疾传播。

## 7 总结与展望

在人类与感染性疾病抗争的漫长岁月里，随着抗病原体药物的广泛大量使用，病原体耐药性的出现和耐药率的不断增高正成为全球人类热点关注的问题。病原体的耐药性不仅降低抗病原体药物的有效率，也严重威胁人类健康。合成生物学的出现为研究感染性疾病的机理、治疗及预防提供了新的思路，并已取得了阶段性的成果。

合成生物学不仅在感染性疾病治疗方面颇有应用，在治疗癌症、代谢系统疾病、再生医学等方面也有相当的应用。然而，要将以合成生物学为基础的生物医学疗法，真正应用到临床治疗中，我们仍然还有很长的路要走。合成生物学疗法临床化最重要的挑战之一是如果将合成的治疗回路

或装置或有机体植入患者的特定细胞，要确保不会干扰人体的新陈代谢。同时，以合成生物学为基础的治疗方案的临床应用，与所有以基因和细胞为基础的治疗，都将面临相同的科学、伦理和法律问题，但由于合成生物学疗法提供更复杂的控制动力学，因此有望产生更高的治疗效果。虽然目前合成生物学疗法还处在试验阶段，还没有由合成生物学家开创的合成生物设备、人工基因网络或相关的产品用于临床治疗，但是合成生物学凭借自身优势，必将在21世纪生物医学发展中扮演重要角色。

## 参 考 文 献

- [1] MARNER W D. Practical application of synthetic biology principles [J]. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 2009, 4(10): 1406-1419.
- [2] LARTIGUE C, VASHEE S, ALGIRE M A, et al. Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast [J]. *Science*, 2009, 325(5948): 1693-1696.
- [3] QUAN J, SAAEM I, TANG N, et al. Parallel on-chip gene synthesis and application to optimization of protein expression [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(5): 449.
- [4] KOSURI S, EROSHENKO N, LEPROUST E M, et al. Scalable gene synthesis by selective amplification of DNA pools from high-fidelity microchips [J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(12): 1295.
- [5] NANDAGOPAL N, ELOWITZ M B. Synthetic biology: integrated gene circuits [J]. *Science*, 2011, 333(6047): 1244-1248.
- [6] TIGGES M, FUSSENEGGER M. Recent advances in mammalian synthetic biology-design of synthetic transgene control networks [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, 20(4): 449-460.
- [7] WEBER W, FUSSENEGGER M. Synthetic gene networks in mammalian cells [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(5): 690-696.
- [8] WIN M N, LIANG J C, SMOLKE C D. Frameworks for programming biological function through RNA parts and devices [J]. *Chemistry & Biology*, 2009, 16(3): 298-310.
- [9] BENENSON Y. RNA-based computation in live cells [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, 20(4): 471-478.
- [10] CANTON B, LABNO A, ENDY D. Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices [J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(7): 787-793.

- [11] HOOSHANGI S, THIBERGE S, WEISS R. Ultrasensitivity and noise propagation in a synthetic transcriptional cascade [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(10): 3581-3586.
- [12] KRAMER B P, FISCHER M, FUSSENEGGER M. Semi-synthetic mammalian gene regulatory networks [J]. *Metabolic Engineering*, 2005, 7(4): 241-250.
- [13] GARDNER T S, CANTOR C R, COLLINS J J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli* [J]. *Nature*, 2000, 403(6767): 339-342.
- [14] KRAMER B P, VIRETTA A U, DAOUD-EL BABA M, et al. An engineered epigenetic transgene switch in mammalian cells [J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(7): 867-870.
- [15] DANINO T, MONDRAGÓN-PALOMINO O, TSIMRING L, et al. A synchronized quorum of genetic clocks [J]. *Nature*, 2010, 463(7279): 326-330.
- [16] RUDER W C, LU T, COLLINS J J. Synthetic biology moving into the clinic [J]. *Science*, 2011, 333(6047): 1248-1252.
- [17] MAY M. Synthetic biology's clinical applications [J]. *Science*, 2015, 349(6255): 1564-1566.
- [18] ANDERSON R M, ANDERSON B, MAY R M. Infectious diseases of humans: dynamics and control [M]. Oxford: University Press, 1992.
- [19] KEELING M J, ROHANI P. Modeling infectious diseases in humans and animals [M]. Princeton: University Press, 2011.
- [20] KOLLEF M H, SHERMAN G, WARD S, et al. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients [J]. *Chest*, 1999, 115(2): 462-474.
- [21] PARDEE K, GREEN A A, TAKAHASHI M K, et al. Rapid, low-cost detection of Zika virus using programmable biomolecular components [J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1255-1266.
- [22] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector [J]. *Science*, 2016, 353(6299): AAF5573.
- [23] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442.
- [24] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, KELLNER M J, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 439-444.
- [25] ENGLISH M A, SOENKSEN L R, GAYET R V, et al. Programmable CRISPR-responsive smart materials [J]. *Science*, 2019, 365(6455): 780-785.
- [26] FREIJE C A, MYHRVOLD C, BOEHM C K, et al. Programmable inhibition and detection of RNA viruses using Cas13 [J]. *Molecular Cell*, 2019, 76(5): 826-837, E11.
- [27] CHEN J S, MA E, HARRINGTON L B, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity [J]. *Science*, 2018, 360(6387): 436-439.
- [28] LI S Y, CHENG Q X, LIU J K, et al. CRISPR-Cas12a has both cis- and trans-cleavage activities on single-stranded DNA [J]. *Cell Research*, 2018, 28(4): 491-493.
- [29] LI S Y, CHENG Q X, WANG J M, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection [J]. *Cell Discovery*, 2018, 4(1): 20.
- [30] MALEK A, RAAD I. Catheter- and device-related infections in critically ill cancer patients [M]. Berlin: Springer 2020: 1401-1417.
- [31] HØIBY N, CIOFU O, JOHANSEN H K, et al. The clinical impact of bacterial biofilms [J]. *International Journal of Oral Science*, 2011, 3(2): 55-65.
- [32] FLEMMING H C, WINGENDER J. The biofilm matrix [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(9): 623-633.
- [33] DONLAN R M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2001, 33(8): 1387-1392.
- [34] STEWART P S, COSTERTON J W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms [J]. *The Lancet*, 2001, 358(9276): 135-138.
- [35] CHUA S L, LIU Y, YAM J K H, et al. Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles [J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 4462.
- [36] LU T K, COLLINS J J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(27): 11197-11202.
- [37] YEHL K, LEMIRE S, YANG A C, et al. Engineering phage host-range and suppressing bacterial resistance through phage tail fiber mutagenesis [J]. *Cell*, 2019, 179(2): 459-469, E9.
- [38] FU W, FORSTER T, MAYER O, et al. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(1): 397-404.
- [39] ALVES D, GAUDION A, BEAN J, et al. Combined use of bacteriophage K and a novel bacteriophage to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(21): 6694-6703.
- [40] GUTIÉRREZ D, VANDENHEUVEL D, MARTÍNEZ B, et al. Two phages, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, lyse mono- and dual-species staphylococcal biofilms [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(10): 3336-3348.
- [41] LEHMAN S M, DONLAN R M. Bacteriophage-mediated control of a two-species biofilm formed by microorganisms causing catheter-associated urinary tract infections in an in vitro urinary catheter model [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(2): 1127-1137.
- [42] ALVES D R, PEREZ-ESTEBAN P, KOT W, et al. A novel



- bacteriophage cocktail reduces and disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under static and flow conditions [J]. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(1): 61-74.
- [43] RYAN E M, ALKAWAREEK M Y, DONNELLY R F, et al. Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms in vitro [J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2012, 65(2): 395-398.
- [44] RAHMAN M, KIM S, KIM S M, et al. Characterization of induced *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-26 and its anti-biofilm activity with rifampicin [J]. *Biofouling*, 2011, 27(10): 1087-1093.
- [45] BEDI M S, VERMA V, CHHIBBER S. Amoxicillin and specific bacteriophage can be used together for eradication of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(7): 1145.
- [46] KOHANSKI M A, DWYER D J, HAYETE B, et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics [J]. *Cell*, 2007, 130(5): 797-810.
- [47] LU T K, COLLINS J J. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(12): 4629-4634.
- [48] 吴楠楠, 朱同玉. 噬菌体在实体器官移植中的应用 [J]. *器官移植*, 2019(4): 410-415.
- WU N N, ZHU T Y. Application of phage in solid organ transplantation, 2019(4): 410-415.
- [49] RIGLAR D T, SILVER P A. Engineering bacteria for diagnostic and therapeutic applications [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(4): 214-225.
- [50] SAEIDI N, WONG C K, LO T M, et al. Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen [J]. *Molecular Systems Biology*, 2011, 7(1):
- [51] GRAY K M, PASSADOR L, IGLEWSKI B H, et al. Interchangeability and specificity of components from the quorum-sensing regulatory systems of *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(10): 3076-3080.
- [52] PU L, YANG S, XIA A, et al. Optogenetics manipulation enables prevention of biofilm formation of engineered *Pseudomonas aeruginosa* on surfaces [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(1): 200-208.
- [53] OHLENDORF R, VIDAUSKI R R, ELDAR A, et al. From dusk till dawn: one-plasmid systems for light-regulated gene expression [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2012, 416(4): 534-542.
- [54] COTTER P A, STIBITZ S. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2007, 10(1): 17-23.
- [55] CHUA K J, KWOK W C, AGGARWAL N, et al. Designer probiotics for the prevention and treatment of human diseases [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2017, 40:8-16.
- [56] HWANG I Y, KOH E, WONG A, et al. Engineered probiotic *Escherichia coli* can eliminate and prevent *Pseudomonas aeruginosa* gut infection in animal models [J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 15028.
- [57] CHOUDHARY E, THAKUR P, PAREEK M, et al. Gene silencing by CRISPR interference in mycobacteria [J]. *Nature Communications*, 2015, 6(1): 6267.
- [58] SINGH A K, CARETTE X, POTLURI L P, et al. Investigating essential gene function in *Mycobacterium tuberculosis* using an efficient CRISPR interference system [J]. *Nucleic acids research*, 2016, 44(18): E143.
- [59] YU W Y, WANG Y X, MEI J Z, et al. Overview of tuberculosis [M]. *BerLin: Springer*, 2020: 1-10.
- [60] TUMPEY T M, BASLER C F, AGUILAR P V, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus [J]. *Science*, 2005, 310(5745): 77-80.
- [61] WEBER W, FUSSENEGGER M. Emerging biomedical applications of synthetic biology [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13(1): 21-35.
- [62] TUMPEY T M, MAINES T R, VAN HOEVEN N, et al. A two-amino acid change in the hemagglutinin of the 1918 influenza virus abolishes transmission [J]. *Science*, 2007, 315(5812): 655-659.
- [63] SMITH G J, VIJAYKRISHNA D, BAHL J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic [J]. *Nature*, 2009, 459(7250): 1122-1125.
- [64] WIMMER E, MUELLER S, TUMPEY T M, et al. Synthetic viruses: a new opportunity to understand and prevent viral disease [J]. *Nature Biotechnology*, 2009, 27(12): 1163.
- [65] PERLMAN S, NETLAND J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis [J]. *Nature reviews microbiology*, 2009, 7(6): 439-450.
- [66] BECKER M M, GRAHAM R L, DONALDSON E F, et al. Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(50): 19944-19999.
- [67] BURBELO P D, CHING K H, BUSH E R, et al. Antibody-profiling technologies for studying humoral responses to infectious agents [J]. *Expert Review of Vaccines*, 2010, 9(6): 567-578.
- [68] CHANDRA A, WORMSER G P, MARQUES A R, et al. Anti-*Borrelia burgdorferi* antibody profile in post-Lyme disease syndrome [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(5): 767-771.
- [69] BURBELO P D, BREN K E, CHING K H, et al. LIPS arrays for simultaneous detection of antibodies against partial and whole proteomes of HCV, HIV and EBV [J]. *Molecular BioSystems*, 2011, 7(5): 1453-1462.
- [70] DASH P K, KAMINSKI R, BELLA R, et al. Sequential LASER ART and CRISPR treatments eliminate HIV-1 in a subset of infected hu-

- manized mice [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 2753.
- [71] XU L, WANG J, LIU Y, et al. CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia [J]. *New England Journal of Medicine*, 2019, 381(13): 1240-1247.
- [72] LIN S R, YANG H C, KUO Y T, et al. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates *in vivo* [J]. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2014, 3:E186.
- [73] PRICE A A, SAMPSON T R, RATNER H K, et al. Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(19): 6164-6169.
- [74] KINDSMÜLLER K, WAGNER R. Synthetic biology: impact on the design of innovative vaccines [J]. *Human Vaccines*, 2011, 7(6): 658-662.
- [75] SUBBARAMAN N. Science snipes at Oxitec transgenic-mosquito trial [M]. Kondon: Nature Publishing Group, 2011.
- [76] PEDROLLO D B, RIBEIRO N V, SQUIZATO P N, et al. Engineering microbial living therapeutics: the synthetic biology toolbox [J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(1): 100-115.
- [77] MILLER M B, BASSLER B L. Quorum sensing in bacteria [J]. *Annual Reviews in Microbiology*, 2001, 55(1): 165-199.
- [78] DUAN F, MARCH J C. Engineered bacterial communication prevents *Vibrio cholerae* virulence in an infant mouse model [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(25): 11260-11264.
- [79] AKAHATA W, YANG Z-Y, ANDERSEN H, et al. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection [J]. *Nature Medicine*, 2010, 16(3): 334.
- [80] COLEMAN J R, PAPAMICHAIL D, SKIENA S, et al. Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias [J]. *Science*, 2008, 320(5884): 1784-1787.
- [81] AMIDI M, DE RAAD M, DE GRAAUW H, et al. Optimization and quantification of protein synthesis inside liposomes [J]. *Journal of Liposome Research*, 2010, 20(1): 73-83.
- [82] DREESEN I A, CHARPIN-EL HAMRI G, FUSSENEGGER M. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection [J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 145(3): 273-280.
- [83] SI L, XU H, ZHOU X, et al. Generation of influenza A viruses as live but replication-incompetent virus vaccines [J]. *Science*, 2016, 354(6316): 1170-1173.
- [84] LI P, KE X, WANG T, et al. Zika Virus attenuation by codon pair deoptimization induces sterilizing immunity in mouse models [J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(17): E00701-E00718.
- [85] WANG L, WANG X, BI K, et al. Oral vaccination with attenuated salmonella typhimurium-delivered TsPmy DNA vaccine elicits protective immunity against *trichinella spiralis* in BALB/c Mice [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 10(9): E0004952.
- [86] STARKS H, BRUHN K W, SHEN H, et al. *Listeria monocytogenes* as a vaccine vector: virulence attenuation or existing antivector immunity does not diminish therapeutic efficacy [J]. *The Journal of Immunology*, 2004, 173(1): 420-427.
- [87] HEGAZY W A H, XU X, METELITSA L, et al. Evaluation of *Salmonella enterica* Type III secretion system effector proteins as carriers for heterologous vaccine antigens [J]. *Infection and Immunity*, 2012, 80(3): 1193-1202.
- [88] VALENZUELA P, MEDINA A, RUTTER W J, et al. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast [J]. *Nature*, 1982, 298(5872): 347-350.
- [89] BLANQUET S, ANTONELLI R, LAFORET L, et al. Living recombinant *Saccharomyces cerevisiae* secreting proteins or peptides as a new drug delivery system in the gut [J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 110(1): 37-49.
- [90] KWAG H-L, KIM H J, CHANG D Y, et al. The production and immunogenicity of human papillomavirus type 58 virus-like particles produced in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Microbiology*, 2012, 50(5): 813-820.
- [91] HALLER A A, LAUER G M, KING T H, et al. Whole recombinant yeast-based immunotherapy induces potent T cell responses targeting HCV NS3 and Core proteins [J]. *Vaccine*, 2007, 25(8): 1452-1463.
- [92] WANG X, XIAO X, ZHAO M, et al. EV71 virus-like particles produced by co-expression of capsid proteins in yeast cells elicit humoral protective response against EV71 lethal challenge [J]. *BMC Research Notes*, 2016, 9(1): 42.
- [93] RAMASAMY V, ARORA U, SHUKLA R, et al. A tetravalent virus-like particle vaccine designed to display domain III of dengue envelope proteins induces multi-serotype neutralizing antibodies in mice and macaques which confer protection against antibody dependent enhancement in AG129 mice [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018, 12(1): E0006191.
- [94] ATHMARAM T N, SARASWAT S, SANTHOSH S R, et al. Yeast expressed recombinant Hemagglutinin protein of novel H1N1 elicits neutralising antibodies in rabbits and mice [J]. *Virology Journal*, 2011, 8(1): 524.
- [95] HEPLER R W, KELLY R, MCNEELY T B, et al. A recombinant 63-kDa form of *Bacillus anthracis* protective antigen produced in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* provides protection in rabbit and primate inhalational challenge models of anthrax infection [J]. *Vaccine*, 2006, 24(10): 1501-1514.
- [96] KING T H, SHANLEY C A, GUO Z, et al. GI-19007, a Novel *Saccharomyces cerevisiae*-based therapeutic vaccine against tuberculosis [J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2017, 24(12): E00245.
- [97] WALCH B, BREINIG T, GEGINAT G, et al. Yeast-based protein delivery to mammalian phagocytic cells is increased by co-

- expression of bacterial listeriolysin [J]. *Microbes and Infection*, 2011, 13(11): 908-913.
- [98] FU G, CONDON K C, EPTON M J, et al. Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing [J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(3): 353-357.
- [99] FU G, LEES R S, NIMMO D, et al. Female-specific flightless phenotype for mosquito control [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(10): 4550-4554.
- [100] DE VALDEZ M R W, NIMMO D, BETZ J, et al. Genetic elimination of dengue vector mosquitoes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(12): 4772-4775.
- [101] RITCHIE S A, STAUNTON K M. Reflections from an old queenslander: can rear and release strategies be the next great era of vector control? [J]. *Proceedings of the Royal Society B*, 2019, 286(1905): 20190973.
- [102] WINDBICHLER N, MENICHELLI M, PAPATHANOS P A, et al. A synthetic homing endonuclease-based gene drive system in the human malaria mosquito [J]. *Nature*, 2011, 473(7346): 212-215.
- [103] WANG S, DOS-SANTOS A L A, HUANG W, et al. Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria [J]. *Science*, 2017, 357(6358): 1399-1402.



通讯作者:金帆(1978—),男,博士,研究员,研究方向为合成生物学, fan.jin@siat.ac.cn。



第一作者:蒲璐(1992—),女,硕士,研究助理,研究方向为合成生物学, lu.pu@siat.ac.cn。