

转基因植物生产动物疫苗的研究及应用

范国昌^{1,2} 山松¹ 钱凯先² 沈桂芳¹

(1. 中国农业科学院生物技术研究中心, 北京, 100081) (2. 浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

Research and Application on Transgenic Plants as Vaccine Source

FAN Guochang^{1,2} SHAN Song¹ QIAN Kaixian² SHEN Guifang¹

(1. Bio-Tech Research Centre, CAAS, Beijing 100081)

(2. Department of Biosciences and Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

植物基因工程的主要目标是创造出具有丰产、优质、抗病虫、抗除草剂、抗寒、抗旱、耐盐碱等优良性状的作物新品种。随着高效基因载体系统和遗传转化技术的发展,植物基因工程技术又出现一个新的生长点,即利用转基因植物生产动物疫苗。目前,这项研究尚处于实验室阶段,但由于其应用前景可观,已引起免疫学家、分子生物学家和植物学家的极大兴趣与关注。本文就该领域的研究发展、方法、特点及应用前景作一综述。

1 动物基因对植物的转化及其表达的研究

动物基因转入植物的最早报道是1983年Shaw等把兔子 β -球蛋白的基因组基因转入烟草,但没有得到表达⁽¹⁾;随后人们又将鸡的 α -肌动蛋白、卵清蛋白、人 α -球蛋白基因转入烟草,也得出相似的结果⁽²⁾,即:完整的动物基因(包括启动子、内含子、加尾信号)在植物中不能转录或正确加工。以后一系列研究结果表明,植物不能识别动物基因的转录起始、终止和加工信号,然而用cDNA代替基因组编码序列,在植物中有作用的启动子和终止子调节下,来自动物的cDNA都可以在植物中有效地转录和翻译。例如:鼠金属硫蛋白(*mMT*)基因在CaMV35S启动子和豌豆核酮糖二磷酸羧化酶小亚基(*rbcS*)基因启动子的指导下,在烟草中得以表达,转基因幼苗对镉毒产生抗性⁽³⁾。德国Max Planck作物育种研究所的Düring等人(1990)分别将编码抗体轻链和重链的cDNA转入烟草转基因植物能合成轻链和重链,并组装成有活性的抗体⁽⁴⁾。目前,在转基因植物中已成功表达了人生长激素、白细胞介素-2、干扰素、人血清蛋白、血红蛋白、胰岛素、人表皮生长因子、萤火虫荧光素酶基因、比目鱼抗冻基因及乙肝表面抗原基因等⁽⁵⁻¹⁰⁾。

2 转基因植物生产动物疫苗的方法及途径

2.1 重组植物病毒

方法是植物病毒进行遗传改造,使其携带外源基因,此重组病毒能在宿主植物中增殖,同时外源蛋白在病毒粒子表面表达以确保抗原性。

豇豆花叶病毒(CPMV)分子结构的研究表明,CPMV粒子由两个衣壳蛋白组成:大(L)蛋白和小(S)蛋白,每个S蛋白形成 β -桶状次级结构,每个 β -桶状结构含8股反向平行的 β -折叠,彼此由不同的环相连。环的重要性在于它们暴露于病毒粒子表面,在该处可被迅速识别以确保强免疫反应。英国John Innes研究所的Lomonsoff博士(1992)构建了CPMV两个基因组RNA的全长cDNA克隆,并将口蹄疫病毒(FMDV)和艾滋病毒(HIV)表面蛋白基因成功地插入S衣壳蛋白基因的 $\beta B \sim \beta C$ 环编码区中,重组质粒转录RNA,并用其以机械方式接种于豇豆植

株。10 天后, 接种过的植株显示与被野生型 CPMV 侵染植株不同的症状。接种植株的叶提取物的电镜检测显示, 存在聚集的 CPMV 状颗粒。由被侵染的叶组织纯化出杂合的病毒粒子, Western 印迹分析表明, 其保留了 FMDV 专一性环。他们用这种杂合病毒粒子制备了用于豚鼠的实验疫苗并进行免疫实验。结果显示, 能诱导产生特异性免疫应答^[11]。

2.2 农杆菌介导的核转化

将编码某种病原体中能引起机体保护性反应蛋白的结构基因克隆到 Ti 质粒上, 然后用这种重组质粒转化农杆菌。携带重组质粒的农杆菌感染植物细胞后, 导入的外源基因可能整合到这些细胞的染色体上。含整合外源基因染色体的植物细胞在一定条件下可以长成新的植株。此植株可以在生长过程中表达外源基因并将这种性状传给子代, 成为表达疫苗的品系。

刘玉乐等(1993)将人乙型肝炎病毒(adw 亚型)表面抗原(HBsAg)基因插入植物双元载体 pRoKII 的 CaMV35S 启动子下游, 构建重组质粒 pRoKII-HBsAg, 将此质粒导入农杆菌 LBA4404 中, 利用农杆菌感染叶盘的方法转化烟草 G140 品种, 得到了抗卡那霉素的转化植株, 并进一步获得了后代植株。酶联免疫分析表明, 转化植株及其后代均能产生具免疫活性的 HBsAg, 免疫吸附电镜观察表明, 转化植株产生的 HBsAg 呈典型的直径为 22nm 的颗粒。显示了用植物廉价生产 HBsAg 的可能性^[6]。Mason 等(1992)也报道了类似的转基因植物生产乙型肝炎疫苗的研究结果^[9], 这种转基因植物 HBsAg 是否能刺激机体产生保护性免疫应答尚在研究之中。

1995 年, Arntzen 等报道了不耐热肠毒素(LT)转基因植物疫苗的研制结果。他们将编码 LT 的 B 亚单位(LT-B)结构基因分别转入烟草和马铃薯中, 并用 ELISA 法在烟草叶片和马铃薯块茎的提取物中检测到了 LT-B 的表达, 同时用免疫沉淀的技术在转基因烟草叶片的提取物中也证实了 LT-B 的存在。直接用马铃薯块茎或其提取液饲喂小鼠 30 天后, 在其血清和粘膜标本中检测到了特异性抗体。他们还证明了转基因植物 LT-B 和大肠杆菌表达的重组 LT-B 具有相同的抗原性, 这两种重组的 LT-B 诱生的特异性抗体都可以中和 LT-B。这些结果说明, 转基因植物 LT-B 有可能成为一种有效的口服疫苗, 在 LT 细菌所致腹泻的预防方面具有重要作用^[12]。

2.3 叶绿体转化

1988 年, Boynton 等首次成功地用野生型的叶绿体 DNA 转化了单细胞生物衣藻的突变体。证明植物叶绿体基因组是可以转化的^[13]。以后一系列研究结果表明, 外源基因可以在叶绿体中得到稳定表达^[14]。而且, 叶绿体作为外源基因转化的受体又具有诸多优越性: (1) 便于外源基因定位整合; (2) 基因为多拷贝, 表达量高; (3) 导入的外源基因性状稳定性高、安全性好; (4) 能直接表达原核基因^[15]。1995 年, Maliga 实验室将 Bt 毒蛋白基因和启动子 Prn 的嵌合基因导入到烟草叶绿体中, 得到毒蛋白占可溶性蛋白 3~5% 的高效表达, 显示出植物叶绿体表达外源基因的优越性^[16]。1996 年, 中国农业科学院生物技术中心沈桂芳实验室, 将丙型肝炎病毒抗原基因 NS3-C 和 CE1 各自插入烟草、衣藻叶绿体转化载体中, 获得了表达^[17]。免疫实验尚在研究之中。

3 转基因植物生产动物疫苗的优缺点

能够生产重组疫苗的其他系统包括: 动物病毒(痘苗病毒、鸡痘腺病毒、逆转录病毒等)、细菌(大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)、酵母(酿酒酵母)、昆虫细胞和哺乳动物细胞。然而, 它们都存在弊端, 限制了其商业化应用。例如: 细菌细胞不能完成许多病毒蛋白质的转录后修饰作用, 不利于蛋白质的重新折叠, 导致其免疫性通常较弱; 酵母菌对有些蛋白质的过分糖基化可能影响针对特定蛋白质的免疫反应, 妨碍了酵母菌在一些疫苗生产中的应用; 多数动物培养系统表达水平低、需要昂贵的生长培养基, 且培养基需特殊处理, 以消除致病的有害微生物, 因此, 疫苗成本很高。

转基因植物疫苗则具有它们无法比拟的优越性^[18]: (1) 易于形成产业化规模, 在筛选到高效表达植株后, 只需

增加耕种面积就能扩大其产量;(2)价格便宜,因为植物易于栽培和管理;(3)安全,植物病毒不会感染家畜及人类;(4)使用方便。已有的实验表明,多种转基因植物疫苗都可以采取口服的方式接种,因此更易被人们接受。

当然,转基因植物疫苗也存在一些有待克服的不足。首先,从植物细胞中提纯特定的蛋白并非易事,相应的纯化工艺有待进一步完善,尤其对于那些注射用的疫苗,有效地除去其中可能混杂的植物碱和植物毒素是生产中的一个不可忽视的问题。其次,有些转基因植物疫苗的有效成份含量较低,接种这种疫苗不但不会诱发机体的保护性免疫反应,相反会引起免疫耐受。此外,若以直接食用转基因植物的方式进行预防接种,还会遇到3个问题:一是某些植物中可能存在某些物质,它们会降低转基因植物疫苗的免疫效果;二是对于某些必须经热加工方可食用的植物,烹调过程会破坏其中疫苗的有效成份(此点可通过将某些抗原基因导入不经加工即可食用的植物来克服);三是口服的转基因植物疫苗必须非常“结实”,足以通过粘膜进入内脏并能在那里激发免疫反应。

4 应用前景

由于传统的疫苗生产包括费用昂贵的纯化、冷藏和注射过程,而在植物组织中产生蛋白则可省去这些步骤,因而转基因植物疫苗显示出诱人的前景。这项研究为植物生物技术开辟一个全新的领域,尽管这项技术短期内不可能产生巨大的商业利润,但是随着这项技术的不断完善,在免疫学家、分子生物学家和植物学家的共同努力下,转基因植物必将生产出各种有实用价值的疫苗。

参 考 文 献

- 1 Shaw C H *et al.* A general method for the transfer of cloned genes to plant cells. *Gene*, 1983, 23: 315~330
- 2 Hunt A G. Plant cells do not properly recognize animal gene polyadenylation sequences. *Plant Mol. Biol.*, 1987, 8: 23~35
- 3 Maiti I B. Light inducible and tissue-specific expression of a chimeric mouse metallothionein cDNA gene in tobacco. *Plant Science*, 1991, 76: 99~107
- 4 Daring K. Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol.*, 1990, 15: 281~293
- 5 李宝健等. 人生长激素基因在花叶芋中的整合与表达. *中国科学B辑*, 1993, 23(4): 377~381
- 6 刘玉乐等. 人乙肝表面抗原基因在转基因烟草中的表达. *中国科学B辑*, 1993, 23(3): 252~255
- 7 朱 楨等. 转基因水稻植物再生及 α -干扰素cDNA的表达. *中国科学B辑*, 1992, 22(2): 149~155
- 8 Hightower R. Expression of antifreeze proteins in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, 1991, 17: 1013~1021
- 9 Hugh S M. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89: 11745~11749
- 10 Ken-ichi H. Expression of a chemically synthesized gene for human epidermal growth factor under the control of cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic tobacco. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1993, 57: 1477~1481
- 11 Lomonosoff G. Vaccine produced in plants. *Agbiotech. News and Information*, 1992, 4(9): 232~233
- 12 Haq T A. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*, 1995, 268(5): 714~716
- 13 Boynton J E *et al.* Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, 1988, 240: 1534~1538
- 14 孙桂华等. 叶绿体的遗传工程. *遗传*, 1995, 17(增刊): 30~33
- 15 任延国等. 高等植物遗传转化的新受体——质体. *生物化学与分子生物学动向*, 1996, 2(1): 30~33
- 16 McBride K E *et al.* Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio/Technology*, 1995, 13(4): 362~365
- 17 范国昌等. 丙肝病毒CE1区基因叶绿体转化载体的构建及转基因衣藻的获得. *浙江大学学报*, 1998, 待发表
- 18 Moffat A S. Exploring transgenic plants as a new vaccine source. *Science*, 1995, 268(5): 658~660