

专题介绍

重组蛋白在植物体中的表达及其应用

郝 林 徐 昕 王尊生

(沈阳师范大学生物系 沈阳 110034)

摘要 近年来,以植物为生物反应器异源表达和生产具有药用及商业价值的蛋白质发展迅速,某些产品已进入临床试验,且获得了很好的疗效;另一类在植物体中表达的具有重要农艺价值的蛋白质可介导植物抵抗病原体,即植物抗体介导的抗性,是植物抗病原体分子育种的又一途径。介绍了重组蛋白在植物体中表达及其应用的现状。

关键词 重组蛋白,转基因植物,植物抗体,病原体抗性,免疫修饰

Recombinant Protein Expression in Plants and Its Application

HAO Lin XU Xin WANG Zun-Sheng

(Department of Biology, Shenyang Normal University, Shenyang 110034)

Abstract? Studies on transgenic plants as the bioreactor to produce pharmaceutical and commercial valuable proteins has been advanced for over a decade. Some recombinant proteins produced in plants are now in clinical trials and have a promise future. Another expressed proteins in plants are agronomically valuable and can mediate resistance to pathogen infections, so could be an alternative method in molecular breeding of plants. In this review, we introduce some advances in this field.

Key words Recombinant protein, Transgenic plant, Plantibody, Pathogen resistance, Immunomodulation

利用植物异源表达生产具有药用及农艺价值蛋白质的研究已有10年左右的历史(Hiatt *et al*, 1989; Higo *et al*, 1993; Stöger *et al*, 2002)。实践证明,与动物(包括转基因动物)和微生物表达系统相比较,植物表达系统具有以下特点:(1)成本低。若达到农业生产规模,生产等量目的蛋白只需其他表达系统所需费用的十分之一(Larrick and Thomas, 2001)其中主要的资金用于下游的分离纯化。因此,在活性疫苗表达方面,当转基因植物(如种子、块茎、果实等)被直接食用时,成本会更低。(2)生产规模可被快速放大。一旦建立起稳定而高效的表达系统,只需扩大种植面积就可大量生产有用蛋白。(3)可生产复杂的蛋白质,如完整的免疫球蛋白,并象动物表达系统一样,能进行正确的转译后加工,如折叠、二硫键的形成,只是糖基化方式与动物的稍有不同。(4)植物蛋白被认为是相对安全的。因为植

沈阳市自然科学基金资助课题。

通讯作者。Author for correspondence.

作者简介:郝林,男,1963年1月生,博士,教授。1996年和2002年分别于丹麦哥本哈根大学分子生物学研究所和加拿大英属哥伦比亚大学生物技术实验室作访问学者,从事植物基因工程和分子生物学研究。目前承担多项国家、省、市科研课题,在国内外学术刊物上发表论文30余篇。

收稿日期:2002-11-10 接受日期:2003-05-11 责任编辑:白羽红

物体不会成为人类或动物病原体（如艾滋病毒、口蹄疫病毒等）的寄主，所以在纯化目的产物时不会被污染。(5) 生产周期相对较短，一经获得了稳定的转基因系统就可进行长期大规模生产。(6) 便于贮藏和运输。通过特异的启动子可将目的基因的表达定位于特定器官中（如种子、块茎、果实），目的产物在其中是非常稳定的，在低温甚至是室温下长期贮存，目的产物的生物活性（如抗原结合活性）下降很少（Fischer and Emans, 2000），同时也便于运输。以热带植物为表达系统，可为某些地处热带亚热带的发展中国家就地生产诊断和治疗性药物提供极大方便。(7) 为植物抗病的分子育种提供了新途径。(8) 用于植物代谢的基础研究及植物表型的改变。

1 抗体基因的克隆、转化和表达

利用植物表达系统生产的抗体蛋白称为植物抗体（plantibody）。最早表明植物表达系统能生产具有生物功能的哺乳动物抗体蛋白是于 1989 年报道的（Hiatt *et al*, 1989）。从此，分泌性抗体（Ma *et al*, 1995）、完整的抗体（van Engelen *et al*, 1994）、嵌合抗体（Ma *et al*, 1995; 1998）、Fab 片段（fragment antigen binding）（De Neve *et al*, 1993）、scFv 片段（single chain antibody fragment）（Owen *et al*, 1992）和双特异性 scFv 片段（Fischer *et al*, 1999）等先后成功地在烟草、马铃薯、水稻、小麦或拟南芥的叶片、根、块茎和种子等器官中表达，表达水平通常为 0.5%~2% TSP（总可溶性蛋白）（Conrad and Fiedler, 1998）。

1.1 抗体基因的克隆

抗体基因通常是从生产单克隆抗体的杂交瘤细胞系中经 mRNA 分离、cDNA 合成以及 PCR 扩增得到的。由此克隆的抗体基因可人为地进行修饰，如在适当位点引入终止密码子使克隆的完整抗体转变为 Fab 片段，或转变为只含单链可变区的 scFv（Bird *et al*, 1988），还可合成融合蛋白，如将 scFv 基因与毒素或酶基因连接，即可表达出融合蛋白，用于专门的疾病治疗（Daniell *et al*, 2001）。合成嵌合抗体，如 IgG/A 嵌合（Ma *et al*, 1995），人鼠抗体嵌合（Vaquero *et al*, 1999）等。利用杂交瘤技术克隆了许多抗体基因并在植物体中表达，但该方法的不便之处是程序繁琐，需要昂贵的仪器设备，且需要实验动物。后来出现的噬菌体展示技术（phage display）用于分离和克隆抗体基因显示出优势（McCafferty *et al*, 1990）。其优点是在抗体基因文库构建过程中，所有克隆的重链和轻链片段能相互组合，产生出具有新的特异性的抗体。更重要的是，随着目的抗体的特异性在蛋白质水平上的选择，同时也选择了相应的编码基因。由该技术克隆的抗体基因在植物中的表达产物具有预期的结合特异性，表明该方法是可行的（Boonham and Barker, 1998; Harper *et al*, 1999; Griep *et al*, 2000）。另外，由此克隆并表达的抗体在植物体中更稳定（De Jaeger *et al*, 1998）。

1.2 转化

要大规模生产抗体蛋白，必须首先建立高效而稳定的表达系统。对双子叶植物的稳定转化方法是农杆菌介导的转化，而单子叶植物的转化常用基因枪法。一般来说，在建立稳定的转化之前，利用瞬时表达系统检测表达载体的效率、表达产物的稳定性、转译后加工、细胞中的定位以及表达产物的功能是必要的（Vaquero *et al*, 1999），有时甚至可提供足够量的产物供临床试验（Fischer and Emans, 2000）。瞬时表达法的特点是目的基因不整合到转化植物的基因组中，表达速度快。目前有 3 种常用的瞬时表达方法，即具 DNA 包被的微弹轰击法

(Christou,1993), 重组农杆菌抽真空转化法 (Kapila *et al*, 1996), 以及修饰的病毒载体感染法 (Scholthof *et al*, 1996; Kumagai *et al*, 2000), 其中常用的是抽真空转化法。

1.3 表达

抗体基因的表达水平及稳定性与表达载体的构建、表达产物在细胞中的定位、抗体本身的特性以及植物的生理变化等因素有关。在启动子选择方面, 多数是利用 CaMV35S 启动子。不同类型的抗体在细胞不同区域定位对其稳定性和产量影响较大。大量的文献表明, 通过在完整抗体分子和 Fab 片段的 N 末端附加一段内质网信号序列使其进入分泌途径 (secretory pathway) 可极大地提高其积累水平 (Yuan *et al*,1997; Conrad and Fiedler, 1998)。相反, 在 scFv 的 N 末端附加一段信号序列, C 末端附加 4 肽 KDEL 滞留信号使其定位于内质网上, 可得到最高的积累量。不过也有报道表明将 scFv 定位于胞壁连续区 (apoplast) 可提高其积累水平 (Daniell, 1999)。一般来说, 重组抗体(recombinant antibodies, rAbs)在胞质中的表达比较困难, 只有 scFv 片段能在其中表达(Schillberg *et al*,1999), 不过稳定性较差, 其原因可能与转译后的折叠有关, 如果是这样, 就可通过调节 scFv 的原始编码序列, 尤其是框架区 (framework region) 而得以改进 (Knappik and Plückthun,1995)。

植物抗体以及其他外源蛋白的另一个表达系统是叶绿体。外源基因通过同源重组插入叶绿体基因组的功能基因之间, 如 Bt 的一种 CRY 蛋白基因通过这种方式整合到叶绿体基因组中, 由于细胞中叶绿体数量多, 因此外源基因的拷贝数达 1 万份, 重组蛋白的积累量占 TSP 的 47%, 并具有杀虫功能 (DeCosa, 2001)。在叶绿体中表达产物能正确折叠并形成二硫键 (Kim and Mayfield, 1997; Staub, 2000), 同时, 由于整合具有精确的位置, 因此消除了外源基因表达常遇到的位置效应(position effect), 使表达更加稳定而有效。在叶绿体表达系统中也未见转基因沉默发生 (Daniell *et al*, 2001)。叶绿体遗传工程也消除了人们关注的环境问题 (Daniell,1999)。

2 重组蛋白在临床上的应用

2.1 植物抗体用于临床诊断和治疗

从理论上讲, 经设计的植物抗体可与任何一种抗原特异结合, 使目标分子被激活或抑制。近年来有关植物表达诊断和治疗性抗体的报道非常多, 表 1 只列举了其中的几种。治疗蛀牙的抗体在临床试验中获得了十分理想的效果, 估计很快就会上市 (Larrick *et al*, 1998; Ma *et al*, 1998; Daniell *et al*, 2001)。

目前, 植物抗体全面用于诊断和治疗需要解决的主要问题包括产品的数量和质量、下游纯化工艺、糖基化等。通过调节表达元件、优化密码子以及提高抗体的稳定性可提高表达系统中 rAbs 的积累水平。由于其他不确定因素很多, 目前对表达系统的评价是很困难的。用于大规模生产的表达系统的选择主要依据是表达系统本身的效率以及是否适合于放大生产、贮藏和下游加工等。纯化的难易程度是全部生产过程中主要的经济指标, 因此直接影响着表达系统的选择。以烟草和玉米为表达系统生产 rAbs 取得了巨大进展 (Daniell *et al*, 2001)。重组蛋白在植物体内的糖基化 (glycosylation) 方式与人体内的不同 (Chargelegue *et al*, 2000; Bakker *et al*, 2001), 这一问题近年来引起人们的关注, 因为不同模式的糖基化会对人体形成免疫原性。一些专门的研究工作就是针对如何消除这种免疫原性的, 如在不需糖基化仍具有抗体活性的

表 1 植物表达的抗体蛋白及应用
Table 1 Plantibodies and applications

应 用	抗体类型	抗 原	表达系统	文献
Application	Antibody type	Antigen	Expression system	References
防治蛀牙	SigA*	链球菌	烟草	Ma <i>et al</i> , 1998
Dental caries		Streptococcal	<i>Nicotiana</i>	
antigen or			<i>tabacum</i>	
诊断	IgG	抗人 IgG	苜蓿	Khoudi <i>et al</i> ,1999
Diagnostic		Anti-human IgG	Alfalfa	
肿瘤治疗	scFv	胚胎抗原	小麦、水稻	Stöger <i>et al</i> ,2000
Cancer treatment		Carcinoembryonic antigen	Wheat,Rice	
B 细胞淋巴瘤治疗	scFv	特型疫苗	烟草	McCormick
B-cell lymphoma		Idiotypic vaccine	<i>Nicotiana</i>	<i>et al</i> ,1999
treatment			<i>benthamiana</i>	
结肠癌治疗	IgG	表面抗原	烟草	Verch <i>et al</i> ,1998
Colon cancer		Surface antigen	<i>Nicotiana</i>	
treatment			<i>benthamiana</i>	
疱疹治疗	IgG	疱疹单型病毒	大豆	Wigdorovitz
Herpes treatment		Herpes simplex virus 2	Soybean	<i>et al</i> ,1999

* 分泌型 IgA(secretory IgA)

情况下,将抗体中有关植物 N-糖基化的识别序列去除。对于高尔基体介导的糖基化,只要在抗体的 C 末端附加内质网滞留信号肽 KDEL,就可避免糖基化。另一种非常理想的方法是将植物糖基化方式转变为适合人体的糖基化,如将人的 β -1,4-乳糖基转移酶(galactosyltransferase)转化烟草,然后再与表达鼠抗体的烟草杂交,其后代产生的抗体就完全适合于人体了(Bakker *et al*,2001)。

2.2 食品疫苗

“某一天孩子们只需咀嚼食物而不是打针就可得到免疫。更重要的是食品疫苗将能挽救无数因缺乏传统接种而死亡的生命”。在 Langridge (2000)的文章“Edible vaccines”中的这句话充分说明了食品疫苗的重要性。食品疫苗(edible vaccines)是指利用转基因植物异源表达细菌和病毒病原体蛋白,并且通过口服而引起免疫反应,进而能抵抗相关病原体的侵染。这方面的工作也是植物表达重组蛋白研究开展较早的。表 2 列举了几种近年来由植物生产的疫苗,有些已成功地用于临床试验(Castanon,1999; Kapusta *et al*, 1999; Tuboly *et al*, 2000)。

口服疫苗比注射免疫更方便有效,因为病原体是通过粘膜表面进入体内的。选择合适的粮食或蔬菜作物作为表达系统,如禾本科作物的种子,马铃薯的块茎以及蔬菜的果实都是理想的表达系统,人或家畜可以直接食用而不需分离纯化。实际应用中所要解决的主要问题是产物的稳定性和产量。口服疫苗常遇到的问题是表达的蛋白在引发免疫反应之前就有可能在胃肠道内被降解。为了克服这一不利因素,开发了几种有效的制剂,如生物胶丸(Daniell *et al*, 2001)。表达水平一直是关注的焦点。通过对目的基因的修饰,如附加先导序列和 poly(A)信号(Richter *et al*, 2000)、优化密码子以适应植物系统(Tuboly *et al*, 2000)或通过转基因植物与各种遗传背景杂交(Daniell *et al*, 2001),都可提高表达水平。另外,表达产物在细胞中的定位也很重要,关系到转译后加工及产品的稳定性。某些重组蛋白的适宜表达部位是细胞表

表 2 植物表达的疫苗

Table 2 Vaccines expressed by transgenic plants

目的基因供体及免疫物种	目的产物	表达系统	免疫方式	文献
Source of purpose genes and target species for the vaccine	Protein or peptide expressed	Expression system	Immunogenicity capacity	References
产肠道毒素的 <i>E.coli</i> (人)	热不稳定毒素 B- 亚基	烟草、马铃薯、玉米	口服后具免疫和保护性	Haq <i>et al</i> , 1995;
Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (human)	Heat-labile toxin B-subunit	Tobacco, Potato, Maize	Immunogenic and protective when administered orally	Tacket <i>et al</i> , 1998
霍乱菌 (人)	霍乱毒素 B 亚基	马铃薯	口服后具免疫和保护性	Arakawa
<i>Vibrio cholerae</i> (human)	Cholera toxin B-subunit	Potato	Immunogenic and protective when administered orally	<i>et al</i> ,1998
乙肝病毒 (人)	表面蛋白	马铃薯、羽扇豆、莴苣	口服后具免疫性	Kapusta
Hepatitis B virus (human)	Envelope surface protein	Potato,Lupin, Lettuce	Immunogenic when administered orally	<i>et al</i> ,1999; Richter <i>et al</i> ,2000
Norwalk 病毒 (人)	衣壳蛋白	烟草、马铃薯	口服后具免疫性	Mason
Norwalk virus (human)	Capsid protein	Tobacco, Potato	Immunogenic when administered orally	<i>et al</i> ,1996
狂犬病毒 (人)	糖化蛋白	蕃茄	-----	McGarvey
Rabies virus (human)	Glycoprotein	Tomato		<i>et al</i> ,1995
口蹄疫病毒 (家畜)	VP1 结构蛋白	拟南芥、苜蓿	注射或口服后具免疫性	Carrillo
Foot-and-mouth disease virus (agricultural domestic animals)	VP1 structural protein	<i>Arabidopsis</i> , Alfalfa	Immunogenic and protective when administered by injection or orally	<i>et al</i> , 1998; Wigdorovitz <i>et al</i> ,1999
肠胃炎冠状病毒 (猪)	糖化蛋白 S	拟南芥、烟草、玉米	注射或口服后具免疫和保护性	Tuboly <i>et al</i> ,
Gastroenteritis coronavirus (pig)	Glycoprotein S	<i>Arabidopsis</i> , Tobacco, Maize	Immunogenic when administered by injection or orally	2000

面、内质网以及高尔基体(Richter *et al*, 2000; Tuboly *et al*, 2000)。

2.3 其他医用蛋白

大量研究表明 ,人体内含量甚微但具有重要临床价值的蛋白或多肽也可在植物系统中表达 (表 3) ,如目前在加拿大生产的人水蛭素 (hirudin) 就是第一个由转基因植物生产的药物 (Giddings, 2001) 。但在生产实践中面临的主要问题仍是表达水平过低 (表 3) ,一般来说 ,在临床应用中需要纯化的重组蛋白表达量应占转化细胞 TSP 的 1% 以上时才具有商业价值 (Kusnadi *et al*,1997) 。因此,真正用于生产还需做大量工作。

3 介导植物抗病虫

植物中表达的重组抗体除了直接用于临床外 ,也可用于植物体自身对环境胁迫的反应。如介导植物抗病毒、细菌、真菌以及线虫等 ,是植物分子育种的又一途径。从理论上讲 ,抑制性的抗体能与发病机制相关的任何蛋白质或病原体结合 ,达到延缓、减弱甚至完全消除

表 3 某些具有药用价值的蛋白质在植物系统中的表达水平
Table 3 Expression levels of selected biopharmaceuticals in transgenic plants

表达的蛋白质 Proteins expressed	可能的应用 Potential application	表达系统 Expression system	表达水平 Expression levels	文献 References
人蛋白质 C(血清蛋白酶) Human protein C (serum protease)	抗凝剂 Anticoagulant	烟草 Tobacco	< 0.01% TSP	Cramer <i>et al</i> , 1996
人水蛭素 Human hirudin	凝血酶抑制剂 Thrombin inhibitor	油菜 <i>Brassica napus</i>	0.3% 种子蛋白 0.30% seed protein	Cramer <i>et al</i> , 1999
人红血球生成素 Human erythropoietin	治疗贫血症 Anemia treatment	烟草 Tobacco	< 0.01% TSP	Matsumoto <i>et al</i> ,1995
人促生长激素 Human somatotropin	生长激素 Growth hormone	烟草 Tobacco	< 0.01% TSP	Staub <i>et al</i> , 2000
人表皮生长因子 Human epidermal growth	烧伤修复 Wound repair	烟草 Tobacco	< 0.01% TSP	Higo <i>et al</i> , 1993
人 β - 干扰素 Human interferon β	治疗乙肝和丙肝 Hepatitis C and B treatment	烟草 Tobacco	0.01% 鲜重 0.01% fresh weight	Eldelbaum <i>et al</i> ,1992
人血清白蛋白 Human serum albumin	治疗肝硬化 Liver cirrhosis treatment	烟草 Tobacco	0.02% TSP	Kusnadi <i>et al</i> ,1997
人血红蛋白 α 、 β Human hemoglobin α , β	血替代品 Blood substitute	烟草 Tobacco	0.05% 种子蛋白 0.05% seed protein	Dieryck <i>et al</i> , 1997

病症(Schillberg *et al*, 2001)。

3. 1 免疫修饰 (immunomodulation)

免疫修饰是指编码抗体或抗体片段的基因在植物体内异源表达，并与特异的抗原结合，从而干扰相关的代谢过程或病原体的感染活性。其实质是使某些关键基因失活，因此免疫修饰是反义技术 (antisense) 和共抑制技术 (cosuppression) 的补充(De Jaeger *et al*, 2000)。与后两者相比，免疫修饰的特点是：(1)可修饰非蛋白抗原。(2)获得对更复杂病原体（如线虫）的抗性。而反义和共抑制技术只能用于获得对整合到寄主基因组的病原体（如病毒）的抗性。(3)抗体的合成为蛋白质活性的修饰提供了一种更加细微的调节方式，因此可用于更细致地分析基因活性。(4)抗体特异的结合及结合的亲和性不同可用于制备一系列目标分子修饰水平不同的个体，用于分析目标分子在植物代谢中的作用。(5)在体内，一种蛋白质通常与其他多种蛋白质相互作用，通过免疫修饰可使其中的一种作用被阻断而不影响其他蛋白的作用，用于目标分子功能的研究。

3. 2 胞内和胞外免疫

根据表达的抗体或抗体片段在细胞内或细胞外的积累，免疫修饰分为胞内免疫(intracellular immunization)和胞外免疫(extracellular immunization)。大多数植物病毒是 RNA 病毒，其复制是在细胞质中进行，因此最有效的抗性应是胞内免疫。Zimmermann 等（1998）比较了与 TMV 病毒粒子结合的 scFv 在烟草胞质和胞壁连续区的表达对 TMV 感染的抗性表明，尽管该 scFv 在胞壁连续区的积累量远高于胞质中的，但后者叶片上局部坏死斑的数量明显少于前者，

病毒的侵染力减小 90% 以上。

对真菌病原体而言,在胞壁连续区进行的胞外免疫能更有效地抑制真菌分泌的降解寄主细胞壁的酶,从而延缓或抑制其侵染。免疫发生的部位在很大程度上依赖于抗体分子的活性及稳定性。有些抗体虽能在胞质中积累,但由于不能形成正确的二硫键而不具活性。一般来说,对目标分子存在于胞壁连续区的免疫,抗体的选择最好是 IgG₅ 或 Fabs,对存在于内质网上的免疫,最好选择 scFv 片段(De Jaeger *et al*, 2000)。

3.3 对病毒的抗性

入侵病毒的主要代谢过程均发生在细胞质,因此在这里病毒是最易受到免疫修饰的。表达抗体通过与病毒表面蛋白或病毒运动、复制必需蛋白特异结合,使病毒失活(Wilson,1993; Baulcombe,1994)。最早通过实验证明重组抗体可干扰植物病毒感染是在1993年(Tavladoraki *et al*,1993),其中抗病毒外壳蛋白的 scFv 在烟草胞质中表达,可减轻病毒的感染和延缓病症的发展。不过定位于分泌途径的抗体也可对病毒进行免疫修饰。表达与完整 TMV 粒子结合的分泌性抗体的烟草可抵抗 TMV 的侵染,局部坏死斑数量减少(Voss *et al*,1995),该实验还表明感染程度与分泌的抗体量直接相关,当转基因烟草叶片胞壁连续区中抗体量达到 0.23%TSP 时,局部坏死斑减少 70%。虽然 scFv 在胞质中积累的量很低,但其介导的抗病活性很高(Zimmermann *et al*,1998),这可能是由于侵染寄主时只需少数几个病毒分子进入胞质的缘故。

许多实验表明抗体介导的抗病毒育种是可行的,是对其他抗病分子育种技术,如外壳蛋白介导的抗性的一种补充。同时有其自身的特点,如可针对病毒致病机理的某些共同点开发出广谱抗性的植株。另外抗体介导的抗性是相对稳定的,而利用外壳蛋白或源于病毒其他基因介导的抗性(Lomonossoff, 1995)存在的问题逐渐显露出来。如入侵病毒与寄主中外源基因之间发生非同源重组或 RNA 病毒复制过程中易发生的突变而导致寄主范围更大、致病能力更强的新病毒产生,或由于重组事件使原本失去运动能力的病毒恢复其功能,甚至完全恢复为野生型(Borja *et al*, 1999; Rubio *et al*, 1999)等,使培育出的抗性植株失去抗性。

3.4 对细菌的抗性

已有许多方法用于植物抗细菌病的遗传操作(Mourgues *et al*, 1998),近来研究表明抗体介导的抗性也可用于抗细菌病。LeGall 等(1998)表明特异于 phytoplasma(一类无细胞壁的细菌病原体)的 scFv 可抵抗其侵染。由于 phytoplasma 被严格地限制于筛管中,因此将特异的 scFv 定位于分泌途径,将转基因烟草的茎嫁接于严重感染了 phytoplasma 的烟草植株上,结果新生的枝叶没有病症,而对照的病症十分明显。

3.5 抗线虫和真菌

抗体介导的线虫抗性工程是一项长期的工作,到目前还未获得有效的抗性植株。选择免疫修饰的目标分子是重要的。根节(root-knot)线虫幼虫表达的细胞酶类是幼虫由根皮层进入维管束必需的,在那里线虫将某些细胞转变成多核的饲养细胞,并完成其生活史。近来从根节线虫 *Meloidogyne incognita* 克隆了几种细胞酶(Smant *et al*, 1998; Rosso *et al*, 1999),这是线虫抗体介导抗性育种的第一步。

病原真菌是植物疾病中最具毁灭性的,也是抗体介导的抗性策略中最具挑战性的(Schillberg *et al*, 2001)。真菌侵染植物后,其菌丝可遍布整个植物体,使植物死亡,或通过分泌真菌

毒素使收获的农作物污染,人食后严重时可死亡。真菌致病必需的分泌蛋白是合适的免疫修饰目标。另一个引人关注的策略是将抗体与抗真菌多肽偶联,定位于真菌细胞表面,杀死其菌丝。尽管在动物体已表明抗体介导的真菌抗性(Yuan *et al*,1998),但还没有直接证据表明转基因植物生产的抗体可保护其免受真菌的侵染,不过有理由相信,与抗病毒一样,抗真菌也将是完全可行的。另一项抗体工程是消除收获的农作物中污染的真菌毒素。已分离了数个抗真菌毒素的重组抗体(Yuan *et al*, 1997) 离体实验表明其中一些抗体具有抑制真菌毒素的作用。

4 调节植物代谢

抗体分子通过与被修饰的目标分子特异结合可稳定或阻断其生物活性(De Jaeger *et al*, 2000; Schillberg *et al*, 2001), 用于目标分子功能的研究,在某些情况下可改变植物的表型。如果被修饰分子是代谢途径中的关键酶,则可改变植物的某一代谢途径,使其积累对人类更有价值的代谢产物。

4.1 对植物激素合成和转运的调节

在内质网中积累 ABA (脱落酸) 特异结合的 scFv 片段的转基因烟草在正常环境条件下表现出萎蔫,呼吸速率增加,气孔不能关闭。其原因可能是在气孔保卫细胞的内质网中富集的 scFv 片段为 ABA 提供了一个库,阻止了 ABA 的转运及其与 ABA 受体之间的相互作用(Artsaenko *et al*,1995)。在 GA (赤霉素) 代谢中,GA₁₉ 和 GA₂₄ 是具有生物活性的 GA₁ 和 GA₄ 合成的前体。在烟草中表达抗 GA_{19/24} 的 scFv 片段使转基因植株矮化,同时 GA₁ 水平下降(Shimada *et al*, 1999)。以上实验表明免疫修饰可用于研究植物激素的活性及功能。与突变或常规的反义技术相比,抗体结合能使激素合成途径的终产物失活而不影响其他前体的功能。相反,在许多生物合成突变体中,ABA 合成被过早地阻断,因此很难将观察到的表型与某一种内源调节剂对应起来。另外,由于独立的转基因植株中外源基因的表达水平不同,因此激素活性被抑制的程度也不同,这种机制可用于生产具有不同激素活性的植株。

4.2 对酶活性的调节

在酶的免疫修饰方面,目前仅有一例报道。Jobling 等(2003)以马铃薯淀粉分支酶 A (starch branching enzyme A, SBEA) 为修饰目标,采用噬菌体展示技术分离出与 SBEA 特异结合的骆驼抗体的重链(VHH) 编码基因片段,与质体特异定位肽 DNA 序列融合后转化马铃薯。在转基因植株叶片中 VHH 抗体片段的表达量占 TSP 的 0.03%,有一半的转基因植株(9/18)表现出高浓度的直链淀粉含量(高于 50%,而野生型植株直链淀粉的含量为总淀粉的 30%),最高达 74%。在这些植株中 SBEA 的活性降低,但 SBEA 蛋白质含量与对照无显著差异,说明 VHH 抗体的存在不影响其抗原分子的表达,只是通过与抗原特异结合而抑制其活性。

另外, Owen 等(1992)表明通过对受体蛋白的免疫修饰可改变诸如光敏色素的活性,如表达 scFv 的转基因种子表现出不正常的萌发。

参 考 文 献

- Arakawa T, Chong D K, Langridge W H, 1998. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotechnol*, **16**: 292~297
- Artsaenko O, Peisker M, Nieden U, Fiedler U, Weiler E W, Muntz K, 1995. Expression of a single-chain Fv antibody

- against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco. *Plant J*, **8**:745~750
- Bakker H, Bardor M, Molthoff J W, Gomord V, Elbers I, Stevens L H, Jordi W, Lommen A, Faye L, Lerouge P, 2001. Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**: 2899~2904
- Baulcombe D, 1994. Novel strategies for engineering virus resistance in plants. *Curr Opin Biotech*, **5**:17~124
- Bird R E, Hardman K D, Jacobson J W, Johnson S, Kaufman B M, Lee S M, 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, **242**: 423~426
- Boonham N, Barker I, 1998. Strain specific recombinant antibodies to potato virus Y potyvirus. *J Virol Methods*, **74**: 93~199
- Borja M, Rubio T, Scholthof H B, Jackson A O, 1999. Restoration of wild-type virus by double recombination of tombus virus mutants with a host transgene. *Mol Plant Microbe Interact*, **12**:153~162
- Carrillo C, Wigdorovitz A, Oliveros J C, Zamorano P I, Sadir A M, Gomez N, 1998. Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *J Virol*, **72**:1688~1690
- Castanon S, Marn M S, Martin-Alonso J M, Boga J A, Casais R, Humara J M, Ordas R J, Parra F, 1999. Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol*, **73**: 4452~4455
- Chargelegue D, Vine N D, van Dolleweerd C J, Drake P M, Ma J K, 2000. A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with plant-specific glycans is not immunogenic in mice. *Transgenic Res*, **9**: 187~194
- Christou P, 1993. Particle gun-mediated transformation. *Curr Opin Biotech*, **4**: 135~141
- Conrad U, Fiedler U, 1998. Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Mol Biol*, **38**: 101~109
- Cramer C, Boothe J G, Oishi K K, 1999. Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream technologies. *Curr Top Microbiol*, **240**: 95~118
- Cramer C L, Weissenborn D L, Oishi K K, Grabau E A, Bennett S, Ponce E, Grabowski G A, Radin D N, 1996. Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Ann NY Acad Sci*, **792**: 62~71
- Daniell H, Streatfield S J, Wycoff K, 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci*, **6**: 219~226
- Daniell H, 1999. G M crops: public perception and scientific solutions. *Trends Plant Sci*, **4**: 467~469
- DeCosa B, Moar W, Lee S B, Miller M, Daniell H, 2001. Hyper-expression of the Bt Cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol*, **19**: 71~74
- De Jaeger G, De Wilde C, Eeckhout D, Fiers E, Depicker A, 2000. The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance. *Plant Mol Biol*, **43**: 419~428
- De Jaeger G, Buys E, Eeckhout D, De Wilde C, Jacobs A, Kapila J, Angenon G, van Montagu M, Gerats T, Depicker A, 1998. High level accumulation of single-chain variable fragments in the cytosol of transgenic *Petunia hybrida*. *Eur J Biochem*, **259**:1~10
- De Neve M, De Loose M, Jacobs A, van Houdt H, Kaluza B, Weidle U, van Montagu, Depicker A, 1993. Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Transgenic Res*, **2**: 227~237
- Dieryck W, Pagnier J, Poyart C, Marden M C, Gruber V, Bournat P, 1997. Human haemoglobin from transgenic tobacco. *Nature*, **386**: 29~30
- Eldelbaum O, Stein D, Holland N, Gafni Y, Livneh O, Novick D, Rubinstein M, Sela I, 1992. Expression of active human interferon- β in transgenic plants. *J Interf Cytok Res*, **12**: 449~453
- Fischer R, Emans N, Schuster F, Hellwig S, Drossard J, 1999. Toward molecular farming in the future: using plant cell

- suspension cultures as bioreactors. *Biotechnol Appl Bio*, **30**: 113~116
- Fischer R, Emans N, 2000. Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res*, **9**: 279~299
- Giddings G, 2001. Transgenic plants as protein factories. *Curr Opin Biotech*, **12**:450~454
- Griep R A, Prins M, van Twisk C, Keller H J H G, Kerschbaumer R J, Kormelink R, 2000. Application of phage display in selecting tomato spotted wilt virus-specific single-chain antibodies (scFvs) for sensitive diagnosis in ELISA. *Phytopathology*, **90**:183~190
- Harper K, Toth R L, Mayo M A, Torrance L, 1999. Properties of a panel of single chain variable fragments against Potato leafroll virus obtained from two phage display libraries. *J Virol Methods*, **81**: 159~168
- Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K, 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, **342**: 76~78
- Higo K, Saito Y, Higo H, 1993. 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 Bioch*, **57**: 1477~1481
- Jobling S A, Jarman C, The M M, Holmberg N, Blake C, Verhoeyen M E, 2003. Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nature Biotech*, **21**: 77~80
- Kapila J , De Rycke R, van Montagu M, Angenon G, 1996. An *Agrobacterium* mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci*, **122**: 101~108
- Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Pniewski T, Letellier M, Lisowa O, Yusibov V, Koprowski H, Plucienniczak A, Legocki A B, 1999. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J*, **13**: 1796~1799
- Khoudi H, Laberge S, Ferullo J M, Bazin R, Darveau A, Castonguay Y, Allard G, Lemieux R, Vezina L P, 1999. Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnol Bioeng*, **64**:135~143
- Kim J, Mayfield P S, 1997. Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. *Science*, **278**: 1954~1957
- Knappik A, Plkthun A, 1995. Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Eng*, **8**: 81~89
- Kumagai M H, Donson J, della-Cioppa G, Grill L K, 2000. Rapid, high-level expression of glycosylated rice alpha-amylase in transfected plants by an RNA viral vector. *Gene*, **245**: 169~174
- Kusnadi A R, Nikolov Z L, Howard J A, 1997. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnol Bioeng*, **56**: 473~484
- Langridge W H R, 2000. Edible vaccines. *Scientific American*, **283** (3): 66~71
- Larrick J W, Yu L, Chen J, Jaiswal S, Wycoff K, 1998. Production of antibodies in transgenic plants. *Res Immunol*, **149**: 603~608
- Larrick J W, Thomas D W, 2001. Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr Opin Biotech*, **12**: 411~418
- Le Gall F, Bove J M, Garnier M, 1998. Engineering of a single-chain variable-fragment (scFv) antibody specific for the *Stolbur phytoplasma* (Mollicute) and its expression in *Escherichia coli* and tobacco plants. *Appl Environ Microb*, **64**: 4566~4572
- Lomonossoff G P, 1995. Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Ann Rev Phytopathol*, **33**: 323~343
- Ma J K, Hiatt A, Hein M, Vine N D, Wang F, Stabila P, 1995. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science*, **268**: 716~719
- Ma J K, Hikmat BY, Wycoff K, Vine N D, Chargelegue D, Yu L, 1998. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med*, **4**: 601~606
- Mason H S, Ball J M, Shi J J, Jiang X, Estes M K, Arntzen C J, 1996. Expression of Norwalk virus capsid protein in

- transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 5335~5340
- Matsumoto S, Ikura K, Ueda M, Sasaki R, 1995. Characterisation of a human glycoprotein (erythropoetin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol Biol*, **27**: 1163~1172
- McCafferty J, Griffiths A D, Winter G, Chiswell D J, 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, **348**: 552~554
- McCormick A A, Kumagai M H, Hanley K, Turpen T H, Hakim I, Grill L K, 1999. Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 703~708
- McGarvey P B, Hammond J, Dienelt M M, Hooper D C, Fu Z F, Dietzschold B, 1995. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology*, **13**: 1484~1487
- Mourgues F, Brisset M N, Chevreau E, 1998. Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. *Tibtech*, **16**: 203~210
- Owen M, Gandecha A, Cockburn B, Whitelam G, 1992. Synthesis of a functional anti-phytochrome single-chain Fv protein in transgenic tobacco. *Bio/Technology*, **10**: 790~794
- Richter L J, Thanavala Y, Arntzen C J, Mason H S, 2000. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol*, **18**: 1167~1171
- Rosso M N, Favery B, Pottie C, Arthaud L, De Boer J M, Hussey R S, 1999. Isolation of a cDNA encoding a beta-1,4-endoglucanase in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and expression analysis during plant parasitism. *Mol Plant Microbe In*, **12**: 585~591
- Rubio T, Borja M, Scholthof H B, Jackson A O, 1999. Recombination with host transgenes and effects on virus evolution: an overview and opinion. *Mol Plant Microbe In*, **12**: 87~92
- Schillberg S, Zimmermann S, Zhang MY, Fischer R, 2001. Antibody-based resistance to plant pathogens. *Transgenic Res*, **10**: 1~12
- Schillberg S, Zimmermann S, Voss A, Fischer R, 1999. Apoplastic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*. *Transgenic Res*, **8**: 255~263
- Scholthof H, Scholthof K, Jackson A, 1996. Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Annu Rev Phytopathol*, **34**: 299~323
- Shimada N, Suzuki Y, Nakajima M, Conrad U, Murofushi N, Yamaguchi I, 1999. Expression of a functional single-chain antibody against GA 24/19 in transgenic tobacco. *Biosci Biotech Bioch*, **63**: 779~783
- Smant G, Stokkermans J, Yan Y T, Deboer J M, Baum T J, Wang X H, 1998. Endogenous cellulases in animals —— isolation of beta-1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Proc Nat Acad Sci USA*, **95**: 4906~4911
- Staub J, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz P, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll J, Spatola L, Ward D, Ye G, Russell D, 2000. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol*, **18**: 333~338
- Stöger E, Sack M, Fischer R, Christou P, 2002. Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. *Curr Opin Biotech*, **13**: 161~166
- Stöger E, Vaquero C, Torres E, Sack M, Nicholson L, Drossard J, Williams S, Keen D, Perrin Y, Christou P, Fischer R, 2000. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol Biol*, **42**: 583~590
- Tacket C O, Mason H S, Losonsky G, Clements J D, Levine M M, Arntzen C J, 1998. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med*, **4**: 607~609

- Tavladoraki P, Benvenuto E, Trinca S, De Martinis D, Cattaneo A, Galeffi P, 1993. Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature*, **366**: 469~472
- Tuboly T, Yu W, Bailey A, Degrandis S, Du S, Erickson L, Nagy E, 2000. Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine*, **18**: 2023~2028
- van Engelen F A, Schouten A, Molthoff J W, Roosien J, Salinas J, Dirkse W G, 1994. Coordinate expression of antibody subunit genes yields high levels of functional antibodies in roots of transgenic tobacco. *Plant Mol Biol*, **26**: 1701~1710
- Vaquero C, Sack M, Chandler J, Drossard J, Schuster F, Schillberg S, 1999. Transient expression of a tumor-specific single chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc Nat Acad Sci USA*, **96**: 11128~11133
- Verch T, Yusibov V, Koprowski H, 1998. Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *J Immunol Methods*, **220**: 69~75
- Voss A, Niersbach M, Hain R, Hirsch H J, Liao Y C, Kreuzaler F, 1995. Reduced virus infectivity in *N. tabacum* secreting a TMV-specific full-size antibody. *Mol Breed*, **1**: 39~40
- Wilson T M, 1993. Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen-derived resistance blossoms. *Proc Nat Acad Sci USA*, **90**: 3134~3141
- Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus Santos M J, Trono K, Peralta A, Gomez M C, 1999. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology*, **255**: 347~353
- Yuan Q, Clarke J R, Zhou H R, Linz J E, Pestka J J, Hart L P, 1997. Molecular cloning, expression, and characterization of a functional single-chain Fv antibody to the mycotoxin zearalenone. *Appl Environ Microb*, **63**: 263~269
- Yuan R, Clynes R, Oh J, Ravetch J V, Scharff M D, 1998. Antibody-mediated modulation of *Cryptococcus neoformans* infection is dependent on distinct Fc receptor functions and IgG subclasses. *J Exp Med*, **187**: 641~648
- Zimmermann S, Schillberg S, Liao Y C, Fischer R, 1998. Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in *Nicotiana tabacum*. *Mol Breeding*, **4**: 369~379