

叶绿体——疫苗生产新工厂

吕海丹 宋林霞 徐振彪*

(山东理工大学生命科学院, 淄博 255049)

摘要 以叶绿体为受体的叶绿体基因工程技术已经在工农业及医药生物技术领域发挥了重要作用。利用叶绿体为基因转移受体的叶绿体基因工程技术来生产疫苗是目前人们关注的焦点。现着重在叶绿体作为遗传工程受体的特点、叶绿体基因工程的研究进展,它在疫苗生产中的应用及发展前景等方面进行综述。

关键词 叶绿体; 基因工程; 疫苗

随着植物转基因技术的发展,以细胞核为受体进行基因转移所带来的一系列难以解决的问题引起了人们的注意,比如:表达效率低,不能进行多基因同时操作,安全性低,易污染等^[1],以叶绿体为受体的叶绿体基因工程技术不仅具有植物转基因技术的特点,而且也弥补了以细胞核为受体带来的种种不足,并已经在工农业及医药领域发挥了重要作用。

利用叶绿体基因工程技术生产疫苗是近年来生物技术领域研究的热点之一,并取得了一定的进展。叶绿体基因工程疫苗具有成本低、不易被病原菌污染、安全性好等优点。此外,这种疫苗在性能方面与常规方法生产的疫苗是相同的。尤其以叶绿体基因工程生产的植物性口服疫苗(oral vaccine)或可食疫苗(edible vaccine)是转基因植物疫苗的研究热点,也是其主要的发展方向,因为植物口服疫苗无需加工提纯和冷冻保存,使用方便,易于推广;另一方面,植物性口服疫苗对人体实现免疫只是简单地摄食含有疫苗的植物组织,通过机体肠道黏膜作用激发特异性免疫应答,从而使机体获得对相应疾病的免疫力;再有,这种疫苗也避免了因静脉注射带来的危险。

1 叶绿体基因工程的特点

1.1 叶绿体简介

叶绿体是高等植物和一些藻类所特有的能量转换器。一般呈椭圆形,它的双层膜结构使其与胞质分开,内有片层膜,含叶绿素,故名为叶绿体。光合作用就是在片层膜上进行的,绝大多数异养生物的有机物质与能量来源都是叶绿体光合作用提供的。

叶绿体能够作为遗传工程受体的一个主要原因是它的半自主性,叶绿体具有自身的DNA和蛋白质合成体系,是一种母系遗传的半自主性细胞器,说它

半自主性遗传是因为其只能合成自身需要的部分蛋白质,其余的蛋白质在胞质中游离的核糖体上合成,必需运到叶绿体才能发挥作用。叶绿体可由植物细胞中含色素或储存物的质体转变而来,也可通过自身分裂生殖得来。高等植物中,叶绿体含量丰富,每个细胞中有10~100个叶绿体,一般茎和叶细胞中含叶绿体较多,根细胞中含叶绿体较少,每个叶绿体中有10~100个基因组,将外源基因转化进去,在植物中达到同质化后,可表达的基因达100~10 000个。因此用叶绿体作受体可使基因表达获得高产量。

1.2 叶绿体作为基因工程受体的优点

同细胞核转化相比,以叶绿体为受体的基因转化具有以下特点:首先利用DNA同源重组能准确控制外源基因的插入位点,避免位置效应和基因沉默的产生,保证了外源基因的稳定表达^[2]。而且叶绿体基因组简单,其遗传物质呈双链环状,类似于原核生物基因组,同时又具备某些真核生物的特点,因而,有利于原核和真核的外源基因的直接表达^[3]。叶绿体基因组可处理多顺反子的能力及其精确、安全、高效等特点,更利于实现多基因共转化,且表达产物在叶绿体中可完成二硫键交联,正确折叠等转录修饰,使表达产物具备生物活性^[4,5]。此外,叶绿体属母系遗传,可避免作物与作物及作物与杂草之间的杂交,避免了细胞核转化可能造成的基因污染等环境安全隐患,消除公众对基因污染的忧虑,即使一些植物靠母系遗传的花粉仍然具有代谢活性,但质体DNA会随着花粉成熟而丢失,不会转移到下一代^[6]。质体编码的蛋白质也不会出现在花粉中出现,因此,不会对以花

收稿日期: 2006-09-19 接受日期: 2007-01-25

* 通讯作者。Tel/Fax: 0533-2781329, E-mail: slxch@163.com

粉或花粉的植物组织为食的昆虫产生影响^[7]。因此,叶绿体转基因植物具有较高的安全性。

2 叶绿体基因工程的研究进展

Boynton 等^[8]利用基因枪转化体系,在低等生物衣藻中成功实现了叶绿体转化,证实了叶绿体转化的可行性,同时也是首例成功的叶绿体转化报道,标志着叶绿体基因工程的诞生。Svab 等^[9]报道在高等植物烟草中实现了叶绿体转化, Daniell 等^[10]用基因枪法将氯霉素转移酶基因(CAT)导入叶绿体,在组培烟草细胞叶绿体中得到瞬间表达,为高等植物叶绿体基因工程提供了依据,由此,叶绿体基因工程迅速发展起来,而且其应用也日益完善。

叶绿体基因工程在提高光合效率,改善作物抗性 & 生物降解等方面已经卓有成效。例如, Kanevski 等^[11]将向日葵的 *rbcl* 基因转入烟草叶绿体中,以取代烟草自身的 *rbcl*, 结果发现转基因烟草中由向日葵的 Rubisco 大亚基和烟草的 Rubisco 小亚基构成了完整而有活性的酶,这为提高光合性能奠定了基础。在提高植物抗性方面也有很多成功的例子,比如:经过叶绿体表达的新 Bt 杀虫肽基因有几千个拷贝的表达量,对昆虫的毒杀力可达 100%,远远超过传统转化的 Bt 抗性^[12]。在生物降解方面,最近报道 PHAs 合酶 *phaC2* 基因在烟草叶绿体中转化成功,而且外源基因在转基因后代中遵循母系遗传规律,不存在转基因的花粉漂移现象,这将意味着一种新的生物降解物的商业化^[13]。此外,叶绿体基因工程还可应用于植物疾病防治等方面,而且应用范围也越来越广。

人类的血清蛋白(HSA)在烟草中得到高效表达,说明以叶绿体为受体表达药用蛋白成为可能^[14]。随即生长因子等陆续实现了在叶绿体中的高效表达。霍乱病毒B亚基(CTB)基因在叶绿体中高度积累而对细胞没有毒害,证明了以叶绿体为受体的基因转化在疫苗生产中的可行性^[2]。由此,叶绿体基因工程疫苗发展起来,并以独具的特色展示了其诱人的开发价值和广阔的应用前景。

3 叶绿体:疫苗生产新工厂

3.1 叶绿体转化得到治疗用蛋白质

人类治疗用蛋白质可以在叶绿体中实现表达,表达效率取决于外源基因的整合位点,增强转录和翻译的调控元件以及外源蛋白的稳定性等。许多成功的例子表明,叶绿体表达的大多数蛋白都能被正确折叠,

具生物活性。如胰岛素生长因子(IGF-1),它可引发神经蛋白质反应,促进骨头愈合。据报道,将其基因转入烟草叶绿体中时,可得到成熟的 IGF-1,表达量可达可溶蛋白的 32%^[15]。而且,人生长激素^[16]、人血清蛋白^[14]等也相继在叶绿体中得到高效表达。此外,人白细胞介素 4^[17]在衣藻叶绿体中的高效转化及表达,为进一步研究在衣藻叶绿体中高效表达外源蛋白打下了基础。

3.2 叶绿体基因工程生产疫苗

3.2.1 肝炎病毒抗原 范国昌等^[18]将甲型肝炎病毒 VP3P1 区和丙型肝炎病毒 C 区融合,并导入到衣藻叶绿体基因组中,融合蛋白得到高效表达,且具有双抗原活性。张中林等^[19]将丙肝病毒基因组非结构 NS3 区和核心抗原 C 区的 cDNA 片段中间加入连接肽,构成融合基 NS3-C,并将其导入到衣藻叶绿体基因中,融合蛋白表达获得成功。山松^[20]等将这一融合蛋白基因成功地导入到烟草叶绿体基因组,但没能获得同质化转基因植株。

3.2.2 霍乱病毒蛋白 B(CTB)抗原 CTB 抗原^[2]已经在叶绿体中转化成功,表达量可达到可溶蛋白的 31.1%。而且 CTB 在叶绿体中可以被组装成有功能的五聚体,它的抗原性和经过纯化处理的 CTB 是相同的。已经有实验证实经叶绿体转化的 CTB 可以黏附在肠的 GM1 神经节苷酯末端,并具有正常的生物学功能。这是首次报道利用叶绿体转化生产疫苗的例子,而且 CTB 在叶绿体中的高表达也预示着转基因植物疫苗的可商业化前景。

3.2.3 鼠疫疫苗抗原 鼠疫耶氏菌(*Y.pestis*),是一种革兰氏阴性细菌,它可以引发鼠疫。有几种亚基疫苗对鼠疫耶氏菌有免疫原性,其中 CaFI 和 LcrV 是对抗鼠疫耶氏菌最有效的两种抗原。FI 是一种定位在细菌表面的荚蛋白, V 抗原是鼠疫杆菌 III 型分泌物中的一种成分,将 F1-V 融合基因导入到烟草叶绿体基因组,融合蛋白表达水平最高可达总可溶蛋白的 14.8%,并能行使正常的功能^[15]。

3.2.4 犬细小病毒的抗原 2L21 肽可使狗抵御犬细小病毒(CPV),实验证明 CPV 与霍乱病毒 B(CTB)或绿色荧光蛋白(GFP)形成的聚合蛋白在烟草叶绿体中可以表达,而且有较高的表达量。其中 CTB 可保持其五聚态和黏附在 GM1 神经节苷酯末端的特性。从烟草中将这两种聚合蛋白(CTB-2L21\GFP-2L21)提取出来,注射到小鼠体内,结果发现注射 GTB-2L21 的小鼠全部产生对抗 2L21 肽的抗体,然而,注射 GFP-2L21

的小鼠只有 1/6 产生了抗体^[21]。

3.2.5 口蹄疫病毒抗原 口蹄疫(FMD)是由口蹄疫病毒引起的烈性传染病, 主要感染偶蹄兽。Sun 等^[22]将口蹄疫病毒抗原(FMDV VPI)与强黏膜免疫佐剂 CTB 亚基的融合基因重组到衣藻叶绿体表达载体中, 并采用基因枪法转化衣藻叶绿体, 获得了具有抗性的转化子。Western 印迹和 ELISA 免疫杂交分析表明 CTBVP1 融合蛋白在衣藻叶绿体中得到表达, 表达量占可溶性总蛋白量的 3%。GM-ELISA 结合分析证明衣藻叶绿体所表达的 CTBVP1 融合蛋白能够正确地折叠, 且具有生物学活性。

3.2.6 破伤风病毒抗原 破伤风(tetanus)病毒蛋白的多肽 C(tetC)片段, 可以用作预防破伤风的疫苗抗原。Tregoning 等^[23]将 tetC 基因在烟草叶绿体基因组进行表达, 为了增加 mRNA 的稳定性及在烟草叶片内表达的可行性, 他们将基因进行了密码子优化, 分别表达了未经改造的富含 AT(72.3%AT)和人工合成的富含 GC(52.5%AT)的基因, TetC-AT 和 TetC-GC 的表达量分别为总可溶蛋白的 25% 和 10%。实验证实, TetC 可使老鼠产生抗体。这项工作为利用植物生产安全的破伤风口服疫苗打下了基础。

3.2.7 炭疽抗原 炭疽是由炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)引起的一种急性传染病。传统的炭疽热抗原(PA)的生产方法往往会产生一些起副作用的有毒因子。Watson 等^[24]将编码 PA 的 *pagA* 基因导入到烟草叶绿体基因组, PA 的表达水平达总可溶蛋白的 18.1%。

3.3 可食疫苗或口服疫苗

Kumar 等^[25]报道了通过体细胞胚胎发生的方法成功实现了质体转化。他们使用非绿色质体转化外源 DNA, 用培养的转基因愈伤组织表达三甲胺乙内酯乙醛脱氢酶(BADH)。这些细胞不经过选择就已经是绿色的, 而没有转基因的细胞是黄色。与没有基因转化的细胞相比, 100 mmol/L NaCl 使转基因胡萝卜细胞中 BADH 的酶活性提高了 7 倍。

因为整合转基因质体的基因组是通过母系遗传的, 而且胡萝卜是两年生植物, 在生长的第一年不开花即可收获块状根。这些特性使胡萝卜作为制药作物不会对食用作物造成污染。胡萝卜体细胞胚胎来自于单个细胞, 通过多级胚胎发生增殖而生成, 而且可以在体外培养数年, 从而可提供统一的细胞源, 这对生产治疗性蛋白是必须的。胡萝卜细胞分裂速度快, 用作生物反应器能产生大量细胞。携带治疗性

蛋白的胡萝卜细胞不需烹饪, 可直接服用。此外, 利用人造种子技术, 体细胞胚胎可冷藏保存数年时间, 因此胡萝卜是生产药用蛋白和疫苗的理想材料。

4 展望

近几年, 人们不断的受疯牛病毒, 非典病毒, 禽流感病毒等流行性病毒的滋扰。目前常用的疫苗几乎都是用微生物或哺乳动物生产的, 不但生产成本低, 而且工序繁琐, 不适合普及应用。利用叶绿体基因工程生产疫苗, 不仅可以减少成本, 而且能提高产品安全性, 尤其是可食疫苗的开发, 可以让人们仅仅通过日常食用这些植物, 就可以获得对应某种疾病或病毒的抗体, 不但方便, 而且避免了由静脉注射引起的风险。但目前成功表达药用蛋白和疫苗等的叶绿体转基因植物还仅限于烟草。虽然胡萝卜^[25]、番茄^[26]、油菜^[27]、大豆^[28]、莴苣^[29]等叶绿体转化体系也相继建立但仍处于开发阶段。由于目前叶绿体表达调控机制尚未完全研究清楚, 转化技术并未成熟, 叶绿体基因工程只能成功应用到有限的物种中, 而像玉米、水稻、小麦等禾本科作物还未实现真正的转化。如果这些问题得以解决, 就可以把所有粮食作物中转入疫苗基因, 从而将饮食与保健防病结合起来, 那时叶绿体就真正成为人类疾病防御的新工厂了。随着叶绿体基因工程技术的不断完善, 相信在不久的将来叶绿体作为生物反应器将在医药领域发挥重要的作用。

参考文献(References)

- [1] Maliga P. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5: 164
- [2] Daniell H et al. *J Mol Biol*, 2001, 311: 1001
- [3] 王昌正等. *首都师范大学学报(自然科学版)*, 2003, 24: 68
- [4] 黎昊雁等. *中国生物工程杂志*, 2003, 23: 22
- [5] 李宏韬等. *遗传*, 2003, 25: 495
- [6] Heifetz PB. *Biochimie*, 2000, 82: 655
- [7] Bogorad L. *Trends Biotechnol*, 2000, 18: 257
- [8] Boynton JE et al. *Science*, 1988, 240: 1534
- [9] Svab Z et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 8526
- [10] Daniell H et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 88
- [11] Kanevski I et al. *Plant Physiol*, 1999, 119: 133
- [12] Kota M et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 1840
- [13] 王玉华等. *农业生物技术学报*, 2006, 14: 213
- [14] Daniell H et al. *Vaccine*, 2005, 23: 1779
- [15] Kumar S et al. *Methods Mol Biol*, 2004, 267: 365
- [16] Staub JM et al. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 333
- [17] 赵雅坤等. *华中农业大学学报*, 2006, 25: 110
- [18] 范国昌等. *科学通报*, 1999, 44: 1301
- [19] 张中林等. *遗传*, 1999, 21: 1
- [20] 山松等. *作物学报*, 2000, 26: 143
- [21] Molina A et al. *Plant Biotechnol J*, 2004, 2: 141

- [22] Sun M *et al. Biotechnol Lett*, 2003, **25**: 1087
[23] Tregoning JS *et al. Nucleic Acids Res*, 2003, **31**: 1174
[24] Watson J *et al. Vaccine*, 2004, **22**: 4374
[25] Kumar S *et al. Plant Physiol*, 2004, **136**: 2843
[26] Ruf S *et al. Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 870
[27] 侯丙凯等. *植物生理与分子生物学报*, 2002, **28**: 187
[28] Dufourmantel N *et al. Plant Mol Biol*, 2004, **55**: 479
[29] Lelivelt CL *et al. Plant Mol Biol*, 2005, **58**: 763

Chloroplast: A New Vaccine Making Factory

Hai-Dan Lv, Lin-Xia Song, Zhen-Biao Xu*

(College of Life Science, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

Abstracts Chloroplast genetic engineering has played important role in agriculture and medicine biotechnology field. Using chloroplast for the chloroplast genetic engineering technology for the production of vaccine is in the spotlight. This paper reviews the characteristic, process of the chloroplast genetic engineering and its using in vaccine making. Chloroplast genetic engineering will be a very good development prospects.

Key words chloroplast; genetic engineering; vaccine

Received: September 19, 2006 Accepted: January 25, 2007

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-533-2781329, E-mail: slxch@163.com