

植物表达抗体的研究与发展

张志宏 吴禄平

(沈阳农业大学果树园艺系, 沈阳 110161)

摘要 利用植物表达抗体是近年来兴起的植物基因工程的一个新领域. 它将编码抗体或抗体片段的基因导入植物, 从而在植物中产生全长抗体或抗体片段. 利用植物表达抗体最诱人的潜在用途是可以大规模廉价生产治疗和诊断用抗体. 此外, 植物抗体还能够通过调控植物代谢改良植物性状并赋予植物对病虫害的抗性. 目前植物抗体的商品化还存在一些问题.

关键词 植物抗体, 转基因植株, 基因表达, 免疫治疗

学科分类号 Q78

近年来, 随着植物生物技术的发展, 利用转基因植物生产异源蛋白已成为一种最具诱惑力的途径. 与微生物反应器和动物反应器相比, 植物反应器的最大优点是可以大规模、廉价生产异源蛋白. 在众多的异源蛋白中, 抗体 (antibody) 是非常令人感兴趣的. 把动物或人的编码抗体基因导入植物, 从植物中生产出的抗体被称为植物抗体 (plantibody)^[1]. 植物抗体具有许多潜在用途, 例如作为医用治疗药剂和诊断试剂, 改良作物性状 (包括抗病虫性), 亦可用于植物基础机理研究.

1 植物表达抗体的研究状况

1.1 在植物中表达全长抗体

1989年, Hiatt等^[2]在世界上首次报道在植物中能够表达抗体, 而且是全长抗体 (full length antibody). Hiatt等将鼠杂交瘤细胞产生的单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb) ——6D4的轻链 (κ) 和重链 (γ) 基因分别导入烟草细胞, 然后用分别表达 6D4 轻链和重链的烟草转基因植株相互杂交, 获得既表达轻链又表达重链的转基因植株, 经 ELISA 分析, 转基因植株产生的抗体具有结合 6D4 抗原——P3 的专一性, 亲和性同杂交瘤细胞产生的亲本抗体相同. Hiatt等研究证实 IgG 链在植物细胞中能够组装成功能性抗体, 而且组装

是非常有效的, 抗体量可达叶总蛋白的 1.3%. 他们还发现, 如果导入编码抗体链的基因没有 IgG 本身的信号序列 (signal sequence), 那么转基因植株就不能组装出功能性抗体. 因此, Hiatt 等推测植物与杂交瘤以相似的方式组装抗体.

随后, Düring 等^[3]在 1990 年报道在烟草中获得表达全长功能性抗体. 采用的策略与 Hiatt 等^[2]的研究策略稍有不同, 他们应用一个同时含有编码 B1~8 抗体轻链 (λ) 基因和重链 (μ) 基因的植物表达载体, 抗体基因与大麦的 α 淀粉酶信号序列相连. 这一策略省略了有性杂交过程. 免疫标记分析结果表明, 转基因植株表达的 IgM 主要分布在内质网 (ER) 中, 少部分在细胞质及叶绿体中. Düring 等的研究结果证实了 Hiatt 等^[2]关于装配全长抗体需要把抗体链转运到 ER 腔的推测. 因此, 无论抗体基因来源如何, 若要在植物细胞中累积全长抗体, 最重要的是基因上要有 ER 靶向序列.

Hiatt 等^[2]和 Düring 等^[3]的研究都指出, 抗体与 ER 结合意味着抗体有可能通过植物细胞的分泌途径分泌到细胞外. 结果, 1996 年, de Wilde 等^[4]报道拟南芥转基因植株表达的全长 IgG 分子能够从细胞中分泌到细胞间隙,

收稿日期: 1997-01-13, 修回日期: 1997-05-08

并且首次展示植物抗体在胞间累积. 细胞壁能限制 17~60 ku 分子排出, 而 IgG 分子为 146 ku, 因此, 拟南芥叶肉细胞壁使 146 ku 的 IgG 分子通过的现象令人奇怪. de Wilder 等的研究结果是特别令人感兴趣的, 因为植物抗体分泌到胞外意味着从植物中提取, 纯化抗体将既经济又容易, 而且抗体可以在胞外结合抗原, 从而赋予植物对病原菌的抗性.

植物细胞具有产生全长抗体的能力导致人们探索在植物中表达 Fc 介导性质发生改变的抗体分子. 在保持抗体在植物细胞中正确组装前提下, Ma 等^[5]对编码 Fc 结构区的基因片段进行切割和拼接, 用 IgA 的 Ca2 和 Ca3 结构区代替 IgG 的 C γ 2 和 C γ 3 结构区. 这一改造, 提高了 Fc 区介导的保护功能, 但对结合抗原的亲合性没有影响. 另外, Ma 等还构建了表达 IgA-IgG 重链 (C γ 1-C γ 2-Ca2-Ca3) 的基因, 从而实现对恒定区数目的改变 (这种 IgA-IgG 重链的长度比正常重链长). 嵌合的 IgA-IgG 重链不仅把 IgA 和 IgG 的 Fc 区功能结合在一起, 而且其识别抗原能力及与轻链结合能力没受任何影响.

1.2 在植物中表达抗体片段

单链 Fv (single chain Fv, scFv) 抗体是免疫球蛋白重链可变区与轻链可变区通过一条短肽连接而成的重组多肽, 是结构简单的抗体片段. scFv 来源于范围广泛的 mAb, 基本保持了亲本 mAb 对抗原的亲合力. 与全长抗体分子相比, scFv 不需要组装, 只需要正确折叠就能具有结合抗原功能. scFv 体积小, 因此非常有利于在细胞中表达、定位. 理论上 scFv 可以定位于细胞中任何部位及非原生质空间, 因此 scFv 用途广泛. scFv 基因比较容易获得, 特别是抗体库 (antibody library) 技术的发展^[6]为获取具有不同用途的 scFv 基因提供了丰富的源泉.

Owen 等^[7]首先成功地实现在植物细胞中表达 scFv. 他们利用 PCR 技术, 从鼠杂交瘤——AS32 的 cDNA 中克隆分离了编码 IgG1 的 scFv 的基因. 把 CaMV35S 启动子调控下的

scFv 基因导入烟草后, scFv 基因在转基因植株中高水平表达. IgG1 具有结合植物光受体调节分子光敏素 A 的功能, 表达 scFv 转基因植株的种子对光控萌发的依赖性降低. 另外种子萌发率降低了约 40%, 据推测这是由于 scFv 与光敏素 A 结合从而导致光敏素 A 不能行使正常功能引起的. 这是在植物中利用抗体结合胞内抗原从而改变植物代谢的第一次成功报道. Owen 等的成功为人们通过抗体来调控植物代谢途径展示了广阔前景.

2 植物表达抗体的应用前景

2.1 大量生产治疗和诊断用抗体

抗体免疫治疗的潜力是巨大的, 多年来一直备受人们关注. 应用 mAb 治疗人类疾病已显示出一定的成功, 但是这需要有足够的抗体. 植物表达系统生产抗体的最大优势是可以大规模廉价地生产, 从而满足抗体免疫治疗的需要. 据估计, 基于 1990 年消费, 如果表达水平为总蛋白的 1%, 那么在大豆中生产 1 g 抗体的费用是 0.1 美元^[8]. 另外, 与微生物表达系统相比, 植物表达系统的优势是植物中的抗体能够很好地糖基化, 这是抗体分泌到胞外空间所必须具备的.

用植物抗体进行局部免疫治疗将是一个引人注目的领域. 应用高亲和性抗体进行局部治疗可以防治龋齿及其他疾病. 分泌性 SIgA (SIgA) 是人类口腔和所有粘膜位点产生的最主要抗体, 在这些位点, SIgA 比 IgG 更为有效. 迄今, 获得大量 SIgA 仍然相对困难, 而用植物生产能解决这一问题. 用植物生产 SIgA 另一引人注目的优点是用可食性食物 (特别是水果、蔬菜) 表达 SIgA, 从而实现口服免疫^[9]. 这将省去从植物中分离纯化抗体过程, 大大降低费用. SIgA 是以分泌型组装, 导致对蛋白酶抗性增加, 从而也增加了其稳定性. 因此, SIgA 可以作用于包括胃肠道在内的所有粘膜位点.

英国科学家 Ma 等系统地进行植物生产 IgA 及 SIgA 的研究. 1994 年, Ma 等^[5]报道

在烟草植株中产生杂合的 IgA-G 分子, 这种植物产生的 IgA-G 分子对引起人类龋齿的变异链球菌——*Streptococcus mutans* 有识别和聚集作用, 从而展示出植物抗体在活体状态下如何阻止细菌移殖. 1995 年, Ma 等^[10]报道在植物中表达组装完整的 SIgA 分子. 他们对分别表达 κ 链, 杂合 IgA-G 重链, 连接链 (J 链), 分泌成分 (SC) 的 4 个烟草转基因植株进行一系列杂交, 最终获得了表达高分子质量、分泌型、具抗体功能 SIgA 的烟草转基因植株. 这种 SIgA 与 IgA-G 对于 *S. mutans* 具有同样的作用, 而且比 IgA-G 更抗蛋白酶的作用. Ma 等的研究结果还证明, 植物单一的叶细胞就能生产复杂的 SIgA 分子. 而在哺乳动物生产系统, 这则要两种不同类型细胞来完成.

2.2 提高植物抗病虫性

抗体工程将成为植物抗病虫基因工程中一种新技术策略. 把编码全长抗体的基因导入植物, 通过信号序列使抗体在植物细胞中通过分泌途径分泌到胞外, 将是赋予植物抗病病原菌危害的一条行之有效途径, 而将编码 scFv 的基因导入植物, 使之在细胞质中高效、稳定表达, 将是培育抗病毒及抗虫植物的极具潜力方法.

Tavladoraki 等^[11]把编码对 AMCV (artichoke mottled crinkle virus) 有作用的 scFv 的基因导入烟草细胞, 获得的转基因植株抗 AMCV 侵染, 表现为发病率降低, 发病延缓. Tavladoraki 等的研究结果使人们看到了利用“胞内抗体免疫技术”防止病毒及害虫危害的曙光. 而 van Engelen 等^[12]和 de Wilde 等^[4]分别在烟草和拟南芥的胞间表达全长抗体的成功则给人们展示了利用抗体防止病原菌危害的可能性.

2.3 调控植物代谢

在植物中, 初生和次生代谢产物的生物合成途径是复杂的, 而且受高度调节. 进入 90 年代后, 通过基因工程手段调控植物的研究逐渐兴起, 并且被预言为今后几年的一个重点发

展领域^[13, 14]. 通过代谢调节, 可以调控植物的生长发育, 可使植物高水平积累某一有价值产物. 目前, 调控代谢的基因工程策略主要有两种, 一是导入一个异源基因, 从而促使某一产物的形成和累积; 二是抑制某一内源基因的表达, 这主要是通过反义 RNA 技术来实现的. 胞内抗体技术^[15]是继反义 RNA 技术之后的一种新型代谢调控技术, 它是利用重组 DNA 技术, 在植物细胞中空间特异性表达具有活性的抗体分子, 从而特异性干扰或阻断某些生物大分子的合成、加工和分泌过程, 导致细胞一系列生物过程发生改变. 植物细胞质呈高还原性, 抗体链在这种条件下通常不能形成二硫键, 从而难以组装成完整抗体分子, 由于 scFv 不需要组装, 就调控发生在细胞质代谢途径而言, scFv 比全长抗体分子更具优势.

3 植物表达抗体的应用问题

用植物表达系统生产医用抗体的一大优势是价格低廉, 但是抗体同其他异源蛋白一样在植物细胞中的表达水平是较低的, 而且绝大多数植物本身蛋白质含量都较低, 因此, 表达水平低更是一个突出问题. 随着分子生物学发展, 提高异源蛋白在转基因植株中表达水平已有很多的可行性方法, 包括选择适当的启动子, 使用增强子, 选择合适的信号序列, 使异源蛋白在细胞空间特异性表达, 在不影响异源蛋白结构功能的前提下, 优化密码子, mRNA 不稳定序列的切除, 协同表达二硫键异构酶或伴侣蛋白以促进蛋白质的正确折叠. 植物表达抗体研究中已开始采用上述方法^[2, 3, 5]. 虽然旨在提高抗体在植物中表达水平的综合方法尚未见报道, 但可以相信, 上述方法的综合使用有可能使抗体在植物中表达水平成倍增加.

抗体的糖基化对于其分泌到胞外空间是必须具备的前提. 植物细胞具有使抗体糖基化的功能, 但是植物细胞中的糖基化形式与哺乳动物细胞有所不同, 因此特异位点的糖基有可能增加植物抗体引起的免疫反应. 这看起来不太可能, 因为人们每天都从植物食物中摄入很多

糖蛋白,但是作为治疗用抗体,其糖基化特异位点是一个需要关注的问题.

虽然抗体在植物中表达水平还较低,但是植物上游生产成本比其他系统都廉价,如果纯化步骤是必需的,那么抗体下游加工应当是经济的,也就是说上游廉价生产优点不应该被下游加工费用所抵消.从植物中有效分离纯化抗体还处于研究阶段.另外,植物的一些次生代谢产物也应引起人们的关注,因为它们有可能在纯化抗体时与抗体分子一同被分离出来,因此对于从植物中分离出的医用抗体,必须对其纯度进行严格鉴定.

利用植物表达抗体的研究还不足 10 年时间,目前还主要是以转化的模式植物(如烟草)为研究对象.近来,随着植物转基因技术的发展^[16],已有近百种植物获得转基因植株,其中包括几大主要粮食作物及一些重要经济作物.因此,今后植物表达抗体的研究将主要以这些重要作物为研究对象,从而为植物抗体的商品化逐渐铺平道路.

参 考 文 献

- Smith M D. Antibody production in plants. *Biotechnology Advance*, 1996, **14** (3): 267~ 281
- Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish B. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 1989, **342** (6245): 76~ 78
- Düring K, Hippe S, Kreuzaler F *et al.* Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiniana tabacum*. *Plant Mol Biol*, 1990, **15** (2): 281 ~ 293
- de Wilde C, de Neve M, de Rycke R *et al.* Intact antigenn-binding MAK33 antibody and F_{ab} fragment accumulate in intercellular spaces of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 1996, **114** (2): 133~ 141
- Ma J K-C, Lehner T, Stabila P *et al.* Assembly of monoclonal antibodies with IgG1 and IgA heavy chain domain in transgenic tobacco plants. *Eur J Immunol*, 1994, **24** (1): 131~ 138
- 王 学, 王海涛. 抗体库的发展及未来. *生物化学与生物物理进展*, 1996, **23** (4): 312~ 316
- Owen M, Gandeche A, Cockburn B *et al.* Synthesis of a functional anti-phytochrome single-chain Fv protein in transgenic tobacco. *Bio/Technology*, 1992, **10** (7): 790~ 794
- Whitelam G C, Cockburn B, Gandeche A R *et al.* Heterologous protein production in transgenic plants. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1993, **11**: 1~ 29
- Mason H S, Arntzen C J. Transgenic plants as vaccine production systems. *Trends in Biotechnology*, 1995, **13** (9): 388~ 392
- Ma J K-C, Hiatt A, Hein M *et al.* Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science*, 1995, **268** (5211): 716~ 719
- Tavladoraki P, Benvenuto, Trinca S *et al.* Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature*, 1993, **366** (6454): 469~ 472
- van Engelen F A, Schouten A, Molthoff J W *et al.* Coordinate expression of antibody subunit genes yields high levels of functional antibodies in roots of transgenic tobacco. *Plant Mol Biol*, 1994, **26** (6): 1701~ 1710
- Goddijn O J M, Pen J. Plants as bioreactors. *Trends in Biotechnology*, 1995, **13** (9): 379~ 387
- Herbers K, Sonnewald U. Manipulating metabolic partitioning in transgenic plants. *Trends in Biotechnology*, 1996, **14** (6): 198~ 205
- Richardson J H, Marasco W A. Intracellular antibodies: development and therapeutic potential. *Trends in Biotechnology*, 1995, **13** (8): 306~ 309
- Songstad D D, Somer D A, Griesbach. Advances in alternative DNA delivery techniques. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 1995, **40** (1): 1~ 15

Research and Development of Expressing Antibodies in Plants. ZHANG Zhi-hong, WU Lurping (*Department of Pomology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China*).

Abstract Expressing of antibodies in plants is one of the fields of plant gene engineering, which was developed recently. It refers to introducing into plants and expressing in them the genes encoding antibodies or antibody fragments. The most intriguing potential of expressing of antibodies in plants is inexpensive large-scale production of antibodies for therapeutic and clinical use. In addition, altering traits is possible by manipulating plant metabolism using plantibodies. This approach could also be applied to conferring pathogen and insect resistance to plants. At present, there are still some questions about plantibodies commercialization.

Key words plantibody, transgenic plant, gene expression, immunotherapy