

文章编号 :1003-8701(2003)02-0051-04

转基因植物生产口服疫苗的研究进展

杜娟,王 罡

(中国人民解放军军需大学植物基因工程研究中心,吉林 长春 130062)

摘 要 :概述了利用转基因植物生产口服疫苗的研究现状。分别对转基因植物生产口服疫苗的优点、作用原理、研究方法、已研究的口服疫苗及问题和前景进行了介绍。

关键词 :转基因植物 ;口服疫苗 ;生物技术

中图分类号 :Q943.2

文献标识码 :A

随着植物基因表达调控的深入研究,将外源基因转入植物的技术应运而生,这不仅使人们得以利用该技术设计改良植物的性状(如抗除草剂、抗虫和抗病等作物新品种的产生),而且转基因植物可作为有效表达系统生产许多重要重组蛋白。利用转基因植物生产基因工程疫苗,是将抗原基因导入植物,使其在植物中表达,人或动物摄入该植物或其中的抗原蛋白质,以产生对某抗原的免疫应答。

1 植物生物技术的发展

1.1 细胞培养技术

自从 White 和 Gatheret 在 1939 年用实验方法培养植物组织和器官以来,经过科学家们半个多世纪的努力,目前植物细胞和组织培养技术已经发展成一门精细的实验科学,在选材消毒、接种培养、诱导筛选、再生转化、继代保存、分离鉴定和工业化生产等方面已经建立了一套标准的操作程序,成为现代生物技术的重要组成部分之一。植物的体细胞具有全能性,即单个细胞经过合适的培养,通过愈伤组织器官分化或体细胞胚胎分化途径形成完整的植物。此外,不同来源的外植体或不同器官经过培养也可以形成完整的植物,为转基因植物的研究提供了重要的技术保证。

1.2 转化系统

由于原生质体失去了细胞壁这个“外壳”,而成为良好的转化系统。当外界存在有合适浓度的 PEG 或磷酸钙时,通过共同培养使原生质吸收外源 DNA 或通过高压电场的作用使外源 DNA 进入,完成转化。此外,子房、胚、花药等器官和培养细胞也可成为转化系统。

1.3 基因分离

目前已有许多方法可以将动物、植物、微生物,甚至人类的特异基因分离出来,为基因转移和表达的研究提供丰富的基因来源。启动子加入为了使外源基因能在植物细胞中有效而稳定的表达,必须使其整合到受体细胞染色体组中并复制。通过将分离的基因与来自植物、病毒或细菌的启动子相连接,然后转移到受体细胞并顺利表达。其中,花椰菜花叶病毒(CaMV)35 s RNA 启动子是经常使用的一种。此外,玉米 ubiquitinI 启动子和水稻肌动蛋白启

收稿日期 2002-07-30,修回日期 2002-11-20

基金项目 :“国家植物转基因中试及产业化基地”专项课题(J99-B-001)

作者简介 :杜娟(1966-),女,长春市人,解放军军需大学助理研究员,学士,主要从事植物基因工程研究。

动子/ 内含子顺序经常用于外源基因在单子叶植物中的表达。

1.4 遗传标记

为了尽快在转化产物中筛选到具有外源基因特性的转化子,一般除了使外源基因与启动子连接以外,还加有遗传标记,如带有抗菌素的标记、酶活性标记等。附加调节顺序往往使所构成的 DNA 构成了组成转录或翻译融合单位,更有利于表达。

2 转基因植物生产基因工程疫苗的基本原理和方法

自 1983 年首次报道植物的遗传转化以来,这项技术已用于世界上几乎所有的主要作物。目前把外源基因导入植物的方法主要有两种:一种为农杆菌介导法,农杆菌是一种土壤细菌,它能够把其质粒上的 DNA 片段转移到植物细胞并稳定地整合到植物核基因组中;另一种是生物爆破系统,它是用 DNA 包被金或钨粒,使颗粒加速,然后穿过植物细胞壁,把 DNA 带入细胞核或细胞器基因组。广泛使用的方法是农杆菌介导法,目前所有表达抗原蛋白的转基因植物都是采用农杆菌介导法,该法的简单步骤是:①选定编码抗原蛋白的基因;②构建载体,把目的基因整合到载体上;③把载体质粒导入农杆菌;④用农杆菌转化植物,使植物带有编码抗原蛋白的基因;⑤抗原蛋白基因在植物中表达,从植物中提取抗原蛋白,如果具有所需特性,则重新构建载体,使其在植物的食用部位表达;⑥根据人和动物使用后的反应,确定可行与否。

3 利用转基因植物生产疫苗优点

①与动物细胞培养相比,植物细胞培养条件简单且易于成活,这有利于遗传操作;②植物培养细胞具有全能性,能够再生植株;③转基因植物中的外源基因可通过植物杂交的方法进行基因重组,进而在植物体内积累多基因;④转化植株系的种子易于贮存,有利于重组蛋白的生产和运输;⑤用动物细胞生产重组蛋白,可能污染动物病毒,这对人类可能造成潜在危险,而植物病毒不感染人类,所以用植物细胞生产重组蛋白更为安全;⑥植物细胞有与动物细胞相似的结构和功能,有利于重组蛋白的正确装配和表达。

4 转基因植物生产基因工程疫苗的应用研究

转基因植物生产疫苗的研究主要集中在烟草、马铃薯、蕃茄和香蕉等植物。

4.1 烟 草

第 1 例利用转基因植物生产疫苗就是利用烟草,当时(1990 年)是用烟草表达链球菌变异株 SpaA 蛋白疫苗,接着 Amtzen 利用转基因烟草生产防治霍乱和腹泻的疫苗。1992 年 Mason 将乙肝病毒表面抗原基因转入烟草生产乙肝疫苗。疟疾孢子虫抗原也在烟草中得到表达。Curtiss 等将链球菌属的一个表面蛋白抗原基因 (spaA) 转入烟草获得表达,它在叶片中占总可溶蛋白的 0.02%。将含 SpaA 的转基因烟草饲喂小鼠后诱导了抗 SpaA 的粘膜免疫应答。1992 年,Arntzen 领导的研究小组报道了利用转基因植物生产乙型肝炎疫苗的研究结果,他们将 HBsAg 基因转入烟草获得转基因植株,HBsAg 转基因烟草的表达水平为总可溶蛋白的 0.01%,从转基因烟草的叶子中提取的 HBsAg 组成平均为 22 nm 的颗粒,其浮力密度和免疫原性与人和酵母来源的 HBsAg 都相似,表明在植物中成功的保持了蛋白质折叠的特性。以重组的 HBsAg 免疫小鼠,其免疫反应与商品化的 HBsAg 疫苗相似,产生了 IgM 和所有的 IgG 亚基,并使 T 细胞增殖,这表明转基因植物表达的抗原保留了激发 B 细胞和 T 细胞免疫反应的抗原决定簇。

4.2 马铃薯

1995 年 Mason 又将乙肝病毒表面抗原基因转入马铃薯中表达,用薯块饲喂小鼠后,产生了免疫应答。Amtzen 也将大肠杆菌肠毒素基因导入马铃薯,同样用薯块喂小鼠也产生了免疫应答。2000 年, Tacket 等报道了转基因马铃薯生产的洛沃克病毒抗原的临床试验,24 名健康志愿人群中,有 20 人服用了 2~3 剂转基因马铃薯(未经烹饪的块茎),有 4 人服用了 3 剂非转基因马铃薯(未经烹饪的块茎),每剂转基因马铃薯中含 215~751 μg 洛沃克病毒外壳蛋白,服用转基因马铃薯的 20 名志愿者中有 19 人(占 95%)产生免疫应答,显著增加分泌特异性 IgA 抗体的细胞数目,有 4 人(20%)产生特异性血清 IgG,有 6 人(30%)产生特异性的 IgA 抗体。同时对志愿者服用马铃薯后进行安全性检测,出现恶心、呕吐、发烧、痉挛、腹泻等症状的概率在实验组和对照之间没有差别。最普遍的症状是恶心,20 名服用转基因马铃薯的志愿者中有 4 人(20%)感到恶心,5 人(25%)出现轻微痉挛;4 名服用非转基因马铃薯的志愿者中有 1 人(25%)感到恶心,2 人(50%)出现轻微痉挛,说明这些轻微的不良反应是由于食用的马铃薯未经烹饪引起,而不是食用转基因疫苗引起。利用烟草和马铃薯生产疫苗是为了方便研究的需要,因烟草是转基因植物的模式植物,但烟草不能口服,人类亦不能生食马铃薯,因熟食会破坏蛋白质疫苗。为此,1995 年以来开展以蕃茄、香蕉生产口服食品疫苗。

4.3 蕃茄

蕃茄中已表达了狂犬病毒糖蛋白,天花病毒表面抗原也在蕃茄中表达成功。

4.4 香蕉

香蕉为世界上第 4 大水果,有些基因已在香蕉中表达成功。此外还有莴苣表达乙肝病毒表面蛋白等的报道。

5 转基因植物生产疫苗存在的问题和对策

尽管转基因植物生产基因工程疫苗有许多优点,但就目前技术而言,仍存在疫苗在植物中的表达水平较低、提纯困难、口服时有被消化的可能等问题。为在植物中获得较高的表达水平,在进行遗传操作时应考虑下列因素:选用合适的强启动子(如花椰菜花叶病毒 CaMV 的 35s 启动子,该启动子在大多数植物细胞内都能启动外源基因的表达)、增强子和前导序列,对密码子进行优化,去除不稳定的 RNA 序列,选择适当的植物表达载体等方法来实现。为了防止口服时被消化降解,可在抗原基因附近加上一些修饰基因或吸附基因序列来保护口服疫苗不被迅速消化,从而可长时间停留在消化系统内。为便于植物生产疫苗的提取纯化,人们发展了外源基因与植物的特异蛋白质基因及基因调控序列连接的融合表达系统,使重组蛋白在植物中的表达具有器官和组织特异性,可大大提高外源蛋白的表达量。这样可简化蛋白的提取纯化过程。如将 GUS 基因与油质蛋白融合表达,种子中 80% 的重组蛋白结合在油体上,这相当于重组蛋白富集了 13 倍,分离种子中的油体,通过特异性内切酶作用将 GUS 蛋白从油体表面释放出来,从而获得有活性的 GUS,这些问题都有待于进一步探讨。随着基因免疫研究的深入,人们将能够了解病原体与疾病免疫的确切关系,知道一种病原体的各种成分诱发了何种免疫成分的产生,同时有助于更好地理解效应免疫和记忆免疫的机制。在实际应用方面,基因疫苗也有着重要的意义。(1)基因疫苗是疫苗的第三次革命。这种第三代疫苗将为预防传染性疾病和肿瘤的基因治疗等开辟新的道路。它使疫苗的制备更加科学合理,通过研究可以知道哪些基因应当包括 DNA 疫苗,筛选出能够诱导出保护性免疫的抗原成分。(2)利用基因免疫研究单个蛋白质诱导免疫反应,分离或合成某个蛋白质的基因,制备出基因疫苗,研究其初次免疫应答的机制。(3)基因免疫是生产单克隆抗体的有用技术。先

分离相应的基因,构建真核基因表达载体,免疫后得到抗体。我们有理由相信,采用转基因植物生产基因工程疫苗的研究必将为各种廉价疫苗的生产开拓更广阔的前景。

参考文献:

- [1] 焦瑞身,李戴平,李致勋,等.细胞工程[M].北京:化学出版社,1998.
- [2] Walden R, Wingender R. Gene transfer and plant regeneration techniquea[J]. Tibtech, 1995, 13(9): 324-331.
- [3] Songstad D D, Somers D A, Griesbach R J. Advance sin alter natire DNA delivery techniques[J]. Plant Cell Tis Qrg Cul, 1995, 40 (1): 1-55.
- [4] Goddijn O J M, Pen J. Plants as bioreactors[J]. Tibtech, 1995, 13(19): 379-387.
- [5] Tacket C O, Mason H S. Are view of oral vaccination with transgenic vegetables [J]. MicrobesInfect, 1999, 1 (10): 777-831.
- [6] Mason H S, Lam D K, Arntzen C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants [J]. Proc Natl. Acad. Sci., USA, 1992, 89 (24): 11745-11749.
- [7] Mason H S, Arntzen C J. Transgenic plants as vaccine production systems[J]. Trends Biotechnol, 1995,13: 388-392.
- [8] Mason H S, Lam D M K, Arntzen C J, et al. Expression of hepatitis B surface antigenin transgenic plants [J]. Proc Natl. Acad. Sci., USA, 1992, 89: 11745-11749.
- [9] Antzen C T, Mason H S. Oral vaccine production in the edible tissues of transgenic plants [A]. Levine M M. New Generation Vaccines[M]. Second Edition. Marcel Dekker, New York, 1997, 263-277.
- [10] Mc Garvey P B, Hammond J, Dienelt M M, et al. Expression of the rabies virus glyco protein in transgenic tomatoes[J]. Bio/Technol, 1995, 13: 1484-1487.
- [11] Mason H S, Ball J, Shi J J, et al. Expression of Nor walk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immuno genicity [J]. Proc Natl. Acad. Sci., USA, 1996, 93: 5335-5340.
- [12] Haq T A, Mason H S, Clements J D, et al. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants [J]. Science, 1995, 288: 714-716.
- [13] Mason H S, Haq T A, Clements J D, et al. Edible vaccine protects mice against Escherichiacoli h eatlabile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene [J]. Vaccine, 1998, 16: 1336-1343.
- [14] Arakawa T, Chong D K X, Langridge W H R. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine [J]. Nature Biotechn, 1998, 16: 292-298.
- [15] Tackef C O, Mason H S, Losonsky G, et al. Immuno genicity in human so far ecombinant bacterial antigen deliverrein a transgenic potato [J]. Nature Medicine, 1998, 4: 607-609.
- [16] Gomez N, Carrillo C, Salinas J, et al. Expression of immuno genic glycoproteins polypeptides from transmissible gastroenteritisc or on a virus in transgenic plants [J]. Virology, 1998, 249: 352-358.
- [17] Carrillo C, Wigdorovitz A, Oliveros J C, et al. Protective immuneresponse to foot and mouth disease virus with VP1expressed in transgenic plants [J]. Jvirol, 1998, 72: 1688-1690.
- [18] Garyht. Plant biotechnology and developing counties [J]. Trends in Biotechnology, 1995, 13: 404-409.
- [19] Masonh S, Land M K, Armtzen J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants [J]. Proc Natl. Acad. Sci., US-A, 1992, 89: 11745-11749.
- [20] Aqta A, Masonh S, Clements J D, et al. Oral immunization with are combinant bacterial antigen? Produced in transgenic plants [J]. Science, 1995, 268: 714-716.
- [21] Mc Garveyph, Hammon D J, Dienelt M M, et al. Expression of the rabies virus glycop rote in ansgenic tomatoes [J]. Bio/Tech-nology, 1995, 13: 1484-1487.
- [22] May G D, Afza R, Mason H S, et al. Generation of transgenic banana (musa acum in ata) plants via agro bacterium-mediated transformation [J]. Bio/Technology, 1995, 13: 486-492.

The study of Oral Vaccines Produced in Transgenic Plants

DU Juan ,WANG Gang

(Research Center for Plant Genetic Engineering, The Quartermaster
University of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract: The study of oral vaccines produced in transgenic plants was reviewed in this paper. We focused on some key areas such as the advantages, working principle methods, oral vaccines successfully produced in plants, problems and prospects of oral vaccines.

Key words: Transgenic plants; Oral vaccines; Biotechnology