

抗体在植物中的表达及应用前景

Expression of Antibody in Plants and Its Prospect for Application

赵 丰 田 波

(中国科学院微生物所)

抗体是动物机体在外源物质(抗原)的刺激下由免疫系统及淋巴细胞产生,并能与抗原特异结合的免疫球蛋白。抗体作为机体自然免疫系统的一部分,具有特异性结合抗原、中和病毒以及与血清中一种被称为“补体”的蛋白质协同完成免疫应答反应等生物学功能,可用于治疗和诊断。抗原抗体的关系类似钥匙与锁的关系,一把锁只有相应的钥匙可以打开。正是由于抗体的高度特异性、亲和性及其性能的多样性,使抗体成为一种具有特殊用途的蛋白。成熟的抗体由抗体的重链和轻链双链组成,而结合抗原的单链抗体及催化抗体的设计进一步拓宽了抗体的应用范围。近年来,抗体已经在包括骨髓杂交瘤细胞、酵母及大肠杆菌的非淋巴细胞体系中获得功能性表达、分泌和组装,形成一门新型的学科——抗体生物工程。抗体生物工程是指以生物技术为手段,将动物淋巴细胞产生的抗体基因人为地在非淋巴细胞中有效表达的综合技术。同其它生物工程的研究一样,抗体生物工程的视线也投向被誉为“绿色宝库”的植物。

美国医学生物学家希亚特(Hiatt)自80年代起一直致力于探索植物中表达抗体的潜能。他于1989年报道了抗体在植物中的功能表达。他的研究结果说明,动物机体产生的抗体也能够植物中功能表达,打破了动植物种属之间的界限,引起生物界的高度重视。就目前的研究结果来看,抗体在植物中表达的种种设想,如研究植物的生物学基础,开发具有新的结合性能或催化活性的理想植物种类,大量生产用于植物性状研究、医学诊断和治疗的抗体等,在技术上看来是可行的。

抗体的合成和组装

抗体是分泌或结合在膜上的糖蛋白,它包括两条轻链和两条重链,链间通过非共价键和二硫键彼此连接,构成具有一定空间结构的复合分子。重链

和轻链又分别划分为可变区(Variable Region)和保守区(Constant Region)。可变区的氨基酸排列顺序随抗体的特异性不同而异,保守区的氨基酸序列则相对稳定。免疫球蛋白(IgG)多肽通常以“前体”(precursor)的形式合成。前体包含一段“信号肽”(signal peptide)。信号肽负责前体转移至细胞的内质网。前体在内质网内的一种与重链结合的辅助蛋白辅助下加工组装成为成熟的功能抗体。在动植物的其它非淋巴细胞中也存在类似辅助蛋白。

抗体在植物中的表达

1989年,希亚特在《自然》杂志上首次报道了抗体在植物中高效功能表达的研究结果。他用于转化的是一种具有催化活性抗体的基因,这段基因来源于一个通常用于植物蛋白表达的调控序列,其互补DNA(cDNA)序列由动物杂交瘤细胞中得到,编码前体或成熟的IgG链。希亚特将其重链和轻链的cDNA分别通过一种被称为植物转化中的“特洛伊木马”的农杆菌转化烟草叶片,转化基因整合至烟草植物细胞的染色体,转化叶圆片再生为植株,分别表达抗体的重链和轻链。这两种植株进行有性杂交,得到同时表达重、轻链功能活性的转基因植株,并按孟德尔定律遗传后代。抗体通过一步亲和吸附可以较容易地从叶片中分离纯化。经分析证明,来源于植物体内的抗体与抗原的结合能力及特异性催化反应活性均与原动物细胞所产生的单克隆抗体相似。

1991年,戴维斯(Davis)用聚合酶链式反应(PCR)的方法,得到抗体重链和轻链可变区的cDNA,通过一段“连接片段”连接,构建至表达载体,可在大肠杆菌和融合酵母中表达有功能活性的抗体。美国的科伯恩(Cockburn)和怀特洛(Whitelaw)于同年成功地在植物中表达了单链抗体(SCAB)。SCAB思想于1988年提出,发展至今已

形成具有普遍意义的设计形式。SCAB 在分子免疫学中很有价值,因为抗体重链和轻链的可变区是抗体基因中特异反应的部分,它们片段小,易于进行分子生物学操作,在植物抗体工程中的优越性尤为明显。

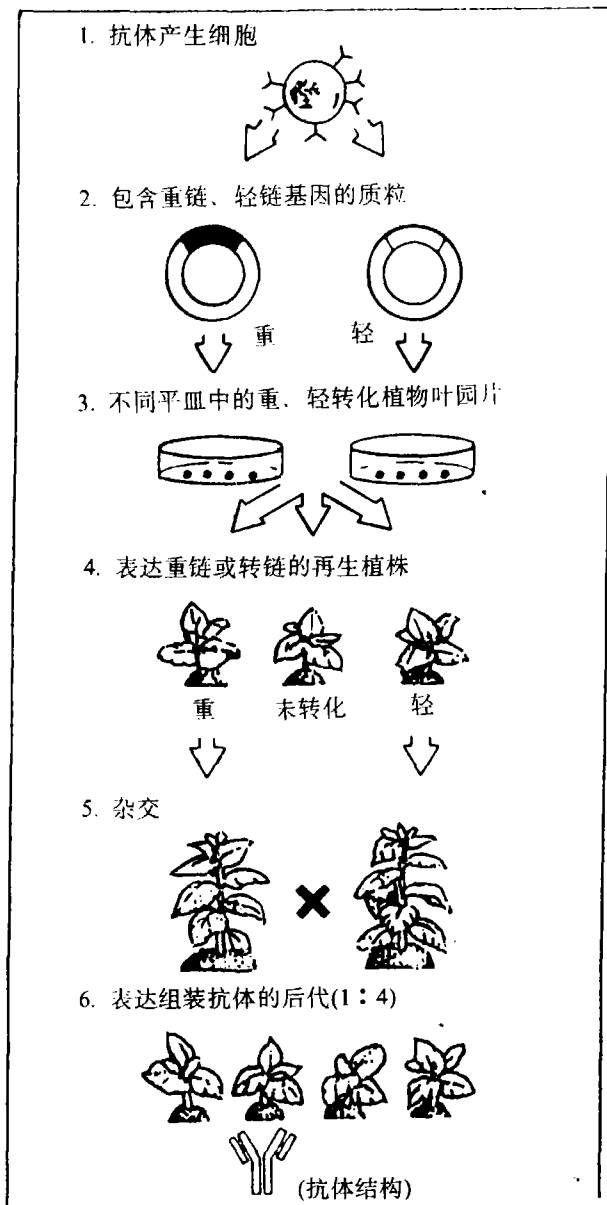


图1. 植物产生抗体方式(一). 抗体重链和轻链的 cDNA 分别通过农杆菌转化得到再生植株,经杂交实现功能抗体的组装

抗体在植物中的积累

希亚特的实验中,抗体在转化合成其重、轻链前体物的植物中有高水平的表达,表达量为植物可溶性叶蛋白含量的百分之一。而转化成熟重、轻链的植物中,抗体的表达量则相当低。其后的研究也有类似的报道。由于在这两种转化植物中 mRNA 的

水平一致,表达量的不同则反映出在这两种情况下翻译效率和蛋白转换之间的差异。实验证明,95% 具有信号肽的 IgG 重、轻链在转化烟草中得以组装,而这种组装在成熟肽重、轻链的转化植物体内未能检测到。这是由于组装的复杂性,它不但说明小鼠来源的信号肽在烟草植物中依然发挥其功能作用,同时表明:在植物中与在其它生物表达系统中一样,分泌对于功能蛋白的组装至关重要。

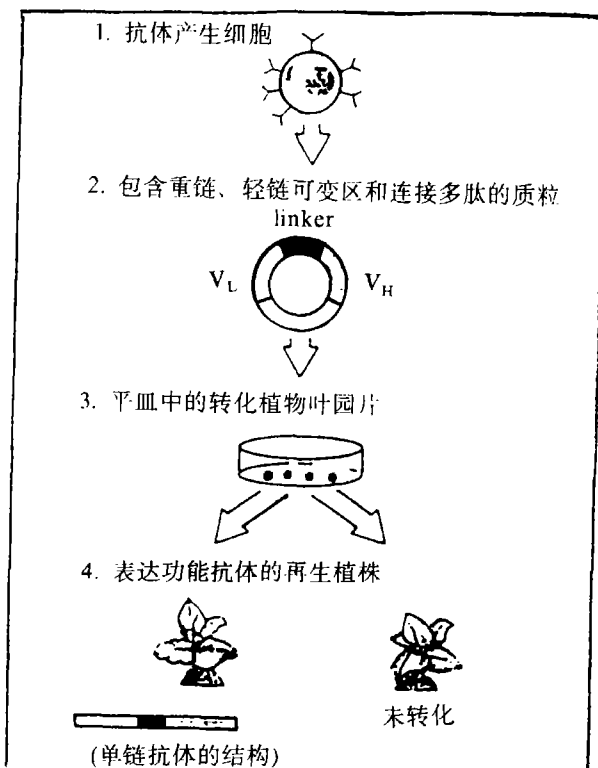


图2. 植物产生抗体方式(二). 抗体重、轻链cDNA可变区和连接多肽组成的单链抗体通过农杆菌转化,得到表达功能抗体的再生植株。

德国的德宁(Düring)其后也做了烟草的抗体基因转化实验,但在他的报告中,抗体的组装和积累量都低于希亚特报道所称百分之一。他用胶体金标记抗体的免疫电镜方法研究了抗体在转化植物细胞中的分布,发现抗体除了在细胞的内质网上表达外,叶绿体内也意外地有相当量的聚集。

植物中表达抗体的应用前景

1. 为研究植物生长调控提供有力手段

植物的生长调控是由几种低分子量的激素,如吲哚乙酸、乙烯、苄氨基嘌呤和一系列较为复杂有机分子所控制,其生物合成途径和作用机制我们尚知之甚少。通过在植物细胞中表达识别这些激素的

抗体,封闭其表达,有可能判断在没有它们调控条件下植物的发育和代谢,借以评价这些激素在植物生长调控中的作用。理论上还可以通过控制抗体的表达来控制某些激素在不同器官和亚细胞部位的表达,从而研究这些激素在整个发育阶段的功能活性。植物转基因技术日臻完善,已能将外源蛋白导向所选择的植物器官或亚细胞部位,所以这种设想在技术上也是可行的。这种策略与反意RNA的思想相似,而抗体技术具有既可以识别蛋白也可以识别非蛋白化合物的性能。不过,以这种策略来研究胞质成分,则要求抗体高效的分泌和组装,这在植物中,甚至在哺乳动物细胞和酵母中也很难达到。由此,单链抗体(SCAB)即成为研究植物生长调控的“生力军”。

2. 植物抗病研究

虽然许多真菌、细菌和病毒等病原体引起的病害被认为是病原—寄主之间的遗传相互作用,但对它们很少进行生物化学水平上的深入研究。现在人们逐步意识到,在某些条件下,病原相关蛋白或其它有机分子与病因也有着必然联系。设想在细胞内表达可与致病因子(抗原)结合的抗体,则可能通过中和作用减少致病抗原的有效浓度,同时细胞内抗体与抗原结合后颗粒增大,使其在细胞间的运输受阻,病症被局限在感染点,防止了植物的系统感染而使病症减弱。这条途径如能成功,将大大拓宽植物基因工程抗病育种的范围。

这项抗病策略有双重优势:其一,它不用分离合成目的抗原基因;其二,抗原的作用可以在亚细胞内定位,成为特定的靶作用点,避免了对其它区域的影响。

然而,抗体用于植物抗病性研究存在四大问题:第一,异源抗体是否在体内引起植物的过敏反应,障碍植物本身防御体系的功能且进而影响植物的生长和发育?第二,抗体是否能在适宜的时间和部位表达,以及是否适量表达从而起到有效发挥中和抗体的作用?第三,抗体在动物体血清内的免疫作用需要血清内许多因素(补体)以及免疫系统内细胞的协同作用,完成裂解和其它免疫应答反应,将入侵的异体杀死或消化,并将不消化的残渣经代谢排出体外以保证机体的正常生理活动。植物本身也有其防御及外泌系统,但与动物的炯然不同。即使植物中表达的抗体与病原中和,病原是否能被有效杀死或消化,抗体—抗原复合物是否能排出坚韧的细胞壁?如果不能代谢,这些复合大分子物质在植物体里的积累是否会影响植物的正常代谢?第四,用于防御的抗体策略可能只有在抗原既不飘移(变异),又对病症的产生举足轻重的条件下方能发挥有效作用。由于病毒在大田中分布的多样化和高频率的变异,抗体作为抗病毒的策略在大多数情况

下可能不甚理想。

3. 防污染的生物滤膜

环境污染危及人类的生存空间,已经成为全球普遍关注的问题。利用生物工程方法防止环境污染可能是一条理想的途径。用污染物(如环境污染物、工业废物、杀虫剂或除草剂分子)的抗体基因转化绿化林木及花卉,这种转基因植物能够吸收空气和土壤中的污染物,达到净化环境的目的。植物细胞的细胞壁的孔径很小,只有分子量低于20 000道尔顿的小分子才能通过,而抗体的分子太大,难以通过。因此由植物细胞表达的抗体就在细胞壁的半透膜间形成一个具有结合能力的空间,任何分子量小于20 000道尔顿的污染物分子“途经”植物,通过植物细胞壁则在表达功能抗体的细胞中富集,并固定在细胞壁内。这种方法的优势是基于植物种植的辽阔性。在应用上可以种植抗体基因转化的植物而形成“防护带”或“防护圈”来控制污染的扩散。同样的问题是抗体—抗原大分子物质在植物体内的富集对于植物生理代谢的影响。目前,国际上开发抗体在生物过滤方面的工作集中在细胞壁界内表达抗体的功能活性的研究。进一步将注重加强抗体的功能活性以激化细胞内的分子催化过程。

4. 农业规模生产抗体

作为医用目的的抗体,其大量生产的问题尚待解决。目前医用和兽用的抗体均来自哺乳类动物。如能用植物来生产抗体,将更为方便和价廉。因为农业规模的生产不仅简便,而且不会有动物自身所患疾病通过抗体传染的危险。种子贮存植物生产的抗体可以经济地大量贮存而且运输便利,并可在一个生长季节得到任何数量的收获。虽然烟草一直作为研究表达抗体的试验植物,但实际上更多的植物可以用来生产抗体。除了一些普通作物以外,四季饲料作物可以由无性繁殖或通过种子在一个生长季节收获多次。例如苜蓿、大豆、蕃茄和马铃薯。农业生产抗体的造价很可能远远低于动物等其它来源的抗体。

值得注意的是,如何评价植物来源的抗体在动物体内的免疫原性?在1992年最新的一则报道中,Scripps Clinic研究所的海恩(Hein)等人将来源于小鼠的IgG基因引入烟草植物中。转化烟草植物的原生质体或细胞分泌的IgG具有与小鼠抗体相同的抗原特异结合能力及催化活性。海恩的研究还发现,除功能相同外,植物细胞对其产生的抗体进行加工和分泌的方式也与哺乳动物细胞相似。海恩认为,有可能采用培养植物细胞的方法,大规模生产应用于治疗的抗体。

尽管不断有人对农业规模生产抗体作出乐观的设想,我们依然注意到,植物生理环境与动物体液循环系统有明显的差异,植物没有唾液酸转移酶

活性,其抗体重链的碳水化合物的终端将与哺乳动物来源的抗体不同。它们可能由木糖、岩藻糖和/或N—乙酰基葡萄糖组成。碳水化合物组成的变化对于抗体的结合特异性、亲和性和催化活性可能没有影响,但它可能对抗体在动物体内的应用至关重要,变化的糖基化过程可能影响植物中产生的抗体在动物体内的免疫原性并改变其生药学性能。

在医学方面,单链抗体的应用价值受到局限。首先,它是由抗体重链和轻链的可变区组成,其结构不包括保守区中重要的“补体激活位点”,所以很可能使其在体内的特异免疫活性受到一定的影响。综合多方面的原因,在植物中表达的抗体可能更适于诊断以及亲和试剂之用,如用于治疗则需解决一些技术上的问题。

抗体在植物中的表达无疑将对植物科学本身及其外界环境的理论与应用研究产生重大影响。虽然对它的研究尚处于起步阶段,而且这个阶段所需的时间和高费用投入在某种程度上障碍了它的进

展,但人们依然可以看到它展现出的诱人前景。有关抗体在植物中的表达研究自1989年希亚特报道了自己的工作并分析了其应用前景后,国际上不少实验室作了多方面细致慎重的工作。就目前来看,重点可能在对植物生长调控的研究上。根据我国目前的状况,对于利用抗体研究植物发育和代谢的细胞生物学和分子生物学的基础理论的研究还是冷门。在这一领域,人们的兴趣主要集中于尝试农业生产抗体及其应用价值和转化抗体以减轻植物病害方面。

要使植物中表达抗体的种种设想在不远的未来真正得以实现,必须解决一些理论和技术上的问题。应当强调的五个方面是:抗体的表达对于植物发育和代谢有何影响,如何清除抗体—抗原复合物在植物体内的富集,如何在适当的植物中适时适量地定位表达抗体,如何有效地大量分离纯化植物中的抗体,如何解决植物来源的抗体在动物体内的免疫原性问题。

(责任编辑 肖庆山)

会议动态

生存、自主、发展 ——中国科协四届三次全委会纪实

2月22日至24日,中国科协四届三次全委会在京召开,与会的委员及列席代表共400余人。会议讨论的焦点是,面对当前全国建立社会主义市场经济体制的大潮,科协怎么办?

一、科协整体改革的设想

朱光亚主席在工作报告中将科协系统改革的目标归纳为相互关联的三个方面:提高科协的影响力,在国家经济、文化和政治建设中发挥更重要的作用;增强自主活动 and 自我发展的能力,特别是经济实力;增进科协对科技团体和科技人员的凝聚力。为此,在思想观念上要转变,树立全方位为科技人员服务的思想,克服日益明显的官僚化、行政化倾向,这是科协影响力和凝聚力的基础;树立独立自主的观念,摆脱对行政部门的依赖思想,充分运用学会的优势,独立开展活动;立足于自力更生,扭转只重学术交流和社会效益,不问经济效益的思想。关于1993年工作,报告提出科协的重点任务是,抓好全国性学会的改革,组织实施“金桥工程”,加快科协系统第三产业的发展。

在讨论中,不少代表对科协 and 学会开展经营活动表示忧虑和漠然,学术交流和经营创收如何兼顾,且不失重点是一个难题。委员们认为,科协整体目标能否实现,除自身努力外,在相当程度上仍取决于国家其他方面改革的进展。目前而言,解决全国性学会面临的生存危机则是当务之急。

二、学会生存危机的对策

科协的基础是学会,科协的活力也在学会,而当前困难最多的也正是学会。首先是经费紧张,现在科协已有165个全国性学会,还有20多个正在申请登记,而正

常的财政拨款并未增长。近两年来,各学会的经费每年大约以15%的速度递减。许多学会由于经费短缺,不得已取消了一些重要活动。中国力学学会去年得到拨款4万多元,可要维持正常活动需11万多元。以往可靠开国际会议弥补,但现在越来越困难,因为其挂靠单位(力学所)也靠上面拨款维持。学会秘书长石光漪认为,靠知识优势办公司固然好,可谁来办,力学学会10名工作人员除了办三个刊物,还要负责学会日常工作和28个省市学会的协调工作,实无暇他顾。其次是身份危机,机构改革给挂靠在其他单位的学会带来了经费、福利、职称、编制一系列新问题。中科院有的所将学会工作人员悬置,他们不属“一线”(承担课题),也不同于“二线”(后勤保卫),有的单位视学会为包袱。另外,在宏观政策上,中国科协所属全国性学会独立登记的社团法人在经济活动中该如何对待,仍然模糊不清。

经费出路何在?科协名誉委员,著名光学家王大珩在发言中提出,应以立法形式,在科技人员工资中增加会费一项,每人每年50元,最多100元,就可解决学会经费难题。

科普创作所所长郭正谊则认为对学会应当采取分类管理。第一类,国家必保的,主要指基础学科和新兴学科,国家经由科协拨款。第二类,由某大公司或部门包下来,比如石油学会由能源部负责。第三类,由几个企业或部门共同支持,比如航空学会可由空军、航空航天部负责经费。第四类,靠同行业支持,比如新闻出版学会,可由各出版社筹集资金。第五类,以会养会,或靠刊物出版物赢利维持,如《航空知识》、《电子世界》、《兵工知识》发

(下转第24页)