

马铃薯作为生物反应器的研究进展

张春宝, 王凤义*

(东北农业大学农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 随着转基因技术的广泛应用, 马铃薯已经从传统的农作物, 被拓展应用到更多领域, 尤其是作为生物反应器来生产药用蛋白、糖类物质、工业用酶、可降解塑料等。当前生物技术发展的速度越来越快, 马铃薯作为生物反应器这一应用方向必将拥有更广阔的前景。

关键词: 马铃薯; 生物反应器; 疫苗; 可降解塑料

所谓生物反应器一般是指用于完成生物催化反应的设备, 可分为细胞反应器和酶反应器两类, 常见于微生物的发酵。随着生物技术领域 DNA 重组技术和转基因技术的飞速发展, 生物反应器的概念从生化水平扩展到了包括动物、植物在内的整个生物界。植物生物反应器是指以植物悬浮细胞培养或整株植物为工厂大量生产具有重要功能的蛋白, 如人或动物的疫苗、抗体、重要药用价值的多肽或可作为食品添加剂、工业原料的植物次生代谢产物。

马铃薯以其无性繁殖的优势, 一直是生物工程研究的先锋作物。马铃薯的组织与细胞培养技术成熟, 植株再生较容易; 遗传转化的各种手段均可采用, 尤其是农杆菌介导转化马铃薯的技术已经成熟; 转化后的块茎和叶片易于再生而获得植株; 又可以通过块茎无性繁殖将转基因的特性传递给后代而无须经过纯化或多代选育, 转化基因可长期稳定表达; 而且马铃薯地上地下均可获得较大的生物量, 由于以上等诸多特点使马铃薯成为了很好的生物反应器。

1 马铃薯作为生物反应器的研究现状

1.1 利用马铃薯生产疫苗

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, 让其在植物中表达, 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。近 10 几年来, 马铃薯广泛用于植物疫苗的生产及临床应用研究。Hag 等^[1]就抗霍乱、腹泻的相关基因导入马铃薯并得到了高效表达。Thanavala 等^[2]又将乙肝病毒表面抗原基因转入马铃薯, 并用表达的薯块饲喂小鼠, 在小鼠体内检测到保护性抗体。Arakawa 等^[3]报道, 霍乱毒素 p 亚基 (CT-B) 可在转基因马铃薯表达, 而且可以折叠成该抗原天然状态的、能与 GM1 神经节苷脂相结合的具有完全免疫原性的五聚体形式。Sch ünmann 等^[4]首次报道了用转基因马铃薯表达抗体融合蛋白, 获得抗血型糖蛋白单链抗体与 HIV 病毒表位融合蛋白在马铃薯中高水平表达产物, 该表达融合体的粗提物无需任何纯化即可代替 SimpliRED (tm) 诊断试剂, 对 HIV 病毒进行凝聚测定。Zhang 等^[5]利用农杆菌介导将人免疫缺陷 1 型病毒 HIV-1p24 蛋白插入马铃薯基因组, 在叶片中获得表达量为 $3.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。2003 年, Zhou 等^[6]用马铃薯表达了感染支气管病毒 S1 型糖蛋白 (IBV), 用表达的支气管病毒 S1 型糖蛋白免疫小鼠和鸡, 3 次免疫后, 小鼠和鸡都能完全抵抗 IBV 的感染。人乳头瘤病毒 (HPV) 是引起宫颈癌主要病因之一, 发病率为世界妇女癌症发病率的第三位, Warzecha 等^[7]以及 Biemelt 等^[8]将抗 HPV 疫苗转入马铃薯, 表达率达可溶性蛋白的 0.2%, 将获得的马铃薯疫苗免疫小鼠产生相应的免疫反应。

收稿日期: 2007-01-20

作者简介: 张春宝 (1980-), 男, 硕士研究生, 研究方向为作物生物技术研究。

* 通讯作者: E-mail: fywang@neau.edu.cn

1.2 利用马铃薯生产植物抗体

植物抗体(plantibody)是指人或动物抗体基因或基因片段在转基因植物中表达的免疫性产物, 这些抗体能功能性地识别抗原并结合抗原。Artsaenko 等^[9]报道, 他们成功地将马铃薯用于 scFv 抗体的生产, 其重组抗体的表达率为马铃薯块茎可溶性蛋白的 2%。新鲜的马铃薯在 4 条件下储存 18 个月后, scFv 抗体的活性没有降低。利用亲和层析可方便地纯化 scFv 抗体。

1.3 利用马铃薯生产蛋白质多肽药物

人血清白蛋白是人血中的一种重要组分, 主要起维持血液的正常渗透压和输送亲水分子的作用, 此外白蛋白还有解毒、参与脂类代谢及血浆中微溶物质的运输、维持血液酸碱平衡等作用, 在医学临床及生物领域有着广泛的应用。Sijmons^[10]用马铃薯生产人血清白蛋白, 叶中可溶性蛋白质可达 0.02%。Arakawa 等^[11]将胰岛素基因与 CTB 基因的 C 末端同框融合, 得到的转基因马铃薯中, 融合蛋白占总可溶蛋白的 0.15%, 产生的融合蛋白具有 GM1 亲和特性以及 CTB 和胰岛素的内源抗原性, 过度肥胖糖尿病小鼠喂食含融合蛋白的转基因马铃薯可大大减轻小鼠的胰腺炎, 并延缓了临床糖尿病的发展。降钙素基因相关肽(CGRP)是由 37 个氨基酸组成的广泛分布于中枢和周围神经、心血管、循环、消化和内分泌等系统的活性, 是具有重要生理活性的神经肽之一。宋东光等^[12]通过农杆菌介导将人降钙素基因相关肽基因由马铃薯块茎专一表达 class I patatin 基因 5 侧翼区和 CaMV 35S 启动子驱动构建的马铃薯表达载体导入马铃薯, PCR 鉴定获得了转基因植株。

1.4 利用马铃薯生产糖类物质

植物中糖类的主要贮存形式是淀粉, 人们通过设法改变植物的代谢途径, 从而使植物成为寡糖生产的生物反应器。Helneke 等^[13]将 CTP-*glgC16* 和块茎贮藏蛋白(patatin)的启动子融合, 获得了表型正常的转基因马铃薯植株, 淀粉含量测定结果表明, 含 Ppatatin-CTP-*glgC16* 的转基因马铃薯的块茎中, 淀粉含量比对照平均增加 3%, 有些株系, 甚至比对照高 60%, 这揭示了通过代谢途径转向的方式可以提高淀粉含量。

此外, 可以通过改变淀粉的代谢途径从而在植物体内合成糖类。Van der Meer 等^[14]将枯草芽孢杆

菌的果糖基转移酶基因导入非果聚糖积累型的马铃薯中, 转基因植株的叶片和小块茎内均有相当量的果聚糖积累, 从而改变了马铃薯植株原有的碳分配模式, 可以在这种基本不含果糖的植物中贮存果糖, 而且含量很高。

1.5 用马铃薯生产工业酶制剂

纤维素酶是一类能够将植物中不易被消化吸收的木质化、纤维化的部分降解为酒精等工业原料的重要酶类, 其中, 葡聚糖内解酶(E2)和纤维二糖水解酶(E3)是纤维素降解过程中能够相互协作的两种重要的催化酶。Ziegelhoffer 等^[15]将 E2 和 E3 的编码基因置于组成型启动子下游, 并且去掉了 E2 和 E3 基因序列中的引物肽序列, 构建了 2 个质粒载体, pTZ103 和 pTZ108, 通过农杆菌转化的方法, 将 E2 和 E3 基因分别导入到马铃薯中。Western 杂交结果表明, E2 和 E3 中正常表达, 并且保留了它的热稳定性。该研究为利用马铃薯等植物作为生物反应器来生产纤维素酶迈出了重要的一步。

1.6 马铃薯生产工业可降解塑料的原料

聚 β 羟基丁酸酯(PHB)是一种具有热塑性质的聚脂。也能用来生产可降解生物塑料。谢安勇等^[16]利用聚合酶链式反应(PCR)技术, 从真养产碱杆菌 H16 染色体 DNA 中扩增并克隆了调控 PHB 生物合成的 *phbB* 和 *phbC* 基因。雍伟东等^[17]将多聚 β 羟基丁酸酯(PHB)合成过程中所需的 2 种酶 *phbB* 和 *phbC* 的编码基因转入到马铃薯体内, 并采用特定的启动子使这些基因的编码蛋白最后定位在细胞的叶绿体中, 结果表明, 转基因马铃薯叶片中 PHB 干物质的含量可以达到 $0.025 \sim 1.800 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 并且这些外源基因的表达并不影响马铃薯的生长和育性, 证明采用转基因马铃薯来生产可降解塑料是一条有效的途径。

1.7 利用马铃薯生产其它的蛋白质

除了以上所述次生代谢物质外, 一些用于其它功能的蛋白也在马铃薯里得到表达。蜘蛛丝蛋白由于其显著的机械性, 可用它制作新型防弹衣的材料, 而备受人们的关注, 但不可能大量从蜘蛛获得。Scheller 等^[18]在马铃薯中表达了蜘蛛丝蛋白。

2 马铃薯作为生物反应器的特点

2.1 种植简单、成本低, 贮藏方便

马铃薯是世界上重要的粮食作物, 种植面积

广, 种植方便, 产量高, 便于大面积推广等许多潜在的优势, 为人类提供了一个更加安全和廉价的生产体系。生产简单, 种植不需特殊技术, 更不需要复杂的工业生产和设施。

不需要特殊容器分装, 不需要低温保存。马铃薯于 4 存放 3 个月, 其体内活性几乎无变化。另外, 运输也方便。

2.2 使用安全, 多数可直接饲用或食用

免疫原在植物组织中, 作为饲料(食物)而吃进胃肠, 不会引起任何副反应。可以通过直接饲喂(人直接食用)而进行免疫。国外已在自愿者身上进行了生食转基因马铃薯的免疫试验。

2.3 易于收集、纯化, 不污染环境

马铃薯块茎作为疫苗成熟收获后即可直接喂食动物, 也可低温冷冻磨成粉末后人食用免疫。马铃薯是一种一年生植物, 具有产量高、生产成本低等优势, 茎叶肥大多汁, 因此易于提取大量次生物质, 如: 疫苗、工业酶制剂、工业可降解塑料和重要的药用蛋白等。

疫苗生产过程, 不会对环境产生任何污染。

2.4 不存在伦理性问题

用马铃薯作生物反应器生产基因工程疫苗跟转基因动物相比, 不会涉及目前公众十分关心的伦理道德问题, 因而更容易为人们所接受。

3 马铃薯作为生物反应器的应用前景

转基因马铃薯作为生物反应器有很好的发展前景, 无论是病毒抗原还是细菌抗原, 都可制成转基因马铃薯疫苗, 用转基因马铃薯作为生物反应器是一个廉价的生产系统, 不需昂贵的设备, 在获得高效表达的转基因马铃薯后, 扩大耕地面积, 就能获得大量的代谢物质, 前景喜人。马铃薯种植方便, 易于推广应用。相信经过植物学、免疫学、分子生物学等多方面专家学者的共同努力, 对转基因马铃薯的基因表达、产物的免疫活性和临床评价的深入研究, 使马铃薯真正作为生物反应器并使其成为一条安全、可靠、低成本的生产途径。

[参 考 文 献]

[1] Hag T A, Mason H S, Clements J D, et al. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants [J].

Science, 1995, 268: 714-716.

- [2] Thanavala Y, Yang Y F, Mason H S, et al. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 3358-3361.
- [3] Arakawa T, Chong D K, Merritt J L, et al. Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants [J]. Trans Res, 1997, 6: 403-413.
- [4] Sch ühmann P H D, Coia G, Waterhouse P M. Biopharming the Sim- pliRED(tm) HIV diagnostic reagent in barley, potato and tobacco [J]. Molecular Breeding, 2002, 9: 113-121.
- [5] Zhang G G, Rodrigues L, Rovinski B, et al. Production of HIV-1p24 protein in transgenic tobacco plants [J]. Mol Biotechnol, 2002, 20: 131-136.
- [6] Zhou Jiyong, Wu Jianxiang, Cheng Liqin, et al. Expression of immunogenic S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus in transgenic potatoes [J]. Journal of Virology, 2003, 77: 9090-9093.
- [7] Warzecha H, Mason H S, Lane C, et al. Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato [J]. Journal of Virology, 2003, 77: 8702-8711.
- [8] Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, et al. Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants [J]. Journal of Virology, 2003, 77: 9211-9220.
- [9] Artsaenko O, Kettig B, Fiedler U, et al. Potato tubers as a bio-factory for recombinant antibodies [J]. Molecular Breeding, 1998, 4: 313-319.
- [10] Sijmons P C. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants [J]. Bio/Technology, 1990, 8: 217-221.
- [11] Arakawa T, Yu J, Chong D K, et al. A plant-based cholera toxin B subunit insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes [J]. Nat Biotechnol, 1998, 16: 934-938.
- [12] 宋东光, 张英慧, 杨泉女. 人降钙素基因相关肽转基因马铃薯的 RT-PCR 分析 [J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(9): 96-99.
- [13] Heineke D, Sonnewald U, Busses D, et al. Apoplease expression of yeast-derived invertease in potato [J]. Plant Physical, 1992(100): 301-308.
- [14] Van der Meer I M, Ebskamp M J M, Visser R G F, et al. Fructan as a new carbohydrate sink in transgenic potato plant [J]. The Plant Cell, 1996, 6: 561-570.
- [15] Ziegelhoffer T, Will J, Austin Phillips S. Expression of bacterial cellulase genes in transgenic alfalfa (Medicago sativa L.), potato (Solanum tuberosum L.), and tobacco (Nicotiana tabacum L.) [J]. MolBreed, 1999, 5: 309-318.
- [16] 谢安勇, 宋艳茹. phB, phC 基因克隆、序列分析及植物表达载体的构建 [J]. 植物学报, 1995, 37: 581-588.
- [17] 雍伟东, 谢安勇. 生物降解塑料 PHB 的研究- phbB, phbC 基因在大肠杆菌及马铃薯中的表达及对马铃薯植株的转化和检测 [J]. 植物学报, 1998, 40: 615-621.
- [18] Scheller J, Guhrs K H, Grosse F, et al. Production of spider silk proteins in tobacco and potato [J]. Nature Biotechnol, 2001, 19: 573-577.