

# 人类免疫缺陷病毒单克隆抗体在小麦胚乳中的表达

齐燕妮<sup>1,2</sup> 廖玉才<sup>2,3</sup> 胡祖权<sup>2,3</sup> 章美云<sup>4</sup> 李和平<sup>1,2</sup>

1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学麦类作物分子生物技术实验室, 武汉 430070;  
3. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070; 4. 香港大学李嘉诚医学院微生物系艾滋病研究所, 香港

**摘要** 为了建立利用小麦生产抗人类免疫缺陷病毒(HIV)单克隆抗体的方法,将植物胚乳特异启动子 AsGlo 分别与该抗体的重链(HC)和轻链(LC)连接构建小麦表达载体,以基因枪法转入小麦品种扬麦 158。转基因 T<sub>0</sub>~T<sub>3</sub>代 PCR 鉴定表明,HC 和 LC 在小麦基因组中共整合和稳定遗传。RT-PCR 分析表明,IgG 重链和轻链基因可在小麦胚乳中正常转录。酶联免疫吸附(ELISA)进一步证实了 IgG 在小麦胚乳中的积累和抗原结合活性,表明 IgG 蛋白能够在小麦胚乳中稳定表达,可利用小麦种子生产抗 HIV 抗体。

**关键词** 转基因小麦; HIV; 单克隆抗体; 胚乳; 特异表达

**中图分类号** S 336 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)01-0009-05

人类免疫缺陷病毒(HIV)会造成机体终身感染,使免疫系统失去抵抗力,最终导致艾滋病(AIDS)。艾滋病的发病率逐年上升,对人类健康造成严重威胁,因此 HIV 的预防和控制备受重视。

随着生物技术的发展,利用植物生物反应器可以生产疫苗、抗体等多种具有重要功能的蛋白质。Carrillo 等<sup>[1]</sup>在拟南芥中表达了口蹄疫病毒的结构蛋白 VP1,这是首次在植物中表达了对病毒性疾病具有免疫作用的抗原。在植物中成功表达的疫苗还有 SARS-CoV S 蛋白<sup>[2]</sup>、口蹄疫病毒多聚蛋白<sup>[3]</sup>和狂犬病病毒核蛋白<sup>[4]</sup>,这些蛋白都具有抗原结合活性及免疫原性。

Wilde 等<sup>[5]</sup>在马铃薯中表达了全抗体 IgGs 和 Fab 片段。研究表明,马铃薯块茎储存 6 个月时其抗体的含量和活性并没有发生显著的变化,绝大多数分离的 IgGs 和 Fab 片段能结合抗原并具有正确的分子量。Hull 等<sup>[6]</sup>在烟草中表达了炭疽杆菌抗原特异性单克隆抗体,它在活体内均具有中和毒素的活性,表明植物生产的单克隆抗体可以被用来预防炭疽杆菌。2009 年,抗艾美球虫属 scFV 抗体片段在豌豆种子得到稳定表达,口服豌豆种子磨成的面粉,机体内对寄生虫的抗性要高于服用烟草来源的纯化抗体,因为种子中的物质能保护抗体免受

胃肠蛋白酶的降解<sup>[7]</sup>。人类 IgG 具有 HIV 广谱抗性,而且可以阻止 HIV 的传播<sup>[8]</sup>,因此在植物中表达 IgG 可以为预防和控制 HIV 提供新的途径。虽然在玉米<sup>[9]</sup>、胡萝卜<sup>[10]</sup>中分别表达了 HIV 的抗体和疫苗,但在小麦中的表达未见报道。

小麦是主要粮食作物之一,蛋白质在小麦颖果中可长期储存而不影响其活性,小麦颖果便于运输和储藏,因此利用小麦颖果生产抗体具有广阔的市场前景。本研究的目的是利用基因枪介导法将抗体基因 IgG 转入小麦,获得转基因植株,并在分子水平上证实目的基因的整合、转录和表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小麦品种扬麦 158、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、质粒 pBar-LYA 和 pLYA 由笔者所在的实验室提供, pBar-LYA 载体中抗除草剂基因 *bar* 由 ubiquitin 启动子驱动。抗体 IgG 重链(HC)和轻链(LC)基因来自笔者所在的课题组。

### 1.2 方法

1)植物表达载体的构建。用 *EcoR* V 和 *Sac* I 酶切 HC 基因(经笔者所在的实验室优化),回收约 1 414 bp 的目的片段。将回收的目的片段插入到植物表达载体 pBar-LYA 克隆位点 *Sma* I 和 *Sac* I

收稿日期: 2012-03-31

基金项目: “863” 国家高技术发展专项(2007AA100505)和教育部博士点基金项目(20070504010)资助

齐燕妮, 硕士研究生, 研究方向: 植物细胞工程与基因工程。E-mail: xbsdqyn@126.com

通讯作者: 李和平, 教授, 研究方向: 植物分子生物学。E-mail: hepingli@mail.hzau.edu.cn

之间,获得 HC 表达载体 pBar-LYA-HC(图 1)。LC 基因经 *Sma* I 和 *Sac* I 酶切,回收约 723 bp 的目的片段,并插入到载体 pLYA 克隆位点 *Sma* I 和

*Sac* I 之间,获得 LC 表达载体 pLYA-LC(图 1)。HC 和 LC 基因均由燕麦球蛋白启动子 AsGlo 驱动。

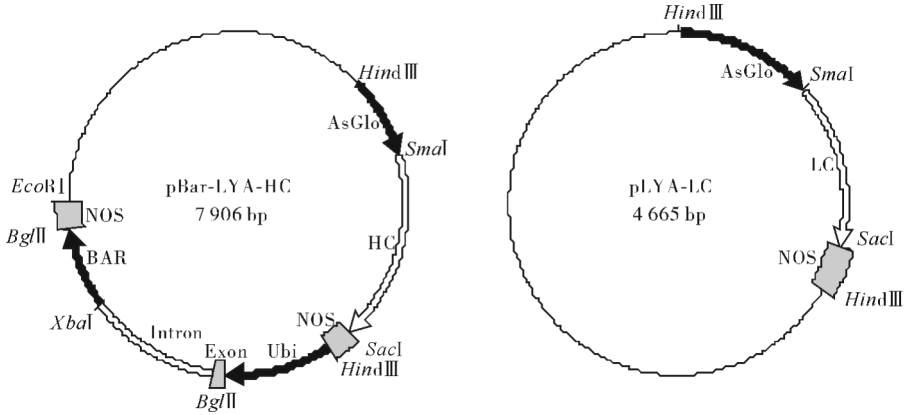


图 1 小麦表达载体 pBar-LYA-HC 和 pLYA-LC 质粒图

Fig. 1 Schematic representation of the plant expression vector pBar-LYA-HC and pLYA-LC

2)培养基。诱导培养基含 MS 基本培养基<sup>[11]</sup>, 0.1 g/L 肌醇,0.2 g/L 脯氨酸,0.5 g/L 谷氨酰胺,0.1 g/L 水解酪蛋白,20 g/L 蔗糖,2 mg/L 2,4-D; 高渗培养基和分化筛选培养基(含 5 mg/L ZT 和 3~5 mg/L Bialaphos)<sup>[12]</sup>;生根筛选培养基含 1/2 MS 基本培养基,15 g/L 蔗糖,0.5 mg/L NAA 和 5 mg/L Bialaphos。凝固剂均为 2.5 g/L phytigel, pH 5.8。

3)基因枪介导的转化及转基因植株的筛选。取开花后 11~14 d 的麦穗,剥取饱满、体被白色绒毛、呈嫩绿色的未成熟籽粒,用 70% 乙醇消毒 30 s,无菌水冲洗 1 次,再用 0.1%  $HgCl_2$  灭菌 6~8 min,无菌水冲洗 5 次,每次 2 min。在无菌条件下剥取半透明状的幼胚(0.8~1.5 mm),盾片朝上,接种于愈伤诱导培养基,于 27 °C 恒温箱中暗培养 5~7 d 后用于转化。

将诱导的愈伤组织先置于高渗培养基 4~6 h,再以 Bio-Rad 基因枪按文献<sup>[13]</sup>方法进行轰击,轰击后的愈伤继续高渗 16~20 h,转至诱导培养基于黑暗下培养 2 周。愈伤组织的筛选参照文献<sup>[12]</sup>进行,得到的抗性植株经春化后移栽至温室。

4)转基因植株的 PCR 检测。取 3~5 叶期小麦幼嫩叶片,用 CTAB 法提取再生植株和未转化植株基因组 DNA<sup>[14]</sup>。根据 IgG 的重链和轻链序列分别设计引物,HC 引物序列为 H1:5'-TGACGGT-GTCGTGGAACCT-3', H2: 5'-GTACTCCTTGCCAT-TCAGC-3'; LC 引物序列为 A1: 5'-TCAAGGT-

TCAGTGGCAGTGGATCTG-3', A2: 5'-TGCTTT GCTCAGCGTCAGGGTG-3',HC 和 LC 扩增的目的片段分别为 497 bp 和 380 bp。采用多重 PCR 同时扩增 HC 和 LC 基因,PCR 程序为:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,64 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环,72 °C 延伸 10 min,10 °C 10 min。

5)转基因植株的 RT-PCR 检测。取开花后 21 d 的转基因株系及未转化植株幼嫩籽粒,采用 Trizol 法提取总 RNA。以反转录的 cDNA 为模板,分别用 HC 和 LC 基因的特异引物 H1/H2 和 A1/A2 进行 RT-PCR 扩增,PCR 程序同 1.2 中的 4)。

6)IgG 蛋白的 ELISA 检测。取开花后 21 d 的转基因株系及未转化植株幼嫩籽粒,提取总蛋白。将籽粒于液氮中研磨后,加入 5 倍体积 PBS 提取液(PBS 中添加 5 mol/L EDTA,1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇,pH 7.4),4 °C 振荡 2~3 h 后离心,收集上清保存于 -20 °C 备用。

取 100  $\mu$ L 上清包被 ELISA 板,每个样品 3 个重复,分别以小鼠抗人 IgG 重链和轻链作为抗体(均为辣根过氧化物酶标记),用 Bio-Rad 酶标仪双波长(450 nm 和 630 nm)检测各样品的吸光值(D)。

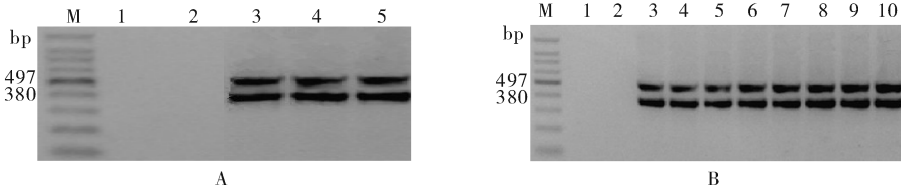
## 2 结果与分析

### 2.1 转基因小麦的 PCR 检测

提取小麦叶片 DNA,用 HC 和 LC 基因特异引物进行多重 PCR 检测,在  $T_0$  代抗性苗中,其中有 3

株为阳性,且同时扩增出 497 bp 和 380 bp 的目的带(图 2-A),表明 IgG 的 HC 和 LC 基因共整合到小麦基因组中。对 T<sub>1</sub>代植株的 PCR 鉴定表明,所有 T<sub>1</sub>代植株均同时检测到 HC 和 LC 2 个基因。

对 T<sub>2</sub>代和 T<sub>3</sub>代进行鉴定,所有转基因后代依然可以同时检测到 HC 和 LC 2 个基因,T<sub>2</sub>代部分植株的 PCR 扩增结果见图 2-B。连续 3 代的 PCR 鉴定结果表明,基因 HC 和 LC 是连锁的,而且能够稳定遗传。



A: T<sub>1</sub>代 T<sub>1</sub> generation; B: T<sub>2</sub>代 T<sub>2</sub> generation; M: 100 bp DNA 分子量标记 100 bp DNA ladder marker; 1: 水对照 H<sub>2</sub>O control; 2: 未转化植株 Non-transformed plant; 3~10: 转基因植株 Transgenic plants.

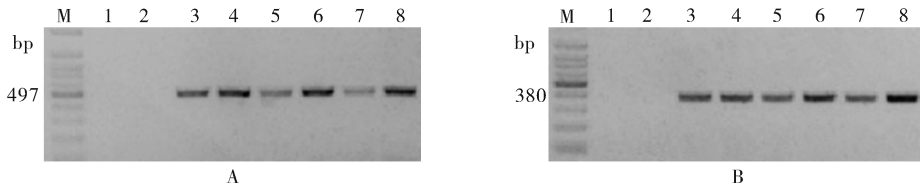
图 2 扬麦 158 转 IgG 基因植株的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of Y158 transgenic plants containing IgG

### 2.2 转基因小麦的 RT-PCR 鉴定

T<sub>2</sub>代转基因小麦和未转化植株开花后 21 d 时,分别提取幼嫩籽粒 RNA,用 IgG 的重链和轻链特异引物进行 RT-PCR 扩增。如图 3 所示,选取的

6 株转基因植株均可扩增出预期大小的目的带,而未转化对照中没有目的带,说明转基因株系的基因组中不仅整合了目的基因,而且能在胚乳中形成正常的转录本。



A: IgG-HC; B: IgG-LC; M: 100 bp DNA 分子量标记 100 bp DNA ladder marker; 1: 水对照 H<sub>2</sub>O control; 2: 未转化植株 Non-transformed plant; 3~8: 转基因植株 Transgenic plants.

图 3 扬麦 158 T<sub>2</sub>代转 IgG 植株的 RT-PCR 鉴定

Fig. 3 RT-PCR identification of Y158 T<sub>2</sub> transgenic plants containing IgG

### 2.3 IgG 蛋白的 ELISA 检测

于开花后 21 d 时,取 T<sub>3</sub>代转基因株系和未转化植株幼嫩籽粒,提取总蛋白进行 ELISA 检测。结果表明,转基因株系蛋白提取液的 D 值与阴性对照相比差异显著(图 4)。用 IgG 重链作为抗体检

测时,样品的 D 值是对照的 3.6 倍;IgG 轻链作为抗体检测时,样品的 D 值是对照的 2.5 倍,说明种子中 IgG 蛋白重链和轻链表达积累量均较高。

## 3 讨论

本研究利用基因枪共转化法将单克隆抗体 IgG 的重链和轻链基因同时导入小麦基因组。T<sub>0</sub>代共得到 3 株转基因植株,并同时含有 IgG 重链和轻链。连续 3 代的 PCR 检测结果表明,HC 和 LC 基因是连锁的,而且能够稳定遗传,说明目的基因已经整合到小麦基因组中。为检测 IgG 在小麦颖果中的表达情况,取开花后 21 d 的幼嫩籽粒提取 RNA,进行 RT-PCR 鉴定,在随机选取的几个样品中都可以检测到信号,说明 IgG 基因在小麦胚乳中能正常转录。ELISA 结果进一步证实小麦胚乳中能产生正常的 IgG 分子。

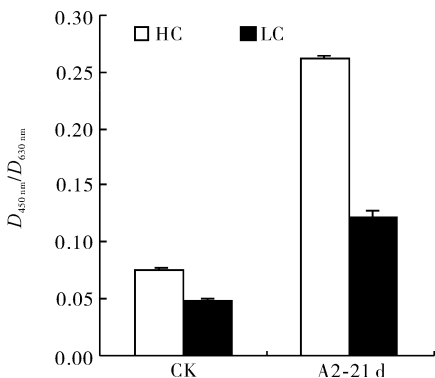


图 4 ELISA 检测转基因小麦中 IgG 蛋白的表达

Fig. 4 ELISA of IgG in transgenic wheat plants

IgG 在体外能够有效的中和 HIV,而且能阻止 HIV 病毒在动物模型中的感染<sup>[8]</sup>。由此可以推测,IgG 可以治疗或抑制 HIV 对人体的感染。为使 IgG 更有效的发挥作用,需要对其大量生产。近年来植物生物反应器发展迅速,为 IgG 的大批量生产提供了一种有效途径。植物作为生产系统具有培养周期较短、成本低、安全、质量高等优点<sup>[15]</sup>,而且产物一般贮藏在种子、果实和块茎中,便于贮存和运输<sup>[16]</sup>。

Rademacher 等<sup>[9]</sup>在玉米胚乳中表达了重组抗体 2G12,此抗体具有 HIV 中和活性,而且并不低于仓鼠卵巢细胞来源的抗体,在烟草中也曾表达过 HIV 有抑制作用的抗体<sup>[17]</sup>,但烟草中含有对人体有害的物质,玉米虽是主要粮食作物之一,但不及小麦应用广泛。

选择燕麦球蛋白启动子 AsGlo 来驱动 IgG 的表达,AsGlo 是胚乳特异启动子,Vickers 等<sup>[18]</sup>曾将 AsGlo 成功应用于大麦和小麦,外源蛋白表达量达到总可溶性蛋白的 10% 左右,甚至最高可达 25%。小麦是人类多种食物的原材料,将小麦种子作为生产 IgG 的工厂,既经济又安全,而且直接口服转基因种子磨成的面粉,机体的抗性要高于纯化的抗体<sup>[7]</sup>。

本研究在小麦胚乳中成功表达了抗体蛋白 IgG,小麦种子数量多,贮存方便,而且蛋白质贮存在种子中不影响其活性,为以后大量纯化抗体用于动物免疫研究并用于生产奠定了基础。

### 参 考 文 献

- [1] CARRILLO C, WIGDOROVITZ A, OLIVEROS J C, et al. Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants [J]. *J Virol*, 1998, 72: 1688-1690.
- [2] POGREBNYAK N, GOLOVKIN M, ANDRIANOV V, et al. Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants; development of recombinant vaccine [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 9062-9067.
- [3] PAN L, ZHANG Y G, WANG Y L, et al. Foliar extracts from transgenic tomato plants expressing the structural polyprotein, P1-2A, and protease, 3C, from foot-and mouth disease virus elicit a protective response in guinea pigs [J]. *Vet Immunol Immunop*, 2008, 121: 83-90.
- [4] ARANGO I P, RUBIO E L, ANAYA E R, et al. Expression of the rabies virus nucleoprotein in plants at high-levels and evaluation of immune responses in mice [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27: 677-685.
- [5] WILDE C D, PEETERS K, JACOBS A, et al. Expression of antibodies and Fab fragments in transgenic potato plants: a case study for bulk production in crop plants [J]. *Mol Breeding*, 2002(9): 271-282.
- [6] HULL A K, CRISCUOLO C J, METT V, et al. Human-derived, plant-produced monoclonal antibody for the treatment of anthrax [J]. *Vaccine*, 2005, 23: 2082-2086.
- [7] ZIMMERMANN J, SAALBACH I, JAHN D, et al. Antibody expressing pea seeds as fodder for prevention of gastrointestinal parasitic infections in chickens [J]. *BMC Biotechnol*, 2009 (9): 1-22.
- [8] MASCOLA J R. Passive transfer studies to elucidate the role of antibody-mediated protection against HIV-1 [J]. *Vaccine*, 2002, 20: 1922-1925.
- [9] RADEMACHER T, SACK M, ARCALIS E, et al. Recombinant antibody 2G12 produced in maize endosperm efficiently neutralizes HIV-1 and contains predominantly single-GlcNAc N-glycans [J]. *Plant Biotechnol J*, 2008(6): 189-201.
- [10] LINDH I, WALLIN A, KALBINA I, et al. Production of the p24 capsid protein from HIV-1 subtype C in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota* using an endoplasmic reticulum-directing SEKDEL sequence in protein expression constructs [J]. *Protein Expr Purif*, 2009, 66: 46-51.
- [11] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473-497.
- [12] LOYOLA-VARGAS V M, Vázquez-FLOTA F. Plant cell culture protocols [M]. 2nd. New Jersey: Humana Press, 2006: 273-283.
- [13] LI H P, ZHANG J B, SHI R P, et al. Engineering *Fusarium* head blight resistance in wheat by expression of a fusion protein containing a *Fusarium*-specific antibody and an antifungal peptide [J]. *Mol Plant Microbe*, 2008, 21: 1242-1248.
- [14] DELLAPORTA S L, WOOD J, HICKS J B. A plant DNA miniprep: version II [J]. *Plant Mol Bio Rep*, 1983(1): 19-21.
- [15] DANIELL H, STREAT S J, WYCOFF K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2001(6): 219-226.
- [16] KORBAN S S, KRASNANSKI S F, BUETOW D E. Food as production and delivery vehicles for human vaccines [J]. *J Am Coll Nutr*, 2002, 21: 212-217.
- [17] SACK M, PAETZ A, KUNERT R, et al. Functional analysis of the broadly neutralizing human anti-HIV-1 antibody 2F5 produced in transgenic BY-2 suspension cultures [J]. *Faseb J*, 2007, 21: 1655-1664.
- [18] VICKERS C E, XUE G P, GRESSHOFF P M. A novel *cis*-acting element, ESP, contributes to high-level endosperm-specific expression in an oat globulin promoter [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 62: 195-214.

## Expression of a monoclonal antibody against human immunodeficiency virus in wheat endosperm

QI Yan-ni<sup>1,2</sup> LIAO Yu-cai<sup>2,3</sup> HU Zu-quan<sup>2,3</sup> ZHANG Mei-yun<sup>4</sup> LI He-ping<sup>1,2</sup>

1. *College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University Wuhan 430070, China;*

2. *Molecular Biotechnology Laboratory of Triticeae Crops, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

3. *College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

4. *AIDS Institute, Li Ka Shing Faculty of Medicine, The University of HongKong, Hong Kong, SAR, China*

**Abstract** To establish a method of producing a monoclonal antibody against human immunodeficiency virus (HIV) in wheat, two gene sequences coding the heavy chain and the light chain of the antibody were separately constructed in plant expression vectors containing an endosperm-specific promoter from oat and then co-introduced into wheat cultivar Yangmai 158 via particle bombardment. Polymerase chain reaction (PCR) analysis of transgenic wheat plants from T<sub>0</sub> to T<sub>3</sub> generations showed that the integration and inheritance of the two genes were stable. Reverse transcription-PCR analysis indicated that both genes were normally transcribed in wheat endosperm of transgenic plants. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) further confirmed that the antibody produced in transgenic wheat plants had specific antigen-binding capability. These results suggested that mammalian antibody can be stably expressed in wheat endosperm and wheat seeds may be used for the production of antibody with HIV-neutralizing activity.

**Key words** transgenic wheat; human immunodeficiency virus; monoclonal antibody; endosperm; specific expression

(责任编辑:杨锦莲)