

农业生物技术

SARS亚基疫苗-突刺蛋白受体结合区RBD在烟草叶绿体中的高效表达

钟雪^{1,2*}, 齐广勋^{1*}, 杨静¹, 邢国杰¹, 刘剑锋², 杨向东¹

1 吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 吉林 长春 130033

2 吉林师范大学生命科学学院, 吉林 四平 136000

钟雪, 齐广勋, 杨静, 等. SARS亚基疫苗-突刺蛋白受体结合区RBD在烟草叶绿体中的高效表达. 生物工程学报, 2014, 30(6): 920-930.

Zhong X, Qi GX, Yang J, et al. High-efficiency expression of a receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein in tobacco chloroplasts. Chin J Biotech, 2014, 30(6): 920-930.

摘要: 叶绿体表达系统为植物源重组药用蛋白和亚基疫苗的生产提供了一个有效的途径。为验证 SARS 亚基疫苗在叶绿体中表达的可行性, 以及为植物源 SARS 亚基疫苗的生产提供一套高效、低成本的技术平台, 本研究将人工优化合成的 SARS-CoV 突刺蛋白 (S 蛋白) 受体结合区序列 RBD 与载体分子 CTB 融合基因导入烟草叶绿体基因组中。PCR 和 Southern 杂交分析表明, 外源融合基因已整合到烟草叶绿体基因组中, 并获得同质化。Western 杂交分析表明, 重组融合蛋白 CTB-RBD 在叶绿体转基因烟草中获得表达, 且主要以可溶性单体形式存在。ELISA 分析表明, 在不同生长阶段、不同生长部位和不同时间点烟草叶片中, 重组融合蛋白 CTB-RBD 的表达水平呈现明显的变化。重组蛋白在成熟叶片中的表达水平最高可以达到 10.2% TSP。本研究通过 SARS 亚基疫苗 RBD 在烟草叶绿体中的高效表达, 有望为植物源 SARS 亚基疫苗的生产以及 SARS 血清抗体的检测提供一个有效的技术平台。

关键词: 突刺受体结合区 RBD, SARS, 植物源亚基疫苗, 叶绿体表达系统

Received: September 18, 2013; **Accepted:** December 9, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31000743), Innovation Program of Jilin Academy of Agriculture Sciences.

Corresponding author: Xiangdong Yang. Tel: +86-431-87063044; E-mail: xdyang020918@126.com.

* These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (No. 31000743), 吉林省农业科学院创新工程项目资助。

High-efficiency expression of a receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein in tobacco chloroplasts

Xue Zhong^{1,2*}, Guangxun Qi^{1*}, Jing Yang¹, Guojie Xing¹, Jianfeng Liu², and Xiangdong Yang¹

¹ Agricultural Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agriculture Sciences, Changchun 130033, Jilin, China

² College of Life Sciences, Jilin Normal University, Siping 136000, Jilin, China

Abstract: Chloroplast-based expression system is promising for the hyper-expression of plant-derived recombinant therapeutic proteins and vaccines. To verify the feasibility of obtaining high-level expression of the SARS subunit vaccine and to provide a suitable plant-derived vaccine production platform against the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), a 193-amino acid fragment of SARS CoV spike protein receptor-binding domain (RBD), fused with the peptide vector cholera toxin B subunit (CTB), was expressed in tobacco chloroplasts. Codon-optimized CTB-RBD sequence was integrated into the chloroplast genome and homoplasmy was obtained, as confirmed by PCR and Southern blot analysis. Western blot showed expression of the recombinant fusion protein mostly in soluble monomeric form. Quantification of the recombinant fusion protein CTB-RBD was conducted by ELISA analysis from the transplastomic leaves at different developmental stages, attachment positions and time points in a day and the different expression levels of the CTB-RBD were observed with the highest expression of 10.2% total soluble protein obtained from mature transplastomic leaves. Taken together, our results demonstrate the feasibility of highly expressing SARS subunit vaccine RBD, indicating its potential in subsequent development of a plant-derived recombinant subunit vaccine and reagents production for antibody detection in SARS serological tests.

Keywords: receptor-binding domain of spike protein, SARS, plant-derived subunit vaccine, chloroplast expression system

疫苗接种免疫是目前控制疾病传播最有效的方式。与传统疫苗生产方式相比,叶绿体生产系统具有表达水平高、生产成本低、易实现规模化生产等多方面优势。叶绿体表达系统的一个显著特点是外源重组蛋白可以在细胞中积累到很高水平^[1-2]。Oey 等^[3]获得了高表达内毒素 (GroupB streptococci, GBS) 的转基因烟草,其成熟叶片中外源蛋白的表达水平达细胞可溶性蛋白 (Total soluble protein, TSP) 含量的 70%。外源重组蛋白的高水平表达不仅大幅度降低了纯化成本,而且有效提高了药用蛋白纯化效果和重组疫苗口服免疫效果^[4]。尽管植物叶绿体起源于原核生物,但在长期的进化过程中,其蛋白表达和翻译机制具有一些真核生物的特

点。外源重组蛋白可以在叶绿体内进行翻译后修饰,如二硫键^[5-6]、酯基修饰等^[7],从而进一步减少了后期体外修饰和加工等过程的成本。叶绿体多基因表达的特点也为同时表达多个药用蛋白或是抗原和佐剂提供了良好的条件。叶绿体表达系统通过同源重组实现外源基因在叶绿体基因组中的定位整合,有效避免了诸如位置效应、基因沉默等方面问题,为实现重组药用蛋白生产过程中的质量控制创造了有利条件。此外叶绿体表达系统克服了微生物和动物细胞生产系统中内毒素、热原、病毒污染等方面的问题^[8]。自 Daniell 等^[9]首次利用叶绿体表达霍乱毒素疫苗 (Cholera toxin B, CTB) 以来,目前利用植物叶绿体表达的重组疫苗已达 27

种,包括抗病毒、抗细菌、抗病原虫疫苗等^[10]。利用巨噬细胞裂解分析 (Macrophage lysis assay)、神经节苷脂 (Ganglioside) 结合试验、病原攻毒试验^[11-12]等体内或体外试验进一步证实了叶绿体表达重组疫苗的功能活性。由于外源重组疫苗抗原在叶绿体中的高水平表达以及有效诱发机体产生免疫保护反应的特点,叶绿体表达系统为开辟新的疫苗免疫方式,实现疫苗口服提供了一条新的技术途径。基于叶绿体表达系统多方面的优势,利用叶绿体作为反应器生产各类具有重要应用价值的重组药用蛋白和亚基疫苗受到各国研究人员的广泛重视。

严重急性冠状呼吸综合症 (Severe acute respiratory syndrome, SARS) 是由突变的冠状病毒 (SARS coronavirus, SARS-CoV) 引起的一类新型急性呼吸系统传染性疾病^[13]。该传染病曾于 2003 年在全球范围内引起严重恐慌。尽管目前该传染病在全球范围内得到控制,但一些研究表明, SARS 病原体很有可能依然存在于某些野生动物中。在适当的条件下,这些病原体很有可能再次传染人类。至今为止,人类尚未研制出有效治疗 SARS 的药物,除了采取消毒、隔离或阻断病毒传染等措施外,开发具有安全、高效、特异性 SARS 疫苗无疑是最为经济和有效的手段。SARS CoV 主要通过 S 突刺蛋白 (包含 S1 和 S2 亚基) 识别宿主细胞血管紧张素转换酶 2 (Angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 进入人体细胞^[14]。进一步研究发现, S1 亚基中 N 端的 193 氨基酸区域 (318-510 aa) 可以有效地结合机体细胞功能受体 ACE2。携带受体结合区 (Receptor binding domain, RBD) 序列的重组融合蛋白 RBD-Fc 可以有效地结合 ACE2, 并有效激发小鼠机体产生高水平的中和抗体反

应,抑制 SARS CoV 病毒的再次感染^[15-17]。因此,这一区域被认为是 S 蛋白的受体结合区,也是目前 SARS 亚基疫苗研究中的重要靶序列之一。本研究采用烟草作为表达宿主,利用叶绿体转基因技术,将 RBD 编码基因导入烟草叶绿体基因组,获得高效表达 SARS 亚基疫苗的叶绿体转基因烟草植株,进而为 SARS 亚基疫苗的低成本、安全、高效生产及 SARS 血清抗体检测提供一个有效的技术平台。

1 材料与方法

1.1 S-RBD 基因序列优化及植物表达载体的构建

根据烟草叶绿体高表达基因 *psbA* 序列 (GenBank Accession No. HQ602934.1), 分析该基因的密码子偏爱性 (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>), 并利用在线序列优化工具 (<http://www.Evolvingcode.Net>) 对 SARS CoV S 蛋白受体结合区 RBD (318-510 aa) 核苷酸序列进行人工优化。优化序列 mRBD 委托南京金斯瑞公司进行合成,并保存在克隆载体 pES 中。利用 *Sma* I / *Xba* I 双酶切 pES-mRBD 和烟草叶绿体表达载体 pLD-CTB-ESAT6, 胶回收 mRBD 基因片段和 pLD-CTB 载体骨架片段。T4 DNA 酶链接后转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 后,挑取单菌落进行 PCR 和酶切检测。阳性转化子送北京六合华大基因有限公司进行测序验证。新构建的载体命名为 pLD-CTB-mRBD。试验中用到的内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶等生化试剂均购自 MBI 公司。质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒等购自天根生化科技有限公司 (Tiangen)。

1.2 烟草叶绿体遗传转化

试验选用的转化受体材料为烟草品种 NC89

(本实验室保存)。具体转化方法参见 Verma 等^[18]的方法。将无菌培养的烟草植株叶片背轴面向上置于 ROMP (MS 盐 4.3 g; 肌醇 100 mg/L; VB₁ 1 mg/L; NAA 0.1 mg/L; 6-BA 1.0 mg/L; 蔗糖 30%; 植物凝胶 0.5%; pH 5.8) 培养基中。采用基因枪轰击法将包裹在金粉上的 pLD-CTB-mRBD 质粒导入烟草叶绿体基因组。轰击靶距为 9 cm, 压力为 7.586 MPa, 金粉用量 5 μg/枪, DNA 与金粉质量比为 1 : 500。轰击后的烟草叶片在不含抗生素的 ROMP 培养基上暗培养 3 d (25 °C–28 °C)后, 用无菌手术刀片将叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块, 置于筛选培养基 (ROMP, 500 mg/L 壮观霉素) 中进行筛选培养 (25 °C–28 °C, 16 h/8 h 光/暗), 每 2 周继代一次。将外植体上再生的绿色抗性芽切割为小块, 继续进行同质化筛选 (ROMP, 500–700 mg/L 壮观霉素)。筛选 3–4 轮后, 将抗性芽转至生根培养基 (1/2 MS, 500 mg/L 壮观霉素) 中。待不定根长至 3–4 cm 时, 将转化苗移栽至温室中生长。

1.3 PCR 检测

根据插入片段中 *aadA* 序列及旁侧烟草叶绿体基因组序列 (*16S/trnA*) 设计 PCR 检测引物 (表 1)。探针模板扩增引物则根据烟草叶绿体基因组插入位点 *trnI/trnA* 序列 (约 800 bp) 进行设计。引物由北京六合华大基因有限公司合成。植物基因组提取采用天根生化科技有限公司 DNA 提取试剂盒进行, 具体提取方法参照试剂盒说明书。引物 T3P/T3M PCR 扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 60 °C 45 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。引物 T5P/T2M PCR 扩增程序: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 63 °C 45 s, 72 °C 3.5 min, 35 个循环; 72 °C 15 min。PCR

扩增片段用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 Southern blotting 杂交检测

植物基因组大量提取采用 CTAB 法^[19]。植物总 DNA 用 *Hind* III 单酶切后, 在 0.8%琼脂糖凝胶中过夜电泳, 并在高盐 (20×SSC) 条件下转移至带正电荷的 Hybond TM-N⁺尼龙膜上。探针制备及杂交程序根据 Roche 公司的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒说明书进行。杂交温度 42 °C。洗膜条件为 2×SSC (含 0.1% SDS), 37 °C 条件下洗膜 2 次, 每次 5 min; 0.5×SSC (含 0.1% SDS), 66 °C 条件下洗膜 2 次, 每次 15 min。然后通过 NBT 化学显色。

1.5 Western blotting 杂交检测

取新鲜烟草叶片约 0.2 g, 在液氮中充分研磨后, 加入 1 mL 蛋白提取缓冲液 (100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 200 mmol/L Tris-Cl, 0.05% Tween-20, 0.1% SDS, 14 mmol/L β-巯基乙醇, 400 mmol/L 蔗糖, 2 mmol/L PMSF) 抽提 5 min。12 000 r/min 离心 5 min 后, 取上清 80 μL, 加入 5×上样缓冲液 20 μL, 沸水中煮沸 5 min。取 20 μL 上清液及沉淀 (等体积 1×PBS 缓冲液

表 1 引物名称及序列

Table 1 Names and sequences of the primer pairs

Primer name	Primer sequence (5'–3')
T3P	CCGCGTTGTTTCATCAAGCCTTACG
T3M	AAAACCCGTCCTCCGTTCCGGATTCCGC
T5P	TGACTGCCACCTGAGAGCGGACA
T2M	CTGTAGAAGTCACCATTGTTGTGC
TPROBE1	CAAAGGGTTGAAGGGAGATAGTGC
TPROBE2	ACCTAACAACGCATCTTCACAGAC

重新悬浮)于12%聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)中电泳^[19]。利用电转法(Bio-Rad)将蛋白转移至BioTrace PVDF膜(PALL公司)上。封闭液(1×PBS, 0.1% Tween-20, 3%脱脂奶粉)封闭1 h后,加入CTB抗体(1:2 000, Abcam公司),4℃孵育过夜。PBST溶液(1×PBS, 0.1% Tween-20)洗膜3次。然后加入HRP标记羊抗兔IgG(1:5 000, Abcam公司)室温孵育1 h。PBST溶液漂洗3次后,加入ECL发光检测液(GE Healthcare),然后于暗室中曝光X光片,胶片显影和定影后扫描。

1.6 ELISA 分析

采用酶联免疫吸附分析法(ELISA)对叶绿体转基因烟草植株中外源融合蛋白的表达量进行分析。在转基因植株不同生长阶段(幼苗期、成株期、衰老期)、烟草幼苗期阶段不同生长部位(上部、中部、下部)和不同时间点(上午8时,中午12时,下午6时),分别提取叶片总蛋白,提取方法见上。用包被液(15 mmol/L Na₂CO₃, 35 mmol/L NaHCO₃, 3 mmol/L NaN₃, pH 9.6)将测试样品和CTB标准蛋白进行系列稀释(50–1000 ng/mL)后包被96孔酶标板。室温条件下,封闭液封闭1 h。然后按1:4 000比例加入CTB抗体(一抗,1:2 000)孵育2 h。PBST溶液洗3次。再用HRP标记的羊抗兔IgG(二抗,1:5 000)室温孵育1.5 h,然后用PBST洗3次。加入3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB, Biochemi公司)反应10–15 min后,再加入2 mol H₂SO₄终止反应。然后用酶标仪读取OD₄₅₀吸光度值。

2 结果与分析

2.1 SARS 蛋白受体结合区 RBD 序列优化及叶绿体表达载体构建

SARS CoV S糖蛋白在病毒与宿主细胞表

面受体结合及介导病毒进入细胞的过程中起关键性作用。其中,S1亚基N末端318–510氨基酸可以有效结合宿主细胞表面的受体蛋白ACE2,是S糖蛋白的受体结合区部位,在引导病毒进入细胞内部过程中发挥着重要的作用^[15]。本研究根据烟草高表达基因 $psbA$ 序列的密码子偏爱性,对RBD序列进行人工优化。优化后的RBD序列长度为579 bp,与原序列同源性为79.06%。GC含量为46%(图1)。利用 Sma I/ Xba I内切酶双酶切pES-mRBD和烟草叶绿体表达载体pLD-CTB-ESAT6,将目的基因构建到pLD-CTB-ESAT6上,并替换载体序列中原有的基因ESAT6。新载体命名为pLD-CTB-mRBD(图2A)。测序结果表明,融合基因CTB-mRBD编码框完整且序列正确。在构建的叶绿体表达载体中,目的基因位于跨粘膜载体分子-霍乱毒素B亚基(CTB)基因序列(321 bp)的下游。融合基因CTB-mRBD之间含有一段间隔序列GGGCCCGGGCCC,该序列编码空间位阻序列GPGP(Gly Pro Gly Pro),可以避免载体分子CTB和靶蛋白mRBD之间的相互干扰。融合蛋白CTB-mRBD预测分子量为34 kDa。融合基因启动子为叶绿体强启动子 $PpsbA$ (携带5'-非翻译区序列),终止子 $rps16$,筛选标记基因为 $aadA$,该基因编码氨基糖苷腺苷酸转移酶,具有抗壮观霉素活性。pLD-CTB-mRBD载体中含有与烟草叶绿体基因组同源的序列 $16S/trnI$ 和 $trnA$,该同源序列可以促进载体分子在烟草基因组中的定位整合,插入位点位于叶绿体基因组 $trnI$ 和 $trnA$ 基因序列间隔区。

2.2 叶绿体转基因烟草植株的获得及分子鉴定

本研究共获得抗壮观霉素转化再生烟草植株35株,转化频率为0.7个抗性芽/枪。对转化

```

mRBD  AACATTACTAACCTATGTCCTTTCGGTGAAGTATTCACGCTACTAAATCCCTTCTGTA
      ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** *
S-RBD  AATATTACAACTTGTGTCCTTTGGAGAGGTTTTTAATGCTACTAAATCCCTTCTGTC

mRBD  TACGCTGGGAACGTAAAAAATTCTAACTGTGTAGCTGATTACTCTGTACTATAACAAC
      ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** *
S-RBD  TATGCATGGAGAGAAAAAATTCTAATGTGTGTGCTGATTACTCTGTGCTCTACAAC

mRBD  TCTACTTCTCTCTACTTTCAAATGTACGGTGTATCTGCTACTAACTAAACGATCTA
      ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** *
S-RBD  TCAACATTTTTTCAACCTTAAAGTGCTATGGCGTTTCTGCCACTAAGTTGAATGATCTT

mRBD  TGTTTCTCTAACGTATACGCTGATTCTTTCGTAGTAAAAGGTGATGATGTACGTCAAAT
      ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** *
S-RBD  TGCTTCTCCAATGCTATGCAGATTCTTTTGTAGTCAAGGGAGATGATGTAAGACAATA

mRBD  GCTCCTGGTCAAACGGTGAATTGCTGATTACAACTACAACTACCTGATGATTTTCATG
      ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** *
S-RBD  GCGCCAGGACAAACGGTGTATTGCTGATTATAATTATAAATGCCAGATGATTTTCATG

mRBD  GGTGTGTACTAGCTTGGAACTCGTAACATTGATGCTACTTCTACTGGTAACTACAAC
      ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** *
S-RBD  GGTGTGTCCTTGCTTGGAACTAGGAACATTGATGCTACTTCAACTGGTAATTATAAT

mRBD  TACAAATACCGTTACCTACGTCACGGTAACTACGTCCTTTCGAACGTGATATTTCTAAC
      ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** *
S-RBD  TATAAATATAGGTATCTTAGACATGGCAAGCTTAGGCCCTTTGAGAGAGACATATCTAAT

mRBD  GTACCTTCTCTCCTGATGGTAAACCTTGTACTCCTCCTGCTCTAACTGTTACTGGCCT
      ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** *
S-RBD  GTGCCCTTCTCCCCTGATGGCAAACCTTGCACCCACCTGCTCTTAATTGTTATTGGCCA

mRBD  CTAAACGATTACGGTTTCTACTACTACTGGTATTGGTTACCAACCTTACCGTGTAGTA
      **** ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** ** *
S-RBD  TTAATGATTATGGTTTTTACACCCTACTGGCATGGCTACCAACCTTACAGAGTTGTA

mRBD  GTACTATCTTTCGAACTACTAAACGCTCCTGCTACTGT
      ***** ** ** ** ** *
S-RBD  GTACTTCTTTGAACTTTAAATGCACCGGCCACGGT

```

图 1 优化后 mRBD 序列与原序列 S-RBD 对比分析

Fig. 1 Sequence comparison of the codon-optimized mRBD with the native S-RBD sequence.

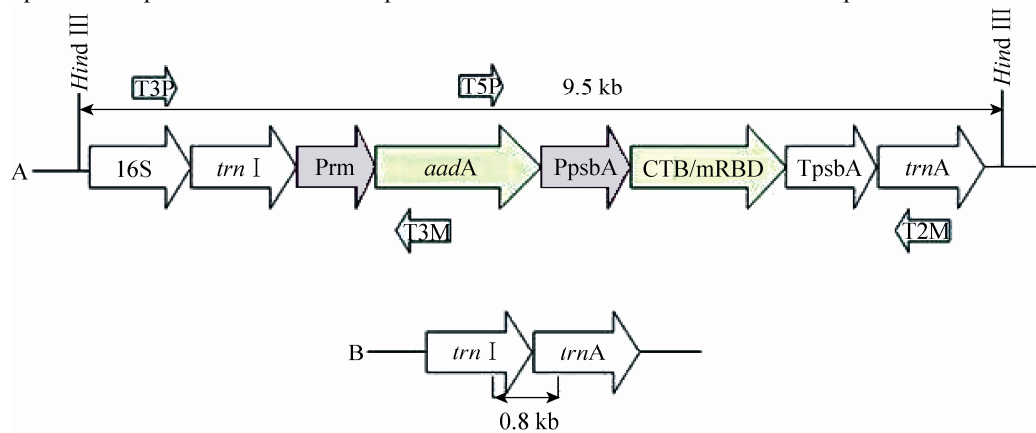


图 2 烟草叶绿体表达载体 pLD-CTB-mRBD 示意图

Fig. 2 Schematic representation of the chloroplast expression vector pLD-CTB-mRBD. (A) Expression vector pLD-CTB-mRBD and annealing positions of the primer pairs. (B) Position of the probe template for Southern blotting analysis.

再生植株进行 PCR 检测 (T3P/T3M, T5P/T2M), 结果显示, 其中 19 株能够扩增出目的条带, 而对照非转基因植株则没有相应的条带, 初步表明目的基因已整合到烟草叶绿体基因组中 (图 3)。其他阴性非转基因植株的出现可能是由于核转化或是烟草 16S rRNA 基因突变的原因^[20]。对获得的 19 株 PCR 阳性植株进行 3-4 轮高压筛选 (500-700 mg/L 壮观霉素), 加快叶绿体基因组的同质化。Southern 杂交分析表明, 转基因植株在

9.5 kb 左右处产生阳性杂交信号, 而在 7.67 kb 处没有条带, 表明目的基因已整合到叶绿体基因组中, 并获得同质化 (图 4)。获得的同质化烟草转基因植株移栽至温室后能够正常生长和结实, 且在外部表型上与对照非转基因植株无明显差异 (图 5A, 5B)。温室中收获的 T1 代转基因烟草种子在含 500 mg/L 壮观霉素培养基上能够正常萌发生长, 而对照非转基因烟草幼苗则全部白化 (图 5C), 进一步表明转基因烟草植株已获得同质化。

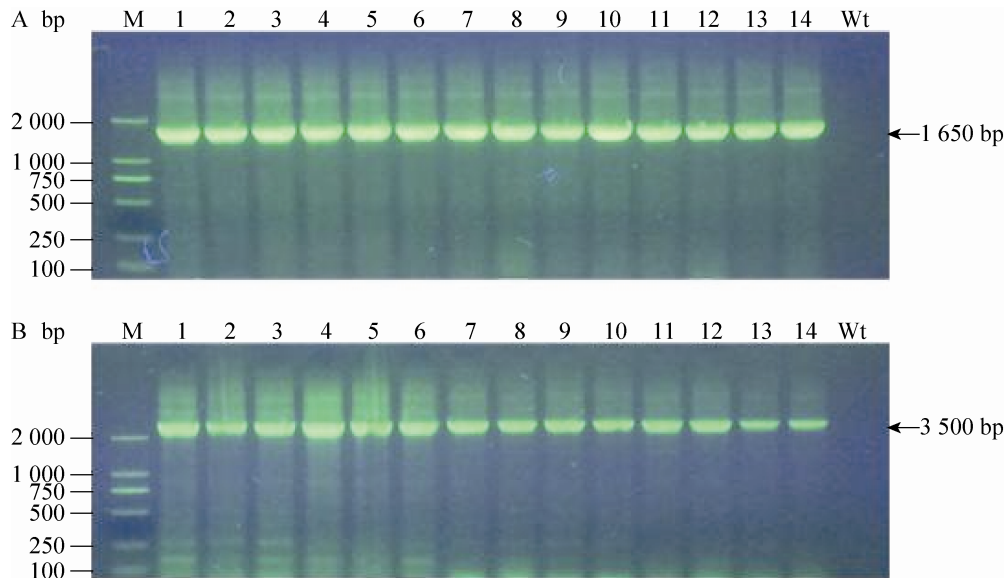


图 3 叶绿体转化再生植株 PCR 检测

Fig. 3 PCR analysis of the regenerated tobacco plantlets. (A) PCR analysis with the T3P/T3 primer pair. (B) PCR analysis with the T5P/T2 primer pair. M: DNA marker; 1-14: regenerated tobacco plantlets; Wt: wild type.

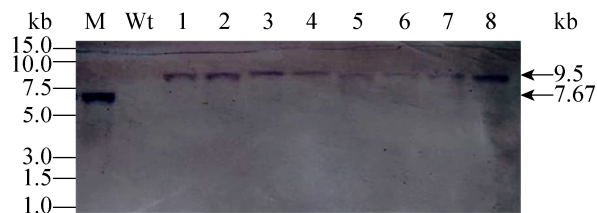


图 4 叶绿体转基因植株 Southern 杂交检测

Fig. 4 Southern blotting analysis of the transplastomic lines. M: DNA marker; 1-8: transplastomic lines; Wt: wild type.



图 5 CTB-RBD 叶绿体转基因烟草植株生长与萌发

Fig. 5 Growth and germination of the CTB-RBD transplastomic tobacco plants. (A) Growth of the transplastomic plants in greenhouse. (B) Flowering and seed-setting of the transplastomic plants. (C) Germination of the transplastomic seeds in the MS medium supplemented with 500 mg/L spectinomycin. Tp: transplastomic plants; Wt: wild type.

2.3 外源融合蛋白 CTB-mRBD 表达分析

为进一步分析外源融合蛋白 CTB-mRBD 在转基因烟草中的表达情况, 我们利用 CTB 抗体进行 Western 杂交分析。结果表明, 在非变性条件下提取的烟草叶片总蛋白中, 融合蛋白在约 34 kDa 处有明显的条带, 与预测分子量大小一致; 融合蛋白在 60–120 kDa 处也出现了杂交信号, 而在约 11 kDa 处则没有出现信号, 表明融合蛋白 CTB-mRBD 在细胞中主要以单体形式存在, 部分以多聚体形式存在, 且在细胞中没有出现融合蛋白剪切现象 (图 6A)。对融合蛋白可溶性分析表明, 融合蛋白主要以可溶性形式存在, 在提取液沉淀中也发现有少量融合蛋白存在 (图 6B)。这一结果与 Lakshmi 等^[20]的研究相一致。

2.4 外源重组蛋白 CTB-mRBD 表达量分析

Western 杂交分析表明, 外源融合蛋白 CTB-mRBD 在细胞中主要以可溶性形式存在, 因此, 本研究采用 ELISA 方法对叶绿体转基因烟草植株中 CTB-mRBD 的表达量进行分析。结果表明, 在不同生长发育阶段的烟草叶片中,

成株期叶片细胞中的融合蛋白表达水平最高, 达 6.15% TSP。其次为幼苗期和衰老期叶片, 其表达量分别为 3.77% TSP 和 3.54% TSP (图 7A)。衰老叶片中外源融合蛋白表达水平的降低可能与叶片中蛋白酶活性增强的原因有关。对不同部位叶片中融合蛋白表达水平分析表明, 中部叶片细胞中的蛋白表达水平最高 (3.58% TSP), 其次为上部叶片 (2.66% TSP) 和下部叶片 (1.54% TSP) (图 7B)。其表达水平变化趋势与不同生长发育阶段的烟草中融合蛋白表达量变化相一致。为进一步分析外源融合蛋白表达量受光照强度变化的影响程度, 我们对不同时间点成熟烟草叶片外源融合蛋白的表达量进行了分析。结果表明, 随着光照强度的增加 (中午 12 时), 融合蛋白的表达水平最高, 达到 10.42% TSP, 而在光照强度较低的时间段内 (上午 8 时, 下午 6 时), 融合蛋白的表达水平则下降到 8.76% TSP 和 8.00% TSP (图 7C)。融合蛋白表达水平随光照强度的变化可能与烟草 *psbA* 启动子有关, 其表达效率受光照强度影响^[21]。

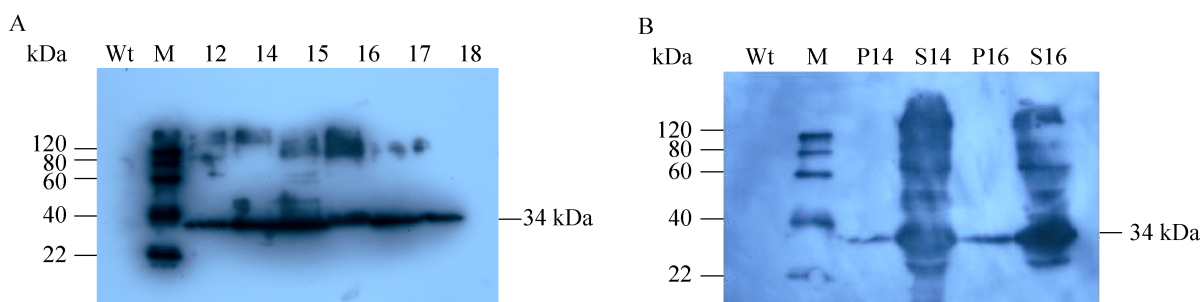


图 6 叶绿体转基因植株 Western 杂交检测

Fig. 6 Western blotting analysis to detect expression of recombinant proteins in transplastomic plants. (A) Immunoblots with anti-CTB antibody showing presence of expected size fusion protein band in CTB-RBD tobacco. (B) Immunoblots showing distribution of recombinant fusion protein in the supernatant and pellet fractions of leaf extract from CTB-RBD tobacco. M: protein standard; Wt: wild type; number denoting different transplastomic lines; P: pellet fraction of leaf extract from transplastomic plant; S: supernatant fraction of leaf extract from transplastomic plant; the primary anti-CTB antibody was used in Western blotting analysis and 20 μ L of samples was added in each lane.

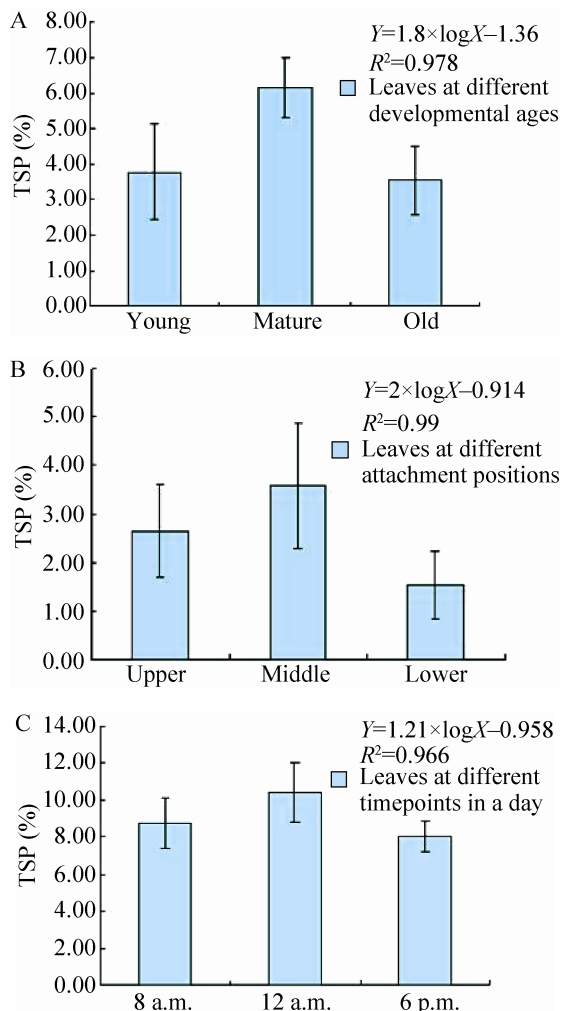


图7 重组融合蛋白CTB-RBD在叶绿体转基因烟草植株不同发育阶段、不同部位和不同时间点表达量分析

Fig. 7 Quantitation of the recombinant fusion protein CTB-RBD in leaves at different developmental ages, attachment positions, timepoints in a day. (A) Expression levels of CTB-RBD in leaves at different developmental ages (young, mature, old). (B) Expression levels of CTB-RBD in leaves at different attachment positions (upper, middle, lower). (C) Expression levels of CTB-RBD in leaves at different timepoints (8 a.m., 12 a.m., 6 p.m.) in a day. TSP%: CTB-RBD protein in percent total soluble protein of the leaves. Three independent measurements were made to quantify expression levels of fusion protein.

3 讨论

已有的研究表明, 注射或口服植物源病毒亚基疫苗可以有效诱导试验动物产生粘膜和血清免疫反应^[22]。在植物中表达的疫苗抗原同时也可以用来血清抗体检测。SARS CoV 主要通过其表面 S 糖蛋白识别宿主细胞上的受体进入细胞。研究表明, S 蛋白含有重要的抗原表位, 在介导病毒与宿主细胞表面受体结合及介导病毒进入细胞过程中起着关键性作用^[23-24]。S 糖蛋白的 S1 亚基中 318-510 氨基酸区域可以有效地结合机体细胞功能受体 ACE2^[15], 因此, 这一区域也被认为是 SARS 病毒 S 蛋白的受体结合区 RBD。Babcock 等^[25]利用哺乳动物细胞表达 S 糖蛋白 1-190 氨基酸区域。结果表明, S190 糖蛋白在动物细胞中能够进行正确的翻译后修饰, 且能够有效结合 Vero 细胞表明受体。Wang 等^[14]利用 HEK293 细胞表达了 RBD-Fc 融合蛋白 (人免疫球蛋白 G1 的 Fc 段)。流式细胞仪分析表明, 纯化 RBD-Fc 能够有效结合细胞表明受体 ACE2, 并引导融合蛋白进入细胞。原核表达研究表明, 携带 RBD 序列的重组融合蛋白 RBD-Fc 可以有效地结合 ACE2, 其结合效率显著高于 S1 糖蛋白。进一步实验研究发现, 进入细胞的 RBD 可以有效激发小鼠机体产生高水平的中和抗体反应^[16]。攻毒实验表明, 诱发产生的中和抗体可以有效识别 S 蛋白的 RBD 序列, 并抑制 SARS CoV 病毒的再次感染^[17]。在利用植物表达重组 SARS 亚基疫苗方面, Li 等^[26]首次在烟草中表达了 SARS CoV S 突刺蛋白 S1 亚基 1-658 氨基酸区域, 外源重组蛋白表达水平达细胞可溶性蛋白 0.2%。不过, 目前尚未见到有利用叶绿体特异性表达 S 突刺蛋白受体结合

区 RBD 的报道。

Daniell 等^[9]的研究表明,叶绿体表达 CTB 重组蛋白通常以聚合体的形式存在。CTB 聚合体能够有效结合肠道上皮细胞膜上的受体,并诱发抗原特异性抗体反应^[9,27]。本研究利用烟草叶绿体表达的重组融合蛋白 CTB-RBD 在细胞中主要以可溶性单体的形式存在,部分以多聚体形式存在。在本实验条件下没有检测到重组融合蛋白 CTB-RBD 被剪切为单体的现象,这一点与 Lakshmi 等^[20]的研究结果不同。外源重组蛋白在叶绿体中的表达水平受多方面因素的影响。除了与转录和翻译效率等因素有关外,外源融合蛋白的稳定性及叶绿体发育程度也是影响其表达水平的重要因素^[19]。在本研究中,衰老叶片和下部叶片中的重组蛋白表达水平都明显降低,其原因可能与衰老叶片中蛋白酶活性增强或是细胞中叶绿体降解等因素有关。而成熟叶片中外源蛋白的表达水平显著高于幼苗期叶片则可能与成熟叶片中叶绿体数量较多(成熟烟草细胞中的叶绿体数量达 100 多个,基因组拷贝数达 10 000 个以上)且发育程度较高等原因有关。这一结果与其他叶绿体表达重组药用蛋白研究一致^[19-20]。另外,本研究选用的烟草 *psbA* 启动子显著影响外源重组蛋白表达水平,该启动子的表达效率受到光照强度的明显影响^[21]。在光照强度较高时(中午 12 时),外源融合蛋白 CTB-RBD 的表达水平可以达到 10.42% TSP,而随着光照强度的降低,外源融合蛋白的表达量也随之降低。关于叶绿体表达融合蛋白 RBD 功能活性问题,已有的研究表明,CTB 及空间位阻序列 GPGP 不会影响重组疫苗抗原的功能^[9,20,27]。在后期的研究中,我们将利用 RBD 特异抗体及受体 ACE2 结合试验,进一

步明确重组 RBD 的活性功能,并期望最终为植物源 SARS 亚基疫苗 RBD 的生产以及 SARS 血清抗体检测提供一套低成本、安全、高效的技术平台。

致谢: 本文通讯作者曾在美国中佛罗里达大学 Henry Daniell 教授实验室进行为期一年的访问学习,期间 Henry Daniell 教授在叶绿体生物反应器研究方面给作者进行了细致的指导,在此一并致谢。

REFERENCES

- [1] De CB, Moar W, Lee SB, et al. Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(1): 71-74.
- [2] Bally J, Nadai M, Vitel M, et al. Plant physiological adaptations to the massive foreign protein synthesis occurring in recombinant chloroplasts. *Plant Physiol*, 2009, 150(3): 1474-1481.
- [3] Oey M, Lohse M, Kreikemeyer B, et al. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant J*, 2009, 57(3): 436-445.
- [4] Maliga P, Bock R. Plastid biotechnology: food, fuel, and medicine for the 21st century. *Plant Physiol*, 2011, 155(4): 1501-1510.
- [5] Arlen PA, Singleton M, Adamovicz JJ, et al. Effective plague vaccination via oral delivery of plant cells expressing F1-V antigens in chloroplasts. *Infect Immun*, 2008, 76(8): 3640-3650.
- [6] Gisby MF, Mellors P, Madesis P, et al. A synthetic gene increases TGFb3 accumulation by 75-fold in tobacco chloroplasts enabling rapid purification and folding into a biologically active molecule. *Plant Biotechnol J*, 2011, 9(5): 618-628.
- [7] Glenz K, Bouchon B, Stehle T, et al. Production of a recombinant bacterial lipoprotein in higher plant chloroplasts. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(1): 76-77.
- [8] Goldstein DA, Thomas JA. Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *Q J Med*, 2004, 97(11): 705-716.
- [9] Daniell H, Lee SB, Panchal T, et al. Expression of

- the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol*, 2001, 311(5): 1001–1009.
- [10] Zhong X, Qi GX, Kang LS, et al. Recent advances in recombinant pharmaceutical proteins and vaccines production in chloroplasts. *J Agril Biotech*, 2012, 20(9): 1080–1096 (in Chinese). 钟雪, 齐广勋, 康岭生, 等. 利用植物叶绿体表达重组药用蛋白和疫苗研究进展. *农业生物技术学报*, 2012, 20(9): 1080–1096.
- [11] Kang TJ, Loc NH, Jang MO, et al. Expression of the B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin in the chloroplasts of plants and its characterization. *Transgenic Res*, 2003, 12(6): 683–691.
- [12] Shao HB, He DM, Qian KX, et al. The expression of classical swine fever virus structural protein E2 gene in tobacco chloroplasts for applying chloroplasts as bioreactors. *Comptes Rendus Biologies*, 2008, 331(3): 179–184.
- [13] McBride R, Fielding BC. The role of severe acute respiratory syndrome (SARS)-coronavirus accessory proteins in virus pathogenesis. *Viruses*, 2012, 4(11): 2902–2923.
- [14] Wang SX, Guo F, Liu KT, et al. Endocytosis of the receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein together with virus receptor ACE2. *Virus Res*, 2008, 136(1/2): 8–15.
- [15] Wong SK, Li WH, Moore ML, et al. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem*, 2004, 279(5): 3197–3201.
- [16] Chen J, Miao L, Li JM, et al. Receptor-binding domain of SARS-Cov spike protein: soluble expression in *E. coli*, purification and functional characterization. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(39): 6159–6164.
- [17] He YX, Lu H, Siddiqui P, et al. Receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein contains multiple conformation-dependent epitopes that induce highly potent neutralizing antibodies. *J Immunol*, 2005, 174(8): 4908–4915.
- [18] Verma D, Samson NP, Koya V, et al. A protocol for expression of foreign genes in chloroplasts. *Nat Protocols*, 2008, 3(4): 739–758.
- [19] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. UNIT 2.3: Preparation of Genomic DNA from Plant Tissue in *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley, 1995.
- [20] Lakshmi PS, Verma D, Yang XD, et al. Low cost tuberculosis vaccine antigens in capsules: expression in chloroplasts, bio-encapsulation, stability and functional evaluation *in vitro*. *PLoS ONE*, 2013, 8(1): e54708.
- [21] Verma D, Daniell H. Chloroplast vector systems for biotechnology applications. *Plant Physiol*, 2007, 145(4): 1129–1143.
- [22] Davoodi SA, Samson N, Daniell H. The green vaccine: a global strategy to combat infectious and autoimmune diseases. *Hum Vaccin*, 2009, 5(7): 488–493.
- [23] Bosch BJ, Cornelis AM, Peter JM, et al. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol*, 2003, 77(16): 8801–8811.
- [24] Chakraborti S, Prabakaran P, Xiao XD, et al. The SARS coronavirus S glycoprotein receptor binding domain: fine mapping and functional characterization. *Virol J*, 2005, 2: 73–80.
- [25] Babcock GJ, Eshaki DJ, Thomas WD, et al. Amino acids 270 to 510 of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein are required for interaction with receptor. *J Virol*, 2004, 78(9): 4552–4560.
- [26] Li HY, Ramalingam S, Chye ML. Accumulation of recombinant SARS-CoV spike protein in plant cytosol and chloroplasts indicate potential for development of plant-derived oral vaccines. *Exp Biol Med*, 2006, 231(8): 1346–1352.
- [27] Koya V, Moayeri M, Leppa SH, et al. Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infection Immun*, 2005, 73(12): 8266–8274.

(本文责编 郝丽芳)