

利用植物质体转基因技术高效表达抗人源白介素 6 单链抗体

吴梦婷[#], 王海涛[#], 张森, 许文博, 张望, 李圣纯

湖北大学 生命科学学院 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

吴梦婷, 王海涛, 张森, 许文博, 张望, 李圣纯. 利用植物质体转基因技术高效表达抗人源白介素 6 单链抗体. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2269-2280.

WU MT, WANG HT, ZHANG M, XU WB, ZHANG W, LI SC. High-level expression of anti-interleukin-6 single chain variable fragment through plastid transformation technology. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2269-2280.

摘要: 白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 是与包括癌症在内的多种疾病相关的一种多功能细胞因子, 免疫疗法利用抗人源 IL-6 抗体来治疗相关疾病取得了很好的治疗效果。植物作为生物反应器可以有效降低药用蛋白的生产成本, 同时积累功能蛋白。通过基因枪轰击和再生筛选, 得到了 2 个在烟草质体中表达了鼠源抗人源 IL-6 单链抗体 (single chain variable fragment, scFv) 的独立株系, 并用 Southern blotting 鉴定了质体转化烟草的同质化状态。抗人源 IL-6 scFv 基因在质体转基因烟草中成功转录和翻译, 功能性抗人源 IL-6 scFv 在质体转基因烟草叶片中的含量占到总可溶性蛋白的 1%, 达到 41 mg/kg 鲜重。另外, 质体转基因烟草的表型与野生型烟草相比并没有显著差异, 它们具有相似的生长速率、成熟植株的株高以及果荚数目。抗人源 IL-6 scFv 的高表达量也表明了利用质体转基因植物低成本生产 scFv 的潜力。

关键词: 质体转基因技术; 白介素 6; 单链抗体; 植物生物反应器; 免疫疗法

Received: November 23, 2021; **Accepted:** February 21, 2022; **Published online:** February 23, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32071477); Innovation Base for Introducing Talents of Discipline of Hubei Province, China (2019BJH021)

[#]These authors contributed equally to this study

Corresponding author: LI Shengchun. E-mail: shengchun.li@hubu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (32071477); 湖北省引智创新示范基地 (2019BJH021)

High-level expression of anti-interleukin-6 single chain variable fragment through plastid transformation technology

WU Mengting[#], WANG Haitao[#], ZHANG Miao, XU Wenbo, ZHANG Wang, LI Shengchun

State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

Abstract: Interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine which participates in the pathogenesis of a variety of clinical disorders, including many kinds of cancers. Anti-IL-6 antibody was proved to be useful for the immunotherapy of various inflammatory diseases. Plants are low-cost platforms for producing specific proteins of therapeutic interest. Two dependent transplastomic tobacco lines expressing murine anti-IL-6 single chain variable fragment (scFv) were generated after bombardment and regeneration, homoplasmy was then verified by Southern blotting analysis. The anti-IL-6 scFv gene was successfully expressed at both transcriptional and translational levels in transplastomic tobacco plants. Functional anti-IL-6 scFv accumulated to 1% of total soluble proteins, namely 41 mg/kg fresh weight. There was no obvious phenotypic difference between the wild-type and the transplastomic tobacco plants, including the growth rate, the height of mature plants and the number of siliques. The high-level expression of anti-IL-6 scFv indicates the potential for cost-effective production of scFv using transplastomic plants.

Keywords: plastid transformation technology; interleukin-6; single chain variable fragment; plant bioreactor; immunotherapy

白介素 6 (interleukin 6, IL-6) 是一种多效应细胞因子, 由肿瘤细胞在内的多种细胞产生并分泌, 具有调节免疫反应以及细胞增殖和分化等功能。研究表明, IL-6 的过量表达与外科创伤、类风湿性关节炎、绝经后骨质疏松症、慢性自身免疫性疾病和艾滋病等多种临床疾病的致病^[1-2], 以及多种肿瘤的发生相关^[3]。为了中和过多的 IL-6 来减弱人体的炎症反应, 免疫疗法利用抗人源 IL-6 抗体结合过量的 IL-6, 进而阻断炎症细胞内的异常通路反应, 目前已经证明该疗法对于类风湿性关节炎和神经质脊髓炎等多种炎症的免疫治疗非常有效^[4-5], 同时也对骨髓瘤和非小细胞型肺癌也有抑制作用^[6-7]。单链抗体 (single chain variable fragment, scFv)

是通过短肽连接可变轻链和重链结构域, 并保持其完整的抗原结合特异性的最小功能结构单位, 具有分子量小、免疫原性低、半衰期短和组织穿透力强等特点, 在临床诊断、疾病治疗和预防等方面具有应用前景^[8]。可见, 抗人源 IL-6 scFv 对于相关疾病的免疫性治疗极具潜力。

动物细胞作为反应器生产药用蛋白时, 由于复杂的生产纯化流程以及冷冻和无菌运输保存要求, 药用蛋白生产成本非常昂贵。植物作为生物反应器生产药用蛋白可以有效降低生产成本, 因此受到越来越多的关注。利用植物生产生物药剂的成本是中国仓鼠卵巢细胞作为生产系统生产生物药剂成本的千分之一^[9]。同时, 植物生物反应器生产重组蛋白时, 植物体内不

会产生人源病原体或者毒素,大大提高了植物生物反应器生产系统的安全性。植物生物反应器生产药用蛋白非常成功的示例是在胡萝卜中表达的葡萄糖脑苷脂酶 (ELELYSO™),这是第一个由植物生产并被美国食品药品监督管理局所认证、用于治疗高歇病的人类用药物^[10]。

目前,植物作为生物反应器可以通过细胞核转基因技术和质体(叶绿体)转基因技术成功实现。相比于外源基因随机插入核基因组的传统核转基因技术而言,质体转基因技术通过同源重组将外源基因定点整合到植物的质体基因组上,不会出现由于随机插入而导致的基因失活现象^[11]。由于大部分植物质体基因组遗传方式为母系遗传,外源基因通过花粉产生基因漂移的概率极低^[12]。最重要的是,以烟草为例,每个烟草叶肉细胞含有高达10 000个质体基因组拷贝,因此整合到质体基因组上的外源基因具有极高的表达潜力。例如,在质体中表达噬菌体裂解蛋白作为药用蛋白抗生素时,该蛋白的积累水平达到总的可溶性蛋白的70%^[13]。而且已有研究表明,在植物的质体中表达药用蛋白可以正常折叠,并且形成二硫键,维持蛋白的功能^[14]。此外,由于质体转基因植物表达的外源蛋白会聚集在质体中,因此通过分离质体可以大大降低药用蛋白的分离纯化成本^[15],而且质体转基因植物叶片进行冷冻、干燥或者高温处理后,质体内的药用蛋白依旧非常稳定^[16],可以有效降低药用蛋白的保存和运输成本。通过质体工程可以成功生产用于治疗老年痴呆症、糖尿病、高血压、血友病、视网膜病以及艾滋等多种疾病的药物^[16-17]。因此,通过植物质体工程大量生产抗人源IL-6 scFv具有较高的商业化生产前景。

通过核转基因技术在烟草中表达鼠源抗人源IL-6 scFv时,植物具有非常严重的表型,表现为植株矮小并且早衰,叶片和根中的抗人源

IL-6 scFv表达量很低且无法识别人源IL-6,只有通过根尖离体培养才能得到功能性抗人源IL-6 scFv^[18]。本研究通过质体转基因技术,将鼠源抗人源IL-6 scFv表达盒整合进入烟草质体基因组中,并在质体转基因烟草中成功检测到了抗人源IL-6 scFv,该抗体的表达量达到叶片总的可溶性蛋白的1%,且能有效识别IL-6。与野生型烟草相比,质体转化植株的生长发育没有明显差异。本研究为转基因植物生产抗人源IL-6 scFv的商业化运用提供了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和植物材料

本实验构建质体转化质粒中所用菌种为大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α ,质体转化所用烟草为*Nicotiana tabacum*,品种为Petit Havana。

1.1.2 培养基

LB培养基:10 g/L胰蛋白胨,5 g/L酵母提取物,10 g/L NaCl,121 °C条件下高压灭菌20 min用于培养转入质体转化质粒的阳性克隆。

烟草再生培养基:Murashige & Skooge (MS)培养基(Duchefa Biochemie, M0245),30 g/L蔗糖,5.4 g/L琼脂,1 mg/L 6-苄基氨基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA),0.1 mg/L α -萘乙酸(α -naphthalene acetic acid, NAA)。

烟草生根培养基:MS培养基(Duchefa Biochemie, M0245),30 g/L蔗糖,5.4 g/L琼脂,0.1 mg/L NAA。

1.2 实验方法

1.2.1 质体转化载体的构建

在本实验室已发表的质体转化载体pYY12^[19]的基础上构建表达鼠源抗人源IL-6 scFv的质体转化载体。pYY12含有一个绿色荧光蛋白基因(*GFP*)表达盒和一个筛选标记基

因 *aadA* (编码对壮观霉素和链霉素均具有抗性的氨基糖苷-3'-腺苷酸转移酶) 表达盒。根据鼠源抗人源 IL-6 scFv 的氨基酸序列和质体翻译密码子偏好性来进行密码子优化^[18-20], 并在武汉金开瑞生物工程有限公司合成鼠源抗人源 IL-6 scFv 的基因。随后利用基因特异性上、下游引物 IL-6_scFv-F 和 IL-6_scFv-R (表 1) 扩增抗人源 IL-6 scFv 的基因序列 (765 bp), 在抗人源 IL-6 scFv 的 3'端引入 6 个 His 标签用于蛋白纯化和检测, 同时分别在基因两侧携带 15 bp 和 16 bp 的 pYY12 同源序列。将抗人源 IL-6 scFv 基因的 PCR 产物和经 *Nco* I/*Xba* I 酶切去除 *GFP* 基因的 pYY12 骨架用 In-Fusion HD Cloning 试剂盒 (TaKaRa) 处理后连接, 并转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中进一步筛选阳性克隆, 得到阳性克隆后通过测序验证插入序列的正确性。

1.2.2 烟草质体转化

用含有 5%有效氯的次氯酸钠处理野生型烟草种子, 并播种在含有 30 g/L 蔗糖的 MS 培养基上。两周后烟草长出真叶再移到培养盒中继续培养, 直到烟草的高度达到 4-5 cm, 收集烟草叶片准备进行基因枪 (PDS 1 000/He system, Bio-Rad) 轰击。轰击时, 基因枪采用七孔的适配器, 轰击压强为 7 584.5 kPa, 轰击距离为 9 cm。轰击后的叶片剪切成 5 cm 大小的方片, 放置在含有 500 mg/L 壮观霉素的烟草

再生培养基上培养, 直至抗性芽出现。

得到的抗性芽后将叶片剪切下来, 继续放在含有 500 mg/L 壮观霉素的烟草再生培养基上进行下一轮筛选。抗性芽需要再经过 1-2 轮的筛选, 才能使所有质体基因组都含有目的基因和筛选标记基因, 也就是达到同质化状态^[21]。同质化的烟草种植在温室中收种。烟草的生长条件为: 25 °C 16 h 光照/22 °C 8 h 黑暗。

1.2.3 烟草总 DNA 提取和 Southern blotting

按照 CTAB 法从 6 周大的烟草幼苗叶片中提取植物总 DNA^[22]。利用 Southern blotting 检测烟草的同质化状态, 将 5 μ g 野生型烟草和两个独立的质体转基因株系烟草的总 DNA 用限制性核酸酶 *Bgl* II 处理 16 h, 随后用 0.8%的琼脂糖凝胶将这 3 个样品中不同大小的 DNA 条带分开。随后将琼脂糖凝胶中的 DNA 转移到尼龙膜 (GE Healthcare) 上, 用长度为 550 bp 特异性结合烟草 *psaB* 基因的 DIG 标记探针 (表 1) 结合尼龙膜上的目的片段^[23]。探针的标记和 Southern blotting 检测参照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) 试剂盒说明书完成。

1.2.4 烟草总 RNA 提取和 Northern blotting

根据 RNAiso plus (TaKaRa) 的使用说明书步骤来提取烟草总 RNA。将 5 μ g 野生型烟草和两个独立的质体转基因株系烟草的总 RNA

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Purposes
IL-6_scFv-F	<u>GAAGGAGATATACCC</u> ATGCAAGTTCAATTA AAA AAGAATCT	Cloning
IL-6_scFv-R	<u>ATTTGATTCTAGATTA</u> ATGATGATGATGATGATGTTTAATTTCTAATTTAGT	
IL-6_probe-F	ATGCAAGTTCAATTA AAA AAGAATCT	Northern blotting
IL-6_probe-R	TTTAATTTCTAATTTAGT	
psaB_probe-F	CCCAGAAAGAGGCTGGCCC	Southern blotting
psaB_probe-R	CCCAAGGGCGGGA ACT GTC	

The underlined nucleotides represent the homologous sequence used for cloning and the nucleotides in bold mark the His tag sequence.

在 80 °C 处理 5 min, 打开 RNA 的二级结构, 随后用 1% 的甲醛变性胶分离不同大小的 RNA 条带, 并将甲醛变性胶的所有 RNA 转移到尼龙膜上。用抗人源 IL-6 scFv 基因特异性的探针 (表 1) 来检测抗人源 IL-6 scFv 的信使 RNA (mRNA)。探针的标记和 Northern blotting 检测参照 DIG Northern Starter Kit (Roche) 试剂盒说明书完成。

1.2.5 烟草总蛋白提取和 Western blotting

6 周大的烟草幼苗叶片放入液氮中冷冻, 利用苯酚法提取叶片的总蛋白^[24]。蛋白浓度是通过 Easy II Protein Quantitative 试剂盒 (TransGen Biotech) 来检测的, 5 μg 野生型烟草和两个独立的质体转基因株系烟草的总蛋白通过 18% 的 SDS-PAGE 分离不同大小的蛋白条带, 进而检测 scFv 的大小与表达量。带有 His 标签的 IL-1 抗原 (Sino Biological) 作为阳性对照, IL-1 抗原的初始浓度为 0.1 mg/mL, 加入不同体积 IL-1 抗原原液得到 50–250 ng 的 IL-1 抗原浓度梯度来检测抗人源 IL-6 scFv 的大小和表达量。对于 Western blotting 分析, 先通过电转法将 SDS-PAGE 分离后的蛋白质转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF 膜, GE Healthcare) 上, 然后用 His 标签抗体 (ABclonal) 检测抗人源 IL-6 scFv, 进一步确认抗人源 IL-6 scFv 的大小和表达量。

1.2.6 抗人源 IL-6 scFv 活性检测

将 0.1 mol/L Tris 缓冲液 (pH 7.6) 加入液氮冷冻并研磨的 5 周大烟草叶片样品中, 离心后上清液为烟草的总蛋白。用浓度梯度为 0、0.025、0.050、0.100、0.150 mg/mL 的牛血清蛋白及其对应的吸光值绘制标准曲线, 通过考马斯亮蓝 G250 (Macklin) 法来测定提取的总活性蛋白的浓度。随后通过人抗 IL-6 抗体 (IL-6 Ab) 酶联免疫分析试剂盒 (spbio) 分析质体转基因

株系中表达的鼠源抗人源 IL-6 scFv 的活性。

2 结果与分析

2.1 转抗人源 IL-6 scFv 质体转基因烟草的获得

2.1.1 转抗人源 IL-6 scFv 同质化植株的获取

首先将表达抗人源 IL-6 scFv 的质体转化载体通过基因枪法转入烟草叶片, 转化后的烟草叶片放置在含有壮观霉素的再生培养基上进行培养, 出现抗性芽后, 将抗性芽移到含有壮观霉素的生根培养基上。选取质体转基因植物 *Nt-pt-anti-IL-6-1* 和 *Nt-pt-anti-IL-6-5* 两个独立的阳性株系来进行其他鉴定。由于质体转基因技术通过同源重组将表达抗人源 IL-6 scFv 的表达盒和 *aadA* 表达盒定点整合进入烟草的质体基因组 *trnG* 和 *trnfM* 两个基因之间, 我们可以利用限制性片段长度多态性分析来鉴定质体转基因植物的同质化程度, 也即含有外源基因的质体基因组与总质体基因组的比率。在外源基因插入位点两侧各有一个 *Bgl* II 酶切位点, 选用的探针可以特异性地结合该片段, 通过 Southern blotting 杂交片段大小的差异可以确定目的基因是否整合进入 *trnG* 和 *trnfM* 两个质体基因之间。图 1A 标记了探针的位置以及杂交条带的大小, 图 1B 显示了 *psaB* 探针杂交实际得到的目的条带大小。野生型烟草的总 DNA 杂交得到的条带大小在 3.5 kb 左右, 而质体转基因植株的总 DNA 杂交得到的条带明显比野生型杂交得到的条带要大, 在 6.3 kb 左右, 与我们预测的条带大小相符。而 *Nt-pt-anti-IL-6-1* 和 *Nt-pt-anti-IL-6-5* 两个孔道在野生型得到的杂交带同一位置也有非常淡的条带, 是由于质体基因转移到核基因组而导致的信号带^[25]。种子测试 (图 1C) 进一步验证了质体转基因植物的同质化程度, 野生型种子只能在不含壮观霉素的 MS 培

培养基上呈绿色而在含壮观霉素的 MS 培养基上呈白色, 而 *Nt-pt-anti-IL-6-1* 和 *Nt-pt-anti-IL-6-5* 的种子在含壮观霉素的培养基上仍然呈绿色且没有出现分离比, 说明这两个株系已经达到同质化。

2.1.2 质体转基因烟草的表型

与之前报道的核转基因植物呈现严重的早衰表型不同^[18], 表达抗人源 IL-6 scFv 的质体转基因烟草植株没有出现明显的表型。我们首先观察了在异养条件和自养条件下, 质体转基因植物和野生型植物的差异。实验发现异养条件下没有明显差别, 图 2A 显示了 *Nt-pt-anti-IL-6-1* 和 *Nt-pt-anti-IL-6-5* 两个质体转基因株系在组培盒

中的生长状态。自养条件下, 质体转基因植物和野生型植物的大小及发育时间均没有明显差异, 图 2B 和 2C 分别显示了 *Nt-pt-anti-IL-6-1* 和 *Nt-pt-anti-IL-6-5* 两个质体转基因株系在土中生长时, 12 周大的烟草植株和 16 周开花期的烟草植株。同时, 我们还统计了开花时期质体转基因植物 *Nt-pt-anti-IL-6-1* 和野生型植株及 16 周大小质体转基因植物 *Nt-pt-anti-IL-6-1* 和野生型植株得到的果荚数目, 测量和统计以后通过独立样本 *t* 检验分析两组数据的差异情况发现, 植物的株高和果荚数在这两组之间没有显著差异 ($P>0.05$, 图 2D-E)。

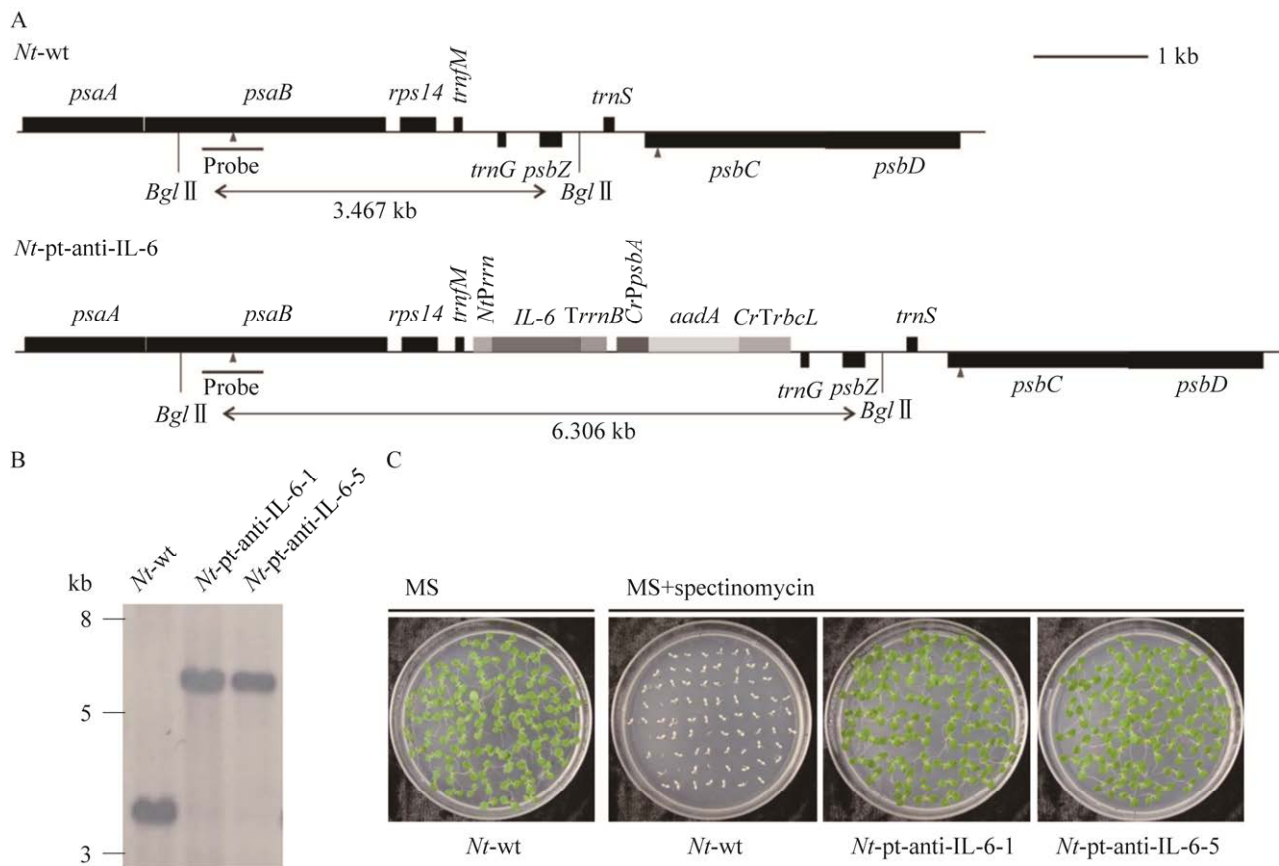


图 1 质体中表达抗人源 IL-6 scFv 同质化植株的获取

Figure 1 Generation of homoplasmic plants expressing murine anti-IL-6-scFv. (A) Physical maps of the transgene targeting region in the plastid genome of wild-type and transplastomic plants. (B) Homoplasmy analysis through Southern blotting. (C) Homoplasmy analysis through seeds test for wild-type and transplastomic plants.

2.2 质体转基因植物中抗人源 IL-6 scFv 转录和翻译水平的鉴定

为了进一步检测 *Nt-pt-anti-IL-6-1* 和 *Nt-pt-anti-IL-6-5* 植物体内的目的基因是否成功转录, 我们通过 Northern blotting 检测了抗人源 IL-6 scFv 基因的转录本, 图 3A 显示通过抗人源 IL-6 单链抗体基因特异性的探针可以得到与我们目的大小相符的条带 (颜色最深的条带), 在目的条带上方的两条带是由于质体基

因组转录时出现的通读现象导致的^[26-27], 下方是总 RNA 的上样对照。

从 Northern blotting 的结果可以看出, 抗人源 IL-6 scFv 的 mRNA 积累量很高, 随后通过 SDS-PAGE 检测了抗人源 IL-6 scFv 的蛋白积累水平, 并成功在 SDS-PAGE 上观察到与目的大小相符的条带 (约 32 kDa)。将一系列浓度梯度的含有 His 标签的 IL-1 蛋白作为对照时, 可以看到转基因植物 *Nt-pt-anti-IL-6-1* 和 *Nt-pt-anti-*

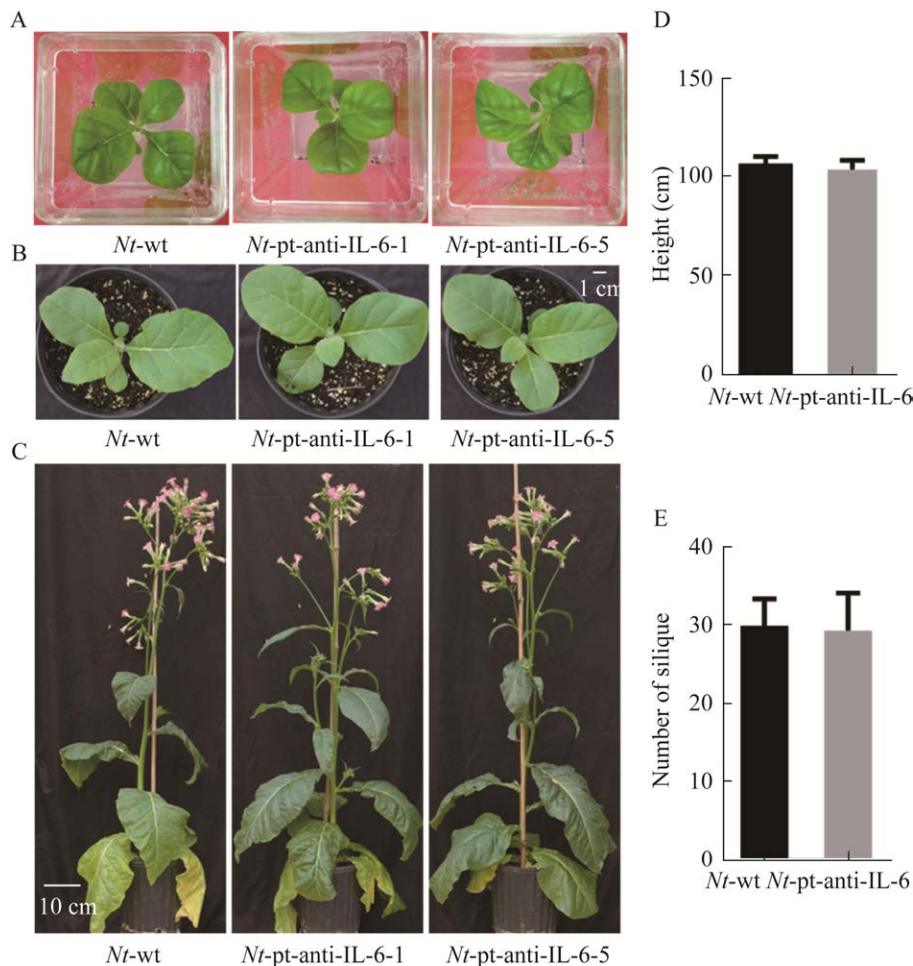


图 2 质体转基因植物的表型分析

Figure 2 Phenotypes of transplastomic plants. (A) Phenotypes of 6-week-old transplastomic plants cultivated under heterotrophic conditions on sucrose-containing MS medium. Phenotypes of transplastomic plants after 8 weeks of growth under autotrophic conditions in soil (B), and 12 weeks of growth in soil (C). (D) Height difference between wild-type tobacco and transplastomic lines in (C). (E) Number of siliques from 16-week-old wild-type tobacco and transplastomic plants. Data are $\bar{x} \pm s$ of 5 plants (D, E).

IL-6-5 出现的 scFv 蛋白表达量为 1%左右 (图 3B)。由于从 SDS-PAGE 观察表达量时需要的蛋白浓度较高, 随后通过 Western blotting 确认了抗人源 IL-6 scFv 表达量为植物总蛋白的 1% (图 3C)。

2.3 质体转基因烟草中抗人源 IL-6 scFv 活性鉴定

为了鉴定质体转基因烟草 *Nt-pt-anti-IL-6* 中抗人源 IL-6 scFv 的活性, 用 Tris 缓冲液提取了植物总蛋白, 并测定了总蛋白的含量, 根据人抗 IL-6 抗体 (IL-6 Ab) 酶联免疫分析试剂盒的

检测范围, 将样品稀释到 0.2×10^{-6} mg/mL, 随后检测植物中的抗 IL-6 scFv 能否与人源 IL-6 抗原特异性识别。选取野生型烟草和两个转基因株系 *Nt-pt-anti-IL-6-1* 和 *Nt-pt-anti-IL-6-5* 各 3 个重复, 称取了样品重量并鉴定了对应的总蛋白含量 (表 2), 通过 ANOVA 分析发现野生型烟草和质体转基因烟草总蛋白含量并没有显著差异。Western blotting 确定了质体转基因烟草中抗人源 IL-6 scFv 表达量为植物总蛋白的 1%, 因此, 抗人源 IL-6 scFv 表达量可以达到 41 mg/kg 鲜重 (表 2)。鉴定抗人源 IL-6 scFv 活性时, 野

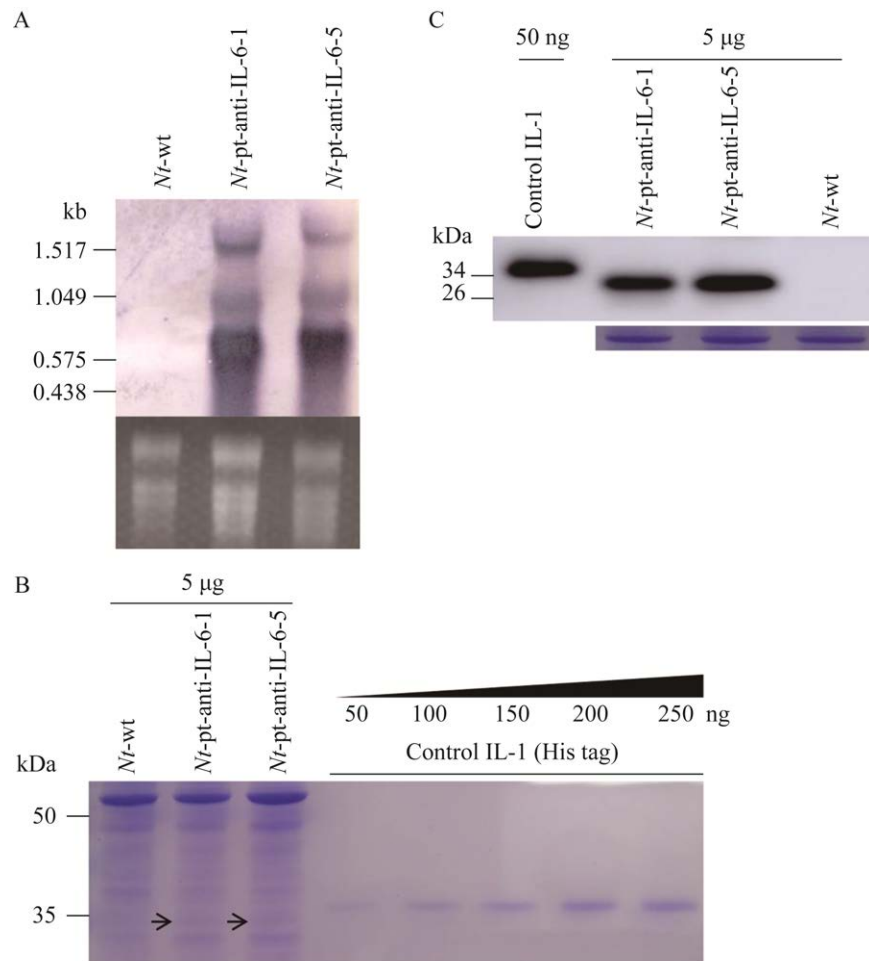


图 3 质体转化烟草中抗人源 IL-6 scFv 转录和翻译水平检测

Figure 3 Analysis of anti-IL-6 scFv expression in transplastomic plants at both transcriptional and translational levels. (A) Northern blotting analysis of anti-IL-6 scFv transcripts. (B) Quantification of anti-IL-6 scFv protein by SDS-PAGE. (C) Western blotting analysis of anti-IL-6 scFv protein accumulation.

表 2 可溶性总蛋白含量及抗人源 IL-6 scFv 的活性鉴定

Table 2 Determination of total soluble proteins and anti-IL-6 scFv activities in 5-week-old tobacco leaf extracts

Item	<i>Nt-wt</i>			<i>Nt-pt-anti-IL-6-1</i>			<i>Nt-pt-anti-IL-6-5</i>		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Weight (g)	0.06	0.06	0.07	0.07	0.09	0.06	0.12	0.09	0.10
Volume (mL)	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Protein concentration (g/L)	0.47	0.63	0.91	0.44	0.93	0.36	0.60	0.90	0.65
Total protein (TP, mg)	0.19	0.25	0.36	0.18	0.37	0.14	0.24	0.36	0.26
TP/weight (g/kg)	3.15	4.46	5.35	2.44	4.13	2.51	2.02	4.09	2.75
anti-IL-6 scFv (mg/kg)	/	/	/	24.36	41.28	25.07	20.16	40.87	27.53
Absorbance 450 nm	0.44	0.49	0.39	0.68	1.30	0.61	0.81	1.20	0.91
Adjusted absorbance	/	/	/	0.25	0.86	0.18	0.37	0.76	0.47
Active anti-IL-6 scFv concentration (ng/L)	/	/	/	2.03	9.36	1.19	3.49	8.20	4.74
Active anti-IL-6 scFv initial concentration (mg/L)	/	/	/	10.13	46.81	5.95	17.46	40.98	23.69

生型植物总蛋白也会发生非特异性结合, 将质体转基因植物总蛋白对应的吸光值减去野生型植物总蛋白对应的吸光值, 再根据标准品计算出质体转基因叶片中对应的活性抗 IL-6 scFv 的含量 (表 2)。检测总蛋白含量和测定抗 IL-6 scFv 活性绘制的标准曲线 R^2 均大于 0.99。

3 总结

植物作为生物反应器的优势在于生产的蛋白药物既可以保持蛋白活性, 也可以大大降低生产成本, 是生产蛋白药物的理想反应器^[28-29]。在植物内存在与哺乳动物细胞类似的转录后修饰, 因此在植物细胞内生产的抗体与哺乳动物细胞产生的抗体没有明显差异^[8,30-31]。随着安全低价的药用蛋白的需求量越来越高, 转基因植物或者植物细胞培养手段被广泛应用于生产哺乳动物重组蛋白, 烟草是生产单链抗体最常用的转基因模式植物, 例如在烟草中表达 HIV 中和抗体 2G12B^[32-33], 烟草细胞悬浮液表达白介素 10^[34], 核转基因和质体转基因烟草中表达乙肝表面抗原^[35]等。转基因植物还可以在果实

以及种子中积累重组药物蛋白, 进而延长其储存时间方便运输。

为了在植物中表达高水平的医用重组蛋白, 我们尝试在烟草质体中表达了抗人源 IL-6 scFv。抗人源 IL-6 scFv 基因由烟草的 16S rRNA 基因的启动子 (*NtPrn*) 驱动, 且 *NtPrn* 融合了噬菌体 T7 的 *g10* 基因的 5'-非编码区序列来调控外源基因的表达^[19]; 筛选标记基因 *aadA* 的表达则由莱茵衣藻的 *psaB* 基因 (编码光系统 I 的 B 亚基^[36], *CrPpsaB*) 的启动子来负责完成 (图 1A)。通过 Southern blotting 检测, 我们得到了同质化的质体转化烟草 (图 1B), 也证明了目的基因和 *aadA* 基因表达盒成功地定点整合到质体基因组中; 同时, 转基因烟草在壮观霉素培养基上的生长情况说明了质体特异性启动子 *CrPpsaB* 有效地驱动了基因 *aadA* 的表达 (图 1C)。随后, 通过 Northern blotting 和 SDS-PAGE 检测了质体转基因烟草中抗人源 IL-6 scFv 基因在转录和翻译水平上的表达量 (图 3)。该结果与之前所报道的核转基因技术生产抗人源 IL-6 scFv 相比^[18], 抗人源 IL-6 scFv 的蛋白积累水

平大大提高。从质体转基因植物生物量占比最大的叶片中直接提取抗人源 IL-6 scFv, 抗体含量达到总可溶蛋白的 1% (图 3B-C), 并且高达 41 mg/kg 鲜重。由于植物细胞核转化的特点是外源基因随机插入, 所以外源基因插入位置不同时, 表达水平也不同。表达抗人源 IL-6 scFv 的核转基因植物叶片和根内的抗人源 IL-6 scFv 的表达水平非常低, 且无法识别 IL-6, 只有对核转化烟草的根尖进行离体培养才能得到有功能性的抗人源 IL-6 scFv, 且含量也不高, 仅占可溶性总蛋白的 0.16%–0.18%^[18], 生产时所需要的生产时间和纯化成本更高。与核转基因植物出现早衰和矮小的表型不同, 表达抗人源 IL-6 scFv 质体转基因烟草没有出现生长异常表型, 其生长和发育以及植物的育性没有受到显著影响 (图 2)。因此, 质体转基因技术更适用于生产抗人源 IL-6 scFv, 可以有效节省生产时间和纯化成本。

通过质体转基因技术生产药用蛋白时, 蛋白的积累水平受到多种因素的影响, 通过改变蛋白翻译的调控元件或者增强蛋白在质体中的稳定性, 可以进一步提高药用蛋白的表达水平^[37]。因此, 利用质体转基因植物生产抗人源 IL-6 scFv 仍有进一步提高产量的可能性。在今后的研究中, 我们还需要在哺乳动物细胞水平以及个体水平进一步检测该 scFv 的生物活性和安全性。在此基础上, 我们可以进一步开发口服药用蛋白。目前, 生菜^[38-39]、番茄^[40-41]、马铃薯^[42-43]和 大豆^[44]等均已成功实现质体转化, 通过在这些人类可直接食用的植物中表达药用蛋白可以进一步降低生产成本。

致谢: 感谢中国留学基金委资助吴梦婷在德国马克斯普朗克植物生理研究所学习质体转基因技术。

REFERENCES

- [1] Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol*, 1993, 54: 1-78.
- [2] Kallen KJ, Zum Büschenfelde KH, Rose-John S. The therapeutic potential of interleukin-6 hyperagonists and antagonists. *Expert Opin Investig Drugs*, 1997, 6(3): 237-266.
- [3] Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, et al. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol*, 2016, 37(9): 11553-11572.
- [4] Araki M, Aranami T, Matsuoka T, et al. Clinical improvement in a patient with neuromyelitis optica following therapy with the anti-IL-6 receptor monoclonal antibody tocilizumab. *Mod Rheumatol*, 2013, 23(4): 827-831.
- [5] Liang B, Song Z, Wu B, et al. Evaluation of anti-IL-6 monoclonal antibody therapy using murine type II collagen-induced arthritis. *J Inflamm (Lond)*, 2009, 6: 10.
- [6] Bayliss TJ, Smith JT, Schuster M, et al. A humanized anti-IL-6 antibody (ALD518) in non-small cell lung cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 2011, 11(12): 1663-1668.
- [7] Suzuki K, Ogura M, Abe Y, et al. Phase 1 study in Japan of siltuximab, an anti-IL-6 monoclonal antibody, in relapsed/refractory multiple myeloma. *Int J Hematol*, 2015, 101(3): 286-294.
- [8] Satheeshkumar PK. Expression of single chain variable fragment (scFv) molecules in plants: a comprehensive update. *Mol Biotechnol*, 2020, 62(3): 151-167.
- [9] Robić G. Challenges in electrochemical pre-purification of recombinant proteins from green plant tissues. *Bioengineered*, 2013, 4(2): 95-96.
- [10] Fox JL. First plant-made biologic approved. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(6): 472.
- [11] Altpeter F, Baisakh N, Beachy R, et al. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Mol Breed*, 2005, 15(3): 305-327.
- [12] Ruf S, Karcher D, Bock R. Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation. *PNAS*, 2007, 104(17): 6998-7002.
- [13] 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.
- [14] Chebolu S, Daniell H. Chloroplast-derived vaccine antigens and biopharmaceuticals: expression, folding, assembly and functionality. *Curr Top Microbiol*

- Immunol, 2009, 332: 33-54.
- [15] Cardi T, Lenzi P, Maliga P. Chloroplasts as expression platforms for plant-produced vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 2010, 9(8): 893-911.
- [16] Hoelscher M, Tiller N, Teh AY, et al. High-level expression of the HIV entry inhibitor griffithsin from the plastid genome and retention of biological activity in dried tobacco leaves. *Plant Mol Biol*, 2018, 97(4/5): 357-370.
- [17] Daniell H, Chan HT, Pasoreck EK. Vaccination via chloroplast genetics: affordable protein drugs for the prevention and treatment of inherited or infectious human diseases. *Annu Rev Genet*, 2016, 50: 595-618.
- [18] Ehsani P, Meunier A, Nato F, et al. Expression of anti human IL-4 and IL-6 scFvs in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol*, 2003, 52(1): 17-29.
- [19] Wu Y, You L, Li S, et al. *In vivo* assembly in *Escherichia coli* of transformation vectors for plastid genome engineering. *Front Plant Sci*, 2017, 21(8): 1454.
- [20] Kwon KC, Chan HT, León IR, et al. Codon optimization to enhance expression yields insights into chloroplast translation. *Plant Physiol*, 2016, 172(1): 62-77.
- [21] Svab Z, Maliga P. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *PNAS*, 1993, 90(3): 913-917.
- [22] Caroca R, Howell KA, Hasse C, et al. Design of chimeric expression elements that confer high-level gene activity in chromoplasts. *Plant J*, 2013, 73(3): 368-379.
- [23] Wurbs D, Ruf S, Bock R. Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome. *Plant J*, 2007, 49(2): 276-288.
- [24] Cahoon EB, Shanklin J, Ohlrogge JB. Expression of a coriander desaturase results in petroselinic acid production in transgenic tobacco. *PNAS*, 1992, 89(23): 11184-11188.
- [25] Fuentes I, Karcher D, Bock R. Experimental reconstruction of the functional transfer of intron-containing plastid genes to the nucleus. *Curr Biol*, 2012, 22(9): 763-771.
- [26] Lu Y, Rijzaani H, Karcher D, et al. Efficient metabolic pathway engineering in transgenic tobacco and tomato plastids with synthetic multigene operons. *PNAS*, 2013, 110(8): E623-632.
- [27] Zhou F, Badillo-Corona JA, Karcher D, et al. High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. *Plant Biotechnol J*, 2008, 6(9): 897-913.
- [28] Yusibov V, Kushnir N, Streatfield SJ. Antibody production in plants and green algae. *Annu Rev Plant Biol*, 2016, 67: 669-701.
- [29] 董文博, 陈洪栋, 郝建国, 等. 用于药用蛋白生产的外源表达系统. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(4): 10.
- [29] Dong WB, Chen HD, Hao JG, et al. Heterologous expression systems for the production of recombinant therapeutic protein. *Genom Appl Biol*, 2009, 28(4): 793-802 (in Chinese).
- [30] Rup B, Alon S, Amit-Cohen BC, et al. Immunogenicity of glycans on biotherapeutic drugs produced in plant expression systems-the taliglucerase alfa story. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186211.
- [31] Lonoce C, Marusic C, Morrocchi E, et al. Enhancing the secretion of a glyco-engineered anti-CD20 scFv-Fc antibody in hairy root cultures. *Biotechnol J*, 2019, 14(3): e1800081.
- [32] Ma JK, Drossard J, Lewis D, et al. Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(8): 1106-1120.
- [33] Sack M, Rademacher T, Spiegel H, et al. From gene to harvest: insights into upstream process development for the GMP production of a monoclonal antibody in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(8): 1094-1105.
- [34] Kaldis A, Ahmad A, Reid A, et al. High-level production of human interleukin-10 fusions in tobacco cell suspension cultures. *Plant Biotechnol J*, 2013, 11(5): 535-545.
- [35] Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, et al. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(11): 1167-1171.
- [36] Ralph Bock. *Cell and Molecular Biology of Plastids: Structure, Function, and Inheritance of Plastid Genomes*. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2007: 29-63.
- [37] Zoschke R, Bock R. Chloroplast translation: structural and functional organization, operational control, and regulation. *Plant Cell*, 2018, 30(4): 745-770.
- [38] Cilia LC, Lelivelt MS, McCabe CA, et al. Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Mol Biol*, 2005, 58: 763-774.
- [39] Kwon KC, Sherman A, Chang WJ, et al. Expression

-
- and assembly of largest foreign protein in chloroplasts: oral delivery of human FVIII made in lettuce chloroplasts robustly suppresses inhibitor formation in haemophilia A mice. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16(6): 1148-1160.
- [40] Ruf S, Hermann M, Berger IJ, et al. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(9): 870-875.
- [41] Nugent GD, Ten Have M, Van Der Gulik A, et al. Plastid transformants of tomato selected using mutations affecting ribosome structure. *Plant Cell Rep*, 2005, 24(6): 341-349.
- [42] Valkov VT, Gargano D, Manna C, et al. High efficiency plastid transformation in potato and regulation of transgene expression in leaves and tubers by alternative 5' and 3' regulatory sequences. *Transgenic Res*, 2011, 20(1): 137-151.
- [43] Scotti N, Valkov VT, Cardi T. Improvement of plastid transformation efficiency in potato by using vectors with homologous flanking sequences. *GM Crops*, 2011, 2(2): 89-91.
- [44] Dufourmantel N, Tissot G, Goutorbe F, et al. Generation and analysis of soybean plastid transformants expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protoxin. *Plant Mol Biol*, 2005, 58(5): 659-668.

(本文责编 郝丽芳)