

大豆种子蛋白表达系统的开发与研究前景

张 玲,张原宇,李启云,于志晶,徐文静,李海云,董英山

(吉林省农业科学院 农业生物技术研究所,吉林 长春 130033)

摘要:大豆种子中蛋白质含量高,是进行蛋白质鉴定的理想植物材料。利用转基因大豆来生产重组蛋白质具有生产成本低,纯化过程简单、技术含量低,规模化容易,蛋白质含量高、产品质量高,安全无污染的优点,并且大豆可以在温室条件下,各方面均优于细菌、酵母、动物细胞、转基因动物等生产体系。本文就通过转基因大豆种子表达系统生产外源蛋白的优点及在国内外的研究进展做一综述。

关键词:大豆;种子表达系统;重组蛋白

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2014.04.0616

The Research and Development Prospects of Soybean Seed Protein Expression System

ZHANG Ling, ZHANG Yuan-yu, LI Qi-yun, YU Zhi-jing, XU Wen-jiang, LI Hai-yun, Dong Ying-shan

(Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: Soybean seed is an excellent protein producer, and also is the best material for protein identification and research. Expressing recombinant proteins by transgenic in soybean seeds possess many advantages, for example low cost of glycosylated protein production, low-tech sustainability of purification lines, highest protein/biomass ratio, high product quality, reduced risk of contamination, minimal waste produced, as well as being a green technology. All aspects are better than bacteria, yeast, and animal protein expression technology. The merits of heterologous protein produced by transgenic soybean seed protein expression system and the progress in domestic and abroad were reviewed.

Key words: Soybean; Seed expression system; Recombinant protein

利用转基因大豆种子表达异源重组蛋白是一种新型的、可持续发展的技术平台。通过这个平台可以打破生物制药行业中重组蛋白生产力不足的限制。利用转基因大豆种子作为异源蛋白表达系统的优点包括:可以低成本的生产糖基化蛋白,大豆在温室环境中就可以大量种植并生长发育,在单位生物量比率中大豆种子含有最高含量的蛋白质,利用大豆种子产生的蛋白质不需要经过特殊处理纯化就可以适用于市场销售。此外,适销对路的大豆配方不需要经过特殊纯化处理、安全可靠、并可以准确计量,且纯化蛋白成本低、技术含量低、生产线具有可持续性发展、污染少、废弃物排出少,绿色环保等特点。到目前为止,没有其他生物可以与之媲美^[1]。本文就通过转基因大豆种子表达系统生产外源蛋白的优点及在国内外的研究进展进行综述。

1 利用转基因大豆种子表达系统生产外源蛋白的优点

1.1 大豆种子蛋白质含量较高

大豆籽实的主要成分有蛋白质、油脂、碳水化

合物(糖)、无机盐、维生素等,富含人类生活所必需的多种营养。在大豆籽实的干物质中,蛋白质含量约占40%~45%,脂肪约占20%~22%,碳水化合物约占28%~35%,灰分约占5%^[2]。大豆是植物种子中蛋白质含量最丰富的作物,与其他主要农作物相比,单位面积上种植大豆获得的蛋白质产量可以是其他农作物的两倍多。而与需要饲养和放牧获得的动物源蛋白相比,在同样单位面积上通过大豆产生的蛋白质的效率更高。因此在大豆种子中表达重组蛋白的生物得率最高。

1.2 低成本的生产蛋白和高效率的转化蛋白潜力

重组蛋白疗效确切、作用显著,对某些疾病具有不可替代的治疗作用。而重组蛋白生产能力不足已经成为该产业发展主要的限制瓶颈。目前纯化和表达某些重组蛋白的费用限制了其实际应用。在西方,生产应用于诊断和治疗的重组蛋白的费用非常昂贵,而对于一些发展中国家,这种障碍更加明显。除非能够在生产成本上有效解决这一问题,否则将永远限制重组蛋白的广泛推广和应用。

使重组蛋白成为商品化产品在很大程度上依

收稿日期:2013-11-25

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2013ZX08004)。

第一作者简介:张玲(1981-),女,博士,助理研究员,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:zly_jaas@126.com。

通讯作者:董英山(1964-),男,博士生导师,研究员,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:ysdong@cjaas.com。

李海云(1979-),女,硕士,副研究员,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:hyli512@126.com。

赖于一个经济的、可持续发展的生产重组蛋白的技术平台。而未来通过转基因技术在大豆种子中表达异源蛋白则是最有效的、低成本的生产重组蛋白的技术平台。已有的研究已经证明了转基因大豆在这方面的潜在的、不可估计的经济优势,已经研发出在常规大豆品系中能够稳定表达 1%~4% 的总含量的可溶性大豆蛋白质的外源转基因大豆蛋白^[9-11]。如果按照外源蛋白可以在转基因大豆种子中有 4% 表达量的水平估算,大约 150 mg 单粒重量的大豆种子(含有 40% 蛋白质估算),就可以获得约 2.4 mg 的外源重组蛋白。而获得 1 kg 的大豆粉大约需要 800 g 左右的大豆种子材料,按照上述估算,1 kg 的大豆粉中就可以获得 12.8 g 的未经过纯化的外源重组蛋白。目前市场上,重组蛋白的零售价格从几百美元到几千美元每毫克不等。如此计算,以 4% 转基因外源蛋白表达量估算,1 kg 或 800 mg 的大豆粉末其经济价值不可估量。

随着分子生物学技术的不断完善和发展,提高大豆种子中外源蛋白表达含量方法和技术也在不断的发展和进步^[12]。相信不久的将来,大豆种子表达系统将以低成本的巨大优势成为今后重组蛋白药物发展的主流方向。

1.3 大豆种植生产成本低,利用大规模温室生产

通常情况下,微生物培养需要昂贵的生产培养基,动物系统生产力低、养殖困难、繁殖缓慢、同时需要无菌的生产条件。而植物大豆表达系统的生产成本较低,易于大规模生产。且大豆能够进行光合作用,仅需要来自土壤的矿物质和水分便可在适宜的条件下获得大量转基因产物。另外,大豆属于自花授粉植物,在温室环境中每年可以进行三季播种大豆,并且通过调控温湿度等环境因素便可对大豆整个生育期进行全程监控。因此,在安全的温室环境下种植转基因大豆,很多影响因素都可以在大豆的生长发育过程中得到有效的控制。而对于生产用于诊断和治疗的重组蛋白来说更可以进一步建立和实施安全、良好的生产质量管理规范认证机构。例如在温室条件下,健全的标准的操作程序可以在伴随大豆产量实现增长的同时也对大豆病虫害和病原菌进行全程监测,以及对大豆的收获及质量进行控制。

2001 年,Traynor 等^[13]比较了大豆在田间和温室种植的收益率:当前在开放环境中种植和收获大豆的成本从 4 500 到 9 000 美元·hm⁻²不等,这种差别取决于年际间大豆的种植条件以及地理区域等。而同样在温室条件下二级生物安全(BSL-2)标准的条件下,大豆的生产成本将增加大约 20 倍左右。尽管生产成本增加了,但是环境温室种植所带来的收益仍然能够将生产转基因大豆的种植和收获的总开支维持在 6 000~12 000 美元·hm⁻²范围内。简而言之,对于生产用于医疗和诊断的重组蛋白的来

说,温室环境下种植转基因大豆比起开放环境来说有更多的优势。

1.4 利用转基因大豆产生的蛋白无需纯化

通过细菌、酵母、昆虫、哺乳动物或植物栽培等技术获得的蛋白质,都需要经过纯化除去含有的病原微生物等污染才能进一步应用,而由大豆衍生的蛋白则不需要纯化。大豆制品(如豆粉、黄豆粉、豆浆等)在日常生活中给人们的饮食健康和农业畜牧业带了许多健康益处。由转基因大豆制成的制剂则可以具备更多的优势,例如:不含致病微生物或潜在的致病微生物,对人蓄安全,外源基因的表达产物不需提取便可直接用于预防和治疗某些疾病且可直接口服免疫,易于生产、运输、推广和普及等。同时大豆配方奶中有固有的缓冲能力可以对治疗性蛋白质通过肠道时起到保护作用,防止口服治疗后的治疗性蛋白质的降解等。

1.5 储藏运输方便

大豆种子是理想的“天然容器”,重组蛋白质储藏在胚乳细胞的蛋白体内,处于胶体状态,极为稳定,在常温下储藏 2~3 年,即使胚损坏丧失了发芽能力,子叶中的蛋白质也不会丧失生物活性,不需特殊贮存条件便可以长期贮运。因此原料储藏、运输不受时空限制。而用动物或微生物表达系统生成重组蛋白则需要特殊的专业知识以及特殊的储藏条件(冷藏)。

2 转基因技术在大豆中的运用情况

大豆种子中蛋白质含量高,是进行蛋白质鉴定的理想植物材料。国外转基因大豆的产业化引领了世界转基因作物的快速发展。利用转基因大豆生产糖基化蛋白最成功的例子是美国 Monsanto 公司利用基因枪轰击方法将编码 5-烯醇-丙酮酸莽草酸-磷酸合成酶(*EPSPS*)基因转入大豆^[3],并培育出 Roundup Ready 转基因大豆并大面积产业化。目前在美国大约 90% 以上种植的大豆都是 Roundup Ready。抗草甘膦转基因大豆品种在生产上的应用促进了耕作制度的变革,带动了大豆产量的显著提高。除了这种附加性状的转基因大豆,最近应用转基因技术在大豆本身品质和抗性改良上的研究也取得了重要进展,如转基因抗虫大豆:在大豆中转入 *cry1A* 基因可以使大豆抵抗鳞翅类害虫^[4];磷高效利用的转基因大豆:在大豆中外源表达磷酸酶(*APase*)基因可以提高大豆对土壤中有效磷的利用^[5]。提高改良大豆种子油含量和成分:转 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶基因(*FAD2-1*)基因大豆,使油酸含量达 70% 的转基因大豆,并于 1997 年获准推广^[6];近年来,通过抑制大豆 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶(*FAD2*)基因和 ACP-棕榈酸硫激酶(*FatB*)基因的表达,减少种子中 $\Delta 12$ 脂肪酸脱氢酶的含量,同时控制棕榈酸产量,从而实现富集油酸,获得了油酸含量高达 85%

的大豆新品系,并也已开始大规模种植等。通过转入溶血磷脂酸酰基转移酶基因(*LPAT*)改良大豆种子油脂的品质和提高种子含油量^[7]。在大豆种子中过表达天门冬氨酸激酶可以增加种子中苏氨酸的含量^[8]。有关转基因大豆成功的案例还很多,这些不仅仅说明转基因大豆可以为人们提供很多附加价值,更能说明通过转基因技术使大豆种子作为外源蛋白表达系统的可行性。

近年来,国外利用大豆种子表达系统生产外源重组蛋白的相关研究报道屡见不鲜,凝血 IX 因子缺乏会引起一种出血性疾病——血友病 B,该病通过输血和 *hFIX* 浓缩剂进行治疗疗效显著,但存在治疗费用高和安全隐患等相关问题,2010 年^[14-15]巴西利亚大学 Nicolau Cunha 等科学家通过基因枪方法把带有凝血 IX 因子(*hFIX*)基因的质粒转入大豆胚轴,使 *hFIX* 蛋白在液泡中表达,其含量可高达转基因大豆种子总可溶蛋白的 23%,并且大豆蛋白的提取物表现血凝活性,达到正常血浆的 1.4%。这种通过转基因技术在大豆种子表达系统获得的安全、廉价的人凝血 IX 因子对血友病 B 的治疗具有重要的意义。此外,还有成功在大豆种子中表达重组人胰岛素(human insulin)、人体生长激素(*hGH*)^[16-18]等相关研究的报道。

3 展 望

总之,利用转基因大豆生产具有医疗和诊断价值的抗体、疫苗及一些重要药用蛋白,具有不可替代的优势和良好的应用前景。改传统生物发酵为现代农业种植,蛋白质的合成与累积是由植物细胞通过光合作用合成,可以节省传统医药工业需要的大量能源和原材料,符合现代工业低碳环保的理念。此外,近年来大豆基因组测序的完成^[19-20]、大豆组织特异启动子的挖掘、高蛋白表达的种子工程以及其他先进的分子生物学技术都在为大豆种子中提高转基因外源蛋白的高表达水平这个技术平台提供了有利可靠的保证。转基因大豆种子表达体系将以低成本的巨大优势成为今后重组蛋白药物发展的主流方向,大片的“分子药田”将会成为现实。

参考文献

- [1] Vianna G R, Cunha N B, Rech E L, et al. Soybeans as bioreactors for biopharmaceuticals and industrial proteins [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2011, 10(3): 1733-1752.
- [2] Liu K. Soybeans: Chemistry, technology, and utilization [M]. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, Inc, 1999.
- [3] Padgett S R, Kolacz K H, Tinus C N, et al. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line [J]. *Crop Science*, 1995, 35(5): 1451-1461.
- [4] McPherson R M, MacRae T C. Evaluation of transgenic soybean exhibiting high expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A transgene for suppressing lepidopteran population densities and crop injury [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2009, 102(4): 1640-1648.
- [5] Wang X, Wang Y, Liao H, et al. Overexpressing AtPAP15 enhances phosphorus efficiency in soybean [J]. *Plant Physiology*, 2009, 151(1): 233-240.
- [6] Pham A T, Lee J D, Bilyeu K D, et al. A novel FAD2-1 allele in a soybean plant introduction offers an alternate means to produce soybean seed oil with 85% oleic acid content [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 123(5): 793-802.
- [7] Clemente T E, Cahoon E B. Soybean oil: genetic approaches for modification of functionality and total content [J]. *Plant Physiology*, 2009, 151(3): 1030-1040.
- [8] Rao S S, Hildebrand D. Changes in oil content of transgenic soybeans expressing the yeast *SLC1* gene [J]. *Lipids*, 2009, 44(10): 945-951.
- [9] Qi Q, Huang J, Rapp W D, et al. Metabolically engineered soybean seed with enhanced threonine levels: biochemical characterization and seed-specific expression of lysine-insensitive variants of aspartate kinases from the enteric bacterium *Xenorhabdus bovienii* [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(2): 193-204.
- [10] Oakes J L, Bost K L, Piller K J, et al. Stability of a soybean seed-derived vaccine antigen following long-term storage, processing and transport in the absence of a cold chain [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, 89(13): 2191-2199.
- [11] Piller K J, Clemente T E, Pascual D W, et al. Expression and immunogenicity of an *Escherichia coli* K99 fimbriae subunit antigen in soybean [J]. *Planta*, 2005, 222(1): 6-18.
- [12] Garg R, Tolbert M, Piller K J, et al. Chloroplast targeting of FanC, the major antigenic subunit of *Escherichia coli* K99 fimbriae, in transgenic soybean [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(7): 1011-1023.
- [13] Traynor P L, Adair D, Irwin R. A practical guide to containment: Greenhouse research with transgenic plants and microbes [M]. Blacksburg, VA: Information Systems for Biotechnology, 2001.
- [14] Cunha N B, Araujo A C, Rech E L, et al. Correct targeting of proinsulin in protein storage vacuoles of transgenic soybean seeds [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2010, 9(2): 1163-1170.
- [15] Cunha N B, Murad A M, Rech E L, et al. Accumulation of functional recombinant human coagulation factor IX in transgenic soybean seeds [J]. *Transgenic Research*, 2011, 20(4): 841-855.
- [16] Cunha N B, Murad A M, Rech E L, et al. Expression of functional recombinant human growth hormone in transgenic soybean seeds [J]. *Transgenic Research*, 2011, 20(4): 811-826.
- [17] Schmidt M A, Herman E M. Proteome rebalancing in soybean seeds can be exploited to enhance foreign protein accumulation [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, 6(8): 832-842.
- [18] Kinney A J, Jung R, Herman E M, et al. Cosuppression of the alpha subunits of beta-conglycinin in transgenic soybean seeds induces the formation of endoplasmic reticulum-derived protein bodies [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(5): 1165-1178.
- [19] Schmutz J, Cannon S B, Nelson W, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. *Nature*, 2010, 463(7278): 178-183.
- [20] Hyten D L, Cannon S B, Shoemaker R C, et al. High-throughput SNP discovery through deep resequencing of a reduced representation library to anchor and orient scaffolds in the soybean whole genome sequence [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 38.