

综 述

植物生物反应器的研究进展

杨晶, 李天航, 熊丽东, 庞实峰, 李校堃

吉林农业大学 教育部生物反应器与药物开发工程研究中心, 长春 130118

摘 要: 利用植物生物反应器生产外源蛋白是一个有吸引力的廉价生产系统, 以下介绍了植物生物反应器的不同表达系统, 及其各个系统的发展进程和研究现状等。重点论述了应用植物各大表达系统生产疫苗、抗体和医用蛋白等方面的情况以及本实验室在这一领域的研究情况。随着该领域研究的进展, 植物生物反应器用于生产低成本药用蛋白的产业化将显示出越来越良好的发展前景。

关键词: 核表达, 油体, 叶绿体, 外源蛋白

Plant as bioreactor

Jing Yang, Tianhang Li, Lidong Xiong, Shifeng Pang, and Xiaokun Li

Ministry of Education Bioreactor and Drug Development Research Center, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Plant can be used as bioreactor for heterogenous protein expression. We reviewed different expression systems of plant bioreactor as well as recent relevant developments. In addition, we discussed perspectives in combination with our own experience.

Keywords: nucleus expression, oil body, chloroplast, foreign protein

随着基因工程、细胞工程、酶工程的发展, 生物技术不断影响着人类生活的方方面面, 不仅体现出巨大的经济价值, 也提供了不可替代的社会服务。其中, 利用植物生物反应器表达生产具有临床应用价值的药用蛋白(包括疫苗、抗体)已成为生物制药产业的热点领域, 在抢占生物经济制高点、促进国民经济持续稳定发展进程中显示了越来越重要的作用, 具有极大的市场前景和商业价值, 日益引起人们的关注。

生物技术特别是在基因工程研究领域内的快速进展使人类进一步拓宽了植物的应用范围。国外发达国家特别是美国采用植物生物反应器这种“分子

农业”的方法, 已经成功地生产出多种高新生物技术产品, 包括特殊的饱和或不饱和脂肪酸、改性淀粉、环糊精或糖醇、次生代谢产物、工农业用酶以及一些高经济附加值的药用蛋白多肽, 一些研究机构和公司已经开始从这些产品生产中获得巨大的经济效益^[1]。

基于生物反应器领域的快速发展, 本实验室(教育部生物反应器与药物开发研究中心)在国家高技术研究发展计划的支持下, 开展了植物生物反应器的研究工作。目前本实验室主要通过真核(植物细胞核)表达系统以及油体表达系统来生产 FGFs 等各种生长因子类药物, 工作已经取得一定进展。今后将

Received: December 18, 2008; **Accepted:** March 12, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA100503).

Corresponding author: Xiaokun Li. Tel: +86-431-84533348; E-mail: xiaokunli@163.net

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2007AA100503)资助。

应用叶绿体表达系统来生产 FGFs。因此, 结合本实验室的相关工作对植物生物反应器应用比较广泛的三大表达系统的研究现状进行了阐述。

1 植物生物反应器简介

生物反应器是指利用生物系统大规模生产有重要商业价值的外源蛋白, 用于医疗保健和科学研究^[2]。1982年首次成功地利用细菌生产重组胰岛素, 这一突破消除了大规模应用胰岛素的限制因素, 但依赖微生物发酵和哺乳动物培养生产商业蛋白体系成本高、规模化生产困难, 安全性较差^[3]。随着 DNA 重组技术和植物组织培养技术的快速发展, 世界第一例转基因植物在 1983 年成功诞生于美国的华盛顿大学。1989 年哺乳动物抗体在转基因植物中首次成功表达, 证实了植物作为生物反应器的可行性。此后, 植物生物反应器研究逐渐兴起。植物作为生物反应器的优势有: 1) 植物生产外源蛋白成本低, 只需阳光、土壤、水分和肥料, 而微生物发酵和动物细胞培养则需要昂贵的培养基, 并且工业化大规模生产时需要严格控制培养条件, 增加生产成本。2) 植物细胞能够再生成植物, 易于成活、生长周期短、易于快速筛选转基因阳性植物、比构建动物生物反应器省时、成功率更高。3) 转基因植物通过自交得到的后代遗传性状稳定, 从而可以在植物体内积累多基因^[4]。4) 植物可大规模种植, 产物贮藏在种子、果实、块茎中, 易于保存、运输, 其中那些能直接食用的植物疫苗不需特殊贮存条件^[5-7]。如室温条件下贮存 5 个月的水稻种子中一种单链抗体的含量和活性无明显损失, 4°C 条件下贮存 18 个月的马铃薯仍有 50% 的活性抗体。5) 植物生物反应器能正确地表达、组装复杂的蛋白质, 生产的蛋白活性高, 很多复杂的蛋白质在微生物系统中不能正确地翻译、折叠、聚合, 最终被降解或形成没有活性的包涵体, 而植物具有生产任何复杂蛋白的潜能性。6) 植物生物反应器生产外源蛋白更安全, 植物体只表达部分免疫蛋白, 不含致病微生物, 没有其他病原菌污染^[8]。植物生物反应器虽然具有诸多优点, 但同时也存在很多限制性因素, 主要包括表达量低, 在植物中表达需要纯化的抗体以及药用蛋白时, 只有当其超过总可溶性蛋白的 1% 时才具有商业开发价值^[9]; 下游加工困难和糖基化蛋白中糖链结构的

改变, 这些问题在研究的过程中不断被解决。基于植物生物反应器的以上优势, 本实验室选用了红花、油菜、苜蓿、番茄、黄瓜和大豆等植物来生产 FGFs 等生长因子类药物, 现阶段已经取得了一定的进展。随着一系列新功能基因的分离、克隆, 以及各种植物高效表达技术平台的逐步建立, 利用整株植物生产药物将成为一种全新的生产模式, 基因药物生产逐步移向农场, 即所谓的“分子农业”。目前口服疫苗、抗体、蛋白质及多肽等药物的生产已构成分子农业的主体。

2 利用真核表达系统生产外源蛋白的研究现状

2.1 利用真核表达系统生产抗体

过去 15 年里, 自从在烟草中成功地表达了免疫球蛋白的重链和轻链, 并且两者组装为有生物学功能的抗体后, 植物便已成为生产各种类型抗体的表达系统。Vaquero 等^[10]报道在烟草叶片中瞬时表达了对胚胎癌抗原特异的单链和嵌合全长抗体。

生产植物来源抗体的瓶颈在于抗体的分离纯化, 若能以口服的方式利用植物组织和种子中表达的治疗性抗体, 将加强植物来源抗体的市场竞争力。目前已有几种植物源的抗体具备潜在的商业应用价值。例如, 1995 年, Ma 等^[11]用植物转基因技术, 在烟草中实现了重组 SIgA 的首次表达。用 PMON 530 表达盒 (Cassette)、天然先导序列 (Native leader sequences) 和 Cauliflower mosaic 病毒 (能在大多数植物的各种细胞中直接转基因表达) 的一段启动子序列, 分别与编码小鼠单克隆抗体的 kappa 链、IgA 与 IgG 的杂交重链、小鼠源性的连接链和兔源性的分泌元件的基因序列组成相应的 4 种表达载体, 用以诱导烟草遗传转化, 分别获得转基因烟草。再进一步进行有性杂交和子代重组, 最终获得了能同步表达这 4 条肽链, 且能组装成可有效识别 *Streptococcus mutans* 表面抗原 I/II 粘附因子的抗 *S. mutans* SIgA。在烟草中表达的抗链球菌表面抗原的分泌型 IgG-IgA 抗体 (预防龋齿), 临床试验证明^[12], 该抗体预防链球菌腐蚀牙齿的效果与鼠淋巴瘤产生的单抗 IgG 类似。治疗单纯疱疹病毒的抗体, 大豆表达的抗体 Anti2HSV22 能够有效地防止单纯疱疹病毒 HSV22 在鼠阴道的存活, 其活性与细胞培养得到的抗体相仿^[13]。Daniell 等^[14]2001 年在小麦和水

稻中成功地表达了抗癌胚抗原的抗体。Zhang 等^[15]利用农杆菌介导法将人免疫缺陷 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 mg/g。Schfinmann 等^[16]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。随后, 又有研究者利用烟草转基因技术, 成功生产抗乙型肝炎表面抗原单链抗体 ScFv 片段、抗淋巴瘤肉瘤抗体和免疫佐剂^[17-19]。EPIcyte 制药公司和 ProdiGene 公司已投资研制用转基因玉米生产抗疱疹和能杀伤精子的单克隆抗体生产抗单纯疱疹病毒 2 和局部避孕药^[20]。目前, 利用植物核表达系统生产抗体的技术已经逐步趋于成熟, 这将大大降低了生产成本。

2.2 利用真核表达系统生产疫苗

利用转基因植物生产疫苗主要是口服疫苗, 人体只需简单的摄食, 就可获得免疫, 植物细胞壁作为天然的生物胶囊可使疫苗不会被胃内的酶破坏, 通过机体肠道黏膜分泌, 激发特异性免疫应答, 使人体获得持久的抗病能力, 这不但可以改变传统的疫苗生产方式和接种手段, 而且会大幅度降低疫苗的生产成本, 具有潜在的巨大社会意义和经济效益。目前已经有多种疫苗在转基因植物中表达成功, 且在动物和人实验中获得了满意的结果^[21]。Curtiss 等报道, 在烟草中表达了链球菌表面蛋白抗原 (SpaA), 用转基因烟草组织饲喂小鼠, 小鼠对 SpaA 蛋白产生粘膜免疫, 这是最早的在植物中表达疫苗性抗原的报道^[22]。之后, 陆续在烟草、生菜、番茄、马铃薯等植物中表达了多种抗原蛋白, 且表达产物被证明具有生物学活性。美国于 1997 年进行了首次植物来源的可食用疫苗的人体临床试验^[23]。国内外有报道用马铃薯和烟草表达霍乱抗原^[24,25]。而 21 世纪初正在进行的研究包括植物源性的糖尿病疫苗、艾滋病疫苗及肿瘤疫苗等。其中最引人注目的是艾滋病病毒 gp120 和 Tat 的疫苗在菠菜中的成功表达^[26]。

2.3 利用真核表达系统生产药用蛋白

利用植物的真核表达系统生产药用蛋白也已经有很多成功的例子, 通过转基因烟草生产葡糖脑苷脂酶的技术已被 Cramer 和其同事注册了专利^[27],

他们的研究证实了未来利用转基因植物生产葡糖脑苷脂酶的商业价值。Sijmonstm 等^[28]用马铃薯生产人血清白蛋白, 叶中可溶性蛋白质可达 0.02%。Tuboly T 等利用烟草花叶病毒载体将猪可传染性肠胃炎病毒 S 蛋白 (Pig transmissible gastroenteritis) 转入紫花苜蓿 (Alfalfa) 中, 表达水平占可溶性蛋白的 0.2%, 注射接种产生免疫反应^[29]。本实验室根据密码子的植物偏好性克隆了 FGFs 基因全长, 并将植物偏好的 FGFs 基因转入苜蓿, 在强启动子的控制下, 进行整株表达, 具有一定的表达水平, 并进行了鸡胚试验, 结果发现在苜蓿中表达的蛋白具有促进血管生成的作用 (专利正在审核, 具体内容保密)。

3 利用植物油体表达系统生产外源蛋白的研究进展

3.1 油体表达系统简介

目标蛋白与植物内源蛋白难于分离和纯化费用高是限制植物表达体系应用的一个主要因素。植物油体表达体系的出现正是迎合了这一需要。油体表达体系明显简化了目标蛋白的分离程序, 降低了纯化成本, 为植物生物反应器的应用提供了新的思路, 拓宽了它的发展和前景^[30]。油体表达系统作为细胞器系统, 解决了细胞核表达系统中存在的一些问题。油体表达系统具有以下优点: 1) 油体融合蛋白易于分离。由于外源蛋白在植物油体中特异表达, 利用油体亲脂疏水的特性 (图 1、图 2), 将转基因植物种子经“粉碎-液体抽提-离心”处理, 回收上层油相, 即可将融合蛋白与细胞内其他组分分开^[31] (图 3)。2) 种子在成熟过程中水分含量会降低 95% 以上^[32], 因此水解酶活性大大降低, 融合蛋白可在种子中长期稳定贮存而不会被降解。oleosin 基因的转录在开花后 4~6 周, 在成熟种子中 mRNA 量急剧降低, 但由于成熟种子中水解酶活性降低, 因此 oleosin 蛋白可在成熟种子中长期稳定存在, 干种子在 4°C 经过一年以上的贮存, 目标蛋白也不会降解。因此转基因植物种子收获后, 可以经较长时间保存而不必担心目标蛋白降解, 这在生产上具有重要意义。3) 油素蛋白一般约占种子总蛋白的 2%~10%。融合蛋白也能高水平表达。4) 种子易于运输, 有利于工业化生产。

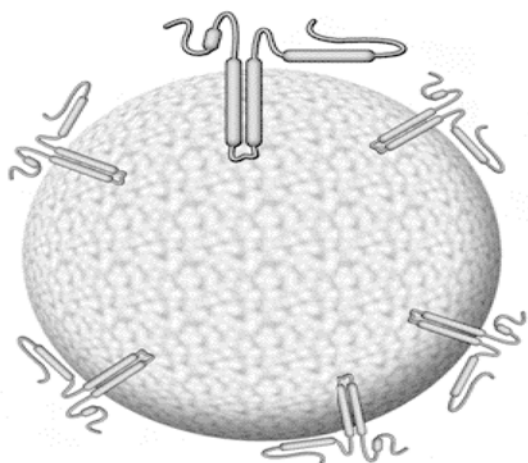


图 1 野生型油体蛋白
Fig. 1 Wild type oilbody.

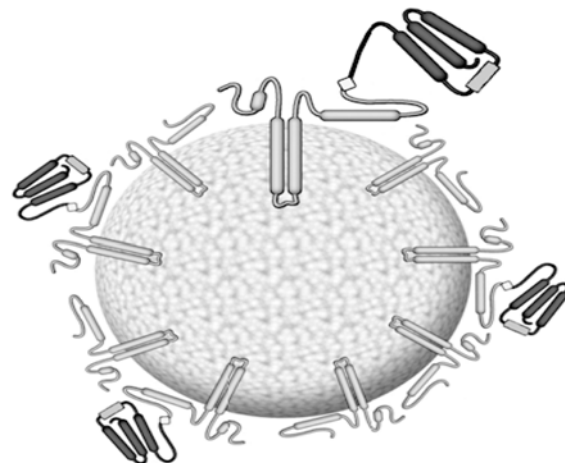


图 2 重组油体蛋白
Fig. 2 Recombinant oilbody.

3.2 重组油体蛋白用于抗体纯化

蛋白 A 是存在于金黄色葡萄球菌表面的一种受体, 对抗体 IgG 有非常高的亲和力 and 选择性, 因此常被用于提纯 IgG、免疫印迹和免疫沉淀等程序。构建 oleosin 蛋白 A 融合表达载体, 转化油料植物, 在转基因油体表面, 蛋白 A 分子端被固定在 oleosin 上, 另外一端呈游离状态, 可以结合人 IgG1 和 IgG2, 但不结合 IgG3, 结合模式与天然蛋白 A 相似。一旦抗体蛋白结合到融合蛋白 A 上, 油体-抗体复合体就可以通过简单的抽提过程与大部分细胞和组织成分分开。融合蛋白 A 在 pH 5~8 时捕获人 IgG1, 在 pH 4 以下又重新释放出来, 是一种更廉价、高效的抗体蛋白纯化方法^[33]。

3.3 利用油体表达系统生产药用蛋白

降钙素是一种重要的治疗骨质疏松、变形性骨炎、骨痛等的小分子多肽药物。贾士荣等^[34]分离和克隆了油菜油体蛋白 oleosin 基因的启动子, 芝麻 oleosin 结构基因, 设计合成了鲑鱼降钙素突

变基因 msCT, 构建了可在油菜种子中高效表达的 oleosin-msCT 融合蛋白基因的植物表达载体。融合蛋白表达量占种子总蛋白的 6.47%, 其生物活性远远超过天然鲑鱼降钙素和人降钙素。水蛭素是预防和治疗血栓病的有效药物。Parmenter 等^[35]将 222 bp 水蛭素基因插入至拟南芥 oleosin 基因的 3'端, 构建以拟南芥 oleosin 启动子驱动的植物表达载体, 用农杆菌介导的叶盘法转化油菜 (*Brassica napus* cv. Westar), 转基因油菜种子经免疫荧光技术检测, 证实 oleosin-水蛭素融合蛋白在油体中表达, 表达产物具有生物学活性, 表达量为种子总蛋白的 1%。转水蛭素基因的油菜在加拿大正在商品化生产。胰岛素治疗是目前唯一能有效治疗 I 型糖尿病的方法, 对 II 型糖尿病也有很好的治疗效果。SemBioSys 遗传公司构建植物表达载体 pSBS4405 转化拟南芥产生的人胰岛素, 与直接来自动物的胰岛素具有生物等效性^[36]。利用红花油体表达系统生产的胰岛素占植物总蛋白的 1.2%, 达到商业生产标准, 生产成本

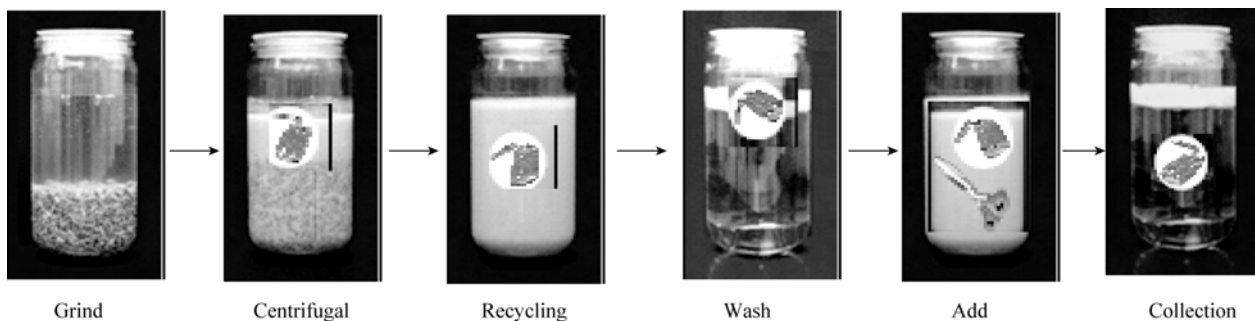


图 3 回收目的蛋白的流程图
Fig. 3 Schematic drawing of recovery target protein.

减少 40%，加工成本减少 70%，目前正在进行 I 期临床研究^[37]。预计到 2010 年红花种植面积可达 16 000 亩，生产的胰岛素可以治疗全球糖尿病患者。本实验室现已经与加拿大 SemBioSys 遗传公司建立合作关系，双方将共同研究红花油体表达系统生产生长因子类药物，目前本实验室已经获得红花转基因植株，并在 DNA 水平上检测到目的蛋白基因已经整合进植物基因组中，利用本实验室在药物开发方面的优势，进一步分离纯化目的蛋白。使植物表达系统成为继大肠杆菌系统后的又一成功突破。

3.4 利用油体表达系统生产工业用酶

gus 基因是常用的报告基因，其形成的融合蛋白常具有 GUS 活性，可以用来构建基因融合系统，也可用于固定化酶技术。Gijs 等^[38]将 *gus* 基因插入拟南芥 *oleosin* 基因的 3' 端，构建以 *oleosin* 启动子驱动的植物表达载体，以农杆菌介导法转化油菜，在转基因植株种子中 80% 的重组蛋白结合在油体上。*Oleosin-Gus* 融合蛋白本身就具有 β -葡萄糖苷酸酶的活性，不必将 GUS 从 *oleosin* 上切下来。且该融合蛋白在转基因油菜种子中 4°C 贮存一年以上，也不降解。Liu 等^[39]也以 *oleosin* 融合蛋白的方式在油菜油体中成功表达了具生物活性的木聚糖酶，但未列出表达量。SemBioSys 遗传公司正在利用油体系统生产凝乳酶、葡萄糖异构酶、胶原酶等工业用酶。

4 利用植物叶绿体表达系统生产外源蛋白的研究进展

4.1 叶绿体基因工程的简介

叶绿体基因工程是以叶绿体基因组为平台对植物进行遗传操作，通过一定方法使外源基因穿过细胞膜和叶绿体双层膜进入叶绿体，在同源重组片段的介导下与叶绿体基因组之间发生同源重组，以定点整合方式进入叶绿体基因组(图 4)，在其中转录、翻译并获得终产物的技术。叶绿体表达系统的优点有：1) 外源基因的高效表达，叶绿体基因组的拷贝数非常大。根据发育时期和组织类型的不同，每个细胞大约具有 10~100 个叶绿体，每个叶绿体具有 10~100 个质体基因组，若将外源基因导入到叶绿体基因组，在植物达到同质化后，外源基因在每个细胞中都具有 100~10 000 个拷贝^[40]，这就为外源基因的高效表达提供了有利条件。2) 基因的原核表达形

式，叶绿体起源于原核生物，基因的编码、排列方式均带有明显的原核特征。因而，原核基因无需改造就可在叶绿体中表达，原核启动子也能在叶绿体中正常行使功能^[41]。3) 无位置效应和基因沉默现象，细胞核转基因技术的外源基因是随机插入，由于插入位点的不同使得基因表达水平各异。基因沉默也是细胞核转基因技术的一个亟待解决的问题。叶绿体转基因技术的外源基因是通过同源重组插入到特定位点，因此叶绿体基因工程几乎不存在位置效应，保证了外源基因的稳定表达。目前，叶绿体基因工程中还没有基因沉默的报道^[42]。4) 环境安全性好，基因工程的安全性一直是公众关注的焦点。核转基因技术中外源基因有可能通过花粉扩散到非目标植物中，造成基因污染。而叶绿体基因工程可以避免这一问题。大多数植物的叶绿体基因组遵循母性遗传机制，导入到叶绿体基因组的外源基因基本不会通过花粉扩散，从而可以保证环境的安全性。5) 基因产物对植物的影响小，传统的细胞核转基因技术，其基因产物积累在细胞质中会带来多种负面影响，如植株生长不良、育性降低等。叶绿体是由双层膜围成的细胞器，内膜具有选择透性，将叶绿体与细胞质隔开，形成相对独立的小环境，叶绿体对物质积累具有较强的承受能力，因此外源基因产物的积累不会对植物产生太大的毒害作用^[43]。虽然叶绿体表达系统有诸多优点，但仍存在一些有待解决的问题，如：1) 作为生物反应器的叶绿体转基因植物范围有待扩大；2) 叶绿体基因的表达调控机制有待弄清；3) 去除选择标记基因的方法有待优化。

4.2 叶绿体作生物反应器生产疫苗抗原

破伤风(Tetanus)病毒蛋白的一段 47 kD 的无毒多肽 C 片段(TetC)，可以用作预防破伤风的疫苗抗原。Tregoning 等^[44]将 *tetC* 基因在烟草叶绿体基因组进行表达，为了增加 mRNA 的稳定性及在烟草叶片内表达的可行性，他们将基因进行了密码子优化，分别表达了未经改造的富含 AT(72.3% AT)和人工合成的富含 GC(52.5% AT)的基因，TetC-AT 和 TetC-GC 的表达量分别为总可溶蛋白的 25% 和 10%。实验证实，TetC 可使老鼠产生抗体。这项工作为利用植物生产安全的破伤风口服疫苗奠定了基础。霍乱毒素(Choleratoxin)是霍乱弧菌的主要致病因子，其中的 B 亚基是保护性抗原。Daniel 等^[19]将霍乱毒素 B 亚

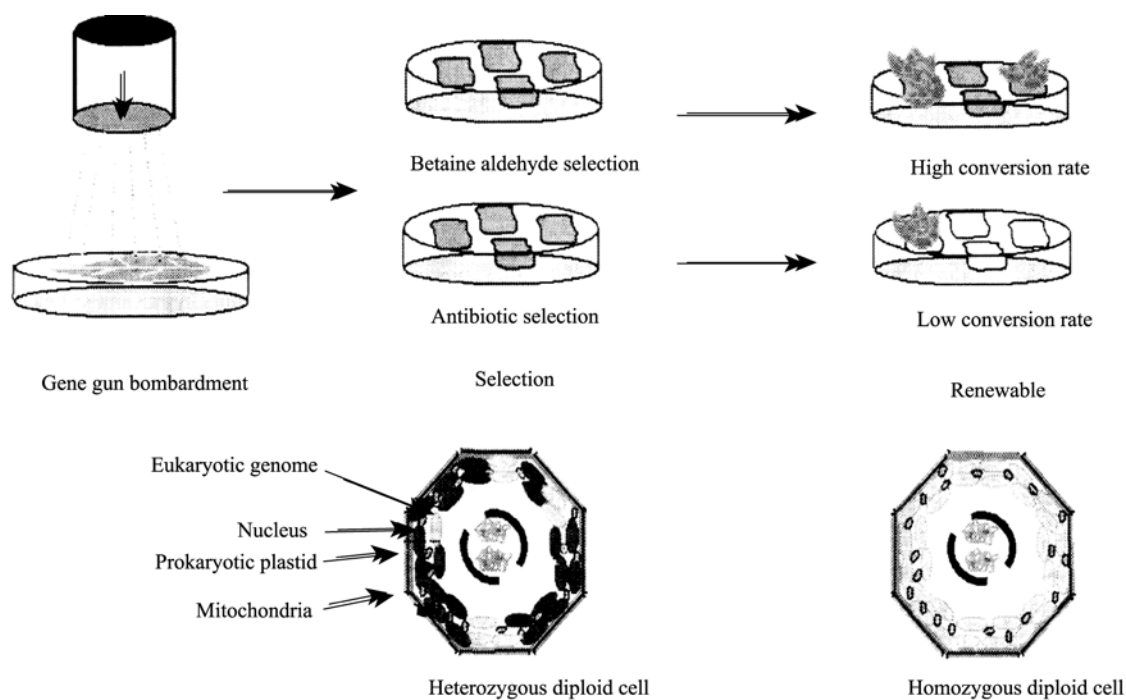


图 4 叶绿体转化示意图

Fig. 4 Schematic drawing of chloroplast transformation.

基(CTB)成功地导入到烟草的叶绿体基因组, 有功能的低聚物达到了总可溶蛋白的 31.1%。CTB 在叶绿体内正确折叠成五聚体, 形成正确的二硫键, 并且可与肠内膜的 GM1 受体相结合。Molina 等^[45]在 2L21 缩氨酸 C 端分别融合霍乱毒素亚基 CTB 或 GFP, 之后在烟草叶绿体中进行表达试验, 发现重组蛋白的表达水平随植物生长发育时期的不同而变化, 盛花期的成熟叶片中的表达水平最高, 幼叶和衰老叶片中的表达量均较低, 合成的 CTB-2L21 重组蛋白最高为可溶性总蛋白的 31.1%, 合成的 GFP-2L21 重组蛋白最高为溶性总蛋白的 22.6%, 且重组蛋白具有正常的生物活性, 首次实现了动物疫苗在转基因植物叶绿体中的合成。鼠疫耶森氏菌(*Yersinia pestis*) 是一种革兰氏阴性菌, 它是引起鼠疫的元凶。有几种亚基疫苗对鼠疫耶森氏菌有免疫原性, 其中 CaF1 和 LcrV 是对抗鼠疫耶森氏菌最有效的 2 种抗原。F1 是一种定位在细菌表面的荚蛋白, V 抗原是鼠疫杆菌 III 型分泌物中的一种成分。2003 年, Singleton 在转基因植物叶绿体中表达 F1-V 融合基因, 融合蛋白的表达量达可溶性蛋白总量的 10%^[46]。炭疽是由炭疽芽孢杆菌引起的一种急性传染病, 也是一种古老的人兽共患病。以前, 炭疽热抗原 PA 的生产通常使

用过滤法, 这种方法常会使其含有一些起副作用的有毒因子。2004 年, Watson 等^[47]将编码 PA 的 pagA 基因导入到烟草叶绿体基因组, PA 的表达水平达总可溶蛋白的 18.1%。2005 年, Koya 等^[48]通过巨噬细胞毒性分析、小鼠免疫实验和毒性中和分析等实验, 证实了叶绿体基因工程 PA 抗原具有正常的功能。由于 PA 的高水平表达, 叶绿体转基因烟草可被用于 PA 疫苗的大量生产。即使在提纯过程中损失掉一半, 每英亩转叶绿体基因植物生产的疫苗也可以达到 3.6×10^8 的剂量。

4.3 叶绿体作生物反应器生产医用蛋白

外源蛋白的表达水平依目的基因整合位点不同、转录翻译的调控元件不同和外源蛋白的稳定性不同而不同, 叶绿体基因工程生产的生物大分子可具有正确空间构象, 这为利用叶绿体转基因植物商业化生产药用蛋白奠定了基础。通过叶绿体转化技术转化烟草后, 在烟草叶片中获得了高水平表达, 其表达量为可溶性总蛋白的 32%^[42]。人类血清蛋白 HSA, 占人类血清总蛋白的 60%, 是医疗上使用非常广泛的静脉内蛋白, 然而, 由于缺乏可行的商业化的重组表达系统, 目前主要从血液中提取。而且, 在重组系统对蛋白水解酶高度敏感, 而且纯化费

用昂贵。连接有 SD 序列的目的基因在转基因植物中的表达水平也只占可溶性蛋白的 0.02%，用来自叶绿体的非翻译区修饰基因的调控序列，在烟草叶绿体中获得了高水平的表达，占可溶性蛋白的 11.1%，这是医用蛋白在转基因植物中的最高表达水平，比以往在转基因植物叶片中的表达量高 500 倍以上。免疫金标记电子显微镜观察以聚集体的形式存在于叶绿体中，有利于蛋白的提取和纯化^[49]。Staub 等^[50]利用叶绿体转化技术，将人生长激素基因导入烟草的叶绿体基因组中，转基因烟草表达出的人生长激素可以形成正确的二硫键，具有正常的生物活性，达叶片总可溶蛋白的 7% 以上，其表达量是利用细胞核转化方法的 300 多倍，在烟草叶绿体中表达的人生长激素蛋白不需要复杂的转录后修饰。同时还获得了不含 N 端蛋氨酸的、和原始的人类生长激素蛋白功能类似的生长激素蛋白，该结果表明植物叶绿体可以作为高效表达医用蛋白的绿色工厂。利用叶绿体转基因植物也可表达其他重要物质，例如：生物可降解塑料、脂肪酸、氨基酸及糖类等。这些物质的合成，主要是通过向叶绿体内导入该物质合成过程关键酶的编码基因，通过增加酶的含量而达到增加合成产物的目的。

5 展望

利用植物生物反应器表达系统已成功地表达了多种外源蛋白，对重组蛋白进行理化特性和生物活性分析，在动物实验和人体实验方面也取得了重要进展，植物生物反应器不仅仅局限于细胞核、叶绿体、油体，在植物的其他细胞器中也可以表达外源蛋白，例如：淀粉体、液泡、内质网和线粒体等。所有这些研究表明植物生物反应器表达系统的研究令人鼓舞。但是作为一个表达系统，植物系统还处于发展阶段，还有许多问题尚待解决，如可利用的宿主植物，有待于进一步开发。尽管尚存一些问题待解决，但植物生物反应器前景可观。随着人类基因组计划研究的深入，相信会发现更多医疗价值的蛋白质，由转基因植物发展来的植物生物反应器将成为极具潜力的生产系统之一。大多数科学家和企业家相信，生物反应器将在 21 世纪末形成低投入、高产出的巨大产业。转基因植物将会成为主要的生产系统，成为 21 世纪人类药物的“生产车间”，为

人类健康提供充足的药物来源。

REFERENCES

- [1] Hang Y, Zhao DX, Li ZH. The research progress of plant cell bioreactor culture (I). *Plant J*, 2001, **18**(5): 567-570. 黄艳, 赵德修, 李佐虎. 植物细胞生物反应器培养的研究进展(I). *植物学报*, 2001, **18**(5): 567-570.
- [2] Franken E, Teuschel U, Hain R. Recombinant protein from transgenic plants. *Curr Opin Biotech*, 1997, **8**: 411-416.
- [3] Gomord V, Faye L. Post-translational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, **7**(2): 171-181.
- [4] Liu CJ, Wu D. Production of medicinal proteins by plant genetic engineering. *J Anhui Agri Teac Coll*, 2000, **14** (1): 51-53. 刘常金, 吴定. 植物基因工程生产药用蛋白. *安徽农业技术师范学院学报*, 2000, **14**(1): 51-53.
- [5] Korban SS, Krasnyanski SF, Buetow DE. Foods as production and delivery vehicles for human vaccines. *J Am Coll Nutr*, 2002, **21**: 212-217.
- [6] Mason HS, Warzencha H, Mor T, et al. Edible plant vaccines: Applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol Med*, 2002, **8**: 324-329.
- [7] Stoger E, Vaquero C, Fischer R, et al. Cereal crops as viable production and storage system for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol Biol*, 2000, **42** (4): 583-590.
- [8] Arakawa T, Langridge WHR. Plants are not just passive creatures. *Nature Med*, 1998, **4**: 550.
- [9] Xiao NZ, Bai YF, Liu JX, et al. The prospects of producing pharmaceutical proteins by plant bioreactor. *Hereditas*, 2003, **25** (1): 107-122. 肖乃仲, 白云峰, 刘锦秀, 等. 植物生物反应器生产药物蛋白的前景. *遗传*, 2003, **25**(1): 107-122.
- [10] Vaquero C, Sack M, Chandler J, et al. Transient expression of a tumor specific single chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 11128-11133.
- [11] Ma JK, Hiatt A, Hein M, et al. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science*, 1995, **268**(5): 716-719.
- [12] Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, et al. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med*, 1998, **4**: 601-606.
- [13] Zeitlin L, Olmsted SS, Moench TR, et al. A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**: 1361-1364.
- [14] Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K. Medical molecular farming: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccine in plants. *Trends Plant Sci*, 2001, **6**: 219-226.
- [15] Zhang GG, Rodriges L, Rovinski B, et al. Production of HIV gp24 protein in transgenic tobacco plants. *Mol Biotechnol*, 2002, **20**: 131-136.
- [16] SchUnmann PHD, Coia G, Waterhouse PM. Biopharming the Sim—pliRED(tm) HIV diagnostic reagent in barley,

- potato and tobacco. *Mol Breeding*, 2002, **9**: 113–121.
- [17] Fischer R, Hoffmann K, Schillberg S, *et al.* Antibody production by molecular farming in plant. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2000, **14**(2): 83–92.
- [18] Lavelle EC, Grant G, Pusztai A, *et al.* The identification of plant lectins with mucosal adjuvant activity. *Immunology*, 2001, **102**(1): 77–86.
- [19] Medina BF, Wright R, Funk V, *et al.* A non-toxic lectin for antigen delivery of plant-based mucosal vaccines. *Vaccine*, 2003, **21**(9-10): 997–1005.
- [20] Potera C. EPiocyte produces antibodies in plants. *Gen Eng Biotechnol News*, 1999, **3**(2): 15.
- [21] Wang XG, Genetic engineering vaccine in transgenic plant. *Prog Biotech*, 1998, **18**(1): 51.
- [22] Curtiss RI, Cardineau G. Oral immunisation by transgenic plants: USA, 4888170, 1995-01.
- [23] Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, *et al.* Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med*, 1998, **4**: 607–609.
- [24] Arakawa T, Chong DK, Merritt JL, *et al.* Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res*, 1997, **6**(6): 403–413.
- [25] 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 Bio*, 2001, **311**(5): 1001–1009.
- [26] Koprowski H. Old and new prescriptions for infectious diseases and the newest recipes for biomedical products in plants. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2002, **50**(6): 365–369.
- [27] Cramer CL, Weissenborn DL, Oishi KK, *et al.* Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Ann NY Acad Sci*, 1996, **792**: 62–71.
- [28] Sijmons PC. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio Technology*, 1990, **8**: 217–221.
- [29] Tuboly T, Yu W, Bailey A, *et al.* Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine*, 2000, **18**(19): 2023–2028.
- [30] Moloney MM, Maurice M, Roeijen GJH, *et al.* Oil bodies and associated proteins as affinity matrices: USA, 6509453, 2003-01-21.
- [31] Zhao CZ, Lu JD, Su L, *et al.* Progress of oilbody as a bioreactor. *Biol Bull*, 2008, **2**: 73–79.
赵传志, 卢金东, 苏磊, 等. 以油体作为生物反应器的研究进展. *生物技术通报*, 2008, **2**: 73–79.
- [32] Moloney MM. The seed-specific transactivator, ABI3, induces oleosin gene expression. *Korean J Plant Tissue Culture*, 2000, **27**(4): 283.
- [33] Goldberg RB, Barker SJ. Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell*, 1989, **56**: 149–160.
- [34] Jia SR, Liu YH. The method of new Salmon calcitonin analog and in the oil body expression: China, 01144257.3, 2001-12-14.
贾士荣, 刘昱辉. 一种新型鲑鱼降钙素类似物及其在植物油体中表达的方法: 中国, 专利号 01144257.3, 2001-12-14.
- [35] Parmenter DL, Boothe JG, Roeijen GJH, *et al.* Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. *Plant Mol Biol*, 1995, **29**(6): 1167–1180.
- [36] Nykiforuk CL, Boethe JG, Murray EW, *et al.* Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Biotechnol*, 2006, **4**(1): 77–85.
- [37] Markley NA, Nykiforuk CL, Boethe J, *et al.* Producing proteins using transgenic oilbody-oleosin technology. *Biopharm*, 2006: 34–46.
- [38] Gijs JH, Roeijen V, Moloney MM. Plant seed oil bodies as carriers for foreign proteins. *Biotechnology*, 1995, **13**(1): 72–77.
- [39] Liu JH, Selinger LB, Cheng KJ, *et al.* Plant seed oil-bodies as an immobilization matrix for a recombinant xylanase from the lumen fungus *Neocallimastix patricarum*. *Mol Breeding*, 1997, **3**(3): 463–470.
- [40] Yan A, Yu LF. Chloroplast genome: The origin and structure and expression regulation. *Biol Bull*, 2004, **2**: 6–7.
燕安, 俞利凤. 叶绿体基因组: 起源、结构与表达调控. *生物学通报*, 2004, **2**: 6–7.
- [41] Hibberd MJ, Linley JP, Khan MS, *et al.* Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojectile bombardment. *Plant J*, 1998, **16**: 627–632.
- [42] Daniell H, Carmona-Sanchez O, Burns B. Chloroplast Derived Antibodies, Biopharmaceuticals and Edible Vaccines. in *Molecular Farming*. Schillberg S, Wiley VCH, Eds. Aachen, Germany: Verlag Publishers, 2004: 113–133.
- [43] Su N, Wu YM, Sun BY, *et al.* The new approach to plant genetic: Chloroplasts transformation. *High-tech Commun*, 2001, **4**: 9–13.
苏宁, 吴燕民, 孙丙耀, 等. 植物基因工程新途径: 叶绿体转化. *高新技术通讯*, 2001, **4**: 9–13.
- [44] Tregoning JS, Nixon P, Kuroda HP, *et al.* Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**: 1174–1179.
- [45] Singleton ML. Expression of CaFI and LcrV as a fusion protein for a vaccine against *Yersinia pestis* via chloroplast engineering. MS thesis, University of Central Florida, USA, 2003.
- [46] Molina A, Herva-Stubbs S, Daniell H, *et al.* High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotech J*, 2004, **2**(2): 141–153.
- [47] Watson J, Koya V, Leppla SH, *et al.* Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a nonfood/feed crop. *Vaccine*, 2004, **22**: 4374–4384.
- [48] Koya V, Moayeri M, Leppla SH, *et al.* Plant-based vaccine: Mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Immun*, 2005, **73**: 8266–8274.
- [49] Millan AF, Mingo-Castel A, Miller M, *et al.* Chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotech J*, 2003, **1**(2): 71–79.
- [50] Staub JM, Garcia B, Graves J, *et al.* High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(3): 333–338.