

转基因植物生产药用蛋白研究进展

陈玉辉, 赵凌侠, 崔丽洁, 唐克轩

(上海交通大学农业与生物学院植物生物技术研究中心, 生命科学技术学院,
复旦-交大-诺丁汉植物生物技术研发中心, 上海 200030)

摘要:利用转基因植物作为生物反应器生产具有重要价值的多肽和蛋白质, 包括抗体、疫苗、药用蛋白等较之其他系统具有很多优越性, 已经成为当前植物基因工程和药物生物技术领域中的研究热点, 着重就这一领域近年来国内外的研究现状、发展趋势、存在的问题及对策进行综述。

关键词:转基因植物; 药用蛋白; 生物反应器

中图分类号: Q77, TQ93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0864(2007)05-0036-09

Progress in Transgenic Plants Producing Pharmaceutical Proteins

CHEN Yu-hui, ZHAO Ling-xia, CUI Li-jie, TANG Ke-xuan

(Plant Biotechnology Research Center, School of Agriculture and Biology, School of Life Science and Technology,
Fudan-SJTU-Nottingham Plant Biotechnology R&D Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

Abstract: The application of transgenic plants as bioreactors in the production of highly valued medical polypeptides and proteins, including antibodies, vaccines and pharmaceutical proteins has many advantages over other production systems, and has become a hot spot in plant genetic engineering and pharmaceutical biotechnology in recent years. The internal and external research progress, development tendency and existing problems in this area were reviewed in this article.

Key words: transgenic plants; pharmaceutical protein; bioreactor

1 植物生物反应器

生物反应器 (bioreactor) 传统意义上是指为细胞繁殖和生化反应提供适宜的环境条件的设备, 从而利用活的细胞或者酶的催化能力生产某种产品。随着现代生物技术的发展, 分子生物学和转基因技术的广泛应用, 生物反应器的概念得到扩展, 利用转基因动物、植物、微生物生产各种特定产品的技术体系也被称为生物反应器。所谓植物生物反应器是指利用植物细胞或完整植物, 大量地生产各种蛋白和代谢产物, 可以直接利用天然的植物细胞, 也可以利用基因工程技术改造的植物细胞、组织、器官和植株^[1]。

从 1983 年首次获得转基因植物至今, 植物基因工程的研究取得了飞速发展。建立在 DNA 重组技术和植物细胞培养、植物组织培养技术基础

上的植物基因工程, 可以将各种特殊设计或改造的外源基因转移到植物染色体内, 在分子水平上定向重组遗传物质, 从而改良植物性状, 培育优良高产的农作物新品种。而以转基因植物作为生物反应器来生产医药重组蛋白, 如抗体、疫苗等, 也成为国际上植物基因工程的一个新的发展趋势。迄今为止, 已有几十种蛋白或多肽在植物中得到成功表达, 例如人的细胞因子、表皮生长因子、促红细胞生成素、胸腺素、干扰素、生长激素和一些可以作为疫苗用的抗原蛋白等。

1.1 传统生物反应器及其缺陷

传统的生物反应器主要指用微生物和酵母生产外源蛋白的系统。传统生物反应器有以下不足: 首先, 细菌无法生产完整的抗体和进行转录后加工; 其次, 用传统方法表达重组蛋白, 所需设备和培养基 (动物细胞培养) 比较昂贵, 后续加工纯

收稿日期: 2007-05-29; 修回日期: 2007-07-03

基金项目: 国家“863”计划和上海市科学技术委员会资助。

作者简介: 陈玉辉, 博士研究生, 主要从事植物生物反应器研究。通讯作者: 唐克轩, 博士, 教授, 主要从事植物分子生物学、植物生物反应器等研究。Tel: 021-62932002; E-mail: kxtang1@yahoo.com, kxtang1@163.com

化(细菌)还需大量的投资,而且动物转基因还存在法律和伦理方面的约束^[2,3];再次,对医用蛋白而言最重要的是安全性问题,而微生物表达系统在加工中难以去除内毒素对重组蛋白的污染,动物表达系统的重组蛋白(或血制品)往往污染有

病原菌、病毒或癌原序列,有传染给人的危险,也存在安全隐患^[4]。

1.2 植物生物反应器的优点

图 1 是几种外源蛋白表达系统的比较。

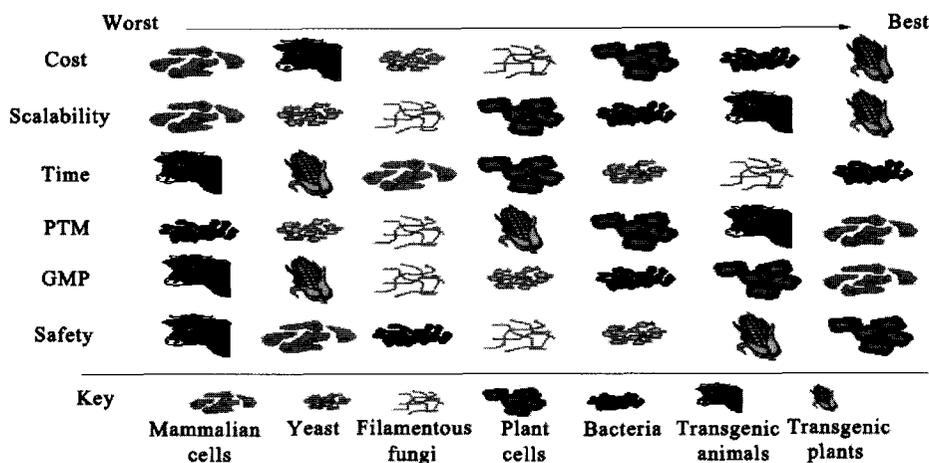


图 1 目前常用的几种表达系统的对比 (Twyman RM, 2005^[5])

Fig. 1 Benefits and limitations of some different production systems for recombinant proteins (from Twyman, 2005^[5]).

Cost: 生产成本; Scalability: 规模化; Time: 生产时间; PTM (post-translational modifications): 翻译后修饰; GMP (good manufacturing practice): 生产条件; Safety: 安全性; Mammalian cells: 哺乳动物细胞; Yeast: 酵母; Filamentous fungi: 丝状真菌; Plant cells: 植物细胞; Bacteria: 细菌; Transgenic animals: 转基因动物; Transgenic plants: 转基因植物

由图 1 可以看出,植物表达系统在生产成本和规模化等几个方面均具有很大的优势。植物生物反应器具有如下优点^[6]:①植物细胞的全能性。植物的组织、细胞或者原生质体在适当培养条件下均能再生出完整的植物个体。药用基因转化到植物细胞后可培育出药用植物品种,遗传稳定,可以通过田间种植生产药物;②植物生产系统具有廉价性。植物表达系统最吸引人之处是它能廉价地生产高价值的、供不应求的蛋白。这一点明显优于微生物和动物细胞的培养;③植物是能够大规模生产蛋白质的生产系统;④用植物生产疫苗简单、方便。用动物或微生物生产口服疫苗需要特殊的专业知识和特殊的贮藏条件,这些生产系统还存在一些其他弊端。利用植物能够贮藏蛋白质于种子中的有利条件,可以简单的、方便的生产、储藏和发放疫苗;⑤植物具有完整的真核细胞表达系统。表达产物可糖基化、酰胺化、磷酸化及可完成对亚基的正确装配等翻译后加工过程,使表达产物具有与高等动物细胞一致的免疫原性

和生物活性;⑥表达产物无毒性和副作用,安全可靠,无残存 DNA 和潜在的致病性、致癌性。

2 利用植物生产药用蛋白的研究进展

2.1 利用植物生物反应器生产抗体

将编码全抗体或抗体片段的基因导入植物,在植物中可表达出具有功能性识别抗原,即具有结合特性的全抗体或部分抗体片段。在植物中表达重组抗体,可以大规模在大田种植,条件相对简单,价格低廉,外源抗体基因片段可以整合进入植物染色体中稳定遗传。植物细胞可以对表达的重组抗体蛋白进行正确的组装和后期加工,其表达产物还能保持良好的生物学特性;同时由于植物表达系统表达的抗体以二聚体形式存在,因此表达产物的亲和力高,有助于全面发挥抗体的功能^[6]。目前,已经有许多完整抗体或各种抗体片段如 Fab 和 scFv 等都已经成功地在植物中表达,如表 1 所示。

表 1 利用转基因植物表达的药用重组抗体 (2000 年以后)

Table 1 Recombinant antibodies expressed in transgenic plants (after year 2000).

年份 Year	抗体 Antibody	抗原 Antigen	转基因植物 Transgenic plants	参考文献 Reference
2000	scFvT84.66	癌胚抗原 (CEA) Carcinoembryonic antigen	豆类 Pea	Perrin <i>et al.</i> , 2000 ^[7]
2000	scFv	癌胚抗原 Carcinoembryonic antigen	谷类 Cereal	Stoger E <i>et al.</i> , 2000 ^[8]
2001	Fab fragment	人肌酸激酶 Human creatine kinase	拟南芥 Arabidopsis	Peeters <i>et al.</i> , 2001 ^[9]
2002	scFv	乙肝表面抗原 Hepatitis virus B surface antigen	烟草 Tobacco	Ramirez <i>et al.</i> , 2002 ^[10]
2002	IgG/scFv	人绒毛膜促性腺激素 Human choriogonadotropin	烟草 Tobacco	Kathuria <i>et al.</i> , 2002 ^[11]
2002	dAb	癌胚抗原 Carcinoembryonic antigen	烟草 Tobacco	Vaquero <i>et al.</i> , 2002 ^[12]
2002	scFv-fusion	血液艾滋病毒抗体 HIV antibodies in blood	烟草、谷物、马铃薯 Tobacco, Cereal, Potato	Schunmann <i>et al.</i> , 2002 ^[13]
2003	scFv	人 IL-4 和 IL-6 Human Interleukin 4,6	烟草 Tobacco	Ehsani <i>et al.</i> , 2003 ^[14]
2003	IgG1	链球菌外源凝集素 Streptococcus mutans adhesin	烟草 Tobacco	Darke <i>et al.</i> , 2003 ^[15]
2003	VHH	马铃薯淀粉分枝酶 Potato starch branching enzyme	马铃薯 Potato	Jobling <i>et al.</i> , 2003 ^[16]
2003	mAb S057	狂犬病毒蛋白 Rabies virus glycoprotein	烟草 Tobacco	Ko <i>et al.</i> , 2003 ^[17]
2003	LSC	单纯疱疹病毒 Herpes simplex virus	藻类 Algae	Mayfield <i>et al.</i> , 2003 ^[18]
2006	scFv	内肠杆菌毒素 A Botulinum neurotoxins A	烟草 Tobacco	Almquist <i>et al.</i> , 2006 ^[19]
2006	mAb	狂犬病毒单克隆抗体 Rabies virus monoclonal antibody	烟草 Tobacco	Girard <i>et al.</i> , 2006 ^[20]

2.2 利用植物生物反应器生产疫苗

利用转基因植物生产疫苗是近年来生物技术领域发展的热点,并且取得了快速的进展。到目前为止,在转基因植物中表达的抗原基因约有 20 几种。转化的植物品种包括:烟草、马铃薯、拟南芥、大豆、花生、莴苣、胡萝卜、番茄、白三叶草、紫花苜蓿、玉米、海带和羽扇豆等。植物性口服疫苗 (oral vaccine) 或可食疫苗 (edible vaccine) 是转基因植物疫苗的研究热点,也是其主要的发展方向。植物口服疫苗无需加工提纯和冷冻保存,使用方

便,易于推广,因此受到较大关注。世界上第一例植物口服疫苗就是利用番茄表达的抗狂犬病病毒的表面抗原^[21]。现在也已经成功地在番茄和香蕉中表达出 HbsAg^[22, 23]。表 2 为目前利用植物系统表达的重组疫苗。利用植物生产疫苗存在下述问题尚待解决:①增强转基因植物可饲(食)疫苗的免疫原性问题;②外源基因在植物中的表达量问题;③受体植物的选择。现在选用的疫苗植物载体多数是一些易于转化的模式植物,例如拟南芥,烟草等。虽然这些模式植物易于转化,但是

经济价值不高,难以大规模推广。有些植物因存在一些缺点,也限制了其在实际生产上的应用。例如,马铃薯生食的口感不好,熟食必然会使蛋白质的理化性质和空间构象发生变化而影响免疫效

果;烟草由于含有生物碱,必须经过提炼方可食用。因此选用生产上大规模种植的具有一定经济价值并可生食或生饲的作物,才易于实现疫苗的产业化。

表 2 利用转基因植物生产的重组疫苗(2000 年以后)

Table 2 Recombinant vaccines expressed in transgenic plants (after year 2000).

年份 Year	抗原 Antigen	转基因植物 Transgenic plants	参考文献 Reference
2000	猪传染性胃肠炎病毒 S 蛋白 Porcine transmissible gastroenteritis virus S protein	拟南芥、马铃薯 Arabidopsis, Potato	Tuboly <i>et al.</i> , 2000 ^[24]
2001	口蹄疫病毒 Foot and mouth disease virus VP1	烟草 Tobacco	Gil <i>et al.</i> , 2001 ^[25]
2002	霍乱毒素 B 亚单位 Cholera toxin B subunit	番茄 Tomato	Jani <i>et al.</i> , 2002 ^[26]
2002	乙肝表面抗原 Hepatitis B surface protein	海带 Kelp	姜鹏等, 2002 ^[27]
2003	轮状病毒衣壳蛋白 VP6 HRV-VP6	马铃薯 Potato	Yu <i>et al.</i> , 2003 ^[28]
2003	乳头瘤病毒 16 型囊膜蛋白 L1 Human papillomavirus type 16	马铃薯、烟草 Potato, Tobacco	Biemelt <i>et al.</i> , 2003 ^[29]
2003	乙肝病毒表面抗原 Hepatitis B surface protein	烟草 Tobacco	Valdes <i>et al.</i> , 2003 ^[30]
2003	大肠杆菌热敏肠毒素 B 亚单位 <i>E. coli</i> heat-labile enterotoxin B	玉米 Maize	Chikwamba <i>et al.</i> , 2003 ^[31]
2003	大肠杆菌热敏肠毒素 B 亚单位 <i>E. coli</i> heat-labile enterotoxin B	番茄 Tomato	Walmsley <i>et al.</i> , 2003 ^[32]
2004	破伤风病毒抗原 Tetanus vaccine antigen	烟草叶绿体 Tobacco chloroplast	Tregoning <i>et al.</i> , 2004 ^[33]
2004	定居因子抗原 I Colonization factor antigen I	马铃薯 Potato	Lee <i>et al.</i> , 2004 ^[34]
2004	狂犬病病毒 Rabies virus glycoprotein	烟草 Tobacco	Ko <i>et al.</i> , 2004 ^[35]
2005	戊型肝炎病毒外壳蛋白 HEV capsid proteins	马铃薯 Potato	Maloney <i>et al.</i> , 2005 ^[36]
2005	艾滋病病毒 Tat 蛋白 HIV-1 tat protein	烟草 Tobacco	Karasev <i>et al.</i> , 2005 ^[37]
2005	人轮状病毒 VP6 Human group A rotavirus	苜蓿 Alfalfa	Dong <i>et al.</i> , 2005 ^[38]
2005	人表皮生长因子受体-2 Human epidermal growth factor receptor-2	烟草 Tobacco	Galeffi <i>et al.</i> , 2005 ^[39]
2005	呼吸道合胞病毒 Respiratory syncytial virus	烟草 Tobacco	Yusibov <i>et al.</i> , 2005 ^[40]
2005	乙肝病毒表面抗原 M 蛋白 HBsAg M protein	烟草 Tobacco	Huang <i>et al.</i> , 2005 ^[41]
2005	Norwalk 病毒衣壳蛋白 Norwalk virus capsid protein	番茄 Tomato	Huang <i>et al.</i> , 2005 ^[41]

2.3 利用植物生产其他重要的药用蛋白

生产具有药学生活性的植物蛋白和多肽是近年来植物生物反应器应用的另一个迅速发展的领域,例如,细胞因子、酶及其他药用蛋白和生物活性肽等。表 3 是在转基因植物中表达的一些重要的药用蛋白。

Verwoer 等^[42]将黑曲霉的肌醇六磷酸酶基因转入烟草,其在成熟种子中的表达量占总可溶性蛋白的 1%。Hood 等^[43]在转基因玉米中成功表达了

重组抗生物素蛋白,表达量占总可溶性蛋白的 2%,现已成为 Sigma-Aldrich 的商品。此外,在转基因油菜种子油体中表达的水蛭素,目前,已经在加拿大投入商业生产,这是第一个完成商业开发的范例。到目前为止,人们已经成功地在植物中表达的蛋白还有胰岛素、红细胞生成素、干扰素、溶菌酶、人生长激素、脑啡肽、人表皮生长因子、人凝血因子、白细胞介素和胸腺素等。表达的宿主植物主要有烟草、马铃薯、拟南芥、玉米和水稻等。

表 3 利用转基因植物表达的其他药用蛋白(2000 年以后)

Table 3 Pharmaceutical proteins expressed in transgenic plants (after year 2000).

年份 Year	表达蛋白 Protein	转基因植物 Transgenic plants	参考文献 Reference
2000	人生长激素 Human growth hormone	烟草 Tobacco	Leite <i>et al.</i> , 2000 ^[44]
2000	人抗菌乳铁转运蛋白 Lactoferrin	马铃薯 Potato	Chong <i>et al.</i> , 2000 ^[45]
2001	人 α -干扰素 Human α -interferon	马铃薯 Potato	Ohya <i>et al.</i> , 2001 ^[46]
2001	人乙酰胆碱脂酶 Human acetyl cholinesterase	番茄 Tomato	Mor <i>et al.</i> , 2001 ^[47]
2002	人 α -干扰素 Human α -interferon	马铃薯 Potato	Sawahel <i>et al.</i> , 2002 ^[48]
2002	白细胞介素-2 Interleukin-2	马铃薯 Potato	Park <i>et al.</i> , 2002 ^[49]
2002	溶菌酶 Lysozyme	水稻 Rice	Humphrey <i>et al.</i> , 2002 ^[50]
2003	人抗坏血酸还原酶 Human dehydroascorbate reductase	烟草 Tobacco	Kwon <i>et al.</i> , 2003 ^[51]
2003	人溶菌酶 Human lysozyme	水稻 Rice	Yang <i>et al.</i> , 2003 ^[52]
2003	人乳铁转运蛋白 Human lactoferrin	水稻 Rice	Suzuki <i>et al.</i> , 2003 ^[53]
2003	谷氨酸脱羧酶 Glutamic acid decarboxylase	烟草 Tobacco	Avesani <i>et al.</i> , 2003 ^[54]
2003	(胃液)内因子 Human intrinsic factor	拟南芥 Arabidopsis	Fedosov <i>et al.</i> , 2003 ^[55]
2004	人表皮生长因子 Human epidermal growth factor	烟草 Tobacco	Wirth <i>et al.</i> , 2004 ^[56]
2004	人凝血 VIII 因子 Human coagulation factor VIII	烟草 Tobacco	Gao <i>et al.</i> , 2004 ^[57]
2004	胰岛素类生长因子-1 Insulin-like growth factor-1	烟草、水稻 Tobacco, rice	Panahi <i>et al.</i> , 2004 ^[58]
2004	白细胞介素-4 Interleukin-4	烟草 Tobacco	Ma <i>et al.</i> , 2004 ^[59]
2004	人乳铁蛋白 Human lactoferrin	烟草 Tobacco	Li <i>et al.</i> , 2004 ^[60]
2006	胰岛素 Human Insulin	拟南芥 Arabidopsis	Cory <i>et al.</i> , 2006 ^[61]
2007	人凝血 IX 因子 Human coagulation factor IX	番茄 Tomato	Zhang <i>et al.</i> , 2007 ^[62]

3 影响药用蛋白在植物中表达的因素

3.1 受体植物的选择

最初的转基因植物多为烟草和马铃薯,因为茄科植物比较容易被转化。随着转基因技术的成熟,能够利用的植物种类也越来越多,不同植物各有优点和缺点,关键是要根据目的选择合适的植物宿主。香蕉是生产疫苗非常合适的植物之一,也是人们普遍喜爱的水果,可以不经加工,直接食用,特别适合儿童,而且产量很高。Clendemen 等^[63]报道在香蕉中找到了香蕉果实特异表达启动子,香蕉将会成为一个非常适合生产外源蛋白的表达系统。藻类也是目前研究的热点,比如盐藻。盐藻作为生物反应器生产外源蛋白具有很多独特的优点。盐藻属于光合自养生物,能利用简单的无机盐类和微量元素进行培养,不需要昂贵的培养基和庞大的发酵设备,因此生产成本较低。盐藻为真核单细胞生物,遗传转化操作技术简单,而且具有与高等动植物相似的叶绿体、线粒体、高尔基体和内质网等细胞器。盐藻表达的产

物可完成翻译后加工,如二硫键的形成,糖基化的修饰等。盐藻细胞含有丰富的营养成分,可以直接食用。另外,盐藻具有一个大型的杯状叶绿体,因此,也是进行叶绿体转化的理想材料^[64]。

3.2 启动子的选择

在转基因植物中,启动子的特性决定了外源蛋白的 mRNA 表达水平,增强外源基因的转录是提高转基因植物中外源蛋白产量的一个重要因素。在植物遗传转化中,双子叶植物主要使用花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S 启动子,而单子叶植物常用水稻肌动蛋白基因(*actin1*)的启动子和玉米泛素基因(*ubiquitin*)的启动子。在这些组成型表达启动子的控制下,外源基因在植物的所有部位和每个发育阶段都会表达。然而,外源基因在受体植物内持续、高效的表达往往会引起植物的变异,影响植物的正常生长发育。为了使外源基因在植物体内有效地发挥作用,同时又减少对植物生长的不利影响,人们对特异表达启动子及人工构建的复合式表达启动子的研究越来越受到重视。目前,已经发现了种子特异表达启动子、果实

特异表达启动子、根特异表达启动子和化学诱导性启动子等多种启动子。这些启动子的克隆和应用为在植物中特异性的表达外源基因奠定了基础。王玉华等^[65]利用水稻叶绿体基因启动子将聚羟基脂肪酸酯 (polyhydroxyalkanoates, PHAs) 基因特异表达于烟草叶绿体,为植物生产生物降解塑料开辟了新途径。宋东光等^[66]将马铃薯块茎专一性表达的 *patatin* 启动子与乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 基因构建载体转化马铃薯茎段,获得了高 HBsAg 蛋白表达的转基因植株。江晓玲等^[67]利用 E8 启动子,在番茄果实中特异性表达霍乱肠毒素 B 亚单位基因 (CTB),小鼠口服免疫后,其血液和肠道粘膜中均检测到抗 CTB 抗体。Guo 等^[68]串连了南瓜 PP2 基因启动子的 -468-85 序列,结果表明,串连的启动子在韧皮部的专一性启动活性高于竹节花黄斑病毒启动子。他们同时发现,即使在全长 PP2 基因启动子前加上 2 个 CaMV35S 启动子的增强序列,它的转录起始效率也比不上 2 个串连的 -468-85 序列,这说明复合式启动子是一种提高外源蛋白表达量的有效途径。

3.3 外源蛋白表达水平低

为了进一步提高外源蛋白在植物细胞中的表达水平,人们设计了很多策略。

3.3.1 蛋白质的靶向定位 在高等植物叶绿体中表达外源基因是一种可供选择的转基因体系,可显著提高外源基因的拷贝数,从而使基因表达产物成倍增加。Schouten 等^[69]将加了一个内质网滞留信号肽的 *scFv* 基因转入烟草,其 *scFv* 的表达量占总可溶性蛋白的 1%,而对照不加信号肽的转基因烟草的 *scFv* 的表达量只占总可溶性蛋白的 0.01%。

3.3.2 优化密码子 植物中遗传密码子的使用频率与动物、微生物不同。适当地将外源基因的密码子替换成为植物偏爱的密码子,能显著提高该基因在植物中的表达水平。Mason 等^[70]按照植物偏爱密码子合成的全长 *LT-B* 基因在马铃薯中的表达量比原来提高了 5~40 倍。在马铃薯叶片中的表达量占总可溶蛋白的 0.19%,最高可达 $19.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,而且表达产物形成了部分的寡聚体,有利于活性的发挥。饲喂老鼠以后,产生了免疫反应。人体试验也产生了免疫反应和相应的抗体,但是,免疫反应没有直接使用病原菌的效果明

显。这可能跟植物细胞的特点和植物表达系统本身有关,也可能与受试体有关。Chen 等^[71]按照植物偏爱密码子设计合成了胸腺素 $\alpha 1$ 基因,体外将其串联成四体,以防止小肽在表达过程中被降解,并且成功地利用原核表达系统表达出了具有生物活性的四体胸腺素 $\alpha 1$,之后又在番茄中对四体串连的胸腺素进行了成功的表达。在番茄中的表达量最高达到 $6.094 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,刺激小鼠淋巴细胞增殖的试验证明,表达产物具有正常的生物活性。

3.3.3 使用核基质附着区 MAR 序列 在转基因的生物技术操作中,将 MAR 序列置于所转基因的两侧,构建成 MAR-gene-MAR 序列,可以创造一个独立的结构域。MAR 的作用一方面可以克服基因组对不同碱基组成的外源基因的识别,另一方面可以使外源基因在染色质中形成独立的活跃转录单元,不受周围染色质结构的影响,从而提高外源基因的表达水平,许多实验报道 MAR 能提高基因的表达水平^[72]。

3.3.4 添加 5' 和 3' 非翻译序列 许多研究已经发现,真核生物的 5' 和 3' 非翻译序列对基因的正常表达是非常必要的,该区段的缺失常会导致 mRNA 的稳定性和翻译水平下降。目前,了解比较清楚的是 5' 非翻译序列的 Ω 因子,它为核糖体提供了新的结合位点,可以增强 mRNA 的翻译效率。植物细胞中 mRNA 的稳定性与 3' 端加入多聚腺苷 polyA 的速度及长度有关。基因转录成 mRNA 后,如果不能及时加入 polyA 尾巴,将会很快被核酸外切酶所降解。因此,为了提高外源基因的稳定性,很多实验在构建载体时,在转录终止子之前加入了 polyA 序列。Haq 等^[73]为了提高 *LT-B* 基因的表达量,在基因的 5' 端和 3' 端分别与 TEV-5'UTR 和内质网定位信号 (SEKDEL) 融合,然后转化烟草和马铃薯。在转基因烟草的可溶蛋白中 *LT-B* 的最高含量达到 $14 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,在马铃薯中的最高含量为 $110 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,大约占 0.01%。用烟草和马铃薯免疫小鼠后均出现了免疫反应。

4 利用植物生产药用蛋白前景展望

用转基因植物生物反应器生产有医疗价值的抗体、疫苗及一些重要药用蛋白,具有一定的优势和良好的前景。随着人类基因组计划的逐渐深

人,人们将会发现更多的有医疗作用的蛋白质,进而需要生产和使用这些重要的重组产物。转基因植物将会成为主要的生产系统之一,不断为人类健康提供充足的药物来源,大片的“分子药田”将会成为现实。

参 考 文 献

- [1] 井 鑫,张兴国. 植物生物反应器研究进展[J]. 西南农业大学学报, 2004, 2(4): 109-112.
- [2] Fischer R, Emans N. Molecular farming of pharmaceutical proteins [J]. Transgenic Research, 2000, 9: 279-299.
- [3] Echelard Y. Recombinant protein production in transgenic animals [J]. Curr. Opin. Biotech., 1996, 7: 536-540.
- [4] Poinar H, Kuch M, Pääbo S, et al.. Molecular analyses of oral polio vaccine samples [J]. Science, 2001, 292: 743-744.
- [5] Twyman R M, Schillberg S, Fischer R, et al.. Transgenic plants in the biopharmaceutical market [J]. Expert. Opin. Emerging Drugs, 2005, (10): 185-218.
- [6] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] Perrin Y, Vaquero C, Gerrard I, et al.. Transgenic pea seeds as bioreactors for the production of a single-chain Fv fragment (scFv) antibody used in cancer diagnosis and therapy [J]. Molecular Breeding, 2000, 6(4): 345-352.
- [8] Stöger E, Vaquero C, Torres E, et al.. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies [J]. Plant Mol. Biol., 2000, 42: 583-590.
- [9] Peeters K, De Wilde C, Depicker A. Highly efficient targeting and accumulation of a Fab fragment within the secretory pathway and apoplast of *A. thaliana* [J]. Eur. J. Biochem., 2001, 268: 4251-4260.
- [10] Ramirez N, Ayala M, Orenzo D, et al.. Expression of a single-chain Fv antibody fragment specific for the hepatitis B surface antigen in transgenic tobacco plants [J]. Transgenic Res., 2002, 11: 61-64.
- [11] Kathuria S, Sriraman R, Nath R, et al.. Efficacy of plant-produced recombinant antibodies against HCG [J]. Hum. Reprod., 2002, 17(8): 2054-2061.
- [12] Vaquero C, Sack M, Schuster F, et al.. A carcinoembryonic antigen-specific diabody produced in tobacco [J]. FASEB J., 2002, 16: 408-410.
- [13] Schünmann P H, Coia G, Waterhouse P M, et al.. Biopharming the SimpliRED HIV diagnostic reagent in barley, potato and tobacco [J]. Molecular Breeding, 2002, 9(2): 113-121.
- [14] Ehsani P, Meunier A, Nato F, et al.. Expression of anti human IL-4 and IL-6 scFvs in transgenic tobacco plants [J]. Plant. Mol. Biol., 2003, 52(1): 17-29.
- [15] Drake P M, Chargelegue D M, Vine N D, et al.. Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots [J]. Plant. Mol. Biol., 2003, 52(1): 233-241.
- [16] Jobling S A, Jarman C, The M M, et al.. Immuno modulation of enzyme function implants by single-domain antibody fragments [J]. Nature Biotechnol., 2003, 21: 77-80.
- [17] Ko K, Tekoah Y, Rudd P M, et al.. Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100: 8013-8018.
- [18] Mayfield S P, Franklin S E, Lerner R A. Expression and assembly of a fully active antibody in algae [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100(2): 438-442.
- [19] Almquist K C, McLean M D, Niu Y, et al.. Expression of an anti-botulinum toxin A neutralizing single-chain Fv recombinant antibody in transgenic tobacco [J]. Vaccine, 2006, 24(12): 2079-2086.
- [20] Girard L S, Fabis M J, Bastin M, et al.. Expression of a human anti-rabies virus monoclonal antibody in tobacco cell culture [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 345(2): 602-607.
- [21] Megarvey P B, Hammond J, Dienelt M M, et al.. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes [J]. Bio/Technology, 1995, 13: 1484-1487.
- [22] Sala F, Rigano M M, Barbante A, et al.. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives [J]. Vaccine, 2003, 21: 803-808.
- [23] Kumar G B, Ganapathi T R, Revathi C J, et al.. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants [J]. Planta, 2005, 222(3): 484-493.
- [24] Tuboly T, Yu W, Bailey A, et al.. Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants [J]. Vaccine, 2000, 18(19): 2023-2028.
- [25] Gil F, Brun A, Wigdorovitz A, et al.. High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants [J]. FEBS Lett., 2001, 488(1-2): 13-17.
- [26] Jani D, Meena L S, Rizwan-ul-Haq Q M, et al.. Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants [J]. Transgenic Res., 2002, 11(5): 447-454.
- [27] 姜 鹏, 秦 松, 曾呈奎. 乙肝表面抗原基因在海带中的表达 [J]. 科学通报, 2002, 47(14): 1095-1097.
- [28] Yu J, Langridge W. Expression of rotavirus capsid protein VP6 in transgenic potato and its oral immunogenicity in mice [J]. Transgenic Res., 2003, 12(2): 163-169.
- [29] Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, et al.. Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants [J]. J. Virol., 2003, 77(17): 9211-9220.
- [30] Valdes R, Reyes B, Alvarez T, et al.. Hepatitis B surface antigen immuno purification using a plant-derived specific antibody produced in large scale [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2003, 310(3): 742-747.
- [31] Chikwamba R K, Scott M P, Mejia L B, et al.. Localization of a bacterial protein in starch granules of transgenic maize kernels [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100: 11127-11132.
- [32] Walmsley A M, Alvarez M L, Jin Y, et al.. Expression of the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as a fusion protein in transgenic tomato [J]. Plant Cell Rep., 2003, 21(10): 1020-1026.

- [33] Tregoning J, Maliga P, Dougan G, *et al.*. New advances in the production of edible plant vaccines: chloroplast expression of a tetanus vaccine antigen, TetC [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 989-994.
- [34] Lee J Y, Yu J, Henderson D, *et al.*. Plant-synthesized *E. coli* CFA/I fimbrial protein protects Caco-2 cells from bacterial attachment [J]. *Vaccine*, 2004, 23: 222-231.
- [35] Ko K, Wei X, Crooks P A, *et al.*. Elimination of alkaloids from plant-derived human monoclonal antibody [J]. *J. Immunol. Methods*, 2004, 286: 79-85.
- [36] Maloney B J, Takeda N, Suzaki Y, *et al.*. Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E [J]. *Vaccine*, 2005, 23: 1870-1874.
- [37] Karasev A V, Foulke S, Wellens C, *et al.*. Plant based HIV-1 vaccine candidate; tat protein produced in spinach [J]. *Vaccine*, 2005, 23: 1875-1880.
- [38] Dong J, Liang B, Jin Y, *et al.*. Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection [J]. *Virology*, 2005, 339(2): 153-163.
- [39] Galeffi P, Lombardi A, Donato M D, *et al.*. Expression of single-chain antibodies in transgenic plants [J]. *Vaccine*, 2005, 23: 1823-1827.
- [40] Yusibov V, Mett V, Mett V, *et al.*. Peptide-based candidate vaccine against respiratory syncytial virus [J]. *Vaccine*, 2005, 23: 2261-2265.
- [41] Huang Z, Elkin Z, Maloney B J, *et al.*. Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses [J]. *Vaccine*, 2005, 23: 1851-1858.
- [42] Verwoerd T C, van Paridon P A, van Ooyen A J, *et al.*. Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in transgenic tobacco leaves [J]. *Plant Physiol.*, 1995, 109 (4): 1199-1205.
- [43] Hood E, Witcher D, Maddock S, *et al.*. Commercial production of Avidin from transgenic maize; characterization of transformant, production, processing, extraction, and purification [J]. *Mol. Breeding*, 1997, 3: 291-306.
- [44] Leite A, Kemper E, da Silva M, *et al.*. Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants [J]. *Mol. Breeding*, 2000, 6: 47-53.
- [45] Chong D K, Langridge W H. Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants [J]. *Transgenic Res.*, 2000, 9(1): 71-78.
- [46] Ohya K, Matsumura T, Ohashi K, *et al.*. Expression of two subtypes of human IFN-alpha in transgenic potato plants [J]. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2001, 21(8): 595-602.
- [47] Mor T S, Sternfeld M, Soreq H, *et al.*. Expression of recombinant human acetyl cholinesterase in transgenic tomato plants [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, 75(3): 259-266.
- [48] Sawahel W A. The production of transgenic potato plants expressing human alpha-interferon using lipofectin-mediated transformation [J]. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2002, 7(1): 19-29.
- [49] Park Y, Cheong H. Expression and production of recombinant human interleukin-2 in potato plants [J]. *Protein Express Purif.*, 2002, 25(1): 160-165.
- [50] Humphrey B D, Huang N, Klasing K C. Rice expressing lactoferrin and lysozyme has antibiotic-like properties when fed to chicks [J]. *J. Nutr.*, 2002, 132(6): 1214-1218.
- [51] Kwon S Y, Choi S M, Ahn Y O, *et al.*. Enhanced stress-tolerance of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene [J]. *J. Plant. Physiol.*, 2003, 160(4): 347-353.
- [52] Yang D, Guo F, Liu B, *et al.*. Expression and localization of human lysozyme in the endosperm of transgenic rice [J]. *Planta*, 2003, 216(4): 597-603.
- [53] Suzuki Y A, Kelleher S L, Yalda D, *et al.*. Expression, characterization, and biologic activity of recombinant human lactoferrin in rice [J]. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 2003, 36(2): 190-199.
- [54] Aversani L, Falorni A, Tornielli G B, *et al.*. Improved in planta expression of the human islet auto antigen glutamic acid decarboxylase (GAD65) [J]. *Transgenic Res.*, 2003, 12(2): 203-212.
- [55] Fedosov S N, Laursen N B, Nexø E, *et al.*. Human intrinsic factor expressed in the plant *Arabidopsis thaliana* [J]. *Eur. J. Biochem.*, 2003, 270(16): 3362-3367.
- [56] Wirth S, Calamante, Mentaberry A, *et al.*. Expression of active human epidermal growth factor (hEGF) in tobacco plants by integrative and non-integrative systems [J]. *Mol. Breeding*, 2004, 13(12): 23-35.
- [57] Gao J, Hooker B S, Anderson D B, *et al.*. Expression of functional human coagulation Factor XIII A-domain in plant cell suspensions and whole plants [J]. *Protein Expr. Purif.*, 2004, 37(1): 89-96.
- [58] Panahi M, Alli Z, Cheng X, *et al.*. Recombinant protein expression plasmids optimized for industrial *E. coli* fermentation and plant systems produce biologically active human insulin-like growth factor-1 in transgenic rice and tobacco plants [J]. *Transgenic Res.*, 2004, 13(3): 245-259.
- [59] Ma S, Huang Y, Yin Z, *et al.*. Induction of oral tolerance to prevent diabetes with transgenic plants requires glutamic acid decarboxylase (GAD) and IL-4 [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101(15): 5680-5685.
- [60] Li Y, Geng Y, Song H, *et al.*. Expression of a human lactoferrin N-lobe in *Nicotiana benthamiana* with potato virus X-based agroinfection [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2004, 26(12): 953-957.
- [61] Nykiforuk C L, Boothe J G, Murray E W, *et al.*. Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds [J]. *Plant biotechnology Journal*, 2006, (4): 77-85.
- [62] Zhang H, Zhao L, Chen Y, *et al.*. Expression of human coagulation factor IX in transgenic tomato [J]. *Biotechnol Appl. Biochem.*, 2007, in press.
- [63] Clendemen S K, Lopez-Gomez R, Gomez-Lim M. *et al.*. The abundant 31-kilodalton banana pulp protein is homologous to class-III acidic chitinases [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(4): 613-619.
- [64] 柴玉荣,王天云,薛乐勋. 新型生物反应器-杜氏盐藻研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(2): 30-33.

- [65] 王玉华, 张秀海, 吴忠义, 等. 通过叶绿体基因工程在烟草中合成中长链羟基脂肪酸聚酯[J]. 科学通报, 2005, 50: 979-986.
- [66] Song D G, Wang G Q, Wang X M, *et al.*. Expression of the HBsAg gene under the control of a patatin promoter in potato (*Solanum tuberosum*) [J]. High Technology Letters, 2000, 10(2): 18-20.
- [67] Jiang X L, He Z M, Chen Q, *et al.*. Transgenic tomato plant expressing cholera toxin B protein specifically in fruit as edible vaccine [J]. Agricultural Sciences in China, 2004, 37(8): 1188-1192.
- [68] Guo H, Chen X, Zhang H, *et al.*. Characterization and activity enhancement of the phloem-specific pumpkin PP2 gene promoter [J]. Transgenic Res., 2004, 13(6): 559-566.
- [69] Schouten A, Roosien J, de Boer J M, *et al.*. Improving scFv antibody expression levels in the plant cytosol [J]. FEBS Lett., 1997, 415(2): 235-241.
- [70] Mason H S, Haq T A, Clements J D, *et al.*. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene [J]. Vaccine, 1998, 16(13): 1336-1343.
- [71] Chen Y, Zhao L, Shen G, *et al.*. Expression and analysis of thymosin alpha 1 concatemer in *Escherichia coli* [J]. Biotechnol. Appl. Biochem., 2007, in press.
- [72] 康杰芳, 王喆之. 转基因植物生产药用蛋白的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(9): 73-76.
- [73] Haq T A, Mason H S, Clements J D, *et al.*. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants [J]. Science, 1995, 268: 714-715.

【新书推介】



《农业自然资源》

刘秀珍 主编 中国农业科学技术出版社

出版日期: 2006.12

I S B N: 7-80233-007-6

定 价: 32.50 元

开 本: 大 16 开

页 数: 246 页

全书共分九章。第一章为概论,概括地阐述了自然资源与人类发展、自然资源的概念、分类、特点以及学习、研究农业自然资源的基本理论与方法。第二章至第七章为农业自然资源各论,以土地资源、农业水资源、农业气候资源、生物资源(包括种植业资源、草地资源、森林资源、中药材资源、野生动物资源)、肥料资源、废弃物资源等六大类与农业生产有关的自然资源为中心,分别对各类自然资源的基本特性、分布规律、评价原则方法和合理开发利用的途径与对策作出阐述

和分析。第八章、第九章在研究和学习六大农业自然资源的基础上,对区域农业自然资源和未来资源的开发及农业资源的可持续利用进行了论述,把农业自然资源作为一个整体,通过探索可持续发展和区域资源综合开发两大问题来带动资源的综合研究。本书适合从事农业资源、环境保护、生态和农学等科技工作者和管理人员阅读和参考,亦可作为农业大专院校的教材和参考书。