

人可溶性 TRAIL 蛋白在衣藻叶绿体中的表达

杨宗岐 李轶女 陈凤 李董 张志芳 刘彦信
郑德先 王勇* 沈桂芳

(南开大学生命科学学院, 天津 300071; 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081; 中国医学科学院中国协和医科大学基础医学院医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005. * 联系人, E-mail: wangyong@nankai.edu.cn)

摘要 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL)能选择性诱导多种肿瘤细胞凋亡而对正常细胞无毒性. 以衣藻叶绿体基因组的 *clpP-trnL-petB-chlL-rpl23-rpl2* 为同源重组片段, 壮观霉素抗性基因为选择标记, 构建了编码 TRAIL 胞外区可溶性片段(sTRAIL)的 cDNA 衣藻叶绿体表达载体 p64TRAIL, 通过基因枪将其导入衣藻叶绿体中, 经壮观霉素抗性筛选, 获得了 3 个抗性衣藻转化子. 转化子经过抗性继代筛选后, 经 PCR, Southern blot 检测分析及暗培养, 证实 sTRAIL 编码区 DNA 已整合到衣藻叶绿体基因组中, Western blot 检测分析表明, sTRAIL 编码区在衣藻叶绿体中获得了表达. Western blot 影像摄录分析表明, 表达的 sTRAIL 蛋白占衣藻细胞可溶性总蛋白的 0.43%~0.67%. 实验结果证明, 用衣藻叶绿体作为生物反应器生产医药蛋白是可行的.

关键词 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL) 衣藻叶绿体 叶绿体表达 同源重组

用植物作为生物反应器生产医药蛋白已成为生物技术研究的新领域^[1]. 在植物中表达医药蛋白具有遗传操作简单、生产成本低、无动物病毒和细菌毒素污染等优点^[1]. 近几年发展起来的植物叶绿体转化技术可使外源基因定向导入叶绿体基因组中并实现表达^[2]. 叶绿体遗传转化与传统的核转化相比具有许多优点, 如高效表达外源基因、通过同源重组定点整合方式导入外源基因从而消除了位置效应及基因沉默、能同时进行多基因表达、母系遗传方式可防止外源基因通过花粉扩散等^[2]. 因此, 叶绿体遗传转化愈来愈受到人们的重视. 利用叶绿体表达系统生产医药蛋白也取得了令人鼓舞的成果. 目前已有霍乱毒素B亚基疫苗^[3]、人生长激素^[4]、人血清白蛋白^[5]及抗菌肽^[6]等多种医用蛋白在烟草叶绿体中得到了成功表达. 最近, 衣藻叶绿体遗传转化的研究也取得了较大进展. 壮观霉素抗性蛋白(aadA)^[7]、 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)^[8]和绿色荧光蛋白(GFP)^[9]在衣藻叶绿体中的成功表达, 证明在衣藻叶绿体中表达外源蛋白是可行的. 2003年, Mayfield等人^[10]实现了疱疹病毒单克隆抗体大单链(HSV8-lsc)蛋白在衣藻叶绿体中的表达. 衣藻是单细胞植物, 素有“绿色酵母(green yeast)”之称, 其含有一个单一约占整个细胞体积的 40%的大型杯状叶绿体, 且与质膜紧贴, 使外源基因的转化和转化后的同质化过程较为容易^[11]. 因此, 衣藻叶绿体成为表达外源蛋白质的理想材料.

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand, TRAIL), 亦称Apo-2L, 是新发现的又一肿瘤坏死因子超家族成员. 人TRAIL分子为 281 个氨基酸, 属于 I 型膜蛋白, 其N末端的 15~40 氨基酸为疏水区域, 形成跨膜结构, C末端 114~281 氨基酸位于胞外, 负责与相应受体结合, 介导信号转导入细胞内, 引起细胞凋亡, 在人体多种组织和细胞中广泛表达^[12~14]. TRAIL 一个最重要的生物学特点是其选择性细胞毒作用, 即 TRAIL 仅诱导肿瘤细胞、转化细胞或病毒感染细胞凋亡, 而不能诱导正常细胞凋亡^[14]. 这一特点显示, TRAIL 是一种新的抗肿瘤药物, 在肿瘤治疗中有着潜在的广泛应用前景. 经金属蛋白酶切下的 TRAIL 胞外区C末端 114~281 氨基酸, 可形成同源三聚体结构, 为可溶性蛋白, 具有完整的膜结合型 TRAIL 的生物学活性, 也能特异性地与 TRAIL 的天然受体结合, 并激活信号传导途径, 诱导肿瘤细胞凋亡^[13,14].

本研究将编码 TRAIL 胞外区可溶性多肽(sTRAIL, 114~281 位氨基酸)的 DNA 通过基因枪转化将其导入衣藻叶绿体中, 得到了稳定遗传的转化衣藻, 并获得了 sTRAIL 蛋白的有效表达.

1 材料与方法

() 实验材料. 野生型衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii* 137CC)由 Harris 博士(Duke University, Durham)赠送. 大肠杆菌(*E. coli*)菌株 DH5 α 为本室保

存. 含有编码 TRAIL 蛋白胞外区第 114~281 位氨基酸的 0.53 kb cDNA 片段的质粒 pTRAIL(114-281) 由中国协和医科大学基础医学院郑德先教授提供. 质粒 patpX 由英国 John Innes Center 固氮实验室程奇博士惠赠, 其克隆有衣藻叶绿体 *atpA* 基因 5'端启动子、*rbcl* 基因 3'端终止子和一组多克隆位点. 质粒 p64D 由本室构建并保存, 含衣藻叶绿体特异表达的 *aadA* 表达盒及同源片段 *clpP-trnL-petB-chlL-rpl23-rpl2*, 其中缺失 *chlL* 结构基因约 1.0 kb, 并在 *chlL5'* 和 *chlL3'* 之间引入多克隆位点 *EcoR*, *BamH*, *Sac*, *Avr* 及 *Bsm*.

() 分子生物学试剂. 各种限制性内切酶、Klenow 酶、T4 DNA 连接酶、Mung bean 核酸酶和随机引物标记试剂盒等购自 Promega 公司, LA Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 生物(大连)有限公司, DNA 回收试剂盒 NucleoTrap 为 ClonTech 公司产品, PCR 引物合成和 DNA 测序由上海生工生物工程有限公司完成, 羊抗 TRAIL 多克隆抗体和碱性磷酸酶标记的兔抗羊 IgG 抗体均购于 Santa Cruz 生物技术公司.

() 衣藻叶绿体的转化及转基因衣藻的筛选. 野生型衣藻培养在 Tris-acetate-phosphate (TAP) 液体培养基中, 20~25 °C, 160 r/min, 光周期 12 h/12 h, 培养方法参见文献[15]. 取 1.5 mL 生长至对数后期(约 7 d)的衣藻于离心管中离心(5000 r/min, 20 °C, 5 min), 去上清, 留 200 μL, 重新悬浮衣藻细胞, 涂于 TAP 固体平板上, 3000 Lx 的光照条件下培养 2~3 d, 挖出均匀地长有一层衣藻的直径为 2~3 cm 的培养基块进行轰击转化. 采用美国 BioRad 公司 Model PDS1000/He Biolistic particle delivery system 转化衣藻叶绿体. 参数为: 真空度 9.48192×10^4 Pa, 轰击距离 9 cm, 氦气压力 7.584236×10^6 Pa, 金粉颗粒直径 1.0 μm.

用包裹有构建好的质粒 p64TRAIL 的金粉子弹轰击受体衣藻细胞, 在光下经过 25 °C, 8 h 过渡培养后, 将衣藻用 TAP 液体培养基冲洗下来, 涂布于 TAP 固体抗性选择培养基上(含壮观霉素 100 μg/mL), 25 °C, 3000 Lx 的连续光照条件下培养, 约 10 d, 挑取单藻落, 于 50 mL 液体选择培养基(含壮观霉素 100 μg/mL)中培养. 7 d 后将 TAP 液体选择培养基中培养的衣藻, 重新涂布于固体抗性选择培养基上培养, 如此重复多轮, 进行继代培养, 以提高外源基因在叶绿体基因组中的同质化程度.

() 叶绿体转基因衣藻 sTRAIL 编码区 DNA 的

PCR 检测. 以参照文献[16]提取的衣藻 DNA 为 PCR 扩增的模板, 以 sTRAIL 编码区 DNA 的一对特异引物 P1(5'-TCACCATGGT GAGAGAAAGAGG-3') 和 P2(5'-TTAGCCA ACTAAAAAGGCCCG-3') 对具有壮观霉素抗性的衣藻进行 PCR 检测, 筛选转基因衣藻, 同时以野生型衣藻为阴性对照, 质粒 pTRAIL (114~281) 为阳性对照. PCR 反应程序为: 94 °C, 1 min, 55 °C, 1 min, 72 °C, 1 min, 30 个循环.

() 叶绿体转基因衣藻的同质化程度及 PCR-Southern blot 分析. 为了检验外源基因是否定点整合入衣藻叶绿体基因组中及外源基因在衣藻叶绿体基因组中的同质化程度, 本研究设计了分别互补于衣藻叶绿体基因组整合位点两侧 DNA 的一对引物 P3(5'-GGTTTGCCGAACAATGT TTTTATTCCTG-3') 和 P4(5'-AGAGGAAAGTATTTAAAGCTGCTTATTC-3'), 以转基因衣藻 DNA 为模板, 用 LA Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增. 采用的 PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C, 1 min, 52 °C, 2 min, 72 °C, 4 min, 32 个循环; 72 °C 延伸 5 min. 上述鉴定同质化程度的 PCR 产物, 经 0.9% 的凝胶电泳, 采用 Bio-Rad Model 785 Vacuum blotter 系统转膜, 然后与用随机引物法标记的 0.53 kb sTRAIL 编码区 DNA 探针杂交.

() 衣藻总蛋白的提取及 Western blot 分析. 衣藻总蛋白提取参照文献[9]的方法. 取 10 mL 生长期为对数后期的衣藻培养液, 离心收集衣藻; 衣藻沉淀用 200 μL 蛋白提取缓冲液(750 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 15% 蔗糖, 100 mmol/L β-巯基乙醇, 1 mmol/L PMSF) 悬浮; 4 °C, 13000×g 离心 20 min, 上清液用于 Western blot 分析. 用 Bradford 法测定上清液中可溶性蛋白质浓度. 取 10 μg 可溶性蛋白质样品, 煮沸 5 min, 用 12% 的 SDS-PAGE 电泳分离, 然后用 BioRad 半干电泳转移仪将蛋白转移至甲醇预处理的 PVDF 膜上. 电转好后的样品膜于含有 5% 脱脂奶粉的 TBST (10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20) 中室温封闭 1 h 后, 将膜于 TBST 稀释的羊抗 TRAIL 多克隆抗体 (Santa Cruz Biothchnology, 1:500) 溶液中 4 °C 反应过夜, 用 TBST 洗膜 3 次. 将膜于 TBST 稀释的碱性磷酸酶标记的兔抗羊 IgG 抗体 (Santa Cruz Biothchnology, 1:2000) 溶液中室温轻摇 1~2 h. 最后用 ECL Western Blotting 检测试剂盒 (Amersham Biosciences) 进行信号检测. 参照文献[17], 用 Image Master VDS 影像摄录分析仪

(Pharmacia Biotech)对Western blot进行定量分析.

() 叶绿体转基因衣藻的表型分析. 将转基因衣藻和野生型衣藻分别涂于 TAP 固体培养基平板上, 用锡箔纸包好, 置于 25 °C 培养箱内, 10 d 后观察表型变化.

2 结果与分析

2.1 衣藻叶绿体表达载体的构建

构建过程如图 1. 将质粒 patpX 用 *Nco* 酶切, 用 Mung bean 核酸酶削平该位点以去除起始密码子 ATG, 连接后得到质粒 patpY; 将质粒 pTRAIL (114~281) 用 *Bam*H 和 *Hind* III 双酶切, 切出含有编码 TRAIL 胞外区可溶性片段(sTRAIL)的 DNA 部分即 sTRAIL 编码区, 然后用 Klenow 大片段酶补平 *Hind* III 位点. 电泳纯化并回收 0.53 kb 的 DNA 片段, 将其克隆于质粒 patpY 的 *Bam*H 和 *Xba* I (补平)位点之间, 使 sTRAIL 编码区置于衣藻叶绿体基因特异启动子 *atpA*5'和终止子 *rbcL*3'调控之下, 得到质粒 patpY-TRAIL; 再用 *Eco*R 和 *Not* I 双酶切, 并补平 *Not* I 位点, 回收含有 sTRAIL 编码区表达盒的 1.2 kb DNA 片段, 将其克隆入含有 *aadA* 表达盒和同源重组片段 *clpP-trnL-petB-chlL-rpl23-rpl2* 的 p64D 质粒 *Eco*R 位点, 构建成编码人 TRAIL 胞外区可溶性片段(sTRAIL)的 cDNA 衣藻叶绿体表达载体 p64TRAIL.

2.2 抗性转基因衣藻的获得及 PCR 分析

用包裹有质粒 p64TRAIL 的金粉子弹轰击野生型衣藻受体细胞, 过渡培养后, 将衣藻用 TAP 液体培养基冲洗下来, 涂布于 TAP 固体抗性选择培养基上 (含壮观霉素 100 mg/L). 在连续光照条件下培养,

7~10 d 后平板上出现绿色的单藻落, 而空载金粉轰击的野生型衣藻细胞, 在 TAP 固体抗性选择培养基 (含壮观霉素 100 μg/mL)上则完全白化死亡. 本实验共轰击 10 枪, 得到 6 个抗性单藻落. 这些绿色单藻落能在二次继代筛选的抗性选择培养基中正常生长, 这初步表明 sTRAIL 编码区和 *aadA* 基因可能通过同源重组整合到衣藻叶绿体基因组中.

为了证明具有壮观霉素抗性的绿色藻落叶体基因组中含有外源 sTRAIL 编码区, 以壮观霉素抗性衣藻 DNA 为模板, 用 sTRAIL 编码区 DNA 的一对特异引物 P1 和 P2 对其进行 PCR 扩增检测, 同时以质粒 p64TRAIL 为阳性对照. PCR 结果表明, 有 3 个壮观霉素抗性衣藻能扩增出 0.53 kb 的 DNA 片段, 大小基本和阳性对照一致, 而其他的抗性衣藻和野生型衣藻, 则没有扩增出相应的片段, 结果如图 2 所示.

2.3 转基因衣藻同质化程度的 PCR 扩增分析

尽管衣藻细胞内只含有一个叶绿体, 但是这个叶绿体却含有 80~100 个叶绿体基因组拷贝, 因此同时转化这么多基因组是不可能的. 在叶绿体转化的初期, 只有少数叶绿体基因组拷贝整合了外源DNA, 所以最初的叶绿体转化细胞是一种异质体(heteroplasmic), 含有野生型和转化型两种叶绿体基因组拷贝, 因此需要对转化后的衣藻进行多轮壮观霉素继代筛选, 以进一步提高转化叶绿体基因组的同质化程度^[18].

对上述 3 个衣藻转化子经过 6 轮 (在含有壮观霉素的 TAP 液体和固体培养基上各继代一次为一轮)继代抗性培养. 为了检验 sTRAIL 编码区是否定点整合入衣藻叶绿体基因组同源位点(*chlL* 基因内)及其在叶

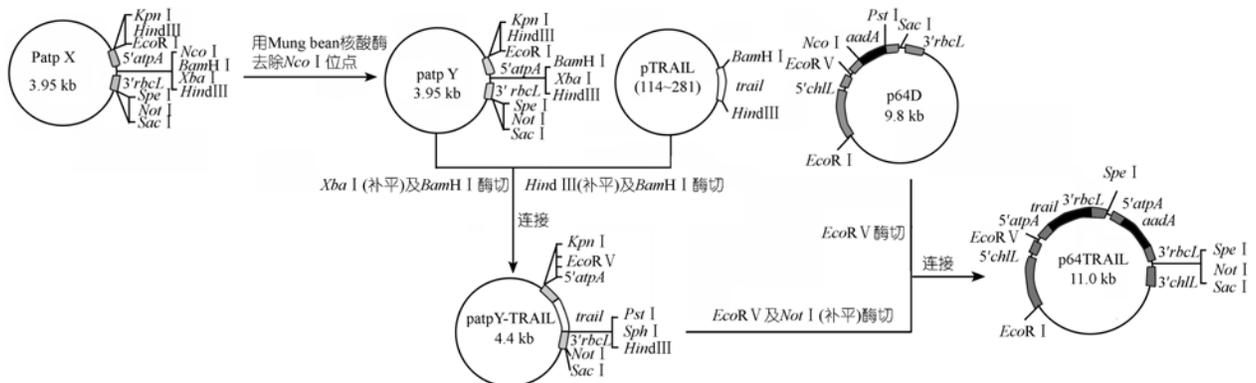


图 1 衣藻叶绿体转化质粒 p64TRAIL 构建示意图

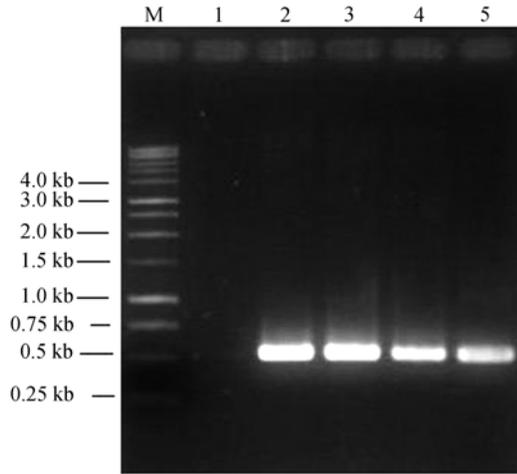


图 2 叶绿体转基因衣藻 sTRAIL 编码区 DNA 的 PCR 分析 M, DNA 分子量标准(Promega); 1, 野生型衣藻; 2, 阳性对照; 3-4, 叶绿体转基因衣藻

叶绿体基因组中的同质化程度, 以转 sTRAIL 编码区衣藻和野生型衣藻 DNA 为模板, 以分别互补于衣藻叶绿体基因组基因 *chlL5'* 下游、*chlL3'* 上游的一对引物 P3 和 P4 为引物, 进行 PCR 产物扩增分析(图 3(a)和 (b)). 当以野生型衣藻 DNA 为模板, 用上述同源片段引物进行 PCR 扩增时, 应扩增出一条 1.0 kb 的条带. 完全同质化的叶绿体转 sTRAIL 编码区衣藻, 应只扩增出一条 3.6 kb 的 DNA 条带. 扩增结果如图 3(c) 显示, 转 sTRAIL 编码区衣藻经过 6 轮壮观霉素筛选后, PCR 扩增产物中已没有 1.0 kb 的条带, 3.6 kb 的条带非常清晰, 而野生型衣藻则仅扩增出 1.0 kb 的条带, 说明经过 6 轮抗性继代培养的衣藻叶绿体转化子中, 转基因叶绿体基因组拷贝已完全取代了野生型叶绿体基因组, 衣藻叶绿体转化子已达到完全同质化.

2.4 叶绿体转 sTRAIL 编码区衣藻的 PCR-Southern blot 检测

为了进一步确定外源 sTRAIL 编码区 DNA 整合到衣藻叶绿体基因组中, 本研究以 0.53 kb sTRAIL 编码区 DNA 为探针, 与上述鉴定同质化程度的 PCR 产物进行杂交, 同时以 0.53 kb sTRAIL 编码区为阳性对照(图 4). Southern blot 分析结果表明, 衣藻叶绿体转化子均能杂交出一条 3.6 kb 的条带, 而野生型衣藻没有出现杂交条带, 证明了 PCR 扩增出的 3.6 kb 条带含有外源目的 sTRAIL 编码区片段, 同时也证明了外源 sTRAIL 编码区确实整合到衣藻叶绿体基因组中.

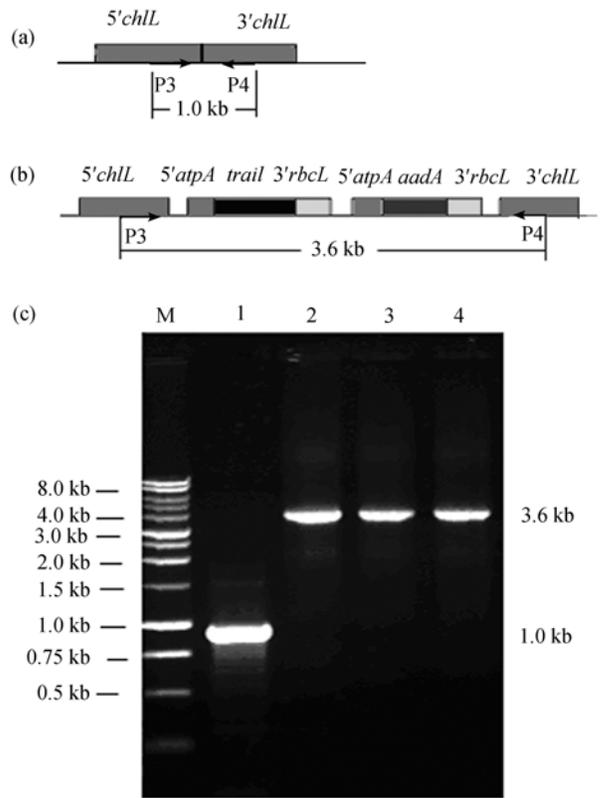


图 3 叶绿体转 sTRAIL 编码区衣藻的同质化程度 PCR 分析 (a) 野生型衣藻叶绿体基因组同源位点结构示意图; (b) 转 sTRAIL 编码区衣藻叶绿体同源位点结构示意图; (c) PCR 产物电泳分析. M, DNA 分子量标准(Promega); 1, 野生型衣藻; 2-4, 衣藻叶绿体转化子

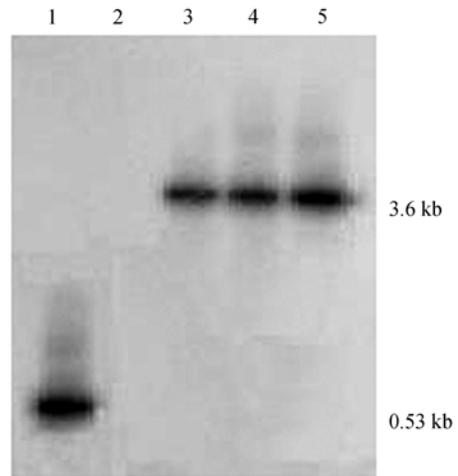


图 4 以 sTRAIL 编码区为探针的 PCR-Southern 杂交 1, 阳性对照, 0.53 kb sTRAIL 编码区片段; 2, 野生型衣藻; 3-5, 衣藻叶绿体转化子

2.5 转 sTRAIL 编码区衣藻的表型分析

野生型衣藻与其他一些植物不同, 能在黑暗中

成光非依赖性叶绿素(light-independent chlorophyll)而呈现绿色,这是因为野生型衣藻能在黑暗条件下产生光非依赖性的原叶绿素酸酯还原酶(light-independent protochlorophyllide reductase),它由*chlL*, *chlN*, *chlB*三种基因编码,这些基因的产物是黑暗条件下叶绿素生物合成所必需的,其中任一基因的缺失,将导致衣藻在黑暗中生长时呈现黄绿色^[19,20]. 本研究所构建的衣藻叶绿体转化载体中的sTRAIL编码区和*aadA*基因,通过同源重组取代了野生型衣藻*chlL*结构基因约1.0 kb的片段,使之不能在黑暗中合成光非依赖性叶绿素而呈现黄绿色.

将野生型衣藻和转 sTRAIL 编码区衣藻在 TAP 固体培养基上划线暗培养 10 d 后,显示出转 sTRAIL 编码区衣藻为黄绿色,而野生型藻为绿色,说明转基因衣藻的叶绿体 *chlL* 结构基因的 1.0 kb DNA 片段已被外源基因所取代(图 5(a)和(b)).

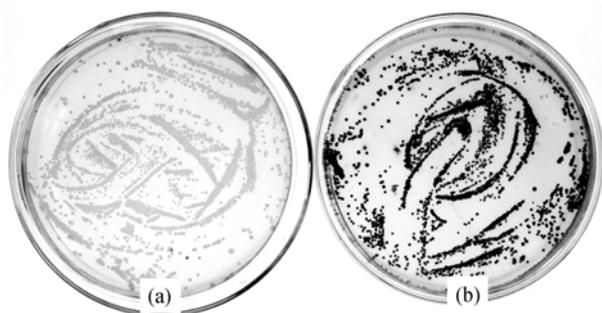


图5 暗培养转 sTRAIL 编码区衣藻表型分析
(a) 叶绿体转 sTRAIL 编码区衣藻; (b) 野生型衣藻

2.6 Western blot 分析

为了证明 sTRAIL 编码区在衣藻叶绿体中获得了表达,提取叶绿体转基因衣藻总蛋白,用羊抗 TRAIL 多克隆抗体(Santa Cruz)和碱性磷酸酶标记的兔抗羊 IgG 抗体(Santa Cruz)进行免疫印迹. 在 3 个转基因衣藻中都检测到了与正对照标准 sTRAIL 蛋白电泳迁移率相同的特异蛋白条带,表明 sTRAIL 编码区表达产物的分子量大小与标准 TRAIL 蛋白的分子量相同,约为 18.5 kD,而在野生型衣藻的相应位置没有出现任何可见条带(图 6),说明 sTRAIL 蛋白在转 sTRAIL 编码区衣藻的叶绿体中得到了表达. 用 Pharmacia Biotech 公司的 Image Master VDS 影像摄录分析仪对 Western blot 进行定量分析,结果显示, sTRAIL 编码区的表达产物占衣藻细胞可溶性蛋白的 0.43%~

0.67% (1 mg 衣藻细胞可溶性蛋白约含 4.3~6.7 μ g 人 sTRAIL 蛋白).

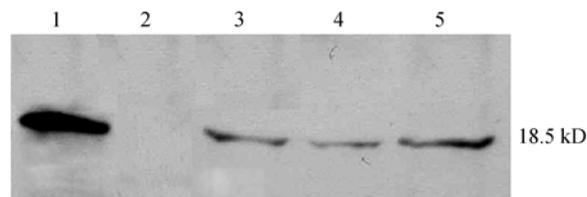


图6 叶绿体转 sTRAIL 编码区衣藻的 Western 检测
1, 正对照, 标准 sTRAIL 蛋白; 2, 负对照, 野生型衣藻; 3~5, 叶绿体转 sTRAIL 编码区衣藻

3 讨论

用衣藻作为生物反应器表达医药蛋白具有以下优点: () 生长速度快, 繁殖周期短; () 其叶绿体和核基因组都可以稳定遗传转化, 为在衣藻中表达多种外源蛋白质提供了可能性; () 大多数衣藻基因启动子受光和营养因子的调控, 有利于外源基因表达的调控; () 能进行光能自养和光能异养, 可以在黑暗条件下以乙酸盐为惟一的碳源生长; () 易进行规模化生产, 且生产成本低. 这些优点使衣藻可能成为高效表达医药蛋白的理想场所和有效途径^[10,21].

目前的研究表明, 人 TRAIL 蛋白的可溶性部分具有与 TRAIL 相近的诱导多种肿瘤细胞凋亡的功效, 在抗肿瘤药物的开发方面具有较好的应用前景^[14]. 因此本文首次报道了该部分可溶性 TRAIL 蛋白, 即 sTRAIL 在衣藻叶绿体中的表达研究结果. 通过构建含有 sTRAIL 编码区的衣藻叶绿体转化载体(图 1), 进行有效的衣藻叶绿体转化、抗性筛选、PCR 检测(图 2)和同质化分析(图 3 和 4), 证明 sTRAIL 编码区已整合进衣藻叶绿体基因组中, 并能稳定遗传, 同时导致衣藻在暗培养条件下不能有效合成叶绿素, 产生黄绿色的藻落表型(图 5). Western blot 分析结果表明, sTRAIL 蛋白在转 sTRAIL 编码区的转化衣藻细胞中得到了成功表达(图 6), 其表达量占衣藻细胞可溶性总蛋白的 0.43%~0.67%. 这是继疱疹病毒单克隆抗体大单链(HSV8-lsc)蛋白之后在衣藻叶绿体中表达的又一种重要医药蛋白质, 无疑是此研究领域中的一个重要进展.

据报道, 在衣藻叶绿体中表达的外源蛋白的表

达水平都很低^[21,22]。在衣藻叶绿体中表达外源蛋白质的早期研究主要是报告基因和抗性基因的表达。β-葡萄糖苷酸酶(GUS)^[8]和海肾荧光素蛋白酶(*Renilla luciferase*)^[23]报告蛋白在衣藻叶绿体中的表达水平在高的内源蛋白背景下几乎检测不到;根据衣藻叶绿体基因组密码子的偏爱性修饰合成的绿色荧光蛋白基因 *gfp* (GFP)^[9]和疱疹病毒单克隆抗体大单链(HSV8-lsc)蛋白基因^[10]在衣藻叶绿体中的表达量都仅占衣藻细胞可溶性总蛋白的 0.5%。衣藻叶绿体基因组的AT含量高达 66.3%,其密码子第三位核苷酸 80%为A或T。Mayfield等人^[21,22]认为,衣藻叶绿体基因组密码子的偏爱性可能是导致外源基因在衣藻叶绿体中表达量低的原因之一。也有学者认为,选择合适的强启动子和终止调节序列也是影响外源基因在衣藻叶绿体中表达量高低的关键因素^[21,22]。本研究选用衣藻叶绿体基因来源的特异启动子 *5'atpA* 和终止调节序列 *3'rbcl* 调控sTRAIL编码区正确的转录和翻译,保证了外源基因的有效表达。因此,对sTRAIL编码区进行衣藻叶绿体密码子偏爱性的改造,以及研究外源蛋白在叶绿体中的积累机制可能是将来进一步研究的重点。

致谢 本工作作为国家自然科学基金(批准号: 30571189)和天津市科委基金(批准号: 033605111)资助项目。

参 考 文 献

- 1 Fischer R, Stoger E, Schillberg S, et al. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7(2): 152—158 [\[DOI\]](#)
- 2 Daniell H, Chebolu S, Kumar S, et al. Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. *Vaccine*, 2005, 23 (15): 1779—1783 [\[DOI\]](#)
- 3 Daniell H, Lee S B, Panchal T, et al. Expression of cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol*, 2001, 311(5): 1001—1009 [\[DOI\]](#)
- 4 Staub J M, Garcia B, Graves J, et al. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(3): 333—338 [\[DOI\]](#)
- 5 Fernandez-SanMillan A, Mingo-Castel A, Miller M, et al. A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnol J*, 2003, 1(2): 71—79 [\[DOI\]](#)
- 6 DeGray G, Rajasekaran K, Smith F, et al. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiol*, 2001, 127(3): 852—862 [\[DOI\]](#)
- 7 Goldschmidt-Clermont M. Transgenic expression of aminoglyco-

- side adenine transferase in the chloroplast: A selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(15): 4083—4089
- 8 Ishikura K, Takaoka Y, Kato K, et al. Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *J Biosci Bioeng*, 1999, 87(3): 307—314 [\[DOI\]](#)
- 9 Franklin S, Ngo B, Efuert E, et al. Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant J*, 2002, 30(6): 733—744 [\[DOI\]](#)
- 10 Mayfield S P, Franklin S E, Lerner R A. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(2): 438—442 [\[DOI\]](#)
- 11 Kindle K L, Richards K L, Stem D B. Engineering the chloroplast genome: Techniques and capabilities for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(5): 1721—1725 [\[DOI\]](#)
- 12 Wiley S R, Schooley K, Smolak P J, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995, 3(6): 673—682 [\[DOI\]](#)
- 13 Pitti R M, Marsters S A, Ruppert S, et al. Induction of apoptosis by Apo22 ligand, a new member of the Tumor Necrosis Factor cytokine family. *J Biol Chem*, 1996, 271(22): 12687—12690 [\[DOI\]](#)
- 14 Gura T. How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science*, 1997, 277(5327): 768—772 [\[DOI\]](#)
- 15 Harris E. The *Chlamydomonas* Sourcebook, A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. San Diego: Academic Press, 1989. 31
- 16 Rochemaix J D, Mayfield S, Goldschmidt-Clermont M, et al. Molecular biology of *Chlamydomonas*. In: Shaw C H, ed. *Plant Molecular Biology: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press, 1988. 253—275
- 17 Tregoning J S, Nixon P, Kuroda H, et al. Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(4): 1174—1179 [\[DOI\]](#)
- 18 Bock R. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol*, 2001, 312(3): 425—438 [\[DOI\]](#)
- 19 Suzuki J Y, Bauer C E. Light-independent chlorophyll biosynthesis: Involvement of the chloroplast gene *chlL* (*frxC*). *Plant Cell*, 1992, 4(8): 929—940 [\[DOI\]](#)
- 20 Ford C, Wang W. Three new yellow mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet*, 1980, 179(2): 259—263 [\[DOI\]](#)
- 21 Mayfield S P, Franklin S E. Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae. *Vaccine*, 2005, 23(15): 1828—1832 [\[DOI\]](#)
- 22 Franklin S E, Mayfield S P. Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7(2): 159—165 [\[DOI\]](#)
- 23 Minko I, Holloway S P, Nikaido S, et al. *Renilla luciferase* as a vital reporter for chloroplast gene expression in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet*, 1999, 262(3): 421—425 [\[DOI\]](#)

(2006-02-24 收稿, 2006-05-17 接受)