



新生物学丛书

植物分子药田： 现状与展望

MOLECULAR FARMING IN PLANTS:
RECENT ADVANCES AND FUTURE PROSPECTS

〔加〕 Aiming Wang Shengwu Ma 主编

安胜军 王志军 付君秋 曲继广 殷殿书 译



科学出版社

新生物学丛书

植物分子药田：现状与展望

Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects

[加] Aiming Wang Shengwu Ma 主编

安胜军 王志军 付君秋 曲继广 殷殿书 译

科学出版社

北 京

图字：01-2016-2807 号

内 容 简 介

本书简明扼要地评述了植物分子药田这门生命科学新兴学科的学科原理、最新研究方法、学科发展瓶颈及学科发展前景等。具体来讲，本书分别讨论了植物分子药田目前的总体研究状况和未来展望，利用稳定的转基因植物进行治疗方面的相关问题，包括细胞悬浮培养、叶绿体、瞬时表达和病毒载体等，用来生产蛋白质的植物叶片及其富有潜力的叶片替代品—植物种子和藻类等，植物提取药用蛋白和工业蛋白，作为分子药田基本环节的下游处理和公众安全顾虑的消除等。

本书集权威性、时代性、前瞻性、系统性为一体。特别适合相关学科的学生、教师和研究者作为教学、科研材料来使用。对植物分子药田和植物生物技术感兴趣的广大读者而言，这也是极具价值的阅读材料。

Translation from English language edition:
Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects
edited by Aiming Wang and Shengwu Ma
Copyright © Springer Science+Business Media Dordrecht 2012
All Rights Reserved

图书在版编目（CIP）数据

植物分子药田：现状与展望/（加）王爱明、（加）马生武主编；安胜军等译. —北京：科学出版社，2016

（新生物学丛书）

书名原书：Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects
ISBN 978-7-03-049075-9

I. ①植… II. ①王… ②马… ③安… III. ①转基因植物—应用—生物工程—医学工程 IV. ①R319

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 142890 号

责任编辑：王 静 岳漫宇 / 责任校对：刘亚琦
责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科 学 出 版 社 出版

北京东黄城根北街 16 号
邮政编码：100717
<http://www.sciencep.com>

北京京华虎彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 6 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2016 年 6 月第一次印刷 印张：17

字数：397 000

定价：98.00 元

（如有印装质量问题，我社负责调换）

《新生物学丛书》专家委员会

主 任：蒲慕明

副 主 任：吴家睿

专家委员会成员 (按姓氏汉语拼音排序)

昌增益	陈洛南	陈晔光	邓兴旺	高 福
韩忠朝	贺福初	黄大昉	蒋华良	金 力
康 乐	李家洋	林其谁	马克平	孟安明
裴 钢	饶 毅	饶子和	施一公	舒红兵
王 琛	王梅祥	王小宁	吴仲义	徐安龙
许智宏	薛红卫	詹启敏	张先恩	赵国屏
赵立平	钟 扬	周 琪	周忠和	朱 祯

作者简介

Aiming Wang (王爱明) 博士 (国籍: 加拿大)

王爱明博士于 1999 年获得英属哥伦比亚大学植物分子生物学和病毒学博士学位。随后的四年中, 在加拿大国家研究院植物生物技术研究所以从事植物基因组学和生物技术的研究, 专注于小麦基因组学方面的研究。2003 年, 在位于加拿大安大略省伦敦市的加拿大农业部南方作物保护和食品研究中心做高级研究员。同年, 被任命为西安大略大学生物系兼职教授。王爱明博士的研究方向为植物生物技术、分子病毒-植物互作关系、开发新型抗病毒策略, 以及分子药田领域中植物病毒的潜在应用。

Shengwu Ma (马生武) 博士 (国籍: 加拿大)

马生武博士在天津南开大学获得微生物学和免疫学硕士学位之后, 于 1988 年在加拿大卡尔顿大学获得细菌遗传学和植物分子生物学博士学位。之后, 作为博士后在加拿大农业部伦敦中心接受植物-微生物互作关系方面的研究训练。目前, 马生武博士不仅是罗森健康研究所的高级研究员及西安大略大学生物系和医学系的兼职教授, 而且是专门从事医用转基因植物培育的 Plantigen 公司的创始人之一。在植物分子药田方面, 马博士怀有浓厚的研究兴趣。一直以来, 在利用转基因植物表达和传递重组自身抗原, 从而通过口服免疫耐受诱导来治疗自身免疫性 1 型糖尿病的研究方面, 他都是领军人物。在重要科学杂志发表多篇论文, 目前任多家国际科技杂志编辑委员会委员。

编著者名单

Adil Ahmad Southern Crop Protection and Food Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 1391 Sandford St., London, ON N5V 4T3, Canada

Didier Breyer Biosafety and Biotechnology Unit, Scientific Institute of Public Health, Rue J. Wytsmanstraat 14, B-1050 Brussels, Belgium

Henry Daniell Department of Molecular Biology and Microbiology, College of Medicine, University of Central Florida, 336 Biomolecular Science Building, Orlando, FL 32816, USA

Adinda De Schrijver Biosafety and Biotechnology Unit, Scientific Institute of Public Health, Rue J. Wytsmanstraat 14, B-1050 Brussels, Belgium

Rainer Fischer Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, Forckenbeckstrasse 6, 52074 Aachen, Germany RWTH, Worringerweg 1, 52074 Aachen, Germany

Martine Goossens Biosafety and Biotechnology Unit, Scientific Institute of Public Health, Rue J. Wytsmanstraat 14, B-1050 Brussels, Belgium

Christoph Griesbeck Department of Engineering, Environmental and Biotechnology, MCI-Management Center Innsbruck-University of Applied Sciences, Egger-Lienz-Str. 120, 6020 Innsbruck, Austria

Philippe Herman Biosafety and Biotechnology Unit, Scientific Institute of Public Health, Rue J. Wytsmanstraat 14, B-1050 Brussels, Belgium

Elizabeth E. Hood Arkansas Biosciences Institute, Arkansas State University, P.O. Box 639, State University, Jonesboro, AR 72467, USA

Ting-Kuo Huang Department of Chemical Engineering and Materials Science, University of California-Davis, 1031B Kemper Hall, 1 Shields Avenue, Davis, CA 95616, USA

Anthony M. Jevnikar Transplantation Immunology Group, Lawson Health Research Institute, London, ON N6A 4G5, Canada

Jussi Joensuu VTT Technical Research Centre of Finland, Espoo, Finland

Allison R. Kermode Department of Biological Sciences, Simon Fraser University, 8888 University Drive, Burnaby, BC V5A 1S6, Canada

Anna Kirchmayr Department of Engineering, Environmental and Biotechnology, MCI-Management Center Innsbruck-University of Applied Sciences, Egger-Lienz-Str. 120, 6020 Innsbruck, Austria

Shengwu Ma Transplantation Immunology Group, Lawson Health Research Institute, London, ON N6A 4G5, Canada Department of Biology, University of Western Ontario, London, ON N6A 5B7, Canada

Karen A. McDonald Department of Chemical Engineering and Materials Science, University of California – Davis, 1031B Kemper Hall, 1 Shields Avenue, Davis, CA 95616, USA

Rima Menassa Southern Crop Protection and Food Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 1391 Sandford St., London, ON N5V 4T3, Canada

James S. New Department of Molecular Biology and Microbiology, College of Medicine, University of Central Florida, 336 Biomolecular Science Building, Orlando, FL 32816, USA

Zivko L. Nikolov Biological & Agricultural Engineering, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA

Katia Pauwels Biosafety and Biotechnology Unit, Scientific Institute of Public Health, Rue J. Wytsmanstraat 14, B-1050 Brussels, Belgium

Deborah Vicuna Requesens Arkansas Biosciences Institute, Arkansas State University, P.O. Box 639, State University, Jonesboro, AR 72467, USA

Stefan Schillberg Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, Forckenbeckstrasse 6, 52074 Aachen Germany

Richard M. Twyman Department of Biological Sciences, University of Warwick, Coventry CV4 7AL, UK

Aiming Wang Southern Crop Protection and Food Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 1391 Sandford St., London, ON N5V 4T3, Canada

Donevan Westerveld Department of Molecular Biology and Microbiology, College of Medicine, University of Central Florida, 336 Biomolecular Science Building, Orlando, FL 32816, USA

Lisa R. Wilken Biological & Agricultural Engineering, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA

从 书 序

当前，一场新的生物学革命正在展开。为此，美国国家科学院研究理事会于 2009 年发布了一份战略研究报告，提出一个“新生物学”（New Biology）时代即将来临。这个“新生物学”，一方面是生物学内部各种分支学科的重组与融合，另一方面是化学、物理、信息科学、材料科学等众多非生命学科与生物学的紧密交叉与整合。

在这样一个全球生命科学发展变革的时代，我国的生命科学研究也正在高速发展，并进入了一个充满机遇和挑战的黄金期。在这个时期，将会产生许多具有影响力、推动力的科研成果。因此，有必要通过系统性集成和出版相关主题的国内外优秀图书，为后人留下一笔宝贵的“新生物学”时代精神财富。

科学出版社联合国内一批有志于推进生命科学发展的专家与学者，联合打造了一个 21 世纪中国生命科学的传播平台——《新生物学丛书》。希望通过这套丛书的出版，记录生命科学的进步，传递对生物技术发展的梦想。

《新生物学丛书》下设三个子系列：科学风向标，着重收集科学发展战略和态势分析报告，为科学管理者和科研人员展示科学的最新动向；科学百家园，重点收录国内外专家与学者的科研专著，为专业工作者提供新思想和新方法；科学新视窗，主要发表高级科普著作，为不同领域的研究人员和科学爱好者普及生命科学的前沿知识。

如果说科学出版社是一个“支点”，这套丛书就像一根“杠杆”，那么读者就能够借助这根“杠杆”成为撬动“地球”的人。编委会相信，不同类型的读者都能够从这套丛书中得到新的知识信息，获得思考与启迪。

《新生物学丛书》专家委员会

主 任：蒲慕明

副主任：吴家睿

2012 年 3 月

译 者 的 话

植物分子药田是生物制药和生物农业及基因工程技术结合形成的新兴交叉学科。它以植物体和植物细胞作为生物制药的宿主，替代目前生物制药所用的细菌、病毒、酵母和动物细胞生产药用蛋白、疫苗亚单位、工业酶和其他的目标化合物。由于它成本低、产出高、易于规模化生产、安全性高等独有优势，愈来愈受到业内人士的重视。该书由加拿大植物研究科学家 Aiming Wang 博士和植物分子生物学研究科学家 Shengwu Ma 博士，以及其他 20 余位该领域的专家共同编写。翻译该书的目的是为了扩大本书的阅读范围，让更多的人了解该领域的发展状况和前景，以期有更多感兴趣的人士涉入该领域的研究和开发，为植物分子药田的研究和应用做出贡献。

此书的翻译工作持续了近一年的时间。我们不敢奢求尽善尽美，但我们努力做到尽心尽力。因为这是一门新兴学科，一些英文表达找不到准确的汉语对应词，特别是一些专业词语，所以我们在查阅大量资料的同时，也拜访和请教了一些业内专家，讨论之后最终明确其含义。尽管如此也可能有不尽如人意之处，敬请读者批评、指正。

感谢石家庄四药有限公司及河北省大容量注射剂工程技术研究中心为本书的出版给予的大力支持。

感谢河北化工医药职业技术学院，河北省高校生物反应器与蛋白类药物开发应用技术研发中心的邵铁梅、温昕、焦展、刘培和李雪，河北化工医药职业技术学院的李银娟、董雷老师，石家庄经济学院马媛媛博士。他们对书中的技术内容发表了自己的意见，为本书的翻译贡献了力量。

科学出版社的岳漫宇编辑，在此书出版过程中提供了帮助，她的热心、耐心和细心令我们十分感动，同她合作，令人非常愉快！

安胜军 王志军 付君秋 曲继广 殷殿书

2015 年 10 月 6 日

译者综述

植物生物反应器中提高重组蛋白 表达和纯化水平的策略

安胜军

转基因植物作为生物反应器（也称植物分子药田），利用植物的遗传转化能力在植物中表达药用蛋白、工业酶和其他次生代谢产物等已经成为生命科学领域中的一门新兴学科。该学科涵盖外源基因的插入、表达及对宿主植物的遗传修饰，也包括植物的生长、收获、运输、贮藏及下游的提取和纯化等（Xu et al., 2012; Horn, 2012; Paul and Ma, 2011; Lau and Sun, 2009）。1983 年，Bevan 首次证实了该技术的可行性。随后，研究者分别于 1986 年和 1989 年在植物中生产了重组人生长激素和重组抗体——免疫球蛋白 β 和 γ 链（Barta et al., 1986; Hiatt et al., 1989）。但是直到 1997 年，Elizabeth 等才以商业化为目的在玉米中表达重组抗生物素蛋白（avidin）。她的实验证实了植物不仅具有作为生物工厂生产重组蛋白的巨大潜力，而且能够生产具有复杂功能和医疗作用的哺乳动物蛋白（Boothe et al., 2010）。

转基因植物生物反应器与其他生物反应器相比具有成本低、产率高、易扩大生产和安全性好等优势。特别是植物具有完成蛋白质翻译后修饰的功能。这能够使重组蛋白准确折叠，从而维持其结构和功能的完整性和稳定性。目前，全球有近 120 家公司、大学和科研机构在该领域进行研究和开发（Basaran and Rodríguez-Cerezo, 2008; Fuchs et al., 2013）。如今，它作为一门独特的技术，已经克服现有生物制药生产技术的局限，取得了其学术研究和产业发展的重要地位，并快速发展，发挥出了强大的经济驱动力和社会影响力（Rybicki, 2009）。目前，大多数转基因植物生产的产品还处于开发和临床试验阶段，仅部分产品实现了商业化（Stoger, 2012）。Prodi Gene 曾是首家利用转基因植物反应器生产重组蛋白并使产品商业化的公司，但由于美国环境保护人士认为其影响生态环境而被迫停产。 β -葡萄糖醛酸酶（ β -glucuronidase, Gus）是第一个商业化的产品，其他商业化的产品还有：人治疗蛋白抑肽酶（aprotinin）、治疗脂类异常吸收的哺乳动物脂酶（lipase）、抗生物素蛋白、重组人乳铁蛋白（human lactoferrin, hLF）和重组人溶菌酶（lysozyme）等。值得一提的是，我国也已经成功研发出植物生物反应器产品，如重组人血清白蛋白（OsrHSA）、重组人抗胰蛋白酶（OsrAAT）、重组人酸性成纤维细胞生长因子（OsrFGF）、单克隆抗体等（He et al., 2011; An et al., 2013; Zhang et al., 2012; Yang et al., 2003; Xie et al., 2008）。实验证明，植物生产重组蛋白的成本是微生物生产系统的 2%~10%，而与哺乳动物生产系统相比，其成本则可降低 1000 倍。这充分显示了植物生产系统与现有其他生产系统比较的绝对优势。因此，该产业正在吸引更多资金的投入，同时其生产的蛋白类药物也逐渐被人们接受（Rybicki, 2010）。转基因植物生物反应器生产重组蛋白虽然有其巨大的优势，但也存在着一些问题和技術难关，包括：如何提高转录水平，如何提高重组蛋白的积累和稳定性，如何解决蛋白质在动物、植物中糖基化修饰的不同，如何选择适宜的宿主植物，以及下游分离和纯化的相关问题等。

安胜军课题组主要是在植物双元表达载体 pBI121 的限制性内切酶酶切位点 *Hind* III 和 *Sac* I 之间, 插入以油菜油体蛋白 (oleosin) 基因启动子驱动的花生油体蛋白基因-人胰岛素基因组成的融合蛋白表达盒, 并将植物表达载体 pBINOI 转化油葵和芝麻构建植物生物反应器, 目前该工作已取得了一定进展。本综述根据最新的研究进展和成果, 着重从优化启动子的转录过程、翻译过程、重组蛋白的翻译后修饰、蛋白质的靶向定位、外源基因插入的位点和拷贝数、下游的纯化策略、宿主植物的选择和重组分子产品等几个方面进行阐述和归纳, 进而提出提高外源基因表达水平, 提高重组蛋白积累水平、稳定性及活性的策略, 并对目前面临的问题和挑战进行分析。

1 优化转录过程

启动子对优化转录过程起着关键的作用。因此, 如何使启动子发挥高水平的有效转录活性受到了人们的广泛关注。对不同功能启动子的结构片段及其相关调节因子的分析、设计和研究为提高转录水平提供了切实可行的理论和方法。依据功能和作用的不同, 本综述从以下几个方面对启动子及其相关作用因子进行论述: 组成型启动子、组织特异性启动子、诱导型启动子、人工启动子和启动子相关作用因子。

1.1 组成型启动子

组成型启动子驱动外源基因的表达不受植物体内生理环境和发育特征的影响, 在植物体内各部位的组织器官和细胞内都可以启动外源基因的表达和外源蛋白的合成, 无选择性。花椰菜花叶病毒 35S 启动子 (CaMV35S) 和泛素启动子 (ubiquitin, Ubi) 是两个作用强而有效的组成型启动子, 被广泛应用于不同植物中表达多种外源重组蛋白。在调控的质量和数量方面, 花椰菜花叶病毒 35S 启动子对双子叶植物比单子叶植物更能发挥其优势作用。目前, 使用花椰菜花叶病毒 35S 启动子表达和生产的重组蛋白有三类。①抗原蛋白类: 霍乱毒素 B 亚单位 (CTB)、大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 (LTB)、乙肝表面抗原蛋白 (HBsAg)、保护性抗原 (protective antigen)、狂犬病毒糖蛋白 G (rabies virus glycoprotein G)、SARS 冠状病毒糖蛋白 S (SARS virus glycoprotein S)。②治疗和诊断蛋白类: 单克隆抗体、SMAP-29 肽 (SMAP-29 peptide)、抗生蛋白链菌素 (strept-avidin)、抗生物素蛋白和脂联素 (adiponectin)。③工业用蜘蛛丝 (spider silk) (Li et al., 2006) 等。泛素启动子 Ubi-1 已经在玉米、拟南芥、马铃薯、向日葵、烟草和水稻中被克隆并被广泛应用。其在植物中表达的重组蛋白包括: 霍乱毒素 B 亚单位、大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位、乙肝表面抗原蛋白、人干扰素 (human interferon, hIFN)、抗生物素蛋白和抑肽酶等。

在转基因水稻中分别用增强型启动子花椰菜花叶病毒 35S 启动子和泛素 Ubi 启动子表达单链抗体可变区基因片段 (single-chain antibody variable fragment, scFv) T84.66 重组抗体时, 发现两个启动子的功能和启动强度基本相同。但是在花椰菜花叶病毒 35S 启动子作用下水稻种子中没有发现该抗体的表达 (Stöger et al., 2000)。Hernandez-Garcia 等 (2009) 从大豆中克隆并鉴定了一种多泛素 (polyubiquitin) 启动子, 并验证了该启动

子的高效启动功能和通用性。其他一些常用的组成型启动子还有：甘露碱合成酶（mannopine synthase, MAS）基因启动子、烟草潜在组成型启动子（tobacco cryptic constitutive promoter）、水稻肌动蛋白启动子（rice actin promoter）、香蕉肌动蛋白启动子（banana actin promoter）、木尔坦棉花曲叶病毒 C1 启动子（C1 promoter of cotton leaf curl Multan virus）、木薯脉花叶病毒启动子（cassava vein mosaic virus promoter）和由甘露碱合成酶基因启动子与花椰菜花叶病毒 35S 启动子增强区杂合而成的 Mac 启动子。

1.2 组织特异性启动子

该类启动子控制基因只在植物体内特异的组织或器官（如种子、果实、叶片等）中表达，或者在组织或器官的特定发育阶段中表达，而且可以避免由于重组蛋白的积累而对植物生长发育产生的负面影响，对提高重组蛋白的生产效率具有重要意义。组织特异性启动子已经成功地应用于外源蛋白分子在转基因植物特定组织或器官中的靶向表达。目前，已经被克隆的植物种子特异性启动子有：阿尔瑟兰启动子（Arcelin promoter）、玉米醇溶蛋白基因启动子（maize zein promoter）、7S 球蛋白启动子（7S globulin promoter）、水稻谷蛋白启动子（GluB-1）和大豆 β -伴球蛋白 α 亚基启动子（soybean β -conglycinin α -subunit promoter）。这些启动子已经被用于表达重组蛋白，如霍乱毒素 B 亚单位、胰岛素原（pro-insulin）、漆酶（laccase）、人 T-细胞抗原决定簇（human T-cell epitopes）、人胎盘酸性 β -葡萄糖苷酶（human placental acid beta-glucosidase）、前维生素 A（provitamin A）、乳铁蛋白和植酸酶（phytase）等（Lau and Sun, 2009）。其中，阿尔瑟兰启动子是一个能高水平转录外源 DNA 的强启动子。在菜豆阿尔瑟兰启动子（Arcelin 5-1）驱动下，单链抗体可变区基因片段的表达量可达种子总蛋白的 36%（De Jaeger et al., 2002）。Ventria Bioscience 公司利用种子特异性表达系统作为技术平台，在玉米和水稻的种子中生产了乳铁蛋白和溶菌酶，并成功地投入了市场。近年来培育成功的“黄金稻米”（Ye et al., 2000）、“高铁米”（Goto et al., 1999）和“芝麻营养米”（Lee et al., 2005）等都使用了水稻自身来源的谷蛋白 GluB-1 等胚乳特异性高效表达启动子。

研究者利用特异性马铃薯块茎贮藏蛋白（patatin）基因启动子在马铃薯块茎中靶向表达大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位、霍乱毒素 B 亚单位、乙肝表面抗原蛋白、葡聚糖（dextran）和交替蔗糖酶（alternansucrase）等重组蛋白（He et al., 2007; Kok-Jacon et al., 2007）。同时，他们还利用植物果实可直接食用而无需后处理的特点在植物的果实中靶向表达可食用疫苗。Jiang 等（2007）研究组已经从西红柿中获得果实特异性 E8 启动子（fruit-specific E8 promoter），并在植物果实中成功地表达了疫苗。

油体蛋白是种子中的一种高度疏水的碱性小分子质量蛋白质，镶嵌在油体（oil body）表面。外源基因插入油体蛋白的 N 端和 C 端，所构成的融合蛋白并未改变油体蛋白的特性。利用油体亲脂疏水的特性可将融合蛋白与细胞内的其他组分分开，这为下游外源蛋白的分离和纯化提供了极大的便利（Moloney et al., 2010）。因此，油体蛋白启动子的作用不容忽视。其中一些具有代表性的启动子已经被克隆和鉴定，例如，菜豆蛋白基因启动子（phaseolin promoter）、拟南芥油体蛋白基因启动子（*Arabidopsis* oleosin promoter）、醇溶性蛋白启动子和油菜种子特异性贮藏蛋白基因启动子（cruciferin）等（Slightom et al.,

1983)。值得一提的是,菜豆蛋白基因启动子是第一个被报道的种子特异性启动子。到目前为止,它也是转基因植物中驱动油体蛋白表达的最强启动子之一。SemBiosys 公司利用油体表达技术成功地表达了胰岛素、阿朴脂蛋白 AI、水蛭素、 γ -亚麻酸、动物疫苗和保健食用油等 (Nykiforuk et al., 2006, 2011, 2012), 并且该公司已在英国完成了胰岛素的临床试验。

Ruhlman 等已经利用两种叶绿体特异性启动子: 16S 核糖体 RNA 启动子 (the 16S ribosomal RNA promoter, Pr_{rrn}) 和 *psbA* 基因启动子 (*psbA* gene promoter), 成功靶向表达了外源基因, 如大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位、霍乱毒素 B 亚单位、保护抗原和胰岛素等 (Ruhlman et al., 2007)。Chlorohgen 公司开发了叶绿体转化技术 (chloroplast transformation technology, CTT)TM, 最早在烟草叶绿体中表达外源重组蛋白。现在该公司已经生产出一系列的产品, 如霍乱疫苗、干扰素、胰岛素等。之后, 陶氏益农公司获得了该技术的绝对使用权。此外, 一种新型叶片特异性 *rbcS* 基因启动子 (*rbcS* gene promoter) 也被应用于在植物叶片中靶向表达天花亚单位疫苗 (smallpox subunit vaccine)、E1 内切葡聚糖酶 (E1 endoglucanase) 和木聚糖酶 (xylanase) (Golovkin et al., 2007)。另一种水稻愈伤特异性启动子 (callus-specific promoter, CSP) 可在水稻种子中驱动外源基因表达, 并使重组蛋白高水平积累 (Wakasa et al., 2009)。

1.3 诱导型启动子

植物诱导型启动子包括化学诱导型、物理诱导型和生物诱导型 3 种。本部分主要介绍化学诱导型启动子。该类启动子的转录活性会受到某些化学因素的影响。这些化学因素主要有乙醇、水杨酸和四环素, 其次是类固醇、蜕化素、雌性激素和糖皮质激素等。

外源蛋白在植物中的表达会干扰宿主植物的生长和发育, 甚至可以阻断其再生。组织器官特异性启动子仅在一定程度上能够消除因外源分子表达而导致的宿主植物生长发育过程中的一些致死问题 (Corrado and Karali, 2009)。化学诱导型启动子在对宿主植物的保护和促进目的基因表达方面则具有较大的优势: ①诱导子对启动子具有高特异性, 诱导时快速响应, 去除时快速关闭, 对植物无毒性作用, 使用方便; ②能够进一步限定目的基因在特异器官或组织中的表达位置, 甚至是在特定的细胞类型中; ③能够在转基因植物特殊的发育阶段和特殊的时间范围内调节基因的表达。诱导系统包括两个转录单位: 第一个转录单位使用一个启动子表达一个化学应答的转录因子, 第二个转录单位由多拷贝转录因子结合位点组成, 并连接到表达靶基因的启动子上。第一个转录单位所使用的启动子可以是组成型启动子, 也可以是特异性启动子 (Corrado and Karali, 2009)。

现在, 水稻 α 淀粉酶 3 基因 (*α Amy3*) 蔗糖饥饿诱导型启动子 (sucrose starvation-inducible promoter) 已经被用于转基因水稻细胞的悬浮培养表达人干扰素 γ 、人 α -抗胰蛋白酶、人生长激素和人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (hGM-CSF)。在转基因烟草中表达人生长激素和人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子时, 与使用组成型启动子表达该产品相比, 前者的产率显著高于后者 (Chen et al., 2004; Kim et al., 2008)。

1.4 人工启动子

真核细胞的启动子基本结构由 DNA 片段（包括 TATA 盒）、转录起始位点和 CCAAT 序列构成。此外，还有一组在序列上相反的片段用于上调或者下调启动子的活性。在核心启动子的上游加入顺式作用元件，包括增强子、激活子和抑制子等，构建了人工启动子（artificial promoter）。

Gurr 等已经证实启动子的驱动力量依赖于 motif 拷贝数和空间位置（Gurr and Rushton, 2005）。Sharma 等（2008）为了增强花椰菜花叶病毒 35S 启动子的强度，在原有序列的基础上将增强子片段的拷贝数增加了两倍，从而使其驱动力量明显增强，并使重组蛋白分子的表达水平有所提高。通过将 MAC 启动子的部分序列和花椰菜花叶病毒 35S 启动子的增强子区域结合而成的杂交 MAC 启动子与增加了两倍增强子序列的花椰菜花叶病毒 35S 启动子相比，前者能够将 β -葡萄糖醛酸酶在叶片中的表达水平提高 3~5 倍，在下胚轴和根部的表达水平提高 10~15 倍。该启动子也被用于转基因紫花苜蓿（alfalfa）、马铃薯和烟草，并成功表达了褐色高温单孢菌（*Thermomonospora fusca*）来源的热稳定纤维素酶 E2 和 E3。Pogrebnyak 研究发现，通过将章鱼碱合成酶（octopine synthase, OCS）和甘露碱合成酶（MAS）基因启动子的调节序列相结合，3 倍重复章鱼碱合成酶、甘露碱合成酶激活子片段和甘露碱合成酶启动子序列，可以构建 3AmasPmas（Aocs）超启动子。3AmasPmas 超启动子已经成功地在转基因西红柿和烟草中表达了 SARS 冠状病毒 S 蛋白（Pogrebnyak et al., 2005）。

双向启动子（bidirectional promoter）是一种重要的人工启动子。1984 年，Velten 首次从根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）的 Ti 质粒中分离出植物双向启动子片段，并证明能在两个方向上启动编码新霉素磷酸转移酶（neomycinphosphotransferase, nptII）基因的表达。之后，双向启动子的结构首次被人工合成，并能够在上游和下游两个方向同时转录基因。Xie 等（2001）利用合成双向启动子的策略在植物科学领域成功地构建了重组拟南芥双向启动子，并用于表达报道基因 β -葡萄糖醛酸酶和新霉素磷酸转移酶基因。Sammarco 等成功构建了四环素诱导的双向启动子系统，并证明双向启动子系统能够同时快速共诱导两个分离的报道基因（Sammarco and Grabczyk, 2005）。研究证明，花椰菜花叶病毒 35S 启动子被修饰后也可以具有相同强度的双向表达能力，同时被成功用于在烟草中表达报道蛋白（Zhang et al., 2008）。以上由多顺式调节 DNA 片段组成的人工双向启动子具有转录起始的功能和同时在两个方向上激活转录的功能。最近，通过融合花椰菜花叶病毒 35S 启动子到 *grp1.8* 或者 4Cl1 启动子的 5'端而构建的双向启动子的研究，为研究人工启动子顺式、反式调节机制开辟了新途径（Lv et al., 2009）。

1.5 启动子相关作用因子——反式作用因子

在植物中优化和提高外源基因的表达水平，反式作用因子也是关键因素之一。反式作用因子既可以直接与启动子结合，也可以与其他因子相互作用共同促进基因的表达。研究者将人溶菌酶基因和转录因子（rice endosperm bZIP, REB）同时转入水稻。在水稻

球蛋白启动子 (rice globulin promoter) 的作用下, 由于转录因子 REB 的存在, 显著增加了人溶菌酶基因的表达水平 (Venter, 2007)。在原核环境下, 转录因子被转化到植物细胞的胞质体中, 能够靶向增加胞质体内外源基因的表达水平。植物细胞核基因组表达的 T7 RNA 聚合酶已经被发现能够提高外源基因在胞质体内的表达水平。对于外源基因在植物中的表达, 转录激活系统越来越受到重视。使用病毒载体提供诱导子, 将病毒介导的转录激活系统应用于糖尿病相关自身免疫抗原 IA-2ic 和 anti-tetanus 抗体 9F12 表达的研究表明, 它紧紧地控制着转录过程 (Hull et al., 2005)。

2 优化翻译过程

2.1 起始密码子的位置及其相关的结构序列

大多数真核细胞 mRNA 的翻译起始依赖于 5'帽子结构 (5'-cap), 并涉及 5'非翻译区 (5'-URT) 核糖体扫描 (ribosomal scanning)。研究表明, 上游可读框 (ORF) 的数量增加具有关键的翻译调节特性。在最佳的优化序列中, 第一个 ATG 起始密码子是绝对的翻译起始位点, 尽管第二个起始密码子序列在其下游仅有几个密码子之隔, 并与其具有相同的结构序列。起始密码子周围的序列对翻译起始也具有重要作用, 其中已被证明的 AACAAUGGC、UAAACAAUGGCU、GCCAUGGCG 在植物基因中是常用的序列。植物基因 mRNA 的-3 和+4 位置是高度保守的。嘌呤在-3 位置, GC 在+4、+5 位置是最保守的碱基位置。多数高表达的植物基因丙氨酸直接与 N 端的甲硫氨酸相连接。公认的高表达植物基因序列 GCT、TCC、TCC 被用于报道基因起始密码子之后, 在烟草中它以指数方式极大地提高了报道基因及每个连续编码的插入序列的表达, 同时把报道蛋白的稳定性提高了近 2 倍。包含有 Met-Ala-Ser-Ser-Gus 的序列结构, β -葡萄糖醛酸酶的活性可增加 30~40 倍 (Sawant et al., 2001)。植物偏爱的翻译起始及其相关结构序列已经用于烟草中表达霍乱毒素 B 亚单位。作为天然植物蛋白泛素片段的 C 端融合蛋白显著提高了霍乱毒素 B 亚单位基因的表达水平 (Ashraf et al., 2005)。植物偏爱的翻译起始及其相关的核酸结构序列 ACC、ACA, 在 ATG 之前, 也已经被证明能够提高和优化基因的表达水平 (Sharma et al., 2008)。

2.2 5'非翻译区对基因表达的调控

5'非翻译区对翻译起始和翻译的有效性起着关键的作用。在大多数真核细胞中, 5'非翻译区和其前导序列联合调控翻译起始, 而且在此过程中其他一些调控因子也已经被广泛证实。帽子结构的前导序列能够提高外源基因的翻译水平。在水稻中多泛素基因 *RUB13* 启动子中使用其 5'非翻译区序列大大提高了 β -葡萄糖醛酸酶基因 mRNA 及翻译水平 (Samadder et al., 2008), 进一步表明了 5'非翻译区在基因表达上的重要性。Wang 等于 2008 年证实, 苜蓿花叶病毒 mRNA 4 (alfalfa mosaic virus mRNA 4)、烟草蚀纹病毒 (tobacco etch virus) 和烟草花叶病毒的翻译前导序列均能提高转录翻译的有效性, 成倍地增加外源基因的表达水平 (Wang et al., 2008)。

2.3 3'非翻译区对基因表达的调控

3'非翻译区(3'-UTR)对基因的表达调控起着重要作用。它不仅直接影响真核生物中多腺苷酸化过程,而且控制着 mRNA 的稳定性和降解速度。从植物中获得的异源 3'非翻译区已经被用于维持重组蛋白的转录和稳定性(Huang et al., 2005)。3'非翻译区中存在一些导致 mRNA 快速降解的 A/U 富集序列片段。Haffani 等(2000)研究发现,*cry3Ca1* 基因编码区 AAUAAA 序列可导致 poly(A)早熟,从而使基因表达量降低。因此,在表达结构设计上,应避免 3'非翻译区的 A/U 富集序列片段及 AT 分子的连续延伸,或者将 3'非翻译区的 A/U 富集序列作为一个插入位点移去或修饰,以保证转录的稳定性。修饰后的 poly(A)序列片段已经在植物中用于优化表达重组蛋白,并且可以显著提高 mRNA 的表达和蛋白质的积累(Mishra et al., 2006)。

2.4 编码区内序列的影响

在编码区中任何一个二级结构的存在都会增加 40S 核糖体起始复合物(40S ribosome-initiation complex)的识别时间,从而使其识别过程减慢。识别时间延长的关键在于编码区域中二级结构的位置。此外,靠近编码序列起始的发卡结构也因位置不同而显示出识别时间不同程度地延长。当在 AUG 和茎环结构(stem-loop)之间有 14 个核苷酸的间隙时,识别时间增加最长。在植物转基因工程应用过程中,这一点必须加以注意。鉴于在进化过程中遗传密码在第 3 位置上的替换,以及因进化而发生的种属特异性密码子的不平衡性,根据宿主植物的不同优化外源基因编码序列对提高重组蛋白表达水平的作用是不容忽视的。

稀有密码子(rare codon)的存在可以形成二级结构,能够减慢或终止核糖体在结构区中的移动。密码子的使用频率和与之匹配的 tRNA 存在着密切的联系。如果所有的 tRNA 被捕获,那么,在蛋白复合物上,一串稀有密码子可以完全阻断翻译过程。通过删除这些负面信号,可以显著增加外源基因在植物中的表达(Kang et al., 2004)。在烟草中用频繁使用的密码子代替稀有密码子,使 GC 含量从 35%增加到 45%。之后,使用优化后的密码子序列合成霍乱毒素 B 亚单位基因,经优化后的基因在花椰菜花叶病毒 35S 启动子的作用下,其表达效率比修饰前增加了 15 倍(Kang et al., 2006)。通过优化密码子的结构,其他一些重组蛋白在植物中的表达和合成也得以实现(Oszvald et al., 2007)。

另外,一些涉及后转录过程和直接影响基因表达水平的序列也在编码区中被发现和鉴定。编码免疫球蛋白 A 基因在烟草中表达时,大部分重组杂合的免疫球蛋白 A/G 分泌到质外体(apoplast)中,部分运输到液泡(vacuole)内,但后者由于液泡细胞溶素的作用而降解。Vitale 等通过转基因删除,分析、识别和鉴定了一个 motif 植物细胞液泡分选信号,并证明在植物中该信号可以存在于 N 端、C 端或者前肽(prepeptide)的中间区域。虽然类似的序列已被鉴定,但目前还没有能够代表液泡分选信号的通用序列(Vitale and Hinz, 2005)。因此,为了避免重组蛋白被运输到液泡而降解,必须通过基因删除、突变对其进行识别和鉴定。

有报道指出，内含子序列的存在对基因的表达有促进作用。内含子位置的不同会导致作用的不均衡。随着内含子与启动子之间距离的增加，其刺激作用逐渐减小 (Fiume et al., 2004)。当其存在于 5' 非翻译区时可以完全失去刺激能力。玉米 *shrunk-1* 基因的内含子-1 插入报道基因 5' 端可使报道蛋白的活性增加 100 倍 (Rose, 2002)。内含子在 5' 非翻译区的分布不是随机的，它的定位似乎更接近于 ATG。Chung 等 (2006) 使用拟南芥 *EF12A3* 基因 5' 非翻译区发现报道基因表达增加了 10 倍。内含子删除分析显示，至少有 3 个内含子片段分布在 5' 非翻译区时才能增加对基因表达的调控作用。一般认为，内含子插入到接近启动子的位置能增加 mRNA 的聚集和翻译水平，但 Rose (2004) 的研究结果表明，5' 非翻译区的存在增加了 mRNA 的聚集，但不能提高报道酶的活性，所以人们认为内含子增加转录和翻译可能是两种不同的机制。

2.5 基因表达的一致性

一般来讲，表达特定重组蛋白的同一基因，在相同的环境中，外源基因的表达水平有时也是不一致的。影响因素可能有：插入位置的不同，外源基因的拷贝数和基因沉默等 (Rybicki, 2009; Fischer et al., 2008)。可是，在表达载体设计上插入一些功能片段，可以获得相同的表达水平。研究认为，核的基质附着区 (matrix attachment region, MAR) 能够调节基因表达。通过募集转录因子到启动子从而达到提高转录活性的目的。另外，AT 富集的片段可以通过形成染色质环而降低位置不同带来的负面影响，并能维持外源基因表达到下一代。基于核基质附着区的天然序列特征，研究者已经合成了人工构建的核基质附着区，同时在不同种属植物中分析和测试了它对启动子的作用特性。一些目的基因，如聚羟基脂肪酸酯 (polyhydroxyalkanoate, PHA)、真氧产碱杆菌 (*Ralstonia eutropha*) 来源的 *bKtB*、*phbB*、*phbC* 基因和 *E.coli* 来源的 *tdcB* 基因的两侧被连接了烟草 RB7 核基质附着区 (RB7 matrix attachment region)，并被转入油棕 (oil palm) 中 (Dennis et al., 2005)，同时编码植酸酶基因的两侧连接 RB7 核基质附着区，并被转入烟草和蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 中。结果显示，外源基因的表达水平获得显著提高 (Abranches et al., 2005)。另外，通过同源重组，将外源基因靶向导入质体，插入叶绿体功能区的研究也获得了成功，同时也消除了位置影响，并且在质体中没有表现出基因沉默现象 (Cardi et al., 2010)。

为提高单拷贝外源基因的表达水平，可以使用特殊的遗传片段。在过去 20 年的研究中，研究者已经发现了一些直接影响外源基因表达的遗传片段。它们分布在 5' 或 3' 端的调控区、编码区及其周围区域。对拟南芥的研究证明，为得到高频率单拷贝数 T-DNA 转化系，使用表达 cAMP 应答片段 (cAMP response element, CRE) 可实现 70% 的单拷贝序列，且表达水平稳定 (De Paepe et al., 2009)。此外，植物人工染色体作为一个独立的平台为外源基因稳定表达提供了优化的环境。人工染色体介导转化基因不干扰宿主植物的基因，并消除了外源基因进入宿主植物基因组的非活性区。克隆拟南芥的着丝点对稳定可遗传的植物人工染色体的构建意义重大。使用端粒介导的染色体替换技术 (telomere-mediated chromosomal truncation) 构建的微型染色体 (mini chromosomal) 携带特异性重组位点并可以加入新的位点 (Yu et al., 2007)。微型染色体与愈伤组织共培养一年后可