

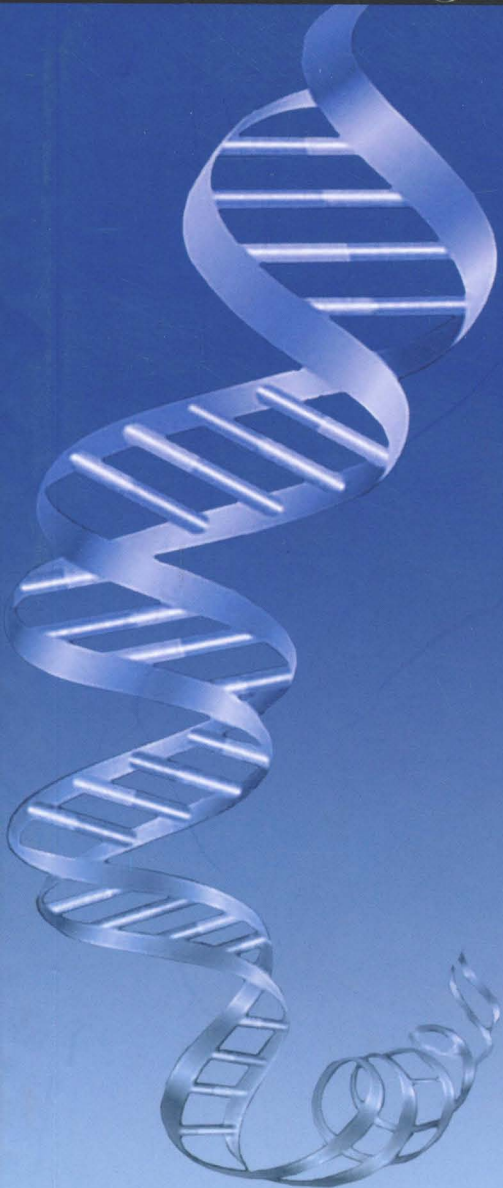
# 转基因植物


Transgenic Plant Bio-reactors



## 生物反应器

周鹏 主编



 中国农业出版社



# 转基因植物生物反应器

周 鹏 主编

中国农业出版社

主 编 周 鹏（中国热带农业科学院）

副 主 编 沈文涛（中国热带农业科学院）

参编作者 魏军亚（中国热带农业科学院）

王冬梅（广西南宁市农业局）

王冬梅（中国热带农业科学院）

代正福（中国热带农业科学院）

符 碧（海南师范大学）

崔百明（石河子大学）

杨英军（河南科技大学）

# 序

随着分子生物学的飞速发展和植物基因工程技术的不断完善，转基因作物的开发应用取得了举世瞩目的成就。转基因作物的全球种植面积由1996年的170万 $\text{hm}^2$ 猛增至2005年的9000万 $\text{hm}^2$ 以上。研发中的一个重要分支是利用转基因植物作为生物反应器来生产外源蛋白，形象地称为“分子农业（molecular farming）”，已成为当今国际研究的热点和生物技术产业发展的新增长点，具有极大的市场前景和商业价值。

第一代转基因植物中转入的性状是抗除草剂、抗虫、抗病等农艺性状，使作物具有抗生物和非生物逆境的特性，也称为“输入性状”。其得益的是农民和研发者，或由于减少农药使用而使环境得到改善，广大消费者并未直接从中得到好处。正在研发和即将推出的第二代转基因作物是转入改善品质、提高营养价值等的基因，或者是有医药和工业用途的基因，即所谓“输出性状”。由于具有特殊功能，或由于生产成本降低，销售价格下降，使广大消费者可在保健和经济上直接从中受益，因而将进一步促进转基因作物的商业化进程。

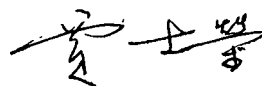
利用转基因植物，包括细胞、组织器官或整株，来生产具有高附加价值的生物制品，包括疫苗、抗体、医用蛋白、工业用蛋白和次生代谢产物等，将使传统的农业产业与医药和工业产业相融合，对国民经济的可持续发展、对农业产业结构的调整和改造、对提高农副产品的附加值、对满足广大消费者的需求等，都将起重要作用。

迄今已知的外源蛋白表达系统，包括原核表达系统和真核表达系统，各有其优缺点，适于表达的蛋白也不尽相同，没有一种方法是万能的。利用植物作为生物反应器来生产目的蛋白，尤其是利用种子或油体表达体系来生产外源蛋白，其优点是可以大规模生产，成本相对较低，种子易保存和运输，可部分利用原有的加工设备。但也存在不少技术问题需要解决，如：如何开发新的基因表达元件，如何设计和构建表达载体以进一步提高表达量，如何降低分离纯

化成本，如何对某些需要糖基化或酰胺化后才有生物学活性的蛋白进行基因操作等，都是面临的关键技术问题。

本书对转基因植物生物反应器的原理和最新研究进展进行了综述，并对其商业化前景作了展望。作者均为在科研一线从事转基因植物及相关研究的专家和科研工作者，积累了相当丰富的经验。本书的特点是将理论与实用技术相结合，可作为分子生物学等相关专业研究生的教材，也可作为从事本领域及相关领域研究的科技工作者的参考书。相信本书的出版将对促进我国转基因植物生物反应器的教学和研究发挥积极的作用。

中国农业科学院生物技术研究所



2006年9月于北京

# 前 言

目前全世界转基因植物已获得了超额利润，每年达 40 亿美元。根据国际农业生物技术应用服务机构的统计和预测，全球范围内，1998 年转基因农作物的销售额为 12 亿~15 亿美元，2000 年达到 30 亿美元，2005 年可达 80 亿美元，2010 年将达到 250 亿美元，农业生物技术产品在农业总产值中的比例将越来越大。转基因植物的研究与应用，不仅是社会发展的要求，而且产生的经济、社会和环境效益是不可估量的。近 10 多年来，转基因植物又有一个重要的发展方向，它就是转基因植物生物反应器的研究和应用。

转基因植物生物反应器是指通过基因工程途径、利用植物细胞、组织器官以及整株植物为工厂来生产具有高经济附加值的医用蛋白（包括疫苗、抗体、药用蛋白等）、工农业用酶、特殊碳水化合物、生物可降解塑料、脂类及其他一些次生代谢产物等生物制剂的生产体系，故又称“分子农业（molecular-farming）”。但从广义上讲，不仅仅指经基因工程改造的植物细胞、组织器官以及整株植物，也包括天然的植物，例如一些天然植物的次生代谢产物也具有重要的药用价值。随着新功能基因的分离、克隆以及各种农作物高效表达技术平台的逐步建立，将会有相当数量的高新生物技术产品不断涌现。这种“分子农业”的出现及普及将会对全球现有的农作物种植结构产生巨大影响。目前，已用于生物反应器的植物有烟草、拟南芥、大豆、小麦、水稻、玉米、油菜、马铃薯、番茄、番木瓜、香蕉、苜蓿和柱花草等。

尽管转基因植物生物反应器仍存在一些问题尚待解决，但丝毫不影响其研究及产品开发的前景，更何况这些问题大多可望在不长时间内得到解决。利用植物表达系统已成功地表达了多种具有生理活性的外源多肽，而且有些已经进行了人体和动物的试验，其前景是可观的。尤其是利用转基因植物生物反应器研制动物可饲疫苗的研究应该先行一步。今后应该将重点放在胃、肠道传染病研究上。因为从技术上容易获得突破，从实际应用上价值也最大。而其他非胃、肠道传染病也可作探索性研究。从已报的结果分析，有的病毒性传染病（如

FMD), 获得成功的可能性很大。新世纪之初, “人类基因组测序计划” 已宣布提前完成, 人类社会已进入一个崭新的后基因组时代。可以预测, 更多人类疾病的发病机理不久将被研究清楚, 随之有更多的新药尤其新的蛋白药物将被开发利用。这些蛋白药物大多可能是更加复杂的蛋白质, 需要更高等的真核细胞生产体系来生产, 转基因植物生物反应器毫无疑问将成为生产这些贵重蛋白药物的主导表达体系之一。因此, 利用植物生物反应器将成为蛋白质和多肽的最具潜力的生产系统, 为人类健康做出巨大的贡献。

介于转基因植物生物反应器是当今全球性的研究热点和已取得的丰硕研究成果, 及目前还未有专门出版以“转基因植物生物反应器”命名的书籍, 故编著该书, 以飨读者。本书分九章, 着重介绍目前转基因植物生物反应器已用于生产重要的药用蛋白, 如抗体、血液替代品和疫苗, 并通过大规模生产许多种具有高经济附加值的高新生物技术产品, 包括工农业用酶、特殊碳水化合物(如改性淀粉、环糊精或糖醇)、生物可降解塑料、脂类(如特殊的饱和或不饱和脂肪酸)及其他一些次生代谢产物等生物制剂。本书分别对上述最新的研究成果进行了综述和总结, 并对这一领域的研究进展以及商业化前景作了展望。

由于水平有限, 书中不足之处, 敬请读者批评指正。特别声明, 本书涉及的插图绝大部分来自互联网, 由于转载缘故, 未能查明和注明引用来源, 敬请原版作者谅解。

编 者

2006年9月于海口



# 目 录

序  
前言

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 第一章 转基因植物生物反应器 .....        | 1  |
| 第一节 转基因植物的产生及其应用 .....      | 1  |
| 一、转基因植物的概念 .....            | 1  |
| 二、转基因植物的研究和应用概况 .....       | 2  |
| 三、转基因植物的应用领域 .....          | 5  |
| 四、转基因植物的经济、社会和环境效益 .....    | 7  |
| 第二节 转基因植物生物反应器基本原理 .....    | 8  |
| 一、转基因植物生物反应器的概念 .....       | 8  |
| 二、国内外研究概况 .....             | 9  |
| 三、发展趋势 .....                | 12 |
| 第三节 转基因生物反应器的应用前景 .....     | 14 |
| 一、应用范围 .....                | 14 |
| 二、存在问题及解决策略 .....           | 18 |
| 三、展望 .....                  | 19 |
| 参考文献 .....                  | 19 |
| 第二章 转基因植物生物反应器的技术方法 .....   | 20 |
| 第一节 转基因植物生物反应器的构建元件 .....   | 20 |
| 一、功能基因的选择及优化重组 .....        | 20 |
| 二、植物表达载体 .....              | 21 |
| 三、用于转基因的农杆菌菌株 .....         | 44 |
| 第二节 转基因植物生物反应器的构建技术 .....   | 45 |
| 一、植物基因转化受体系统 .....          | 45 |
| 二、植物转基因技术方法 .....           | 48 |
| 三、转基因植物中外源基因的遗传规律 .....     | 55 |
| 四、转基因植物鉴定方法 .....           | 56 |
| 五、植物生物反应器的产物活性分析技术 .....    | 58 |
| 第三节 转基因植物生物反应器的产品利用技术 ..... | 60 |
| 一、转基因植物的直接利用 .....          | 60 |
| 二、表达产物的分离纯化 .....           | 61 |

|                                |            |
|--------------------------------|------------|
| 三、表达产物二次加工 .....               | 61         |
| 参考文献 .....                     | 61         |
| <b>第三章 转基因植物疫苗 .....</b>       | <b>63</b>  |
| 第一节 概述 .....                   | 63         |
| 一、植物疫苗的优点 .....                | 63         |
| 二、植物疫苗的可行性 .....               | 64         |
| 三、植物疫苗表达系统 .....               | 65         |
| 四、植物疫苗接种使用途径 .....             | 65         |
| 第二节 植物口服疫苗黏膜免疫机理 .....         | 65         |
| 一、黏膜免疫系统的组成 .....              | 66         |
| 二、黏膜免疫的应答机理 .....              | 67         |
| 第三节 与人类相关的植物疫苗 .....           | 70         |
| 一、人类病毒植物疫苗 .....               | 70         |
| 二、人细菌植物疫苗 .....                | 84         |
| 三、植物黏膜免疫佐剂 .....               | 90         |
| 四、癌症相关植物疫苗 .....               | 91         |
| 五、免疫耐受植物疫苗 .....               | 93         |
| 第四节 与动物相关的植物疫苗 .....           | 94         |
| 一、口蹄疫病毒植物疫苗 .....              | 94         |
| 二、猪病毒性腹泻植物疫苗 .....             | 96         |
| 三、新城疫病毒植物疫苗 .....              | 98         |
| 四、犬细小病毒植物疫苗 .....              | 99         |
| 五、牛轮状病毒植物疫苗 .....              | 100        |
| 六、兔出血症植物疫苗 .....               | 100        |
| 七、动物其他病毒植物疫苗 .....             | 101        |
| 第五节 植物疫苗研究存在的问题 .....          | 102        |
| 参考文献 .....                     | 103        |
| <b>第四章 转基因植物生产蛋白质和多肽 .....</b> | <b>113</b> |
| 第一节 国内外在该领域的研究现状及发展趋势 .....    | 113        |
| 第二节 生产蛋白质和多肽的方法 .....          | 114        |
| 一、农杆菌等介导的核转化系统 .....           | 114        |
| 二、植物农杆菌渗透及病毒瞬时高效表达系统 .....     | 114        |
| 三、植物叶绿体高效表达系统 .....            | 116        |
| 四、植物细胞悬浮培养系统 .....             | 117        |
| 第三节 蛋白质和多肽生产的受体种类 .....        | 117        |
| 一、叶片类作物 .....                  | 117        |

|                        |            |
|------------------------|------------|
| 二、谷物或豆科作物的种子           | 118        |
| 三、水果和蔬菜                | 118        |
| 四、纤维和油料作物              | 118        |
| 五、其他形式的表达受体            | 118        |
| 第四节 应用研究               | 119        |
| 一、抗体及其片段               | 119        |
| 二、细胞因子                 | 122        |
| 三、转基因植物生产其他医用蛋白和生物活性肽  | 124        |
| 四、工业酶                  | 127        |
| 第五节 存在的问题与对策           | 129        |
| 一、多基因的协同表达             | 129        |
| 二、转基因沉默                | 130        |
| 三、提高表达量                | 130        |
| 四、翻译后的准确修饰             | 134        |
| 五、消除转基因对环境潜在的污染        | 137        |
| 六、降低下游的分离、纯化的成本        | 137        |
| 七、小结                   | 138        |
| 参考文献                   | 138        |
| <b>第五章 转基因植物生产糖类物质</b> | <b>141</b> |
| 第一节 生产糖类物质的基本原理        | 141        |
| 第二节 转基因植物生产糖类物质的进展     | 143        |
| 一、转基因植物生产蔗糖            | 143        |
| 二、转基因植物生产海藻糖           | 143        |
| 三、转基因植物生产寡糖            | 144        |
| 四、转基因植物生产淀粉            | 144        |
| 五、转基因植物生产果聚糖等其他糖类物质    | 153        |
| 第三节 存在问题与展望            | 154        |
| 参考文献                   | 155        |
| <b>第六章 转基因植物生产脂类物质</b> | <b>159</b> |
| 第一节 国内外脂类物质生产的情况及发展趋势  | 159        |
| 第二节 脂肪酸的分类及其合成途径       | 161        |
| 一、脂肪酸的分类               | 161        |
| 二、酸合成及种子油脂形成的途径        | 162        |
| 三、利用转基因植物生产脂类物质的一般方法   | 163        |
| 第三节 转基因植物生产脂类的应用研究     | 163        |
| 一、提高或降低饱和脂肪酸的含量        | 163        |

|  |     |
|--|-----|
| 二、转基因油料作物生产某些具特殊用途的脂肪酸·····                | 165 |
| <b>第四节 转基因植物生产脂类存在的问题与对策</b> ·····         | 173 |
| 一、提高转基因植物中外源基因的表达量·····                    | 174 |
| 二、深入研究合成途径，提高脂肪酸合成量·····                   | 174 |
| 三、提高脂肪酸在油料种子中的有效积累·····                    | 175 |
| <b>参考文献</b> ·····                          | 175 |
| <b>第七章 转基因植物生产次生代谢产物（可降解塑料、生物碱等）</b> ····· | 177 |
| <b>第一节 利用转基因植物生产生物可降解塑料（PHAs）</b> ·····    | 177 |
| 一、生物可降解塑料简介·····                           | 177 |
| 二、PHAs 的生物合成及其分子机制·····                    | 183 |
| 三、PHAs 的主要生产途径·····                        | 188 |
| 四、利用转基因植物生产 PHAs ·····                     | 190 |
| <b>第二节 转基因植物生产有用次生代谢物质</b> ·····           | 194 |
| 一、植物的次生代谢物质及其功能·····                       | 195 |
| 二、次生代谢在植物进化过程中的生物学意义·····                  | 199 |
| 三、植物次生代谢产物与作物品质·····                       | 202 |
| 四、植物次生代谢合成途径及其调节·····                      | 202 |
| 五、植物次生代谢产物合成的调控·····                       | 207 |
| 六、转基因植物生产次生代谢物的研究现状和发展·····                | 209 |
| 七、利用转基因植物生产次生代谢物质·····                     | 211 |
| <b>参考文献</b> ·····                          | 216 |
| <b>第八章 植物生物反应器下游技术</b> ·····               | 218 |
| <b>第一节 植物生物反应器下游技术简介</b> ·····             | 218 |
| 一、植物生物反应器工程下游技术的特点·····                    | 218 |
| 二、生物技术下游加工过程的一般步骤·····                     | 218 |
| <b>第二节 转基因植物中有效成分的提取方法</b> ·····           | 219 |
| 一、溶剂提取法·····                               | 219 |
| 二、水蒸气蒸馏法·····                              | 222 |
| 三、微波萃取技术·····                              | 223 |
| 四、反胶束萃取技术·····                             | 224 |
| <b>第三节 植物有效成分的分离纯化方法</b> ·····             | 225 |
| 一、溶剂分离法·····                               | 225 |
| 二、水溶液两相溶剂萃取法·····                          | 226 |
| 三、盐析法·····                                 | 228 |
| 四、透析法·····                                 | 229 |
| 五、结晶、重结晶和分步结晶法·····                        | 229 |

|  |            |
|--|------------|
| 六、超滤技术·····                              | 231        |
| 七、大孔树脂吸附技术·····                          | 233        |
| 第四节 色谱技术·····                            | 234        |
| 一、纸色谱·····                               | 235        |
| 二、薄层色谱·····                              | 236        |
| 三、制备型薄层色谱·····                           | 237        |
| 四、柱色谱·····                               | 238        |
| 五、制备型加压液相色谱·····                         | 242        |
| 六、气相色谱·····                              | 243        |
| 七、高速逆流色谱技术·····                          | 244        |
| 八、反相液相色谱·····                            | 246        |
| 九、膜色谱技术·····                             | 247        |
| 十、疏水色谱法·····                             | 248        |
| 十一、亲和层析·····                             | 249        |
| 第五节 植物有效成分提取的其他技术·····                   | 251        |
| 一、超临界流体萃取技术·····                         | 251        |
| 二、离子交换层析技术·····                          | 254        |
| 三、膜分离技术·····                             | 258        |
| 四、超声波提取技术·····                           | 259        |
| 五、分子印迹技术·····                            | 260        |
| 六、电泳亲和色谱技术·····                          | 262        |
| 七、浊点萃取技术·····                            | 263        |
| 参考文献·····                                | 264        |
| <b>第九章 转基因植物生物反应器产品的产业化现状和安全性评价·····</b> | <b>267</b> |
| 第一节 转基因植物生物反应器产品及其产业化现状·····             | 267        |
| 一、已经达到商业化的转基因植物生物反应器产品·····              | 267        |
| 二、GMP 标准下的转基因植物生物反应器产品·····              | 270        |
| 三、转基因植物生物反应器产品在发展中国家的应用前景·····           | 271        |
| 第二节 转基因植物生物反应器产品安全性评价·····               | 273        |
| 一、转基因植物安全性评价内容·····                      | 273        |
| 二、转基因生物安全性评价体系·····                      | 279        |
| 三、国内外转基因植物安全评价的管理现状·····                 | 282        |
| 四、全球转基因生物及其产品安全性评价的热点问题·····             | 284        |
| 参考文献·····                                | 286        |
| 附录一 基因工程安全管理办法·····                      | 287        |
| 附录二 农业转基因生物安全管理条例·····                   | 292        |
| 附录三 农业转基因生物安全评价管理办法·····                 | 299        |
| 附录四 转基因食品卫生管理办法·····                     | 308        |

# 第一章 转基因植物生物反应器

## 第一节 转基因植物的产生及其应用

### 一、转基因植物的概念

转基因植物 (transgenic plant) 是应用重组 DNA 技术和转基因技术, 将外源基因导入植物细胞, 并在其中整合、表达和传代, 从而创造出的新型植物。也就是说, 利用植物基因工程技术对某种植物进行定向改造, 通过基因工程、细胞工程和育种工作, 培育出具有新性状的植物。

随着重组 DNA 技术的发展, 已可将人、动物、植物、微生物的基因相互转移, 打破了物种之间难以杂交的天然屏障。转基因技术只不过是利用现代生物、物理和化学等技术方法, 把具有某种特性的基因定向导入其他生物体内, 以产生人类所期望的结果。其可控性更强, 时间也更短。过去的杂交育种技术, 只能让成千上万个基因自然随机交互作用, 要得到一个较有优势的品种, 往往需要 10~12 年或更长时间, 效率很低。据了解, 当前人类所能利用的生物物种只占全部的 20%~55%, 很多生物资源人类无法直接利用。但通过转基因的方法, 可以将其遗传物质转移出来加以重组表达, 这将极大地拓展人类对自然资源的利用。迄今已经把具有实用价值的基因, 如抗病毒、抗虫、抗除草剂、改变蛋白质组分、雄性不育、改变花色和花形、延长保鲜期等的基因, 分别转入烟草、马铃薯、棉花、番茄、大豆、苜蓿、矮牵牛等作物。因此, 植物基因工程对未来农业将产生不可估量的影响。

一般来讲, 转基因工作分为三个步骤: ①从生物体中分离获得所需要的基因, 即 DNA 片断。②通过载体将基因转入到新细胞中, 并使其与新细胞中染色体组 DNA 发生组合, 即 DNA 的重组。③在筛选培养基上培养有外源基因的细胞或组织, 使其产生正常健康的转基因植物, 通过有性繁殖将优良性状传递给下一代。要实现以上三步需要进行的工作: ①寻找目标基因。从可能含有目标基因的生物中, 确定该生物体内有哪些基因与其优良性状有关。②分离获得目标基因。利用内切酶或逆转录酶结合各种基因文库、RT-PCR 等技术, 将生物细胞中的天然基因分离出来, 亦可通过确定所需基因的遗传密码排列顺序来人工合成 DNA 链。③选取合适的基因载体。现有质粒载体、病毒载体、脂质载体等, 都可将基因 DNA 转入到受体细胞, 其中以质粒载体最为常见。质粒是一种可以与细菌共生的遗传物质, 一般情况下对细菌的生命和遗传没有影响, 但在特定情况下, 质粒中的 DNA 可以替代寄主细菌的 DNA。所以, 通过内切酶和逆转录酶可以将质粒的 DNA 分子改为所需的结构, 如此即可将寄主细菌 DNA 变为所需 DNA, 再感染目标生物体, 即可达到基因转移的目的。

## 二、转基因植物的研究和应用概况

自 1983 年第一批转基因植物（烟草、马铃薯）问世以来，生物技术发展十分迅猛，转基因植物在农业、园艺和林业生产上的应用和发展取得了一系列突破性成就。1986 年首批转基因植物（抗虫、抗除草剂）被批准进行环境释放试验，1994 年首批转基因植物（延熟番茄和抗除草剂棉花等）获得批准商品化生产。1996 年美国批准的商品化转基因植物达 21 种、加拿大 18 种、澳大利亚 14 种、日本 7 种。至 1998 年 6 月国外批准商品化应用各类转基因植物产品（品牌）已近 90 种，仅美国和加拿大就超过了 50 种。目前，全世界培育成功的转基因植物已有 35 科 140 多种。其中包括水稻、玉米、马铃薯、甘薯等粮食作物；棉花、大豆、油菜、亚麻、向日葵等经济作物；番茄、黄瓜、芥菜、甘蓝、花椰菜、胡萝卜、茄子、生菜、芹菜等蔬菜作物；苜蓿、白三叶草、柱花草等牧草；苹果、核桃、李、番木瓜、甜瓜、草莓、香蕉等瓜果；矮牵牛、菊花、香石竹等花卉；以及霸占杨树等造林树种。我国的植物转基因研究虽然起步较晚，但已逐步跟上世界先进水平。目前研究集中在一些主要农作物的基因改良方面。据报道，我国科学家已获得 50 多种作物的转基因植株，有水稻、小麦、玉米、大豆、马铃薯、花生、杨树、番木瓜、烟草、甜瓜、辣椒等，其中涉及 103 个基因的 47 种转基因植物正处在不同的研发阶段。

据不完全统计，至目前为止，全球转基因农作物主要集中在七大类作物上。它们是大豆、玉米、棉花、油菜、马铃薯、南瓜和番木瓜。主要涉及植物抗虫、抗病、抗除草剂、抗逆、作物高产、品质改良、药物生产及环境美化等方面。其中大面积商品化生产的转基因作物主要是以提高抗性（如抗病、抗虫、抗除草剂）和品质改良为主。以抗虫转基因棉花为例，它不仅可以直接抵抗棉铃虫等害虫的为害，提高棉花产量，而且可以大量减少农药的使用，从而节省开支，减少了农药对天敌的杀灭，保护生态环境。根据 Clive James (1997) 报道，全球转基因作物面积发展很快，1996 年为 280 万  $\text{hm}^2$ ，到 1997 年就增长到 1 280 万  $\text{hm}^2$ ，仅一年的时间就增长近 4.5 倍。其中美国所占比例最高，其次是中国。到 2001 年，全球转基因植物种植总面积达到 5 260 万  $\text{hm}^2$ ，同 2000 年相比，增长 19%，增长幅度达到 840 万  $\text{hm}^2$ ，是 1999—2000 年度增幅（430 万  $\text{hm}^2$ ）的 2 倍。99% 的转基因作物种植集中在美国、阿根廷、加拿大、中国四个国家。其中美国 3 570 万  $\text{hm}^2$ ，占 68%；阿根廷 1 180 万  $\text{hm}^2$ ，占 22%；加拿大 320 万  $\text{hm}^2$ ，占 6%；中国 150 万  $\text{hm}^2$ ，占 3%。另外，墨西哥、保加利亚、乌拉圭、罗马尼亚、西班牙、印度尼西亚、德国等国家转基因植物种植面积也有较大幅度的增长。其中印度尼西亚是首次报道种植转 Bt 基因棉花的国家。从转基因作物的种类来看，主要是大豆、玉米、烟草、棉花等。全球种植最为广泛的转基因作物是大豆，总面积为 3 300 万  $\text{hm}^2$ ，占全球转基因作物种植总面积的 63%；其次是转基因玉米，种植面积为 980 万  $\text{hm}^2$ ，占 19%；转基因棉花 680 万  $\text{hm}^2$ ，占 13%；转基因油菜 270 万  $\text{hm}^2$ ，占 5%。从转基因作物的性状来看，主要是抗除草剂、抗虫、抗病毒以及品质改良等。抗除草剂农作物种植面积最大，占转基因农作物总种植面积的 77%；其次是转 Bt 抗虫作物，占 15%；抗虫、抗除草剂的双抗棉花及玉米占 8%。抗除草剂转基因大豆种植面积为 3 300 万  $\text{hm}^2$ ，占全球转基因作物种植总面积的 63%；转 Bt



基因玉米种植面积为 590 万  $\text{hm}^2$ ，占 11%。我国植物转基因研究也取得了重要进展。目前经我国农业部审查并经全国基因工程安全委员会批准商品化生产的作物主要有抗虫转基因棉花（Bt 棉和 Bt+CpTI 棉）、抗病毒烟草、延迟成熟期的转基因番茄、抗 CMV 转基因番茄、抗 CMV 转基因甜椒、抗 PRSV 转基因番木瓜。此外，抗虫玉米、水稻、大豆、烟草，抗病马铃薯、烟草，抗除草剂大豆等正在进行田间试验。除转基因抗虫棉已经大面积生产外，其他几种转基因作物的种植面积较小。早在 1994 年 Fraley 就对生物工程研究的前景进行了设想。1995—2000 年为第一阶段，主要是作物农艺性状方面的研究，如作物的抗除草剂、抗病、抗虫等方面研究；2000—2005 年为第二阶段，主要是通过作物的淀粉、糖、脂肪酸等方面的改良，而进一步加强食品加工方面的研究；2005—2010 年为第三阶段，药理学方面的研究为其主要研究内容。2010 年以后，特殊化学成分的研制与生产则是第四阶段研究。

以下是国内外转基因植物的一些实例。

### （一）抗病虫害转基因植物

作物病害和虫害使农业生产遭受严重损失。例如欧洲的玉米螟就使欧洲一年玉米产量损失 4 000 万 t。目前已有十多种抗病虫害的基因被应用，如从苏云金杆菌中分离的苏云金杆菌毒素（Bt）基因、从植物组织中分离的  $\alpha$ -淀粉酶抑制物基因及凝集素基因、从蝎子等动物中分离的昆虫毒素基因等，并已导入玉米、棉花、马铃薯、烟草、苜蓿、花椰菜、花生、水稻、番茄、杨树等多种植物，对主要害虫的防治效果与常规防治效果相近或略好，对环境无污染。将烟草花叶病毒、黄瓜花叶病毒、马铃薯 X 病毒、木瓜环斑病毒等的外壳蛋白基因导入作物，获得的转基因瓜果、马铃薯、番茄、烟草、苜蓿等，具有对相应病毒的抗性。在抗细菌和真菌方面，从天蚕中分离的天蚕素 B 及人工合成的杀菌肽，具有较好的抗真菌效果。已有抗青枯菌马铃薯、抗霉菌葡萄、抗真菌草莓、抗叶斑病和巴拿马病香蕉等转基因植物的报道。

### （二）抗除草剂转基因植物

化学除草剂在现代农业中起着十分重要的作用，但要求高效、广谱，又要对作物及人、畜无害。为此，科学家们利用抗草甘膦、抗磺酰脲类、抗臭苯氯等基因，培育出大豆、玉米、棉花、烟草、油菜等耐除草剂的转基因植物，与相对应的除草剂一起作用时，可有效杀除杂草而不伤害作物和人、畜。在美国使用面积已达 690 万  $\text{hm}^2$ ，占转基因植物种植面积首位，取得巨大经济效益。

### （三）抗逆转基因植物

提高作物对抗逆境能力的基因工程也已取得一定进展。例如我国将山菠菜的甜菜碱脱氢酶基因导入烟草、草莓和水稻，明显提高了植物的耐盐性。向烟草导入拟南芥叶绿体的甘油-3-磷酸乙酰转移酶基因，以调节叶绿体脂膜的不饱和度，使转基因烟草抗寒性增加。用转基因方法增加叶绿体中 MnSOD 活性，可使转基因苜蓿在冷害后较快地恢复生长。导入合成脯氨酸有关酶的基因，可增加作物对干旱和盐碱胁迫的抗性。导入麦根酸基



因可提高水稻的耐碱能力。日本近来通过转基因技术培育出能在 50℃ 高温下生长的烟草。

#### (四) 优质高产转基因植物

改善作物产品的品质是植物基因工程当前重要的研究内容。据报道, 将巴西坚果中富含蛋氨酸的 2S 清蛋白基因转入烟草, 可使烟草种子蛋白中蛋氨酸含量增加 30%。日本将大豆球蛋白和铁蛋白基因导入水稻, 使稻谷中球蛋白含量达到 8%~9%, 含铁量比普通大米高出 2~3 倍。瑞士将  $\beta$ -胡萝卜素相关基因导入水稻, 生产的大米富含胡萝卜素 (维生素 A 原)。我国培育的转基因新品种, 其蛋白质含量比标准品种可高 45%~48%, 产量可提高 10%~20%。美国将月桂树的月桂酸基因导入油菜, 转基因油菜籽中月桂酸含量高达 40% 左右, 为生产月桂酸开辟了重要来源。澳大利亚培育的重组麝香石竹, 花期可延长 1 倍。将花朵蓝色素基因导入玫瑰, 培育出了蓝玫瑰。日本也已克隆出控制花色浓度和光泽的 Mixta 基因。美国将乙烯合成关键酶基因的反义 RNA 基因导入番茄, 生产的番茄能抗软化, 使番茄采收后的运输和储藏时间大大延长。美国培育的工程棉所含的聚酯纤维, 其保暖性能比普通棉高 8.6%。将靛蓝色素相关基因 BCE 和红色花色素合成酶基因 DFR 转入棉花, 获得了有靛蓝色和红色纤维的棉桃。将芽孢杆菌 RNA 酶 (barnase) 基因转入作物, 使之特异地在花药绒毡层细胞中表达, 破坏该组织中的 mRNA, 使之过早退化, 导致花粉败育形成雄性不育株, 这一基因工程已在育种工作中应用。我国将 GST 基因导入棉花雄性不育的恢复系中, 育成了有很强恢复能力的恢复系, 在世界上首先使“三系”杂交棉花产业化。

#### (五) 生产可食疫苗的转基因植物

转基因植物生产疫苗是利用分子生物学技术把重组的疫苗基因 (编码病原菌免疫蛋白亚基的基因) 导入植物, 人体和动物通过食用含有抗原的转基因植物, 激发肠道免疫系统, 从而产生对病毒、细菌等病原菌的免疫能力。这种可食疫苗具有便于推广、生产成本低、可直接食用、不必冷藏等优点, 受到科学家们的高度重视。利用该技术国外至今已获得成功的有乙型肝炎表面抗原、不耐热的肠毒素 B 亚单位 (LT-B)、诺沃克病毒外壳蛋白、流感病毒血凝素和艾滋病病毒抗原、口蹄疫病毒抗原和鼻病毒抗原、疟疾抗原等 10 多种疫苗, 不久的将来可望大规模生产面市。随着转基因植物的不断涌现和大量推广, 将是今后农业生产中必然出现的趋势。它不仅大大地提高农业产量, 改善作物品质, 还可以开辟生产新医药用品原料的新途径, 提高人类生活的质量。国内在利用转基因植物或病毒载体生产疫苗的研究方面还远远滞后于其他国家, 有关论文报道甚少。

尽管转基因植物生产基因工程疫苗有许多优点, 但就目前技术而言, 仍存在疫苗在植物中的表达水平较低、提纯困难、口服时有被消化可能等问题。为在植物中获得较高的表达水平, 在进行遗传操作时应考虑下列因素: 选用合适的强启动子 (如花椰菜花叶病毒 CaMV 的 35S 启动子, 该启动子在大多数植物细胞内都能启动外源基因的表达)、增强子和前导序列; 对密码子进行优化, 除去不稳定的 RNA 序列, 选择适当的植物表达载体等方法等来实现。为了防止口服时被消化降解, 可在抗原基因附近加上一些修饰基因或吸附基因序列来保护口服疫苗不被迅速消化, 从而可长时间停留在消化系统内。为便于植物生

产疫苗的提取纯化，人们发展了外源基因与植物的特异蛋白质基因及基调控序列连接的融合表达系统，使重组蛋白在植物中的表达具有器官和组织特异性，可大大提高外源蛋白的表达量。这样可简化蛋白的提取纯化过程。如将 GUS 基因与油质蛋白融合表达，种子中 80% 的重组蛋白结合在油体上，这相当于重组蛋白富集了 13 倍，分离种子中的油体，通过特异性内切酶作用将 GUS 蛋白从油体表面释放出来，从而获得有活性的 GUS。

### 三、转基因植物的应用领域

转基因植物主要在农业生产上得到了应用。培育转基因植物的初衷是为了提高作物产量、改善品质、增强作物抗逆性、抗病虫害的能力，因此，转基因植物主要在如下农业方面得到了研究和应用。

#### (一) 培育抗除草剂作物

将除草剂耐性引入农作物是增加对除草剂选择性及完全性的一条新途径。现已获得了抗除草剂基因工程烟草、番茄、马铃薯、棉花、油菜、大豆、水稻等作物。

#### (二) 培育抗虫作物

培养抗虫植物是转基因技术的一个重要应用领域，不仅对改良作物具有重要意义，同时，对种子工业和农业化学也有不可低估的影响。迄今发现并应用于提高植物抗虫性的基因主要有两类：一类是从细菌中分离出来的抗虫基因，如苏云金芽孢杆菌毒蛋白基因（Bt 基因）；另一类是从植物中分离出来的抗虫基因，如蛋白酶抑制剂基因（PI 基因）、淀粉酶抑制剂基因、外源凝集素基因等。其中 Bt 基因和 PI 基因在农业上利用最广。

已经获得了抗虫基因烟草、番茄、马铃薯、棉花、甘蓝、水稻、大豆、苹果、甘蔗、杨树等。

#### (三) 培育抗病作物

病毒对植物的为害是农业生产上损失最大的病害之一，利用转基因技术选育带有抗病基因的品种是防止和减轻病毒为害的有效方法。已用多种植物病毒进行了试验，如黄瓜花叶病毒（CMV）、马铃薯 X 和 Y 病毒（PVX 和 PVY）、大豆花叶病毒（SMV）、苜蓿花叶病毒（AIMV）等。已经获得的抗病毒转基因植物有番茄、马铃薯、辣椒、小麦、水稻等。利用基因工程手段增强植物对细菌和真菌病的抗性方面也取得了很大进展。

#### (四) 培育抗逆性强的作物

如 Murata 等通过向烟草导入拟南芥叶绿体的甘油-3-磷酸乙酰转移酶基因，以调节叶绿体膜脂的不饱和度，使获得的转基因烟草的抗寒性增加。

#### (五) 培育和改良作物品质

种子及其他储藏器官（块茎、块根、鳞茎等）中蛋白质的含量及其氨基酸的组成、淀

粉和其他多糖化合物以及脂类物质的组成，直接关系到这些食物的营养价值或在工业上的用途。因此，品质的改良内容包括水果蔬菜的延熟保鲜、有益健康的植物油（如不饱和脂肪酸）含量的提高、增加营养价值（如维生素）、富含抗癌蛋白质的大豆、高营养的饲料（如高赖氨酸、表达植酸的玉米）等方面。

## （六）改善食物中的碳水化合物组成

基因工程技术已被成功地应用于食物中多种碳水化合物组分的修饰改造。例如，果聚糖是一类有益人类健康的可溶性碳水化合物，普通食物中果聚糖的含量一般较低，只在菊芋等少数几种植物中的含量很高。目前，科学工作者已将果聚糖合成中的关键酶（1-SST）及相关的基因分离出来了，并且已利用基因工程技术将1-SST基因转移到甜菜等食物中，以提高食物中果聚糖的含量。此外，基因工程技术还被成功地应用于改变食物中直链淀粉和支链淀粉的含量，利用基因工程技术开发出来的无直链淀粉的马铃薯已在欧洲等地广泛种植。

**1. 改善食物中蛋白质的组成** 近年来，利用基因工程技术改善动物性食品和植物性食品中蛋白质成分的研究取得了长足的发展。植物性食物中的谷类和豆类是人体蛋白质的重要来源，谷类种子中含10%~15%的蛋白质，豆类种子中的蛋白质含量高达30%左右。但谷类蛋白质中因缺少赖氨酸而使其营养价值降低；而豆类蛋白中则因缺少蛋氨酸而影响其营养价值。通过对不同种类食物的合理搭配，可以弥补谷类和豆类蛋白质的营养缺陷。但是，利用基因工程技术直接增加谷类蛋白质中的赖氨酸和豆类蛋白质中的蛋氨酸，是提高植物性蛋白质营养价值的最有效的方法。目前，通常采用两种途径来改善植物性蛋白质中氨基酸的比例：第一种方法是利用基因工程技术改变食物中各种蛋白质的生物合成途径，从而使谷物和豆类的储存性蛋白质中的赖氨酸和蛋氨酸的数量增加；第二种方法是来自于其他生物体中的编码高含量赖氨酸和蛋氨酸的外源基因转入谷类或豆类食物中，利用外源基因的表达合成高含量赖氨酸和蛋氨酸的蛋白质，平衡谷类和豆类食物中的氨基酸比例，如利用转基因技术已获得高蛋白质质量的甘薯。

**2. 改善食物中油脂、微量元素的组成** 植物油脂是主要的食用油，利用基因工程技术已成功地开发出油酸含量由原来的25%增加到85%的转基因大豆新品系。硬脂酸含量由原来的2%提高到40%的转基因油菜种子以及含油量提高25%的超油1号、超油2号油菜品种；富含铁元素、锌元素和维生素A，能防止贫血病和预防维生素A缺乏的新品种水稻等一批特优品种。

**3. 降低食物中有害成分** 天然食物中含有多种对食品品质产生不利影响的化学成分。如大豆中的蛋白酶抑制剂、大米等食物中的过敏原蛋白以及能引起番茄等果蔬食品变软腐烂的水解酶等。利用传统的食品加工方法，如加热、酶解等方法也可以除去食物中的有害成分，但会增加食品的生产成本以及影响食品中的其他营养成分，并容易造成加工污染。随着对这些化学物质研究的深入，有越来越多的与这些化学物质生成有关的基因被分离出来，为采用基因工程技术降低或除去天然食物中的这些影响食品品质的有害成分打下了基础。

利用基因工程技术降低或除去食物中有害化学成分的基本策略与通过基因工程技术增加食品中某一营养成分的策略有所不同。用基因工程技术增加食物中某一营养成分的基本

方法，是向植物中导入编码这一成分的基因或合成酶基因，使其获得合成所需营养成分的能力，例如通过向植物中导入与长链不饱和和脂肪酸合成有关的去饱和酶基因，可以使植物获得合成 DHA 和 EPA 的能力，从而提高植物油脂中 DHA 和 EPA 的含量。而利用基因工程技术降低或除去食物中某一化学成分时，则常采用反义核酸（antisense RNA）技术以抑制食物中原有的与所需除去的化学成分合成有关的基因表达。例如通过对大米中一种能引起过敏反应的蛋白质的研究，分离出编码该过敏原蛋白的 mRNA，并建立相应的 cDNA 文库，测定了该基因的碱基序列，然后利用基因工程技术将连接上启动子和终止子的与过敏原蛋白基因碱基互补的反义基因导入食物中，由于反义基因能产生与正常过敏蛋白基因 mRNA 互补的 RNA 链，并与正常过敏蛋白基因 mRNA 结合形成双链 RNA，阻止该基因的 mRNA 翻译成相应的蛋白质，从而达到降低和除去该过敏原蛋白的目的。为了让生物体内产生反义 RNA，可将正常的过敏原蛋白基因经反向接入后导入植物中。目前，反义核酸技术已被广泛应用于除去食物中各种不利的化学成分。

#### （七）利用基因工程调控植物激素和生长发育

对植物生殖生长过程（包括花的形成、发育、雄性不育、自交不亲和性、胚胎发育等）的调控，在作物生产及园艺上均十分重要。最为成功的是利用基因工程产生雄性不育系或控制植物的育性。如河北农业大学培育成功了一种转基因杨树新品种，这种新品种杨树属于雌性，果实很小，所以不会产生飞絮，并具有非常强的抗虫性，可以完全不用对树木施用任何化学药剂。此外，这种杨树树干挺直，树形美观，硬度高，生长快，非常适于城市绿化，令人头痛的城市杨树飞絮现象将不再发生。

#### （八）利用基因工程调节植物的次生代谢或用植物生产具有重要经济价值的蛋白质

植物的很多次生代谢产物广泛用于生产药物、化妆品、食品添加剂等，但是在天然植物中它们的含量很低。利用转基因技术将蔬菜、水果通过基因工程技术变成天然药物或功能食品以及产生大量有医用价值的蛋白或疫苗。利用转基因植物作为生物反应器，科学家们正在探索生产产品，如生物降解塑料、工业用润滑剂和洗涤剂大量化工产品。Calgene 公司已经用转基因油菜生产工业用润滑剂和 12-碳的脂肪酸来生产洗涤剂。由于油菜容易栽培，并生成大量优良油脂，Calgene 公司进一步获得了生产芥子酸的转基因油菜，用来生产润滑剂和尼龙 13-13，基因来自于 *Simmondsia chinensis* 和 *Meadow foam*。美国斯坦福大学 Somerville 的研究小组将微生物可以生产生物降解塑料聚羟基丁酸酯（PHB）的基因转入拟南芥菜，经过改造的基因提高了该基因表达水平 100 倍，转基因的拟南芥菜植株生长和种子产量正常。Agracetus 公司的研究人员也在进行类似的研究，他们将与 PHB 有关的基因转入棉花，以生产生物降解塑料。这些公司的研究成果，将取代目前用石油做原料生产化工产品的传统方法。

### 四、转基因植物的经济、社会和环境效益

目前，在全世界转基因植物种植面积中，美国占总面积的 68%，其后依次为阿根廷、



加拿大和中国。美国 55% 的大豆和 40% 的玉米都经过转基因的改造，仅转基因玉米产品获得的超额利润，每年就达 40 亿美元。根据国际农业生物技术应用服务机构的统计和预测，全球范围内 1998 年转基因农作物的销售额为 12 亿~15 亿美元，2000 年达到 30 亿美元，2005 年可达 80 亿美元，2010 年将达到 250 亿美元，农业生物技术产品在农业总产值中的比例将越来越大。转基因农作物之所以能够获得如此迅速的发展，是因为它能够为解决人们目前所面临的人口增长与耕地面积减少的难题提供了一条有效途径。比如我国，到 2030 年左右，人口将达到 16 亿，需要的粮食在 61 亿 t 左右，意味着粮食生产要在单产和总产上提高 30% 和 50%，现有的技术支持不了这么大幅度的产量提高，若想达到这个目标，不采用新技术保证不了将来中国人的吃饭问题，更何况是要解决全球人口的吃饭问题。转基因植物还明显表现为减少对农药的施用及生态环境的保护方面。可见，转基因植物的研究与应用，不仅是社会发展的要求，而且产生的经济、社会和环境效益是不可估量的。

## 第二节 转基因植物生物反应器基本原理

### 一、转基因植物生物反应器的概念

转基因植物生物反应器是指通过基因工程途径，利用植物细胞、组织、器官以及整株植物为工厂，来生产具有高经济附加值的医用蛋白（包括疫苗、抗体、药用蛋白等）、工农业用酶、特殊碳水化合物、生物可降解塑料、脂类及其他一些次生代谢产物等生物制剂的生产体系，又称“分子农业（molecular farming）”。但从广义上讲，不仅仅指经基因工程改造的植物细胞、组织、器官以及整株植物，也包括天然的植物，例如一些天然植物的次生代谢产物也具有重要的药用价值。随着新功能基因的分离、克隆以及各种农作物高效表达技术平台的逐步建立，将会有相当数量的高新生物技术产品不断涌现，这种“分子农业”的出现及普及，将会对全球现有的农作物种植结构产生显著影响。利用植物作为生物反应器生产药物产物或者功能食品，这也成为当今的研究热点。目前，已用于生物反应器的植物有烟草、拟南芥、大豆、小麦、水稻、玉米、油菜、马铃薯、番茄、番木瓜、香蕉、苜蓿和柱花草等。

转基因植物作为生物反应器，是因为：

1. 植物是最经济的蛋白质生产系统。种植植物所需要的仅是阳光，来自土壤或肥料的矿质营养、水分，这一点明显优于微生物发酵和动物细胞的培养。因为微生物发酵需要昂贵的设备投入，而动物细胞的培养需要昂贵的生长培养基，而且要保持无菌的生产条件。

2. 植物可以大规模种植，而且产物储藏在种子、果实、块茎中便于储运。例如，在室温条件下经过 5 个月储存的水稻种子中 scFv（single chain Fv）的含量和活性没有明显的损失。在 4℃ 条件下，储存 18 个月的马铃薯仍保留 50% 的有活性的抗体。

3. 植物具有完整的真核细胞表达系统。表达产物能进行正确的折叠装配，以及糖基化、磷酸化、酰胺化，从而具有高等动物细胞表达的产物基本一致的免疫原性和生物

活性。

4. 植物生物反应器的产物具有无毒性和副作用、安全可靠、无残存 DNA 和潜在致病、致癌性。用动物细胞作为生物反应器, 则有可能因为动物本身携带的致病原对人的健康造成威胁。由于植物具有上述优势, 所以“分子农业”的设想在 20 世纪 80 年代末一经提出, 就成为转基因植物领域的研究热点。目前, 在植物生物反应器上已取得一定成绩。

## 二、国内外研究概况

利用转基因植物作为生物反应器生产具有临床应用价值的药用蛋白的研究逐渐受到各国的重视, 其中植物口服疫苗 (oral vaccine) 或可食疫苗 (edible vaccine) 是转基因植物的研究热点之一。下面就国内外在植物生物反应器方面的研究状况作概述。

### (一) 国外植物生物反应器研究概况

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。

在植物生物反应器研究中, 最受人们关注, 同时研究进展也最快的是生产各种疫苗用的抗原蛋白。病毒和细菌性传染病是威胁全球人类健康及生活质量最重要的因素之一。自 1778 年英国人 Jenner 首次发现人接种牛痘可预防天花病毒传染以来, 疫苗已被证明是对付传染性疾病特别是病毒性传染病最为经济和有效的方法。现在人们通过接种疫苗已完全根除了天花, 并在全球范围内基本控制了脊髓灰质炎、狂犬病、破伤风、白喉、百日咳和乙型脑炎等多种病毒及细菌性传染病的发生和传播。疫苗的形式也由菌体疫苗发展到亚单位疫苗 (subunit vaccine), 甚至还产生了 DNA 疫苗。但是, 目前人们使用的疫苗还主要是通过微生物发酵或动物细胞组织培养获得的, 需要复杂的生产设备, 生产工序繁琐, 生产成本较高, 不易保存和运输。因此, 这些疫苗在经济落后的发展中国家推广起来比较困难, 普通人群不易接受。此外, 有些疫苗还存在着安全性和使用不便等方面的问题。

1991 年, 美国人 C. J. Arntzen 和 H. S. Mason 率先提出了用转基因植物生产疫苗的新思路。此后, 国内外多个实验室相继在烟草、马铃薯、番茄、苜蓿和莴苣中表达了乙肝表面抗原、大肠杆菌热敏毒素 B 亚基、霍乱毒素 B 亚基、诺沃克病毒壳蛋白和狂犬病毒 G 蛋白等抗原, 并利用在植物中表达的抗原进行了动物和人体的免疫实验, 获得了大量有价值的研究数据, 为今后利用转基因植物生产疫苗奠定了良好基础。植物来源的重组药用蛋白第一次临床应用研究是由星球生物技术有限公司 (Planet Biotechnology, Inc) 报道的。该公司利用转基因烟草中表达的抗体 sIgA 生产新药 CaroRx TM, 主要目的是预防和治疗由细菌引起的龋齿。临床实验证实 CaroRx TM 可以有效清除口腔内的变异链球菌 (*S. mutans*), 并预防志愿者口腔产生龋齿。该公司也正在设计和开发一些新的 sIgA 抗体, 用来有效预防口腔、呼吸道、消化道、生殖和尿道等黏膜系统和皮肤受到一些传染性病菌和毒性因子的感染。美国著名的孟山都公司 (Monsanto) 已经培育出一种转基因玉

米，每公顷玉米可以产生 3.7 kg 达到药用蛋白标准的人类抗体。假如每公顷的玉米产量可达 8.6 t 的话，在重组蛋白产量方面还具有相当大的改善空间。临床医学研究者计划向每个癌症患者注射 250 mg 这种玉米种子来源的抗体蛋白药物。孟山都公司还在种植一种转基因大豆，这种大豆可以生产针对单纯疱疹病毒 2 (HSV-2) 的人源化抗体。这种抗体的动物试验表明，它可以阻止 HSV-2 在小鼠阴道内的传播。植物来源的抗体在体外的稳定性和体内的生物活性与动物细胞培养来源的抗体相同。利用它将开发出一种低成本的治疗方法来防治某些由性传播的疾病。美国的 Prodi Gene 公司和 EPIcyte Pharmaceuticals 公司正合作开展玉米生产抗体的开发，主要是生产某些人黏膜抗体用于被动免疫治疗。因为 Prodi Gene 公司在蛋白表达和提取方面具有丰富的经验，而 EPIcyte Pharmaceuticals 公司拥有多项相关专利。Large Scale Biology 公司和斯坦福大学已经合作开发了一种肿瘤特异性疫苗，可用于阻止细胞的恶性生长，它们利用植物病毒作为瞬时表达系统。研究者们利用修饰后的烟草花叶病毒作为瞬时表达载体，可表达源自 38C13 鼠 B 细胞淋巴瘤型特异的单链抗体。在重组病毒侵染本萨明那烟 (*N. benthamiana*) 后，单链抗体蛋白在细胞质外体内可以积累到很高的水平。这种抗体片段可与一种亚型特异的抗抗体反应，这表明植物产生的 38C13 单链抗体经过了正确的折叠，用亲和层析纯化的 38C13 单链抗体免疫后的小鼠可以产生大于 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  型特异性的抗抗体。这些小鼠可以抵御致死剂量的 38C13 肿瘤的攻毒试验，其保护效果类似于用 38C13 IgM-匙蓝蛋白偶联疫苗免疫后的结果。这种产生肿瘤特异性蛋白疫苗的病毒快速表达体系，为治疗非何杰金氏淋巴瘤提供了一种可靠的方法。治疗的目的是在患者体内产生特殊的抗体，它能特异性识别恶性生长的 B 细胞表面特异性位点，使靶细胞最终受到破坏，而正常的细胞不会受到任何影响。另外，一个引起全球关注的研究成果是瑞士联邦技术研究所的 Ingo Potrykus 教授及其同事在洛克菲勒基金会和欧盟农业研究计划 (European Commissions Agricultural Research Programme) 共同资助下，在 2000 年将水仙的八氢番茄红素合成酶和番茄红素环化酶基因导入水稻，研制出一种富含  $\beta$ -胡萝卜素 (维生素 A 前体) 的水稻，品种名称 T309，每克稻米含 1.6 mg  $\beta$ -胡萝卜素，由于稻米色泽金黄，故称为金色大米。发展中国家目前有 2.5 亿~10 亿人患维生素 A 缺乏症，正是由于此症，这些国家每年有 1 000 万~2 000 万儿童死亡。食用富含铁质和维生素 A 的这种转基因水稻，将大大减少发展中国家儿童贫血症和维生素 A 缺乏症的发病率。该技术目前已被免费授权给菲律宾国际水稻研究所和印度的一个水稻研究中心，以期培育出适合当地种植的水稻品种。

## (二) 国内植物生物反应器研究概况

我国植物生物反应器的研究始于 20 世纪 90 年代初期，虽然在构建高效植物表达载体和培育转基因植物等主要技术环节上与国外相差无几，但在研究的广度和深度上与发达国家相比却存在很大差距。幸运的是，由于国家有关方面已意识到植物生物反应器的重要性，所以在制订“九五”计划时，选择了“利用转基因植物生产口服疫苗和生物可降解塑料”等 4 个研究课题作为探索性项目而予以资助。“九五”期末，已获得如下研究成果：

① 中国农业科学院生物技术研究所刘德虎等将乙型肝炎病毒表面抗原基因导入马铃薯和番茄，饲喂小鼠试验检测到较高的保护性抗体，浓度足以对人类产生保护作用。该所

还进行了利用植物叶绿体作为生物反应器生产药用蛋白的探索，目前已将丙肝病毒(HCV)抗原基因导入衣藻叶绿体。利用转基因植物生产口服疫苗可以大大降低疫苗的生产成本，在发展中国家更有良好的发展前景。

② 已将产毒素大肠杆菌热敏毒素 B 亚基及定居因子 CS6B 抗原蛋白基因导入马铃薯中，获得了高效表达重组抗原蛋白的转基因马铃薯植株，小鼠的口服接种实验证实可诱导特异性保护抗体产生，相关转基因植物已进入环境释放阶段。

③ 获得了口蹄疫流行株的基因库及我国常发生的 O 型口蹄疫口服疫苗 VP1 基因，拥有相应的口蹄疫诊断技术和疫苗评价标准，已成功地利用 TMV 载体大量表达出与 TMV 外壳蛋白融合的多个口蹄疫病毒表面抗原小肽，可从 100 g 烟草叶片中得到 1~2 g 含口蹄疫病毒 OK1 株系抗原决定小肽(11 肽和 14 肽)的融合蛋白。对模式动物豚鼠进行的免疫实验结果表明，这些融合蛋白小肽具有良好的免疫原性，可作为预防口蹄疫的安全的新一代基因工程疫苗。王冬梅等人(2005 年)将 VP1 及其多表位融合基因转入柱花草，获得了表达，并进一步作表达产物活性分析。

④ 建立了农杆菌介导的胡萝卜转化系统，已在烟草和胡萝卜中表达了霍乱毒素 B 亚基(CTB)，CTB 的表达量达到 0.1%。通过在 CTB 基因前导入烟草病程相关蛋白 PR1b 的信号肽序列，使 CTB 在烟草中的合成量提高了 20 多倍，并通过一步亲和层析法从烟叶中提纯了 CTB。

通过探索性研究，进一步缩短了我国与世界先进国家的技术差距。从研究结果来看，国外普遍应用的植物转基因技术在我国已成功应用，有些技术还为我国所独创，如花粉管通道转基因技术。国外尚在探索的新技术，如使用植物病毒作为瞬时表达载体实现基因高效表达，我国也在探索。因此，应当说我国在利用植物生物反应器技术上已有较好的基础。

在制订“十五”、“863”计划时，国家进一步加大了在植物生物反应器研究方面的投入力度。其中“利用植物生物反应器生产动物口蹄疫、结核病等兽用疫苗”、“降钙素和人乳铁蛋白等功能蛋白植物生物反应器的研制”、“组织和器官特异性基因表达启动子研究及高效表达载体构建”、“高效转化系统的研究”和“外源蛋白在受体植物中高效和稳定表达机制的研究”等课题被列为重大课题而予以了资助。2005 年前后，当上述重大专项主要技术经济指标实现以后，我国医药市场上出现了几种用植物生物反应器生产的药物、疫苗或其他保健食品。

目前，国内在一些植物如马铃薯和玉米等高效表达外源基因的技术上还不很成熟，从植物中提取和纯化表达产物的技术还有待改进。许多植物病毒可在植株寄主体内大量扩增，并表达病毒蛋白，如烟草花叶病毒感染烟草后，其外壳蛋白的含量可达烟草叶片蛋白总量的 20%。此外，病毒的提取和外源蛋白的纯化也比较方便，因而只要设计巧妙，就可以用植物病毒载体作为生物反应器，大幅度提高外源基因的表达量。用病毒载体既可表达分子量较大的全长外源蛋白，也可表达与病毒蛋白相融合的多肽。因为大部分病毒载体仍具有感染活性，无须经过植物基因转化过程，即可在常规植株体内表达外源基因。所以，用病毒作为植物生物反应器大量生产外源目的蛋白具有广阔的市场前景。

应该特别指出的是，我国植物生物反应器的研究和利用还主要集中在药用蛋白的研究



和应用方面。利用转基因植物生产特殊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、工农业用酶制剂的研究仍然未引起国家足够的重视，其实，这些生物制剂的市场潜力也是非常可观的。国内一些科学家通过自筹资金或采用国际合作方式开展了前期研究工作，并取得了令人瞩目的研究进展，如利用转基因玉米生产植酸酶，在加工成动物饲料添加剂后，可有效降低家畜排泄物中的磷含量，这对降低水污染和保护生态环境方面很有意义。

### 三、发展趋势

纵观生物技术的发展史，一个显著的特征是其发展呈波浪式前进。以单克隆抗体为例，于 20 世纪 70 年代末兴起，研制治疗用的单克隆抗体于 80 年代达到高潮，80 年代末至 90 年代初处于低谷甚至被怀疑，但是，到 90 年代后期又大放异彩，数种基因工程人源化单克隆抗体被美国 FDA 批准上市，为乳腺癌、淋巴瘤等患者的治疗带来新的希望，也为生产研制单位带来巨大的经济利益。借 2000 年人类基因组工作框架图完成的东风，我国生物技术板块上市公司在 2000 年也是热度相当高，2001 年则相对趋于平淡。但由于生物技术作为产业还只是刚刚开始，其前景是非常广阔的。

在 20 世纪最后 20 年里，生物技术在农业中的应用取得很大进展。生物技术在农业中的应用有两个方向：一是利用基因工程生产转基因农作物，使得主要的粮食作物和经济作物具有抗病、抗虫、抗逆和增产等特点，即转基因食品；二是利用转基因植物生产医用产物。其最早的例子之一是利用植物储藏蛋白高水平表达特性，生产人的神经肽——亮氨酸脑啡肽。这种物质是一种小分子多肽，在油菜中先以蛋白储藏种子的形式被生产出来，后用胰蛋白酶水解，使其从储藏蛋白质上切割下来，再通过 HPLC 予以回收，在临床上可作止痛剂或镇静剂使用。这种利用转基因植物（包括植物病毒）生产廉价诊断蛋白质和抗体等医用产物，取代微生物发酵的技术称为“分子农业”。植物作为生产药用蛋白的生物反应器，为人类提供了一个更加安全和廉价的生产体系。与微生物发酵、动物细胞和转基因动物等生产系统相比，它具有许多潜在的优势：如微生物系统不能对真核生物蛋白进行准确的翻译后加工和蛋白糖基化，细菌在发酵过程中常产生一些不溶性聚合物，而将这些聚合物重新溶解，并折叠成天然蛋白质，则需要很高的成本。此外，发酵常需要庞大的设备投资；动物细胞培养所需的生长培养基胎牛血清相当昂贵，且哺乳动物细胞在工业规模培养时，对温度、pH、溶解氧和某些代谢物均十分敏感，如果不严格控制这些培养条件，就容易使细胞生长发生变化，从而影响发酵和产品的纯度；更重要的是因植物不是人类病原体的宿主，利用重组植物生产的生物药不论提纯与否，都不存在潜在的人类病原，因而相当安全。但转基因植物生产医用产物普遍存在着表达水平不高的问题。这是影响其产业化的最主要的技术因素。随着研究的深入，这方面已开始逐步有所突破。

从商业的角度来看，植物是药用蛋白质诱感力最大的系统之一。尽管开发这个系统仍然受到诸多因素的限制，但最近国外公布的植物生物技术或种子公司与药物或酶工业企业之间的合作，明确表达出产业界对该系统的商业兴趣正在日益增长。目前国外利用转基因

植物生产或研制的医用产物有抗体、疫苗及蛋白质等。利用转基因粮食作物生产口服医用产物，使人们在食用的同时，顺便就可治疗某种疾病或获得了某种疾病的免疫功能，具有经济、方便、实用等特点。故食用疫苗成为当前转基因植物生产医用产物的热点领域。食用疫苗第一个人体临床报道是1997年经美国FDA批准，利用转基因马铃薯表达的细菌腹泻疫苗原大肠杆菌热不稳定肠毒素B亚基(LT-B)，对志愿者进行口服临床试验。结果证明，表达的LT-B马铃薯块茎在人的黏膜和全身有免疫反应，与接受109个产肠毒素大肠杆菌志愿者的反应相似。这说明植物产生的重组LT-B通过口服可防止消化作用，并能诱导人体免疫反应。此外，口服乙肝表面抗原(HBsAg)和马铃薯表达的诺沃克病毒粒子(VLPs)的临床试验也证明了植物细胞具有保护疫苗原不受消化作用，疫苗原能诱导人身和黏膜免疫反应。

“分子农业”尤其是可食用疫苗是我国上市公司投资的较理想领域。世界卫生组织(WHO)在全球提倡以疫苗来抵抗传染性疾病，而现在世界各国的疫苗生产是建立在细胞培养系统之上的，其庞大的设备投资和高成本的投入，对各国尤其是发展中国家而言是不适合的，疫苗由于太贵而得不到推广。因此，利用转基因植物生产疫苗将是世界各国重点产业化的领域。利用粮食或蔬菜作物如玉米、马铃薯、番茄等生产转基因医用产物，对负担不起目前流行疫苗的发展中国家来说，植物口服疫苗就像“食品添加剂”，无须太多额外负担，就可实现预防疾病的目的。这对许多发展中国家而言尤其具有现实意义，这是转基因植物规模生产食用疫苗根本动力。转基因植物生产食用疫苗易规模化生产。转基因植物生产医用产物的成本主要集中在下游分离纯化阶段，但如果用转基因植物生产食用疫苗就可避免或至少减免部分纯化过程，这样就容易规模生产，并使其生产成本大大降低。我国是一个发展中国家，也是一个人口大国，常见传染性疾病发病率高，且我国已开始实施儿童初始免疫计划，因而转基因植物生产食用疫苗在我国市场前景广阔。

前面已述，我国“分子农业”已开始起步，并取得了一些科研成果。但将这些成果进一步开发并产业化则需要大量的资金。而我国上市公司一般都拥有较多的资金和便利的筹资渠道，具有介入的实力。而且“分子农业”在我国甚至是国际上均是一个较新的产业化领域，此时介入不仅可获得较大的投资收益，还可提升公司结构，改变其在公众中的形象。

发展“分子农业”存在的一些障碍。一方面来自社会对转基因植物安全性的争议。转基因植物在大田释放前就已经过了严格的安全检查，但不幸的是转基因植物出世以来就一直饱受争议，其中又以欧美的争论最为激烈和具有代表性。应该说，任何一种新的技术利用不当都会带来危险，但为何转基因植物会有如此高的“礼遇”呢？欧洲的转基因技术远落后于美国，由于转基因技术所带来的变革是空前的，因此，谁掌握这方面的技术，谁就会在未来的发展中具有优势。这就是欧洲一方面极力反对转基因植物，一方面又大力资助本地的实验室进行转基因方面的研究。另一方面来自转基因植物生物反应器研究及产品本身。转基因植物生产食用疫苗的主要成本和风险集中在前期研究与开发阶段，因而光靠科研单位是难以独立完成的。尤其是在我国目前尚未有相应的优惠政策，必须鼓励全社会积极投资参与到其中。

### 第三节 转基因生物反应器的应用前景

#### 一、应用范围

##### (一) 在生物制药领域中的应用

利用转基因生物反应器生产医药制剂和医用疫苗，称植物医药基因工程。它是把重组的编码药用活性多肽和疫苗基因导入植物，使转基因植物能够大量生产这些活性多肽和疫苗。植物医药基因工程是工厂化农业（factory farming）或分子药田的有诱惑力的部分。医药领域主要是利用转基因植物生物反应器生产口服疫苗及医用蛋白等，因此该领域又称为“分子农业医药”。它是近年来发展的崭新交叉学科，是融合农业、生物技术和医药的一项高科技新技术。该技术以分子生物学为原理，应用遗传工程和 DNA 重组技术，以植物或动物细胞作为生物反应器，以农业生产方式来进行规模化生产各种医药蛋白质，彻底改变了传统的医药工业模式。以植物作为一种新型生物反应器，尤其是以水稻种子为生物反应器的研究在近几年取得了突破性进展，使得分子农业医药开始进入实用阶段。目前各种抗体、口服疫苗、各种抗肿瘤药物（包括蛋白酶抑制剂、多肽）以及一些高营养价值的生物蛋白质，均可通过植物生物反应器进行生产，使得分子农业医药产业迅速发展。国外在植物中采用这种分子农业的方法，已成功地生产了越来越多的有用物质，其中不乏高价值的药用蛋白多肽。随着基因工程领域研究的进展，利用转基因植物生产药用蛋白将会有更广阔的前景。

分子农业医药这种策略不仅可以大大降低这些本来昂贵的药品的生产成本，而且简化了储存方式。因此，国际上植物基因工程研究的一个新发展趋势就是利用转基因植物生产药物。这方面的工作最早是 1988 年比利时 PGS 公司的科研人员做的，本意是想让烟瘾君子们不用抽烟而只需拿烟叶闻闻或放在嘴里咀嚼就可过烟瘾，以此减少尼古丁对人体的毒害。他们将一种神经肽的编码基因转入烟草，得到的转基因烟草表达出高产量的神经肽。尽管他们的初衷未能实现，因为神经肽是通过血液运输起作用的，它在口腔中会被降解掉，但却意外地找到一条利用转基因植物生产神经肽的途径。此后，其他科学家们纷纷加入这一领域的竞争并且成果纷呈。1989 年美国斯格里普斯研究所利用转基因烟草高水平地表达了单克隆抗体，其表达量达叶总蛋白量的 1.3%。据计算，如果按照这种表达水平，美国只需将其烟草土地面积的 1%（约 6 000 hm<sup>2</sup>）用来种植这种转基因烟草，就可以产生出 270 kg 的抗体，足以提供给 2 万癌症患者 1 年治疗之用。此外，美国 Bioresources 公司利用植物基因工程手段生产白细胞介素 2（IL2），荷兰用转基因马铃薯生产人的血清蛋白，韩国用转基因烟草和番茄生产人的胰岛素。我国北京大学蛋白质工程与植物基因工程实验室已克隆了对早、中期妊娠引产极为有效的天花粉蛋白的基因，并首次成功地在转基因烟草中表达了该基因。迄今在世界范围内正在研究开发的医药活性多肽和疫苗估计在 100 种以上。目前已有几十种药物蛋白或多肽在植物中得到成功表达，其中包括人的细胞因子、表皮生长因子、促红细胞生成素、干扰素、生长激素、单克隆抗体和可作为疫苗

用的抗原蛋白等。

**1. 植物抗体** (plant antibody) 抗体 (antibody) 是动物体液中的一系列球蛋白, 称为免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig), 可介导动物的体液免疫反应。在植物体内表达编码抗体或抗体片段 (如 Fab 片段和 Fv 片段), 获得的产物就称为植物抗体。在植物中表达人和动物的抗体和疫苗成为人们关注的焦点。利用植物生产要比杂交瘤细胞低廉得多。据估计, 在 250 m<sup>2</sup> 的温室中利用苜蓿生产 IgG 的成本约为 500~600 美元/g, 而利用杂交瘤细胞生产抗体的成本约为 5 000 美元/g。因此, 利用植物生产抗体具有广阔的市场前景。目前, 利用转基因植物表达的抗体包括完整的抗体分子、分泌型抗体 IgA、IgG、单链可变区片段 (scFv)、Fab 片段、双特异性 scFv 片段以及嵌合型抗体等不同类型的抗体。表达产物含量最高达植物可溶性蛋白的 2% 以上。这类抗体具有生物学活性, 在纯化后可用作药物、诊断试剂和亲和剂等。表 1-1 所列的是近年来在植物中表达的抗体及可能的应用。

表 1-1 植物表达的抗体蛋白及应用

| 抗体类型  | 抗原     | 表达系统  | 应用        |
|-------|--------|-------|-----------|
| SIgA* | 链球菌    | 烟草    | 防治蛀牙      |
| IgG   | 抗人 IgG | 苜蓿    | 诊断        |
| scFv  | 胚胎抗原   | 小麦、水稻 | 肿瘤治疗      |
| scFv  | 特型疫苗   | 烟草    | B 细胞淋巴瘤治疗 |
| IgG   | 表面抗原   | 烟草    | 结肠癌治疗     |
| IgG   | 疱疹单型病毒 | 大豆    | 疱疹治疗      |

\* 分泌型 IgA (secretory IgA)

**2. 疫苗 (vaccine) 及口服疫苗 (edible vaccine)** 传染病严重威胁人类的生命和健康, 一直以来人类主要通过疫苗接种获得免疫预防。但在发展中国家, 昂贵的疫苗造成数百万人尤其是儿童依然死于传染病。目前利用植物作为生物反应器生产疫苗, 不仅极大地降低了疫苗的生产成本, 而且能使人 and 动物产生相应的免疫应答, 因此, 有助于疫苗的普及从而改善发展中国家人民的健康状况。目前在植物中表达的疫苗有几十种, 包括乙肝病毒表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HbsAg)、诺沃克病毒 (norwalkvirus) 外壳蛋白、大肠杆菌热不稳定肠毒素 B 亚基 (LT-B)、霍乱毒素的 A, B 亚基 (CT-A, B)、冠状病毒 (Coronavirus) 的免疫原糖蛋白 S 多肽、狂犬病毒糖蛋白、口蹄疫病毒 (foot-and-mouth-disease-virus) 抗原、水貂肠炎病毒抗原、犬细小病毒抗原等。如表 1-2 所示植物表达的具有开发前景的疫苗。植物疫苗在动物实验中已证明能够成功激发动物黏膜免疫应答和血清免疫应答, 使动物对致病原产生抵抗力, 但在人体中的免疫检测还不多, 只有少数几种植物疫苗进行了人体试验。Mason 实验小组让志愿者服用了包含 LT-B 的去皮马铃薯片, 受试者表现出黏膜和全身性免疫反应。Tacket 等将转诺沃克病毒外壳蛋白基因的马铃薯让 20 个志愿者服用, 结果 19 个人产生特异性 IgG, 6 个人产生特异性 IgA, 说明 95% 的人对诺沃克病毒产生了抵抗力。目前, 科学家正在进行植物源性的抗癌疫苗、

抗艾滋病疫苗、抗糖尿病疫苗以及利用植物生产加强免疫效应的辅助佐剂，以及在表达疫苗的植物受体、提高抗原表达水平及使用剂量等方面的较系统研究。

表 1-2 植物表达的具有开发前景的疫苗

| 目的产物                               | 表达系统           | 免疫方式  |
|------------------------------------|----------------|-------|
| 大肠杆菌热不稳定肠毒素 B 亚基 (LT-B)            | 烟草、马铃薯、玉米      | 口服    |
| 霍乱毒素 B 亚基 (CT-B)                   | 马铃薯            | 口服    |
| 乙肝病毒表面抗原 (HBsAg)                   | 烟草、马铃薯、莴苣      | 口服    |
| Norwalk 病毒衣壳蛋白                     | 烟草、马铃薯         | 口服    |
| 狂犬病毒 G 蛋白                          | 番茄             | 口服    |
| 口蹄疫病毒抗原 (FMDV-VP1)                 | 拟南芥、马铃薯、苜蓿、柱花草 | 注射或口服 |
| 肠胃炎冠状病毒糖化蛋白 S                      | 拟南芥、烟草、玉米      | 注射或口服 |
| 人源轮状病毒外壳蛋白 VP7                     | 马铃薯、番茄、番木瓜     | 口服    |
| 结核杆菌分泌蛋白 MPT64                     | 胡萝卜            | 口服    |
| 结核杆菌分泌蛋白 ESAT-6                    | 番木瓜            | 口服    |
| 水貂肠炎病毒抗原 (MEV-VP2)                 | 豇豆             | 注射或口服 |
| 炭疽病毒保护性抗原 (anthrax-PA)             | 烟草             | 注射或口服 |
| 麻疹病毒 H 蛋白 (measlesvirus H protein) | 烟草             | 口服    |

**3. 药用蛋白** 植物作为生物反应器除了可以生产抗体、疫苗外，还可表达细胞因子、酶及其他药用蛋白和生物活性肽等。转基因植物生产药物蛋白最早的例子之一是利用植物储藏蛋白天然的高水平表达特性生产人血清蛋白 (HSA)。HSA 是一种非糖基化蛋白，据估计全球每年需求量达到 550 t。通常，它是从人血中分离提纯，因此成本高昂，而且还要冒病毒污染的风险。现在，人们可以利用转基因植物得到更安全、价廉的人血清白蛋白以及白介素、干扰素等贵重药物蛋白。但是，利用植物生产细胞因子、酶、药用蛋白和生物活性肽等需要下游纯化，只有它占总可溶性蛋白 (total soluble protein, TSP) 的 1% 以上才有商业开发的價值。迄今已有几十种药用蛋白质或多肽在植物中得到成功表达，其中包括人的细胞因子、表皮生长因子、干扰素、生长激素、人血清白蛋白和人血红素  $\alpha$ 、 $\beta$  等 (表 1-3)。

表 1-3 在植物系统中表达的有药用价值的蛋白质

| 表达的蛋白质                  | 可能的应用   | 表达系统 | 表达水平       |
|-------------------------|---------|------|------------|
| 人蛋白质 C (血清蛋白酶)          | 抗凝剂     | 烟草   | <0.01% TSP |
| 人水蛭素                    | 凝血酶抑制剂  | 油菜   | 0.3% 种子蛋白  |
| 人红血球生成素                 | 治疗贫血症   | 烟草   | <0.01% TSP |
| 人促生长激素                  | 生长激素    | 烟草   | <0.01% TSP |
| 人表皮生长因子                 | 烧伤修复    | 烟草   | <0.01% TSP |
| 人 $\beta$ -干扰素          | 治疗乙肝和丙肝 | 烟草   | 0.01% 鲜重   |
| 人血清白蛋白                  | 治疗肝硬化   | 烟草   | 0.02% TSP  |
| 人血红素 $\alpha$ 、 $\beta$ | 血替代品    | 烟草   | 0.05% 种子蛋白 |

注：TSP，总可溶性蛋白。



## (二) 在食品领域中的应用

转基因植物在食品领域中的应用就衍生出“转基因食品 (transgenic food)”或“基因改良食品 (genetically modified food, GMfood)”。所谓转基因食品是指利用分子生物学手段, 将某些生物的基因转移到其他生物物种中, 使其出现原物种不具有的性状或产物。以转基因生物为原料加工生产的食品为转基因食品。目前, 作为食品的转基因生物以转基因植物为主。1985 年转基因鱼的出现, 揭开了基因工程技术在食品行业中应用的序幕。从此, 基因工程食品诞生了, 受到了全人类的关注, 并在人们的日常生活中占有越来越大的比重。据报道, 目前国际市场上以生物工程为基础的食品工业产值已达 2 500 亿美元左右。利用生物技术开发生产出新的食品, 如功能性食品、食品添加剂等。随着转基因技术在食品领域的突破和应用, 人类可以获得更符合人们需求的食品。它具有产量高、营养丰富、品质好等优势。近 10 多年来, 在农作物培育过程中利用生物技术大大提高了农产品的质量和产量。如基因修饰技术已经提高了马铃薯碳水化合物的含量, 改变了葡萄籽和花生的脂肪酸成分, 降低了木薯中氰化葡萄糖苷含量等。近年来又研究“金色大米”, 这种大米能诱导合成出维生素 A 前体物质。此外, 利用植物生产其他具有特殊用途的高新生物制剂, 如改性淀粉、脂类和其他次生代谢产物。美国科学家培育的高 C2 亚麻酸含量大豆、高色氨酸含量玉米, 加拿大科学家培育的高不饱和脂肪酸含量油菜, 对防止心血管疾病、皮肤保健和提高食品营养具有很好的利用价值。目前涉及食品原料的转基因农产品有大豆、玉米、油菜、马铃薯、番茄、甜椒、番木瓜、西葫芦等。

21 世纪的食品工业将是一个继续快速发展的行业。随着现代生物技术的进一步发展和应用, 食品行业发生变革是必然的趋势。但是, 为人类提供安全、富有营养、品质高、稳定性能好、价格合理以及方便食用等是必须考虑的众多因素, 尤其是转基因食品的安全性。虽然目前各国都有法规和条例用于规范转基因食品的试验和生产。但是, 加强转基因食品的安全问题, 保障人体的健康, 保护生态环境的任务任重而道远, 必须在大力发展生物技术的同时加以严格管理。

## (三) 在工业领域中的应用

利用转基因植物生产可降解塑料是最有说服力的工业应用例子。采用转基因技术将生物合成聚羟基烷酸酯所需的 *pha*、*phb* 及 *phc* 等多种基因构建于植物体内, 利用植物的自养功能在体内直接合成 PHAs (这类化合物统称为聚羟基烷酸酯, polyhydroxyalkanoates, 如 PHA、PHB、PHC)。孟山都公司已经研制出了可产生聚合物的基因改性油菜和十字花科植物, 这是生产生物降解塑料的第一步。Metabolix 公司也正在用植物作物生产生物可降解聚酯, 美国斯坦福大学 Somerville 的研究小组将微生物的可以生产生物降解塑料聚羟基丁酸酯 (PHB) 的基因转入拟南芥菜, 经过改造的基因提高了该基因表达水平 100 倍, 转基因的拟南芥菜植株生长和种子产量正常。Agracetus 公司的研究人员也在进行类似的研究, 他们将与 PHB 有关的基因转入棉花, 以生产生物降解塑料取代目前用石油作原料生产化工产品的传统方法。生物降解材料将广泛用于农用材料 (如农膜)、包装材料 (如食品包装袋)、环保材料 (如垃圾袋)、生物化工材料 (如高性能滤膜)、微电材

料（如用于热封闭元件的压力传感器）、能源材料（如生物柴油）及医用材料（如药物载体与外科缝合针）等各个领域，成为人类绿色生活与节约型经济的重要组成部分。

## 二、存在问题及解决策略

### （一）外源蛋白表达的水平低

对转基因植物植物疫苗来说，表达量必须达到较高水平，才能达到口服免疫的效果，而对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%，才具有商业开发价值。为了提高外源蛋白在植物细胞中的表达水平，科研工作者进行了如下工作：①蛋白质的靶向定位。如在叶绿体表达外源基因，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。②使用植物病毒作为表达载体，可大大提高外源基因的表达水平。③使用强启动子和组织特异性启动子，增强基因表达或特异组织中的表达量。④使用植物偏爱的密码子对密码子优化，植物中遗传密码子的使用频率与动物、微生物不同，适当地对外源基因的密码子进行替换能显著提高该基因在植物中的表达水平。⑤使用增强子序列，利用组织特异性的启动子，优化先导序列，能够提高外源基因的表达水平。⑥mRNA 中不稳定序列的除去。⑦通过修饰抗原蛋白基因序列将其定位于胞内部分（如液泡或内质网中）。⑧使用核基质附着区 MAR 序列，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。⑨通过协同表达二硫键或伴侣蛋白促进蛋白质的正确表达。

### （二）下游生产成本高

尽管植物生物反应器的上游生产成本比较低，但若涉及产物需要提纯，则费用昂贵。因此，在上游设计中应注意尽量简化下游的纯化成本。将外源蛋白多肽与植物油脂蛋白（oil-body）形成融合蛋白在植物中表达，油脂蛋白的亲脂性使之成为一种高效的多肽纯化系统。利用 GVGVP 作为融合蛋白（GVGVP 是一种人工合成基因编码的蛋白多聚体），只要一步即可纯化，这一方法已成功运用于胰岛素的纯化。另外，有发展前景的是利用毛状根系统生产外源多肽，即利用转基因植物将目标蛋白从植物根系分泌到液体培养基中，这一系统已成功地生产 Guy. s13 单克隆抗体（预防龋齿），产量可达 2.4 mg/L。此外，运用植物悬浮细胞培养系统也可减少下游的纯化成本。

### （三）安全性问题

目前，转基因产品的安全性存在争议，尤其在口服疫苗方面，这一争议就更加尖锐。例如在转基因研究中用于筛选阳性克隆使用的选择标记基因多数为抗生素抗性基因。因此，人们担心人食用这种转基因植物后也会产生抗生素抗性。另外，在植物抗体的研究中，抗体上都连有多聚糖，由于动物源的抗体中多为唾液酸，这在植物中缺乏，而植物中富含木糖，这在动物中不存在。因此人们怀疑不同的聚糖结构会对植物抗体的免疫原性和致敏性产生影响“这有待进一步的实验确证”同时，转基因植物具有潜在的破坏生态环境

的可能性。因此，制定和完善转基因植物的安全和管理法规尤为重要。

### 三、展 望

尽管转基因植物生物反应器仍存在一些问题尚待解决，但丝毫不影响转基因植物生物反应器的研究及产品开发的前景，更何况这些问题大多可望在不长时间内得到解决。利用植物表达系统已成功地表达了多种具有生理活性的外源多肽，而且有些已经进行了人体和动物的试验，其前景是可观的。尤其是利用转基因植物生物反应器研制动物可饲疫苗的研究应该先行一步。今后应该将重点放在胃、肠道传染病研究上。因为从技术上来说容易获得突破，从实际应用上价值也最大。而其他非胃、肠道传染病也可作探索性研究。从已报道的结果分析，有的病毒性传染病（如 FMD），获得成功的可能性很大。新世纪之初，“人类基因组测序计划”已宣布提前完成，人类社会已进入一个崭新的后基因组时代。可以预测，更多人类疾病的发病机理不久将被研究清楚，随之有更多的新药尤其是新的蛋白药物将被开发利用。而这些蛋白药物大多可能是更加复杂的蛋白质，需要更高等的真核细胞生产体系来生产，转基因植物生物反应器毫无疑问将成生产这些贵重蛋白药物的主导表达体系之一。因此，利用植物生物反应器将成为蛋白质和多肽的最具潜力的生产系统，为人类健康做出巨大的贡献。

### 参 考 文 献

- [1] 李元. 基因工程药物. 北京: 化学工业出版社, 2002
- [2] 马大龙. 生物技术药物. 北京: 科学出版社, 2001
- [3] 朱宝泉. 生物制药技术. 北京: 化学工业出版社, 2004
- [4] Dalsgaard K, et al. Plant - derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nat Biotechnol*, 1997, 15: 248~252
- [5] Hap TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*, 1995, 268 (5211): 714~716
- [6] Krebbers E, vandekerckhove L. Production of peptides in plant seeds. *Trends Biotechnol*, 1990, 8: 1~3
- [7] Kumagai M H, et al. Rapid, high - level expression of biologically active alpha - trichosanthin intransected plants by an RNA viral vector. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1993, 90: 427~430
- [8] Ma J K, Hiatt A, Hein M, et al. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science*, 1995, 268: 716~719
- [9] Mason H S, Man - kitLam D, Arntzen C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Nat Acad Sc USA*, 1992, 89: 11745~11749
- [10] Mason H S, Ball J M, Shi J J, et al. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1996, 93: 5335~5340



## 第二章 转基因植物生物反应器的技术方法

开展与植物生物反应器相关的新功能基因、新调控元件、新产品和新技术方法的研究，进行基因定点整合、产品安全与植物生物反应器的产业化相配套的关键技术研究，可为今后植物生物反应器应用的长期发展奠定工作基础。

### 第一节 转基因植物生物反应器的构建元件

#### 一、功能基因的选择及优化重组

##### (一) 功能基因的选择

目标功能基因的正确选用决定着植物生物反应器产物的应用前景。如利用植物生物反应器技术生产预防腹泻疫苗、乙肝疫苗、口蹄疫疫苗及肺结核疫苗，则选择在转基因植物中表达的病原基因主要有大肠杆菌热敏肠毒素 B 亚基 (LT-B) 基因、霍乱弧菌毒素 B 亚基 (CTB) 基因、乙肝表面抗原 (HBsAg) 基因、口蹄疫病毒 VPI 基因和结核杆菌分泌蛋白 MPT64、ESAT-6 等。其中研究得最多的是 LT-B。选用这些抗原基因主要基于以下 3 点理由：第一，有坚实的基础，特别是免疫原性和分子结构清楚。第二，有标准的检测方法可用。因为外源基因在转基因植物中的整合是随机性的，所以必须有灵敏准确、可靠的检测技术进行转化植株的筛选；在免疫试验中，还要检测血清和黏膜抗体的反应水平。如果没有成功的检测方法，是无法进行此项研究的。第三，有广阔的应用前景。这几种植物疫苗一旦研究开发成功，即具有广阔的世界市场，特别适用于广大发展中国家。用于医用蛋白表达的基因主要有干扰素  $\alpha$ -2b 基因等，用于工农业原料生产的基因如可降解塑料的 *pha*、*phb* 基因等。

##### (二) 优化重组基因

目的功能基因选择后，就应重点考虑提高重组基因在植物组织中表达量的问题。已有许多方法用来优化重组基因的结构，使其能更适合在某种特定的植物中高效表达。

**1. 使用信号肽序列** 在目的基因的 3'端加上微粒体保留信号 SEKDEL 多肽序列，使合成的蛋白能保留在细胞的内质网部位，不会分泌出来，从而提高产量。

**2. 选择特异启动子** 花椰菜花叶病毒 35 s 启动子是一个常用的启动子，适合多种植物。对马铃薯来说，Patatin 启动子更为适合；在启动子 3'端加上烟草蚀刻病毒 5'端的非翻译区也是一种提高表达的方法。

**3. 使用(校正)偏爱密码子** 编码甘氨酸的 GGG 在单子叶植物基因组中非常少见，因此，将插入基因中的这一编码改为 GGA 是一种更适合在植物中表达的方法。

4. 其他方法 包括除去虚假的 mRNA 加工信号、减少 A-T 含量等。

## 二、植物表达载体

### (一) 载体种类及其特性

1. 植物遗传转化的载体系统 作为植物遗传转化的载体必须是能进入宿主细胞内进行复制和表达的核酸分子。目前的载体系统有病毒的载体系统和质粒的载体系统两大类。

(1) 病毒载体系统 植物病毒作为植物遗传转化的载体系统是由植物病毒的侵染特性所决定的。以病毒作载体的表达系统为瞬时表达系统，其一般不能把外源基因整合到植物细胞基因组中。植物病毒的感染率很高，在较短时间内可获得较大的表达量。但因以病毒为载体的表达系统每个宿主材料都要接种病毒载体，故瞬时表达系统不易起始。作为病毒载体的病毒最好是双链 DNA 植物病毒。目前已有十种植物病毒被改造成不同类型的外源蛋白表达载体，其中包括椰菜花叶病毒 (CaMV)、烟草花叶病毒 (TMV)、豇豆花叶病毒 (CPMV) 和马铃薯 X 病毒 (PVX) 等。在 TMV 载体中成功表达的外源病毒至少有 150 种以上。植物病毒被用作转移外源基因的载体，因病毒基因组一般较小，允许插入的外源基因的大小受到一定的限制。

(2) 农杆菌质粒载体系统 农杆菌质粒是一种能实现 DNA 转移和整合的天然系统。植物遗传转化中最常用的农杆菌质粒载体是 Ti 质粒和 Ri 质粒。20 世纪 70 年代中期，比利时和美国的几个研究小组证明了致瘤农杆菌均带有染色体外的、共价闭合的环状 DNA 质粒，37℃ 条件培养的细菌会丢失这类质粒。同时，也丧失了致瘤能力。细菌间结合可将这类质粒转移到不含质粒的菌株中，使后者获得致瘤能力。这类肿瘤诱导质粒 (tumor inducing plasmid) 可简称为 Ti 质粒。另外，还有一种发根农杆菌，它可在植物感染部位诱导形成另一种形态的肿瘤，即发状根，被称之为根诱导质粒 (root inducing plasmid)，简称 Ri 质粒。Ti 和 Ri 质粒在结构和功能上有许多相似之处。Ti 和 Ri 质粒的大小均为 200~800 kb，均属巨大质粒，它们都有两个与致瘤有关的区域，即致瘤区 (Vir 区，编码能够实现 T-DNA 转移的蛋白) 和可转移 DNA 区 (T-DNA，是质粒上能够转移整合入植物受体细胞核基因组并能在植物细胞中表达从而导致冠瘿瘤的发生，且可通过减数分裂传递给子代的区域)。在 Ti 和 Ri 质粒 T-DNA 长度为 12~24 kb 之间，其两端均有相似的 25bp 的顺向重复边界序列，在整合过程中左右边界序列之间的 T-DNA 可以转移并整合到宿主细胞基因组中。研究发现，只有边界序列对 DNA 的转移是必需的，而边界序列之间的 T-DNA 并不参与转化过程，因而可以用外源基因将其替换。Ti 和 Ri 质粒的 Vir 区的许多基因参与 T-DNA 的加工和 T-DNA 从细菌转移进植物细胞核的过程。Vir 区位于 T-DNA 以外的一个 35 kb 内，其产物对 T-DNA 的转移及整合必不可少。农杆菌侵染植物首先是吸附于植物表面伤口，受伤植物分泌的酚类小分子化合物可以诱导 Vir 基因的表达。Vir 产物能诱导 Ti 质粒产生一条新的 T-DNA 单链分子。此单链分子从 Ti 质粒上脱离后，可以与 Vir 产物 VIRD2 蛋白共价结合，并在 VIRD4 和 VIRB 等蛋白的帮助下从农杆菌进入植物细胞的染色体中。

除去致癌基因的 Ti 质粒是植物遗传转化中最常用的载体，即切除 T-DNA 上与肿瘤有关的基因，仍保持完整基因转移所必需的 Vir 区和 T-DNA 边界序列。为使这种改建的质粒在植物遗传转化中有效地发挥作用，一般在 T-DNA 上插入一个选择性标记，通常采用抗菌素抗性标记，由一个真核型全程表达的启动子驱动。这样，人们可以在加有相应选择因子的培养基上选择出转化细胞，并得到正常生长的转基因植物。目前，植物遗传转化大多采用农杆菌介导的方法。农杆菌介导的植物遗传转化所用的载体大致有两类：①共整合载体（contegrating vector，又称一元载体），这类载体系统由一个共整合系统中间表达载体与改造后的受体 Ti 质粒组成。在农杆菌内，通过同源重组将外源基因整合到修饰过的 T-DNA 上，形成可穿梭的共整合载体，在 Vir 基因产物的作用下，完成目的基因向植物细胞的转移和整合。但这类方法构建困难，整合体形成率低，一般不常用。②双质粒载体（binary vector，又称二元载体），把转化过程中起重要作用的 Vir 区仍保留在 Ti 质粒上，而 T-DNA 及其边界序列置于一个较小的易操作的质粒上。这个小质粒可以穿梭于大肠杆菌和农杆菌之间。所有的基因重组过程可以在大肠杆菌内进行，免去了直接操作巨大的 Ti 质粒而带来的麻烦。（图 2-1）显示了共整合载体（一元载体）、双质粒载体（二元载体）及其介导的遗传转化途径。

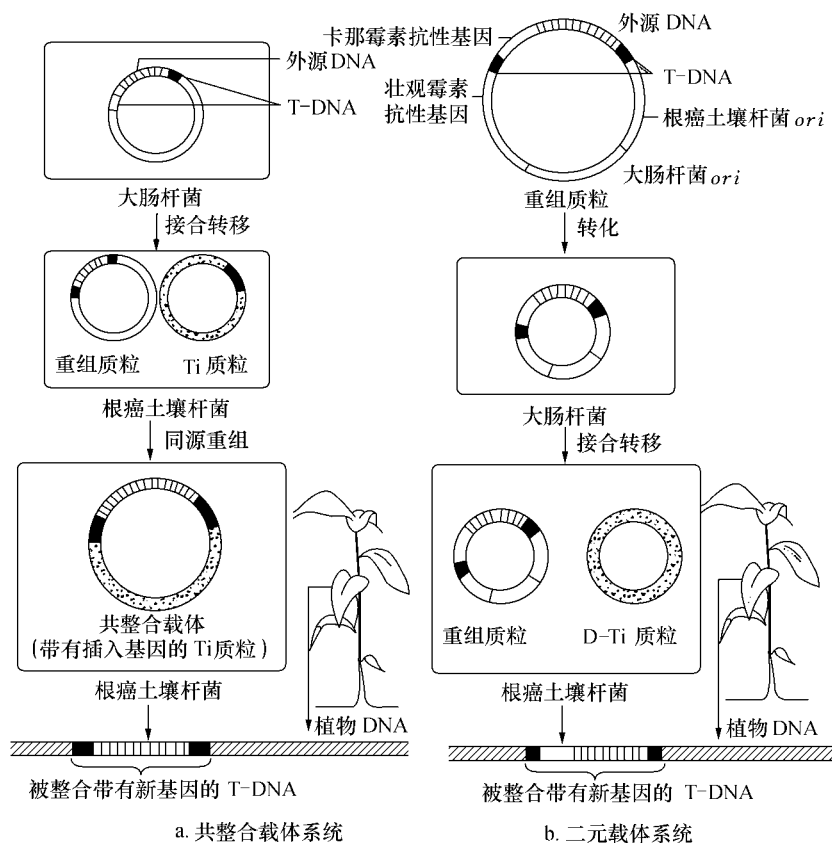


图 2-1 共整合载体（一元载体）、双质粒载体（二元载体）及其介导的遗传转化途径

农杆菌介导的植物遗传转化可以把带有外源 DNA 的 T-DNA 整合到植物细胞的基因组中,从而遗传给后代。而且 T-DNA 中允许插入的 DNA 片断较大,可达 50 kb。前些年,农杆菌介导的植物遗传转化仅限于一些双子叶植物。近年来,单子叶植物如水稻的农杆菌介导的植物遗传转化也取得了突破性进展。

**2. 植物遗传转化载体与农杆菌工程菌株构建** 在实际工作中,改建的 Ti 质粒 pBI121 中 T-DNA 区的致瘤基因为 pBR 质粒所取代。外源基因通过 DNA 重组技术克隆在大肠杆菌的 pBR 质粒上,随后通过 1 次同源交换即可把外源基因插入 pGV3850 的两边界序列之间,而与外源基因相连的抗菌素标记即可用为选择标记。当此带外源基因的 Ti 质粒的农杆菌感染植物细胞时,T-DNA 边界顺序之间的整个顺序可被整合进植物的核基因组。

常用的 Ti 质粒载体系统为双质粒载体。载体构建的具体操作:将 Ti 质粒的 T-DNA 及其边界先组装在一个较小的易操作的微小质粒(mini Ti)上,然后使 DNA 缺失,而将外源基因连同调控顺序插到边界顺序之间,这个质粒转化到农杆菌并自我复制。而 Ti 质粒的 Vir 区组装在另外一个质粒上,同存于农杆菌细胞内。在感染植物后,由于一个质粒的 Vir 区基因的作用,使另一质粒(mini Ti)上的边界顺序及其之间的外源基因整合到植物的核基因组中。这种构建的依据是在 T-DNA 转移过程中,Vir 基因并不一定与 T-DNA 处于同一个质粒上。

中间载体的构建基于大肠杆菌具有能与农杆菌高度接合转移的特性,研究者们将 T-DNA 片段克隆到大肠杆菌的质粒中,并插入外源基因,最后通过接合转移把上源基因引入到农杆菌的 Ti 质粒上。这是一种把预先进行亚克隆、切除、插入或置换的 T-DNA 引入 Ti 质粒的有效方法。带有重组 T-DNA 的大肠杆菌质粒的衍生载体称为“中间载体”(intermediate vector),而接受中间载体的 Ti 质粒则称为受体 Ti 质粒(acceptor Ti plasmid),一般是卸甲载体(disarmed vector)。所谓卸甲载体就无毒 Ti 质粒载体。因为利用野生型的 Ti 质粒作载体时影响植株再生的直接原因是 T-DNA 中 onc 基因的致瘤作用。因此,为了使野生型的 Ti 质粒成为基因转化的载体,必须切除 T-DNA 的 onc 基因,而“解除”其“武装”,构建成所谓的“卸甲”或称“缴械”载体。在这种 onc-载体中已经缺失的 T-DNA 部分被大肠杆菌的一种常用质粒 pBR322 取代。这样任何适合于克隆在 pBR322 质粒的外源 DNA 片段都可以与 pBR322 质粒 DNA 同源重组,而被其整合到 onc-Ti 质粒载体上。中间载体通常是多拷贝的 *E. coli* 小质粒,这一点对 Ti 通过体外操作导入外源基因是非常必要的。

将微型质粒转入到含有辅助性 Ti 质粒农杆菌的途径有两条:一条是直接纯化的微型 Ti 质粒转化速冻的根癌农杆菌感受态细胞;另一条是采用三亲交配方法,三亲交配由含微型 Ti 质粒的 *E. coli*、含有助动质粒 pRK2013 的 *E. coli* 和含有辅助 Ti 质粒的农杆菌组成。三细菌混合后产生菌间的接合转导。pRK2013 可移入农杆菌,但由于不能自主复制而被丢失,其进入含有微型 Ti 质粒的 *E. coli* 后,可促进微型 Ti 质粒一起或分别转移入农杆菌中。但由于 pRK2013 的“自杀”特性,最终在农杆菌中剩下微型 Ti 质粒和 Ti 质粒二元载体,此农杆菌可直接用于植物细胞转化。二元载体不需经过两个载体的共整合过程。因此,构建的操作过程比较简单。由于微型 Ti 质粒较小,并无共整合过程,因此,质粒转移到农杆菌比较容易,且构建的频率较高。此外,二元载体在外源基因的植物转化

中效率高于共整合载体。故常被使用。

## (二) 重要的表达调控元件——启动子

植物生物反应器的关键技术是提高外源基因在转基因植物体内的表达量或相关产物的产量，而在此技术中启动子扮演了重要的角色。启动子的使用种类要依转化对象及产物形式进行合理选择。因此，有必要对启动子的遗传背景及其结构功能进行详细了解。

**1. 启动子及其基本构造** 启动子是位于结构基因 5' 端上游的一段 DNA 序列，能够指导全酶 (holoenzyme) 同模板正确结合，活化 RNA 聚合酶，启动基因转录。全酶是指酶蛋白及其辅酶构成的有功能的复合物。RNA 聚合酶的核心酶虽可合成 RNA，但不能找到模板 DNA 上的转录起始位点，只有带  $\sigma$  因子的全酶才能专一地同启动子结合。RNA 聚合酶沿着模板前进，直到终止子，转录产生一条 RNA 链。通常把基因转录起点前面即 5' 端的序列称为上游 (upstream)，起点后面即 3' 端的序列称为下游 (downstream)，并把起点的位置记为 +1，下游的核苷酸依次记为 +2, +3, …, 上游方向依次记为 -1, -2, -3, …。

RNA 聚合酶同启动子结合的区域称为启动子区。将各种原核基因同 RNA 聚合酶全酶结合后，用 DNase I 水解 DNA，最后得到与 RNA 聚合酶结合而未被水解的 DNA 片段。这些片段有一个由 5 个核苷酸 (TATAA) 组成的共同序列，以其发现者的名字命名为 Pribnow 框 (Pribnowbox)，这个框的中央位于起点上游 10 bp 处，所以又称 -10 序列 (-10 sequence)，后来在 -35 bp 处又找到另一个共同序列 (TTGACA)。Hogness 等在真核基因中又发现了类似 Pribnow 框的共同序列，即位于 -25 ~ 30 bp 处的 TATA-AAAG，也称 TATA 框 (TATAbox)。TATA 框上游的保守序列称为上游启动子元件 (upstream promoter element, UPE) 或上游激活序列 (upstream activating sequence, UAS)。另外在 -70 ~ -78 bp 处还有一段共同序列 CCAAT，称为 CAAT 框 (CAATbox) 原核生物中 -10 区同 -35 区之间核苷酸数目的变动会影响基因转录活性的高低，强启动子一般为  $17 \pm 1$  bp，当间距小于 15 bp 或大于 20 bp 时都会降低启动子的活性。

在真核基因中，有少数基因没有 TATA 框。没有 TATA 框的真核基因启动子序列中，有的富集 GC，即有 GC 框；有的则没有 GC 框。GC 框位于 -80 ~ -110 bp 处的 GC-CACACCC 或 GGGCGGG 序列。TATA 框的主要作用是使转录精确地起始；CAAT 框和 GC 框则主要是控制转录起始的频率，特别是 CAAT 框对转录起始频率的作用更大。如在 TATA 框同相邻的 UPE 之间插入核苷酸，也会影响转录使之减弱。

为什么 RNA 聚合酶能够仅在启动子处结合呢？显然启动子处的核苷酸顺序具有特异的形状以便与 RNA 聚合酶结合，就好像酶与其底物的结构相恰恰适合一样。将 100 个以上启动子的顺序进行了比较，发现在 RNA 合成开始位点的上游大约 10bp 和 35bp 处有两个共同的顺序，称为 -10 和 -35 序列。这两个序列的共同顺序如下：-35 区 “AATGT-GTGGAAT”，-10 区 “TTGACATATATT”。大多数启动子均有共同顺序 (consensus sequence)，只有少数几个核苷酸的差别。在原核生物中 -10 序列又称为 Pribnow 盒。在真核生物中相应的序列位于 -35 bp 处，称为 TATA 盒，又称为 Goldberg-Hognessbox，是 RNA 聚合酶 II 的结合部位。-10 和 -35 这两个部位都很重要：① RNA 聚合酶能和



—35和—10序列中的碱基和DNA主链中的磷酸基相接触；②离开共同顺序较远的启动子的活性亦较弱；③最重要的是，破坏启动子功能的突变中有75%都是改变了共同顺序中的碱基，其余25%亦为离共同顺序较近。—35和—10序列相距约20 bp，即大致是双螺旋绕两圈的长度。因为这两个结合区是在DNA分子的另一侧面，可见此酶是结合在双螺旋的一面。可以想像，它能“感觉到每个结合区的沟底中碱基所产生的特异形状”。

原核生物亦有少数启动子缺乏这两个序列（—35和—10）之一。在这种情况下，RNA聚合酶往往不能单独识别这种启动子，而需要有辅助蛋白质的帮助。可能是这些蛋白质因子与邻近序列的反应可以弥补启动子的这个缺陷。

在真核生物中，在转录起始位点上游—70~—80 bp处有CAAT顺序，也称为CAAT盒。这一顺序也是比较保守的共同顺序：GCCTCAATCT。RNA聚合酶可以识别—顺序。近年来在对家兔 $\beta$ 珠蛋白基因CAAT顺序的研究中发现，用人工方法诱导CAAT顺序发生突变，使家兔 $\beta$ 珠蛋白基因的转录水平降低。

启动子中的—10和—35序列是RNA聚合酶所结合和作用必需的顺序。但是，附近其他DNA顺序也能影响启动子的功能。例如，在核糖体RNA合成的起始位点的上游—50到—150核苷酸之间的顺序就是对启动子的完全活性所必需的。如果这一段DNA顺序缺失，并由其他外来DNA所取代（例如克隆在质粒DNA中的rRNA基因），则转录起始的频率将降低90%。同样，在其他情况下，远隔部位的富有AT的DNA顺序被认为能增进转录起始的频率。有时候上游顺序可以是某些能直接激活RNA聚合酶的“激活蛋白”的结合部位。但是，上游顺序往往有另外的功能。例如上游顺序可以吸引拓扑异构酶，后者可导致结合的局部产生有利转录起始的超螺旋状态。上游顺序所引起的DNA结构的微细变化可能在双螺旋上被传导到相当远的距离。因此，上游顺序的变化可以影响—10和—35区的DNA结构细节。

**2. 植物启动子研究** 植物基因的表达是在DNA水平、转录水平、转录后水平、翻译水平及翻译后水平等多个层次进行调控的。其中转录水平的调控最经济有效，它是植物基因表达最重要的调节方式。植物基因工程中对外源基因的表达调控，主要通过不同的植物表达载体中的调控元件来实现，而植物表达载体中的启动子对外源基因的调控是转录调控中最主要的环节。

组成型启动子是植物基因工程中应用最早、最广泛的一类启动子，特点是表达具有持续性、无器官和组织特异性，表达量一般较高。然而，许多情况下，组成型启动子不适合基因工程的应用。如，高表达转录因子类基因对植物的生长发育往往产生严重干扰，影响其在农作物的转基因育种方面的应用；在利用植物的特化反应器官作为植物反应器时，器官特异性表达启动子将更加经济、高效；在农作物品质改良方面，常需要组织器官特异性或发育时期特异性的启动子。因此，对不同启动子及其调控元件的深入研究，将使我们可以根据需求选择合适的启动子或合成新启动子用于植物基因工程的研究。

**3. 启动子的基本组成** 启动子是指一段可与RNA聚合酶及其他一些影响转录的反式因子结合而准确有效地起始基因转录的DNA序列。真核启动子包括基本的核心启动子（core promoter）部分和其他顺式作用元件（*cis*-acting DNA sequences）。

核心启动子通常只需30~60个碱基，包括TATAbox、转录起始位点（initiator，

Inr)、TFIIB 识别元件 (BRE) 和下游启动子元件 (downstream core promoter element, DPE) 等基序 (sequence motifs)。但并非所有的核心启动子都包含这些基序。似乎没有一个基序是完全通用的。

核心启动子是 RNA 聚合酶, 是转录机器的作用位点。RNA 聚合酶的基础转录活性需要多种辅助因子的参与, 如, TFIIA、TFIIB、TFIID、TFIIE、TFIIF 和 TFIIF 等也被称为基本转录因子。RNA 聚合酶与基础转录因子和核心启动子共同构成了基本的转录复合物。

除核心启动子外, 其他顺式作用元件包括最接近启动子 (proximal promoter)、增强子 (enhancer)、沉默子 (silencers) 和边界序列或绝缘子 (boundary/insulator)。最接近启动子是指转录起始位点附近 ( $-250 \sim +250$  nt) 的部分。增强子和沉默子可以出现在远离转录起始位点几千 bp 的地方, 激活或抑制基因的转录。边界序列或绝缘子则限定了增强子和沉默子的作用区域。这些元件提供了各种序列特异的 DNA 结合因子的识别位点。这些 DNA 结合因子的复杂组合以及与 RNA 聚合酶 II 复合物的相互作用, 赋予了启动子多样性的时空表达特性。根据启动子的表达特性, 可将其分为组成型启动子、组织特异性启动子和诱导型启动子。

**4. 组成型 (constitutive) 启动子** 组成型表达的启动子调控下的基因表达水平大体恒定, 在多数植物组织中均可以表达, 而且在不同组织部位表达水平也没有明显差异, 所以, 又称为非特异性表达组成型启动子。目前, 在植物基因工程上常用组成型启动子有花椰菜花叶病毒的 35S 启动子 (Benfy, 1990) 及其衍生的一些启动子、农杆菌胭脂碱和章鱼碱合成酶基因的 NOS 启动子和 OCS 启动子、水稻肌动蛋白-1 启动子 (Act-1) (McElroy, 1990) 以及玉米泛素-1 启动子 (Christensen, 1992) 等。从结构上看, 大多数组成型启动子转录起始位点上游几百个核苷酸处, 存在有六聚体花纹 (hexamer motifs) 序列 TGACTG (Weising, 1991), 该序列往往以重复形式出现并被 5~8 个核苷酸隔开。缺失及定点突变分析结果表明, 六聚体花纹序列的存在对维持 CaMV35S 启动子、NOS 启动子和 OCS 启动子的转录活性是必要的。目前已分离了与六聚体花纹相互作用、编码转录活化因子的基因。为了使外源目的基因在植物中持久、高效地表达, 以充分发挥外源基因表达产物的功能, 一般都使用组成型启动子。目前使用最广泛的组成型启动子是花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子和来自根癌农杆菌 Ti 质粒 T-DNA 区域的胭脂碱合酶基因启动子 (NOS) 和章鱼碱合酶基因启动子 (OCS)。在植物抗虫基因工程中已用到的组成型启动子有 CaMV 35S 启动子、MAS、Ubi-1、Act-1 和 PHAL-1 等启动子 (Schuler, 1998)。

(1) CaMV35S 启动子 CaMVM 35S 启动子来自花椰菜花叶病毒 (CaMV), 由于启动整个 CaMV 基因组所得到的转录产物的沉降系数为 35S, 故将编码该转录产物的启动子称为 35S 启动子。35S 启动子的结构已经清楚, 即为起始于 CaMV 35S RNA 转录起始点 -941 至 +208 的 Bgl II 片段, 包括 TATA 盒、CAAT 盒、反向重复序列和增强子核心序列四个部分。CaMV 35S 启动子的活性主要决定于 -343 至 -46 区域 (Odell, 1985)。Fang 等 (1989) 通过缺失研究表明, 该区域可被再分为三个部分: -343 至 -208、-208 至 -90、-90 至 -46。前两部分能增强转录活性, 第三部分本身没有什么活性, 它只是作为前两部分的辅助成分而起着增强转录的作用。CaMV 35S 启动子的 -209 至 -46

片段的单拷贝或多聚体可以增强异源启动子的转录活性。在该启动子的-46至-105区段存在增强子序列,在-75处含有一个六个核苷酸TGACGT的重复的花纹结构,如果突变这一序列,将引起核因子与其结合力下降,导致启动子表达能力减弱。增强子核心序列与动物的增强子相同,即GTGG/TTTG。通过对35S启动子的研究表明,该启动子可以划分为两个区域(domain):从-90至+8为A区域,主要负责在胚根、胚乳及根组织内表达(Benfey和Chua,1989);区域B(-343至-90)主要控制所驱动基因在子叶、成熟植株的叶组织及维管束组织内表达。在B区域内的增强子序列可以提高表达水平。如果35S启动子中存在两个B区将能使35S启动子的活性提高10倍(Kay,1987)。B区域内的增强子对异源启动子也有作用。值得注意的是,对某些启动子而言B区充当一个表达的阻遏因子。

(2) Nos和Ocs启动子 来自根癌土壤杆菌的胭脂碱合酶基因(Nos)和章鱼碱合酶基因(Ocs)启动子具有与植物基因启动子相似的共有序列(consensus sequence)。这两个启动子都含有TATA盒同源的序列,该序列位于转录起点上游30~40bp处;上游60~80bp处也有类似的CAAT盒序列。已有研究表明,Nos和Ocs启动子也有一定的创伤诱导和激素诱导活性(An,1989),含有由六个聚体花纹组成的反向重复序列,中间由八个核苷酸序列隔开。六聚体花纹序列可以与亮氨酸拉链蛋白因子(调节因子)相互作用,该序列对诱导其活性是必须的。另外还发现,Nos启动子的强度依组织部位及器官位置不同而异,在老组织内通常比幼嫩组织中强,在繁殖器官内其表达强度随发育状态而异。值得注意的是,Nos启动子在禾本科植物中几乎没有启动表达能力或能力很弱。

(3) 双向启动子(dual promoter) 在TR-DNA上有5个基因,从基因1和基因2之间分离出一个具有启动子作用的479bp片段,它能以两个相反的方向启动转录,表现出双向启动子的作用。其结构和作用特点:①组成型表达;②由于在479bp片段中包含两个不同的启动子,故它与 $npt$  II及另一个目的基因融合后,将使选择标记基因与目的基因之间的距离最短,因此,将大大降低仅有标记基因被整合而丢失目的基因的机率;③由于两个嵌合基因在5'末端直接相连,故影响其中一个基因转录效率的因素也同样会影响另一个基因的有效表达。这样,抗性标记的选择将与目的基因的选择呈现出很高的协同性。

(4) 玉米泛激素1基因启动子 玉米泛激素1(maize ubiquitin 1, Ubi-1)基因Ubi-1的启动子驱动外源基因在转基因单子叶植物中组成型强表达。Cornejo等(1993)用带有第一外显子和第一内含子的Ubi-1启动子与 $gus$ 基因的编码区构建嵌合基因Ubi-1- $gus$ 后转入水稻,结果 $gus$ 基因在转基因水稻植株的绝大多数组织中强表达,并且其表达水平随着转基因水稻植物的生长发育有较大的变化。受热胁迫时,Ubi-1- $gus$ 在水稻原生质细胞和转基因愈伤组织中的表达水平都升高。Rao等(1998)和Duraialagaraja等(1998)使用Ubi-1启动子驱动 $gna$ 基因在转基因水稻中组成型表达,结果水稻植株上稻褐飞虱的存活率降低了约45%。

**5. 组织特异性(tissue-specific)启动子** 组织特异性启动子也称之为器官特异性(organ-specific)启动子。这种启动子调控基因只在某些特定的组织部位或器官中表达,并往往表现出发育调节(developmental regulation)的特性。这种特异性通常以特定的组



织细胞结构和化学、物理信号为基础。因此，这类转录调控序列与诱导型启动子有一定的共同点。

在抗虫基因工程研究中，为了使外源基因在受体生物中高效表达，必须借助高活性的启动子。但在许多情况下，外源基因在受体植物中非特异性地持续、高效表达，不但造成浪费，而且也为耐受害虫种群的产生提供了持续的选择压力。为了更经济、更有效地发挥外源基因的作用，避免基因产物对受体生物及环境产生副作用，针对害虫侵害部位的不同，选择组织或器官特异性启动子，如韧皮部特异、块茎特异、叶特异、种子特异和根特异等启动子，使抗虫基因只在特定的组织或器官中表达，可以更为有效地达到抗虫的目的。研究基因表达的特殊形式，以最终实现按人们的意愿定时、定位乃至定量地在生物体中表达外源基因的研究正成为现代分子生物学的热点之一。所以，在以后的植物抗虫、抗病基因工程研究中，这类启动子将会越来越广泛地得到应用。

对组织特异性启动子的结构已进行了较为深入的研究，发现它们除了具备一般启动子的结构特点之外，还具有一些特殊的结构。如 AT 富含序列 (AT-rich sequence)：该序列一般都有核心基序 ATTA (T) AAT，且它一般都与转录活性有关。在大多数启动子中 AT 富含序列都和基因表达的正调控有关。但也有关于 AT 富含序列作为负调控因子的报道。组织特异性序列：启动子中控制基因组织特异性表达的序列一般位于 TATA box 的上游，且紧靠 TATA box。决定组织特异性的序列一般不超过 30 bp，且通常不同种属的相同基因的启动子具有保守的基序 (Keller 等，1989；Scherthner 等，1988)。这一特点为开展植物基因工程研究带来了便利条件。沉默区 (silence region)：该区是启动子的一段序列，它和相应反式作用因子结合后可阻断增强子及反式激活因子的作用。在大豆查尔酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 基因启动子中，沉默区包含有三个 SBF (silencer binding factor) 因子的结合位点，SBF-1 因子结合后起抑制子的作用。沉默区的缺失不会引起基因表达水平的下降 (Lawton 等，1991)。

根据启动子在植物体中的活性部位不同，已报道的组织特异性 (tissue-specific) 启动子分为如下 4 类：

(1) 韧皮部组织特异性启动子 由于韧皮部组织是许多植物病原微生物及害虫侵害植物的靶组织，因此，利用韧皮部特异启动子使抗病、抗虫基因在韧皮部高效表达，有助于防治病虫害。已发现的韧皮部特异启动子有竹节花黄斑驳病毒启动子、笋瓜 *pp2* 基因启动子、玉米和水稻蔗糖合酶基因启动子、豌豆谷氨酰胺合酶基因启动子等。

(2) 块茎组织特异性启动子 马铃薯块茎蛋白 Patatin 由多基因家族编码，通常只在块茎中表达。该基因家族中有些基因的 5' 端上游区调控序列与马铃薯块茎蛋白的组织特异性表达有关。Wenzler 等 (1989) 研究了马铃薯 Patatin 启动子，发现它可驱动 *gus* 基因在转基因马铃薯的块茎中高水平表达。

(3) 花药特异性 (anther-specific) 启动子 番茄的晚期花药基因 *Lat52* 和 *Lat59* (Eyal 等，1995)、烟草的花药表达基因 *Ntp303* (Koltunow, 1990)、烟草花药绒毡层中特异表达的 *TA29* 基因 (Seurinck, 1990) 和玉米的花药表达基因 *Zm13* (Hamilton 等，1992) 都是花药特异性表达的，它们皆含有花药特异性启动子。这类启动子皆含有一个 30~32 bp 的花药特异性元件，位于 TATA 盒上游 -20~-40 bp。在花药特异性元件的

上游还存在类似增强子作用的特异序列，能增强基因在花药组织中的表达，被称为数量元件。此元件在 Zm13 启动子中为 AGGTGC，在 Lat52 启动子中为 TGGTTA，在 Ntp303 启动子中为 AAATGA。数量元件的增强作用局限于花药中，在其他组织中无效，并且其作用不能被 CaMV35S 增强子等其他增强子元件所代替。使用花药特异启动子可驱动外源基因在转基因植物的花药中特异表达从而实现特殊的功能（Hamilton 等，1998）。

(4) 果实特异性 (fruit-specific) 启动子 番茄 E4 基因与果实成熟有关。外源乙烯可迅速诱导其在未成熟的果实和叶中表达 (Lincoln 和 Fischer, 1988)，E4 基因启动子具有果实特异性。番茄 E8 基因在叶中表达较弱，而在果实和花药中有高水平的表达，其启动子也是果实特异性的。番茄多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 基因 *Pg* 在非成熟果实中不表达，其 mRNA 只在果实成熟过程中才能被检测到 (Sheehy 等, 1987)；*Pg* 基因的 4.8 kb 启动子片段可驱动报告基因在转基因植物的果实成熟过程中高水平表达 (Nicholass 等, 1995)。

**6. 诱导型 (inducible) 启动子** 诱导型启动子是指在某些物理或化学信号的刺激下，这类启动子所驱动的目的基因的转录水平可以大幅度地提高，因此，也称为诱导型增强子。诱导型启动子具有的特点：①受物理或化学信号的诱导；②含有诱导特异性序列；③含有增强子和沉默子或类似功能的序列元件；④某些诱导型启动子同时也是组织特异性启动子；⑤常以诱导信号命名，可分为光、热、冷、创伤、生长素诱导启动子和真菌诱导启动子等。

(1) 伤诱导 (wound inducible) 启动子 植物损伤后会产生一些小分子物质和多糖成分，这些物质进一步作为损伤信号诱导一系列防御基因的表达，如马铃薯蛋白酶抑制-II 基因 (*Pi-II*) 等，从而抵抗昆虫和其他病原菌对植物的再度攻击。

(2) 光诱导启动子 植物的两个光合基因核酮糖二磷酸羧化酶小亚基 (*SSrbc*) 基因 *rbcS* 和光捕获复合物 a/b 结合蛋白 (*LHCP a/b*) 基因皆含有光诱导启动子，受光的调节。Shell 等 (1987) 使用豌豆 *rbcS* 基因的 973bp 启动子片段驱动 *Cat* 报告基因在转基因植物中的表达表现出叶绿体依赖性和光的诱导活性。

(3) 化学物质诱导启动子 (chemicals inducible promoter) 许多化学物质如酸、碱、水杨酸、脱落酸、茉莉花素等，以及各种植物激素都能影响或诱导植物基因的表达。

(4) 乙烯诱导启动子 乙烯是一种植物内源激素，它能影响植物生长发育的许多方面。生物体内控制乙烯生物合成的基因在特定的发育时期，如果实成熟期、花瓣衰老期或受到病菌感染时可以被诱导表达 (Abeles 等, 1992)。目前，在各种植物中发现的由乙烯诱导表达的基因已有上千种。在这些种类不同的基因中研究得最多的是类防御基因，当有病原菌入侵时，乙烯能激活这类基因的表达。而目前研究的重点主要是使用外源乙烯诱导表达编码 I 类基本几丁质酶 (class I basic chitinase)，I 类 p-1,3-葡聚糖酶 (class I p-1,3-glucanase) 和其他一些基本类型的致病相关蛋白 (basic-type pathogenesis-related protein)。对这些诱导基因的启动子的功能序列分析发现，当受到病菌侵染时乙烯诱导表达的防御基因的启动子与果实成熟或衰老时乙烯诱导表达的基因的启动子不同。在这些防御基因的启动子中的相似区域都有一个共同的高度保守的特异序列 AGCCGCC，因该元件是由 GCC 基序重复而成，故将其命名为 GCC 盒。又因为该序列的功能是响应乙烯

诱导的调控元件，因此，又将它命名为乙烯响应元件（ethylene - responsive element, ERE）。在转基因番茄中，该元件足以使报告基因的表达接受乙烯的诱导（Shinshi 等，1995）。试验证实与 GCC 盒相互作用的乙烯响应元件的结合因子是一类翻译因子。该因子在细胞外信号的诱导下正负调控 GCC 介导的基因表达（Masaru 等，2000；Ohme T. M. 等，2000）。

Dof 蛋白家族是一个植物翻译因子的大家族，它们都有一个高度保守的锌指结构。在烟草中发现有一种 Dof 蛋白——NtBBF1，它的显著特点是其能特异性地识别并结合肿瘤基因：olB 启动子中的结构域 B（domain B），而 rolB 基因除了能特异性地在顶端分生组织和维管束组织中表达外，还能在生长素的诱导下表达。这就是说该基因的启动子既是顶端分生组织和维管束特异性启动子，也是诱导型启动子。Baumann K 等（1999）研究发现，NtBBF1 在 rolB 启动子结构域 B 中识别的靶序列是 ACTTTA 基序。他们将 rolB 启动子与 GUS 基因融合转化烟草，发现 GUS 只能在顶端分生组织和维管束中特异性地表达，尔后将在 ACTTTA 基序发生突变的 rolB 启动子与 GUS 融合转化烟草，结果发现报告基因在顶端分生组织中的表达几乎被完全抑制，而在维管束组织中根本毫无表达。这一有趣的现象说明 ACTTTA 基序对 rolB 启动子的组织特异性表达是必须的。试验还发现，当 rolB 启动子的 ACTTTA 基序被突变后，该启动子受生长素的诱导活性也明显下降。这说明，该基序是 rolB 启动子中受生长素诱导的顺式作用元件之一。另外，研究还发现，在烟草中，除了能在成熟叶片的叶肉细胞中表达外（只有 NtBBF1 基因的表达能在此检测到），NtBBF1 基因的表达模式同 rolB 启动子的明显相似。这些试验结果说明，Dof 蛋白识别结合的 ACTTTA 基序是 rolB 启动子的调控基序，它与 NtBBF1 蛋白因子的结合控制着 rolB 启动子驱动的组织特异性和生长激素诱导的基因表达。

（5）水杨酸诱导启动子 病理学家们发现，当遭遇病原菌侵染时，高等植物会在病原菌侵染的部位产生免疫性物质，把这种植物自身的免疫反应称为系统获得性抗性（systemic acquired resistance, SAR）。SAR 与一系列涉及植物防御机制宿主基因，如葡聚糖酶、几丁质酶以及致病相关（pathogenesis - related, PR）蛋白等基因的协同表达有关。系统获得性抗性最早是在烟草花叶病毒侵染其茄科寄主植物的过程中发现的。后来发现在许多植物中都有这种防御反应，而且发现 SAR 不仅对病毒有作用，对细菌和真菌病原同样有效。进一步研究发现，诱导 SAR 的一个必要的信号就是水杨酸（salicylic acid, SA）。无论是内源的水杨酸水平的增高，还是体外施用水杨酸或其合成类似物，如 2,6 - 二氯异烟酸（2,6 - dichloroisonicotinic acid, INA），都不仅能增强这种广谱抗性，而且还能刺激系列相关基因，即致病相关（pathogenesis - related, PR）基因的表达，而且可能就是 PR 基因的表达直接赋予了寄主植物的抗性。因此 PR 基因表达的调控研究成为目前植物抗病研究的焦点。

20 世纪 80 年代末，Lam E 等（1989）在研究来自花椰菜花叶病毒的强启动子——35S 启动子的作用方式时发现，豌豆和烟草的叶片组织中的一种细胞因子能特异性地识别位于启动子的 -75 区域的一个串联重复的 TGACG 基序，而且体外试验发现，该因子与 35S 启动子结合后能激活启动子控制的基因表达。随后在烟草的根部提取液中也发现了这种可特异性地结合两个串联的 TGACG 基序的因子。而当该基序被突变后，就失去了与

这种因子结合的能力。把带有这种突变基序的启动子与报告基因转烟草后，发现在转基因烟草中，这种启动子驱动的报告基因的表达量在叶组织中下降了 50% 以上，而在根部则下降了 80% 以上。相比之下，在该基序两侧类似于 CCAAT 盒的序列 (CCAAT-box-like sequences) 突变后，报告基因在体内的表达却未受到明显影响。因此，他们认为这个含有两个 TGA, CG 基序的长约 21 bp 的序列在启动子中具有激活作用，这也是第一个被发现在启动子中具有激活作用的序列。因此，将该序列命名为激活序列 1 (activation sequence 1, as-1)，而与该序列特异性地结合的蛋白因子命名为激活序列因子 1 (activation sequence factor 1, ASF-1)。

后来 Qin 等 (1994) 应用启动子缺失转化试验深入研究了 35S 启动子中的各个调控元件与水杨酸的关系。他们分别将完整的 35S 启动子 (+1 至 -343) 及缺失体 -90 35S (+1 至 -90) 和 -46 35S (+1 至 -46) 启动子分别与 GUS 报告基因融合转化烟草，结果发现在转基因烟草中用 2 mmol/L 的水杨酸钠水溶液处理各品系的转基因烟草叶片 2 h 后，完整的 35S 启动子和 -90 35S 启动子的转基因植株叶片中的 GUS 表达量明显增强，而 -46 35S 启动子的转基因植株叶片中的 GUS 表达量无明显变化。这说明受水杨酸诱导的元件可能在 -90~-46 之间，他们又将 -90~-46 区段缺失的 35S 启动子与 GUS 融合转化烟草，结果转基因植株不受水杨酸诱导，这就直接证明了水杨酸作用的顺式元件就位于 -90~-46 之间。结合别的研究者和他们以前研究发现的位于该区段的第一个激活序列 (Benfey 等, 1989; Fang 等, 1989; Lam 等, 1989)，因此，他们猜想这个位于 -83~-63 之间的 21 个碱基对的 as-1 序列可能就是水杨酸作用的顺式元件。为验证上述猜想，他们将这 21 个碱基对的元件置于 35S 启动子缺失体的上游，并与 GUS 融合转化烟草，结果发现转基因烟草叶片经水杨酸处理后 GUS 表达量明显增强。该试验直接证实了这个 21 bp (CTGACGTAAGGGATGACGCAC) 的 as-1 元件就是水杨酸诱导的顺式作用元件。

从 35S 启动子中发现了水杨酸作用的顺式作用元件后，在病毒和 T-DNA 的启动子中也发现了与 as-1 序列类似的顺式调控元件。后来在高等植物的与防御相关基因的启动子中都发现了类似的 as-1 元件，将它们统称为类 as-1 元件 (as-1-like cis elements)。类 as-1 元件不但在序列上具有极高的同源性，而且在功能上也高度一致，即都能被生长素和水杨酸激活或诱导表达 (Niggeweg R 等, 2000 b)。与此同时，研究发现，35S 启动子中的 as-1 元件或其他类 as-1 元件在高等植物中都能普遍介导 SA 和生长素诱导的翻译的激活 (auxin-inducible transcriptional activation)。as-1 元件的显著特点是两个被 4 个碱基对隔开的不完全基序 TGACGTCA。细胞核中的 ASF-1 和细胞中的水杨酸响应蛋白 (salicylic acid response protein, SARP) 能特异性地识别并结合该基序。这些水杨酸相关蛋白是一种翻译因子，它们和所有与植物的防御反应相关的翻译因子一样都有一个高度保守的结构域。该结构域是个基本的亮氨酸拉链 (basic leucine zipper)，因此，把这种结构域称为 bZIP 结构域，这类翻译因子也就相应地称为 bZIP 因子。试验证实 bZIP 结构域能够特异性地与 as-1 元件结合 (Zhang Yuelin 等, 1999)。而 bZIP 因子又是与富含锚蛋白 (ankyrin-rich) 的 NPR1 (nonexpressor of PR1) 相互作用的 TGA 家族中的一员。后来，Niggeweg 等 (2000a) 从烟草中分离到 4 种不同的与 as-1 元件结合的 bZIP 因子，



将其分别命名为 TGA 1a, TGA2.1, TGA2.2 和 PG13。他们认为这些因子可能是 ASF-1 或 SARP 的组分。并发现, ASF-1 或 SARP 的组分非常相似, 而且 TGA2.2 是二者的主要成分。随后的研究表明 (Niggeweg 等, 2000b) 这 4 种 bZIP 因子在氨基酸序列上有很高的保守性和同源性, 特别是在 bZIP 结构域中, 它们的氨基酸序列同源性高达 89%。这说明这 4 种因子是以相同的方式在相同位点与 as-1 元件结合, 只是它们可能分别存在不同的组织部位, 如 TGA 1a 主要存在于根部, 并与 as-1 元件结合。所有的这些证据表明, 正是这类 bZIP 因子介导着水杨酸通过与 as-1 元件或类 as-1 元件的结合, 从而诱导或激活含有该元件的启动子控制的基因表达。

### (三) 标记基因

标记基因是一种用来筛选和鉴定转化的细胞、组织和转基因植株的 DNA 片段, 包括起富集转化细胞作用的选择基因和易检测表达产物的报告基因。抗生素类和抗除草剂类是当前转基因植物中常采用的选择标记基因。转基因植物中所用的抗生素抗性基因包括 npt II、aph-I、bla、aac 等 10 多种。抗除草剂基因类除有抗 Glufosinate (bialaphos) 的 bar 和 pat 基因及抗草甘膦的 epsps 基因外, 还包括绿磺隆和磺胺类抗性基因等。目前使用最多的为抗生素标记基因, 鉴于转基因生物安全性问题, 寻找非抗生筛选标记是近年来科学家们研究的焦点。

**1. 抗生素选择标记** 筛选 (或选择) 基因转化体的常规方法是使用抗生素筛选标记。作为一种标记基因都必须具备的条件: ①编码一种不存在于正常植物细胞中的酶; ②基因较小, 可构成嵌合基因; ③能在转化体中得到充分表达; ④检测容易, 并且能定量分析。目前应用最多的标记基因及抗生素有: ①Npt-II (新霉素磷酸转移酶基因, 亦称氨基糖苷磷酸转移酶 II 基因, Aph-II), 它赋予转化细胞为卡那霉素、新霉素和 G418 等抗生素抗性; ②HPT (潮霉素磷酸转移酶基因), 它赋予转化细胞潮霉素 (hygromycin, Hm) 抗性; ③DHFR (二氢叶酸还原酶基因), 它赋予转化细胞抗氨甲蝶呤的毒性; ④Gent (庆大霉素抗性基因), 它赋予转化细胞庆大霉素抗性; ⑤一种非抗生素标记——抗除莠剂的标记基因, 如草甘膦 EPSP 合成酶、磺酰脲和除草剂 phosphinothricin (PPT) 等抗性。

**2. 非抗生素选择标记 (或安全标记)** 由于人们担心这些新型的植物会对人类健康和自然生态环境造成威胁, 并由此而引发了激烈的争论。其焦点主要有转基因生物是否会破坏自然生态环境, 包括转基因植物导致杂草问题、产生病毒或加重病害对非目标生物的影响、加速目标生物抗性进化等方面的可能性; 转基因技术的产品是否会影响人类的健康, 包括对人类的毒性、过敏性和抗生素抗性等。

鉴于世界范围内公众对转基因植物安全性的忧虑, 许多研究者已在安全标记基因的探索中取得了一些进展, 他们根据植物细胞对不同糖类的分解代谢能力、对细胞胁迫环境的酶类基因等开发出了一些安全标记基因。已经报道的有糖类代谢酶、耐胁迫酶基因和对转化细胞或组织进行实时监控的绿色荧光蛋白基因等。

(1) 糖类代谢酶基因 目前试用于转化的安全标记基因有木糖异构酶基因 (xylose isomerase, *xyIA*)、磷酸甘露糖异构酶基因 (phosphomannose isomerase, *pmi*) 和核糖

醇操纵子等。使用木糖异构酶基因和磷酸甘露糖异构酶基因做标记已见报道。*pmi* 基因作为一种新型的安全选择标记基因已被成功运用于多种植物的转基因实验中。*pmi* 基因已成功应用于玉米、甜菜、水稻、小麦的遗传转化。农杆菌转化玉米幼胚愈伤组织时,用 *pmi* 基因作为选择标记基因获得的转化率为 50%;农杆菌转化小麦时,转化率为 25%;农杆菌转化水稻幼胚时,转化率为 41%。有报道表明,在甜菜转化研究中,*pmi* 基因/甘露糖筛选体系比卡那霉素筛选体系转化频率提高 10 倍。

核糖醇是自然界中广泛存在的五碳醇之一,一般不能被生物细胞利用,而大肠杆菌 C 菌株却能很好利用,这是因为其中有 *atl* 和 *rtl* 两个紧密串联的操纵子作用的结果。Fayette 等构建成了以 *rtl* 操纵子片段为标记的质粒载体,然后转化大肠杆菌 K12 菌株,转化菌株能够在以核糖醇为碳源的培养基上生长。虽然目前尚未见到该操纵子转化植物的报道,但受此启发,设想以 *rtl* 操纵子作为一种非抗生素选择标记应该可以完全代替抗性基因应用于植物遗传转化中。

作为安全基因标记,虽然这类糖代谢酶的研究已取得一些进展,但不可否认,它们还有许多问题需要解决。以核糖醇操纵子为标记目前尚未见报道,但该选择体系的筛选剂价格低廉,筛选程序简单,筛选效果显著。因此,糖类代谢酶类作为安全基因标记具有巨大的应用潜力。

(2) 耐胁迫基因 这种标记基因的作用和传统的抗性标记基因相似,也属于负选择。标记基因编码的产物是一种酶,可对细胞生长有毒的或有胁迫的化合物进行催化,使其转变成无毒且对生长有益的化合物,从而使转化细胞能在含有有毒或有胁迫化合物的培养基中生存,而非转化细胞则被杀死。

(3) 甜菜碱醛脱氢酶 (BADH) 基因 甜菜碱醛脱氢酶 (betaine aldehyde dehydrogenase, BADH) 能催化有毒的甜菜碱醛转变成无毒的甜菜碱,因此,该基因可被用于安全基因标记,并有很大的优势。Daniell 等在这方面做的有益尝试表明了甜菜碱脱氢酶基因完全可用于安全的标记基因。

(4) 汞离子还原酶 *merA* 基因 汞是土壤、水体和空气重金属污染的主要元素之一,环境中的汞有单质汞、离子汞和有机汞(如甲基汞)3 种形态。其中无机汞的毒性最低,有机汞(如甲基汞)的毒性是单质汞的数千倍,鱼类吸收有机汞(如甲基汞)的速度很快,通过食物链引起生物富集,且不易从生物体内排出,从而大大增加了对人体的危害。

土壤中有一种细菌,具有把甲基汞转变成离子汞、离子汞转变成单质汞,并把它排出体外的能力。目前人们已从细菌中分离出基因 *merA*、*merB*。其中 *merA* 基因编码汞还原酶 (mercuric reductase),催化离子汞转化单质汞的过程,*merB* 基因编码甲基汞裂解酶 (methylmercury lyase),催化甲基汞转化为离子汞。两个基因联合作用就会将有机汞转化为气态的单质汞,而单质汞的毒性最低,这样可使排放到大气中的汞降到安全的浓度。已有人采用基因转移的方法将这两个基因导入植物,试图转化水体中汞的形态,修复被污染的土壤和水体。

据此道理,*merA* 基因用于标记基因,在培养基中加入离子状态的汞盐,如氯化汞 ( $\text{HgCl}_2$ ) 作为筛选剂,转化的细胞具有转化有毒的氯化汞为无毒的单质汞的能力而存活,非转化细胞则毒害而死,从而达到选择目的。Yang 等第一次用来自拟南芥的 actin 启动子

启动 *merA* 标记基因在花生中表达,证实了 *merA* 基因用作标记基因的可行性。

因此,从传统的抗生素抗性标记到这些已用于转化的安全标记,可以得出这样结论,凡对植物能造成胁迫的因素,只要清楚其胁迫的机制,如果再配合相应的筛选剂加以利用,就可以开发出安全的标记基因来。由此推而广之,许多耐盐和耐旱基因具有开发为安全标记的潜在利用价值。如果这种设想可行,并成功地应用于植物的遗传转化,那么将可能实现转化一次,同时转移两个目标基因的目的。其中一个耐胁迫基因,另一个是目的基因,而耐胁迫基因又起到了标记基因的作用。这种以耐胁迫基因为标记的体系,操作方法、过程如同传统的抗性标记,程序简单、技术成熟、应用范围广泛,克服了上述各种标记基因的缺点。因此,以耐胁迫基因为标记的体系具有极大的开发应用前景。通常这类基因中在实验室条件下较易操作的是一些耐盐基因,如可对植物造成胁迫的酶类基因  $\gamma$ -二氢吡咯-5-羧酸合成酶 (*P5cs*) 基因、肌醇甲基转移酶 (*ImtI*) 基因、甘露醇与山梨醇及糖醇代谢关键酶基因等。脯氨酸是一种重要的有机渗透调节物质,它的许多特性与甜菜碱相似,并以游离状态广泛地存在于植物体中。盐渍条件下时,多数植物都会发生游离脯氨酸的积累。*P5cs* 是脯氨酸合成途径中的关键酶,目前其作为目标基因已转化多种植物,转化植物的耐盐性均得到了不同程度的提高。*ImtI* 是从冰叶午时花 (*Mesembrythum crystallium*) 的 cDNA 文库中分离得到的,受盐、干旱等逆境诱导表达,可将底物肌醇转变成芒柄醇 (D-ononitol)。芒柄醇含有多个羟基,亲水能力强,能减少胁迫造成的水分损失而使植物耐盐性提高。山梨醇、甘露醇等己糖醇含有多个羟基,亲水性能强,能有效地维持细胞内水活度,与甜菜碱、脯氨酸一样均为有机渗透调节物质。在大肠杆菌中,1-磷酸甘露醇脱氢酶 (*mtlD*) 和 6-磷酸山梨醇脱氢酶 (*gutD*) 分别引起甘露醇和山梨醇的氧化与分解,已经将之转化植物,并且提高了植物的耐盐能力。

(5) 荧光素酶基因和绿色荧光蛋白 (*GFP*) 基因 荧光素酶 (luciferase) 是生物体内催化荧光素或脂肪醛氧化发光的一类酶的总称。由于荧光素酶检测简便、灵敏、快速,因此,目前荧光素酶基因在基因工程方面已成为广泛使用的报告基因,也有许多采用 *GFP* 基因作为标记基因的植物转化成功的报道。

### 3. 叶绿体合成中的关键酶基因

(1) 谷氨酸-1-半醛转氨酶 (*GSAAT*) 基因 叶绿素是植物光合作用的物质基础,如果植物中缺少叶绿素,植物将失绿黄化,不能正常进行光合作用,从而影响植株的正常生长发育,甚至导致植物死亡。植物体内叶绿素生物合成途径现已经清楚。只要该途径的任何一步中断,都会影响叶绿素的正常合成。最近,利用该途径中的一个关键酶——*hemL* 基因发展了一种基于叶绿素合成的生物安全标记。

3-氨基-2,3-二氢苯甲酸 (3-amino-2,3-dihydrobenzoic acid, Gabaculine) 是一种植物毒素,它能强烈地抑制谷氨酸-1-半醛转氨酶 (*GSAAT*) 的活性,使  $\delta$ -氨基- $\gamma$ -酮戊酸 (amino laevulinic acid, ALA) 不能合成,从而导致叶绿素的生物合成中断。然而若在培养基中加入 ALA,叶绿素的生物合成就可以正常进行。到目前为止,已经分离出了许多抗 Gabaculine 的突变体,其中有一个被命名为 GR6 的突变体携带有 *hemL* 基因。Gough 等用 *hemL* 基因转化烟草,然后用 Gabaculine 进行筛选,分子检测表明,携带有标记基因 *hemL* 的都为绿苗,缺乏标记基因 *hemL* 的都为白化苗,显示了用 *hemL* 作为

标记基因的应用前景。

作为一种选择标记基因, *hem L* 与抗生素或除草剂抗性基因的选择原理相似, 都是利用一种抗性基因使转化细胞具有某种抗性, 从而能够在含有该选择剂的培养基上正常生长, 而非转化细胞由于缺少该抗性, 生长受到抑制甚至死亡。所不同的是, GR6 *hem L* 不具有抗生素或除草剂抗性, 从而避免了安全性引起的争论。

(2) 原卟啉原氧化酶 (PPO) 基因 植物体内叶绿素生物合成步骤中的另一关键酶——原卟啉原氧化酶 (protoporphyrinogen oxidase, PPO) 是植物体内叶绿素和血红素生物合成最后共同步骤的催化酶, 即把原卟啉原 (protoporphyrinogen, proto) 氧化为原卟啉 (protoporphyrin IX, proto) 的催化酶。收集光能是叶绿素的基本功能, 因此, 原卟啉原氧化酶独特的重要地位决定了它在生产上常用做除草剂的主要成分。PPO 基因已在大肠杆菌、酵母和植物中分离到, 虽然有人将 PPO 作为抗除草剂标记基因用于玉米的转化, 但未见作为安全标记基因的报道。如同 *hem L* 基因一样, 如果能发现一种抑制 PPO 活性的物质, 在培养基中加入原卟啉原作为筛选剂, 以 PPO 基因作为标记, 那么只有转化的细胞才有将有毒的原卟啉原转化为无毒的原卟啉的能力而存活, 非转化细胞的生长则受到抑制, 从而达到选择目的。

**4. 无标记基因植物转化方法的研究** 标记基因的安全性问题已引起世人的关注。虽然人们也开发了一些更加安全的标记基因用于研究, 但是, 以上所有的标记基因都存在一些缺点与不足, 如转化效率有待提高、检测过程有待完善、筛选剂有待优化、应用的范围有待拓宽等。因此, 有人针对这些问题设计出了无载体骨架、无标记基因的植物转化体系。这一思路的技术核心是构建由目的基因、表达调控序列和两侧边界序列共同组成的线形化的基因转化元件, 通过花粉管通道途径进行基因的转化操作, 然后再利用分子手段进行必要的检测, 获得无载体骨架序列的转基因植株, 并且认为该方法理论上适合任何有性生殖的作物。但该方法缺点是要求植物必须处于授粉期, 因而应用受到一定程度的限制。

**5. 叶绿体遗传转化的表达载体** 随着研究的不断深入, 人们发现以上细胞核遗传转化存在难以克服的弊端。因此, 1988 年以来兴起了一种遗传转化技术——叶绿体遗传转化。人们逐渐对这项技术的优越性和发展前景有所认识, 并日益重视起来。到目前为止, 已在多种植物中实现了叶绿体转化。从基因转化的安全性趋势看, 这一转化体系正成为植物基因工程中新的生长点。但是, 要从事叶绿体转化, 就需要预先知道该物种叶绿体基因组序列, 而目前人们对此知之甚少。这一点成为限制高等植物叶绿体遗传转化的主要瓶颈。另外, 还要使用叶绿体特异的启动子和终止子, 而它们的分离与获得也是十分困难的, 因此, 现阶段从事高等植物叶绿体遗传转化困难颇多, 仍需进一步研究。尽管如此, Daniell 等还是构建了高等植物叶绿体遗传转化通用载体 (universal vector), 为这一问题的初步解决提供了方便, 并且认为这种载体可用于多种植物的转化。

**6. 其他标记的利用** 除了以上各种标记基因之外, 有人还报道了其他一些安全的筛选标记或思路。

**7. 生物合成基因** 生物的某些支链氨基酸 (赖氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸) 的合成都要经过天冬氨酸的合成途径。其中赖氨酸是由天冬氨酸激酶和二羟基吡啶二羧基合酶催化合成的, 两种酶都受赖氨酸的反馈抑制, 细菌来源的这两种酶由于对赖氨酸不敏



感, 因此, 可以作为植物转化的筛选标记, 在含赖氨酸的培养基中转基因植株能够存活, 而非转基因植株则因死亡而被淘汰。

**8. 筛选标记基因的失活** 为了减少抗性基因标记的产物带来的不安全性, 一些研究者采用反义 RNA 基因或采用抗体基因等策略使筛选标记基因失活。其缺点是没有去掉标记基因, 仍存在基因的表达和传播的可能性。此外, 有人认为色氨酸脱羧酶基因、葡萄糖苷酶基因也可用于标记基因。色氨酸脱羧酶基因原理与甜菜碱醛脱氢酶基因的原理相同, 转化的细胞可以将培养基中有毒的色氨酸类似物的毒性解除, 进而存活, 并发育成完整的个体。葡萄糖苷酶基因可将无活性的细胞分裂素衍生物转化为活性形式, 实现标记功能。异戊烯基转移酶 (isopentenyl transferase, IPT) 基因的原理与其相似, 它通过提高转化体中细胞分裂素的水平促进再生。

#### (四) 其他增强表达元件

**1. 增强子 (enhancer)** 增强子是一种远端调控元件, 至少距转录起始点上游 100 bp 以上, 通常位于  $-700 \sim -1\ 000$  处, 所以又称为上游激活序列 (upstream activator sequence, UAS)。增强子区的跨度一般有  $100 \sim 200$  bp, 常由  $8 \sim 12$  bp 的核心序列和其他序列相间排列。其主要特性: 增强效应十分明显; 增强效应与其位置和取向无关; 大多为重复序列, 含有一个核心序列  $-(G)TGGG/TA/TA/T(G)$ ; 有严密的组织和细胞特异性; 没有基因专一性; 许多增强还受外部信号的调控。研究表明, 增强子能使和它连锁的基因转录频率明显增加的 DNA 序列, 是一种重要的基因表达调控元件。因此, 增强子的合理使用可明显提高外源基因的表达水平。从植物基因中分离相应的增强子并构建嵌合基因, 可望确保转化基因按照合适的调控模式表达, 消除基因表达在时空上的专一性所产生的失活问题。利用具有组织与发育特异性调控作用的增强子也是一条确保转基因有效表达的理想途径。

**2. 内含子 (intron)** 内含子是真核生物基因才具有的结构。图 2-2 所示, 内含子、外显子位置与基因编码情况。近年研究表明, 内含子对基因表达也有一定的促进作用。2004 年 Rose 利用 TRP1 和 gusA 基因融合, 研究了拟南芥中由内含子引起的基因表达增强现象。当把内含子置于不同的位置进行转基因, GUS 酶活性检测表明, 内含子位于基因不同位置时, mRNA 积累水平未显著提高, 但酶的活性却有明显增强。因此, 初步判断内含子可能通过增强转录和启动翻译两种完全不同的途径来增强基因表达。

分 I 型 (group I intron) 和 II 型 (group II intron)。I 型内含子是一类具有酶催化功能的内含子, 转录成 RNA 后, 可以自我剪接。此类内含子转录后可以形成 9 个由碱基配对形成的特定二级结构, 分别命名为 P1~P9。P1 和 P7 是保守的。I 型内含子具有自我剪接的功能, 在剪接反应中, 要有一种鸟嘌呤核苷 (含有游离的  $3'-OH$ ) G-OH。G 首先结合到内含子的  $5'$  端, 当线性的内含子成为环状时, 其  $3'$  端可以距离  $5'$  端 15 个核苷酸以外, 从而将原来的  $5'$  端和 15 个碱基 (或以上) 的节段 (包括 G) 切除出去。这种自我剪接, 是由 RNA 的特定序列的核酸内切酶的活性所催化。I 型内含子比 II 型内含子更普遍。这两类内含子之间没有什么关系, 它们有一个共同的特性, 就是在体外能够自我剪接, 而不需要任何蛋白质酶的催化。但是, 在体内它们却都需要蛋白质帮助折叠成二级结

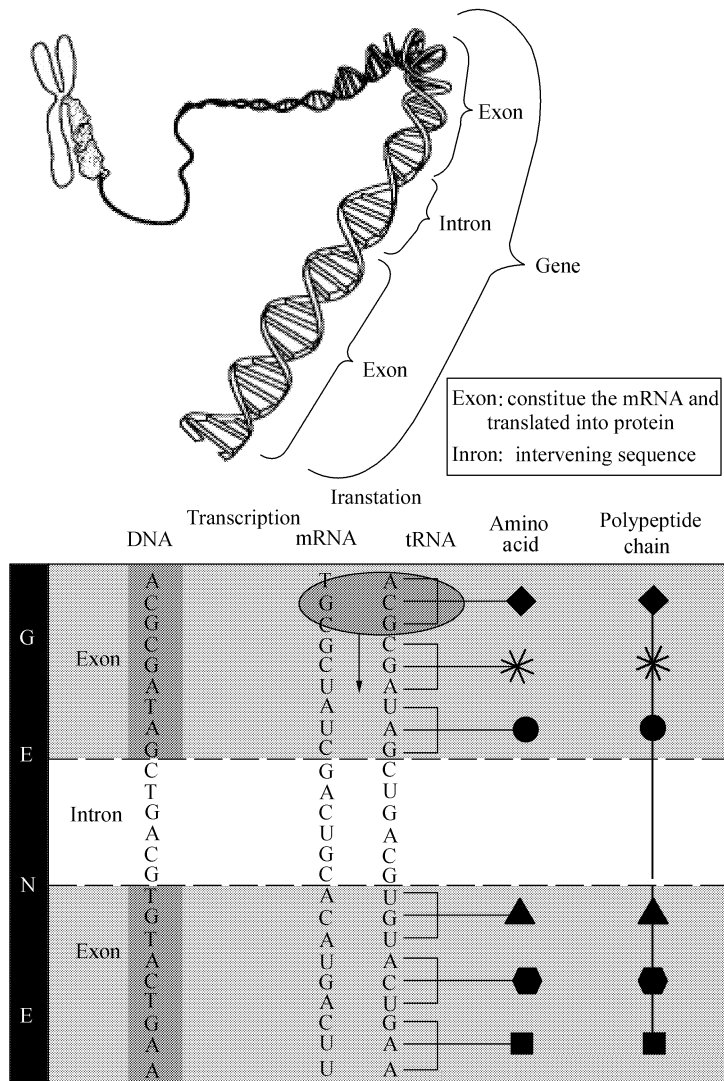


图 2-2 内含子、外显子与基因编码情况

构。Ⅱ型内含子 (group II intron) 为主要存在线粒体中的一类内含子, 它的剪接位点类似于核编码结构基因的内含子, 并同样遵从 GT-AG 规律。剪接机理同核内含子的剪接相似, 也要形成一个套索的中间体, 通过形成 5'-2' 磷酸二酯键将要剪接的位点靠近到一起。但是, Ⅱ型内含子的剪接又不完全与核内含子的剪接相同。它具有自我剪接的功能, 不需要剪接体和 snRNA 的参与, 也不需要 ATP 供能。从结构上看, Ⅱ型内含子的 6 个结构域可形成发夹环, 结构域 5 与 6 之间只间隔 3 个碱基, 结构域 6 参与转酯作用。合理插入具有促进功能的内含子, 以增强外源基因的表达水平。

**3. MAR 序列** 细胞核基质支架附着区 (matrix attachment regions, MARs) 是与核基质结合的一段染色体 DNA 序列, 大多数 MARs 位于基因两侧非编码区, 富含 AT 和保守的结构域。其最小活性序列为 300 bp, 常与增强子、启动子、复制起始点等重要元件相

邻。MARs 可以作为边界因子和染色质调控因子对外源基因的表达发生作用。MARs 不编码任何功能蛋白。利用染色质高级结构的特点以改进转基因稳定性和提高表达效率的一种方法是细胞核基质支架附着区构建策略,即将其连到目的基因两侧,并转到生物体中,发现它能增加转基因表达水平,并能在一定程度上降低转化体之间转基因表达的差异。这种转基因结构可使整合的外源基因形成一个单独的转录单元,由此,可以减少周边顺序的影响。即转基因发生时,外源基因随机插入植物的基因组 DNA 中。如果插入位点的染色质呈紧密排列状态,则很容易发生外源基因的沉默现象。当基因转录单元两侧连接 MARs 之后, MARs 则与核基质结合形成一个相对独立的疏松染色质 loop 结构,可以减少同源依赖的基因沉默,使外源基因保持较高的转录活性,从而提高表达效率。

MARs 序列已成为近几年来植物基因工程研究领域颇受关注的热点之一。许多 MAR 序列片段以及与之相结合的核基质蛋白已相继从不同生物中分离和鉴定。MAR 序列性质,长期以来,对细胞核的研究主要集中在染色体、核仁和核膜上。1974 年, Berezney 和 Coffey 将分离的小鼠肝细胞核,用去污剂溶去核膜,再用核酸酶消化核酸,最后用高盐溶液抽提并除去组蛋白和其他可溶性蛋白,剩余的一些不溶性蛋白质则呈现出一种三维空间的骨架结构,且仍能维持核的原有状态,他们称这种结构为核基质(nuclear matrix)。而 Mirkovitch 等人在 1984 年用二碘水杨酸锂代替高盐溶液来除去组蛋白,将得到的结构称为核骨架(nuclear scaffolds)。核基质/核骨架结构在生物细胞核内是普遍存在的。用限制性酶消化染色质后,发现仍有一段 DNA 序列结合在核基质/核骨架上,这段 DNA 根据核基质、核骨架的命名相应地被称为基质结合区或骨架结合区(scaf-fold attachment regions, 简称为 SARs),实际上两者指的是同一种物质。1991 年 Pienta 等提出 MAR 序列本身的长度约有 1 kb,在两个 MAR 之间的染色质区域可以形成 DNA 环,环的大小为 5~200 kb,每个环均为一个独立的表达结构。1991 年 Vonkries 等发现几种蛋白质能与 MAR 在体外进行特异性结合。目前从动物和昆虫细胞中已经分离出一些与 MAR 相互作用的蛋白质,其中包括拓扑异构酶、组蛋白 H1、HMG-I/Y、核纤层蛋白 A 和 B、核仁蛋白、hnRNP-U、ARBP 和 SAF-B 蛋白。1996 年 Meier 等首次从植物番茄中分离到了一种 MAR 结合丝状蛋白——MFP1。根据 MFP1 的丝状结构,有人认为它可能是核骨架的组成成分。MFP1 含有一个伸展的  $\alpha$ -螺旋区域,但是没有球状的头部和尾部。另外, MFP1 有两个功能域,其中一个含有 228 个氨基酸的 C-末端区,此区对于 MFP1 同 MAR 的结合是必需的;另一个含有 125 个氨基酸的 N-末端区,此区含有两个疏水区,其中一个区与少数跨膜区相类似。此蛋白可以在许多组织中表达。1999 年, Gindullis 等用酵母双杂交系统和体外结合分析方法,又从番茄中分离得到了一种新型的蛋白质——MAF1。它是一种分子量比较小的可溶性蛋白,富含丝氨酸和苏氨酸。实验证明, MAF1 也是核基质的组成成分,它在体内能与 MFP1 相互作用。同年, Hatton 等从豌豆核基质中又分离和鉴定出两种 MAR 结合蛋白: MARBP-1 和 MARBP-2,它们的分子量分别为 60 ku 和 65 ku,可以在多个组织中表达。这两种结合蛋白之间的同源性高达 86%,并且在 C-末端有几个 KKD/E 重复。MARBP-1 和 MARBP-2 与酵母核仁蛋白 Nop56p 和 Nop58p 同源,后两种蛋白参与核糖体的形成。最近, Gaku 等从小麦核基质中又分离了一种新型 MAR 序列结合蛋白——AHM1,它能与 MAR 特异性结合。

AHM1 是一种多区域蛋白，其中有一个 J 同源区、一个 AT 结合区和一个锌指结构基元，AT 结合区必须位于 C-末端方能使此蛋白与 MAR 序列结合。显然，MAR 序列结合蛋白的进一步分离鉴定，将为最终阐明 MAR 序列的作用机制提供重要信息。近年来，研究人员将分离得到的 MAR 序列连接在报告基因的两翼，通过大量转基因实验来探索 MAR 序列的功能。结果发现，在稳定整合的转基因植物中，MAR 在一定程度上提高了转基因的平均表达水平，同时也可以降低不同转化体之间转基因表达水平的差异。将从豌豆基因组中分离的 MAR 连到 GUS 基因两翼构建表达载体，经农杆菌介导转化烟草，结果含有 MAR 的转基因烟草中 GUS 基因的表达水平比对照（不含 MAR 的转基因烟草）提高 2 倍。但在瞬时表达中，MAR 对 GUS 基因的表达没有影响。在转基因杨树的实验中，烟草 MAR 序列的存在可使 GUS 表达水平提高 10 倍，并且可以产生更多的抗性芽。人们在研究转基因水稻中 MAR 序列对于 GUS 转基因表达活性的影响时，发现 GUS 两侧连上 MAR 序列之后，其平均活性比对照（GUS 两侧未连 MAR 序列）高出 900 倍。DNA 杂交分析证实，在所有这些转基因的水稻植株中，至少都有一个拷贝的 GUS 基因整合到染色体基因组上。实验证明，MAR 序列可以显著地降低 GUS 基因在转基因植株当代和后代中表达的变异程度，能够降低代与代之间转基因沉默发生的频率，减少转基因丢失。将烟草 Rb7 或酵母的 ARS1 MAR 构建到表达载体中转化水稻，第一代中两者都显著提高了转基因的表达水平，但并没有明显降低转化体之间转基因表达的差异。第二代中，转基因表达水平与第一代的表达水平有明显的相关性。另外，还发现 Rb7MAR 显著提高了第二代中转基因表达的稳定性，在一定程度上防止了转基因沉默的发生。Apolonia 等发现， $\beta$ -云扁豆基因的 5' MAR 能够起到增强子的作用。烟草和水稻中，在有些稳定表达的转基因整合位点附近，也发现了类似于 MAR 的内源序列。这些研究结果表明，将 MAR 构建到表达载体外源基因的两侧，就有可能使目的基因在转基因植物的染色质中形成独立的区域，进而促进其表达。研究还发现，MAR 具有的这种转录增强作用与转录的起始点和转基因与 MAR 序列之间的距离无关，而与该基因的整合状态及拷贝数量有关。不含 MAR 的转基因随着拷贝数量的增多而表达水平降低，两翼连有 MAR 的转基因在拷贝数量增加到 9~10 个之前，其表达水平有随拷贝数量的增多而提高的倾向。但当拷贝数量超过了 9~10 个，转基因的表达水平就急剧下降。对这种现象的解释是 MAR 减少了 DNA 配对引起的同源依赖的转基因沉默，但当拷贝数量很高时，这种作用就消失了。GUS 基因的表达活性与其转基因的拷贝数量之间并不存在直接的相关性。在外源基因不超过 40 个拷贝数的情况下，MAR 序列可以明显降低共抑制效应。MAR 序列影响转基因表达的机制，1989 年，Stief 等最早开始了研究 MAR 在转基因表达中的作用，指出 MAR 不同于经典的增强子，它必须整合到宿主基因组中才能起作用。此后，Klehr 等和 Allen 等，分别在动物和植物体中观察到 MAR 对瞬间转录的影响很小，这似乎涉及了染色质结构。关于 MAR 序列是如何通过染色质结构的环形区域依靠降低位置效应来增强基因表达水平的，人们提出了种种假设。早期的假设认为，当不使用 MAR 序列进行转化时，导入的外源 DNA 通常以随机方式整合进宿主基因组。如果外源 DNA 被整合到转录活跃区，如常染色质中的解旋 DNA 区，外源基因则会顺应该区的染色质结构，从而可能进行高水平的转录；相反，若导入的外源 DNA 整合进转录不活跃区，如异染色质区，转基因将采纳不活



跃区的染色质结构，从而进行低水平的转录或发生基因沉默。如果将 MAR 序列连接到报道基因的两翼，那么任何整合进不活跃区的外源 DNA 都有可能形成一个独立的环区，此区受周围染色质的影响很小，使得外源基因能够进行高水平的转录。后来，Schlake 等人又提出 MAR 序列因子可以作为一个超乙酰化的组蛋白核心来稳定染色体的拓扑结构。MAR 序列可以限制凝聚染色质结构的扩展，使得相邻的转录单元彼此独立，以免受周围染色质中顺式调控元件的影响，从而达到基因正常表达，降低不同转化体之间表达差异的目的。这种作用称为 MAR 的“位置独立”效应。1996 年，Allen 等将报告基因 *gusA* 两侧接入烟草 Rb7MAR 进行转化，可以使报告基因的表达效率提高 140 倍，并提出 MAR 的存在可使外源基因避免受到异位配对或其他同源序列相互作用的影响，使得同源依赖性基因沉默发生的几率下降。MAR 序列还可以通过限制染色质结构而起作用。在转化体内，MAR 与转基因整合在一起，当位于外源基因两侧的 MAR 序列结合在核基质上时，MAR 结合位点之间的短区域使得外源基因不能形成稳定的凝聚染色质结构，从而保证转录正常进行。1997 年，Iglesias 等发现 MAR 序列位于染色体的端粒附近。因为细胞周期中端粒是朝向核孔的，所以，这种空间上的优势也可以使得 MAR 序列能够增强转基因表达。有人还提出“染色质开放模式”，认为当置换蛋白大量存在时，MAR 可以与染色质中的置换蛋白相互作用而取代组蛋白 H1，使得许多核小体处于松散状态。这样，染色质就形成一种 RNA 聚合酶容易接近的开放结构，从而提高了转基因表达水平。MAR 序列的特征，目前已从果蝇、家蚕、鸡、哺乳动物细胞、酵母和一些植物中克隆了许多 MAR 序列。通过对 MAR 序列的核苷酸序列分析，发现 MAR 之间没有明显的序列同源性，但却有共同的特征：富含 A、T 碱基 ( $\geq 70\%$ )；含有若干短的基元序列/模体，如 A-box (AATAAAYAAA)、TTWTWTTWTT (T-box)、一个或多个拓扑异构酶结合位点 (GTNWAYATTNATNNR)；DNA 链解旋序列 (AATATATTT)。MAR 序列几乎都位于非转基因间隔区，但是，这些特征并不是 MAR 特有的，不能仅利用这些特征就能识别出 MAR。1997 年，Cornelis M. Van Drunen 等人对拟南芥质体蓝素 (PC) 基因周围染色质区域的结构进行了分析，他们在这个 16 kb 的区域内鉴定了三段 MAR 序列，这三段 MAR 序列将此区域分成两个小的染色质区域，大小分别为 5 kb，每个区域中包含两段基因。将这三段 MAR 序列做一下对照，发现它们有一段兼并的大小为 21 bp 的序列：TAWAWWWNNAWWRTAANNWWG，而在这个区域的其他地方却没有发现这段 21 bp 序列。另外，发现在拟南芥的其他四段 MAR 中也存在着这样一个类似的序列元件。将这七段 MAR 序列做一下对比，发现这段 21 bp 序列是由两段在空间上紧密结合在一起的序列元件组成的：TAWAWWW 和 AWWRTAANNWWG。在这七段 MAR 序列中，这两个元件或者是被几个碱基间隔开，或者是部分重叠在一起。作者提出将这段 21 bp 序列作为拟南芥中 MAR 序列的识别标记 (MRS)。对拟南芥基因 DNA 碱基对进行分析发现 MRS 平均每隔 10 kb 就出现一次。实验中还发现尽管 MRS 是拟南芥 MAR 所特有的，但 MRS 并不参与 MAR 与核基质的结合。所以 MRS 不是 MAR 与核基质结合所必需的，而可能是 MAR 序列完成其他功能所必需的。1990 年，Phi-Van 和 Stratling 指出，MAR 和核基质之间的相互作用具有进化上的保守性，MAR 可以与异源的核基质相互作用。如大豆凝集素和热激蛋白基因的 MAR 与鸡溶菌酶的 MAR 可以和烟草的核基质结合。但并



不是所有的 MAR 都能够与异源的核基质相互作用，如人  $\beta$ -珠蛋白基因中的 MAR 与烟草核基质之间的结合能力就很弱。富含 A/T 所形成的 DNA 小沟结构对 MAR 与核基质之间的相互作用具有重要的意义，用抗生素偏端酶素与此沟结合能阻止 MAR 与核基质的结合。

综上所述，对 MAR 序列的研究在近十多年来已取得了相当大的进展，同时，也出现了一系列有争议和尚待深入研究的问题。如虽然认定了 MAR 对转基因表达水平有增强作用，但对是否减弱了表达差异似乎还存在争议，各个试验结果也存在差异；MAR 序列的作用机制还不太清楚；MAR 序列与核基质是如何作用的及与 MAR 序列结合的蛋白质的性质等方面仍需要进一步研究，MAR 序列对外源基因整合到受体基因组中的频率影响还未见报道。可以相信，一旦研究清楚 MAR 序列的作用机理，发现或合成一段通用或专用的 MAR，就能实现转基因的人为控制，这必将极大地推动整个植物基因工程的发展。

### (五) 筛选标记删除系统

筛选标记删除系统用于除去转基因植物中的标记基因，目前已有共转化、转座子、同源重组和定点重组等系统。

随着植物生物技术的迅猛发展，各类转基因植物不断问世，并在解决人类所面临的粮食、能源和环境危机等方面显示出巨大潜力。与此同时，转基因植物的生态安全性和食品安全性日益成为公众关注的焦点。产业化的转基因植物一方面是构成生态系统的重要元素，其安全性关系到人类生存环境的维护；另一方面又是食品加工的主要原料，直接影响到消费者的身体健康。为此，科学工作者正在探讨和开发一系列安全的转基因策略，力求最大限度地避免转基因植物可能带来的潜在风险。一般来说，植物遗传转化过程中选择标记基因不可缺少，但转基因植物中标记基因的存在不仅会带来一定的潜在风险，而且还增加了重复基因转化的难度。因此，转基因植物中标记基因的除去已成为提高转基因植物生物安全性的重要内容。

**1. 共转化系统** 共转化系统除去标记基因的原理：首先，将选择标记基因和目的基因分别设计在两个不同的 DNA 分子上或 T-DNA 片段中，经基因转化进入植物后，目标基因和选择标记基因将被整合在不同的位置上（转基因植物基因组中 2 个非连锁位点），其后在植株杂交（或自交）及减数分裂过程中分离，在后代中获得除去标记基因的转基因植物。用 PCR 或 Basta 涂抹（bar 基因）等方法检测已删除了标记基因的转基因植物。构建植物表达载体时，目的基因和标记基因可分别插入 2 个载体，也可插入到同一载体。若通过农杆菌介导法转基因，2 种载体（分别含目的基因和标记基因）可以分别导入同一农杆菌菌株，也可以分别导入 2 种不同类型的菌株，将含有标记基因和目的基因的农杆菌混合后用于共转化。研究表明上述方法中，共转化率都可达 50% 左右，约有 50% 的共转化植株在 T1 代时共转化基因可出现分离，从而获得除去了标记基因的转基因植株。此方法要求植物能进行有性生殖，且需从大量的转基因群体中筛选转基因植株。De-block 和 Mcknight 用该法获得较高的共转化效率，分别有 78% 和 100% 的共转化植株 DNA 共整合在非连锁位点上。在使用基因枪转化中，两个分子有时会共整合在连锁位点上，不能有效地获得切除标记基因的植物。

**2. 转座子系统** 转座子 (transposon) 是指在生物细胞中从同一染色体的一个位点转移到另一个位点或从一条染色体转移到另一条染色体上的一段特殊的 DNA 序列。常用的转座子系统有 AcDs 系统、EnSpm 系统、Tam 系统等。利用转座子流动性的特点可使带有选择标记基因的 DNA 片段和目的基因分离。利用转基因植物与非转基因植物的杂交以及子代的分离可得到无选择标记基因的后代植株。转座子系统转座频率受转座酶和离解酶活性的动态调节。转座活性在不同植物中变化很大, 当转座频率很低时需要大量地筛选工作。常用的玉米的 AcPDs 转座系统中, 当 Ac 转座酶存在的情况下, 非自主型 Ds 转座成分可被激活并发生转座, 而且在玉米和其他双子叶植物中连锁位点和非连锁位点的转座频率大致相等。利用 AcPDs 转座系统的这些特性, 已发展了一系列消除转基因植物中标记基因的策略。Ebinuma 等 (2000) 将 ipt (isopentenyl transferase) 基因作为阳性选择标记基因插入到 Ac (pNPI106) 中得到 MAT (multi auto transformation) 载体系统。该系统中 ipt 基因的表达会导致细胞分裂素产生过多, 所以, 转基因植株为丛枝表型; 当 Ac 转座失败 (即从染色体上切下而又未能重新插入到另一位点) 时, ipt 基因就被除去, 转基因植株的丛枝表型消失。这种方法的优点是转基因植株及除去标记基因的转基因植株都很容易辨别, 且 T1 代就可得到除去标记基因的个体。

**3. 同源重组系统** 同源重组的原理是将选择标记基因置于重复序列之间, 通过重复序列的同源重组作用将标记基因切除。在植物中同源重组发生的频率很低, 叶绿体中发生的频率较高。同源重组事件很复杂, 其许多特性目前仍未清楚。

**4. 定点重组系统** 定位重组系统包含两个组成元件: 单个多肽的重组酶和为重组酶识别的 DNA 位点。当前研究较清楚的是噬菌体 P1 的 CRE lox 定位重组系统。在该系统中, CRE 基因可通过转化或有性杂交整合到事先整合有 lox 基因的植物基因组的 lox 位点上, CRE 重组酶专一性地识别 34 bp 的 lox 位点, CRE 可介导染色体外 DNA 的剪切、倒位和整合反应, 从而切除选择标记基因。即在植物细胞中 Cre 重组酶可以和 2 个 34 bp 的 lox P 位点互动, 并将位于这 2 个位点之间的 DNA 切除。CRE lox 系统已经从原来的只能用于有性繁殖的植物发展到现在可用于有性和无性繁殖的植物。Dale 等 (1991) 和 Russell 等 (1992) 将 CrePloxP 系统成功地用于转基因植物中标记基因除去的研究。在此基础上, Gleave 等 (1999) 将条件致死基因 codA (cytosinedeaminase) 用作选择标记, 建立了更为有效的标记基因除去系统。Sugita 等 (1999) 用定点重组系统 RPRS 代替了 MAT 载体系统中的 Ac 转座子建立了一套改良的标记基因除去体系, 在中度丛枝和高度丛枝型转基因烟草植株中, MFTPs (marker free transgenic plants) 的获得率分别达 39% 和 70%。

## (六) 无抗生素筛选标记基因载体系统及其他转基因安全策略

**1. 不使用抗性标记基因的转基因体系** 近年来, 一些与植物细胞分化相关的基因已被克隆。比如, 拟南芥的 PGA22、AtIPT、CKI1、ESR1、CHK1 和 SERK 等基因在植物细胞中表达后也可促进细胞的分化。如果将这类可促进植物细胞分化的基因与目的基因串联并用于遗传转化, 我们就可以在不含细胞分裂素的培养基中选择培养得到转化细胞, 从而避免了抗性选择标记的使用。另外, 随着花粉管通道技术的不断成熟和转化效率的进一

步提高,花粉管通道法将有望成为一种深受欢迎的无标记转基因手段。

**2. 转基因的组织特异性表达** 植物转基因育种早期所用的启动子主要为组成型启动子,这不仅造成了转基因植物能量的浪费,而且带来了潜在的安全性问题。近年来,各类组织特异性启动子的研究和应用日益受到重视。已有报道,由花药、种子、韧皮部、胚乳、叶片和髓部等组织特异性启动子驱动的外源基因在转基因植物中成功实现了特异性表达。显然,转基因的组织特异性表达必将有效提高转基因植物的生物安全性。

**3. 转基因的诱导性表达** 近年来,植物天然诱导型启动子和化学诱导型调控系统的研究和应用日益受到重视,这对提高转基因植物的生物安全性具有十分积极的意义。已报道,光诱导型启动子、伤诱导型启动子和病原物诱导型启动子等都可以在转基因植物中实现成功的诱导型表达。化学诱导型调控系统是新发展起来的一种转基因调控系统,其中包含2个转录元(transcription unit)。第一转录元由一个组成型启动子(如35S)驱动一个对特定化学物敏感的转录调控因子构成;第二转录元由多拷贝的转录因子结合位点,微型植物启动子(如截短的35S启动子)和目的基因串联而成。这样,通过特定的化学物质调控就可实现转基因表达的人为调控。令人遗憾的是,上述化学调控系统中用作诱导物的甲基脱氢皮质醇(dexamethasone, dex)、雌二醇(estradiol)和四环素(tetracycline)都对生态环境有害,不宜用于生产实践。Martinez等(1999)设计了一种受化学杀虫剂诱导的调控系统,但在非诱导情况下的背景表达较高。Caddick等(1998)报道了一种受乙醇诱导的调控系统,且未检测到背景表达。另外,如果将化学诱导型调控系统和组织特异性启动子合理组合,就可以有效地控制目的基因的时空表达。

**4. 防止转基因逃逸及超级杂草的产生** 转基因的逃逸(transgen escape)是导致生态风险的重要因素。近年来,科研工作者在防止转基因逃逸方面作了大量探索。De Block等(1993)首次报道了通过转基因产生雄性不育的策略,有效阻断了转基因通过花粉逃逸的途径。不过,转基因雄性不育植株可以接受非转基因植物的花粉,所以,转基因仍然能通过种子向自然群体扩散。

**5. RBF结构的利用** 为了从分子水平上彻底阻断转基因的逃逸,Kuvshinov等(2001)设计了一种RBF(recoverable block of function)结构,其中包括阻遏区(blocking construct)、恢复区(recovering construct)和目的基因区(genes of interest)3部分。阻遏区的巯基肽链内切酶SHEP(sulfhydryl endopeptidase)启动子可以驱动barnase基因在种子成熟期表达,并将胚杀死,因而转基因植物的正反交种子都不能发芽,有效防止了转基因逃逸。恢复区热激蛋白HS(heat shock protein)启动子驱动的barnstar基因可以受热激而表达,并可钝化barnase的毒性。研究表明,导入RBF结构的转基因烟草在种子成熟期以40℃热激处理后,收获的种子全部可以正常发芽。

**6. 质体遗传转化** 将目的基因导入植物细胞的叶绿体等质体中也可以防止转基因随花粉而逃逸。近年来,叶绿体遗传转化取得了很大进展,烟草、拟南芥、油菜和水稻等许多植物的叶绿体遗传转化和目的基因表达都已获得成功。

**7. 染色体组特异性选择** 对异源多倍体作物来说,只有某一套染色体和其近缘杂草具有杂交亲和性。比如,小麦的D染色体组和有芒山羊草(*Aegilops cylindrica*)的D染

染色体组具有杂交亲和性，因而转基因很容易通过 D 染色体组转移到这种杂草中。但在自然情况下位于小麦 A（或 B）染色体组中的基因极少会转移到其相应的近缘杂草中。因此，通过转基因的染色体定位选择那些转基因插入到安全性较高染色体组的转基因植物进行产业化，可以在一定程度上降低产生超级杂草的生态风险。

**8. TM 基因的应用** 在自然界，杂草间及杂草和作物之间都存在着激烈的竞争，所以，即使是温和的不利性状也会使植物的杂草化受到极大的限制。Gresse (1999) 介绍了一种防止超级杂草 (superweed) 产生的新策略，其基本原理是将那些控制对杂草生存不利性状（如防止种子散落和降低种子二次休眠等）的 TM (transgenic mitigation) 基因和目的基因串连，这样转基因植物就失去了有利杂草形成的竞争优势。即使发生了转基因逃逸，也会因 TM 基因伴随漂移而使得超级杂草的形成受到限制。当然，这类 TM 基因不仅要和目的基因紧密连锁，而且对转基因植物应该是有利或中性的。

### 三、用于转基因的农杆菌菌株

农杆菌属也称土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 和根瘤菌属 (*Rhizobium*) 是同属于根瘤菌科 (Rhizobiaceae) 的革兰氏阴性菌。土壤农杆菌属有根癌农杆菌、放射形农杆菌、发根农杆菌和悬钩子农杆菌 4 个种。根癌农杆菌广泛存在于双子叶植物中，据不完全统计，约有 93 属 643 种双子叶植物对根癌农杆菌敏感。裸子植物对该菌同样具有敏感性，能诱发肿瘤。一般认为单子叶植物对农杆菌无敏感性。但近年来有报道，对单子叶植物也有侵染能力。根据根癌农杆菌 (*A. tumefaciens*) 诱导植物细胞产生的冠瘿碱种类不同，可分为三种类型的根癌农杆菌：章鱼碱型 (octopine type, Oct)、胭脂碱型 (nopaline type, Nop) 和农杆菌碱型 (agropine type, Agr. 也称琥珀碱型, succinamopine, Suc)。常用的根癌农杆菌菌系及菌株见表 2-1。

表 2-1 根癌农杆菌菌系及菌株

| 菌株                      | 致病性       | 染色体背景 | 所含质粒          | 研究者/年代            |
|-------------------------|-----------|-------|---------------|-------------------|
| <b><u>Nopaline:</u></b> |           |       |               |                   |
| C58                     | virulent  | C58   | pTiC58        |                   |
| A208SE                  | virulent  | C58   | pTiT37-SE     | Rogers 等, 1987    |
|                         | disarmed  |       |               |                   |
| pGV3850                 | disarmed  |       | pTiC58/pBR322 | Zambryski 等, 1983 |
| MOG301                  |           |       |               | Hood 等, 1993      |
| LBA958                  |           | C58C9 | pTiC58        | Hooykaas 等, 1984  |
| <b><u>Octopine:</u></b> |           |       |               |                   |
| Ach5                    |           | Ach5  | pTiAch5       | Hoekema 等, 1983   |
| LBA4404                 | avirulent | Ach5  | PAL4404       | Ooms 等, 1981      |
|                         | disarmed  |       |               | Hoekema 等, 1983   |

(续)

| 菌株                                  | 致病性                       | 染色体背景                | 所含质粒  | 研究者/年代                           |
|-------------------------------------|---------------------------|----------------------|---|----------------------------------|
| GV3111SE                            | disarmed                  | C58                  | pTiB6S3 - SE                                    | Fraley 等, 1985<br>Rogers 等, 1986 |
| GV2260                              | disarmed                  |                      | pGV2260   | Deblaere 等, 1985                 |
| LBA1010                             |                           | C58C9                | pTiB6S  | Koekman 等, 1982                  |
| MOG101<br>(LBA1010Sp <sup>r</sup> ) |                           | C58                  | MOG101/Pmog410                                  | Hood 等, 1993                     |
| <b><u>L. L-Succinamopine:</u></b>   |                           |                      |   |                                  |
| A281                                | hypervirulent             | C58                  | pTiBo542  | Hood 等, 1986a, b                 |
| EHA101                              | hypervirulent<br>disarmed |                      | pTiBo542  | Hood 等, 1986                     |
| EHA101<br>(pEHA101)                 |                           | A136<br>A281pTiBo542 | pEHA101 为<br>缺失的衍生物                             | Hood 等, 1986a                    |
| EHA105<br>(Kan <sup>s</sup> )       | hypervirulent             |                      | 删除 pTiBo542<br>及 EHA101 中<br>的 Kan <sup>r</sup> | Hood 等, 1993                     |

注: Nop 菌株的特点是其染色体背景为 C58, 生长速度快, 不结球, 在转化实验中易操作, 常用的菌株有 C58、pGV3850、A208SE 等。Oct 菌株的特点是其染色体背景为 Achs, 生长速度慢, 菌株培养过程中结球, 在转化实验中难操作, 其培养后不易洗掉, 常用菌株有 LBA4404、LBA1010。Suc 菌株的特点是其染色体背景为 A281 或 A136, 具 Nop 菌株的特点, 以 A136 为染色体背景的常用菌株为 EHA101。它具有生长速度快, 不结球等优良特性, 特别是这种菌株的侵染力比较强, 能侵染单子叶植物。MOG101 菌株的染色体背景也为 C58, 也具有生长速度快、不结球的特点, 且因 MOG101 具有 SP<sup>r</sup> 抗性筛选标志, 因此, 在通过结合转移将其转移至其他农杆菌菌系时有利选择。MOG301 菌株的染色体背景也为 C58, 且含有 SP<sup>r</sup> 抗性筛选标志, 因此, 也为 Nop 型提供了一种新的衍生菌株。EHA105 是 EHA101 的衍生菌, 删除了 EHA101 中的 pTiBo542 的 T-DNA 及 Kan 抗性基因。MOG101、MOG301 及 EHA105 是较为理想的转化菌株。

## 第二节 转基因植物生物反应器的构建技术

### 一、植物基因转化受体系统

植物基因转化受体系统是指用于转化的外植体通过组织培养途径或其他非组织培养途径, 能高效、稳定地再生无性系, 并能接受外源 DNA 整合, 且对转化选择抗生素敏感或非抗生素敏感的再生系统。成功的基因转化首先依赖于良好的植物受体系统的建立。将外源基因稳定的导入农作物体内 (即植物遗传转化) 是植物转基因植株产生的关键。外源基因一般不能主动转移到植物细胞中, 需要适当的转化方法, 并借助恰当的载体才能转移到植物的基因组中。转化成功与否以及转化效率的高低, 很大程度上取决于良好受体再生系统的建立。同时, 对不同物种也要采用不同的转化方法。因此, 植物遗传转化的受体系



统、载体系统和遗传转化方法是转基因植物技术的关键。

### (一) 植物基因转化受体系统应具备的条件

**1. 高效稳定的再生能力** 用于植物基因转化的外植体的组织细胞, 必须具有全能性 (totipotency) 的潜能, 易再生, 有很高的再生频率, 并且有良好的稳定性和重复性。

**2. 较高遗传稳定性** 植物受体系统接受外源 DNA 后应不影响其分裂和分化, 并能稳定地将外源基因遗传给后代, 保持遗传的稳定性, 尽量减少变异。

**3. 具有稳定的外植体来源** 因为基因转化的频率很低, 需要多次反复地实验, 所以, 就需要大量的外植体材料。转化外植体一般采用无菌实生苗的子叶、胚轴、幼叶等, 或采用可进行快速繁殖的材料。

**4. 对选择性抗生素或非抗生素敏感** 转化细胞或植株通过对抗生素或非抗生素产生抗性获得选择纯化, 这类作用称为选择标记, 这要求植物受体材料对所选的选择标记具有一定的敏感性, 氨基葡萄糖苷类抗生素如新植霉素 (neomycin)、卡那霉素 (kanamycin) 和潮霉素 (hygromycin) 等抗生素常被用之, 而非抗生素筛选标记, 如甘露糖苷酶等, 作为转基因生物安全方面考虑而被使用。

**5. 对农杆菌侵染有敏感性** 利用农杆菌 Ti 和 Ri 质粒作为载体介导的植物基因转化, 则需要植物受体材料对农杆菌敏感, 才能接受外源基因。单子叶植物和裸子植物对农杆菌的侵染不敏感, 而双子叶植物对农杆菌的敏感程度也不一样, 不同的植物, 甚至是同一植物的不同组织细胞对农杆菌侵染的敏感性也有很大差异。因此, 在选择农杆菌转化系统前必须测试受体系统对农杆菌侵染的敏感性, 只有对农杆菌侵染敏感的植物材料才能作为其受体系统。

**6. 具有潜在的经济价值或生产应用价值** 除拟南芥等模式植物外, 一般使用的基因转化受体都应考虑将来转基因成功后的应用及效益。

### (二) 植物基因转化受体系统的类型及其特性

**1. 植物组织受体系统** 即愈伤组织再生系统, 是指外植体经脱分化培养诱导愈伤组织, 并通过分化培养获得再生植株的受体系统。受伤的细胞容易受到病毒或质粒的感染, 这些病毒或质粒上的某些 DNA 通过各种不同的方式转移到受伤的植物细胞, 并形成愈伤组织。愈伤组织可以培养成完整的转化植株。该受体系统转化率高, 可获得较多的转化植株, 取材广泛、适用性广。但再生植株无性系变异较大, 转化的外源基因稳定性差, 嵌合体多。

**2. 直接分化再生系统** 指外植体细胞越过脱分化产生愈伤组织阶段而直接分化出不定芽获得再生植株。其具有周期短、操作简单、无性系变异小、转化频率较低、适用范围较小和嵌合体多等特点。

**3. 原生质体再生系统** 原生质体是植物细胞除去细胞壁后的部分, 是一个质膜包围的“裸露细胞”, 能够直接高效地摄取外源 DNA 或遗传物质, 甚至细胞核。原生质体在合适的条件下具有分化、繁殖并再生成完整植株的能力, 具有全能性。原生质体在体外比

较容易完成一系列细胞操作或遗传操作，互相之间可以发生细胞融合，而且还可以直接高效的捕获外源基因。其具有嵌合体少、适用范围较大（花粉管通道法也是利用了卵细胞的原生质体原理）、遗传稳定性差、周期长、难度大及再生频率低等特点。

**4. 胚状体再生系统** 胚状体是由具有卵细胞特性的胚性细胞发育而来。这些胚性细胞具有很强的接受外源 DNA 的能力，是理想的基因转化感受态细胞，而且胚性细胞繁殖量大，同步性好，转化后的胚性细胞即可发育成转基因的胚状体及完整的植株。因此，该受体系统的重要特点是转化率和转化效率都很高。

**5. 生殖细胞受体系统** 它是利用植物自身的生殖过程，以植物生殖细胞，如花粉细胞、卵细胞为受体细胞进行基因转化的系统，也称之为种质系统。目前主要以两个途径利用生殖细胞进行基因转化：一是利用组织培养技术进行花粉细胞和卵细胞的单倍体培养，诱导愈伤组织，进一步分化发育成单倍体植株，从而建立单倍体的基因转化系统；二是直接利用花粉和卵细胞受精过程进行基因转化，如花粉管导入法、花粉粒浸泡法、子房微针注射法等。由于该受体系统与其他受体系统相比有许多优点，如具有全能性的生殖细胞直接为受体细胞，具有更强的接受外源 DNA 的潜能，一旦将外源基因导入这些细胞，犹如正常的受精过程会收到“一劳永逸”的效果；利用植物自身的受粉过程，操作方法方便、简单。不足之处是利用该受体系统进行转化受到季节的限制，只能在短暂的开花期进行，且无性繁殖的植物不能采用。其具有转化效率高、周期短、操作简便和仅适用开花植物（受季节性限制）等特点。

**6. 叶绿体转化系统** 1988 年 Boynton 等首先利用基因枪把野生型 *atpB* 基因的叶绿体 DNA 导入突变的衣藻中得到表达，并使其光合作用能力恢复，证明了叶绿体转化的可行性，从此也创立了叶绿体遗传转化体系，现已成为植物基因工程的新热点。其特点为目的基因的转化效率高，且后代表达稳定，利于适合多基因转化。由于植物细胞中含有多个叶绿体，因此，将外源基因导入叶绿体基因组中时会使该基因在细胞中的拷贝数迅速增加，可大大提高转化基因的表达效率。1999 年 Khan 和 Maliga 将绿色荧光蛋白基因和抗壮观霉素基因的融合基因导入烟草叶绿体中，其表达量约占叶片可溶性蛋白的 18%。2000 年 Staub 将人类生长激素蛋白基因转入烟草叶绿体中，其表达量占叶绿体可溶性蛋白的 7%，是基因组整合表达的 300 倍，而且在叶绿体中表达的蛋白避免了转译后的修饰作用，因此，提高了可应用融合蛋白的数量，可实现外源基因的定点整合。叶绿体转化时可以通过构建定位片段使目的序列与叶绿体基因组同源序列间进行重组，实现外源基因的定点整合。外源基因可稳定遗传。由于叶绿体具有母系遗传性，目的基因在后代中的性状分离不遵循孟德尔规律，故转化基因可在子代中稳定地遗传和表达。基因表达为原核方式，环境安全性高。叶绿体转化系统自建立至今虽然有了很大的发展，但目前利用叶绿体作为转化受体，可转化的高等植物仍然很有限。而限制叶绿体转化技术在农作物中广泛应用的主要因素为许多农作物的叶绿体基因组序列未知，目前仅有 10 多种植物的叶绿体基因组全序列已被测定，因此无法确定用于载体构建的同源片段和外源基因的插入位点；多数禾谷类作物是从胚性细胞发育而来，而这些胚性细胞中只含前质体或未成熟的叶绿体，不适于基因枪转化；许多农作物的组织培养及筛选技术不完备，难以满足叶绿体转化的需要。Sidorov 等根据叶绿体基因组序列的高度保守性构建的通用表达载体和

Daniell 等用基因枪转化前质体的成功，为解决前两个困难带来了希望。今后一段时期内，叶绿体转化迫切需要解决的问题仍然是进一步完善转化方法和寻找更适合的筛选标记。

### (三) 植物基因转化受体系统的建立程序

**1. 高频再生系统的建立** 高频再生系统必须具备 4 个条件：外植体的组织细胞具有再生愈伤组织和完整植株的能力，而且最好是外植体能直接分化芽；芽的分化率达 90% 以上；易离体培养，具有高度可重复性；体细胞无性系变异小。因此，必须进行外植体的选择（幼年型的外植体、增殖能力强的外植体、萌动期的外植体、强再生能力基因型的外植体和遗传稳定性好的外植体）和最佳培养基的确立（富集元素平衡培养基、硝酸钾含量较高的培养基、中等无机盐含量的培养基、低无机盐培养基）。

**2. 抗生素敏感性试验** 对抗生素浓度的要求是既能有效地抑制非转化细胞的生长，使之缓慢地死亡，又不影响转化细胞的正常生长。抗生素敏感性试验目前一般采取的方法是先设计出愈伤组织诱导或分化再生培养基，高压灭菌后加入不同种类、不同浓度梯度的无菌抗生素，将未经转化的受体材料置于选择培养基上培养，并观察分化再生状况（以未附加抗生素的培养基接种同样的受体材料为对照）。从试验结果中选择毒性较小、试验浓度相对较低的抗生素作为今后的筛选抗生素。

**3. 农杆菌的敏感性试验及菌种的选择** 利用野生型农杆菌能在外植体组织中形成肿瘤（或发根），从肿瘤的诱导率、发生时间及生长状态确定其敏感性。其操作程序是把常用的菌株接种在固体琼脂平板或液体培养基中。用牙签挑取菌体，穿刺受体植物组织中。可在同一植株的不同部位——叶片及其中脉、花、茎和幼茎的节间多次接种，比较其敏感性。一般来说幼嫩的节间较为敏感，易诱发肿瘤。然后将该植株放在阳光下（不直射）几周后观察肿瘤（或发根）的诱发情况，能形成肿瘤（或发根），则说明该材料可作为农杆菌的一个宿主，可用带有标记基因、报告基因或目的基因的农杆菌介导转化。

以上植物基因转化受体系统的建立程序仅适用农杆菌介导的基因转化，对直接转化法则应根据具体的方法制订相应的程序。

## 二、植物转基因技术方法

植物转基因方法主要包括直接基因转移和农杆菌介导的转化两大类。直接基因转移又包括 PEG 介导的转移、电击介导的转移、基因枪转化以及花粉管通道法等。这些方法各有其优缺点。直接基因转移存在一个共同的、不可忽视的缺点，即常是多拷贝外源基因序列的插入，而多拷贝插入与基因的失活和沉默有着非常密切的关系。与此相反，农杆菌介导的转化多是单拷贝或低拷贝的插入，且优先插入至转录活性区。因此，农杆菌介导的遗传转化已成为各种植物转基因的首选方法，而花粉管通道法以其方法简便、成本较低及周期短等优点受到众广的科技工作者的青睐。目前应用最普遍的转基因方法主要有农杆菌介导、直接转化、植物生殖细胞转化法、脂质体介导转化法等。

### (一) 农杆菌介导的植物转化方法

根癌农杆菌的宿主范围很广，其与宿主（植物细胞）之间的相互作用机理也研究得较为清楚（图 2-3），因此，农杆菌介导的植物转化方法用得最多、最为成熟。根据 DeCleene 等的统计表明，至少有 643 种植物可被农杆菌感染致瘤。近年来，农杆菌介导的遗传转化的实践更拓展了其范围，如水稻等以前难用该方法转化的植物也取得了突破性的进展。目前，常用的农杆菌转化的方法有如下三种：

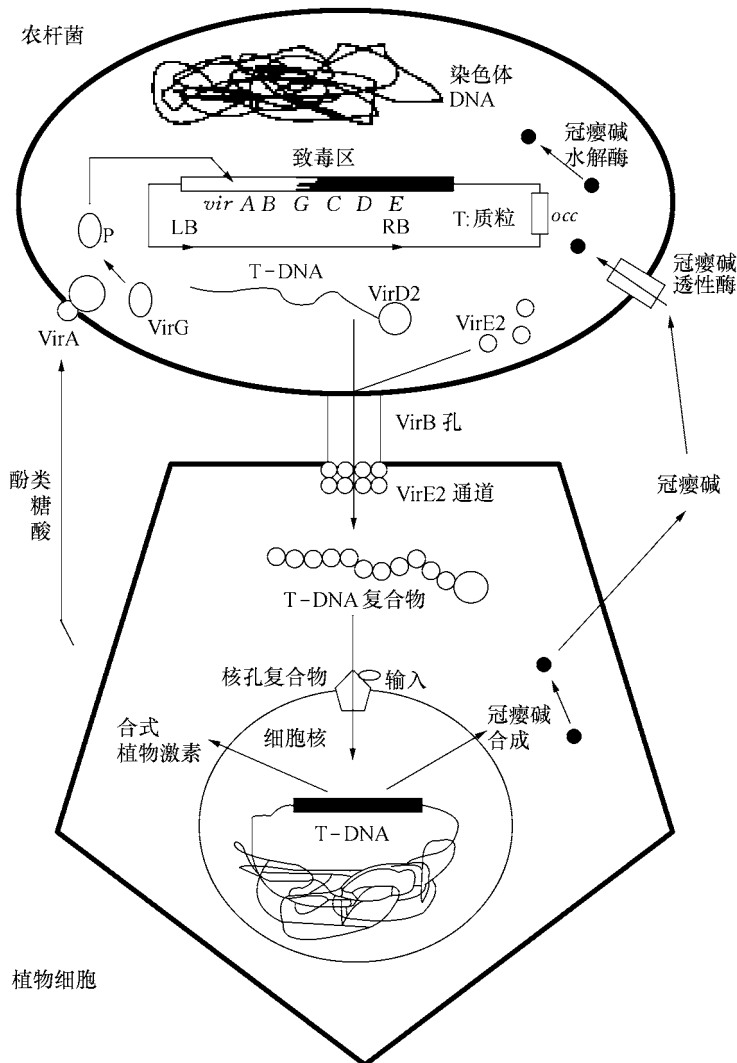


图 2-3 农杆菌与植物细胞之间相互作用

**1. 整株感染** 一般采用种子实生苗或试管苗作为外植体，在整体植株上造成创伤，然后把对数生长期农杆菌接种于创伤面上，或用针头把农杆菌注射到植物体内，使其进行

侵染转化。Hood 用菌株 A281 感染月龄的挪威云杉 (*Picea abies*) 幼苗, 冠瘿瘤转化率达 31%。除了实生苗外, 小植株也能够受侵染。Loopstra 转化 12 月龄的唐松 (*Pinus lam bertiana*), 从得到的冠瘿瘤中测到农杆菌的合成。这种方法充分利用了实生苗的生长潜力, 具有较高的转化成功率。同时, 可以避开组织培养的过程, 对诱导再生困难的植株是一条可以选择的途径。其优点是实验周期短、操作简便。但不足之处是转化细胞中常含有未转化的细胞, 筛选困难。近年来, 很多采用更为简便的方法, 即用农杆菌在减压条件下感染模式植物拟南芥的花器官以增加感染面积, 把收到的种子在抗性培养基上筛选转基因植物。

**2. 叶圆片法** 又称“叶盘法”。该方法是 Monsanto 公司的 Horsch 等于 1985 年建立的, 其技术途径见图 2-4。这是双子叶植物较为常用的简单有效的方法。主要方法是选取健康的无菌苗, 用打孔器打出叶圆盘或把叶外植体切成小块, 将带有新鲜伤口的叶圆盘与载有目的基因的农杆菌液进行短期共培养, 农杆菌通过伤口使携带外源基因的 Ti 和 Ri 质粒进入植物细胞, 使外源基因整合进植物基因组中。众多研究报道: 叶片(叶柄)、茎(花茎、葡状茎)、子叶(子叶柄)、下胚轴(上胚轴)是目前应用最成功的外植体, 并且不同植物所要求的外植体的种类不同。同一物种中, 不同的外植体会有不同的转化效果。例如苜蓿属的 *M. varia* 试管苗的叶片比叶柄的转化效率高 4 倍。实际上, 其他外植体, 如愈伤组织也可用该方法进行转化, 其技术途径见图 2-5。

**3. 原生质体农杆菌共培养法** 该法是将处于细胞壁再生时期的原生质体与农杆菌一起共培养, 离心洗涤去菌后, 培养在含抗生素的选择培养基上, 即可得到转化的细胞克隆。这

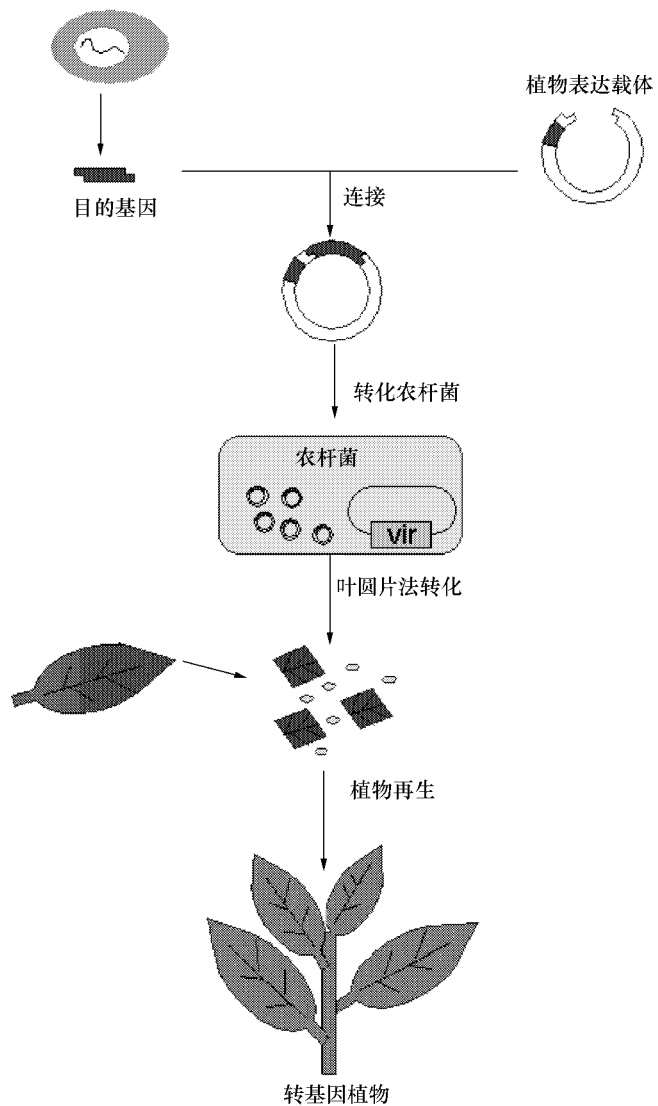


图 2-4 根癌农杆菌介导的叶盘法——叶圆片法



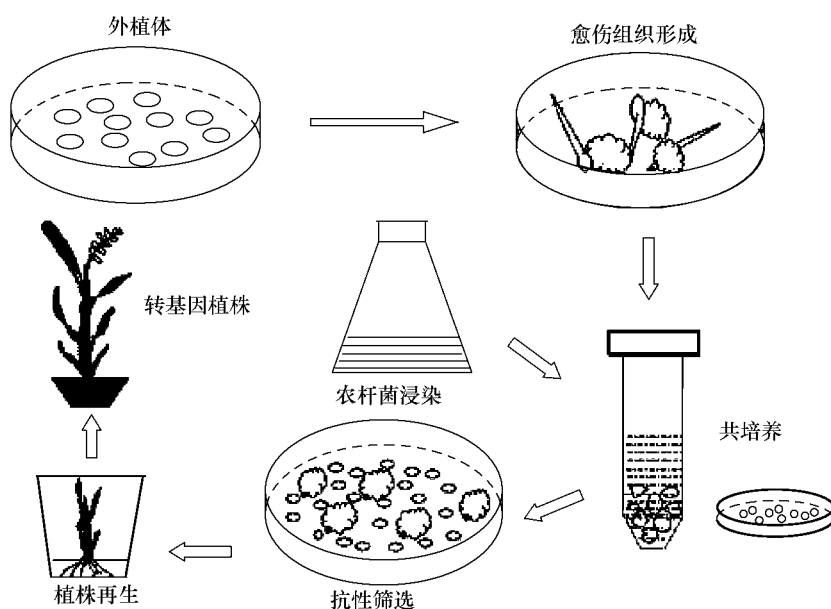


图 2-5 根癌农杆菌转化——愈伤组织共培养途径

种转化方法的优点是得到的转化体一般不会是嵌合体。利用此种方法已使烟草属的多种植物，以及矮牵牛、龙葵、胡萝卜等细胞转化，并已获得转基因植株。

## (二) DNA 直接转化

即用裸露的 DNA 经特殊处理（对目的基因分离鉴定后，在 5' 端加上一个启动子，在 3' 端加上终止子）后，直接转移到植物细胞和原生质体中，并整合到细胞核基因组的技术。它适用于对农杆菌感染不敏感的植物。使用此法的前提是需要建立良好的细胞或原生质体培养及再生系统。常用的 DNA 直接转化的方法可以分为化学和物理方法两大类。

**1. 化学转化方法** 在化学转化方法中，最常用的是聚乙二醇（PEG）、多聚鸟氨酸（PLO）、聚乙烯醇（PVA）、磷酸钙沉淀等方法。其中以 PEG 法（Krens 等，1982）应用较多，效果较好。其基本设计思路来源于 PEG 诱导的原生质体融合技术。其基本方法是将刚分离的原生质体悬浮于含有质粒 DNA 的溶液中，用 PEG 促进原生质体对质粒 DNA 的摄取，从而获得转基因的再生愈伤组织，进而可分化得到转基因植物。应用这种方法已成功获得大麦、柑橘、胡椒等植物的转基因植株。该法转化效率低和对原生质体难以培养的禾谷类不能进行有效转化。

**2. 物理转化方法** 物理转化方法的原理在于许多物理因素可影响细胞膜的功能，或造成机械损伤，使外源 DNA 直接进入细胞。常用的物理转化方法有电穿孔法、显微注射法和基因枪法。

电穿孔法（electroporation）又称“电激法”（Neumann 等，1982），是在高压电脉冲作用下，在新鲜分离的原生质体的质膜上形成可逆性的瞬间通道，从而发生外源 DNA 的摄取。电穿孔法对植物细胞不产生毒性，而且转化效率较高，特别适于瞬间表达。但该法

存在易造成原生质损伤的缺点。Nyman 等 (1992) 用电穿孔法把 GUS 基因转移到草莓原生质体中。利用该法已在甘蔗、大麦等植物中成功实现基因转化。

显微注射法 (microinjection) 是 Pena 等 1987 年首创的, 在用此方法进行基因导入时, 通常需先把原生质体或培养的细胞固定在琼脂或低熔点的琼脂糖上, 或用聚赖氨酸处理使原生质体附着在玻璃平板上, 也可以通过一固着的毛细管将原生质体吸着在管口, 再进行操作。该方法的优点是转化效率高, 无特殊的选择系统。但是, 利用显微注射需要以精细的显微操作技术和低密度的培养为基础。同时, 要想获得转化的植株, 需要注射大量的细胞或原生质体, 费工、费时。因此, 该方法比较适合大细胞的操作。主要用于动物的基因转化当中。在用于植物的基因转化方面, Ding 等 (1994) 将 Bt 毒蛋白基因通过注射法注入玉米胚囊, 获得玉米抗虫植株。沈世华等 (2001) 直接对离体的玉米子房注射, 然后进行光照培养, 3~4 周后, 获得种子, 避免了组织培养与再生。可见前两者都是以原生质体为材料, 但是, 原生质体的培养及植株再生有较大的困难, 费时、费力, 还存在着基因型的限制。

基因枪法又称微弹轰击法 (microinjectile bombardment), 是由康乃尔大学 Sanford 等在 1987 年建立的基因导入方法。其原理是将 DNA 包裹于微小的金属钨或金粒的表面, 在高压下使金属颗粒喷射, 高速穿透受体细胞或组织, 使外源基因进入受体细胞核, 并整合表达的过程。之所以选择钨或金作为子弹的原因, 在于它们在植物细胞和原生质体中呈现惰性, 不会影响植物细胞或原生质体正常的生理活动。至今为止, 该法已成为除了农杆菌介导转化法以外应用最广泛的基因转移技术。此法已在葡萄、水稻等植物转基因中应用, 并获得转基因植株。基因枪法也可以有效地用于叶绿体的转化, 还可以转移 RNA、YAC、DNA 克隆等。基因枪法是一种受体范围很广的基因转化方法, 虽成独立技术体系, 但从某种意义上讲, 它是农杆菌转化方法的重要补充。因为其转化结果没有根癌农杆菌有优势, 常产生基因多拷贝形式, 这对转基因植物来说会产生基因沉默现象。表 2-2 归纳总结了其应用特点及优势。基因枪法与根癌农杆菌转化法技术途径比较见图 2-6。

表 2-2 基因枪技术的优越性与不足之处

基因枪技术的优越性:

- ① 无宿主限制, 能转化任何植物, 不受外植体限制, 这为那些农杆菌感染不敏感的单子叶植物转化提供了可行方法。
- ② 靶受体类型广泛, 不受基因型的限制, 可以适用于不同的物种以及同一物种的不同品种, 细胞、组织、器官等均可作为转化受体, 并且可用于酵母、细菌及动物的转基因中。
- ③ 可以转化线粒体、叶绿体等植物的不同细胞器, 外源 DNA 进入细胞质后很难穿过双层膜。在细胞器用基因枪技术转化时, 这类细胞器转化频率高, 重复性好, 是目前该领域研究中最常用和最有效的 DNA 导入技术。
- ④ 可控度高。采用高压放电或高压气体驱动, 可根据实验需要, 将金属颗粒 (载体) 射入特定层次的细胞 (感受态细胞和再生区细胞), 这大大提高了遗传转化效率。
- ⑤ 操作简便快速。基因枪转化法只要在无菌条件下, 将载有外源基因的金属颗粒轰击受体材料, 便可进行筛选培养, 不需要进行原生质体制备分离与培养的繁琐工作。

基因枪技术的不足之处：

- ① 基因枪轰击的随机性导致转化效率不高。
- ② 基因插入往往是多拷贝成簇整合到受体基因组中，而且可能发生多种方式重排。
- ③ 同源序列能以 DNA - DNA、DNA - RNA、RNA - RNA 的方式相互作用，导致转录或转录后水平的基因沉默。
- ④ 轰击过程中可能造成外源基因的断裂，并且使插入的基因成为无活性的片段。
- ⑤ 出现非转化体或嵌合体的可能性较高。

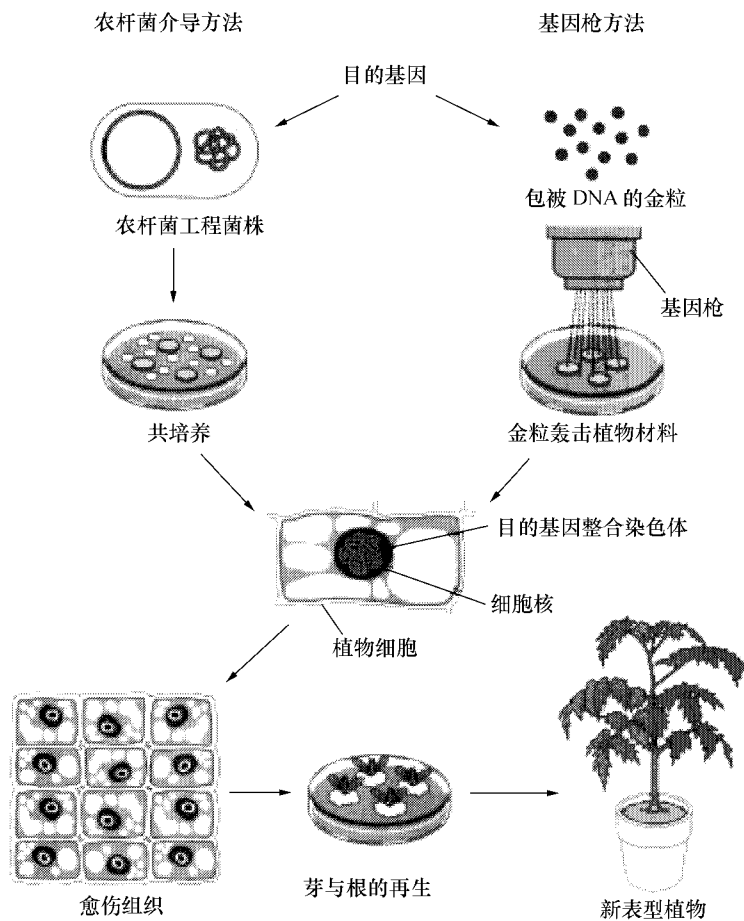


图 2-6 基因枪法与根癌农杆菌转化法技术途径比较

低能离子束法 (ion implantation) 是由我国科学家自行创造的一种基因转移的方法。余增亮等在研究低能离子束与细胞表面相互作用的过程中，发现离子束对细胞壁具有刻蚀作用，提出离子束介导转基因的设想。10 多年来，离子束介导的遗传基因转化，在水稻、小麦、棉花、烟草、西瓜等多种植物上取得成功。

用于植物基因直接转化的方法还有激光束法，即用激光微束处理植物组织或细胞，使胞壁和胞膜穿孔，从而使 DNA 导入其中。另外，还有我国科学家创造的利用超声波进行基因转化的方法，已获得烟草、玉米等植物的转化植株。

**3. 花粉管通道法** 利用植物正常授粉后形成的花粉管通道导入外源 DNA 的技术，称“花粉管通道法” (pollen-tube pathway)，是由我国周光宇等 (1983) 建立，并在长期科学研究中发展起来的。其主要原理是利用开花植物授粉后形成的花粉管通道，在植物开花以后，除去柱头，直接利用外源的 DNA 进行涂抹，使外源 DNA 能沿着花粉管渗入，经过珠心通道进入胚囊，转化尚不具备正常细胞壁的卵、合子或早期胚胎细胞。该方法的优点是避开了组织培养技术，受体细胞为具有细胞全能性的卵细胞或者受精卵细胞，缺点是对不同作物导入 DNA 的最佳时间有较大的差异，应随植物不同而做出相应的改动。这一技术可以应用于任何开花植物，现有许多派生技术方法见报道。如负压花浸泡法等。成株转化率一般在  $10^{-2} \sim 10^{-1}$ 。花粉管通道法导入外源基因，这在很多植物中已有成功的报道，如水稻、烟草、甘蓝、小麦、棉花等。据王景雪等 (2001) 利用花粉作为外源的载体进行遗传转化，在玉米上获得成功。在玉米的开花期，用花粉与质粒 DNA 混合，并附加超声波处理，然后辅以人工授粉的方法将外源基因导入受体中。

### (三) 脂质体介导转化

该方法是 Dellaporta 等在 1981 年创造的。其原理是脂质体为人工拟造的类脂 (或胆固醇) 与磷脂构成的小体，能跨膜转运，可将核酸包裹起来，免于核酸酶的作用，而保持核酸的完整性。但该方法缺点是在包装 DNA 时，必须用短时间的超声处理，会使相当多的 DNA 断裂。同时，所用的材料必须使用具有全能性的原生质作为受体细胞，并且转化效率较低，现在很少使用。主要用于动物的基因转化，在植物上此方法介导的基因转移在烟草、青菜等植物上有报道。

### (四) 病毒载体转化

病毒侵染植物后，其核酸分子可以进入植物细胞，进行自我复制和蛋白质合成。正是由于这一特性，使人们在 20 世纪 80 年代初期开始研究将病毒作为植物基因转移载体的可能性。双链 DNA 病毒、单元边 DNA 病毒和 RNA 病毒都可以把基因转移到完整的植物体或组织中，并得到表达。这种方法的基因转化效率比较高。但是，它的安全性受到质疑，目前主要用于动物的基因转移。

除以上基因转化方法以外，还有电泳、碳硅纤维、浸泡法、转座子介导和替代性转化等方法。Kaepfer (1992) 利用碳硅纤维在质粒 DNA 存在下，涡旋转化了烟草和玉米的悬浮细胞培养物。倪苏等 (2000) 利用 DNA 溶液加入十二甲基亚砷浸泡水稻种子胚，获得表现不一的后代。Southgate-EM 等 (1998) 利用电泳、碳硅纤维等方法对玉米进行基因转化。替代性转化法是新西兰 DISR 和 Massey 大学的研究人员设计的一种方法，不是把外源基因导入并表达在植物的本身，而是导入并表达于生活在植物体内的内生植物真菌里，一旦内寄生菌生活在植物里，则外源基因将会由于真菌菌丝体对发育种子胚珠的侵

入而进行母性遗传。目前这种技术被认为是克服禾谷类作物遗传工程困难的一种方法。

以上所述的基因转化方法，可以几种方法联合使用，有时能获得更佳的转化效果。例如 Scorza 等（1995）以无核葡萄未成熟的合子胚中诱导产生的体细胞胚为试材，体细胞胚先被基因枪轰击 2 次，然后与农杆菌共培养，最后经 Southern 杂交证明基因转入。Chand 等报道，当由胡萝卜悬浮培养细胞刚分离的原生质体与发根农杆菌混合，并不形成转化细胞团，如果放 2h 以后，对此混合液进行脉冲处理，会明显提高转化效率。明小天等（2001）利用基因枪将根瘤农杆菌细胞直接轰击到水稻的愈伤组织中，可以明显提高其转化效率。因而，为了获得高效率的、稳定的转化植株，利用多种方法相互结合是进行基因转化的一个较好的途径，是现在进行基因转化的趋势。

### 三、转基因植物中外源基因的遗传规律

#### （一）外源基因的整合

虽然目前已开发出许多有效的基因转移体系可将外源基因导入受体细胞，但导入的外源基因能否整合以及整合的位置与状态均难以控制。所以，在目前植物基因工程的研究中，只能在大量的转基因植物中进行选择，这在一定程度上限制了植物基因工程的广泛应用。从已有的文献来看，外源基因的整合最主要的是异常重组，其次是位点专一重组和同源重组，但后两者频率相当低。对外源基因的整合方式而言，最理想的无疑是同源重组。因为这一方式可以将外源基因整合在特定的位置上，还可以修复有缺陷的基因，诱导特定基因失活等。但目前由于技术所限，很难做到这一点。

外源基因以质粒为载体通过同源或非同源重组随机整合到受体染色体 DNA 上。因而质粒 DNA 上的受体染色体的存在方式将影响外源基因存在的完整性和拷贝数。实验表明，位于不同质粒上的两个基因的共转化频率低于同一质粒上的两个基因。前者共转化过程中的共整合频率为 20%~30%，而后者为 80%~100%。说明转化过程中质粒 DNA 的完整性保证了非筛选基因和筛选基因在受体染色体上有较高的共整合频率。

#### （二）外源基因在后代中遗传的多样性

外源基因在后代中遗传的多样性通常用转基因植株与非转基因植株杂交或转基因植株自交结合来分析外源基因在后代中的遗传。外源基因一般作为显性基因传递给后代，遵循孟德尔遗传规律，自花授粉的后代表现 3:1 分离规律，与非转化亲本杂交的后代表现 1:1。可能在多拷贝转基因植株中，只有一个具有表达功能，或者所有表达的拷贝整合在受体染色体基因组的一个位点。但也有表现出 2 个不连锁的显性基因，在自交的后代中表现出 15:1 的分离规律。另外，有一特殊现象表现出自交一代符合 3:1 分离规律，而自交二代不符合孟德尔遗传规律。一般说来，虽然目的基因 DNA 在整合过程中经受各种变化，如甲基化、环化、片断分离和丢失等，但整合一旦发生，外源基因可稳定地通过有性生殖遗传给子一代，除非在减数分裂过程中丢失。



## 四、转基因植物鉴定方法

### (一) 外源基因的整合鉴定

**1. Southern 杂交** Southern 杂交用于检测和分析外源基因的整合情况。它是用标记的外源基因或片段作探针，与目标 DNA 进行杂交。具体方法有 Southern 斑点杂交、Southern 印迹杂交及 Southern 原位杂交三种。

(1) Southern 斑点杂交 斑点杂交可以较快地粗略检测植物基因组内是否含有外源基因。植物总 DNA 或基因组 DNA 不经限制性内切酶酶切，以手工或点膜器法将样品直接点在固相膜上。点样前 DNA 样品需经变性处理，一般做法是采用 NaOH 碱变性，也可以通过煮沸变性。样品在负压作用下流至固相膜上，轻微洗膜除去盐后进行固定。固定方法可采用 80 °C 烘烤或 254 nm 紫外线照射，以后的操作与印迹杂交相同。斑点杂交的主要缺点是假阳性率较高。

(2) Southern 印迹杂交 印迹杂交用于检测经限制性内切酶切割的植物 DNA 片段中是否存在与探针同源的序列，并可分析外源基因在植物染色体上的整合情况。如拷贝数、插入方式以及外源基因在转化植株 F1 代中的稳定性等问题。具体操作包括植物 DNA 提取、酶切、电泳、印迹转移、杂交（包括探针的制备及变性、预杂交、洗膜）及杂交信号检出等步骤。具体方法参见《分子克隆实验指南》（第三版，科学出版社，2003 年）。

(3) Southern 原位杂交 Southern 原位杂交是确定外源基因在染色体上的位置。它以标记的外源基因为探针，在适宜的条件下，探针与固定在玻片上的细胞内变性染色体上互补序列形成稳定的杂交体，尔后根据探针的标记性质进行检测，放射性同位素标记的探针，通过放射自显影检测，酶标记探针通过显已反应检出，在显微镜下观察。原位杂交包括取材及材料预处理、固定细胞、细胞的 RNase 酶解及染色体变性、杂交、检出等五个程序。具体方法参见《分子克隆实验指南》（第三版，科学出版社，2003 年）。原位杂交技术存在两个问题：一是灵敏性不高，二是有时会出现非特异性杂交。

**2. PCR - Southern 杂交** PCR - Southern 杂交是一种近年来开始使用的检测外源基因整合的方法。该方法先对被检材料进行外源基因的 PCR 扩增，然后再用目的基因的同源探针与扩增的特异性条带进行杂交。PCR - Southern 杂交解决了 Southern 杂交所需的样品量较大（5~15 μgDNA）、样品纯度要求高等问题。因此，利用 PCR - Southern 杂交解决了在转化材料比较少时不能及时检测问题。

### 3. RFLP 及 RAPD 分析

(1) RFLP 分析 RFLP（限制性片段长度多态性）是用限制性内切酶消化 DNA，通过分析限制性酶切片段的多态性，来显示 DNA 结构的多态性，从而达到了解基因细微结构及其变化的一种分析方法。RFLP 除经常用于植物品种遗传分析及分类外，还可以研究基因突变及基因转化。如今 RFLP 是一项利用放射性同位素或非放射性物质标记探针，与转移在固相膜上的基因组 DNA 进行杂交，通过显示限制性内切片段的大小来检测不同遗传位点等位变异的一项技术。通过对转化后得到的不同克隆系的 RFLP 分析，可获得

不同克隆系在外源基因整合数及整合位点上的信息。

(2) RAPD 分析 RAPD (随机扩增多态 DNA) 是利用 PCR 技术从扩增的 DNA 片段上分析多态性。外源基因转化后转基因植株基因组 DNA 与非转化植株基因组 DNA 在外源基因插入的部位有着明显不同。当引物适宜时, 扩增的条带长短就会不同, 所以, 利用 RAPD 分析可以快速对导入的外源基因进行鉴定。如果转化植株有外源基因插入, 则可能会引起植物基因组重排, 这样在一定条件下, 用 RAPD 技术可以检测出对照植株和转化植株 PCR 产物带形的区别, 还可以检测后代植株间基因组的稳定性及在后代间的分离。RAPD 技术可在对被检对象无任何分子生物学资料的情况下, 对其基因组进行分析。

目前根据待扩增基因两端已知的 DNA 序列设计 15~30 个核苷酸的引物进行常规的 PCR, 常用于大量转基因植株样品快速筛选鉴定 (初筛)。

## (二) 外源基因的表达分析

### 1. 报告基因的酶法检测

(1) GUS 基因检测 GUS 基因广泛用作转基因植物、细菌和真菌的报告基因, 尤其应用在研究外源基因瞬时表达的转化实验中。此外, GUS 基因 3'-端与其他结构形成的融合基因也能够正常表达, 所产生的融合蛋白仍具有 Gus 活性, 这对研究外源基因表达的具体细胞部位及组织部位提供了方便条件。目前主要有 4 种不同的检测方法: ①组织化学染色定位法。以 X-Gluc 为底物, 通过显色反应可直接观察到组织器官中 GUS 基因的活性。为避免叶绿素对实验结果的干扰, 常用乙醇及 FAA 固定液进行脱色处理。②荧光法测定 Gus 活性。以 4-甲基伞形酮酰- $\beta$ -D 葡萄糖醛酸苷 (4-MUG) 为底物, Gus 催化其水解为 4-甲基伞形酮 (4-MU) 及  $\beta$ -D 葡萄糖醛酸。4-MU 分子中的羟基解离后被 365 nm 的光激发, 产生 455 nm 的荧光, 可用荧光分光光度计定量。③分光光度法测定 Gus 活性以对硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷为底物, Gus 将其水解, 生成对硝基苯酚, 在 pH 7.15 时离子化的发色团吸收 400~420 nm 的光, 溶液呈黄色, 可用荧光分光光度计定量。④Gus 活性的荧光法定性检出采用底物凝胶荧光检测法及 SDS-PAGE 法。

(2) 荧光素酶基因的检测 用作报告基因的荧光素酶基因主要来自细菌或萤火虫。检出方法有活体内荧光素酶活性检出和体外荧光素酶活性的检测两种。荧光素酶基因的检测方法简便、灵敏, 并且通常无本底, 因而该基因很适合在植物基因转化中用作报告基因。此外, 与其他报告基因相比, 它不损害植物体或离体器官的情况下测定表达产物, 做法为向被检材料渗入荧光素, 通过照相或图像电视系统, 检测植物体内的可见光生成, 并通过光生成的部位了解基因表达部位、基因产物分布部位及底物在植物组织中的转移等。

(3) NPT-II 基因的检测 NPT-II 基因来源于细菌转座子 Tn5 上的 aphA<sub>2</sub>, 目前被广泛使用。该基因编码氨基糖苷-3'-磷酸转移酶 (NPT-II), 该酶使氨基糖苷类抗生素 (新潮霉素、卡那霉素、庆大霉素、G418 和巴龙霉素等) 磷酸化而失活。其机理是 NPT-II 使 ATP 分子上的  $\gamma$ -磷酸基转移到抗生素分子上, 影响抗生素与核糖体亚基的结合, 从而使抗生素失活。检测原理是使用放射性标记的 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP, 通过  $\gamma$ -磷酸基团转移, 生成带放射性的磷酸卡那霉素。具体检测方法有点渍法、层析法和凝胶原位检测法 3 种。

## 2. 外源基因的转录检测

(1) Northern 杂交 转基因植株中外源基因的转录水平可通过细胞总 RNA 或 poly (A) mRNA 与探针的杂交来分析, 称 Northern 杂交。它是研究转基因植株中外源基因表达及调控的重要手段。Northern 杂交分为斑点杂交及印迹杂交。斑点杂交只能鉴定外源基因是否转录, 而印迹杂交可对外源基因的转录情况进行较详细的分析, 如 RNA 转录体的大小及丰度等。Northern 杂交程序分为植物细胞总 RNA 的提取、探针的制备、印迹及杂交等步骤。

(2) RT-PCR 检测 RT-PCR 原理是以植物总 RNA 或 mRNA 为模板进行反转录, 再经 PCR 扩增, 用以检测外源基因在植物细胞内的表达。如果从细胞总 RNA 提取物中得到特异的 cDNA 扩增条带, 则表明外源基因实现了转录。此方法简单、快速。但对外源基因转录的证实还需 Northern 杂交实验结果来验证。

## 3. 外源基因表达蛋白的检测

(1) ELISA 检测 ELISA (酶联免疫吸附法, enzyme-linked immuno sorbent assay) 是一种利用免疫学原理检测抗原、抗体的技术。以固-液抗原-抗体反应体系和酶标记技术, 使抗原与抗体的结合通过酶反应来检测。由于酶反应的放大作用, 使测定的灵敏度极高, 可检出 1pg 的目的产物。同时, 酶反应有很强的特异性, 因此, ELISA 是基因表达研究中不可缺少的技术与方法。其除了检测可溶性抗原 (抗体) 之外, 还可以检测含表面抗原的细胞。检测程序包括抗体制备、抗体或抗原的包被、免疫反应及检出三个阶段。

(2) Western 杂交 Western 杂交 (Western blot) 是将蛋白质电泳、印迹、免疫测定融为一体的特异蛋白质检测方法, 具有很高的灵敏性。用于检测植物细胞内目的蛋白表达与否、浓度大小及大致的分子量。包括植物蛋白的提取、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、蛋白质印迹、抗体探针的制备、杂交与检出等步骤。

(3) 表达蛋白的含量测定 蛋白质含量可根据它们的物理性质, 如折射率、相对密度、紫外吸收进行测定。也可用化学方法, 如定氮、双缩脲反应、folin-酚试剂反应、Lowry 法、Bradford 法等测定。还可用通过与染料结合生产有色物质进行测定。

# 五、植物生物反应器的产物活性分析技术

## (一) MTT 比色实验

Mosmann 于 1983 年首创, MTT 比色法是一种检测细胞存活和增殖的方法, 也是一种有效的检测表达蛋白的生物学活性技术。MTT 商品名为噻唑蓝。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为难溶的蓝紫色的结晶物 (甲胍, formazan, 其产量与活细胞数成正相关), 并沉积在细胞中, 而死细胞则无此功能。DMSO、无水乙醇或酸化异丙醇等能溶解细胞中的蓝紫色的结晶物, 用酶联免疫检测仪在 490~560 nm 波长处测定其吸光值, 可以间接反映活细胞数量。该方法灵敏度高、操作简便、经济、快速、自动化, 无放射性污染。缺点是影响因素多, 重复性较差。MTT 有毒性致突变性, 操作时应

注意防护。

## (二) 细胞体外实验

如细胞生长/抑制实验、细胞体外杀伤实验。

## (三) 动物试验及人体自愿者实验

**实例一：**Mason 等研究了 NVCP 在转基因烟草和马铃薯中的表达及其口服免疫原性，发现在转基因植物中表达的 NVCP 与重组杆状病毒表达的 NVCP 具有相似的物理学特性。在转基因烟草的叶浸提物中 NVCP 也可组装成病毒样颗粒，电镜下观察为空心的球形，大小和形态与杆状病毒在昆虫细胞中所表达的无区别，直径为 38 nm，在蔗糖梯度离心及 SDS/PAGE 中其物理特征与杆状病毒在昆虫细胞中表达的重组蛋白也相似。rNVCP 在叶中的表达量最高可达可溶性蛋白的 0.23%，在马铃薯块茎中可达 0.37%。用从叶中浸提的 rNVCP 灌服小鼠（在 1、2、11、28 d 灌服，剂量 10~80  $\mu\text{g}$ ）进行口服免疫试验。或用马铃薯块茎直接饲喂小鼠（在相同时间每次饲喂 4 g 去皮马铃薯，含 40~80 ng NVCP 蛋白），均可产生特异性血清 IgG 和 IgA 抗体。需要说明的是，免疫后 40d 检测抗体时，灌服鼠血清怕 IgG 抗体产生率较高近 90%，而黏膜 IgA 的产生率较低，约 60%；直接饲喂的小鼠，血清 IgG 抗体产生率只有 40%，黏膜怕 IgA 抗体产生率才 10%。这种低反应性原因不明，可能与免疫原特性有关。

**实例二：**对 LT-B 和 CT-B 转基因植物的研究相对较多，效果也较好。Haq 等报告，用 LT-B 基因转化的烟草和马铃薯，其外源基因均能获得表达，并有较好的免疫原性。在他们的试验中，最大表达量，烟草为每克可溶性蛋白 5  $\mu\text{g}$ ，马铃薯块茎为每克可溶性蛋白 30  $\mu\text{g}$ 。用烟草叶浸提物口服免疫的小鼠（在 0、4、21、25 d 灌服，每次约含 12.5  $\mu\text{g}$  重组 LT-B 蛋白），在免疫后 30~32 d 时采集血清和粪便，检测血清 IgG 和黏膜 IgA，结果其 IgG 和 IgA 抗体价与用同剂量细菌性 LT-B 灌服的免疫小鼠完全一致。在同样时间直接饲喂转基因马铃薯，每次 5 g（含 15~20  $\mu\text{g}$  LT-B），也都产生血清 IgG 和黏膜 IgA，但与每次灌服 20  $\mu\text{g}$  细菌性 LT-B 小鼠相比，抗体清度较低。这一现象的产生是由于生饲马铃薯中有限制或干扰重组蛋白与肠黏膜淋巴组织反应的因素存在。但据 Mason 等报告，每周饲喂小鼠 1 次，每次 5 g 马铃薯（含 20 或 50  $\mu\text{g}$  LT-B），第三次饲喂后 1 周，血清 IgG 和黏膜 IgA 抗体水平高于灌服 5  $\mu\text{g}$  细菌性，LT-B 的小鼠，而且口服 25  $\mu\text{g}$  LT-B 进行攻击试验时，饲喂试验组虽没有 1 只小鼠被完全保护，但免疫保护效果也优于灌服 5  $\mu\text{g}$  细菌性 LT-B 的对照组。

Arakawa 等对 CT-B 转基因马铃薯重组蛋白的免疫原性进行了研究。他们用马铃薯块茎饲喂小鼠，每周 1 次，4 次后，在不同时间分别测血清和粪便中 IgM、IgG 和 IgA 3 种抗体，发现粪中 IgG 和 IgA 在第 4 次饲喂后 4 d（总计约 28 d）时最高，在以后 40 d 内逐渐降低；血清 IgG 和 IgA 在 35~70 d 时略有上升，而 IgM 则略有下降。他们还发现，在粪 IgG 和 IgA 下降后，再饲马铃薯加强免疫时，这 2 种抗体均可升高。饲喂免疫小鼠血清抗体具有中和 CT 对 Vero 细胞的致病变作用。饲喂 1 g 马铃薯的小鼠血清中和价为 1:2，饲喂 3 g 马铃薯的小鼠血清为 1:8。用 CT 攻击免疫小鼠，回肠内仅泻液显著



减少, 若以回肠内腹泻液的体积和回肠长度比为标准计算保护率, 饲喂 1 g 马铃薯组小鼠保护率为 42%, 饲喂 3 g 马铃薯组为 62%; 而灌服 30  $\mu\text{g}$  细菌性 CTB 对照组小鼠则为 55%, 表明这种饲用转基因马铃薯具有良好免疫原性。作者已申请并获准在自愿者人体进行免疫试验。

**实例三:** Tackef 等在志愿者人体进行了生食 LT-B 转基因马铃薯免疫试验。参试 14 人, 分低、高剂量组, 分别于 0、7、21 d 食用 3 次, 每次低剂量组食用 50 g 转基因马铃薯, 高剂量组为 100 g (每克马铃薯含 3.7~15.7  $\mu\text{g}$ LT-B), 结果表明, 食用 7 d 后, 在血循环和粪便中即可部分检出 IgG 和 IgA 特异性抗体, 并证明有中和活性。血清 IgG 持续时间较长, 食后 59 d 时, 有的个体仍在上升, 血清 IgA 在食后 28 d 达高峰; 而粪便 IgA 在 7~14 d 达高峰。黏膜抗体检出率也比血清抗体低, 粪便 IgA 检出率为 50%, 血清 IgG 为 91%, IgA 为 55%。由此可见, 对食用转基因 LT-B 疫苗的反应, 个体间存在显著差异。此外, 还初步发现增加食用马铃薯剂量 2~3 倍, 并未相应地增强免疫反应的作用。

**实例四:** Gomez 等用 TGEV-S 蛋白 N 端 cDNA 或全长 cDNA 获得了转基因芥菜。在叶浸提物中, 表达的外源蛋白占叶可溶性总蛋白的 0.03%~0.06%。2 种 cDNA 表达水平没有明显区别。用叶浸提物经肌肉注射免疫小鼠, 在 0、15、30 d 各 1 次, 每次含总蛋白为 40 mg。第一次加福氏完全佐剂, 以后用不完全佐剂。结果表明, 免疫鼠可产生特异性血清抗体, 并在蚀斑减少试验中表现了中和活性。据此可认为, 转基因植物表达的这种 S 蛋白有可能成为疫苗生产新来源。但遗憾的是未进行口服试验。

**实例五:** Carrillo 等用口蹄疫病毒 VP1 基因也获得了转基因芥菜。用含有 rVP1 的叶浸提物免疫小鼠, 可诱导产生特异性抗体。这种抗体不仅能与 VP1 发生反应, 而且也能与完整的口蹄疫病毒颗粒反应。特别令人鼓舞的是, 所有免疫小鼠都抵抗了口蹄疫病毒强毒的攻击。

### 第三节 转基因植物生物反应器的产品利用技术

利用基因工程技术, 将某些生物的有益健康的基因转移到植物、农作物中去, 改造植物、农作物的遗传物质, 使遗传物质得到改造的生物在性状、营养和消费品质等方面向人类需要的目标转变。转基因植物生物反应器使植物、农作物生产健康食品、功能食品、营养食品, 在农业生产、动物饲养和医药研究等诸多领域有着广泛的应用前景。

#### 一、转基因植物的直接利用

利用转基因植物, 生产抗艾滋病、狂犬病、糖尿病和结核病等疾病的疫苗和药物, 若基因受体为水果等作物则可直接通过口服, 这是转基因植物的直接利用的典型范例。直接口服的前提条件是通过黏膜产生免疫效果的疫苗, 如腹泻疫苗等, 或不易被胃蛋白酶降解的小分子多肽及具有独特结构的多肽, 如三叶因子等。德国科学家通过培育转基因植物的方式, 在研制治疗癌症等疾病的药物方面取得一定进展。科学家认为, 转基因植物转基因



植物有希望在未来成为获得多种疫苗及特种药物的新途径。来自弗莱堡大学医院的专家胡伯特·布鲁门称，他们在培育转基因植物方面已取得一定成果，已从培育的转基因植物中获得了一些可在癌症检测中起作用的复杂抗体。此外，诸如干扰素等一些治疗癌症的特殊药物也可通过转基因植物获得。科学家解释说，这种方法的原理是将外来基因移植到某些植物中，进而诱使植物自身产生一些蛋白质以对抗不同的疾病。据悉，目前不少科学家正在尝试培育转基因马铃薯、番茄等常见蔬菜，使这些植物含针对诸如狂犬病、流感或者肝炎等疾病的免疫物质，从而使人们通过普通食用方式，吸收这些免疫物质进而达到免疫目的。与现有的疫苗注射方式相比，这种方法在经济上具有很大优势，特别适合贫困国家针对大面积人群使用。布鲁门同时表示，“根据现有科研水平，预计在5~6年后即可通过转基因植物开发出新型疫苗与药物。”通过植物转基因技术获得富有营养的高淀粉含量的马铃薯、含较低饱和脂肪酸的植物油等水果和蔬菜，也可通过直接口服。比如说，普通稻谷里不含有人体所需的维生素A，通过转基因工程，可以让水稻里含有丰富的维生素A。人们吃了这种水稻就不得夜盲症，或由于缺乏维生素A引起的各种疾病。

### 二、表达产物的分离纯化

转基因植物直接表达的产物——蛋白质，若考虑作为针剂或诊断试剂使用，则必须从转基因植物体中分离纯化这种多肽产物，如单克隆抗体、血清白蛋白等；另一些产物是转基因植物间接表达产物，也需经过分离纯化技术才能使用，如利用转基因植物生产价廉的完全生物降解的植物塑料（PHAs），则必须从转基因植物中提取 PHAs。

### 三、表达产物二次加工

有些转基因植物直接或间接表达产物，通过分离纯化后，在体外经过一些酶处理，进行一些必要的化学修饰或单体聚合才能达到使用目的。

## 参 考 文 献

- [1] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社, 1998
- [2] 吴乃虎. 基因工程原理. 第2版. 北京: 科学出版社, 2001
- [3] 朱玉贤, 李毅. 现代分子生物学. 北京: 高等教育出版社, 1997
- [4] Benfey PN, Ren L, and Chua N-H. Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains. EMBO J, 1990, 9: 1685~1696
- [5] Benfey PN, Ren L, and Chua N-H. Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. EMBO J, 1990, 9: 1677~1684
- [6] Brown RL, Kazan K, McGrath KC, et al. A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of Arabidopsis. Plant Physiol, 2003, 132: 1020~1032
- [7] Buchel AS, Brederode FT, Bol JF, et al. Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression in vivo. Plant Mol Biol, 1999, 40: 387~396

- [8] Chakravarthy S, Tuori RP, D'Ascenzo MD, et al. The tomato transcription factor Pti4 regulates defense - related gene expression via GCC box and non - GCC box cis elements. *Plant Cell*, 2003, 15: 3033~3050
- [9] Fujimoto SY, Ohta M, Usui A, et al. Arabidopsis ethylene - responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box - mediated gene expression. *Plant Cell*, 2000, 12: 393~404
- [10] Gourrierc J, Li YF, Zhou DX. Transcriptional activation by Arabidopsis GT - 1 may be through interaction with TFIIA - TBP - TATA complex. *Plant J*, 1999, 18: 663~668
- [11] Jupin I, Chua N - H. Activation of the CaMV as - 1 cis - element by salicylic acid: differential DNA - binding of a factor related to TGA1a. *EMBO J*, 1996, 15: 5679~5689
- [12] Kim S - R, Choi J - L, Costa MA, et al. Identification of G - Box Sequence as an Essential Element for Methyl Jasmonate Response of Potato Proteinase Inhibitor II Promoter. *Plant Physiol*, 1992, 99: 627~631
- [13] Nishiuchi T, Nakamura T, Abe T, et al. Tissue - specific and light - responsive regulation of the promoter region of the Arabidopsis thaliana chloroplast omega - 3 fatty acid desaturase gene (FAD7) . *Plant Mol Biol*, 1995, 29: 599~609
- [14] Sánchez - Serrano JJ, Pe ña - Cortés H, Willmitzer L, et al. Identification of potato nuclear proteins binding to the distal promoter region of the proteinase inhibitor II gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 7205~7209
- [15] Sandhu JS, Webster CI, Gray JC. A/T - rich sequences act as quantitative enhancers of gene expression in transgenic tobacco and potato plants. *Plant Mol Biol*, 1998, 37: 885~896
- [16] Stalberg K, Ellerstom M, Ezcurra I, et al. Disruption of an overlapping E - box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage - protein promoter in transgenic Brassica napus seeds. *Planta*, 1996, 199: 515~519

# 第三章 转基因植物疫苗

## 第一节 概 述

预防接种 (vaccination) 不但保护了个体免受传染病的侵袭, 而且在群体中也限制了病原微生物的传播。通过预防接种来预防、控制、消灭传染病是 20 世纪最伟大的成就之一。人类使用疫苗进行免疫预防的历史可追溯到我国宋代采用“种花”的以毒攻毒的办法来预防天花。以后这种技术传到欧洲, 1796 年英国医生琴纳受种人痘的启示, 发现了种牛痘预防天花较人痘更安全可靠, 这就是现代免疫医学的起源。此后 200 余年来, 世界各国的医药研究人员先后开发出数百种疫苗。疫苗的发展已经从传统的减毒活疫苗、灭活全菌 (病毒) 疫苗、纯化蛋白或多糖疫苗发展到基因工程疫苗阶段。疫苗学也从实验室学科发展成了今天的集免疫学、微生物学、生物化学、分子生物学、生物工程学、流行病学、临床医学和卫生经济学等于一体, 采用尖端技术及其最新研究成果的综合性学科。改进现有疫苗、研制新型疫苗和开发联合疫苗是当今世界疫苗领域的主攻方向。

目前, 虽然已使用许多重组疫苗, 但最大的问题是其成本太高而产量又不足, 因此需要以新的生产系统来满足日益增加的需求。进入 20 世纪 90 年代, 一种前所未闻的新型疫苗引起了人们极大的兴趣, 它就是植物疫苗。其特点是表面上看来它们不过是普通的蔬菜 (水果或其他农作物), 实际上却是生物工程新产品。所谓植物疫苗 (plant - based vaccine), 是把植物基因工程技术与机体免疫机理相结合, 将抗原基因整合于植物体上或重组于病毒载体后转染于植物体上, 利用植物体自身的生命活动, 使该抗原基因得以复制表达, 生产出能使机体获得特异抗病能力的疫苗。1992 年, 美国科学家 Arntzen 和 Mason 率先提出了用转基因植物生产疫苗的新思路。此后, 植物疫苗开发研究因其独特的优越性发展迅猛, 国外已有 100 多种外源蛋白或多肽在植物中成功表达, 先后开发出了十几种人或动物用植物疫苗。植物疫苗的问世堪称为医药技术的一大飞跃, 它是食品与药物 (疫苗) 的完美结合。今后 10 年里人们将会看到一系列植物疫苗陆续登场, 它们将成为 21 世纪世界医药市场上研究和销售的热点。

### 一、植物疫苗的优点

除植物系统外, 能够生产重组疫苗的系统包括动物病毒 (痘苗病毒、鸡痘腺病毒、逆转录病毒等)、细菌 (大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)、酵母 (酿酒酵母)、昆虫细胞和哺乳动物细胞。然而, 它们都存在弊端, 限制了其商业化应用。如细菌细胞不能完成许多病毒蛋白质的转录后修饰作用, 不利蛋白质的重新折叠, 导致其免疫性通常较弱; 酵母菌对有些蛋白质的过分糖基化可能影响针对特定蛋白质的免疫反应, 妨碍了酵母菌在一些疫苗生产中的应用; 多数动物培养系统表达水平低, 需要昂贵的生长培养基, 并且培养基需特殊处

理，以消除致病的有害微生物，因此，疫苗成本很高。而转基因植物疫苗则具有这些系统无法比拟的优越性：

**1. 生产简便，成本低廉，经济易推广** 与植物生物反应器相比，原核生物反应器与动物生物反应器生产时需要昂贵的技术设备、大量的人力、物力。植物是最经济的蛋白质表达系统，种植系统简单易行，植物所需要的仅是阳光和来自土壤或肥料的矿物质营养及水分。植物细胞具有全能性，培养条件简单，便于进行遗传操作。转基因植物疫苗体系一旦建立，就可以在较短的时间内大量繁殖出具有相同遗传背景的无性繁殖系，只需增加耕种面积，像普通植物一样进行种植、收获、运输和加工，就能迅速形成产业化规模。植物基因工程生产的疫苗可以直接储存于种子或果实中，无需冷冻设备进行储藏，易进行长距离运输和普及推广。特别适合在发展中国家使用。

**2. 口服方式的优点** 转基因植物疫苗可以直接口服接种，这既节省了提取、纯化和保存的成本，也省去了注射等医疗措施，易推广使用，特别适合儿童接种和家畜接种。

**3. 免疫原性和生物活性好** 植物比动物细胞培养条件简单，可克服微生物系统不能对真核生物蛋白进行准确的翻译和后加工，使三维空间结构更趋于自然状态。已有大量动物和临床试验证明，植物表达的疫苗产物具有与动物病毒抗原相似的免疫原性和生物活性。

**4. 安全性高** 植物是人类食物来源之一，除个别人群对某些特定的植物过敏外，其安全性高。常规疫苗和其他新疫苗在制备过程中，容易被外源性病原体污染，常规疫苗和其他新技术疫苗在大规模细胞培养或繁殖过程中，容易产生病原性细菌，特别是细胞培养过程中，霉形体的污染极其普遍，而转基因植物疫苗只表达亚单位疫苗，不含致病微生物或潜在致病微生物，免除了使用活病原带来的风险和注射疫苗的灭菌问题，对人、畜安全，不会引起负反应。而且转基因植物作为疫苗生产系统不会成为伦理关注的焦点。

## 二、植物疫苗的可行性

**1. 表达产物具有后加工能力，能进行有效的翻译后加工** 植物细胞和动物细胞一样，均有一套完善的真核表达系统，具有与动物细胞相似的翻译后加工过程，适合动物病毒抗原的表达。表达产物具有与高等动物细胞表达的产物相似的免疫原性及生物活性。植物表达系统生产的蛋白质疫苗可进行正确加工，包括糖基化、磷酸化、酰胺化、亚基正确装配等转译后加工等特点，可保持自然状态下的免疫原性。目前医药生产常用的微生物发酵系统不能对真核蛋白质疫苗进行正确的翻译后加工，有时还导致其免疫原性变弱。

**2. 转基因植物口服疫苗能诱导黏膜免疫** 黏膜免疫是病毒性腹泻的免疫保护机制，在启动黏膜免疫方面尚属难题。转基因植物细胞可以启动黏膜免疫，其机制可能是植物细胞壁给抗原提供了一种生物微囊，使其能经过胃的酸性环境，安全到达小肠，可以保护抗原不被消化酶降解，并有缓释作用，从而引起黏膜免疫应答。另外，一种口服植物疫苗能刺激黏膜免疫系统的解释是，诱导机体产生黏膜分泌 IgA。人体黏膜是人体阻挡某些病原体与人体接触的第一道屏障；黏膜免疫的产生对某些传染病，尤其是通过黏膜传播的传染病的预防非常有效。因此，开发转基因植物疫苗具有巨大的应用潜力和前景。

### 三、植物疫苗表达系统

**1. 稳定的转基因植物整合表达系统** 外源基因稳定地整合在基因组上，如根癌农杆菌介导外源 DNA 或直接导入。其优越性在于通过无性繁殖或有性繁殖可获得大量转基因植物的后代，并且能够产生多基因复合疫苗产品。使用稳定的基因组整合技术转化植物细胞，现以获得转基因马铃薯、烟草和番茄等。

**2. 病毒载体瞬时表达系统** 目前主要有两种类型的表达系统被用在植物中生产外源蛋白：一种为抗原展示系统，其将外源基因选择性地插入病毒 CP 基因中融合表达，使小分子外源肽呈现在病毒粒子表面，通过提纯重组病毒即可获得大量的抗原；另一种类型为多肽表达系统，主要在植物中表达不融合的重组蛋白。植物病毒表达载体系统具有许多优点：首先是病毒增殖水平较高，可使伴随的外源基因高水平表达；其次，病毒增殖速度快，外源基因在很短时间（通常在接种后 1~2 周内）可达最大量的积累；第三，病毒基因组小，易进行遗传操作，大多数植物病毒可以通过机械接种感染植物，适于大规模商业操作；第四，宿主范围广，一些病毒载体能侵染农杆菌不能或很难转化的单子叶、豆科和多年生木本植物，扩大了基因工程的宿主范围；第五，病毒颗粒易纯化，可显著降低下游生产成本。

**3. 植物叶绿体表达系统** 依赖于带有编码选定抗原的基因的植物叶绿体转化。一旦在植物组织内产生了目标蛋白质，外源基因可以在叶绿体中得到稳定表达。叶绿体作为外源基因转化的受体具有诸多优越性：便于外源基因定位整合；基因为多拷贝，表达量高；导入的外源基因性状稳定性高、安全性好；能直接表达原核基因。

### 四、植物疫苗接种使用途径

第一，可将植物来源的蛋白质纯化，然后以比较好的方式（包括注射）给予接种。在不可食植物组织中表达的蛋白质，通常在使用之前需要提取和纯化。

第二，将含候选疫苗的植物原料加工成一种适于口服的可食用形式。一些植物组织特别是种子通过生物被囊化将表达的抗原保护，从而不需要使用额外的封装技术来保护疫苗在通过胃肠道时对抗胃的酸性环境和蛋白酶的作用。用这种方法加工的植物原料其表达抗原的浓度通常是均匀的，这对均匀给药有重要意义。

第三，直接以转基因植物原料使用。为保证剂量恒定同样需要含量均匀，因此，至少要将植物原料彻底粉碎和混合均匀。这种方式不仅适用于人，特别是儿童接种，而且适合能容易消耗植物组织的动物。

## 第二节 植物口服疫苗黏膜免疫机理

人体的呼吸道、消化道和泌尿生殖系统都覆盖着黏膜，许多使人致病、致死的病原体大都可经黏膜侵入人体（图 3-1）。因此，通过口服，由黏膜途径接种疫苗，具有深远的意义。与注射疫苗相比，口服疫苗不仅能诱导黏膜免疫反应，也能诱导系统免疫反应，且



避免了由注射器可能带来的疾病传染。

植物抗原细胞壁正好是抗原的临时保护伞，使它们在胃分泌物中相对安全。当细胞壁在肠中开始溶化时，抗原逐渐释放出来激活哺乳动物的免疫系统。消化疫苗时，植物抗原由黏膜免疫系统如胃肠道及呼吸道的 M 细胞（microfold cells）将抗原传递给巨噬细胞，巨噬细胞和其他抗原呈递细胞再将抗原展示给辅助性 T 细胞。当辅助性 T 细胞识别外源的蛋白质片段后，就会激活 B 细胞制造和释放能够中和抗原的抗体。当疾病因子出现时，记忆辅助性 T 细胞一方面刺激胞毒 T 细胞攻击受感染细胞，一方面迅速刺激记忆 B 细胞分泌中和抗体，消灭入侵的病原体，并对敌人发动更广泛的攻击。由于注射疫苗通常难以触发黏膜免疫应答，因此植物疫苗可同时激活黏膜和全身应答的双重效应将会帮助哺乳动物增强对许多危险微生物的防御（图 3-2 和图 3-3）。

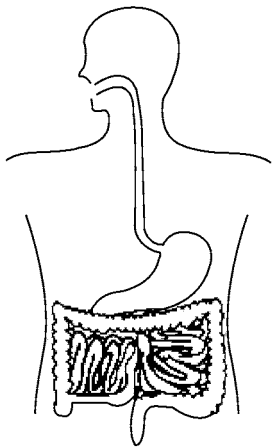


图 3-1 人体的黏膜免疫系统

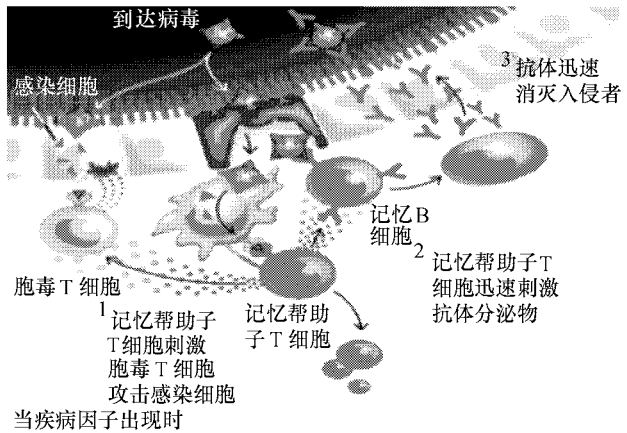


图 3-2 疫苗抗原的免疫途径

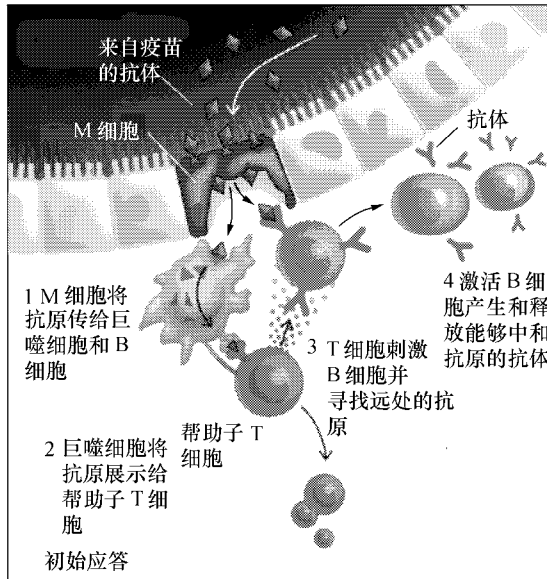


图 3-3 疫苗的防御机制

随着基因工程的飞速发展和植物转化技术的完善，利用植物生物反应器可生产方便、廉价、有效、不需纯化就可直接口服的疫苗，即通过抗原蛋白基因在植物可食部位的表达，直接食用后激发人体黏膜免疫系统产生抗体，预防疾病。这种新型口服疫苗改变了传统的疫苗生产方式和接种手段，大大降低了疫苗的生产成本，给免疫预防领域带来了一场根本性的变革。

## 一、黏膜免疫系统的组成

根据功能和分布，人体的黏膜免疫系统（mucosal immune system, MIS）可分为两个部分：一是黏膜相关淋巴组织（mucosa-associated lymphoid tissue, MALT），主要包括扁桃体、盲肠、派氏淋巴集结等胃肠道的集合淋巴小结和分布在黏膜系统各处的淋巴滤泡。抗原由此进入黏膜免疫系统，被抗原提呈细胞捕获、处理和提呈给 T、B 细胞，是黏膜免疫应答的诱导和活化部位。二是弥散淋巴组织（diffuse lymphoid tissue），广泛分布于黏膜固有层中，是黏膜免疫效应部位，浆细胞和致敏淋巴细胞通过归巢机制迁移至弥散淋巴组织，抗体和致敏淋巴细胞在此发挥生物功能。

## 二、黏膜免疫的应答机理

人体黏膜除了有天然免疫的屏障作用外，还具有获得性免疫的功能。黏膜的获得性免疫反应可分为免疫反应的起始和效应产生的两个阶段。在免疫反应的起始阶段黏膜相关淋巴组织与外界抗原接触后将抗原摄取，淋巴组织的辅助细胞提呈抗原，将组织中的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞致敏。致敏的 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞通过不同的淋巴管离开淋巴组织，并通过胸导管进入血液循环，进而到达全身各处的黏膜组织，产生第二阶段的免疫效应。此时 B 淋巴细胞定居下来，并克隆性的增殖，在再度接触抗原和辅助性 T 淋巴细胞分泌的细胞因子的作用下，发生了向 IgA 浆细胞分化的过程，进而产生大量的特异性 IgA 抗体。黏膜免疫系统的免疫反应既有体液免疫，又有细胞免疫，起主要作用的是体液免疫。其抗体主要是分泌型 IgA，占黏膜组织所产生抗体的 80% 以上。以 IgA 为主的抗体能封闭细菌和病毒对黏膜上皮细胞的黏附，从而阻止病原微生物的侵入。抗体还能中和细菌产生的毒素和灭活已经侵入上皮细胞的病毒。

(1) 黏膜免疫应答的诱导 1677 年，Peyer 在哺乳动物肠道黏膜上发现了小肠黏膜下的淋巴集结，并称之为派氏淋巴集结（Peyer's patches, PP 结）。PP 结多位于系膜小肠对向面的边缘，在回肠末端最为明显。研究表明，PP 结具有明显的淋巴上皮及上皮下的淋巴组织。淋巴组织中有大量的淋巴滤泡，覆盖滤泡的上皮细胞被称为 M 细胞。普通的淋巴结有输入和输出淋巴管，而 PP 结则没有输入淋巴管，因此是通过其上皮细胞摄取抗原的。派氏淋巴集结是黏膜免疫系统最重要的淋巴器官，也是最典型的集合黏膜淋巴组织（图 3-4）。

启动黏膜免疫发生的场所主要是一种特化扁平上皮细胞——M 细胞（即膜性细胞），位于黏膜淋巴结的滤泡上皮中（图 3-5）。M 细胞的主要功能是摄取并转运抗原，

尤其是颗粒抗原。M 细胞与普通黏膜上皮细胞不同，在它的表面没有致密的微绒毛，这有利 M 细胞摄取大分子抗原，甚至细菌和病毒，穿越黏膜的屏障，将抗原传送到下面的淋巴组织中去，诱导产生特异的黏膜免疫反应。另外，M 细胞的基底部深深凹陷成一个袋，袋中含有 B、T 淋巴细胞及巨噬细胞，这不仅缩短了含有抗原的吞饮小泡跨越 M 上皮的距离，而且有利抗原快速有效地进入上皮下淋巴组织，激活 B、T 淋巴细胞诱导免疫应答，分泌 IgA。IgA 形成双体或多体选择性与上皮细胞多聚受体结合，诱导强烈的黏膜免疫应答。

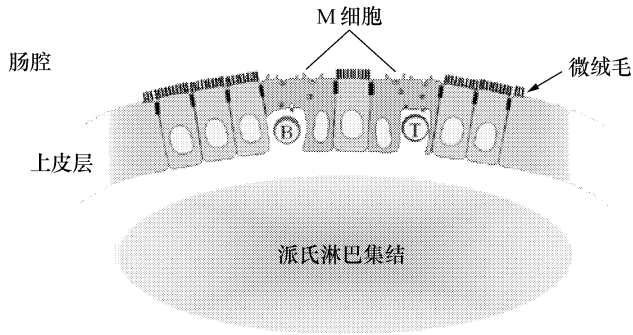


图 3-4 肠腔中的 M 细胞

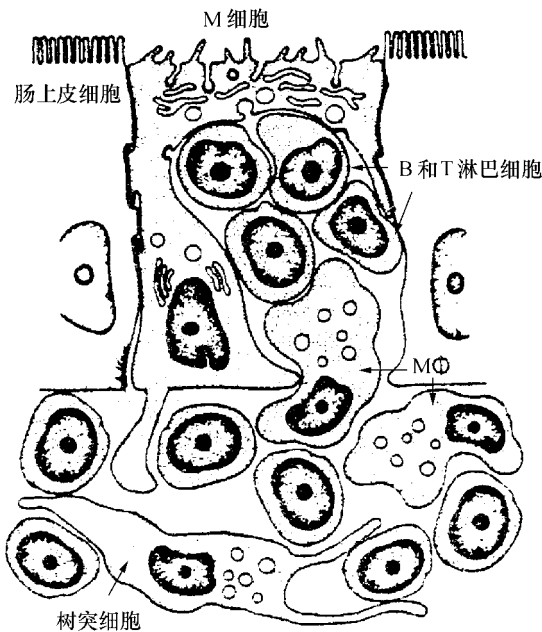


图 3-5 肠黏膜上的 M 细胞

由于 M 细胞不表达 II 类组织相容性抗原分子 (MHC II)，因此 M 细胞可能不参与对抗原的加工、处理和呈递。而 T 淋巴细胞只有在同时识别抗原呈递细胞加工处理过的抗原和组织相容性分子后，才能被激活。和 T 细胞激活有关的 APC 细胞主要

有巨噬细胞、B淋巴细胞、树突细胞。它们与黏膜上皮紧密相连，在黏膜顶区形成细胞网络，可对由M细胞传送来的抗原进行进一步的加工、处理。经加工处理后的蛋白质抗原降解成10~14个氨基酸长度的多肽，再和MHC的II分子结合以后呈递给辅助性T淋巴细胞，淋巴滤泡被激活，产生高亲和力记忆B细胞，从而引发局部和全身的免疫应答。

(2) 黏膜免疫应答的效应 黏膜免疫效应部位主要包括上皮内淋巴细胞 (inter epithelial lymphocyte, IEL) 和固有层淋巴细胞 (lamina propri lymphocyte, LPL)。IEL是体内最大的淋巴细胞群，由于它们位置上离肠腔很近，这就使得 IEL 成为黏膜免疫系统中首先与外源抗原接触的成分。IEL 中 63%~80% 为 CD<sup>8+</sup>T 细胞，少数为 CD<sup>4+</sup>T 细胞。研究表明，IEL 有与细胞毒 T 细胞及 NK 相似的胞内颗粒，并能分泌 TNF- $\alpha$ 、 $\gamma$ -IFN 等淋巴因子，所以 IEL 具有细胞杀伤和防御肠道病原体入侵的作用。LPL 位于黏膜固有层，含丰富的 T、B 淋巴细胞，是 IgA 抗体产生的主要场所。浆细胞所分泌的大量 IgA 可通过分泌片的介导进入黏膜表面，中和抗原物质，清除外来抗原 (图 3-6)。

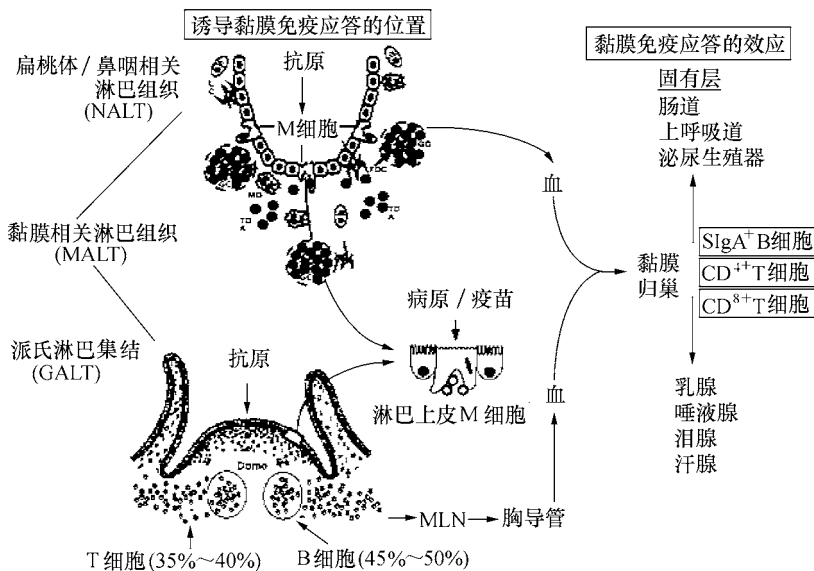


图 3-6 黏膜免疫应答过程

(3) 公共黏膜免疫系统 1964 年 James Gowans 发现在黏膜致敏活化的淋巴细胞经导管、血液后又落户于黏膜效应部位发挥作用，而外周组织中活化的淋巴细胞就不会进入黏膜。黏膜细胞的这种归巢性优点是在黏膜某一处致敏的淋巴细胞可以传播到黏膜组织的各个部位，称之为公共黏膜免疫系统 (common mucosal system)。这种细胞迁移及免疫共享机制将全身的免疫状态达成一致，介导在多个效应部位发挥针对同一抗原的免疫反应，而与起始的诱导部位无关，这是黏膜疫苗作用发挥的基础。例如鼻咽部暴露于某抗原可以同时于在直肠、呼吸道、阴道产生 SIgA 和 IgG。因此，预防消化道、呼吸道和生殖泌尿道传染病能通过口服途径接种疫苗来产生有效的黏膜免疫反应。

### 第三节 与人类相关的植物疫苗

#### 一、人类病毒植物疫苗

##### (一) 肝炎病毒植物疫苗

肝炎病毒 (hepatitis virus) 是引起病毒性肝炎的病原体, 目前公认的人类肝炎病毒至少有 5 种型别, 包括甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒及戊型肝炎病毒。其中甲型肝炎病毒与戊型肝炎病毒由消化道传播, 引起急性肝炎, 不转为慢性肝炎或慢性携带者。乙型与丙型肝炎病毒均由输血、血制品或注射器污染而传播, 除引起急性肝炎外, 可致慢性肝炎, 并与肝硬化及肝癌相关。

**1. 甲型肝炎病毒植物疫苗** 甲型病毒性肝炎是由甲型肝炎病毒 (hepatitis A virus, HAV) 引起的一种急性传染病 (图 3-7)。临床上表现为急性起病, 有畏寒、发热、食欲减退、恶心、疲乏、肝肿大及肝功能异常。甲型肝炎病毒属小 RNA 病毒科 (Picornavirus), 呈球形, 二十面体立体对称, 无包膜。HAV 的核酸为单一的正链 RNA, 长约 7 500 个核苷酸, 基因结构由 5' 末端非编码区、编码区和 3' 末端非编码区组成。编码区所编码的结构蛋白是一个大分子蛋白质, 经断裂后成为不同的多肽 (VP1、VP2、VP3 及 VP4)。这些多肽构成壳粒, 组成衣壳蛋白包围并保护核酸。编码区还编码病毒复制所需的 RNA 多聚酶、蛋白酶等。病毒的衣壳蛋白有抗原性 (HAVAg), 可诱导产生抗体。2004 年, 我国西南师范大学的科研人员首次成功的在转基因甜橙中表达了甲型肝炎病毒外壳蛋白, 为获得易储存、方便廉价的甲型肝炎病毒可食疫苗带来了希望。

**2. 乙型肝炎病毒植物疫苗** 乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) (图 3-8) 在世界范围内传播, 估计全世界有乙型肝炎患者及无症状 HBV 携带者达 2 亿人之多, 其中有 1 亿在我国。HBV 基因组较小, 仅含约 3 200 个核苷酸。负链 DNA 含有 4 个开放读框 (ORF), 分别称为 S、C、P 和 X 区。S 区中有 S 基因、前 S1 和前 S2 基因, 分别编码 HBV 的外衣壳蛋白 (HBsAg, PreS1 与 PreS2 抗原), 是 HBV 结合肝细胞膜上特异性受体的主要蛋白成分。C 区中有 C 基因及前 C 基因, 分别编码 HBcAg 及 HBeAg。表面抗原 (HBsAg) 由糖基化的 gp27 和非糖基化的 gp24 亚单位, 通过二硫键连接形成的二聚体蛋白, 代表 HBsAg 的结构单位。因 HBsAg 大量存在感染者血中, 是 HBV 感染的主要标志。HBsAg 具有抗原性, 可引起机体产生特异保护性的抗-HBs, 也是制备疫苗的最主要成分。PreS1 及 PreS2 抗原具有吸附于肝细胞受体的表位, 其抗原性比 HBsAg 更强, 抗-PreS2 及 PreS1 能通过阻断 HBV 与肝细胞结合而起抗病毒作用。核心抗原 (HBcAg) 存在 Dane 颗粒核心结构的表面, 为内衣壳成分, 其外被 HBsAg 所覆盖, 故不易在血循环中检出。HBcAg 的抗原性强, 能刺激机体产生抗-HBc。

乙型肝炎病毒植物疫苗是目前植物疫苗研究较多的、较为成功的一个实例。自 1992 年 Mason 首次在转基因烟草里表达 HBsAg 以来, 科学家们已经采取了不同生物技术方法在不同植物里表达乙型肝炎病毒的不同抗原, 并取得了良好的成果。已有动物实验证明,



乙型肝炎病毒植物疫苗表达的 HBsAg 与人和酵母来源的 HBsAg 都相似，表明在植物体系中成功地保留了蛋白质折叠的特性，其免疫反应与商品化的 HBsAg 疫苗相似。令人振奋的是，表达了 HBsAg 的转基因马铃薯、羽扇豆和莴苣通过人体免疫实验也获得了成功，为乙型肝炎病毒植物疫苗的商业化开发提供了一个强有力的临床实验证据。最近，科研人员又将乙型肝炎病毒植物疫苗的研究投入到核心抗原（HBcAg），以期获得更好的结果。其中，美国研究人员利用一种新的病毒表达系统（icon viral expression system）转染烟草，大大提高了 HBcAg 表达量，通过口服免疫小鼠产生了免疫反应，并且检测到特异抗体 IgG、IgA，为乙型肝炎病毒植物疫苗又开辟了新的途径（表3-1）。

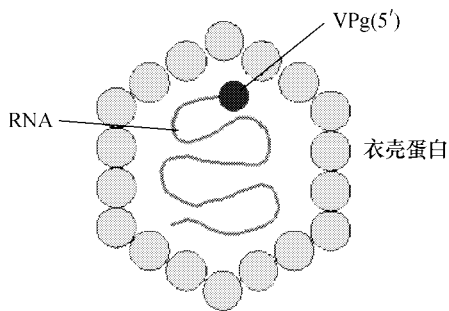


图 3-7 甲型肝炎病毒颗粒示意图

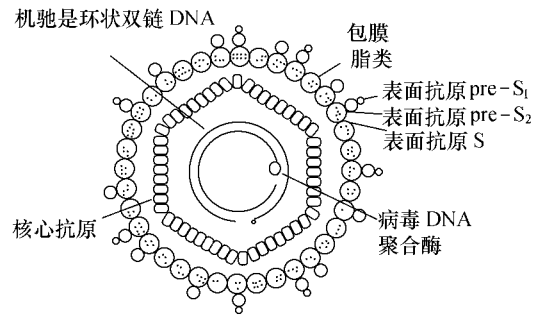


图 3-8 乙型肝炎病毒颗粒示意图

表 3-1 乙型肝炎病毒植物疫苗研究实例

| 抗原             | 表达系统   | 表达量            | 免疫效果                        | 参考文献                |
|----------------|--|----------------|-----------------------------|---------------------|
| HBsAg          | 转基因烟草  | 0.006 6% TSP   | 注射小鼠能产生免疫反应                 | Mason 等, 1992       |
|                | 烟草   | 6.5            | 未报道                         | Smith 等, 2002       |
|                | 大豆悬浮细胞   | 45 μg/g FW     |                             |                     |
|                | 转基因马铃薯   | 16 μg/g FW     | 小鼠口服产生免疫反应                  | Richter 等, 200      |
|                | 转基因马铃薯   | 0.035% TSP     | 未报道                         | Shulga 等, 2004      |
|                | 转基因马铃薯   | 8.5 μg/g FW    | 人口服产生免疫反应                   | Thanavala 等, 2005   |
|                | 转基因墨西哥酸浆                                       | 0.3 μg/g FW    | 小鼠口服产生免疫                    | Gao 等, 2003         |
|                | 转基因香蕉  | 0.038 μg/g FW  | 未报道                         | Kumar 等, 2005       |
|                | 转基因番茄  | 0.3 μg/g DW    | 小鼠口服后发生免疫反应，<br>能检测到特异的黏膜抗体 | Shchelkunov 等, 2005 |
|                | 转基因羽扇豆，  | 11~150 ng/g FW | 小鼠和人口服产生                    | Kapusta 等, 1999     |
|                | 莴苣   | 1~5.5 ng/g FW  | 免疫反应                        |                     |
|                | 转基因马铃薯   | 8.35 μg/g FW   | 小鼠口服产生免疫                    | Kong 等, 2001        |
|                | 黄瓜绿斑驳花叶病毒 (cucumber green mottle mosaic virus) | 未报道            | 体外免疫淋巴细胞产生特异抗体              | Ooi 等, 2005         |
| 抗原展示系统转染<br>香瓜 |  |                |                             |                     |
| pre-S2<br>+S   | 转基因烟草  | 0.542% TSP     | 腹膜内注射老鼠能在其体内产生免疫            | Huang 等, 2005       |

(续)

| 抗原                              | 表达系统   | 表达量                         | 免疫效果                                   | 参考文献                     |
|---------------------------------|--|-----------------------------|--|--------------------------|
| S, PreS                         | 转基因马铃薯   | 0.08%,<br>0.012% TSP        | 小鼠口服产生免疫反应                             | Joung 等, 2004            |
| 乙肝病毒表面抗原和人类免疫缺陷病毒 ENV, GAG 双价表位 | 转基因番茄  | 1~7.5 $\mu\text{g/g}$       | 小鼠口服产生免疫反应                             | Shchelkunov 等, 2006      |
| 表面抗原与大豆营养贮藏蛋白质融合                | 转基因烟草  | 0.023% TSP                  | 注射小鼠能产生免疫反应, 融合蛋白较非融合蛋白免疫产生的 IgG 有较大提高 | Sojikul 等, 2003          |
| 核心抗原                            | 马铃薯 X 病毒 (potato virus X) 或豇豆花叶病毒 (cowpea mosaic virus) 多肽表达系统 转染烟草或豇豆 | 未报道                         | 未报道                                    | Mechtcheriakova, 等, 2006 |
| 核心抗原                            | Icon 病毒表达系统 转染烟草 (icon viral expression system)                        | 7.14% TSP 或<br>2.38 mg/g FW | 小鼠口服产生免疫反应, 检测到特异抗体 IgG、IgA            | Huang 等, 2006            |
| 核心抗原与口蹄疫病毒 VP21 表位融合            | 转基因烟草  | 0.05% TSP                   | 腹腔内注射老鼠, 能在其体内产生免疫                     | Huang 等, 2005            |

注: TSP, total soluble protein, 总可溶性蛋白; FW, fresh weight, 鲜重; DW, dry weight, 干重。

**3. 丙型肝炎病毒植物疫苗** 丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 过去被称为肠道外传播的非甲非乙型肝炎病毒。HCV 是一类具有包膜结构的单正链 RNA 病毒 (图 3-9)。病毒体呈球形, 大小为 40~60 nm。HCV 基因组为一条单正链线状 RNA, 长度约 9.5 kb, 由 9 个基因区组成: 自 5' 端开始, 依次为 5' 端非编码区、核心蛋白区 (core, C 区)、包膜蛋白-1 区 (E1 区)、包膜蛋白-2 (E1 区) 和 5 个非结构蛋白 (NS 区) 和 3' 端非编码区。

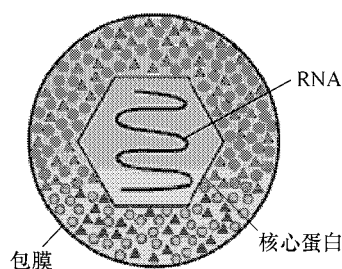


图 3-9 丙型肝炎病毒颗粒示意图

一般来说，清除病毒建立机体保护性免疫通常与针对病毒包膜蛋白上中和抗原表位的抗体产生有关。这种抗体既可阻止病毒对敏感细胞的吸附，又可增加细胞免疫对病毒的识别和清除作用。研究表明，HCV 包膜糖蛋白 E2 的 HVR1 区具有重要的中和表位，并证实 HVR1 是体液反应的主要靶位。在此基础上，研究人员开展了丙型肝炎病毒植物疫苗的研制。目前的研究主要是应用一些植物病毒表达系统成功的表达了 E2 的 HVR1 中和表位。动物实验已经显示获得的免疫原可以诱导动物产生免疫应答。

表 3-2 丙型肝炎病毒植物疫苗研究实例

| 抗原                              | 表达系统  | 表达量                    | 免疫效果  | 参考文献              |
|---------------------------------|---|------------------------|---|-------------------|
| 包膜蛋白 E2<br>HVR1 表位              | 黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus) 抗原展示系统<br>转染烟草 | 100 $\mu\text{g/g}$ FW | 能与人抗<br>HVR1 抗体发生<br>交叉反应                                       | Natilla 等, 2004   |
| 包膜蛋白 E2<br>HVR1 表位              | 黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus) 抗原展示系统<br>转染烟草 | 未报道                    | 静脉注射免疫<br>家兔能产生免疫<br>反应, 在感染丙<br>型肝炎病毒人体<br>内能产生特异的<br>CD8 T 细胞 | Piazzolla 等, 2005 |
| 包膜蛋白 E2 的<br>HVR1 表位与<br>CTB 融合 | 烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus) 多肽表达系统<br>转染烟草  | 0.04% TSP              | 鼻腔接种小鼠<br>产生免疫  | Nemchinov 等, 2000 |
| 包膜蛋白 E2<br>HVR1 表位              | 苜蓿花叶病毒 (alfalfa mosaic virus) 抗原展示系统<br>转染烟草  | 未报道                    | 未报道   | Attar 等, 2004     |

**4. 戊型肝炎病毒植物疫苗** 戊型肝炎是由戊型肝炎病毒 (hepatitis E virus, HEV) 引起的, 与甲型肝炎相似。HEV 病毒体呈球状, 无包膜, 表面有锯齿状缺刻和突起, 形似杯状, 故将其归类于杯状病毒科 (Caliciviridae)。HEV 基因组为单正链 RNA, 全长约 7.5 kb, 具有 polyA 尾, 共有 3 个 ORF, 最长的第一个 ORF 约 5 kb, 编码病毒复制所需的依赖 RNA 的 RNA 多聚酶等非结构蛋白。第二个 ORF 长约 2 kb, 含有编码病毒核衣壳的基因。第三个 ORF 只有 300 余个核苷酸, 与第一、二 ORF 有部分重叠。

戊型肝炎主要发生在亚洲、非洲和中美洲的发展中国家, 多发生于雨季或洪水后。近年来, 我国戊肝感染率每年以 30% 的速度增长。戊肝的病死率位居目前各种病毒性肝炎的首位, 为甲肝的 5~10 倍。接种疫苗是预防戊肝的最好办法, 不过迄今为止世界上仍无任何候选疫苗获批上市。因此, 植物疫苗独特的优点对研制适合发展中国家使用的戊型肝炎病毒疫苗具有重要的意义。目前这方面的研究正在积极的开展, 已经成功地在转基因烟草、马铃薯和番茄中表达了 ORF2 (表 3-3)。

表 3-3 戊型肝炎病毒植物疫苗研究实例

| 抗原   | 表达系统   | 表达量   | 免疫效果            | 参考文献            |
|------|--------|---|-----------------|-----------------|
| ORF2 | 烟草叶绿体  | 13.27 $\mu\text{g/g}$ FW                                    | 皮下注射老鼠能在其体内产生免疫 | Zhou 等, 2006    |
|      | 转基因马铃薯 | 5~30 $\mu\text{g/g}$ FW                                     | 小鼠口服未产生免疫       | Maloney 等, 2005 |
|      | 转基因番茄  | 0.48 $\mu\text{g/g}$ FW (叶)<br>0.61 $\mu\text{g/g}$ FW (果实) | 未报道             | Ma 等, 2003      |

## (二) 艾滋病毒植物疫苗

1981 年发现艾滋病 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 以来, AIDS 已成为全球最严重的感染性疾病和非洲地区人口死亡的首要原因。联合国艾滋病规划署公布的报告显示, 2005 年度全世界新增艾滋病病毒感染者 500 万, 该病毒感染者总人数已达 4 030 万, 这是自艾滋病被发现以来感染病毒人数最多的 1 年, 比 2003 年度增加了 6.5%, 新增感染者里, 有超过一半人的年龄在 15~24 岁之间。在目前所有艾滋病病毒感染者中, 近一半是女性。预防性疫苗是最有前景的控制人免疫缺陷性病毒 (human immunodeficiency virus, HIV, 又称艾滋病病毒) 感染的策略, 却面临着诸多科学难题的挑战, 如: ①缺乏对免疫与保护相关性的了解。②对灵长类保护试验与人体保护性疫苗相关性的知识有限。③HIV 基因的变异及由此导致的病毒免疫学性状的变异对疫苗效力的影响。尽管如此, 科学界一致认为研制出安全、有效的 HIV 疫苗完全可能, 艾滋病疫苗已被列为最迫切需要研制的新疫苗之首。由于撒哈拉以南的非洲地区仍然是艾滋病病毒感染者最多的地区, 感染者总数为 2 580 万, 其中 320 万为新增感染者。因此, 研究开发廉价、接种方便的艾滋病疫苗显得更为重要。

HIV 是单链 RNA 病毒 (图 3-10), 属于逆转录病毒 (Retrovirus) 科。HIV 分为 HIV-1 型和 HIV-2 型, 世界各地的艾滋病主要由 HIV-1 型引起, HIV-2 型在西非洲呈地方性流行。HIV 呈 20 面体立体对称球形颗粒, 表面有刺突状结构的糖蛋白, 直径约为 100 nm, 分为包膜与核心两部分。包膜以脂质双层结构为框架, gp41 蛋白横跨脂质双层。gp41 外端连接 gp120, 包膜下有一层基质蛋白 p17, 附着脂质双层膜的内层, 起稳定作用。病毒的核心呈锥形, 核衣壳由核心蛋白 p24 组成, 和其他逆转录病毒基因组一样为二倍体基因, 核心内有两条相同的单股 RNA 链, 由氢键将两个 RNA 分子连接成 70 sRNA, 重要的蛋白质有逆转录酶 (p66/51) 和整合酶 (p34)。HIV 基因组又称 HIV RNA, 由约 9 200 个碱基组成, 其 RNA 中含有 gag、env 和 pol 三种结构蛋白的基因以及 6 种调控基因 Tat、Vif、Vpr、Vpu (在 HIV-2 型为 Vpx)、Nef、Rev。gag 基因先编码一个 55 ku 的前体蛋白 (p55), 然后在蛋白酶作用下裂解形成衣壳蛋白 (CA) p24 和基质蛋白 p17, p24 形成病毒蛋白的锥体核。pol 基因一部分与 gag 重叠, 表达融合蛋白 p160, 然后水解成 3 个片段, 从 5~3 分别是 p11、p66/51 和 p32。Env 基因编码包膜糖蛋白, 先编码一个 88 ku 的蛋白, 经糖基化后分子量增至 160 ku, 即包膜糖蛋白的前体 gp160。该前体蛋白在蛋白酶作用下, 裂解成 gp120 和 gp41。p24、gp120、gp41 及 p55 是 HIV

免疫学诊断的主要检测抗原。调控基因编码辅助蛋白，调节病毒蛋白合成和复制。Tat 等 6 个基因被称为调控基因，分别表达 6 种蛋白质，对病毒复制起调控作用。它们分别是 Tat(transactivator, 反式激活因子)、Rev (regulator of expression of virion proteins, 毒粒蛋白表达调节因子)、Nef (negative regulatory factor, 负调控因子)、Vpr (viral protein r, 病毒 r 蛋白)、Vpu (viral protein u, 病毒 u 蛋白)、Vif(virion infectivity factor, 病毒感染因子)。

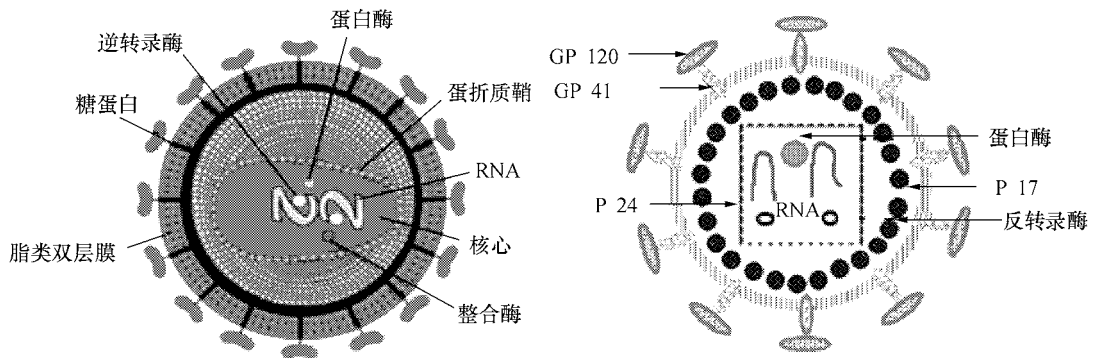


图 3-10 HIV 颗粒示意图

艾滋病作为不治之症的形象已经深入人心，它几乎成为了死神的标签。目前，所有最需要的疫苗中，首先肯定是艾滋病疫苗，国际上最早开始艾滋病候选疫苗临床试验的时间是 1987 年，从那时至今日，仍无一个疫苗被证实可以应用。未成功的主要原因是由于艾滋病病毒的致病机理和免疫机理尚不清楚。艾滋病病毒基因存在高度变异和对疫苗能够同时产生抗体和细胞免疫的要求。随着对 AIDS 研究的不断深入，科学家们对艾滋病疫苗的研制仍然很有信心，研究植物疫苗的科学家也在为解决这个最具挑战性的科学难题而不懈努力着。由于 HIV 外膜蛋白和 Tat 是激发体液免疫和细胞免疫应答的最重要的抗原蛋白，自 1997 年开始，研究人员已经采用了不同的植物表达系统进行了 HIV 抗原蛋白表达的研究（表 3-4），并进行了相关的动物免疫实验，为推动研制一种不受性别、年龄、种族以及社会经济状况限制的艾滋病疫苗开辟了新的途径。

表 3-4 艾滋病植物疫苗研究实例

| 抗原                      | 表达体系   | 表达量                    | 免疫效果            | 参考文献            |
|-------------------------|--|------------------------|-----------------|-----------------|
| Env/p120 V3 环           | 苜蓿花叶病毒 (alfalfa mosaic virus) 抗原展示系统转染烟草     | 未报道                    | 静脉注射免疫小鼠能产生中和抗体 | Yusibov 等, 1997 |
| Env/p120 V3 环部分肽段       | 番茄丛矮病毒 (tomato bushy stunt virus) 抗原展示系统转染烟草 | 900 $\mu\text{g/g}$ FW | 静脉注射免疫小鼠能产生免疫应答 | Joelson 等, 1997 |
| Env/p120 V3 环部分肽段融合 CTB | 转基因马铃薯                                       | 0.004% TSP             | 未报道             | Kim 等, 2004     |



## 转基因植物生物反应器

(续)

| 抗原                                | 表达体系   | 表达量              | 免疫效果                       | 参考文献                                   |
|-----------------------------------|--|------------------|----------------------------|--|
| Env/p120 V3 环                     | 烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus) 抗原展示系统转染烟草     | 1.6 mg/g FW      | 未报道                        | Sugiyama 等, 1995                       |
| Env/p120 V3 环表位 (10, 15, 20aa)    | 烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus) 抗原展示系统转染烟草     | 未报道              | 未报道                        | Beachy 等, 1996                         |
| gp130 (analogous to HIV gp120)    | 转基因玉米  | 0.08% TSP        | 未报道                        | Horn 等, 2003                           |
| Gag/p24                           | 番茄丛矮病毒 (tomato bushy stunt virus) 抗原展示系统转染烟草 | 0.4% TSP         | 未报道                        | Zhang 等, 2002<br>Zhang 等, 2000         |
| Gag/p24 融合 IgA $\alpha$ -chain 序列 | 转基因烟草  | 1.4% TSP         | 注射免疫小鼠能产生免疫应答              | Obregon 等, 2006                        |
| Gag/p27 (135 - 364aa)             | 转基因马铃薯                                       | 0.014% TSP       | 未报道                        | Kim 等, 2004                            |
| Gag/p27 (135 - 364aa) 融合 CTB      | 转基因马铃薯                                       | 0.022% TSP       | 未报道                        | Kim 等, 2004                            |
| Env/gp41 的 ELD K WA 表位            | 马铃薯 X 病毒 (potato virus X) 抗原展示系统转染烟草         | 未报道              | 鼻和静脉注射免疫小鼠能产生免疫应答, 能产生中和抗体 | Marusi 等, 2001                         |
| Env/gp41 的 731 - 752 肽            | 豇豆花叶病毒 (cowpea mosaic virus) 抗原展示系统转染豇豆      | 1.5 mg/g FW      | 小鼠鼻接种、口服免疫能产生免疫应答          |  |
| P1 肽 (649 - 684aa) 融合 CTB         | 瞬时表达   | 未报道              | 免疫小鼠能产生免疫应答                | Matoba 等, 2004                         |
| TBI 表位                            | 转基因番茄果实                                      | 0.3 $\mu$ g/g DW | 小鼠口服免疫能产生免疫应答和特异黏膜抗体       | Shchelkun 等, 2004<br>Shchelkun 等, 2004 |
| Tat First exon (1 - 72a. a.)      | 转基因烟草  | 0.01% TSP        | 免疫小鼠未产生免疫应答                | Webster 等, 2005                        |
| Tat                               | 转基因烟草  | 0.01% TSP        | 免疫小鼠未产生免疫应答                | Webster 等, 2005                        |
| Tat (1 - 93aa)                    | 烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus) 抗原展示系统转染菠菜     | 0.03% TSP        | 用 DNA 疫苗小鼠口服免疫, 能产生免疫应答    | Karasev 等, 2005                        |
| Tat 融合 CTB                        | 转基因马铃薯                                       | 0.007% TSP       | 未报道                        | Kim 等, 2004                            |
| Tat (12aa) 融合轮状病毒 NSP4            | 转基因马铃薯                                       | 0.0015% TSP      | 未报道                        | Kim 等, 2003                            |

据报道,我国科学技术部、国家食品药品监督管理局于2006年8月18日在北京联合宣布,我国自主研发的艾滋病疫苗已经顺利完成I期临床试验,全部49(男33人、女16人)位受试者均未出现明显不良反应,产生了针对HIV的特异性细胞免疫反应。研究结果表明,我国自主研发的艾滋病疫苗的安全性得到初步验证,且达到国际同类疫苗的免疫应答水平。这标志着我国的艾滋病疫苗距离临床应用已为期不远了。

### (三) 人源轮状病毒植物疫苗

人源轮状病毒(human rota virus, HRV)是引起婴幼儿急性腹泻和死亡的重要病原体,占有肠道感染病因的50%以上,几乎所有3岁以下儿童都发生过RV感染。据估计,每年全球约有近百万儿童死于HRV腹泻,发展中国家占87万,在我国初步的统计表明也有约10万。卫生措施似乎对HRV传播影响甚小,营养状况对发病危险的重要性也远低于细菌性腹泻。无论发达国家还是发展中国家,3岁前儿童90%都要受HRV感染。轮状病毒腹泻在全球已成为一项重要的公共卫生问题,迄今尚无治疗RV的特效药物。世界卫生组织对开发其疫苗给予高度重视。发展轮状病毒疫苗,预防病毒性腹泻是刻不容缓的任务。

轮状病毒为呼肠病毒科轮状病毒属,在电镜下其直径为65~75 nm的二十面体,有一核心,含有病毒核酸,周围包绕两层壳体,内壳为22~24个辐射状结构的亚单位,附着在直径45~50 nm的核心上,向上伸出与外壳交汇处合成车轮状的外形(图3-11),故称轮状病毒。病毒颗粒有三种衣壳(外壳、内壳及核心颗粒),包绕着含11个片段的双链RNA基因组。每一基因片段编码一种单独的具有不同抗原特异性的病毒蛋白。HRV的外壳结构蛋白VP4、VP7由基因4及9编码,具有中和抗原活性,

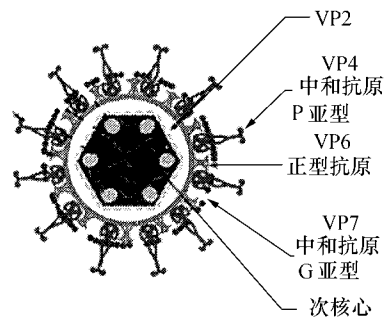


图3-11 轮状病毒颗粒示意图

能刺激机体产生中和抗体。VP7为含量丰富的糖蛋白,系主要抗原,依其抗原性不同区分的血清型称之为G型。VP4为蛋白酶敏感蛋白,含量少,系次要抗原,但具重要致病性。VP4和VP7是病毒中和反应的主要目标,能诱导产生中和抗体。内衣壳是由4种病毒蛋白组成(VP6、VP1、VP2、VP3)。VP6是主要的病毒蛋白,能诱导产生IgG抗体和IgA抗体,与保护性免疫有关。另外的非结构蛋白(NSP4)对轮状病毒性胃肠炎是重要的,并且近来被证实是一种肠毒素。已有研究证实,RV的4种蛋白VP4、VP6、VP7及NSP4与其抗原性有关。

目前,RV疫苗主要有RV口服弱毒活疫苗、多价重组疫苗、亚单位疫苗、DNA疫苗等。植物的多种优越性可被用于转基因疫苗研究,这些技术已达到了一个新的发展阶段。因此,轮状病毒植物疫苗具有可以有效地预防轮状病毒感染以及应用方便的潜力,将可能成为防治轮状病毒感染的越来越重要的方法。已有一些VP6、VP7和NSP4在转基因马铃薯、烟草和番茄上的研究报道(表3-5),研究人员将表达了转基因衣壳蛋白VP6和VP7的马铃薯分别饲喂口服免疫小鼠,检测到了抗血清IgG和肠内的IgA抗体的滴度。

黏膜免疫接种后，体液和肠道内的抗体与轮状病毒衣壳蛋白抗原反应结果为可食性植物疫苗预防和治疗肠道病毒病原体的可行性提供了良好的依据。此外，一些科研人员以食用植物可利用性来合成轮状病毒肠毒素抗原 NSP4，保留它们所有的致病的抗原决定簇，以便启动最大黏膜免疫反应。这些结果显示，在转基因植物疫苗的生产 and 传输方面，植物作为生物反应器的巨大潜力。

表 3-5 人源轮状病毒植物疫苗研究实例

| 抗原                                      | 表达体系                               | 表达量                          | 免疫效果                         | 参考文献                          |
|---|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| VP6                                     | 马铃薯 X 病毒 (potato virus X) 表达系统接种烟草 | 50 $\mu\text{g/g}$ FW        | 未报道                          | O' Brien 等, 2000              |
|   | 番茄悬浮细胞                             | 4.3 $\mu\text{g/g}$ FW       | 未报道                          | Chung 等, 2000,<br>Kim 等, 2001 |
|   | 转基因马铃薯                             | 0.01% TSP                    | 口服免疫小鼠能在其体内产生免疫中和抗体          | Yu 和 Langridge, 2003          |
| 转基因苜蓿                                   | 0.28% TSP                          | 口服免疫小鼠能在其体内产生免疫应答, 减轻小狗的腹泻症状 | Dong 等, 2005                 |                               |
| VP7                                     | 转基因马铃薯                             | 未报道                          | 口服免疫小鼠能在其体内产生免疫中和抗体          | Wu 等, 2003                    |
| NSP4 融合霍乱毒素 CTB 基因                      | 转基因马铃薯                             | 0.1% TSP                     | 体外与神经节苷脂 GM1 结合              | Arakawa 等, 2001               |
| CFAI 融合霍乱毒素 CT-A2 与轮状病毒 NSP4 融合霍乱毒素 CTB | 转基因马铃薯                             | 3.3 $\mu\text{g/g}$ FW       | 口服免疫小鼠能在其体内产生免疫应答, 减轻小狗的腹泻症状 | Yu 和 Langridge, 2001          |

#### (四) 诺沃克病毒植物疫苗

诺沃克病毒 (Norwalk virus 或 *Noroviruses*) 的感染被认为是继轮状病毒之后的人类腹泻的第二大病因, 广泛分布于全世界。主要发生在人群密集区, 如医院病房、饭店、军舰、集体宿舍等。据报道, 感染诺沃克病毒主要是因为患者食用了海鲜以及凉拌菜、贝类、寿司等未经过卫生加工的生冷食物。按照世界各国历次暴发诺沃克病毒的情况来看, 生吃贝类是导致病毒流行的最主要原因。发病后的主要临床表现为疲劳、腹部痉挛、恶心、呕吐、腹痛、腹泻等。该病毒于 1968 年在美国俄亥俄州诺沃克暴发而被发现。诺沃克病毒

的毒粒无包膜，为二十面体对称的圆状颗粒（图 3-12）。毒粒上有 32 个杯状的表面凹陷。基因组为股正链 RNA，基因长 7 642 bp，有 3 个开放读码框架（ORFs）：ORF1 编码具有多聚酶活性的非结构蛋白前体，为非结构蛋白；ORF2 编码衣壳蛋白，可以体外自行组装成空壳状类病毒颗粒，其外形和大小与天然病毒相似，已证实此蛋白有抗原性；ORF3 位于基因组的 3' 端编码一个 212 氨基酸的小蛋白，属于强碱性蛋，其作用尚不清楚。目前还没有预防诺沃克类病毒感染的疫苗。因此，维持良好的个人、食物及环境卫生是目前预防的重点。

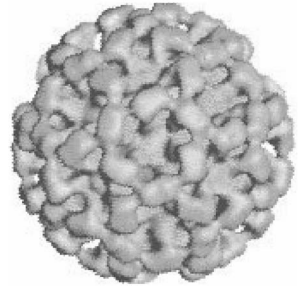


图 3-12 诺沃克病毒颗粒示意图

Mason 等以烟草和马铃薯为受体研究了诺沃克病毒衣壳蛋白基因在植物中的表达及产物的免疫活性。结果表明，在获得的转基因烟草叶片中，诺沃克病毒衣壳蛋白的最高含量为可溶性蛋白总量的 0.23%；在转基因马铃薯薯块中，NVCP 的最高含量为可溶性蛋白总量的 0.37%。用从烟草叶片中浸提的重组 NVCP 或用马铃薯块茎直接饲喂小鼠进行免疫试验，均可产生特异性血清 IgG 和黏膜分泌型 IgA 抗体。

Tacket 等报道了转基因马铃薯生产的诺沃克病毒抗原的临床试验。24 名健康志愿者群中有 20 人服用了 2~3 剂转基因马铃薯（未经烹饪的块茎），有 4 人服用了 3 剂非转基因马铃薯（未经烹饪的块茎）。每剂转基因马铃薯中含 215~751 μg 诺沃克病毒外壳蛋白。服用转基因马铃薯的 20 名志愿者中有 19 人（占 95%）产生免疫应答，显著增加分泌特异性 IgA 抗体的细胞数目，有 4 人（20%）生特异性血清 IgG，有 6 人（30%）产生特异性的 IgA 抗体。同时，对志愿者服用马铃薯后进行安全性检测，出现恶心、呕吐、发烧、痉挛、腹泻等症状的概率在实验组和对照之间没有差别。最普遍的症状是恶心，20 名服用转基因马铃薯的志愿者中有 4 人（20%）感到恶心，5 人（25%）出现轻微痉挛；4 名服用非转基因马铃薯的志愿者中有 1 人（25%）感到恶心，2 人（50%）出现轻微痉挛。说明这些轻微的不良反应用于食用的马铃薯未经烹饪引起，而不是食用转基因疫苗引起，可以通过改变转基因受体植物为可生食受体如番茄、香蕉等来解决。

### （五）狂犬病毒植物疫苗

狂犬病毒属于弹状病毒科（Rhabdoviridae）狂犬病毒属（*Lyssa virus*），是可以引起人和多种动物致死性中枢神经系统感染，以恐水、畏光、吞咽困难、狂躁等临床表现为特征的病原体。许多动物既是储存宿主又作为传播媒介在世界范围内维系并传播着本病。家犬是狂犬病毒进入人群的主要传播媒介。基因组长约 12 kb（图 3-13），从 3 端至 5 端依次为分别编码病毒核蛋白（NP）、衣壳基质蛋白（M1P）、膜基质蛋白（M2P）、糖蛋白（GP）和转录酶大蛋白（LP）的 5 个基因，各个基因间还含非编码的间隔序列。5 种蛋白都具有抗原性。M1、M2 蛋白分别构成衣壳和囊膜的基质。L 蛋白为聚合酶。G 蛋白在囊膜上构成病毒刺突，与病毒致病性有关。N 蛋白为核蛋白，有保护 RNA 功能。G 蛋白和 N 蛋白是狂犬病病毒的主要抗原，刺激机体可诱生相应抗体和细胞免疫。过去一直认为 G 蛋白是唯一诱生中和抗体，并能提供狂犬病保护性免疫的抗原。

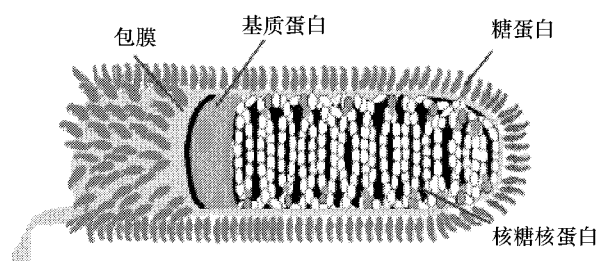


图 3-13 狂犬病毒颗粒示意图

目前研制成功狂犬病病毒糖蛋白重组痘苗病毒疫苗，而狂犬病病毒 G、N 亚单位疫苗等正在试用中。目前，狂犬病毒植物疫苗的研究主要集中在利用转基因的方法和苜蓿花叶病毒抗原展示系统表达 GP 糖蛋白和 NP 核蛋白表位（表 3-6），静脉注射免疫小鼠都能产生免疫应答。2002 年 Yusibov 等报道了植物疫苗的一项人体临床试验：将狂犬病病毒糖蛋白（G 蛋白）和核蛋白（N 蛋白）与三叶草花叶病毒（AIMV）的外壳蛋白（CP）融合，14 名志愿者口服表达此融合蛋白表位的转基因菠菜后，5 名以前曾免疫过传统狂犬病疫苗者中 3 人，9 名以前未免疫过疫苗者中 5 人有明显的狂犬病病毒特异性抗体应答，而对照者则无此抗体的显著增加。完成服用程序后 7 d，再给 9 名先前未免疫者一剂传统狂犬病疫苗，结果其中 3 人产生了抗狂犬病病毒中和抗体而 5 名对照者无此抗体产生。虽然在用疫苗前未检得中和抗体，但明显表明植物狂犬病疫苗能作为抗狂犬病免疫的补充口服加强剂，这为狂犬病毒植物疫苗的可行性提供了良好的实践依据。

表 3-6 狂犬病毒植物疫苗研究实例

| 抗原               | 表达体系  | 表达量                   | 免疫效果                            | 参考文献             |
|------------------|---|-----------------------|---------------------------------|------------------|
| GP 糖蛋白           | 转基因番茄                                       | 0.001% TSP            | 未报道                             | McGarvey 等, 1995 |
|                  | 转基因烟草                                       | 0.38% TSP             | 静脉注射免疫小鼠能在其体内产生免疫应答和保护抗体        | Ashraf 等, 2005   |
| GP 糖蛋白和 NP 核蛋白表位 | 苜蓿花叶病毒 (alfalfa mosaic virus) 抗原展示系统转染烟草    | 未报道                   | 静脉注射免疫小鼠能在其体内产生免疫应答和中和抗体        | Yusibov 等, 1997  |
|                  | 苜蓿花叶病毒 (alfalfa mosaic virus) 抗原展示系统转染菠菜    | 未报道                   | 静脉注射和口服免疫小鼠能在其体内产生免疫保护作用        | Modelska 等, 1998 |
|                  | 苜蓿花叶病毒 (alfalfa mosaic virus) 抗原展示系统转染烟草和菠菜 | 30 $\mu\text{g/g}$ FW | 静脉注射免疫小鼠能在其体内产生保护抗体，人口服免疫产生免疫应答 | Yusibov 等, 2002  |

## (六) 呼吸道融合瘤病毒植物疫苗

呼吸道融合瘤病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 是造成患者严重的病毒性支



气管炎及病毒性肺炎等急性病毒性呼吸道疾病的主要原因。呼吸道融合瘤病毒是一种 RNA 病毒 (图 3-14), 属副黏液病毒科 (Paramyxoviridae), 肺病毒属 (*Pneumovirus*), 具有外套膜 (envelope), 其基因组为负性, 单股, 由 15 222 个核苷酸组成, 包含 10 段副基因组的 mRNA。这些 mRNA 可以转译出 11 种已经被确认存在的蛋白质, 包括 4 种核蛋白壳蛋白质 (nucleocapsid protein), 分别命名为核壳体 N 蛋白、磷酸化蛋白 P、大聚合酶酰转录延伸因子 M2-1 和 M2-2。3 种穿透膜的外套糖蛋白质分别是融合 F 蛋白、黏附 G 蛋白及小疏水 SH 蛋白; 两种非结构蛋白质, NS1、NS2; 一种基质蛋白质 M 蛋白以及目前推测为负调控因子的 M2-2 等蛋白质。目前功能不明确的有 NS1、NS2 及 SH 蛋白质等。

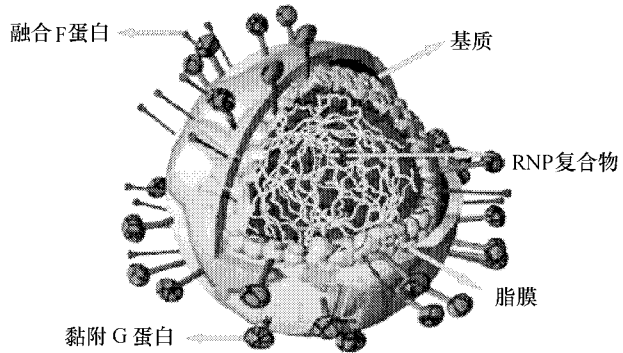


图 3-14 呼吸道融合瘤病毒颗粒示意图

目前有一些发展中的疫苗及抗呼吸融合病毒的免疫球蛋白, 尚在评估其效果中。截至目前为止, 尚无有效的疫苗上市。但有一种免疫球蛋白已在美国上市, 用于早产儿等高危险群效果还不错。2000 年 Sandhu 等利用番茄果实特异表达启动子在番茄果实中表达了融合 F 蛋白, 表达量为 35.5  $\mu\text{g/g}$ , 口服免疫小鼠产生了免疫应答。Belanger 等采用苜蓿花叶病毒抗原展示系统表达了 F、G 蛋白抗原表位, 表达量达 500  $\mu\text{g/g}$  FW, 静脉注射免疫小鼠产生了免疫保护抗体。最近, protein Yusibov 等利用苜蓿花叶病毒抗原展示系统表达了 G 蛋白抗原表位, 免疫人树突状细胞后产生了较强的  $\text{CD}^{4+}$  和  $\text{CD}^{8+}$  T 细胞免疫反应。

### (七) 麻疹植物疫苗

麻疹是全球性疾病, 严重危害人类健康。据世界卫生组织估计, 2001 年有 3 000 万~4 000 万麻疹病例, 死亡 74 万人。每年麻疹死亡病例占疫苗可预防疾病死亡病例的 50%~60%。因此, 麻疹仍然是全球范围内危害儿童生命的主要疾病之一。麻疹是由麻疹病毒引起的一种以发热呼吸道卡他和遍及全身斑丘疹为特征的急性病毒性传染病。人类是麻疹病毒的自然宿主。麻疹通过呼吸道和直接接触传播。麻疹疫苗应用之前, 呈世界性分布, 是危害儿童生命健康极其严重的传染病之一。自麻疹疫苗进行广泛预防接种以来, 麻疹的致病率和病死率分别下降了 74% 和 85%。但世界卫生组织估计全球每年仍大约有 4 500 万例麻疹, 其中 100 万婴儿和儿童死于麻疹, 主要集中在发展中国家, 特别是非洲国家。在疫苗可预防的疾病当中, 麻疹仍是死亡数最多的。WHO 已将麻疹列为无脊灰地区下一个要消除的疾病。

麻疹病毒属于副黏病毒科麻疹病毒属, 为单股负链 RNA, 大致呈球形结构 (图 3-15), 直径 120~270 nm, 外有包膜, 基因组约 16 kb。麻疹病毒有 6 个结构蛋白, 从 3 端到 5 端依次为核蛋白 (N)、磷酸蛋白 (P)、膜蛋白 (M)、融合蛋白 (F)、血凝素

蛋白 (H) 和 RNA 多聚酶 (L)。病毒包膜上的 2 个糖蛋白 (H 和 F)，在病毒感染时起吸附和融合细胞膜的作用，使病毒进入细胞内进行复制。H 和 F 为病毒的主要抗原，刺激机体产生保护性中和抗体，诱导的中和抗体在保护病毒感染时具有重要意义。

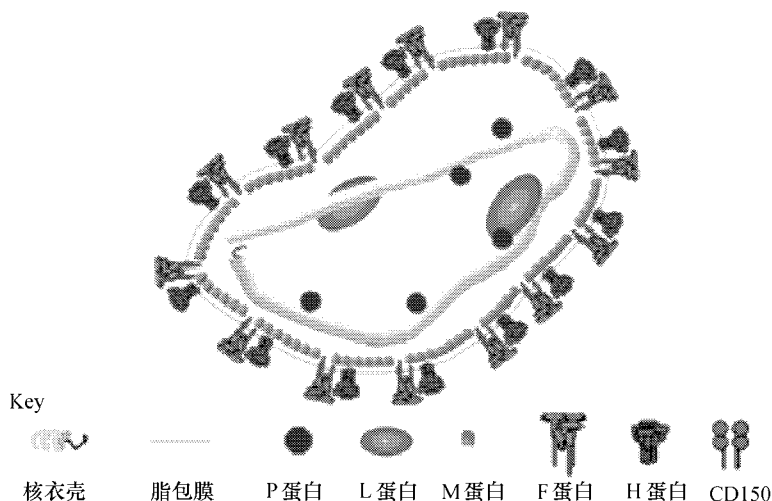


图 3-15 麻疹病毒颗粒示意图

最早使用的麻疹疫苗为灭活疫苗，但灭活疫苗接种后再次接触麻疹病毒时容易出现严重的异型麻疹。随着麻疹病毒体外成功分离和减毒后，减毒活疫苗的应用极大降低了麻疹的发病率。且减毒活疫苗需要冷链运输，在偏远地区不易达到该条件，影响疫苗的活性。近年来在一些工业化国家由于对接种后可能发生肠胃炎症和孤独症的担心，麻疹疫苗的接种率有所下降。目前还未确切的证据支持这一担心。不过疫苗接种后普遍存在一定的副反应，对接种活疫苗引起的副作用的担心，使开发新型疫苗成为必要。要求研制开发新一代麻疹疫苗在体内残留抗体的条件下，能激发有效的细胞免疫和体液免疫应答，且疫苗应安全、有效、廉价、无需冷藏、接种方便。以表达血凝素蛋白为主的麻疹疫苗正因为有这些特有的优点而成为目前研究的热点之一，目前已报道的有转基因烟草、胡萝卜、生菜（表 3-7）。

表 3-7 麻疹植物疫苗研究实例

| 抗原           | 表达体系   | 表达量 | 免疫效果                     | 参考文献  |
|--------------|--------|-----|--------------------------|---|
| 血凝素蛋白        | 转基因烟草  | 未报道 | 静脉注射和口服免疫小鼠能在其体内产生免疫中和抗体 | Huang 等, 2001<br>Webster 等, 2002<br>Webster 等, 2005 |
|              | 转基因胡萝卜 | 未报道 | 静脉注射免疫小鼠能在其体内产生免疫中和抗体    | Bouche 等, 2003<br>Marquet - Blouin 等, 2003          |
|              | 转基因生菜  | 未报道 | 腹腔注射免疫小鼠能在其体内产生免疫中和抗体    | Webster 等, 2006                                     |
| 血凝素蛋白与破伤风类毒素 | 转基因胡萝卜 | 未报道 | 静脉注射免疫小鼠能在其体内产生免疫应答      | Bouche 等, 2005                                      |

### (八) SARS 冠状病毒植物疫苗

SARS(severe acute respiratory syndrome), 即严重急性呼吸道综合征(传染性非典型肺炎), 是一种急性呼吸道传染病, 截止 2003 年 7 月, 已蔓延至全球 30 多个国家和地区, 共有 8 400 多人感染, 造成 800 多人死亡, 其中中国及新加坡发病情况尤为严重。SARS 的流行给人们的身心健康、社会和经济的发展带来了巨大的威胁。经过全球科研人员的通力合作, SARS 病毒最终被证实为一种新的冠状病毒(Coronaviridae), 这为研究病毒的生物学特性, 开发快速、敏感、准确的诊断手段奠定了基础, 从而减少了交叉感染和社会负担。为防止非典疫情卷土重来, 最直接、有效的办法就是研制出能预防非典的疫苗。目前抗击 SARS 的疫苗研制主要包括灭活疫苗、减毒疫苗、DNA 疫苗、重组亚单位疫苗、载体疫苗、感染性 cDNA、拟病毒等。由于疫苗研究是一种新药研究的过程, 要想在短期内就研制出可以直接用于人体的 SARS 防治疫苗, 是不符合新药研发的过程和规律的, 我国研制的 SARS 病毒灭活疫苗已经被批准开展临床研究。

SARS 病毒基因图谱的迅速问世, 为相关的疫苗研究奠定了基础。SARS 病毒表面 S 蛋白(spike glycoprotein)(图 3-16)是病毒的主要中和性抗原, N 蛋白(nucleocapsid phosphoprotein)和 M 蛋白(membrane protein)也可以诱导免疫效应。因此, S 蛋白及 N、M 蛋白均可应用于抗 SARS 疫苗研究。由于 S 蛋白是高度糖基化的蛋白, 且其主要的中和性抗原表位均位于 N 端 560 个氨基酸残基, 表位的抗原性依赖于蛋白构象和糖基化。由于植物细胞的全能性及其完整的真核细胞表达系统, 使植物表达与动物一致的免疫原性及生物活性的抗原蛋白成为可能。所以 S 蛋白在植物细胞中表达可保持其蛋白构象, 具有较好的抗原性和免疫原性。2005 年, 美国费城托马斯·杰斐逊大学科研人员在先前研究提示病毒 S 蛋白可能是产生重组疫苗的最佳抗原的基础上, 在转基因低尼古丁烟草和番茄果实中分别表达了 S 蛋白 N 端 79 000 片段, 口服转基因番茄材料免疫小鼠产生了黏膜免疫和系统免疫, 并且检测到 SARS-CoV 特异的 IgA; 静脉注射转基因低尼古丁烟草免疫小鼠产生 SARS-CoV 特异的 IgG。目前他们正在其他动物体内进行实验, 优化饲喂方法, 以证实这种方法可以安全、价廉地制成疫苗。具有免疫原性的 SARS 植物疫苗的获得, 为人类最终战胜 SARS, 研制新型 SARS 疫苗开辟一条新的道路。

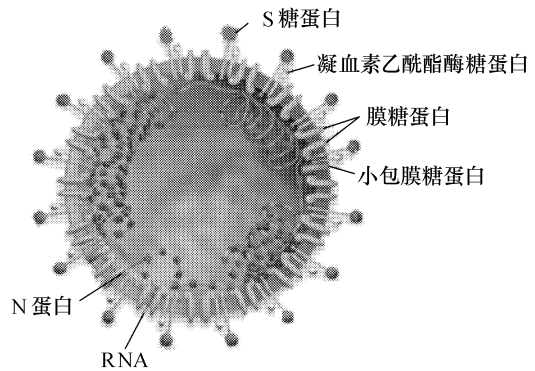


图 3-16 冠状病毒颗粒示意图

所以 S 蛋白在植物细胞中表达可保持其蛋白构象, 具有较好的抗原性和免疫原性。2005 年, 美国费城托马斯·杰斐逊大学科研人员在先前研究提示病毒 S 蛋白可能是产生重组疫苗的最佳抗原的基础上, 在转基因低尼古丁烟草和番茄果实中分别表达了 S 蛋白 N 端 79 000 片段, 口服转基因番茄材料免疫小鼠产生了黏膜免疫和系统免疫, 并且检测到 SARS-CoV 特异的 IgA; 静脉注射转基因低尼古丁烟草免疫小鼠产生 SARS-CoV 特异的 IgG。目前他们正在其他动物体内进行实验, 优化饲喂方法, 以证实这种方法可以安全、价廉地制成疫苗。具有免疫原性的 SARS 植物疫苗的获得, 为人类最终战胜 SARS, 研制新型 SARS 疫苗开辟一条新的道路。

### (九) 人巨细胞病毒植物疫苗

人巨细胞病毒(human cytomegalo virus, HCMV)属于疱疹病毒 $\beta$ 亚科, 是一种潜伏性病毒。器官移植病人、免疫抑制病人和免疫力低下者(肝、肾、骨髓移植者, HIV 患者, 新生儿和婴幼儿等人群), 原发或再激活的 HCMV 感染可引起相应的临床症状。

目前, HCMV 感染的致病机制尚不清楚, HCMV 疫苗还未批准上市。

HCMV 基因组由 230~235 kbp 的双链 DNA 组成 (图 3-17), 包含 200 多个开放阅读框 (ORFs)。研究证明宿主某些抗糖蛋白抗体对抑制病毒有重要作用。gB 蛋白是 HCMV 重要表面糖蛋白之一, 在病毒与宿主细胞膜的黏附、融合以及病毒进入细胞和在细胞间的转移中起重要作用。gB 是由 907 个氨基酸组成的跨膜蛋白, 成熟 gB 由 116 ku 和 58 ku 两部分通过二硫键结合组成。动物试验结果表明, gB 可诱导机体产生针对 HCMV

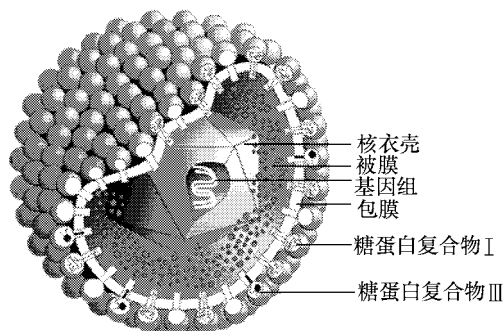


图 3-17 人巨细胞病毒颗粒示意图

的特异性体液和细胞免疫应答。因此, 加拿大研究人员将 gB 在转基因烟草种子中进行了克隆、表达, 并对其免疫活性进行研究, 结果植物种子成功表达了具有免疫活性的长片段异源蛋白。虽然 HCMV 转基因植物口服疫苗的研制目前尚处起步阶段, 各种各样的问题有待逐步解决, 相信不久的将来, 植物口服疫苗会成为 HCMV 疫苗的主体。

## 二、人细菌植物疫苗

### (一) 炭疽杆菌植物疫苗

炭疽病是由炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) 引起的一种死亡率非常高的疾病。炭疽芽孢杆菌为革兰氏阳性菌, 主要通过皮肤、呼吸道和消化道感染动物和人。最初感染的部位常有巨噬细胞吞噬的炭疽芽孢, 吞噬芽孢的巨噬细胞迁移到局部的淋巴结, 芽孢在巨噬细胞内萌发, 进而裂解巨噬细胞, 然后繁殖体炭疽杆菌进入血液中, 引起败血症和毒血症, 从而导致机体死亡。炭疽杆菌在有氧条件下可形成大量的芽孢, 存在数十年后仍能够保持感染能力, 若再次感染动物或人, 则会重新在生物体内繁殖, 并导致机体死亡。继 2001 年 9 月 11 日受到恐怖分子袭击后, 美国又遭遇炭疽攻击, 先后有几例人接触夹有炭疽芽孢粉末的邮件而感染炭疽的病例, 其中已有人死亡, 引起全社会的极度恐慌受美国炭疽袭击事件的影响, 生物恐怖主义者和一些国家的军方把炭疽杆菌研制成为一种生物武器。因此, 炭疽芽孢杆菌作为战略性生物武器的防治研究工作更迫切。

感染炭疽的患者死亡的主要原因是炭疽杆菌在血液中大量繁殖, 并产生毒素, 只需微量的毒素就可致人于死亡。炭疽毒素主要由 3 个功能相关的蛋白组成外毒素, 3 种蛋白分别称为保护性抗原 (protective antigen, PA)、致死因子 (lethal factor, LF) 和水肿因子 (edema factor, EF)。PA 是一单链蛋白质, 主要功能是介导 LF 和 EF 进入宿主细胞。LF 是一种高特异性的具有 4 个锌离子结构域的金属蛋白酶, 能够分解 MAPKK, 并使巨噬细胞溶解, 从而导致宿主死亡。EF 是钙和钙调蛋白依赖性的腺苷酸环化酶, 它使 ATP 去掉两个分子磷酸, 形成 cAMP, 使得细胞内 cAMP 大量积聚, 破坏细胞内复制的信号传导通路。



随着基因工程技术的发展,人们已经成功的将一些病原体抗原基因转到食用植物中,并在果实中成功的表达,为研制新型疫苗提供了新的思路。由于植物远离人和动物的疾病,并且可以把抗原通过食物输入到人和动物的体内,用这种方法不仅不用担心患上疾病,还可以获得有效的免疫力。Haq 等最初用转基因植物中表达的重组细菌抗原进行口服免疫获得了成功。利用这个思路 Aziz 等把 PA 基因转到烟草中,并在烟叶中检测到具有活性的 PA 的表达,这为炭疽杆菌疫苗研究提供了新的途径。另有报道,Thomas Jefferson 大学的 Alexander Karasev 已将 PA 基因成功转入菠菜中,并在菠菜中有表达,目前该研究正在进行中(图 3-8)。

表 3-8 炭疽杆菌植物疫苗研究实例

| 抗原                            | 表达体系                                   | 表达量             | 免疫效果                       | 参考文献                           |
|-------------------------------|--|-----------------|----------------------------|--------------------------------|
| 保护性抗原                         | 烟草叶绿体                                  | 2 mg/g FW       | 和佐剂一起皮下注射小鼠,能对其体内毒素产生免疫    | Koya 等, 2005<br>Watson 等, 2004 |
|                               | 转基因烟草                                  | 低量(未报道)         | 未报道                        | Azi 等, 2002                    |
|                               | 转基因烟草                                  | 低量(未报道)         | 和佐剂一起腹膜内注射免疫小鼠,能在其体内产生免疫应答 | Aziz 等, 2005                   |
|                               | 烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus)抗原展示系统转染菠菜 | 未报道             | 未报道                        | Sussman 等, 2003                |
| 保护性抗原 domain-4 的抗原表位(15 个氨基酸) | 苜蓿花叶病毒(alfalfa mosaic virus)抗原展示系统转染烟草 | 20 $\mu$ g/g FW | 和佐剂一起腹膜内注射免疫小鼠,能在其体内产生免疫应答 | Brodzik 等, 2005                |
| 炭疽致死因子与 CTB 融合                | 转基因马铃薯                                 | 100 ng/g FW     | 未报道                        | Kim 等, 2004                    |

## (二) 破伤风植物疫苗

据 WHO 的估计,每年全球有 40 万个破伤风感染病例,其中大部分都是属于新生儿破伤风(*Neonatal tetanus*)。破伤风是由破伤风杆菌(*Clostridium tetani*)所引起的一种急性疾病。这种细菌广泛存在泥土和人、畜粪便中。它可通过破损的皮肤和黏膜(如伤口、骨折、烧伤,甚至木刺或锈针刺伤)而侵入人体,并在伤口深部缺氧环境中生长繁殖,产生大量破伤风杆菌毒素,作用于神经系统,引起全身特异性感染。临床上,破伤风的治疗非常困难,死亡率高,而预防的效果极佳,普遍使用破伤风抗毒血清被动免疫法预防的外伤者,发生破伤风的概率只有万分之一左右。破伤风类毒素



(tetanus toxin, Tet) 是用来预防破伤风的一种免疫疫苗。为了防止破伤风病的发生, 医生给病人注射一定量的破伤风类毒素, 从而达到预防破伤风病的目的。而破伤风抗毒素是用对破伤风病具有免疫力的人或动物血清经加工精制而成的免疫抗体, 注射到人体后, 可直接对破伤风起到抵抗的作用。但这种抗毒素是被动的, 而且在体内只能维持很短时间。因此, 最根本的还是应该注射破伤风类毒素, 以使体内产生自动免疫抗体, 从而达到长久的预防破伤风的目的。破伤风类毒素是用破伤风菌经减毒加工处理后制成的疫苗, 注射到人体后需要经过一定时间后人体才会产生自动免疫力。因此, 如果人体未接种过破伤风类毒素而发生外伤, 或是刚刚注射破伤风类毒素而自身尚产生免疫抗体时发生外伤, 为防止感染破伤风, 应首先注射破伤风抗毒素, 以使被动免疫和自动免疫衔接起来, 从而达到预防破伤风的目的。美国研究人员 Tregoning 等利用烟草叶绿体表达系统表达了破伤风类毒素 C 片段 (TetC), 表达量达 25% TSP, 口服和鼻黏膜免疫小鼠都能产生保护性免疫应答。英国科学家 Chargelegue 等利用转基因的方法在烟草中表达了 TetC 和抗 TetC 的融合蛋白, 表达量为 0.8% TSP, 静脉注射免疫小鼠后产生了免疫应答和保护作用。

### (三) 肠毒素大肠杆菌腹泻植物疫苗

肠毒素大肠杆菌 (*Enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC) (图 3-18) 是引起世界上发展中国家婴幼儿及到这些国家旅游者腹泻的主要致病菌。据统计, 每年可导致数亿人次腹泻, 数十万 5 岁以下儿童死亡, 并与儿童后天生长期生长迟缓相关。现已知 ETEC 定居因子 (colonization factor antigens, CFAs) 和肠毒素 (enterotoxins) 与疾病密切相关。CFAs 是 ETEC 细胞表面菌毛, 目前已发现有 20 多种, 具有较强的免疫原性, 能刺激机体产生特异性抗体。肠毒素是 ETEC 产生的毒性分泌蛋白, 有不耐热肠毒素 (heat-labile enterotoxin, LT) 和耐热肠毒素 (heat-stable enterotoxin, ST) 两种。LT 毒素分子由 A, B 两种亚基组成, 是毒素的毒力活性部分, B 亚基与靶细胞结合, 介导 A 亚基进入, 它还是毒素主要的免疫原性部分, LT 的免疫原性与霍乱弧菌肠毒素相似, 两者的抗血清交叉中和作用, 而 ST 与霍乱毒素无共同的抗原关系。这两种功能不同的亚基分别由毒素 A 亚基基因和毒素 B 亚基基因所编码。当病原菌感染宿主后, ETEC 首先通过 CFAs 黏附到小肠黏膜上皮细胞刷状缘受体上, 抵抗住肠道蠕动与肠内分泌物清洗, 维持 ETEC 在肠道内生长繁殖。然后释放出一种或两种肠毒素, 与小肠细胞膜上的特异受体结合, 引发细胞内水、电解质失衡, 造成细胞吸收障碍, 产生脱水性腹泻。

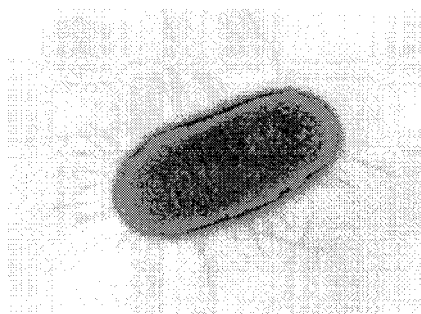


图 3-18 大肠杆菌电镜图

CFAs 与小肠黏膜黏附和肠毒素致毒是 ETEC 腹泻不可或缺的两个必要条件。ETEC 疫苗发展已有 20 多年, 尽管研制有多种疫苗, 但遗憾的是至今还没有一种可应用于人体。主要是由于自然界 ETEC 和 CFAs 种类多和区域分布差异, 导致多价疫苗研

制困难。由于 ETEC 腹泻是由定居因子和肠毒素共同作用产生的，所以，无论是纯化的菌毛疫苗或类毒素疫苗，其免疫性必定是不完善的。死疫苗尽管可不受活菌无法同时表达多种抗原的限制，却无法实现持续性免疫的目的。随着现代分子生物学和免疫学的进一步发展，为研制安全有效的 ETEC 多价疫苗提供了先进的理论和技术支持，加速了现存 ETEC 疫苗的完善和新兴 ETEC 载体、DNA、植物疫苗的发展。而新 CFAs 的发现提供了更多的抗原种类；ETEC 基因组、蛋白质组的深入了解，提供了更多的减毒基因和抗原表位的选择；黏膜免疫调节机制的揭秘也定能为 ETEC 疫苗发展开辟新的道路（表 3-9）。

表 3-9 肠毒素大肠杆菌腹泻植物疫苗研究实例

| 抗原                                      | 表达体系   | 表达量                | 免疫效果                    | 参考文献   |
|---|--------|--------------------|-------------------------|--|
| CFAI 融合霍乱毒素 CT-A2 与轮状病毒 NSP4 融合霍乱毒素 CTB | 转基因马铃薯 | 3.3 μg/g FW        | 口服免疫小鼠能产生免疫应答，减轻小狗的腹泻症状 | Yu 和 Langridge, 2001   |
| CFAI 融合霍乱毒素 CTA 与轮状病毒 NSP4 融合霍乱毒素 CTB   | 转基因马铃薯 | 0.002% TSP         | 口服免疫小鼠能产生免疫应答           | Lee 等, 2004  |
| LT-B                                    | 转基因马铃薯 | 0.01% TSP          | 口服免疫小鼠能在其体内产生免疫黏膜抗体     | Haq 等, 1995  |
|   |        | 17.2 μg/g FW       | 口服免疫小鼠能产生免疫应答           | Mason 等, 1998  |
|   |        | 15.7 μg/g FW       | 口服免疫人能在其体内产生免疫黏膜抗体      | Tacket 等, 1998   |
|   |        | 13 μg/g FW         | 口服免疫小鼠能产生免疫应答           | Lauterslager 等, 2001   |
|   | 转基因玉米  | 未报道                | 口服免疫小鼠能产生免疫保护抗体         | Streatfield 等, 2001  |
|   |        | 10% TSP            | 口服免疫小鼠能在其体内产生免疫黏膜抗体     | Lamphear 等, 2002; Streatfield 和 Howard, 2003b; Streatfield 等, 2003 |
|   |        | 3.7% TSP           | 口服免疫小鼠能在其体内产生免疫黏膜抗体     | Chikwamba 等, 2002a; Chikwamba 等, 2002b                             |
|   | 未报道    | 口服免疫人能在其体内产生免疫黏膜抗体 | Tacket 等, 2004          |  |
|   | 转基因烟草  | 3.3% TSP           | 体外与神经节苷脂 GM1 结合         | Kang 等, 2005c  |

(续)

| 抗原                | 表达体系   | 表达量   | 免疫效果                              | 参考文献             |
|-------------------|--|---|-----------------------------------|------------------|
|                   | 烟草花叶病<br>毒 ( Tobacco<br>mosaic virus )<br>多肽表达系统<br>转染烟草 | 75 $\mu\text{g/g}$ FW                                       | 鼻内接种免疫小鼠能产<br>生免疫应答, 有免疫佐剂<br>的作用 |                  |
| 突变无毒 LT-B         | 烟草叶绿体  | 3.7% TSP  | 体外与神经节苷脂 GM1<br>结合                | Kang 等, 2004b    |
| LT-B 融合避孕<br>疫苗抗原 | 转基因番茄  | 66 $\mu\text{g/g}$ DW (果<br>实)<br>10 $\mu\text{g/g}$ FW (叶) | 未报道                               | Walmsley 等, 2003 |

#### (四) 霍乱植物疫苗

霍乱是由产生霍乱毒素的霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) (图 3-19) 引起的急性细菌性肠道传染病, 是发病急、传播快、波及面广、危害严重的甲类传染病; 也是当前 3 种国际检疫传染病中最严重的一种。1817—1923 年的百余年间, 先后有过 6 次世界大流行, 均从恒河下游三角洲地带向外扩散。第七次霍乱世界大流行自 1961 年开始, 历时 30 余年, 这在霍乱流行史上是空前的。霍乱的流行目前在发展中国家仍是一个令人困扰的公共卫生问题, 主要临床表现为腹泻、呕吐以及由此引起的体液丢失、脱水、电解质紊乱及低钾综合征等, 如不及时抢救, 患者常可因低血容量休克、代谢性酸中毒或肾功能衰竭等死亡。

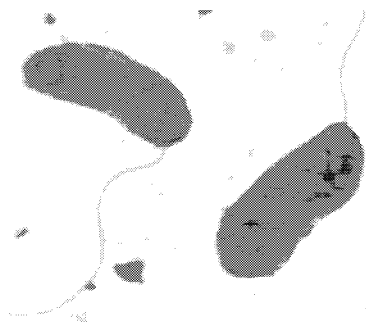


图 3-19 霍乱弧菌电镜图

霍乱毒素 (cholera toxin, CT) 是霍乱弧菌致病的重要因素, 为不耐热毒素, 对蛋白酶敏感而对胰蛋白酶抵抗, 分子量为 84 ku, 由 A 和 B 两个亚单位组成。A 亚单位又分 A1 和 A2 两个组分, 其间有二硫键连接。A 亚单位起生物活性作用即毒性单位, 但与组织细胞无结合能力, 抗原性较弱。B 亚单位 (cholera toxin subunit B, CTB) 为结合单位, 本身并无毒性, 但具有较强的抗原性, 能特异地识别肠上皮细胞上的受体。此受体由神经节苷脂 GM1 (单唾液酸神经节苷脂, 神经节苷脂最初是从脑和神经组织中提取到的, 以后发现广泛存在于各种细胞表面) 组成。1 个毒素分子是由一个 A 亚单位和 5 个 B 亚单位通过非共价键连接组成的多聚体。霍乱毒素产生后, 其 B 亚单位与肠上皮细胞受体结合, 使毒素分子变构, A 亚单位进入细胞, A1 肽链活化, 作用于腺苷酸环化酶, ATP 不断转化为 cAMP, 胞内 cAMP 浓度明显增加, 促进肠黏膜细胞的分泌功能, 结果肠液 (水和电解质) 大量分泌, 形成本病特征性的剧烈水样腹泻。

霍乱疫苗接种已有 100 多年的历史，曾用过的最为广泛的是非经肠道免疫制剂——灭活的霍乱弧菌菌种疫苗，采用肌肉注射，经 20 世纪 60 年代霍乱流行区控制试验表明，效果不佳，副作用大，世界卫生组织（WTO）已经宣布不再推荐此疫苗的应用。现今研制的 rBS 或 rBS-WC 口服疫苗，副作用小，免疫效果好，在孟加拉国现场试验表明对霍乱的保护作用至少持续 3 年，特别有意义的是在霍乱流行区，危及生命的严重病人可减少 50%，因此被认为是当今最好的疫苗，且能对肠毒性腹泻、旅行者腹泻有保护作用，是已被 WHO 推荐应用的疫苗。世界上目前只有瑞典 SBL Vaccine AB 公司进行生产，中国研制的 rBS-WC 口服疫苗已取得新药证书。目前，霍乱植物疫苗的研究主要集中在将 CTB 转入各种植物（表 3-10）。

表 3-10 霍乱植物疫苗研究实例

| 抗原    | 表达体系                             | 表达量             | 免疫效果            | 参考文献            |
|-------|----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| CTB   | 转基因马铃薯                           | 0.3% TSP        | 口服免疫小鼠能产生免疫应答   | Arakawa 等, 1997 |
|       | 烟草叶绿体                            | 4.1% TSP        | 体外与神经节苷脂 GM1 结合 | Daniell 等, 2001 |
|       | 转基因烟草                            | 1.5% TSP        | 静脉注射免疫小鼠产生免疫应答  | Jani 等, 2004,   |
|       |                                  | 0.02% TSP       |                 | Kang 等, 2004a   |
| 转基因番茄 | 0.02% TSP (叶),<br>0.04% TSP (果实) | 体外与神经节苷脂 GM1 结合 | Jani 等, 2002    |                 |

### (五) 人其他细菌植物疫苗

利用其他细菌抗原基因研制植物疫苗实例见表 3-11。

表 3-11 利用其他细菌抗原基因研制植物疫苗实例

| 病原体   | 抗原                     | 表达生产体系                                   | 表达量          | 免疫效果                    | 参考文献                    |
|---|------------------------|--|--------------|-------------------------|-------------------------|
| 弗氏志贺氏菌<br>( <i>Shigella flexneri</i> )          | IpaC                   | 转基因拟南芥                                   | 0.2% TSP     | 未报道                     | MacRae 等, 2004          |
| 金黄色葡萄球菌<br>( <i>Staphylococcus aureus</i> )     | fibronectin 结合蛋白 D2 表位 | 豇豆花叶病毒 (cowpea mosaic virus) 抗原展示系统 转染烟草 | 1200 µg/g FW | 静脉注射免疫小鼠能产生免疫中和抗体       | Brennan 等, 1999c        |
| 肠致病性大肠杆菌<br>(Enteropathogenic <i>E. coli</i> )  | BFP 抗原 A               | 转基因烟草                                    | 7.7% TSP     | 口服免疫小鼠能产生免疫应答和中和抗体      | Vieira da Silva 等, 2002 |
| 肠出血性大肠杆菌<br>(Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> ) | Intimin                | 转基因烟草                                    | 3 µg/g FW    | 口服免疫可促进静脉注射免疫过的小鼠产生免疫应答 | Judge 等, 2004           |

(续)

| 病原体   | 抗原          | 表达生产体系  | 表达量                                 | 免疫效果   | 参考文献   |
|---|-------------|---|-------------------------------------|--|--|
| 幽门螺旋杆菌<br>( <i>Helicobacter pylori</i> )    | UreB        | 转基因烟草   | 未报道                                 | 未报道  | Gu 等, 2005   |
| 铜绿假单胞菌<br>( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) | 膜蛋白<br>F 表位 | 豇豆花叶病<br>毒 ( cowpea<br>mosaic virus )<br>抗原展示系统<br>转染豇豆<br><br>烟草花叶病<br>毒 ( tobacco<br>mosaic virus )<br>抗原展示系统<br>转染烟草 | 1 200 $\mu\text{g/g}$ FW<br><br>未报道 | 静脉注射免<br>疫小鼠能产生<br>免疫应答和<br>保护<br><br>静脉注射免<br>疫小鼠能产生<br>免疫应答和<br>保护 | Brennan 等, 1999a;<br>Brennan 等, 1999b;<br>Gilleland 等, 2000<br><br>Gilleland 等, 2000;<br>Staczek 等, 2000 |

### 三、植物黏膜免疫佐剂

黏膜是阻止病原微生物入侵的重要生理防线。黏膜免疫方法与传统的肌肉注射方法相比有以下优点：口服或鼻腔内接种可避免针剂的疼痛，减少注射局部的炎症反应，易重复接种。最重要的是黏膜免疫既能产生机体各黏膜系统的局部免疫保护反应，又能产生全身性的免疫反应。但困扰黏膜疫苗一个重要问题是很多抗原的黏膜免疫原性很弱，不能刺激有效的免疫反应，这与黏膜耐受有关，特别是可溶性抗原通常并不会诱导出所期待的黏膜免疫反应。霍乱毒素 (CT) 和大肠杆菌不耐热毒素 (heat-labile enterotoxin, LT) 是目前已知的强细菌黏膜免疫佐剂，它们能促进和增强许多不同的细菌和病毒抗原的免疫原性。

LT 和 CT 都属于 A-B 型细菌蛋白毒素家族，虽然各自表现不同的毒性作用，但两者的氨基酸序列有 80% 的相同，晶体结构分析显示两者有很相近的结构特征，都是由亚单位 A 和亚单位 B 组成。亚单位 A 均有二磷酸腺苷酸核糖化作用，具有一定的毒性。亚单位 B 本身无毒性，可与靶细胞膜上神经节苷脂 1 (GM1) 特异性结合，穿透细胞，将亚单位 A 带入细胞。CT、CT 的亚单位 B (CTB)、LT 和 LT 的亚单位 B (LTB) 作为免疫佐剂，都可刺激肠道的上皮细胞，增强黏膜细胞对抗原的通透性，肠道的淋巴系统能摄取更多的抗原分子，从而增强了免疫反应的效果。研究表明，当 CT (CTB、LT、LTB) 与不相关抗原一同经黏膜途径免疫动物时，可大大增强机体对特异性抗原的特异性黏膜 IgA 免疫应答和系统 IgG 免疫应答。同时 CTB 和 LTB 还是一种良好的蛋白半抗原和弱免疫原的载体，共免时可以赋予半抗原免疫原性，增强弱免疫原的免疫原性。由于 CT 和 LT 具有肠毒性，限制了其作为免疫佐剂的应用前景，因而研究的热点转向了其无毒的受体结合亚单位。研究表明，单独的 CTB 或 LTB 也具有较弱的免疫佐剂活性，特别是当其经化学方法或基因融和技术使其与不相关抗原形成偶联蛋白或融合蛋白时，其免疫佐剂活性强于其与不相关抗原混合免疫时的佐剂活性，起到了佐剂和输送载体的作用，为新一代基因工程疫苗提供了良好的基础。



开发黏膜免疫佐剂，尤其是高效、廉价的制备系统已成为人们关注的焦点之一。利用转基因植物作为生物反应器的优点，通过基因融合手段，构建可表达 CT 或 (CI'B、LT、LTB) 与目的基因抗原融合的表达载体。将基因构建于植物表达载体，并进一步将转化入受体植物，利用这种策略大大提高的植物疫苗的免疫效果。本章在各种植物疫苗的介绍中已详细列出具体实例，可供参考。

#### 四、癌症相关植物疫苗

##### (一) 人乳头瘤病毒宫颈癌植物疫苗

宫颈癌是严重危害妇女健康和生命的疾病，每年约有 50 万新发病例，25 万人死亡，是引起妇女死亡的第二大原因，其中大部分在发展中国家，占 80% 左右。1977 年德国学者 Zur Hausen 等从宫颈癌标本中发现了人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) DNA，推测 HPV 感染与宫颈癌发生有关。进一步的分子流行病学证据表明，HPV 与人类多种癌症，特别是与宫颈癌有着密切的关系。HPV 属乳头多瘤空泡病毒科 (Papovaviridae) 乳头瘤病毒属 (图 3-20)，是一类感染表皮和黏膜鳞状上皮的小 DNA 病毒。其基因组为双链环状 DNA，长 7.5~8.0 kb，含 8 个早期开放读码框架 (E1-E8)，参与病毒 DNA 的复制、转录、翻译调控和转化等功能；2 个晚期读码框架 (主要外壳蛋白 L1 和次要外壳蛋白 L2) 和 1 个非编码长控区。目前已经证实 HPV 有 130 多个基因型。有 35 个型别的 HPV 感染泌尿生殖道。HPV6、11 为低危型，而 HPV31、33、35、39、51、52 和 58 为中危型，HPV16、18、45 和 56 为高危型。

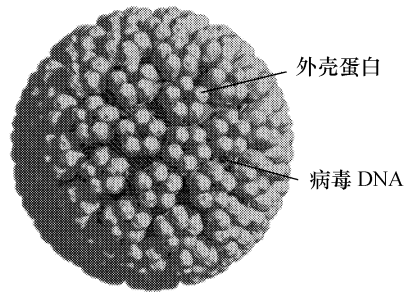


图 3-20 人乳头瘤病毒颗粒示意图

由于从感染灶组织中很难分离到病毒体，迄今未能建立体外培养系统进行病毒培养。目前对宫颈癌的治疗基本以手术和放疗为主，给病人带来很大的痛苦。预防 HPV 相关癌症的最有效的方法是研制特异性的疫苗，诱导机体产生中和抗体，激发保护性免疫反应，达到有效预防与癌症相关型的 HPV 传播的目的，降低宫颈癌的发生率，并且可能降低与 HPV 感染弱相关的癌症如肛门、外阴或扁桃体癌的发生率。根据现有的资料显示 HPV 病毒的蛋白有免疫原性，HPV L1、L2 是病毒的衣壳蛋白，组成病毒的外壳，暴露在外面可以被机体的免疫系统认识，因此，HPV L1、L2 基因和它们的蛋白产物是最合适的预防性疫苗。

近年来，癌症疫苗的含义发生了变化，它被定义为一种治疗手段，癌症疫苗能使通过免疫细胞活性化，激发免疫细胞攻击癌细胞，从而达到提高自身免疫力、消灭癌细胞的目的。预防并非疫苗的唯一目标，对其他一些癌症来说，疫苗被当作一种治疗手段。基因重组技术、抗肿瘤免疫理论的发展，为癌症疫苗的研究和开发提供了条件，利用植物生产廉价癌症疫苗的研究和发展提供了新的途径和希望 (表 3-12)。对 HPV 治疗性疫苗，考虑 E6 和 E7 蛋白是癌蛋白，具有使上皮细胞永生化的特性，HPV E6/E7 是最具吸引力的靶抗

原。因此，它们的蛋白产物是最适合的治疗性疫苗，用于治疗与 HPV 相关的恶性肿瘤。

表 3-12 人乳头瘤病毒宫颈癌植物疫苗研究实例

| 病原体                                    | 抗原 | 表达体系                                    | 表达量                      | 免疫效果                   | 参考文献            |
|--|----|---|--------------------------|------------------------|-----------------|
| 人乳头瘤病毒 11<br>(human papillomavirus 11) | L1 | 转基因马铃薯                                  | 0.023 $\mu\text{g/g}$ FW | 静脉加强免疫后，小鼠口服免疫能产生免疫应答  | Warzecha 等，2003 |
| 人乳头瘤病毒 16<br>(human papillomavirus 16) | E7 | 马铃薯 X 病毒 (potato virus X) 多肽表达系统 转染烟草   | 4 $\mu\text{g/g}$ FW     | 静脉注射免疫小鼠能在其体内产生免疫和保护作用 | Franconi 等，2002 |
|  |    | 马铃薯 X 病毒 (potato virus X) 多肽分泌表达系统 转染烟草 | 20 $\mu\text{g/g}$ FW    | 皮下注射免疫小鼠能在其体内产生免疫应答    | Franconi 等，2006 |
|  | L1 | 转基因烟草                                   | 0.004 $\mu\text{g/g}$ FW | 静脉注射免疫兔子能在其体内产生免疫应答    | Varsani 等，2003  |
|  |    | 转基因烟草                                   | 0.034%~<br>0.076% TSP    | 血凝集反应证明了其免疫源性          | Liu 等，2005      |
|  |    | 转基因烟草、转基因马铃薯                            | 0.2%~0.5%<br>TSP         | 静脉加强免疫后，小鼠口服能产生免疫应答    | Biemelt 等，2003  |

## (二) 结肠直肠癌植物疫苗

结肠直肠癌 (colorectal cancer) 是结肠或直肠内的细胞异常生长所形成的癌病。癌细胞会持续生长，并逐渐扩散和转移至身体其他部位。结肠癌更是男性第三类最常见的癌症，全球每年约有 100 万患者，其中以西方与工业发达国家发病率为高。例如在美国，结肠直肠癌是居于第二位的癌症。在我国的发病率也呈上升趋势。结肠直肠癌的治疗方法包括单独或合并使用外科手术、化疗 (使用抗癌药物) 或放射治疗 (利用 X 光对付或消灭癌细胞)。GA733-2 抗原被认为是一个与结肠直肠癌转移发生相关的关键蛋白。Verch 等 (2003) 利用烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus) 多肽表达系统感染烟草表达了 GA733-2，并将表达后纯化蛋白注射小鼠，诱导了其体内的体液免疫反应，交叉淋巴细胞毒实验表明，该系统表达的抗原蛋白与昆虫表达系统表达的抗原蛋白具有相同的免疫源性。

## 五、免疫耐受植物疫苗

### (一) I 型糖尿病植物疫苗

I 型糖尿病是一种器官特异性自身免疫性疾病。由于体内胰岛素绝对缺乏，致使体内葡萄糖、蛋白质及脂肪代谢紊乱，其主要特征是长期高血糖。随着病程延长，体内的糖、蛋白质及脂肪代谢紊乱，可以导致眼、肾、神经、血管及心脏等组织器官慢性进行性病变，如得不到合理治疗，则最后导致双目失明、尿毒症、脑血管及心脏病变、下肢或足坏疽，甚至危及生命。遗传的易感性加上外界环境因素的影响，如病毒感染，特别是柯萨奇 B4 病毒感染，直接或间接造成自身免疫反应。在 I 型糖尿病患者的血液中可查出多种自身免疫抗体，如谷氨酸脱羧酶抗体（GAD 抗体）、胰岛细胞抗体（ICA 抗体）等。这些异常的自身抗体可以损伤人体胰岛分泌胰岛素的 B 细胞，使之不能正常分泌胰岛素。

大量的实验和临床研究表明，通过口服自身抗原诱导免疫耐受是防治自身免疫性疾病的有效措施。针对自身抗原的免疫无反应状态称为自然耐受（natural tolerance）或自身耐受（self-tolerance）。口服耐受（oral tolerance）是通过消化系统摄入外源性抗原诱导外周免疫系统产生抗原特异性无反应状态。口服耐受为恢复和维持正常的自身耐受提供了一条自然途径，具有简便、有效、安全和无毒性等特点。自 1990 年首次证明谷氨酸脱羧酶（GAD）是 I 型糖尿病的自身抗原以来，GAD 及其自身抗体（GAD-Ab）便成为 I 型糖尿病的研究热点之一。初步研究表明，谷氨酸脱羧酶自身抗体（GAD-Ab）与 I 型糖尿病的病理过程及  $\beta$  细胞的胰岛素分泌功能密切相关。注射 GAD 自身抗原能够成功地预防 NOD 小鼠的 I 型糖尿病。

1997 年加拿大科学家在烟草和马铃薯中表达了与 I 型糖尿病的自身抗原鼠 GAD67，通过口服免疫非肥胖性糖尿病小鼠证实，植物来源的 GAD67 有效减缓了其糖尿病的发展。2003 年他们又分别获得了转入 GAD65 和 mIL-4 的转基因烟草，转入 GAD65 和 mIL-4 烟草单独免疫小鼠不能产生免疫保护，但转入 GAD65 和 mIL-4 烟草共同口服免疫非肥胖性糖尿病小鼠后产生了免疫保护反应。

### (二) 过敏植物疫苗

过敏疾病是指有过敏体质的病童，在接触了环境当中的过敏原或非过敏的刺激因素之后，局部产生慢性发炎反应的疾病。当这种慢性发炎反应表现在气管、鼻子、皮肤或眼睛，就分别形成气喘病、过敏性鼻炎、异位性皮肤炎或过敏性结膜炎等过敏疾病。全球人群在一生中，有 30%~40% 会发生不同程度的过敏反应。一般最常见的过敏疾病为过敏性结膜炎、过敏性鼻炎、过敏性湿疹或异位性皮肤炎及过敏性哮喘等。目前，临床上将哮喘、过敏性鼻炎等称为呼吸性过敏病。它是指人体在接触到致敏物质后，身体内产生一种名为免疫球蛋白 E（IgE）的特殊抗体，并与环境中的致敏物质起反应，刺激呼吸器官中的细胞释放某些化学物质，进而引发各种呼吸系统的症状。过敏原疫苗的研发，目前已有令人兴奋的初步结果。将过敏原蛋白质或其对应核糖核酸加以处理后，注射入实验动物体

内，可以改变实验动物免疫反应，使其不易对此过敏原产生过敏反应。这些研究显示，人类将有可能制造安全无虑的过敏原疫苗，使过敏病童无惧一些常见的主要过敏原。针对外源性抗原的免疫无反应状态称为获得性耐受（acquired tolerance）。2005年，日本科学家在水稻种子内特异表达了融合大豆球蛋白的日本柳杉花粉过敏源 Cry j I，Cry j II T 细胞表位，通过小鼠的免疫实验证实，该转基因水稻诱导了小鼠对花粉过敏源的免疫耐受反应。2003年澳大利亚研究人员将转向向日葵种子白蛋白基因的窄叶羽扇豆饲喂哮喘实验小鼠，使得小鼠哮喘超敏反应和病理特征得到明显减弱。

#### 第四节 与动物相关的植物疫苗

近几年来，随着畜禽饲养业规模的扩大和集约化程度的持续提高，对群体免疫性疫苗的需求量必然加大。但是，目前散养动物，乃至大规模的集约化养殖场多采用刺种或注射等方法进行免疫预防接种，这显然比较麻烦，特别是在进行多种传染病的防治中，需要进行多次刺种、注射、滴鼻等免疫接种，这无疑要耗费大量的劳动力和时间，同时会造成多次应激。而对狗或其他散养动物，难度就更大。虽然联苗和多价苗的出现，在一定程度上缓解了这一矛盾。但仍然会对畜禽的生长、发育、抗病与生产造成影响。相比之下，通过饮水或采食口服疫苗对动物进行预防接种，则安全、易行、实用、方便、省时、省力，更易被广大用户接受。因此，有关动物胃肠道口服疫苗的探索已成为当前免疫研究的前沿课题之一。随着黏膜免疫理论研究的深入和现代生物技术的发展和完善，动物口服疫苗的研制也取得了新的成就。特别是植物疫苗的出现，为研究出省时、省力、方便、实用、安全、高效、易保存的动物可饲疫苗带来了希望。由于动物疫苗的试验能比人用疫苗更快地付诸于临床应用，更多的学者致力于研发预防动物传染病的植物疫苗。

##### 一、口蹄疫病毒植物疫苗

口蹄疫（foot and mouth disease, FMD）是偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触性传染病，被国际兽医局列为头号 A 类传染病。该病传播途径多、传播速度快，曾多次在世界发生大流行。虽然该病的死亡率不高（幼畜除外），但造成动物生产性能下降，捕杀动物花费大量的人力、物力和财力，影响国际贸易，经济损失惨重。为此，世界各国非常重视 FMD 的研究。口蹄疫病毒（foot and mouth disease virus, FMDV）属于小 RNA 病毒科，口蹄疫病毒属（图 3-21）。FMDV 基因组 RNA 全长约 8.5 kb，依次为 5'UTR、ORF 和 3'UTR 组成。ORF 约 6.5kb，由 L 基因、P1 结构蛋白基因、P2 和 P3 非结构蛋白基因以及其始密码子

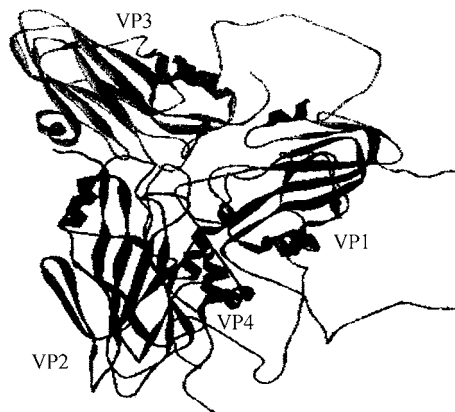


图 3-21 口蹄疫病毒的核壳结构

和终止密码子组成。其中 P1 结构蛋白基因编码 4 种主要的衣壳蛋白，既 VP1、VP2、VP3 和 VP4。VP1-3 组成衣壳蛋白亚单位，VP4 位于病毒颗粒内部。VP1 基因 FMDV 主要的免疫原性基因，它含有 B 细胞抗原表位 (141~160 aa) 和 T 细胞抗原表位 (200~213 aa)，能诱导集体产生中和抗体。另外，B 细胞抗原表位区构成“G-H”环暴露在病毒粒子的表面，环内的 RGD (精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸) 序列高度保守，是病毒的宿主细胞结合的特异性位点。疫苗接种是特异性预防 FMD 的可靠和有效手段，安全有效的疫苗是成功地预防、控制乃至最终消灭 FMD 的先决条件。FMD 弱毒疫苗和灭活疫苗等常规疫苗都具有良好的免疫原形，在预防和控制 FMD 的过程中发挥着重要作用。但由于病毒毒力返强、病毒灭活不彻底、活病毒逃逸加工厂等不安全因素，世界上一些地区 FMD 的暴发似乎与灭活疫苗中残存的活病毒有关，促使人们寻求一种更加安全有效的 FMD 疫苗。另外，由于灭活疫苗制备成本高，价格昂贵，限制了该疫苗的推广。

近年来，随着分子生物学技术的飞速发展，FMDV 基因工程疫苗如亚单位疫苗、可饲疫苗、合成肽疫苗、蛋白质载体疫苗、基因缺失疫苗、活载体疫苗、核酸疫苗等不断涌现。可饲(食)疫苗即利用农杆菌或基因枪等技术，将免疫原性基因导入植株中，获得表达免疫原性蛋白的植株。FMD 转基因植物可饲疫苗是研究较早，并且效果较好的例子之一。早在 1998 年，Carrillo 等用 FMDV 的主要保护性抗原基因 VP1 获得了转基因拟南芥，用叶浸提物免疫小鼠，可诱导产生特异性抗体，所有免疫的小鼠都能抵抗 FMDV 强毒半数致死量的攻击，这是有关转基因植物表达的病毒抗原使免疫动物全部获得保护的首篇报道，而且一个免疫剂量仅为 25~50 mg 叶片。1999 年 Wigdorovitta 等又利用牧草苜蓿作为受体材料，成功获得了转基因苜蓿，以 15~20 mg 剂量免疫小鼠，免疫鼠能 100% 抵抗致死量强毒的攻击。随后，不断有以转基因马铃薯、苜蓿、烟草作为受体材料或植物病毒表达系统表达 VP1 的成功报道。动物实验也证实了其所具有的免疫原性。最近，中国农业科学院生物研究所利用烟草叶绿体系统使得 VP1 的表达量提高到 2%~3% TSP，中国热带农业科学院的研究人员又以热带牧草柱花草为受体获得了表达 VP1 转基因植株。FMDV 转基因植物可饲疫苗的研究的不断发展(表 3-13)，将为牛、羊等草食动物 FMD 的防治带来光明的前景。总之，理想的疫苗必须安全、有效，同时还应具备价廉、易推广等优点。因此，FMDV 植物可饲疫苗是未来的发展方向。

表 3-13 口蹄疫病毒植物疫苗研究实例

| 抗原  | 表达体系   | 表达量 | 免疫效果                     | 参考文献             |
|-----|--|-----|--------------------------|------------------|
| VP1 | 豇豆花叶病毒<br>(cowpea mosaic virus) 抗原展示系统<br>转染豇豆 | 未报道 | 未报道                      | Usha 等, 1993     |
|     | 转基因拟南芥   | 未报道 | 静脉注射免疫小鼠能在其体内产生免疫应答和保护作用 | Carrillo 等, 1998 |



(续)

| 抗原                | 表达体系  | 表达量                    | 免疫效果                      | 参考文献                |
|-------------------|---|------------------------|---------------------------|---------------------|
|                   | 烟草花叶病毒<br>(tobacco mosaic virus) 多肽表达系统<br>转染菠菜 | 150 $\mu\text{g/g}$ FW | 静脉注射免疫鼠能在其体内产生免疫应答和保护作用   | Wigdorovitz 等, 1999 |
|                   | 转基因苜蓿   | 未报道                    | 静脉注射和口服免疫小鼠能在其体内产生免疫和保护作用 | Wigdorovitz 等, 1999 |
|                   | 烟草叶绿体   | 2%~3% TSP              | 未报道                       | Li Y 等, 2006        |
|                   | 转基因苜蓿   | 0.01% TSP              | 静脉注射免疫小鼠能在其体内产生免疫和保护作用    | Dus 等, 2005         |
|                   | 转基因马铃薯  | 0.01% TSP              | 静脉注射免疫小鼠能在其体内产生免疫和保护作用    | Carrillo 等, 2001    |
| VP1 融合 GUS        | 转基因苜蓿   | 0.1% TSP               | 静脉注射免疫小鼠能在其体内产生免疫和保护作用    | Dus Santos 等, 2002  |
| VP21 表位融合乙型肝炎核心抗原 | 转基因烟草   | 0.05% TSP              | 腹膜内注射免疫小鼠, 能在其体内产生免疫应答    | Huang 等, 2005       |

## 二、猪病毒性腹泻植物疫苗

猪病毒性腹泻是猪的常见病、多发病。引起腹泻的病毒种类较多, 但危害严重的主要有猪传染性胃肠炎病毒 (transmissible gastroenteritis virus of swine, TGEV)、猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 和猪轮状病毒 (RV) 3 种。各年龄猪均可感染, 对仔猪危害最严重, 有较高的发病率和死亡率, 而其他猪由于腹泻引起的生长迟缓、饲料报酬降低所造成的经济损失更是无法估计, 长期以来是困扰世界养猪业发展的难题。由于仔猪腹泻症大多数发病日龄小, 发病急, 病死率高。因此, 靠发病后进行免疫防御是来不及的。目前, 大多数疾病已有疫苗, 用以给母猪预防注射, 仔猪可以通过吮吸母乳获得抗体, 以保护仔猪不发病。它无疑是最有效的预防仔猪腹泻病发生的重要措施之一。

PED、TGE 和猪轮状病毒病都是肠道病, 都是通过消化道感染的。它们的靶细胞都是肠绒毛上皮细胞, 引起肠绒毛的萎缩脱落, 是导致动物消化紊乱、酸中毒和脱水的原因。在预防上, 如果在肠腔内经常有抗体存在, 就可以不断地中和猪体摄入的病毒, 从而起到保护作用。在主动免疫中, 当猪体自然感染 PEDV、TGE 和 RV 时, 主要是肠黏膜的局部免疫, 病毒对肠腔的刺激既可产生 IgG, 也可产生 IgA, 这是体液免疫, 同时也可产生细胞免疫。肠上皮细胞形成的 IgA 分泌片可有效地将 IgA 从黏膜固有层转运进入肠腔。在免疫学中起主要作用的免疫球蛋白是 IgG 和 IgA。IgG 也叫循环抗体, 它的主要作用是用来抵御全身感染, 而 IgA 主要用来抵御黏膜感染。IgG 的分子量较大, 不容易穿过

肠壁进入肠腔，它们对胃酸和消化酶的抵抗力较差。IgA 也叫分泌抗体，分子量较小，它们在黏膜免疫中起主要作用，可以抵御胃酸和消化酶的消化，并且与肠黏膜有亲和作用，所以 IgA 在肠道中起重要的作用。因此，利用植物疫苗来预防腹泻肠道病具有一定的免疫理论基础。

### （一）猪传染性胃肠炎病毒植物疫苗

猪传染性胃肠炎病毒（TGEV）隶属于冠状病毒科冠状病毒属，是引起仔猪病毒性腹泻的重要病原，由其引起的猪传染性胃肠炎（transmissible gastroenteritis of swine, TGE）以呕吐、严重腹泻、脱水和对 2 周龄以内仔猪的高度致死为特征。TGEV 基因组为不分段的单股正链 RNA，TGEV 由 4 种结构蛋白和 3 种非结构蛋白构成。纤突（S）蛋白为大的糖蛋白，它形成病毒突起，是唯一能诱导产生中和抗体和提供免疫保护作用的结构蛋白。所以，S 蛋白是基因工程研究的重点，尤其近年来在植物中表达 S 蛋白的表达方面国内外研究者进行了不断的探索（表 3-14）。

表 3-14 猪传染性胃肠炎病毒植物疫苗研究实例

| 抗原    | 表达系统   | 表达量       | 免疫效果                | 参考文献   |
|-------|--------|-----------|---------------------|--|
| S 糖蛋白 | 转基因拟南芥 | 0.06% TSP | 静脉注射免疫老鼠能在其体内产生中和抗体 | Gomez 等, 1998  |
|       | 转基因马铃薯 | 0.06% TSP | 静脉注射或口服免疫小鼠产生免疫应答   | Gomez 等, 2000  |
|       | 转基因烟草  | 0.2% TSP  | 静脉注射免疫猪能在其体内产生中和抗体  | Tuboly 等, 2000   |
|       | 转基因玉米  | 2% TSP    | 口服免疫仔猪产生免疫应答和保护作用   | Streatfield 等, 2001;<br>Lamphear 等, 2002;<br>Streatfield 和 Howard, 2003b |

### （二）猪流行性腹泻病毒植物疫苗

猪流行性腹泻（porcine epidemic diarrhea, PED）是以水泻、呕吐和脱水为特征的一种急性病毒性腹泻。猪流行性腹泻现已成为世界范围内的猪病之一。猪流行性腹泻病毒（PEDV）是 PED 的致病因子，是导致类似猪传染性胃肠炎临床症状的真正病原。PEDV 为冠状病毒属成员，病毒核酸为线形正义单链 RNA。整个基因组长度为 27 000~33 000 个核苷酸。PEDV 的结构蛋白与其他冠状病毒相似，主要有糖基化纤突（spike）蛋白 S、糖基化囊膜（membrane）蛋白 M 和 RNA 结合的未糖基化核衣壳（nucleocapsid）蛋白 N。S 蛋白含有主要的中和介导抗原决定部多肽。该多肽含有多个潜在的糖基化位点，预测的 PEDV 蛋白 S 的多数糖基化位点都具有生物学意义。近年来，研究人员以表达蛋白 S 的抗原表位对猪流行性腹泻植物疫苗进行了研究（表 3-15），并取得了良好的研究进展。

表 3-15 猪流行性腹泻植物疫苗研究实例

| 抗原           | 表达系统   | 表达量                   | 免疫效果                    | 参考文献           |
|--------------|--|-----------------------|-------------------------|----------------|
| S 蛋白<br>抗原表位 | 转基因烟草  | 20 $\mu\text{g/g}$ FW | 口服免疫小鼠产生系统免疫<br>和黏膜免疫抗体 | Bae 等, 2003    |
|              | 转基因烟草  | 0.1% TSP              | 未报道                     | Kang 等, 2005a, |
|              | 转基因烟草  | 2.1% TSP              | 未报道                     | Kang 等, 2005b  |
|              | 转基因马铃薯   | 0.1% TSP              | 未报道                     | Kim 等, 2005    |
|              | 烟草花叶病毒<br>(tobacco mosaic vi-<br>rus) 多肽表达系统<br>接种烟草 | 5.0% TSP              | 未报道                     | Kang 等, 2004   |

### 三、新城疫病毒植物疫苗

新城疫 (newcastle disease, ND) 由新城疫病毒 (newcastle disease virus, NDV) 引起的一种以呼吸道, 消化道黏膜出血为典型病变的高度接触性、急性败血性禽类传染病。除家禽外, 至少有 200 多种鸟可以自然或实验室感染, 是危害世界养禽业的最严重的传染病之一, 给世界养禽业造成了损失巨大。

新城疫病毒 (newcastle disease virus, NDV) 属于副黏病毒科腮腺炎病毒属 (*Rubulavirus*), 基因组为一条单股、负链、不分节段的 RNA (图 3-22)。经典毒株的基因组长度均为 15 186 nt, 分别编码 6 种结构蛋白, 即核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, NP)、磷蛋白 (phospho protein, P)、基质蛋白 (matrix protein, M)、融合蛋白 (fusion protein, F)、血凝素神经氨酸酶 (haemagglutinin neuraminidase, HN) 和大蛋白 (large protein, L)。研究表明, HN 蛋白通过识别、吸附细胞表面受体来启动病毒致病性, 而 F 蛋白通过其融合多肽的穿膜作用来产生致病作用。因此, HN、F 是构成 NDV 致病性的分子基础和主要毒力相关蛋白。目前新城疫疫苗的类型大致可概括为活疫苗、灭活疫苗和基因工程疫苗三大类。由于 F、HN 两种糖蛋白均具有良好的免疫原性, 基因工程疫苗根据其并证明了 F 基因或 HN 基因重组疫苗对强毒攻击具有较好的免疫保护力, 最高者达 100%。基因工程疫苗能在个体内长期存在, 并持续表达低水平的抗原蛋白, 无须后续免疫注射而能够诱导持续的免疫效应达 1 年以上, 甚至终生免疫。一种基因疫苗还能够诱导产生针对多个抗原表位的免疫和保护作用。基因工程疫苗还具有安全、操作简单、成本低廉等特点。由此可见, 构建

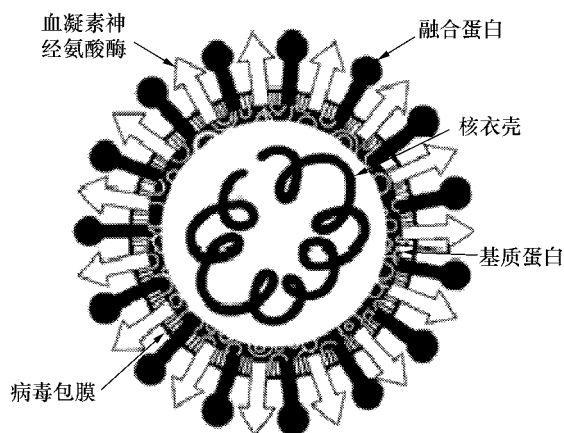


图 3-22 新城疫病毒颗粒

重组 HN、F 基因活载体苗，是今后疫苗发展的热点和必然，其开发应用前景十分广阔。

2005 年 Berinstein 等在马铃薯中分别表达了 HN、F 蛋白，表达量为 0.06% TSP，口服和静脉注射免疫小鼠都产生了免疫应答，并检测到 NDV 特异抗体 IgG，证明新城疫病毒植物疫苗可以诱导小鼠的黏膜应答。同年，我国扬州大学的科研人员在水稻里表达了 F 蛋白，同样免疫小鼠产生了免疫反应和特异抗体。Zhao 和 Hammond 还利用黄瓜病病毒抗原展示系统中分别表达了 8 个氨基酸 HN 抗原表位、17 个氨基酸的 F 蛋白，表达量可达 430 μg/gFW，为开发安全、操作简单、成本低廉的新型新城疫疫苗开拓了广阔的前景。

#### 四、犬细小病毒植物疫苗

犬细小病毒病是由犬细小病毒 (*Canine parvovirus*, CPV) 引起的一种急性传染病，是目前危害犬类的最主要的烈性传染病之一。病的特征是剧烈呕吐、出血性腹泻、血液白细胞显著减少，或非化脓性心肌炎，本病常发生于幼犬。近年来，该病对我国养犬业和警（军）犬事业也造成了极大的威胁。随着我国宠物业的不断发展，对 CPV 的预防和控制也就成为众所关注的问题。

CPV 病毒粒子为二十面体对称结构（图 3-23），病毒无囊膜，在电镜下呈圆形或六角形。基因组是单链、负义、线形 DNA。基因组容量在动物 DNA 病毒中最小，全长 5 323 个核苷酸。CPV 主要编码四种蛋白，由早期转录物翻译的非结构蛋白 NS1 和 NS2 和由晚期转录物翻译的结构蛋白 VP1 和 VP2 组成。研究发现，VP2 编码 CPV 的主要抗原决定簇可诱导机体产生中和抗体，其基因序列决定着抗原型及宿主的特异性。

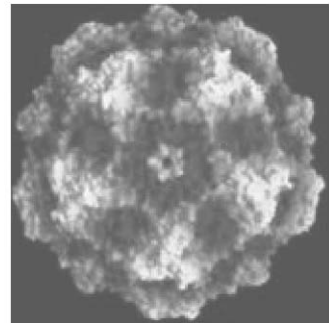


图 3-23 犬细小病毒颗粒示意图

疫苗免疫是预防发病的根本措施。目前已经有 CPV 灭活菌、弱毒苗及猫泛白细胞减少症疫苗等用于预防 CPV 病。近年来研究人员利用植物病毒抗原展示系统或转基因植物对 VP2 的抗原表位进行了表达，注射或黏膜免疫动物实验证明犬细小病毒植物疫苗可以诱导实验动物产生免疫反应（表 3-16）。

表 3-16 犬细小病毒植物疫苗研究实例

| 抗原     | 表达系统                                   | 表达量 | 免疫效果                | 参考文献              |
|--------|--|-----|---------------------|-------------------|
| VP2 表位 | 李痘病毒 (plum pox potyvirus) 抗原展示系统 烟草    | 未报道 | 静脉注射免疫老鼠能在其体内产生中和抗体 | Fernandez 等, 1998 |
|        | 豇豆花叶病毒 (cowpea mosaic virus) 抗原展示系统 烟草 | 未报道 | 静脉注射免疫狗产生免疫保护反应     | Langeveld 等, 2001 |

(续)

| 抗原                     | 表达系统   | 表达量                | 免疫效果                     | 参考文献                              |
|------------------------|--|--------------------|--------------------------|-----------------------------------|
|                        | 豇豆花叶病毒<br>(cowpea mosaic virus) 抗原展示系统<br>转染豇豆 | 未报道                | 静脉或鼻接种免疫小鼠<br>和兔能免疫、中和抗体 | Nicholas 等, 2002                  |
| VP2 表位融合 GUS           | 转基因拟南芥   | 3.3% TSP           | 口服或静脉注射免疫小鼠产生免疫应答        | Gil 等, 2001                       |
| VP2 表位融合霍乱毒素 CTB 或 GFP | 烟草叶绿体  | 22.6,<br>33.1% TSP | 静脉注射免疫小鼠和兔<br>能免疫、中和抗体   | Molina 等, 2004,<br>Molina 等, 2005 |

## 五、牛轮状病毒植物疫苗

牛轮状病毒 (bovine rota virus) 可引起新生犊牛腹泻。主要症状为精神委顿、厌食、脱水和体重减轻, 又由于腹泻导致犊牛机体免疫机能下降, 常继发犊牛肺炎和其他疾患, 引起犊牛死亡或发育不良。牛轮状病毒与人、猪轮状病毒同属 Rotavirus type A, 且具交叉共同抗原。

目前, 已有的减毒牛轮状病毒疫苗是以给母牛预防注射, 犊牛通过吮吸母乳获得抗体而保犊牛不发病, 是有效预防犊牛轮状病毒腹泻病发生的重要措施之一。最近, 研究人员同样利用牛轮状病毒植物疫苗免疫小鼠而使得后代子鼠获得了被动免疫。牛轮状病毒外壳结构蛋白 VP4 和 VP7 是病毒中和反应的主要目标, 能诱导产生中和抗体。Perez Filgueira 等利用烟草花叶病毒多肽表达系统转染烟草表达了  $5\mu\text{g/gFW}$  牛轮状病毒 VP8 (VP4 部分肽段), 静脉注射免疫小鼠产生免疫保护反应, 后代子鼠通过吮吸母乳获得了被动免疫。Wigdorovitz 等利用表达了牛轮状病毒 VP4 的转基因苜蓿进行小鼠免疫试验, 静脉注射或口服免疫小鼠产生免疫保护反应, 后代子鼠通过吮吸母乳也获得了被动免疫。

牛轮状病毒内衣壳是由 4 种病毒蛋白组成 (VP6、VP1、VP2、VP3)。VP6 也是主要的病毒蛋白, 与保护性免疫有关。已经有研究人员分别在马铃薯和烟草中表达了 VP6, 其中利用烟草叶绿体系统表达的 VP6 达 3% TSP, 这为廉价可饲牛轮状病毒植物疫苗的开发生产奠定了实践基础。

## 六、兔出血症植物疫苗

兔出血症 (rabbit hemorrhagic disease, RHD) 俗称兔瘟、兔出血热, 是由兔出血症病毒 (rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV) 引起的一种急性、高度传染性、高致死性的疾病。以呼吸系统出血, 实质器官水肿、淤血及出血变化为特征。1984 年 2 月, 该病首先在我国暴发, 随后朝鲜、韩国、意大利、德国、印度、法国、苏联、西班牙、日本、美国和非洲等国家和地区相继有该病流行的报道。RHDV 基因组为单股正链 RNA,



全长 7 437 bp，仅含两个开放阅读框。VP60 是 RHDV 的主要结构蛋白。它在诱导抗病毒感染的免疫反应中起重要作用，是病毒免疫保护性抗原。

由于兔出血症病毒在体外组织细胞的培养方法尚未建立，目前广泛使用的疫苗为组织灭活苗。但随着家兔饲养成本的提高以及非免疫兔的减少，可用于制苗的肝组织日趋减少，使组织灭活苗的成本不断增加，加之组织灭活苗可能导致散毒的缺点，近年来人们对 RHDV 疫苗的研究主要着眼于基因工程疫苗。在兔出血症植物疫苗方面，Castanon 等在转基因马铃薯中表达了 VP60，静脉注射免疫家兔产生了免疫应答。Fernandez 等用李树痘病毒为载体成功表达了 VP60 的结构蛋白，并用表达 VP60 的李树痘病毒感染植物的抽提物免疫家兔，效果显著。

### 七、动物其他病毒植物疫苗

动物其他病毒植物疫苗研究也取得了一些进展，具体见表 3-17。

表 3-17 动物其他病毒植物疫苗

| 病原体   | 抗原    | 表达生产体系  | 表达量                                  | 免疫效果                               | 参考文献                                       |
|---|-------|---|--------------------------------------|------------------------------------|--|
| 牛疱疹病毒 1 型<br>(bovine herpesvirus type 1)        | 糖蛋白 D | 烟草花叶病毒 ( tobacco mosaic virus )<br>多肽表达系统<br>接种烟草 | 20 $\mu\text{g/g}$ FW                | 注射免疫小鼠能产生免疫反应，提高了牛对病毒的抗性           | Perez Filgueira 等，2003                     |
| 牛瘟病毒<br>(rinderpest virus)                      | 血凝素蛋白 | 转基因木豆<br><br>转基因花生                                | 0.49% TSP<br><br>0.5% TSP            | 未报道<br><br>口服或静脉注射免疫小鸡能产生免疫应答和中和抗体 | Satyavathi 等，2003<br><br>Khandelwal 等，2004 |
| 禽传染性支气管炎病毒<br>(infectious bronchitis virus)     | S 糖蛋白 | 转基因马铃薯  | 0.22% TSP<br>2.53 $\mu\text{g/g}$ FW | 口服或静脉注射免疫小鸡能产生免疫应答和中和抗体            | Zhou 等，2003，<br>Zhou 等，2004                |
| 鸡传染性法氏囊病病毒<br>(infectious bursal disease virus) | VP2   | 转基因拟南芥  | 4.8% TSP                             | 口服免疫小鸡能产生免疫保护                      | Wu 等，2004                                  |
| 貂肠炎病毒<br>(mink enteritis virus)                 | VP2   | 豇豆花叶病毒 ( cowpea mosaic virus )<br>抗原展示系统<br>转染豇豆  | 1 200 $\mu\text{g/g}$ FW             | 静脉注射免疫貂能产生免疫应答和保护                  | Dalsgaard 等，1997                           |

## 第五节 植物疫苗研究存在的问题

### (一) 抗原蛋白的表达量和稳定性

近年来虽然有相当多的植物疫苗研究方面的报道，但真正能进入产业化及普及化使用仍有相当大的差距。主要原因之一是抗原蛋白表达量不足。目前最需要的仍是提高疫苗的表达量以及稳定性。有效口服疫苗的剂量往往必须是注射疫苗的1 000倍，因此，研究人员除了不断优化转基因系统来提高蛋白表达量以及稳定性外，使用植物病毒载体或叶绿体表达系统进行疫苗的研究有明显增加的趋势。除了表达系统的选择外，也可以使用常规育种技术等方式帮助解决一些问题。所以，在整体的研发上须多元化的应用与合作，以达到最大的效益。

### (二) 免疫有效性

口服疫苗接种有时不但不会诱发机体的保护性免疫反应，相反还会引起免疫耐受或变态反应。因此，必须确定口服疫苗是起诱导作用还是抑制作用，以便确定转基因植物口服疫苗的服用有效剂量和时间，使抗原含量控制在既能激发免疫反应，又不会致病。

### (三) 受体植物的选择

在已研究的受体植物中，以烟草、马铃薯为最多。主要是因为它们遗传操作较容易，但烟草含有有毒生物碱，马铃薯不宜生食，而且加热易使抗原蛋白变性，所以，它们都不是理想的转基因植物口服疫苗受体植物。最终的口服疫苗应该在果蔬或饲料作物中生产，并且要有以下两个特点：①能在未经烹煮的状态下使用。避免烹煮过程中蛋白质变性；②具有较高的蛋白质含量，能大量表达转入的抗原基因。

### (四) 生物安全性问题

在研究植物疫苗的同时，我们仍需要考虑对环境、人或动物可能造成的不良影响。毕竟转基因植物或重组病毒不属于自然环境。环境方面，由于植物疫苗在作物中所占的比例极小，所以，可以建立一个良好的生产供给流程的封闭系统和一套评估风险模型，以防止疫苗或遗传物质流入生态链。在评估其对人或动物的免疫有效性方面，需要植物学界与医学界的共同参与，对有可能产生的过敏原性以及毒性等反应、营养价值以及对其他生物的影响等多方位进行评估。这些都需要利用动物和一些模式生物进行谨慎周密的大量的探索性科学研究，以建立和不断完善一套科学的有效性和安全性评价体系。在美国，美国农业部(USDA)及食品和药品管理局(FDA)统筹植物药物的管理。USDA规定转基因植物表达药物的定位和防范，FDA确保质量保证(QA)和质量控制(QC)。FDA保证在生产和原料的准备中保持QA和QC标准，以确保人用的安全和有效。FDA还通过分阶段进行的临床试验监测确定加工植物药物的相对危险性，以颁发生产许可。最近，FDA发布了植物药物生产的第一部规程草案。

## 参 考 文 献

- [1] Arakawa T, Chong DKX, Merritt JL, et al. Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Research*, 1997, 6: 403~413
- [2] Arakawa T, Yu J and Langridge W H R. Synthesis of a cholera toxin B subunitrotavirus NSP4 fusion protein in potato. *Plant Cell Rep*, 2001, 20: 343~348
- [3] Ashraf S, Singh P K, Yadav D K, et al. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *J Biotechnol*, 2005, 119(1): 1~14
- [4] Attar A K E, Shamloul A M, Shalaby A A, et al. Expression of chimeric HCV peptide in transgenic tobacco plants infected with recombinant alfalfa mosaic virus for development of a plant - derived vaccine against HCV. *African J Biotechnol*, 2004, 3(11): 588~594
- [5] Aziz MA, Singh S, Anand Kumar P, et al. Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2002, 299: 345~351
- [6] Aziz MA, Sikriwal D, Singh S, et al. Transformation of an edible crop with the pagA gene of *Bacillus anthracis*. *FASEB J*, 2005, 19: 1501~1503
- [7] Beachy R N, Fitchen J H, Hein M B. Use of plant viruses for deliery of vaccine epitopes. *Ann. NY Acad. Sci*, 1996, 792: 43~49
- [8] Bae JL, Lee JG, Kang TJ, et al. Induction of antigenspecific systemic and mucosal immune responses by feeding animals transgenic plants expressing the antigen. *Vaccine*, 2003, 21: 4052~4058
- [9] Belanger H, Fleysh N, Cox S, et al. Human respiratory syncytial virus vaccine antigen produced in plants. *FASEB J*, 2000, 14(14): 2323~2328
- [10] Berinstein A, Vazquez - Rovere C, Asurmendi S. Mucosal and systemic immunization elicited by Newcastle disease virus (NDV) transgenic plants as antigens. *Vaccine*, 2005, 23 (48 ~ 49): 5583~5589
- [11] Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, et al. Production of human papillomavirus type 16 virus - like particles in transgenic plants. *J Virol*, 2003, 77(17): 9211~9220
- [12] Birch - Machin I, Newell CA, Hibberd JM. Accumulation of rotavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability. *Plant Biotechnol J*, 2004, 2: 261~270
- [13] Bouche F B, Steinmetz A, Yanagi Y, et al. Induction of broadly neutralizing antibodies against measles virus mutants using a polyepitope vaccine strategy. *Vaccine*, 2005, 23(17~18): 2074~2077
- [14] Bouche F B, Marquet - Blouin E, Yanagi Y, et al. Neutralising immunogenicity of a polyepitope antigen expressed in a transgenic food plant: a novel antigen to protect against measles. *Vaccine*, 2003, 21(17~18): 2065~2072
- [15] Brennan FR, Gilleland LB, Staczek J, et al. A chimaeric plant virus vaccine protects mice against a bacterial infection. *Microbiology*, 1999, 145: 2061~2067
- [16] Brennan FR, Jones TD, Longstaff M, et al. Immunogenicity of peptides derived from a fibronectin - binding protein of *S. aureus* expressed on two different plant viruses. *Vaccine*, 1999, 17: 1846~1857
- [17] Brigati C, Giacca M, Noonan D M, et al. HIV Tat, its targets and the control of viral gene expression. *FEMS Micro - biol. Lett*, 2003, 220: 57~65

- [18] Brodzik R, Bandurska K, Dekka D, et al. Advances in alfalfa mosaic virus - mediated expression of anthrax antigen in planta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 338: 717~722
- [19] Carrillo C, Wigdorovitz A, Oliveros JC, et al. Protective immune response to foot - and - mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *J Virol.*, 1998, 72(2): 1688~1690
- [20] Carrillo C, Wigdorovitz A, Trono K, et al. Induction of a virus - specific antibody response to foot and mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants. *Viral Immunology*, 2001, 14: 49~57
- [21] Castanon S, Marin MS, Martin - Alonso JM, et al. Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J Virol.*, 1999, 73(5): 4452~4455
- [22] Chargelegue D, Drake PM, Obregon P, et al. Highly immunogenic and protective recombinant vaccine candidate expressed in transgenic plants. *Infect Immun.*, 2005, 73(9): 5915~5922
- [23] Chikwamba R, Cunnick J, Hathaway D, et al. A functional antigen in a practical crop: LT - B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Research*, 2002a, 11: 479~493
- [24] Chikwamba R, McMurray J, Shou H, et al. Expression of a synthetic *E. coli* heat labile enterotoxin B sub unit(LT B) in maize. *Molecular Breeding*, 2002, 10: 253~265
- [25] Chung I S, Kim C H, Kim K I, et al. Production of recombinant rotavirus VP6 from a suspension culture of transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. ) cells. *Biotechnol Lett.*, 2000, 22: 251~255
- [26] Dalsgaard K, Uttenthal A, Jones TD, et al. Plant - derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nature Biotechnol.*, 1997, 15: 248~252
- [27] Daniell H, Lee S, Panchal T. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Molecular Biology*, 2001, 311: 1001~1009
- [28] Delves PJ, Roitt IM. The immune system. *N Engl J Med.*, 2000, 343: 108
- [29] Dong J L, Liang B G, Jin Y S, et al. Oral immunization with pBsVP6 - transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology*, 2005, 339(2): 153~163
- [30] Dus Santos MJ, Wigdorovitz A. Expression of foot and mouth disease virus antigens in transgenic plants. *Rev Sci Tech.*, 2005, 24(1): 175~187
- [31] Dus Santos MJ, Wigdorovitz A, Trono K, et al. A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus(FMDV)peptide - based vaccine in transgenic plants. *Vaccine*, 2002, 20(7~8): 1141~1147
- [32] Fernandez - Fernandez MR, Martinez - Torrecuadrada JL, Casal JI. Development of an antigen presentation system based on plum pox potyvirus. *FFEB Letters.*, 1998, 427: 229~235
- [33] Fernandez - Fernandez MR, Mourino M, et al. Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus - based vector. *Virology*, 2001, 280(2): 283~291
- [34] Franconi R, Massa S, Illiano E, et al. Exploiting the plant secretory pathway to improve the anticancer activity of a plant - derived HPV16 E7 vaccine. *Int J Immunopathol Pharmacol.*, 2006, 19(1): 187~197
- [35] Franconi R, Di Bonito P, Dibello F, et al. Plant - derived human papillomavirus 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection. *Cancer Res.*, 2002, 62(13): 3654~3658
- [36] Gao Y, Ma Y, Li M, et al. Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing

- HBsAg. *World J Gastroenterol*, 2003, 9: 996~1002
- [37] Gil F, Brun A, Wigdorovitz A, et al. High - yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants. *FEBS Lett*, 2001, 488(1~2): 13~17
- [38] Gilleland HE, Gilleland LB, Staczek J, et al. Chimeric animal and plant viruses expressing epitopes of outer membrane protein F as a combined vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *FEMS Immunol and MedicalMicrobiol*, 2000, 27: 291~297
- [39] Gomez N, Wigdorovitz A, Castanon S, et al. Oral immunogenicity of the plant derived spike protein from swine - transmissible gastroenteritis coronavirus. *Arch Virol*, 2000, 145(8): 1725~1732
- [40] Gomez N, Carrillo C, Salinas J, et al. Expression of immunogenic glycoprotein S polypeptides from transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants. *Virology*, 1998, 249(2): 352~358
- [41] Gu Q, Han N, Liu J, et al. Cloning of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene and its expression in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. ). *Plant Cell Reports*, 2005(24): 532~539
- [42] Haq TA, Mason HS, Clements JD et al. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*, 1995, 268: 714~716
- [43] Horn M E, Pappu K M, Bailey M R, et al. Advantageous features of plant - based systems for the development of HIV vaccines. *J Drug Target*, 2003, 11(8~10): 539~545
- [44] Hu R, Wei H, Chen SC, et al. Construction of the plant expression vector with hepatitis a capsid protein fusion gene and genetic transformation of *Citrus Sinensis* Osbeck. *Yi Chuan*, 2004, 26(4): 425~431
- [45] Huang Z, Dry I, Webster D, et al. Plant - derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*, 2001, 19(15~16): 2163 - 2171
- [46] Huang Y, Liang W, Pan A, et al. Production of FaeG, the Major Subunit of K88 Fimbriae, in Transgenic Tobacco Plants and Its Immunogenicity in Mice. *Infection and Immunity*, 2003, 71: 5436~5439
- [47] Huang Y, Liang W, Wang Y, et al. Immunogenicity of the epitope of the foot - and - mouth disease virus fused with a hepatitis B core protein as expressed in transgenic tobacco. *Viral Immunol*, 2005, 18(4): 668~677
- [48] Huang Z, Elkin G, Maloney BJ, et al. Virus - like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. *Vaccine*, 2005, 23(15): 1851~1858
- [49] Huang Z, Santi L, LePore K, et al. Rapid high - level production of hepatitis B core antigen in plant leaf and its immunogenicity in mice. *Vaccine*, 2006, 24(14): 2506~2513
- [50] Jani D, Meena LS, Rizwan - Ul - Haq QM, et al. Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. *Transgenic Research*, 2002, 11: 447~475
- [51] Jani D, Singh NK, Bhattacharya S, et al. Studies on the immunogenic potential of plant - expressed cholera toxin B subunit. *Plant Cell Reports*, 2004, 22: 471~477
- [52] Joelson T, Aakerblom L, Oxelfelt P, et al. Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus. *J Gen Virol*, 1997, 78( 6): 1213~1217
- [53] Joensuu JJ, Kotiaho M, Riipi T, Snoeck V, et al. *Transgenic Research*, 2004, 13: 295
- [54] Joensuu JJ, Kotiaho M, Teeri TH, et al. *Transgenic Research*. , 2006
- [55] Joensuu JJ, Verdonck F, Ehrström A, et al. *Vaccine*, 2006, 24: 2387
- [56] Joung YH, Youm JW, Jeon JH, et al. Expression of the hepatitis B surface S and preS2 antigens in tubers of *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Rep*, 2004, 22(12): 925~930



- [57] Judge NA, Mason HS and O' Brien AD et al. Plant cell - based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of Escherichia coli O157: H7 shedding in feces. *Infection and Immunity*, 2004, 72: 168~175
- [58] Kang T, Loc N, Jang M. Modification of the cholera toxin B subunit coding sequence to enhance expression in plants. *Molecular Breeding*, 2004, 13: 143~153
- [59] Kang T, Kim Y, Jang Y, et al. Expression of the synthetic neutralizing epitope gene of porcine epidemic diarrhea virus in tobacco plants without nicotine. *Vaccine*, 2005, 23: 2294~2297
- [60] Kang T, Han S, Kim M, et al. Expression of non - toxic mutant of Escherichia coli heat - labile enterotoxin in tobacco chloroplasts. *Protein Expression and Purification*, 2004, 38: 123~128
- [61] Kang TJ, Kang KH, Kim JA, et al. A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide - based vaccine in transgenic plants. *Protein Expr Purif*, 2004, 38(1): 129~135
- [62] Kang TJ, Kim YS, Jang YS, et al. Expression of the synthetic neutralizing epitope gene of porcine epidemic diarrhea virus in tobacco plants without nicotine. *Vaccine*, 2005, 23(17~18): 2294~2297
- [63] Kang TJ, Seo JE, Kim DH, et al. Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants. *Protein Expr Purif*, 2005, 41(2): 378~383
- [64] Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, et al. A plant - derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J*, 1999, 13(13): 1796~1799
- [65] Karasev A, Foulke S, Wellens C, et al. Plant based HIV - 1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach. *Vaccine*, 2005, 23: 1875~1880
- [66] Kaufman DL, Clare - Saizier M, Tian J, et al. Spontaneous loss of T - cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin - dependent diabetes. *Nature*, 1993, 366: 69
- [67] Khandelwal A, Renukaradhya GJ, Rajasekhar M, et al. Systemic and oral immunogenicity of hemagglutinin protein of rinderpest virus expressed by transgenic peanut plants in a mouse model. *Virology*, 2004, 323: 284~291
- [68] Kim CH, Kim KI, Hong SH, et al. Improved production of recombinant rotavirus VP6 in sodium butyrate - supplemented suspension cultures of transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cells. *Biotechnol Lett*, 2001, 23: 1061~1066
- [69] Kim TG, Gruber A, Langridge W H. HIV - 1 gp120 V3 cholera toxin B subunit fusion gene expression in transgenic potato. *Protein Expr Purif*, 2004, 37 (1): 196~202
- [70] Kim TG, Langridge W H. Synthesis of an HIV - 1 Tat transduction domain - rotavirus enterotoxin fusion protein in transgenic potato. *Plant Cell Rep*, 2004, 22: 382~387
- [71] Kim TG, Ruprecht R, Langridge WH. Synthesis and assembly of a cholera toxin B subunit SHIV 89.6p Tat fusion protein in trans - genic potato. *Protein Expr. Purif*, 2004, 35: 313~319
- [72] Kim TG, Gruber A, Ruprecht R M, et al. Synthesis and Gag p27 capsid protein cholera toxin B assembly of SIVmac subunit fusion protein in transgenic potato. *Mol. Biotechnol*, 2004, 28: 33~40
- [73] Kim TG, Ruprecht R, Langridge W H. SIVmac Gag p27 capsid protein gene expression in potato. *Protein Expr. Purif*, 2004, 36: 312~317
- [74] Kim TG, Galloway DR, Langridge WH. et al. Synthesis and assembly of anthrax lethal factor - cholera toxin B - subunit fusion protein in transgenic potato. *Mol. Biotechnol*, 2004, 28: 175~183
- [75] Kim YS, Kang TJ, Jang YS, et al. Expression of neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus in potato plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2005, 82: 125~130

- [76] Kong Q, Richter L, Yang YF, et al. Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(20): 11539~11544
- [77] Koya V, Moayeri M, Leppla SH, et al. Plant - based vaccine; mice immunized with chloroplast - derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infect. Immun*, 2005, 73: 8266~8274
- [78] Kumar GBS, Ganapathi T R, Revathi C J, et al. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. *Planta*, 2005, 222: 484~493
- [79] Lamphear BJ, Streatfield SJ, Jilka JM, et al. Delivery of subunit vaccines in maize seed. *Control Release*, 2002, 85: 169~180
- [80] Langeveld JPM, Brennan FR, Martinez - Torrecuadrada JL, et al. Inactivated recombinant plant virus protects dogs from a lethal challenge with canine parvovirus. *Vaccine*, 2001, 19: 3661~3670
- [81] Lauterslager TGM, Florack DEA, Van Der Wal TJ, et al. Oral immunisation of naive and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT - B. *Vaccine*, 2001, 19: 2749~2755
- [82] Lee RWH, Strommer J, Hodgins D, et al. Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin 50 fusion protein. *Infection and Immunity*, 2001, 69: 5786~5793
- [83] Lee JY, Yu J, Henderson D et al. Plant - synthesized *E. coli* CFA/I fibrial protein protects Caco - 2 cells from bacterial attachment. *Vaccine*, 2004, 23: 222~231
- [84] Li Y, Sun M, Liu J, et al. High expression of foot - and - mouth disease virus structural protein VP1 in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(4): 329~333
- [85] Liu HL, Li WS, Lei T, et al. Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in transgenic tobacco plants. *Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai)*, 2005, 37(3): 153~158
- [86] Ma Y, Lin SQ, Gao Y, et al. Expression of ORF2 partial gene of hepatitis E virus in tomatoes and immunoactivity of expression products. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(10): 2211~2215
- [87] 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101 (15): 5680~5685
- [88] Ma SW, Zhao DL, Yin ZQ, et al. Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance. *Nat Med*, 1997, 3: 793(7)~796
- [89] Maloney BJ, Takeda N, Suzuki Y, et al. Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. *Vaccine*, 2005, 23(15): 1870~1874
- [90] Marian R, et al. *Cell*, 1996, 86: 345
- [91] Marquet - Blouin E, Bouche F B, Steinmetz A, et al. Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.) - derived measles virus hemagglutinin. *Plant Mol Biol*, 2003, 51(4): 459~469
- [92] Marusic C, Rizza P, Lattanzi L, et al. Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 2001, 75(18): 8434~8439
- [93] Mason H S, Lam D M, Arntzen C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(24): 11745~11749
- [94] Mason HS, Haq TA, Clements JD et al. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat - labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT - B gene. *Vaccine*, 1998, 16:

1336~1343

- [95] Matoba N, Magerus A, Geyer BC, et al. A mucosally targeted subunit vaccine candidate eliciting HIV-1 transcytosis-blocking Abs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2004, 101: 13584~13589
- [96] Matsumura T, Itchoda N, Tsunemitsu H. Production of immunogenic VP6 protein of bovine group A rotavirus in transgenic potato plants. *Arch Virol*, 2002, 147(6): 1263~1270
- [97] Mechtcheriakova IA, Eldarov MA, Nicholson L, et al. The use of viral vectors to produce hepatitis B virus core particles in plants. *J Virol Methods*, 2006, 131(1): 10~15
- [98] McGarvey P B, Hammond J, Dienelt M M, et al. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Nature Biotechnol*, 1995, 13: 1484~1487
- [99] McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, et al. *Vaccine*. 1992, 10: 75
- [100] Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, et al. Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(5): 2481~2485
- [101] Molina A, Hervas-Stubbs S, Daniell H, et al. High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol J*, 2004, 2: 141~153
- [102] Molina A, Veramendi J, Hervas-Stubbs S, et al. Induction of neutralizing antibodies by a tobacco chloroplast-derived vaccine based on a B cell epitope from canine parvovirus. *Virology*, 2005, 342(2): 266~275
- [103] Muller C P, Marquet-Blouin E, Fack F, et al. Immunogenic measles antigens expressed in plants: role as an edible vaccine for adults. *Vaccine*, 2003, 21(7~8): 816~819
- [104] Nicholas BL, Brennan FR, Martinez-Torrecuadrada JL, et al. Characterization of the immune response to canine parvovirus induced by vaccination with chimaeric plant viruses. *Vaccine*, 2002, 20(21~22): 2727~2734
- [105] Natilla A, Piazzolla G, Nuzzaci M, et al. Cucumber mosaic virus as carrier of a hepatitis C virus-derived epitope. *Arch Virol*, 2004, 149(1): 137~154
- [106] Nemchinov L G, Liang T J, Rifaat M M, et al. Development of a plant-derived subunit vaccine candidate against hepatitis C virus. *Arch Virol*, 2000, 145(12): 2557~2573
- [107] Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP. *Cell*, 1996, 86: 345
- [108] Obregon P, Chargeleguel D, Drake P M. W. et al. HIV-1 p24-immunoglobulin fusion molecule: a new strategy for plant-based protein production. *Plant Biotechnol J*, 2006, 4(2): 195~207
- [109] O'Brien GJ, Bryant CJ, Woogd C, et al. Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in *Nicotiana benthamiana* coats PVX rods and also assembles into viruslike particles. *Virology*, 2000, 270: 444~453
- [111] Ooi A, Tan S, Mohamed R, et al. The full-length clone of cucumber green mottle mosaic virus and its application as an expression system for Hepatitis B surface antigen. *J Biotechnol*, 2006, 121(4): 471~481
- [112] Pearay L, Ogra, Howard Faden, Robert C, et al. *Clini Micro Rev*, 2001, 14: 430
- [113] Perez Filgueira DM, Zamorano PI, Dominguez MG, et al. Bovine herpes virus gD protein produced in plants using a recombinant tobacco mosaic virus (TMV) vector possesses authentic antigenicity. *Vaccine*, 2003, 21: 4201~4209
- [114] Perez Filgueira DM, Mozgovej M, et al. Passive protection to bovine rotavirus (BRV) infection induced by a BRV VP8 produced in plants using a TMV-based vector. *Arch Virol*, 2004, 149(12): 2337~2348

- [115] Piazzolla G, Nuzzaci M, Tortorella C, et al. Immunogenic properties of a chimeric plant virus expressing a hepatitis C virus(HCV)- derived epitope: new prospects for an HCV vaccine. *J Clin Immunol*, 2005, 25(2): 142~152
- [116] Piller KJ, Clemente TE, Mu Jun S, et al. Expression and immunogenicity of an Escherichia coli K99 fi mbriae subunit antigen in soybean. *Planta*, 2005, 222: 6~18
- [117] Pogrebnyak N, Golovkin M, Andrianov V, et al. Severe acute respiratory syndrome(SARS)S protein production in plants: development of recombinant vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(25): 9062~9067
- [118] Ruedl C, Wolf H. *Int Arch Allergy Immunol*, 1995, 108: 334
- [119] Richter L, Mason H S, Arntzen C J. Transgenic Plants Created for Oral Immunization Against Diarrheal Diseases. *J Travel Med*, 1996, 3(1): 52~56
- [120] Richter L J, Thanavala Y, Arntzen C J, et al. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(11): 1167~1171
- [121] Sandhu J S, Krasnyanski S F, Domier L L, et al. Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus - F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Res*, 2000, 9(2): 127~135
- [122] Satyavathi VV, Prasad V, khandelwal A, et al. Expression of hemagglutinin protein of Rinderpest virus in transgenic pigeon pea[Cajanus cajan(L.) Millsp.]plants. *Plant Cell Reports*, 2003, 21: 651~658
- [123] Shchelkunov SN, Salyaev RK, Pozdnyakov SG, et al. Immunogenicity of a novel, bivalent, plant-based oral vaccine against hepatitis B and human immunodeficiency viruses. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(13): 959~967
- [124] Shchelkunov SN, Salyaev RK, Rekoslavskaya NI, et al. Study of immunogenic properties of the candidate edible vaccine against human immunodeficiency and hepatitis B viruses based on transgenic tomato fruits. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2005, 401: 167~169
- [125] Sheikh NA, al-Shamisi M, Morrow WJ. *Curr Opin Mol Ther*, 2000, 2: 37
- [126] Shchelkunov SN, Salyaev RK, Ryzhova TS, et al. Designing of a candidate edible vaccine against hepatitis B and HIV on the basis of a transgenic tomato. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 2004, 11: 50~55
- [127] Shulga NY, Rukavtsova EB, Krymsky MA, et al. Expression and characterization of hepatitis B surface antigen in transgenic potato plants. *Biochemistry(Mosc)*, 2004, 69(10): 1158~1164
- [128] Smith ML, Keegan ME, Mason HS, et al. Factors important in the extraction, stability and in vitro assembly of the hepatitis B surface antigen derived from recombinant plant systems. *Biotechnol Prog*, 2002, 18(3): 538~550
- [129] Sojikul P, Buehner N, Mason HS. A plant signal peptide - hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(5): 2209~2214
- [130] Staczek J, Bendahmane M, Gilleland LB, et al. mosaic virus containing an epitope of outer membrane protein F of Pseudomonas aeruginosa provides protection against challenge with P. aeruginosa. *Vaccine*, 2000, 18: 2266~2274
- [131] Streatfield SJ and Howard JA. Plant-based vaccines. *International J Parasitol*, 2003b, 33: 479~493

- [132] Streatfield SJ and Howard JA. Plant - based vaccines. *International J Parasitology*, 2003, 33: 479~493
- [133] Streatfield SJ, Jilka JM, Hood EE, et al. Plant - based vaccines; Unique advantages. *Vaccine*, 2001, 19: 2742~2748
- [134] Streatfield SJ, Lane JR, Brooks CA, et al. Corn as a production system for human and animal vaccines. *Vaccine*, 2003, 21: 812~815
- [135] Sugiyama Y, Hamamoto H, Takemoto S, et al. Systemic production of foreign peptides on the particle surface of tobacco mosaic virus. *FEBS Lett*, 1995, 359(2~3): 247~270
- [136] Sussman HE. Spinach makes a safer anthrax vaccine. *Drug Discov Today*, 2003, 8(10): 428~430
- [137] Streatfield SJ, Jilka JM, Hood EE, et al. Plant - based vaccines; Unique advantages. *Vaccine*, 2001, 19: 2742~2748
- [138] Smart V, Foster PS, Rothenberg ME, et al. A plant - based allergy vaccine suppresses experimental asthma via an IFN - gamma and CD4 + CD45RBlow T cell - dependent mechanism. *J Immunol*, 2003, 171(4): 2116~2126
- [139] Tacket C O, Mason H S, Losonsky G, et al. Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis*, 2000, 182(1): 302~305
- [140] Tackaberry E S, Prior F, Bell M, et al. Increased yield of heterologous viral glycoprotein in the seeds of homozygous transgenic tobacco plants cultivated underground. *Genome*, 2003, 46(3): 521~526
- [141] Tackaberry E S, Dudani A K, Prior F, et al. Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B(UL55) in seeds of transgenic tobacco. *Vaccine*, 1999, 17(23~24): 3020~3029
- [142] Thanavala Y, Mahoney M, Pal S, et al. Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(9): 3378~3382
- [143] Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, et al. Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(4): 1174~1179
- [144] Tregoning JS, Clare S, Bowe F, et al. Protection against tetanus toxin using a plant - based vaccine. *Eur J Immunol*, 2005, 35(4): 1320~1326
- [145] 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. *Phytochemistry*, 2004, 65(8): 989~994
- [146] Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, et al. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nature Medicine*, 1998, 4: 607~609
- [147] Takagi H, Hiroi T, Yang L, et al. A rice - based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2 - mediated IgE responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(48): 17525~17530
- [148] Tacket CO, Pasetti MF, Edelman R, et al. Immunogenicity of recombinant LT - B delivered orally to humans in transgenic corn. *Vaccine*, 2004, 22: 4385~4389
- [149] Tuboly T, Yu W, Bailey A, et al. Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine*, 2000, 18: 2023~2028
- [150] Usha R, Rohll JB, Spall V, et al. Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology*, 1993, 197: 366~376



- [151] Varsani A, Williamson AL, Rose RC, et al. Expression of Human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Arch Virol*, 2003, 148(9): 1771~1786
- [152] Verch T, Hooper DC, Kiyatkin A, et al. Immunization with a plant - produced colorectal cancer antigen. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(2): 92~99
- [153] Vieira da Silva J, Garcia AB, Vieira Flores VM, et al. Phytosecretion of enteropathogenic *Escherichia coli* pilin subunit A in transgenic tobacco and its suitability for early life vaccinology. *Vaccine*, 2002, 20: 2091~2101
- [154] Wagner B, Hufnagl K, Radauer C, et al. Expression of the B subunit of the heat - labile enterotoxin of *Escherichia coli* in tobacco mosaic virus - infected *Nicotiana benthamiana* plants and its characterization as mucosal immunogen and adjuvant. *J Immunol Methods*, 2004, 287(1~2): 203~215
- [155] Warzecha H, Mason HS, Lane C, et al. Oral immunogenicity of human papillomavirus - like particles expressed in potato. *J Virol*, 2003, 77(16): 8702~8711
- [156] Walmsley AM, Alvarez ML, Jin Y, et al. Expression of the B subunit of *Escherichia coli* heat - labile enterotoxin as a fusion protein in transgenic tomato. *Plant Cell Reports*, 2003, 21: 1020~1026
- [157] Watson J, Koya V, Leppa SH, et al. Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a non - food/feed crop. *Vaccine*, 2004, 22, 4374~4384
- [158] Webster D E, Cooney M L, Huang Z, et al. Successful boosting of a DNA measles immunization with an oral plant - derived measles virus vaccine. *J Virol*, 2002, 76 (15): 7910~7912
- [159] Webster D E, Thomas M C, Huang Z, et al. The development of a plant - based vaccine for measles. *Vaccine*, 2005, 23(15): 1859~1865
- [160] Webster DE, Thomas MC, Pickering R, et al. Is there a role for plant - made vaccines in the prevention of HIV/AIDS? *Immunol Cell Biol*, 2005, 83(3): 239~247
- [161] Webster D E, Smith S D, Pickering RJ, et al. Measles virus hemagglutinin protein expressed in transgenic lettuce induces neutralising antibodies in mice following mucosal vaccination. *Vaccine*, 2006, 24(17): 3538~3544
- [162] Wu H, Singh NK, Locy RD, et al. Immunization of chickens with VP2 protein of infectious bursal disease virus expressed in *Arabidopsis thaliana*. *Avian Diseases*, 2004, 48: 663~668
- [163] Wu Y Z, Li J T, Mou Z R, et al. Oral immunization with rotavirus VP7 expressed in transgenic potatoes induced high titers of mucosal neutralizing IgA. *Virology*, 2003, 313(2): 337~342
- [164] Wigdorovitz A, Mozgovoij M, Santos MJ, et al. Protective lactogenic immunity conferred by an edible peptide vaccine to bovine rotavirus produced in transgenic plants. *J Gen Virol*, 2004, 85(7): 1825~1832
- [165] Wigdorovitz A, Perez Figueira DM, Robertson N, et al. Protection of mice against challenge with foot and mouth disease virus(FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1. *Virology*, 1999, 264: 85~91
- [166] Wright K E, Prior F, Sardana R, et al. Sorting of glycoprotein B from human cytomegalovirus to protein storage vesicles in seeds of transgenic tobacco. *Transgenic Res*, 2001, 10(2): 177~181
- [167] Yang ZQ, Liu QQ, Yu HX, et al. Expression and immunization testing of fusion protein of Newcastle disease virus in leaf tissue of transgenic rice. *Yi Chuan Xue Bao*, 2005, 32(12): 1305~1311
- [168] Yu J and Langridge W H R. A plant - based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nature Biotechnol*, 2001, 19: 548~552

- [169] Yu J and Langridge W H R. Expression of rotavirus capsid protein VP6 in transgenic potato and its oral immunogenicity in mice. *Transgenic Research*, 2003, 12: 163~169
- [170] Yusibov V, Modelska A, Steplewski K, et al. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV - 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(11): 5784~5788
- [171] Yusibov V, Hooper D C, Spitsin S V, et al. Expression in plants and immunogenicity of plant virus -based experimental rabies vaccine. *Vaccine*, 2002, 20(25~26): 3155~3164
- [172] Yusibov V, Mett V, Mett V, et al. Peptide - based candidate vaccine against respiratory syncytial virus. *Vaccine*, 2005, 23(17~18): 2261~2265
- [173] Yusibov V, Modelska A, Steplewski K, et al. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV - 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(11): 5784~5788
- [174] Zhang G G, Rodrigues L, Rovinski B, et al. Production of HIV - 1 p24 protein in transgenic tobacco plants. *Mol Biotechnol*, 2002, 20(2): 131~136
- [175] Zhang G, Leung C, Murdin L, et al. In planta expression of HIV - 1 p24 protein using an RNA plant virus - based expression vector. *Mol Biotechnol*, 2000, 14(2): 99~107
- [176] Zhao Y, Hammond RW. Development of a candidate vaccine for Newcastle disease virus by epitope display in the Cucumber mosaic virus capsid protein. *Biotechnol Lett*, 2005, 27(6): 375~382
- [177] Zhou J, Wu J, Cheng L, et al. Expression of immunogenic S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus in transgenic potatoes. *J Virol*, 2003, 77: 9090~9093
- [178] Zhou JY, Cheng LQ, Zheng XJ, et al. Generation of the transgenic potato expressing full - length spike protein of infectious bronchitis virus. *J Biotechnol*, 2004, 111: 121~130
- [179] Zhou YX, Lee MY, Ng JM, et al. A truncated hepatitis E virus ORF2 protein expressed in tobacco plastids is immunogenic in mice. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(2): 306~312
- [180] Ziauddin A, Lee RWH, Lo R, et al. Transformation of alfalfa with a bacterial fusion gene, *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin50 - gfp: Response with *Agrobacterium tumefaciens* strains LBA4404 and C58. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2004, 79: 271~278

## 第四章 转基因植物生产蛋白质和多肽

### 第一节 国内外在该领域的研究现状及发展趋势

20 世纪 90 年代以来,随着植物转基因技术的成熟,以植物为“生物反应器”的应用在逐步兴起。以植物为生物反应器有廉价的原料——阳光、大气、土壤和大规模生产的优势。目前,植物为生物反应器主要是用来生产工业酶,如饲料中用的植酸酶和精细化学品、药品等。但越来越多的研究已投入大宗化学品的生产,如维生素 C 和生物材料。可以预见的是,随着更多的植物内合成途径(和相关的基因和蛋白质酶)被解密,以植物作为生物反应器的应用将越来越普遍。这同时将对农业的产业升级有深远的影响。

1988 年有人用干扰素在芜菁上表达,目的是检验人干扰素的出现是否能抑制病毒感染(D exoeten 等,1998)。尽管结果是否定的,但实验在偶然中揭示了植物可用于生产具有药用功能的外源蛋白质。其他利用植物生产有用蛋白质的例子不少,比如用马铃薯和烟草生产人血清蛋白(Sijmons 等,1990)、用烟草生产 $\alpha$ -直链淀粉(Pen 等,1992)等。迄今为止,利用植物作为生物反应器生产的重要药物有人血清蛋白、表皮生长因子、脑啡肽、干扰素、促红细胞生成素、生长激素、单克隆抗体等。而且 Prodigene 公司利用玉米作为植物生物反应器生产的抗生物素蛋白、胰岛素、 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶,目前已进入市场(Hood 等,1997; Witcher 等,1998; Woodard 等,2003),虽然还未商品化,但已经显示出巨大的市场潜力。

利用植物生物反应器生产药物将成为 21 世纪利润率最高的生物医药产业。自 20 世纪 80 年代以来,仅美、日两国开发的生物技术新药就达 224 种,其中美国 107 种,日本 117 种。提供用于制造肥皂的月杜酸的孟山都公司是一个传统的化工企业,经过自我改革,目前已成为一个生命科学公司。自 1993 年以来,孟山都公司已在生物和基因科学领域投入了 66 亿美元,1995—1998 年孟山都公司的股票价格上涨了 5 倍。某些生物技术药品开始逐渐取代一些传统药品,1998 年抗艾滋病病毒蛋白酶抑制剂 Viracept 的销售额已超过了其竞争药品 Crixivan。Viracept 现已占蛋白酶抑制剂 10 亿美元市场份额的 40%。

基因科学的发展对化学工业变革的推动比制药工业更加迅猛,模拟生命过程的生物反应器在酶工程和发酵工程中应运而生。近年来,化学工业有 20% 被生物反应器所取代,其设备投资减少 80%,能耗降低 50%。据美国能源部报告,通用的 50 多种化工原料已有 19 种可以由植物生产。

目前,我国在利用植物生物反应器生产药物方面的研究滞后于发达国家,在植物生物反应器生产药物研究方面的立项课题较少。“九五”期间,国家“863”高技术发展计划资助了两项研究课题:①利用转基因植物生产乙型肝炎口服疫苗。该项研究取得了很好的进展,已在马铃薯和番茄中成功地表达了乙型肝炎病毒膜中蛋白抗原。②植物病毒(TMV)表达载体系统构建。今后的发展方向:研究和开发能有效预防常见病、多发病等疾病的廉

价、安全、使用方便的口服疫苗，以及对某些疾病具有特殊疗效而常规传统药物无效的新型生物技术药物。这将为保障人们的健康水平发挥积极而重要的作用。

## 第二节 生产蛋白质和多肽的方法

自 20 世纪 90 年代初进行的转基因植物研究，经过近 10 年的努力已取得很大进展。转基因植物生产蛋白质和多肽主要有 3 种方式：一是将外源药用蛋白基因稳定地整合到植物基因组中得到，其中农杆菌介导法应用比较普遍，该方法虽然费时，但一旦成功即可大规模放大；二是用病毒作为载体在寄主植物中瞬时表达，一般用作疫苗和亚单位疫苗；三是采用植物叶绿体高效表达系统。

### 一、农杆菌等介导的核转化系统

目前，研究成功的转基因植物药用蛋白中，有 80% 是由农杆菌介导形成的转基因植物表达系统生产。在农杆菌介导表达含两条或多条肽链组成复杂蛋白（如抗体）时，将不同的肽链分别导入不同的植株，再将表达不同肽链的转基因植株通过有性杂交，杂交 F1 代中有同时含复杂蛋白所有亚单位株系，用此株系进行稳定的表达系统，或是构建不同启动子控制的植物双边界表达载体，一次转化得稳定表达株系。如，1989—1990 年 Hiatt 等巧妙地利用农杆菌介导方法获得分别表达重链和轻链蛋白的转基因植物，再通过杂交的方法解决了重链和轻链同时表达并组装成抗体。从杂交植物中产生的抗体占整个可溶性蛋白的 1%。

基因枪是用金粉将载体颗粒包埋，在高压气流的作用下将颗粒导入细胞，目的基因与核或质体基因组整合的过程。农杆菌对单子叶植物转化率低，因此单子叶植物一般采用基因枪转化的方法。与农杆菌介导表达复杂蛋白相比，基因枪可以一次将含不同基因的片段同时导入同一细胞中，通过筛选获得转基因株系。目前基因枪法实现了多种谷物叶绿体和线粒体基因的转化。

### 二、植物农杆菌渗透及病毒瞬时高效表达系统

#### （一）农杆菌真空渗透瞬时表达系统

此系统是用重组了目的基因的农杆菌通过真空渗透的方式侵染植物的叶片，随农杆菌的增殖与生长在短时间内表达大量的目的蛋白（Kapila 等，1997）。

此系统一般用在进行核转化、建立稳定的表达系统之前，检测构建载体的可行性、受体植物的代谢情况、产物的量和活性等，不进行大规模生产使用。也有用此系统进行规模化生产的报道。如 Voinne 等（2003）发现，通过农杆菌真空渗透法瞬时表达的宿主在几天后发生了转基因沉默，他们将目的基因和来自番茄丛生病毒的 p19 蛋白（一种基因沉默的抑制剂）融合表达，几种蛋白的产量提高了 50 倍左右。Medicago 公司的研究者们描

述了怎样在 1 周时间内侵染 7 500 片苜蓿的叶片，达毫克级规模的生产方法 (D'Aous 等, 2001)。

## (二) 植物病毒瞬时表达系统

在植物中生产药用蛋白的另外一条途径是使用基因工程植物病毒作载体，这类载体可瞬时高效表达大量外源蛋白，是农杆菌转化系统等所不能做到的。目前已有十种植物病毒被改造成不同类型的外源蛋白表达载体 (表 4-1)，其中超过 150 多种的蛋白多肽在 TMV 载体中成功表达。利用融合抗原表达策略已生产出含有疟疾动物口蹄疫病毒、鼻病毒及艾滋病毒 (HIV) 抗原决定簇的嵌合外壳蛋白，这类融合蛋白的生产方式将来可能是生产疫苗的一条重要和经济有效的途径。

表 4-1 利用植物表达的外源蛋白

| 药用蛋白                          | 商业应用     | 表达方式                |
|-------------------------------|----------|---------------------|
| 乙肝病毒表面抗原 (HBsAg)              | 疫苗       | 转基因                 |
| 大肠杆菌热不稳定肠毒素 B 亚基 (LT-B)       | 口服疫苗     | 转基因                 |
| 诺沃克病毒外壳蛋白 (Norwalkvirus)      | 口服疫苗     | 转基因                 |
| 盖氏 13 单克隆抗体 (Guys. 13mAb)     | 预防龋齿     | 转基因                 |
| 谷氨酸脱羧酶 (GAD)                  | 预防糖尿病    | 转基因                 |
| 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)        | 预防感染     | 转基因                 |
| Leu-脑啡肽 (Leu-enkephalin)      | 镇痛       | 转基因                 |
| 水蛭素 (hirudin)                 | 凝血酶抑制因子  | 转基因                 |
| 表皮生长因子 (EGF)                  | 刺激上皮细胞分裂 | 转基因                 |
| 促红细胞生成素 (EPO)                 | 调节红细胞水平  | 转基因                 |
| 虹鳟生长激素 (growthhormone)        | 刺激生长     | 转基因                 |
| 人血清白蛋白 (humanserumalbumin)    | 血浆成分     | 转基因                 |
| 人干扰素 (HIFN-A-D)               | 抗病毒      | CaMC <sup>(1)</sup> |
| A-天花粉蛋白 (A-trichosantin)      | 抑制艾滋病病毒  | TMV <sup>(2)</sup>  |
| 血管紧张肽转化酶抑制剂 (ACEI)            | 抗过敏反应    | TMV                 |
| 流感病毒血凝素 (influenzavirus HA) & | 疫苗       | TMV                 |
| 艾滋病毒抗原 (HIV-1gp120)           |          |                     |
| 疟疾抗原                          | 疫苗       | TMV                 |
| 口蹄疫病毒抗原 (FMDV-VP1) &          | 疫苗       | CPMV <sup>(3)</sup> |
| 鼻病毒抗原 (HRV-14)                |          |                     |
| 水貂肠炎病毒抗原 (MEV-VP2)            |          | CPMV                |
| 犬细小病毒抗原 (CPV-CP-VP2)          | 疫苗       | PPV <sup>(4)</sup>  |

注: (1) CaMV 为花椰菜花叶病毒表达载体; (2) TMV 为烟草花叶病毒表达载体; (3) CPMV 为豇豆花叶病毒表达载体; (4) PPV 为李痘病毒表达载体。



常用的植物病毒载体包括烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus)、番茄丛矮病毒 (tomato bushy stunt virus)、苜蓿花叶病毒 (alfalfa mosaic virus)、马铃薯 X 病毒 (potato virus X) 和豇豆花叶病毒 (cowpea mosaic virus)。1992 年英国的 Agricultural Genetics Company (AGC) 报道他们将口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 和艾滋病病毒 (HIV-1) 表面抗原基因导入豇豆花叶病毒基因组中, 成功地在植物中获得动物疫苗。1998 年, Modelska 等将狂犬病病毒糖蛋白基因克隆到苜蓿花叶病毒外壳蛋白的开放阅读框中, 分别在烟草和菠菜中得到表达。

病毒瞬时表达系统的优点: ①短时间内产生大量的目的蛋白。据研究发现, 在接种后的 5~14 d, 表达水平达每千克鲜重叶片含 5 g 目的蛋白 (细胞总蛋白含量的 50%)。②病毒蛋白超高速的增值。几乎关闭了宿主细胞本身的蛋白合成, 目的蛋白下游提纯的背景简单, 在一定程度上降低了纯化的成本。③产量稳定。2 周时间即可达毫克级的产量, 4~6 个月可达克级的产量。目前, 已用此系统进行了抗体、干扰素、激素和酶类等高价值的蛋白的生产。缺点: ①病毒在高频增殖的情况下, 易产生突变和缺失, 产生的产物氨基酸序列存在差异。②一般不能表达超过 1 kb 的基因片段。③不能同时表达两个或多个蛋白分子, 如全抗体分子, 由轻链和重链组成, 只能单独表达, 再组装。最近, ICON 公司建立一套用农杆菌处理叶片实现一个或多个病毒表达载体组装的系统。在这套系统中, 生长期和生产期分开, 宿主和病毒没有生理上的冲突, 产量可达工业生产的规模。

### 三、植物叶绿体高效表达系统

近期大量研究结果表明, 外源基因可以在叶绿体中得到高效、稳定表达。美国研究学者利用烟草叶绿体成功地表达了有生物学活性的人生长激素, 而且表达量占可溶性蛋白 7.0%。中国农业科学院生物技术研究所叶绿体遗传工程室已分别将甲肝、乙肝抗原融合基因导入烟草和衣藻叶绿体中, 并得表达。在烟草叶绿体中表达人血清白蛋白及耐热性木聚糖酶, 分别占总可溶性蛋白的 11% 和 6% (Fernandez-San 等, 2003; Leelavathi 等, 2003)。生产的生长激素比核基因组的表达高 100 多倍。

目前在叶绿体中表达蛋白的研究主要集中在烟草和 *C. reinhardtii*, 质体基因转化可以在多种现在的主栽品种中进行, 包括胡萝卜和番茄, 通过直接的食用而达到防病和治病的效果, 是植物生物反应器一个最诱人的研究领域。通过基因枪等方法将外源基因导入植物叶绿体中目的基因经同源重组整合到叶绿体功能基因的间隔区中, 外源基因随叶绿体的数目的增加而达到很高的拷贝。没有位置效应, 也不发生基因沉默; 多基因能够同在一个阅读框中同时表达; 重组蛋白在叶绿体中富集, 对宿主细胞的毒性影响小; 不像核基因组转化产生含转基因的花粉, 对环境带来潜在的危害。但叶绿体基因的表达和翻译后的加工模式接近原核表达系统, 如能加二硫键, 适合表达 scFv 抗体等不需其他加工修饰的蛋白和多肽; 而缺乏真核生物某些特有的修饰, 如糖基化等, 不能表达需进行糖基化修饰后组装成具活性的全 mAb 等蛋白。

#### 四、植物细胞悬浮培养系统

经农杆菌介导、基因枪轰击和电击等方法将外源基因导入植物细胞，植物细胞在提供光、水、营养物质、适宜的温度、无菌等条件的情况下，能够像动物细胞一样增殖，产生药用蛋白和多肽，再通过抽提而得终产物的过程，即植物细胞悬浮培养生物反应器（Fischer 等，1999）。与动物细胞培养比较，植物细胞需要的营养物质简单，对培养的条件要求粗放，规模化程度高。从基因到蛋白产物的时间比整株植物稳定表达要短，产物据其分子量大小直接分泌到培养基（ $<60$  ku）或保留在细胞周质（ $>60$  ku）中，下游的提取和纯化简单。但悬浮培养要求一系列的设备和操作娴熟的技术员进行生产，成本较高，适合高价值的药用蛋白和多肽的生产。

目前已有 20 多种药用蛋白通过植物细胞悬浮培养生产，包括抗体及其片段、白介素、促红细胞生成素、人集落细胞刺激因子等（Shadwick 和 Doran，2004）。烟草 BY-2 细胞悬浮仍是目前被广泛应用的植物细胞株。除此以外，还有水稻、大豆、番茄、苜蓿等作物的细胞也在某些公司或研究单位使用。但植物细胞培养通常存在产量低、细胞株中目的基因不稳定等亟需解决的问题。对高产、遗传稳定、易遗传操作的细胞的发现无疑是很重要的。Boehm 等（2005）发现用来自落叶松（*Larix* sp.）和浮萍（*Wolffia* sp.）肉胚胎的细胞进行悬浮细胞培养，不但基因的转化效率高、转基因稳定，而且蛋白的产量高，稳定性好，能成功地分泌表达，易进行大规模的发酵生产。

### 第三节 蛋白质和多肽生产的受体种类

正确地选择某一植物作为药用蛋白和多肽生产的表达受体是一个重要的问题。在选择转基因植物时，应更多地考虑植物基因转化的易操作性，合适的翻译后加工，生长的速度，产物在植物中的可积累性以及复合产物的简单提取和纯化方法等。

#### 一、叶片类作物

烟草作为生产蛋白和多肽受体的历史悠久。因为在烟草中转基因操作和表达简单、可控性高，外源蛋白的产量高，易实现规模化生产，转基因不进入食物链。目前仍是一种使用性最高的表达受体。虽然烟草中含有烟碱等其他有毒的植物碱，但可利用一些低植物碱含量的品种进行生产。

其他用于蛋白和多肽表达的叶类作物还有苜蓿、大豆和生菜等。苜蓿和大豆是豆科植物，有固氮作用，生产上可降低氮肥的施用。苜蓿单位面积干物质产量高，而且一年可收获 9 次，是一种良好的高产受体植物。已经在苜蓿和大豆中成功地表达了多种抗体和 *Aspergillus* 植酸酶等。

在叶片中表达蛋白和多肽时，虽初产物含量高，但产物是在一个液体的环境中生产和保存的，不稳定，终产量低。收获后，叶片必须冷冻或干燥运输，或者立即加工、提取目

的产物，蛋白成分复杂，提纯难度大。还存在表达产物可能会影响受体植物的生长发育，被食草动物食用，或流放进环境中等危险。

## 二、谷物或豆科作物的种子

相对于叶片作物来说，在种子中表达蛋白和多肽的优点是：①保存期长，种子有合适的生化环境提高稳定蛋白和多肽的富集。有研究显示，在常温下，在种子中保存3年的抗体仍有活性（Stoger等，2002）。②种子不含酚类化合物，提高了下游加工的效率。③不被食草动物食用。但产生种子有开花的过程，必须阻止花粉散落发生基因的飘移。

已经有水稻、大麦、玉米、豌豆和大豆等作物的种子用于药物的生产器官。如在玉米中表达了抗生物素酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶和重组抗体，正进一步探索表达产生漆酶、胰岛素等工业酶类。

## 三、水果和蔬菜

在水果和蔬菜的可食器官表达抗体和营养物质的优点是：不因煮熟、加工或只经半加工而引起活性变化，没有下游的提取和纯化成本的消耗，直接食用即可达到治疗和保健的效果。这类水果和蔬菜有马铃薯、番茄、香蕉等。Artsaenko和他的同事探索在马铃薯中表达抗体，De Wilde等（2002）建立大批量生产抗体的平台。马铃薯还用来表达葡聚糖酶、诊断性抗体融合蛋白和人乳蛋白等。

## 四、纤维和油料作物

用纤维和油料作物，如亚麻、棉花和油菜，表达蛋白和多肽的优点在于：产物可作为纤维和油提取后的副产物而回收。但残存的纤维和油影响产物的进一步提纯，只有那些不需要精提的蛋白和多肽才用此受体生产。

## 五、其他形式的表达受体

植物生物反应器的产量不但与目的基因的特性、表达的方式及培养的条件等有关，而且还与受体本身的特性有关。如基因转化的难易程度、生长状况、体内的生化特征、分泌与否等有很大的关系。发现一种性质优良的表达受体对生产和基础研究都很重要。

### （一）植物的根

一般需从受体复杂的生化背景条件下提取药用蛋白是一项高成本且繁琐的工作，极大地限制了转基因植物生产药用蛋白的进程。用转基因植物的器官分泌表达产物到简单的培养基中是一种很好的解决措施。分子的分泌是植物细胞和器官的功能，植物的根尤其如此。根从土壤中吸取营养物质，与根际微生物作用，抵抗多种病原物等，这些功能的完成

都靠根能分泌不同的生物物质（包括蛋白质）进入土壤中来完成。事实上，Borisjuk 和他的同事们（2004）早就提出根分泌表达是一种有效生产重组蛋白的方法，这个方法叫“杀根分泌（rhizosecretion）”。

烟草根生产在液体培养容器中，吸取水和养分，表达目的基因和内质网信号肽融合的重组蛋白，分泌到培养基中。不仅下游的加工容易、成本低，而且提供了一种连续生产、回收目的蛋白的方法。利用转基因烟草的根表达绿色荧光蛋白并分泌到培养基中。

### （二）苔藓、绿藻等低等植物

苔藓、绿藻等低等植物遗传背景和基因操作简单，易进行遗传改造，如通过高频率的同源重组，在较短的时间内产生跟动物细胞完全一致的翻译后修饰加工方式，低蛋白酶活性等适合重组蛋白生产的转基因株系。研究还发现，苔藓、绿藻的个体小，在一个相当于细胞培养的密闭容器中进行整株植物的培养，在无抗生素的条件下遗传稳定性高，产物分泌到培养基中，方便提纯。2003 年 Knäblein J 利用苔藓成功地表达了活性的分泌到培养基中的 VEGF，说明重组蛋白能够在苔藓中正确地进行翻译后修饰和组装。因为同型二聚体蛋白 VEGF 有活性的表达，仅当单体表达达一定水平，单体表达后正确组装，正确组装的单体需经二硫键连接装备成二聚体，二聚体再成功分泌到培养基中。

## 第四节 应用研究

生产医药品和贵重蛋白，由于利用植物生产蛋白具有廉价和简单的优点，各国竞相开展利用植物生产医药品和贵重蛋白质的研究。日本科学家利用烟草花叶病毒在番茄中成功地表达出了降血压药物，从 100 g 番茄可获得 20 mg 的病毒粒子，持续地食用具有降低血压的效果。美国一家生物公司用玉米生产出了抗生物素蛋白和  $\beta$ -葡糖醛酸酶（Gus）。过去这两种产品一直采用独特的生产过程制造，生产成本昂贵。据预测用玉米生产这两种产品的成本将降低 60%~70%。据估计利用植物生产的医药品和生化产品将会陆续上市，是一个具有发展前景和市场潜力的领域。

### 一、抗体及其片段

抗体是一种复杂的糖蛋白，由脊椎动物的免疫系统产生，特异识别和中和抗原。据统计，目前大约有 1 000 多种医用重组抗体正处于全世界不同药物公司的研发阶段，200 多种已经进入临床实验。目前，占医用多肽的 1/4，到 2005 年抗体的需求达到了百万美元的市场。

传统的单克隆抗体（mAbs）来自老鼠，被人的免疫系统识别产生免疫反应，极大地限制了使用。重组技术让低免疫原性，高活性的母乳化或者理想化抗体代替鼠源抗体。在动物细胞、酵母或细菌中生产抗体，不仅成本高，而且规模难达到市场对抗体的需求。抗体工程和植物基因工程的联合发展，导致了在植物中表达各种抗体分子。植物表达重组抗

体提供一种安全、廉价、大规模的方法。

Hiatt 等 (1989) 首先报道了在植物中表达重组抗体 6D4 的研究情况, 证明了植物能够表达全长的具有功能的抗体。Vaquero 等在烟草叶中表达了肿瘤特异性的单链抗体片段 scFvT84.66 和嵌合抗体 T84166/Gs8。Zeitlin 等在转基因大豆中表达了能够识别 2 型单纯疱疹病毒 (HSV-2) 的人类免疫球蛋白全长 IgG。研究表明, 植物抗体的活性与细胞培养来源的单克隆抗体没有明显的差异, 并能够防止 HSV-2 病毒在小鼠中间传播。McCormick 等在烟草中表达的来自鼠 B 淋巴细胞瘤 38C13 的免疫球蛋白的基因型特异性的 scFv。小鼠接种了经过纯化的植物来源的 38C13scFv 产生了大于  $10\mu\text{g/ml}$  的抗独特型免疫球蛋白, 并能够经受致死剂量的同源 38C13 肿瘤的攻击。Kathuria 等在烟草中表达了人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 特异性抗体, 表达产物能够与 hCG 的 beta 亚基特异性结合, 抑制 hCG 诱导的睾丸激素的产生。此外, 利用转基因植物表达的抗体和抗体片段还有神经肽半抗原 IgM、人肌酸激酶 IgG、链球菌外源凝集素分泌性 IgA/G、乙型肝炎抗体重链可变区、膀胱癌细胞 IgG、恒河猴 D 抗原 IgG、乙肝表面抗原单克隆抗体等。表达宿主主要是烟草和拟南芥。

植物生产用于治疗的分泌性抗体由一条重链、一条轻链、连接区和控制分泌部分组成。采用基因工程技术得到分别单独表达一条链的植株, 然后通过连续的有性杂交得到能将 4 条链完整装配成为功能 SIgA 的转基因植株, 表达量可达到  $200\sim 500\mu\text{g/g}$  植物叶片鲜重。初步临床研究表明, 植物 SIgA 抗体在局部使用和全身使用都是安全的, 没有毒性。Planet 生物技术公司完成的临床试验结果表明, 植物抗体可以显著降低受试者口腔变形链球菌水平。SIgA 植物抗体的大量生产为黏膜免疫系统 (肠道、呼吸道、生殖泌尿道) 的疾病提供了新的治疗机会。

过去 10 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, 植物已成为生产各种类型抗体的表达系统。这包括全长的 IgG 和 IgA、嵌合 IgG 和 IgA、分泌型 IgA (sIgA)、单链抗体片段 (single-chain antibody fragment, scFv)、抗原结合片段 (fragment antigen binding)、Fab、scFv、双特异性抗体、膜锚定 scFv, 以及重链多变位点 (heavy-chain variable domains) 等。最近, 植物表达抗体的种类还在继续增加。如 Vaquero 等报道, 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。表 4-2 反映了植物表达系统生产抗体的巨大潜力。

表 4-2 在转基因植物中表达的重组抗体

(Fischer R 和 Emans N, 2000)

| 年    | 类型        | 抗体/抗原 | 植物器官 | 细胞定位     | 转化植物   |
|------|-----------|-------|------|----------|--------|
| 1989 | IgG1      | 磷酸酯   | 叶    | 内质网      | 烟草     |
| 1990 | IgM       | 半抗原   | 叶    | 叶绿体, 内质网 | 烟草     |
| 1991 | VH domain | 神经肽   | 叶    | 胞内和胞外    | 本塞姆氏烟草 |
| 1992 | scFv      | 植物激素  | 叶    | 细胞溶质     | 烟草     |
| 1993 | IgG1 Fab  | 人肌酸激酶 | 叶    | 细胞核      | 烟草     |
| 1993 | scFv      | 植物激素  | 叶    | 质外体      | 烟草     |



#### 第四章 转基因植物生产蛋白质和多肽

(续)

| 年    | 类型             | 抗体/抗原             | 植物器官 | 细胞定位     | 转化植物   |
|------|----------------|-------------------|------|----------|--------|
| 1993 | scFv           | 菊苣斑纹病毒            | 叶    | 细胞溶质     | 本塞姆氏烟草 |
| 1994 | IgG            | 真菌角质酶             | 根    | 质外体      | 烟草     |
| 1994 | IgG1           | 链球菌实变体凝集素         | 叶    | 质外体      | 烟草     |
| 1995 | IgA/G          | 链球菌实变体凝集素         | 叶    | 质外体      | 烟草     |
| 1995 | IgG            | 烟草花叶病毒            | 叶    | 质外体      | 烟草     |
| 1996 | scFv           | 角质酶               | 叶    | 内质网      | 烟草     |
| 1996 | IgM            | 根结线虫分泌物           | 叶、根  | 质外体      | 烟草     |
| 1996 | scFv           | 甜菜坏死黄脉病毒          | 叶    | 质外体      | 本塞姆氏烟草 |
| 1996 | scFv           | 肌酸激酶              | 叶    | 内质网, 细胞质 | 烟草     |
| 1996 | IgG1Fab        | 肌酸激酶              | 叶    | 质外体      | 拟南芥    |
| 1997 | scFv           | $\beta$ -1,4 内葡聚糖 | 根    | 细胞溶质     | 马铃薯    |
| 1997 | scFv           | 唑酮                | 叶    | 内质网      | 烟草     |
| 1997 | scFv           | 脱落酸               | 叶    | 内质网      | 烟草     |
| 1997 | scFv           | 脱落酸               | 种子   | 内质网      | 烟草     |
| 1997 | scFv - IT      | CD - 40           | 植物   | 质外体      | 烟草组织   |
| 1998 | scFv           | 唑酮                | 块茎   | 内质网      | 马铃薯    |
| 1998 | human-ized IgG | 单纯疱疹病毒 II 型       | 植物   | 分泌途径     | 大豆     |
| 1998 | scFv           | 二氢叶酸还原酶           | 叶    | 细胞溶质     | 矮牵牛    |
| 1999 | IgG            | Human IgG         | 植物   | 质外体      | 苜蓿     |
| 1999 | scFv           | 癌胚抗原              | 叶    | 瞬时表达     | 烟草     |
| 1999 | scFv           | 番茄伪曲顶病毒属          | 植物   | 内质网, 质外体 | 本塞姆氏烟草 |
| 1999 | bi - scFv      | 烟草花叶病毒            | 叶    | 内质网, 质外体 | 烟草悬浮细胞 |
| 1999 | scFv           | 烟草花叶病毒            | 植物   | 细胞溶质     | 烟草     |
| 1999 | scFv           | CEA               | 细胞   | 内质网, 质外体 | 水稻悬浮细胞 |
| 1999 | scFv           | 38CB 鼠 B 淋巴细胞     | 叶    | 质外体      | 烟草     |
| 2000 | scFv           | CEA               | 植物   | 内质网, 质外体 | 水稻、小麦  |
| 2000 | scFv           | TMV               | 叶    | 质外体, 膜   | 烟草     |

目前已有 4 种植物源的抗体具备潜在的商业应用价值。其一是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，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。其二是在小麦和水稻中表达的抗癌胚抗原的抗体。癌胚抗原是细胞表面糖蛋白，也是肿瘤相关的特征抗原之一。抗癌胚抗原的抗体在体内肿瘤造像及肿瘤的免疫治疗上有广泛的应用价值。其三是治疗单纯疱疹病毒的抗体大豆表达的抗体 Anti-HSV-2，能够有效地防止单纯疱疹病毒 HSV-2 在鼠阴道的存活，其活性与细胞培养得到的抗体相仿。其四是利用植物病毒表达载体表达的治疗淋巴瘤的抗体（scFv），抗体基因来源于鼠 B 淋巴瘤。用植物来源的该抗体免疫小鼠，能够使小鼠抵御淋巴瘤侵染。植物来源的抗体与动物细胞来源的单克隆抗体相比，是否具有市场竞争力？由于目前市场上还没有商品化的植物性抗体，因此很难精确地估计其生产成本。植物抗体只有具备高产量、低成本、高活性、低免疫原性时，才能有巨大的市场前景。Daniell 根据在 250 m<sup>2</sup> 温室中转基因苜蓿表达 IgG 的情况估算，植物源抗体的生产成本为每克 500~600 美元，而用杂交瘤生产抗体的成本每克则要 5 000 美元。植物表达抗体水平的高低与生产成本的关系很大，按目前最高的表达水平计算，0.05% FW 植物源抗体的生产成本将降至 50 美元/g。植物生产抗体的成本将低于细胞培养（1 000 美元/g）和转基因动物（100 美元/g）的生产成本。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。

## 二、细胞因子

在医学领域，已有多种细胞因子上市，而用于畜牧生产和动物疾病防治的细胞因子却非常稀少。其主要原因是利用发酵工程生产的细胞因子成本高，不适于动物应用。植物生物反应器为动物细胞因子的生产提供了新的工具，国际上已有数个研究小组尝试利用植物生物反应器生产动物用细胞因子。如日本北海道的学者用马铃薯成功地表达出了人的  $\alpha$ -干扰素，试图利用其防治牛的呼吸道疾病。由于利用转基因植物生产的物质具有可直接食用的特点，对高度集约化的畜牧业生产非常便利，在畜牧生产和动物疾病防治中具有重要的生产应用价值。

### （一）人表皮生长因子

人表皮生长因子（human epidermal growth factor, hEGF）是由 53 个氨基酸组成的蛋白。目前主要用于外敷治疗烧伤、创伤、角膜炎等有关外表皮细胞的疾病，也可以口服，促进内表皮细胞生长，治疗肠、胃溃疡。随着人们生活水平的提高、饮食结构的改变和生活节奏的不断加快，消化道疾病已成为临床医疗中的多发病。据估计，约有 10% 的人曾患有胃肠道溃疡。已经证明，hEGF 能保持胃肠道上皮细胞的完整性。它除具有抑制胃酸作用外，还具有增加胃黏膜血流量，增加胃黏膜细胞中 RNA、DNA 及蛋白质的合成作用，促进黏膜细胞生长，从而促进溃疡愈合，使愈合后的溃疡不易复发。人工合成表皮生长因子基因，然后在大肠杆菌及酵母系统及植物中表达，获得具有生物活性的人表皮生

长因子蛋白的技术已趋于成熟，特别是采用分泌性表达系统，国内几家单位已先后完成高效表达系统的建立，并通过中试研究和药审药检制备出注射剂。

Salmanian 等将化学合成的 hEGF 基因转入马铃薯块茎中，每毫克可溶蛋白中 EGF 的表达量为 120pg。陈廷速等（2002）将 hEGF 基因构建植物表达载体。转化拟南芥，并获得转基因植株，将通过研究 hEGF 的表达与调控，提高其蛋白活性，为下一步转化目标植物表达 hEGF 提供可靠的技术基础。戴潍等（2001）将人工合成的 hEGF 基因导入聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7002 和鱼腥藻 *Anabaena* sp. PCC7120。放射免疫分析证明，hEGF 基因在两种转基因藻中均得到了表达，而且，在聚球藻 7002 中是采用分泌形式将表达产物分泌到培养液中。

## （二）红细胞生长素

红细胞生长素（erythropoietin, EPO）促进红细胞的分化与增殖，在贫血或是大量失血的病人中应用可达到较好的治疗效果。

Matsumoto 等（1995）用电击法将 EPO 基因导入烟草细胞，获得了表达 EPO 的细胞株，用根癌农杆菌介导法将 EPO 基因导入烟草细胞系，EPO 在烟草细胞中能够正确加工并分泌到细胞膜外吸附到细胞壁上，而不分泌到培养基中，能被糖基化，但比动物细胞生产的 EPO 糖链要小，在体外实验中能够刺激红细胞的分化和增殖，但未能检测到体内生物活性。

## （三）干扰素

干扰素（IFN）是宿主细胞受病毒感染后产生的非特异防御因子，在临床上被广泛应用于病毒性疾病和恶性肿瘤的治疗，靠从人血提取或用人血白细胞诱导生产。干扰素价格昂贵，用其治疗一个肝炎病人需要 2 万~3 万美元。1980 年瑞士公司第一次用基因工程细菌生产出干扰素。之后，美国、古巴、日本和中国分别用酵母、昆虫细胞和大肠杆菌表达出干扰素。目前较多国家都已取得成功，正在大量生产。最近几年，基因工程干扰素已大规模商业化生产，且在临床使用。但动物细胞的昂贵培养，使其成本大大提高，而利用转基因植物技术则可大规模地廉价生产。有研究者利用农杆菌介导法将  $\gamma$ IFN 基因片段导入烟草中，建立了一个利用植物表达系统大量生产干扰素基因的模式系统，从而降低干扰素生产成本，已获得了一批转人  $\gamma$ IFN 基因片段的烟草植株。

## （四）巨噬细胞集落因子

粒细胞集落刺激因子（granulocyte colony stimulating factor, G-CSF）是能够在体内外特异地作用于中性粒细胞系，促进其增殖、分化，并能维持功能和存活的一种糖蛋白类生长因子。G-CSF 在临床上有非常广泛的用途，其毒副作用很低。目前主要用于防治化疗及放疗后引起的骨髓抑制。此外，还用于自身骨髓移植、某些类型的白血病、艾滋病的白细胞减少和再生障碍性贫血、外周造血干细胞移植等均显示具有显著的疗效。G-CSF 基因分别在哺乳动物细胞、原核细胞和植物体中均以获得成功表达，国内外几家公司已制备出注射剂。

Sardana 等 (2002) 将粒细胞集落刺激因子基因与谷蛋白基因融合在烟草中表达粒细胞集落刺激因子, 具有较高的生物活性。Gans 等在转基因烟草种子中表达了 GM-CSF, 分析表明, 其表达产物具有免疫反应, 其生物活性与人的一致。我国魏兰珍等 (2005) 在人粒-巨噬细胞集落刺激因子 (hGM-CSF) 基因的 5' 端添加有利于在蓝藻细胞中高效表达的 SD 序列, 然后插入到表达载体 (pRL 439) 强启动子 PpsbA 的下游, 进一步与穿梭表达载体 pDC-08 相连构建穿梭表达载体 pDC-GM。利用三亲接合转移方法将该穿梭表达载体 (pDC-GM) 转入丝状鱼腥藻 7120, 通过相应抗生素筛选后得到能稳定遗传的转基因藻。以该转基因藻的基因组 DNA 为模板进行 PCR 检测, 结果表明, hGM-CSF 基因已转入鱼腥藻 7120。这是首次尝试把蓝藻作为制备重组 hGM-CSF 的新宿主, 具有潜在的经济价值和社会效益。

### (五) 白细胞介素

人白细胞介素 4 (hIL4) 是一种重要的免疫活性调节分子, 与一些自身免疫性疾病有重要关系。有研究者将 hIL4 基因融合到衣藻叶绿体 rbcL 5'-UTR 和 3'-UTR 之间, 组成 5'-UTR-hIL4-3'-UTR 片段, 将其插入来源于衣藻叶绿体基因组 5.7 kb 同源片段中, 构建成 pXhIL4 同源重组质粒。经过 Western blot 印迹转移分析, 证实了人白细胞介素 4 基因在衣藻叶绿体中获得成功表达。也有研究者利用农杆菌介导的方法, 将人源白细胞介素-2 基因导入大白菜, 转化植株进行 PCR 和 PCR-Southern 杂交、Western 杂交检测, 结果证明, 白细胞介素-2 基因已整合入白菜基因组中, 白细胞介素-2 在转基因大白菜中得到表达。

### (六) 成纤维细胞生长因子

成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 超家族是广泛存在于从线虫到人类的一类短肽类生长因子。成纤维细胞生长因子不但能够促进包括成纤维细胞、内皮细胞、软骨细胞、平滑肌细胞、黑色素细胞等多种细胞的增殖, 而且还能够促进脂肪细胞的分化, 引发巨噬细胞和成纤维细胞产生白细胞介素 6 (IL-6), 刺激星形细胞的迁移, 延长神经元的寿命。FGF 在个体的发育、血管发生、造血、肿瘤发生中发挥重要作用。在治疗帕金森综合症、急性脊柱扭曲性损伤、断指中神经功能重建、脑缺血、肾缺血、心肌梗塞、闭塞性脉管炎、视网膜缺血、胃溃疡及难愈合性伤口等多种临床应用方面具有巨大潜力。王仁厚 (2003) 用农杆菌介导法在番茄中成功表达了酸性成纤维细胞生长因子 ( $\alpha$ -FGF)。

## 三、转基因植物生产其他医用蛋白和生物活性肽

利用转基因植物生产药用蛋白和多肽药用蛋白的市场需求量非常大。如纯化的血清白蛋白 (HAS), 全世界的年需求量为 550 t。传统的生产方法是从人的血液中分离提取, 这样提取不仅价格较高, 而且还有病原微生物污染的危险。而今人们可以利用转基因植物进行生产类似的植物性来源的药用蛋白质, 还有脑啡肽, 以及价格十分昂贵的药物: 葡糖脑

苷脂酶等。表 4-3 列出了植物表达系统生产药用蛋白的情况。

表 4-3 在转基因植物中产生的重要的药用蛋白  
(Kunka 等, 2005)

| 蛋白             | 受体植物    | 应用  |
|----------------|---------|---|
| 生长激素           | 烟草, 太阳花 | 首次在植物中表达的人源蛋白, 而后在叶绿体中表达量约为叶子总蛋白的 7%              |
| 人血白蛋白          | 烟草, 马铃薯 | 首次在植物中表达的人源全长蛋白, 表达量为叶子总蛋白的 0.1%~11%, 应用于肝硬化, 烧伤等 |
| $\alpha$ -干扰素  | 水稻, 芜菁  | 首次在水稻中表达药用蛋白                                      |
| 促红细胞生成素        | 烟草      | 首次在烟草悬浮细胞表达人源蛋白                                   |
| 人分泌碱性磷酸酶       | 烟草      | 通过根和叶子分泌产生  |
| 抑肽酶            | 玉米      | 在玉米中表达药用蛋白  |
| 胶原             | 烟草      | 首次在植物中表达人源结构聚合蛋白                                  |
| a,1-抗胰蛋白酶      | 水稻      | 首次在烟草悬浮细胞表达药用蛋白                                   |
| 乳铁蛋白           | 水稻, 番茄  | 抗微生物活性  |
| 蛋白 C           | 烟草      | 抗凝(血)剂  |
| 水蛭素            | 油菜      | 凝血酶障碍   |
| 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 | 烟草      | 嗜中性白血球减少症   |
| 脑啡肽            | 拟南芥     | 通过麻醉抗痛敏   |
| 表皮生长因子         | 烟草      | 促进表皮下修复和增生  |

### (一) 水蛭素

水蛭素是迄今发现的最强的凝血酶天然抑制剂, 用于治疗血栓的形成。过去, 水蛭素是从欧洲医蛭提取, 现在除大部分利用重组细菌和酵母生产外, 也可利用基因工程油菜、烟草和埃塞俄比亚芥生产。

### (二) 人血清白蛋白

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)是含 17 对二硫键(-S-S-), 由 585 个氨基酸组成分子量为 68 ku 的蛋白。人血清白蛋白在人血浆中含量极其丰富(成年人每升血液中含 40 g 左右), 它主要起维持血液的正常渗透压和运送许多亲水分子(如类固醇激素、胆色素和脂肪酸等大量的医疗分子)的作用。因此, 人血清白蛋白在临床上广泛应用于大出血、休克、烧伤、成红白细胞增多症、白蛋白过少症等。医疗上资料表明, 人血清白蛋白在美国每年需求量达 300 t, 全世界年销售量 600 t 左右, 形成年销售额至少 300 亿美元的巨大市场。现在临床上人血清白蛋白主要是靠收集人的血液通过分级过滤获得。面对如此巨大的需求量, 单靠人血液提取人血清白蛋白是难以满足的。同时, 人血来源极其复杂, 容易导致污染, 如肝炎病毒、艾滋病毒等。为了缓解这些矛盾, 通过基因工



程技术把人血清白蛋白基因克隆到植物宿主上进行高效表达是最具有前景的方法。

Sijmons 等将人血清白蛋白 (HAS) 嵌合基因导入马铃薯和烟草中。为了使此蛋白得以分泌, 在试验中使用了人的前导序列及烟草的 PR-S 信号序列, 结果表明, 在转基因植株的叶组织和悬浮培养液中, 两种信号序列都能使 HSA 分泌。对 N-末端氨基酸序列的分析表明, HSA 蛋白前体的加工依赖于信号序列, 且正确加工的 HSA 也得以分泌。成熟 HAS 编码区与烟草的一个蛋白分泌信号序列融合产物的表达量达到占总蛋白的 0.2%。

### (三) 人蛋白 C

人蛋白 C (protein C) 是一种糖蛋白, 是一种维生素 K 依赖性的酶原, 是血液中一种重要的抗凝物质。在凝血酶-血栓调节蛋白复合物的作用下被激活。活化的蛋白 C 是凝血因子 Va 及 Va 的生理性抑制因子, 在蛋白 S 存在时, APC 选择性地裂解凝血因子 Va 及 Va, 从而发挥抗凝血作用。APC 还可通过对纤溶抑制物的灭活作用而激活纤溶系统。通过这种机制, 纤溶酶原激活物受到保护而未被抑制, 从而使纤溶酶原转变为纤溶酶, 继而消化血凝块中的纤维蛋白。这种抗凝特性严格制约了血栓形成。APC 还具有明显的抗炎作用, 能够明显抑制炎症细胞因子 IL-1 和 TNF- $\alpha$ 。

Cramer 等 (1996) 报道了在转基因烟草中表达了具有医疗价值的复杂蛋白质: 人蛋白 C (human protein C, hPC), 表明烟草中合成 hPC 的后加工, 如糖基化、二硫键的形成与动物体内过程相似。

### (四) 人葡糖脑苷脂酶

人葡糖脑苷脂酶 (human glucocerebrosidase, hGC), 是高度有效缓解高歇病 (家族性脾贫血、脑苷脂沉积病和巨脾病) 的唯一药物。过去从人胎盘中提取, 估计 I 型高歇病人平均每年需要有 10~20 t 胎盘, 才能为其提供足够的用于治疗葡糖脑苷脂酶。因此, 葡糖脑苷脂酶已成为世界上最贵的药物之一。1999 年, 美国弗吉尼亚州的公司与弗吉尼亚州大学合作, 获得了利用转基因植物烟草生产葡糖脑苷脂酶的专利, 其培育出的转基因烟草每一植株的产酶量可顶替 2 000~8 000 个胎盘。预期根据这一研究发现, 将可利用转基因商业生产足够的葡糖脑苷脂酶和其他溶酶体酶类, 用于酶替代疗法。

### (五) 人类乳铁转运蛋白

人类乳铁转运蛋白 (human lactoferrin, hLF) 是转铁蛋白家族中的成员之一。主要分布在哺乳动物的乳汁、血液、泪液、胆汁、精液、羊水和小肠液等分泌物中。具有促进人体对 Fe 的吸收和利用, 能抵御病菌侵染、具有免疫调节、抗氧化、抑制癌细胞的生长、抑制胆固醇的积累等的重要生理和生物学功能, 其分子生物学研究受到人们的高度重视, 人乳铁蛋白的氨基酸顺序和三维结构也已确定。商业上的大量需求, 促进了人乳铁蛋白的异源表达研究。

目前, 人乳铁蛋白已成功地在牛、羊、鼠、昆虫等细胞, 烟草、水稻、番茄、马铃薯、玉米、曲霉、大肠杆菌、酵母等受体中表达, 并取得了较好的结果。Chong 等在转基

因马铃薯中表达了全长具生物活性的人类乳铁转运蛋白，表达量为可溶性蛋白的 0.1%，马铃薯块茎组织抽提物具有抑制人类致病菌的活性。把人乳铁蛋白基因转入植物中，合成具有生物活性的人乳铁蛋白，相当于在植物中添加新的营养保健因子，同时还可提高转化植株抗病性。

#### (六) 脑啡肽

脑啡肽是一种止痛的神经肽，在医疗临床上有广泛的应用。Earlier 等 (1989) 将编码白脑啡肽基因与种子储藏蛋白 *Brassica napus* 2Sj 基因融合，成功地在种子中表达了白脑啡肽。Vandekerckhove 等将人的神经肽——亮氨酸脑啡肽（它是一个含有 5 个氨基酸残基的小分子多肽）基因导入油菜中，在油菜中先以种子储存蛋白 2S 清蛋白的形式被生产出来，储藏蛋白质再经胰蛋白酶水解，并通过 HPLC 法回收，获得的脑啡肽产量达到每克种子含 220 nmol/L，在临床上可作为止痛剂或镇静剂，是植物中生产药用蛋白多肽最早的例子之一。

#### (七) 人类三聚胶原蛋白

胶原蛋白属于动物性物质，在动物细胞中扮演着黏结功能的角色，广泛存在动物细胞中，是细胞外基质最重要的组成成分，也是动物结缔组织中最主要的一种结构性蛋白质。人体成分有 16% 左右是蛋白质，而蛋白质中又有 30%~40% 的胶原蛋白，所以，成年人身体中大约有 3 kg 胶原蛋白，主要存在的部位有皮肤、肌肉、骨骼、牙齿、内脏（如胃、肠、心肺、血管与食道）与眼睛等。胶原蛋白存在动物皮肤与骨骼中，如猪皮、牛筋、鸡及鸟的皮肤及骨骼中也含有大量的胶原蛋白。虽然胶原蛋白来源很多，但目前工业上生产主要来自牛、猪、鸟及鱼的皮肤、骨骼与筋肉等。近年来生物技术学家也尝试以重组 DNA（遗传工程）方法，将生产胶原蛋白有关的基因剪接到牛或羊等家畜细胞，借由牛乳或羊乳的分泌，可由乳汁中萃取得到胶原蛋白，这种以“基因转殖动物”（transgenic animals）来生产胶原蛋白的方法叫“动物工厂”（animal bioreactor），目前仍处于研发阶段，尚未工业生产。但用转基因动物生产胶原蛋白的成本高，安全性低，而人类三聚胶原蛋白缺乏可引起一系列的疾病。近年来，用植物生产胶原蛋白的研究刚刚开始。

Ruggiero 等 (1999) 在烟草表达系统中表达了人类三聚胶原蛋白，表达的胶原蛋白单链能够在植物体内以二硫键结合成三聚体，形成稳定的三聚体螺旋结构。

### 四、工业酶

酶的工业应用已取得了令人瞩目的成就。采用高效、高选择的酶作为工业催化剂，开发环境友好的工艺来生产医药化工产品、精细化工产品、传统化工产品等已在逐步的发展起来，并在有些领域替代了传统的化工方法，显示出了巨大的潜力。随着研究水平的提高，可以预见，将有更多的产品通过酶催化反应生产。利用植物生物反应器生产酶已成为工业酶大规模生产的趋势。

### (一) $\alpha$ -淀粉酶

$\alpha$ -淀粉酶在粮食加工、食品工业、酿造、发酵、纺织品工业和医药行业都经常使用，是一类用途十分广泛的酶。目前已有研究报道，在植物体中对 $\alpha$ -淀粉酶进行了表达，这为 $\alpha$ -淀粉酶的大规模生产提供了新的途径。如在马铃薯中成功表达了 $\alpha$ -淀粉酶，表达产物分泌到块茎的质外体中。

### (二) $\beta$ -1,3-葡聚糖酶

$\beta$ -1,3-葡聚糖酶因其能够作用于淀粉，将降解成单糖等，而广泛用于啤酒发酵工业，或是饲料工业，消除 $\beta$ -葡聚糖的抗营养作用，改善畜禽生产性能，大大提高饲料效性。

国内有研究以甘蓝型双低杂交油菜亲本（恢复系、保持系）为材料，在对以游离小孢子、子叶柄为受体的农杆菌介导的转基因方法上，将 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因导入目前生产上广泛应用的杂交油菜亲本（恢复系、保持系）中，通过探讨转双价基因株系的抗菌核病的效果及转基因的遗传规律，从中能够获得高抗结核菌病的转基因株系。Witcher等（1998）用转基因玉米生产重组的 $\alpha$ -葡聚糖酶，表达量占种子可容蛋白的0.7%，其生化特征、生物学活性等均与天然的 $\alpha$ -葡聚糖酶相同。Dai Z Y等（2000）在马铃薯中表达了葡聚糖酶。

### (三) 植酸酶

植酸酶是催化植酸（肌醇六磷酸）及植酸盐水解成肌醇与磷酸（或磷酸盐）的一类酶的总称。它使植物性饲料中磷的利用率提高60%，粪便中磷的排出量减少40%，从而减少饲料中磷的添加量。它还可降解植酸盐的抗营养作用，因此对提高畜牧生产效益及降低其对环境的污染有重要意义。植酸酶现已在酵母、真菌、细菌、家蚕等多个表达系统中表达成功，各国对这些系统的研究比较多，但总的来说，基因工程菌发酵用培养基成本高；原核生物不能对表达产物进行准确的翻译后加工及蛋白质的糖基化；微生物发酵生产的植酸酶可能让动物感染病原体；植酸酶制剂的耐热保护技术也亟待解决。

20世纪90年代科学家们开始尝试在植物中表达植酸酶的研究，并取得了阶段性的进展。在饲料性植物种子中表达植酸酶，不需提取加工植酸酶，成本低于其他方式生产，使用方便，这将是植酸酶应用的最佳方法。Pen等（1993）将黑曲霉的肌醇六磷酸（即植酸酶）基因导入烟草，在成熟种子中肌醇六磷酸达可溶性蛋白的1%。Verwoerd等（1995）将植酸酶cDNA转化到烟草中，表达出的酶蛋白活性与天然黑曲霉植酸酶相当；免疫细胞化学法定位，发现该酶是分泌到细胞外的，且叶片中植酸酶的最高水平达到叶片可溶蛋白的14.4%，而烟草的形态、生长及种子的萌发并未表现异常。Li等（1997）将黑曲霉的*phyA*基因在组成型启动子的控制下插入大豆转化质粒，用基因枪法将其引入大豆细胞，并进行细胞悬浮培养。表达酶的分子量虽比真菌植酸酶小，但两者糖基化所产生的多肽分子量是一致的，其最适pH及最高温度也几乎相同。*phyA*基因的导入对细胞的再生

频率没有较大影响。Coello 等 (2001) 将大肠杆菌的植酸酶基因连同一段液泡定位表达信号肽序列在胚特异性启动子的控制下转化拟南芥, 在转基因植株干种子中检测到了植酸酶的活性, 且内部植酸酶的水平有所降低, 无机磷酸盐的含量相对提高。研究表明, 在胚中特异表达的植酸酶能够在胚发育过程中降低其中的植酸水平。Koegel 等将黑曲霉的植酸酶基因导入紫花苜蓿中, 并成功获得了重组植酸酶。研究发现, 转基因苜蓿植酸酶能够完全取代在动物饲料中添加的无机磷, 降低了饲料的生产成本, 并能使粪便中排放的磷降至原来的 1/2 以下。Podersen 等将 *phyA* 基因分别转化了小麦和油菜, 均检测到高活性的植酸酶表达。李钱锋等 (2006) 在水稻的种子中表达了植酸酶, 无机磷含量分析表明, 含目的基因的转基因水稻种子及其后代叶片中的无机磷含量较未转化植株均有了明显的提高。

#### (四) 胃脂肪酶

食物中的脂肪必须在消化液中脂肪酶的作用下才能被分解成为甘油三酯再被人体所吸收利用。可以用来治疗因胃脂肪酶不足而引起的先天性黏液稠厚症, 在干酪生产中添加胃脂肪酶只是加速干酪的成熟。

法国《新观察》月刊报道, 通过一种细菌携带狗染色体的基因片段, 将其转移到烟草染色体上, 并获得有效表达, 致使烟草能合成胃脂肪酶 (系酸性酶类), 其含量占干烟草叶总量的 0.5%~1%, 也就是说, 每公顷土地可收获 1 kg 左右这种酶的产物, 利用这种酶每年可治愈好几百万黏滞病 (先天性黏液稠厚症) 患者。因此, 此转基因药用烟草植物可在自然界生长、培植, 更方便地提供大量药用酶。

### 第五节 存在的问题与对策

利用转基因生产蛋白和多肽研究过程当中有许多理论和技术问题值得深入探讨。目前还没有一种转基因植物生产的蛋白和多肽达到商品化。主要原因: 存在转基因沉默; 目的产物的表达量低, 达不到商业化生产的要求; 表达药用蛋白的准确修饰, 如抗体的糖基化修饰; 降低产物的抽提及下游加工成本; 转基因对环境的污染; 协同表达多基因等问题。

#### 一、多基因的协同表达

植物生产某种具功能的蛋白或多肽是一个相当复杂的过程, 有时需要几种酶基因或酶基因和调控因子共同作用来完成, 这就需要协同表达多个基因。在植物中同时表达多个目的蛋白如今已成为可能。将所要表达的目的蛋白基因构建在一个开放阅读框架内, 目的蛋白基因之间连接有 10~20 个氨基酸的序列, 翻译后形成的所谓的“多蛋白”可由目的蛋白之间的短肽介导切割成为各自完整的功能性蛋白 (Claire Halgin 等, 1999)。这样一种表达系统为向植物中导入多基因或引入某一完整的代谢途径提供了一个更为有效的途径。

## 二、转基因沉默

转基因沉默是近年来转基因研究过程中的一个热点问题。研究人员提出了3种转基因沉默的机制，即位置效应、转录水平和转录后水平的基因沉默。并且认为甲基化是转基因沉默的直接原因。针对转基因植物中的转基因沉默问题，已提出了一些策略来加以防止，如在构建载体时尽量采用与内源序列同源性较低的元件，在转基因的侧翼接上核基质结合序列（matrix attachment regions, MAR）以避免位置效应的影响等（朱莉等，1999）。

## 三、提高表达量

异源蛋白商业化生产的关键一环是提高该蛋白在宿主生物中的产量。利用强启动子从转录水平增强转基因的表达早已广为采用，但许多情况下转录后调节也影响转基因的表达。

这可以通过以下几个方面来提高外源蛋白在植物体内的表达：①通过改变调控元件或附加一些调控元件构建表达载体，提高外源蛋白的表达量；②用融合基因来生产外源蛋白；③利用分泌途径来提高外源基因的表达；④通过重组蛋白的细胞定位来提高外源蛋白的表达量。

**1. 改变调控元件或附加一些调控元件** 将外源基因与植物组织特异表达的蛋白基因及其调控序列连接，使重组蛋白在植物中的表达具有器官或组织特异性，可大大提高外源蛋白的表达量。Gijs 等（1999）将葡糖醛酸酶（glucuronidase, 简称 GUS）基因与油质蛋白前 800 bp 的核苷酸序列连接，插入根癌农杆菌的双元载体 pCGN1559 中，融合基因在芸薹中成功表达，80% GUS 的活性分布在油体上。外源基因与植物的特异调控基因融合表达，既提高了外源蛋白的表达量，又简化了蛋白的提取纯化步骤，展示了利用植物大规模生产外源蛋白（包括生产基因工程疫苗）的诱人前景。

真核细胞有着非常复杂的结构，高度有序，而且是一种动态结构。在真核细胞的细胞核中有核基质结合序列（matrix attachment region, MAR）。在转基因生物技术操作中，将 MAR 序列置于所转基因的两侧，构建成 MAR-gene-MAR，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碱基组成不同的外来基因的识别，另一方面可避免插入位点附近染色质的影响。许多试验都报道 MAR 能提高基因表达水平，在用基因枪转化烟草细胞系时，用酵母 MAR 表达提高 12 倍，用烟草 MAR 表达提高 60 倍。同时，发现烟草 MAR 与烟草核骨架的结合能力大于酵母 MAR。Bode 等报道，免疫球蛋白重链基因（IgH）增强子的 MAR3 有 AATATATTT 序列，可使碱基不配对，若将其突变成 ACTGTCTTT 或 ACTGCTTT，基因不配对被抑制，与核骨架的亲合力降低，Bode 等人工合成 5'TCTTTAATTTCTAATATATTTAGAA3' 由 25 个碱基序列组成的寡核苷酸序列，并 7 次重复连接，共 190 bp，此 190 bp 的序列与核骨架的结合力达 75%，用它作两翼转基因后荧光素酶（Luc）的活性比无此序列的载体高 6 倍。



**2. 利用融合基因生产外源蛋白** 用转基因植物生产疫苗,有的需经纯化后使用,有的可不经提取纯化直接作为一种食品疫苗口服使用。为了有利提取纯化,人们发展了外源基因的融合表达系统,使植物体内外源蛋白储存于某一特异器官或组织内,并从中分离目的蛋白,这样可以简化蛋白的提取纯化过程。如将 GUS 基因与油质蛋白融合表达,种子中 80% 的重组蛋白结合在油体上,这相当于重组蛋白富集了 13 倍,分离种子中的油体,并重新悬浮,通过特异性内切酶作用,将 GUS 蛋白从油体表面释放出来,从而获得有活性的 GUS。利用该融合表达系统生产的水蛭素已成为第一个商业化产品。油脂体是植物种子中甘油三酯的储藏场所,由嵌合有油质蛋白的单层磷脂膜包裹而成。油质蛋白在种子中的表达水平很高,并定位于油脂体中。把外源基因与油脂蛋白融合表达,使外源蛋白易分离纯化,从而降低外源蛋白的后处理费。目前已经发展出一种有效的策略增强转基因的表达:将目的基因与泛素(ubiquitin)基因进行翻译水平的融合,该融合蛋白在转基因植物体中表达后,N-端的泛素部分被植物内源的泛素专一性蛋白酶切掉后,目的蛋白就形成有活性的构象,同时,在转基因植物中得到积累,从而表达水平得到显著提高(David Hondred 等,1999)。

**3. 利用分泌途径提高外源基因表达** 在真核生物中大多数分泌蛋白在 N-末端都具有约 30 个氨基酸信号序列,若为一定的细胞机制所识别,就能引导蛋白穿过内质网膜。不同生物的信号序列在氨基酸水平上相似性不大,但它们都有一些共同的特点,在氨基末端都带正电荷,分子内部都有一段疏水氨基酸,都具有 1 个含附着位点的 C-末端。这些特点在生物体中都是较保守的。Verwoerd 等研究了肌醇六磷酸酶在转基因烟草中的积累,构建了 pMOG413 双元载体,以 CaMV35S 作启动子,在 CaMV35S 启动子和肌醇六磷酸酶基因之间有 PR-S 信号肽的基因序列,并在试验中研究了 PR-S 信号肽对肌醇六磷酸酶的分泌作用。结果表明,细胞间液中肌醇六磷酸酶的活性比叶片高 87 倍。这说明 PR-S 信号肽具有分泌作用。并测定了植株移栽后 7 周内肌醇六磷酸酶的积累,在移栽到土中的 1~5 周,其含量逐渐上升,在第 6 和第 7 周维持在某一水平。这是由于烟草叶片的衰老,使得肌醇六磷酸酶 mRNA 水平下降,而肌醇六磷酸酶要抵御蛋白水解酶的降解,所以肌醇六磷酸酶的含量维持在一个稳定水平。带有翻译专一信号肽序列的蛋白及与内质网相关的蛋白通常分泌到质外体,在缺乏其他运输工具或停滞信号条件下,亚细胞定位的通道便是细胞间隙。如果将来源于烟草的病原相关蛋白或 PR1a 蛋白与异源蛋白相结合,就能将这些蛋白引导到细胞间隙。在利用植物生产重组蛋白的研究中,研究蛋白质向质外体的分泌具有重要意义:①便于研究内质网和高尔基体对多肽的加工;②便于目的蛋白的提取和收获;③便于研究 BiP 蛋白初生多肽结构;④便于研究内质网相关的天然伴侣;⑤蛋白质定位到质外体可以免受蛋白酶的降解。对需要正确折叠或糖基化的蛋白,研究其分泌途径很有必要。用这种分泌系统已经验证了多种重组蛋白。最早是利用植物来生产抗体——“植物抗体”。老鼠 6D4 单克隆抗体 4 或 K 链的积累依赖有功能的分泌型引导序列。Hiatt 等在试验中用老鼠的分泌引导序列,结果发现植物能识别并运用这种信号序列。During 等用编码鼠免疫球蛋白 BI-8 轻链和重链的 cDNA 做了类似的试验,用来源于大麦 A-淀粉酶基因的引导序列代替 BI-8 多肽的分泌型引导序列,结果在植物中也发现了相似的抗体。但这种免疫球蛋白不是定位到质外体,而是定位于内质网。随着单链抗

体结合蛋白 (scFv) 的诞生, 人们自然会想到去验证单链抗体在植物中的表达和功能。Oven 等在烟草中成功地表达了 scFv。scFv 重组蛋白已在多种植物中得到表达, 但这些植物中的表达量都不高。Firek 等报道, 如果使用适宜的分泌型引导序列, scFv 就能在质外体积累。Sijmons 等将人血清白蛋白 (human serum albumin, 简称 HAS) 嵌合基因导入马铃薯和烟草中。为了使此蛋白得以分泌, 在试验中使用了人的前导序列及烟草的 PR-S 信号序列。结果表明, 在转基因植株的叶组织和悬浮培养液中, 两种信号序列都能使 HSA 分泌。对 N-末端氨基酸序列的分析表明, HSA 蛋白前体的加工依赖于信号序列, 且正确加工的 HSA 也得以分泌。Sijmons 等认为, 信号序列有助于 HSA 的分泌。在试验中以不含信号序列的 pMOG285 作对照, 在 HSA-mRNA 水平上能检测到 HAS, 但 Western 杂交后就找不到 HSA 蛋白。这可能是由于非分泌型的 HSA 不稳定造成的。重链和轻链的两个二硫键的正确形成对 scFv 的稳定性和功能十分必要。胞质为还原环境, 缺少内质网所具有的蛋白二硫键异构酶, 对形成有功能的 scFv 不利。如果在基因的 5 端前接上信号肽, 使之进入内质网, 情况可能会有利。这一原理有可能用于解释加入信号肽后表达量提高的原因。在植物分泌体系的应用方面也有困难, 最明显的是糖基化问题。在植物中复杂聚糖的生产包括糖苷酶催化下甘露糖的水解以及岩藻糖和木糖等植物特有糖的添加。多聚糖通常附着在糖基化的植物蛋白上, 对多聚糖的研究表明, 这些多聚糖在植物体内通常是致免疫的。Von Schaewen 等观察到 M2 曲霉菌突变体, 该突变体阻止了带有复杂聚糖的蛋白的积累。经分离该突变体发现, 其细胞提取液缺乏 N-乙酰葡萄糖转移酶 I。该酶是复杂聚糖合成途径中的第一个酶。将此突变体与能表达血细胞凝集素 (PHA) 糖蛋白的转基因曲霉进行杂交, 得到一新型植株。该植株生产的 PHA 不含聚糖, 而为富含甘露糖的糖基化形式。

黏质沙雷氏杆菌的 *chiA* 基因编码一种分泌蛋白-ChiA 蛋白, Lund 等通过改变 *chiA* 基因, 使其在烟草细胞中得以表达, 所表达的 ChiA 蛋白附加了复杂聚糖, 且在烟草细胞中能够被分泌。在 ChiA 信号序列缺失条件下, 所表达的 ChiA 蛋白是不能分泌的, 而在带有信号序列的条件下 (不论是 PR-1b 信号序列还是 ChiA 信号序列), ChiA 蛋白都糖基化, 且是分泌型的。研究还发现, PR-1b 作信号时, ChiA 的分泌量比 ChiA 信号序列下的分泌量高。这说明用 PR-1b 信号序列替换 ChiA 蛋白信号序列能增强 ChiA 蛋白在植物细胞中的分泌。

**4. 重组蛋白的细胞定位** 植物作为生产重组蛋白的宿主最终要涉及蛋白的提取。如果将蛋白定位到某一细胞组分, 蛋白的提取将容易得多。如果该细胞组分具有蛋白质稳定或易分离等重要特点, 将使生产成本大为降低。在这方面有几种亚细胞定位策略证明是有效的, 包括内质网分泌途径的各个方面及液泡膜、质外体等途径。另外, 叶绿体和油体等细胞器也可以定位。

(1) 定位到蛋白体 将重组蛋白定位到蛋白体的可能性最初是由 Sengupta、Gopalan 等提出来的。他们利用农杆菌介导的方法, 在烟草中成功地表达了菜豆蛋白的基因组克隆, 包括启动子、编码区及 3 端 1 200 bp 的编码序列, 并认为该基因的表达具有种子特异性, 所产生的蛋白糖基化, 且定位在蛋白体上。种子是天然的储存器官, 可以长时间储存。储藏型的蛋白可以定位到蛋白体上。2S 白蛋白是最小的种子贮藏蛋白, 由分子量为

9ku 和 3ku 的 2 个亚基组成, 2 个亚基间由二硫键相连。2S 白蛋白是高度保守的, 而且有可变区, 最大特点是 8 个半胱氨酸残基在数量和位置上的高度保守性, 有 1 个半胱氨酸间隔区在长度和序列上是多变的。可以利用这些特点来生产一些小肽。Vandekerckhove 等研究了来源于芸薹属的 2S 白蛋白作为重组蛋白载体的特点。Krebbers 等曾报道, 拟南芥 (*arabidopsis*) 和芜菁甘蓝 (*B. napus*) 的 2S 白蛋白 C 末端可以被附着, 从而可以作为大小亚单位的加工位点。而 Vandekerckhove 等认为, 将重组蛋白附着在这些白蛋白的 C 末端的简单做法不可能有效。经研究发现, 在白蛋白的某一区域其长度和序列是多变的, 该位点在 2S 白蛋白的第 6 和第 7 半胱氨酸之间。Vandekerckhove 等研究出了一个能编码拟南芥 2S 白蛋白和亮氨酸-脑啡肽五肽所形成的融合蛋白的基因结构。这种基因融合体被导入拟南芥和芜菁甘蓝, 且正确表达。这种重组蛋白定位在蛋白体上, 并能积累, 每克种子中含量达 206 nmol/L。用这种方法可以生产一些重组蛋白, 但还有许多限制因素。向某一序列多变的封闭蛋白添加某一蛋白质常会造成额外氨基酸向肽 C-末端的附着。去除此氨基酸不仅花费高, 也使过程过于复杂化。更重要的问题是大小的限制。根据预测的 2S 白蛋白固有环的大小, 允许改变的最大限度为 4 个氨基酸。

Saalbach 等对巴西果 2S 白蛋白的 N-末端和 C-末端进行了不同的遗传构建, 并与分泌型酵母逆转录酶融合来转化烟草, 研究 2S 白蛋白的液泡定位信号。结果表明, N-末端及含有全部前导肽的前体都不能将逆转录酶定位到液泡, 而包括前体最末端 20 个氨基酸在内的 C-末端能够将逆转录酶有效地定位到液泡。进一步分析表明, C-末端的氨基酸残基为 13~16 个时仍能进行定位, 只是效率有所降低, 当 C-末端减少至 9 个氨基酸或更短时, 定位效率下降 30%, 这一部分包括前导肽 C-末端的 4 个氨基酸。逆转录酶在烟草中表达后定位在液泡, 当把 2S 白蛋白前体 C-末端的肽去掉时, 所有的平头 2 白蛋白都从烟草细胞中分泌出去。这表明, C-末端的肽在液泡定位中是必须的, 但并不有效, 必须至少加上成熟蛋白的 12 个氨基酸才能构成有效定位的完整信号。

Hoffman 等报道, 15 ku 的玉米醇溶蛋白能够在烟草等异源种子中表达, 且能在蛋白体上积累。Bagga 等报道, 玉米醇溶蛋白不仅储存在种子中, 且其定位和加工过程与菜豆蛋白等球蛋白不同。以 35S 为启动子的 B-菜豆蛋白只在种子中表达, 而在叶片中没有积累, 认为在叶中 B-菜豆蛋白定位到液泡中, 在液泡中很快发生了转变。对叶中蛋白体上玉米醇溶蛋白积累的观察发现, 玉米醇溶蛋白能够提高叶类作物的蛋白含量。

(2) 将重组蛋白定位到叶绿体 改变叶绿体的遗传和生化功能在许多方面很重要。叶绿体不仅是光合作用的场所, 也是脂质合成的位点, 同时, 还进行着淀粉和氨基酸代谢。负责叶绿体中功能酶的核编码基因含有 1 个编码转肽序列的区域, 这些位点可用来引导外源多肽到质体上。Falco 等利用这种方法在堪纳诺油菜和大豆种子中生产了高水平的游离赖氨酸。在转基因植物基因表达研究方面, GUS 是一种非常有效的报告系统, 且具有通用性。将 GUS 的 N-末端和 C-末端与外源蛋白融合后仍能保持酶活性, 使得 GUS 可作为定位研究中的报告酶。GUS 可以运输到植物细胞的叶绿体、线粒体及细胞核等, 在这些部位具有酶活性, 因此 GUS 可以作为叶绿体、线粒体及细胞核定位研究中的报告酶, 而 GUS 在内质网中没有酶活性, 不能作为内质网定位研究的报告酶。Iturriaga 等报道, 如果 N-连接的糖基化发生在第 358 位的天冬酰胺残基上, 会使 GUS 丧失酶活性,

Farrell等也报道,以丝氨酸替代第358位的天冬酰胺残基可以消除糖基化,但仍会使GUS的酶活性降低60%。GUS酶活性的改变可以作为分泌核空泡定位研究中的“报告子”。Firek等研究了野生型GUS和改良型GUS(GUS的N-末端与小麦A-淀粉酶的信号肽相融合)在内质网上的定位,结果表明,改良后的GUS定位到内质网上后仍具有酶活性,但大多数具有酶活性的GUS仍存在细胞内,并未分泌到细胞表面去。所以,这种改良后的GUS不适合作为蛋白分泌研究中的报告酶。

**5. 降低宿主植物蛋白酶活性** 通过在宿主中表达不影响其生长和发育的蛋白酶抑制剂基因,显著降低蛋白酶的活性,提高目的蛋白的产量。Van der等(2003)报道,在烟草胞质体中表达水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因 *oryzasystatin*,转基因烟草叶片中可溶性蛋白的含量提高了40%,未发现表型上的变化。Michaud D等(2003)在马铃薯中表达天门冬氨酸酶抑制剂基因,番茄组织蛋白酶抑制剂D,叶片总蛋白含量提高35%以上,植株的生长发育未受到影响。就目前对植物细胞蛋白水解过程的了解和转基因技术操作,在未来的几年内发展一种在细胞分泌途径无特异蛋白酶活性的转基因株系,为在“柔和”的环境中表达复杂的重组蛋白提供一个平台,这无疑是一项极富挑战性而无价的研究。

#### 四、翻译后的准确修饰

植物与动物分享一套较保守的蛋白合成系统,在植物中表达高等动物基因,植物细胞能对表达产物进行糖基化、酰胺化、磷酸化、亚基的正确装配等翻译后的加工,使表达产物具有与高等动物一致的生物活性。但植物对蛋白的加工也有自己一套与动物细胞不同的方式,在其中表达外源蛋白时带有植物特有的糖基等,而对动物可能具有免疫原性,导致产生免疫反应,或是蛋白的结构产生影响,从而影响蛋白的活性,这是制约植物生物反应器生产药用蛋白和多肽一个最主要的原因之一。因此,在植物中表达外源蛋白,特别是药用蛋白要求植物对其进行最准确的加工修饰,不加有植物本身而不是原蛋白有的基因。

植物中表达外源蛋白最受关注的是糖基化修饰。因为糖结构参与糖蛋白肽链的折叠、蛋白的进一步成熟、分拣、投送,最后的定位、分泌和代谢及蛋白立体结构的维系。在生物体内蛋白聚糖还能保护蛋白以免降解,并影响蛋白的热稳定性、可溶性、生物活性及免疫原性、清除频率(clearance rate)、蛋白与配体的相互作用等生理生化特性(Gomord和Fave,2004)。即使是细微的糖基化结构差异,也可能会影响植物生产药用蛋白的应用价值。因此,植物与动物在糖基化模式上的差别使植物作为生物反应器的广泛应用受到了限制(Gomord和Fave,2004;Lerouge等,2000)。同时,植物作为生物反应器的安全性也受到了威胁。图4-1显示动物细胞与植物细胞糖基化的差异。在植物过敏源的研究中,人们观察到植物的复杂型N-聚糖在花粉和植物起源的食物过敏源中频繁出现。此外,已有报道,过敏症状病人体内能够产生针对植物特异性N-聚糖的抗体(Lerouge等,2000;Obermeyer等,2004)。植物生产的动物源药用蛋白特别是单克隆抗体很有可能带有抗原决定簇,主要是 $\beta$ -1,2-木糖残基和 $\alpha$ -1,3-岩藻糖残基。这种蛋白质被长期、大量地注射到人体内就会产生免疫原性反应和各种不同的过敏症状。在分子农业迅猛发展的今天这是一个不容忽视、亟待解决的问题。



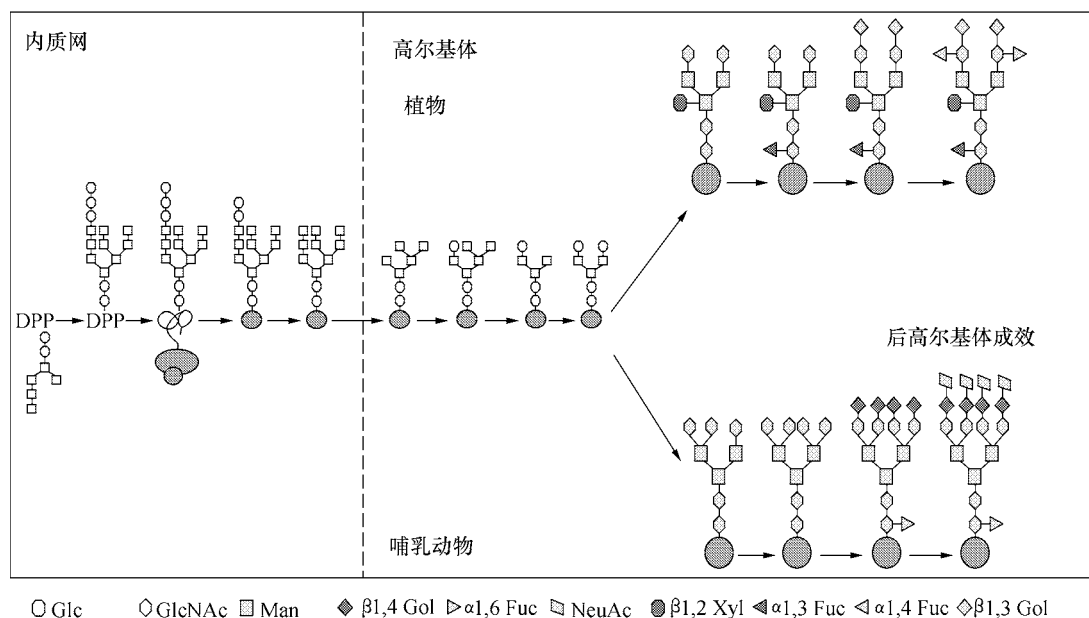


图 4-1 植物和哺乳动物细胞内质网和高尔基体中 N 端的糖基化

(Loic 等, 2005)

解决植物表达外源蛋白“忠实”的问题，也就是植物表达蛋白“人源化”的问题，包括外源蛋白在内质网定位、选择适宜的表达系统及其生理状态、抑制植物特异的糖基化酶，使其修饰方式人源化、降低植物特异糖基化修饰，转化哺乳动物特异糖基化酶等。

**1. 外源蛋白的内质网滞留** 一般认为给药用蛋白加上 ER 滞留信号，目的蛋白就会滞留于内质网而避免高尔基体中酶的修饰，因而不会产生抗原决定簇（图 4-2）。此策略适用于生物活性不依赖于非内质网内发生的转译后修饰的药用蛋白。Ko 等（2003）构建载体时，将 KDEL 基因分别连在单克隆抗体重链的 N 和 C 基末端，结果表达产物产生了大量（90%）不含植物特异糖基的少甘露糖型 N-糖蛋白，这种抗体与动物源抗体功能一致，仅仅是寿命稍短。

现有的研究表明，内质网滞留策略并不是完全可靠的。原因：一是植物表达的带有 K/HDEL 信号的蛋白稳定性很差；二是重组蛋白可以由高尔基体以囊泡的形式逆向转运至内质网。也就是说这种重组蛋白处在内质网和高尔基体间不断地循环的状态，在循环过程中药用蛋白很有可能被高尔基体酶修饰。

**2. 选择适宜的表达系统及其生理状态** 植物的 N-糖基化跟哺乳动物一样受到生理和环境因素的影响。比较烟草茎基部的老叶片、茎中部的成熟叶片和茎顶端的幼嫩叶片中表达抗体的糖基化结构后发现，在顶端幼嫩叶片中表达的抗体带有相对较多的高甘露糖型 N-聚糖，在老叶片中的抗体带有大量缺少岩藻糖和木糖残基。因此，在生产中选择生理状态较老的叶片进行加工或收集其分泌物，就可能得到无免疫原性，并具复杂型 N-聚糖结构的药用蛋白。这种方法适用于蛋白功能不依赖于动物特异糖基化末端（例如唾液酸末端）的重组蛋白在转基因植物中的生产。



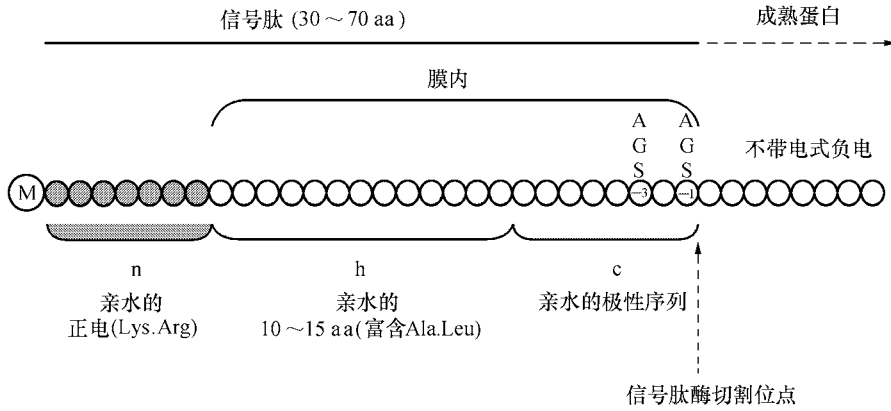


图 4-2 定位到内质网中的前体蛋白 N 断信号肽的结构  
(Loic 等, 2005)

同时, 不同植物品种对外源重组蛋白的 N-糖基化加工的修饰结果也不同。在拟南芥、烟草和苜蓿的悬浮培养细胞中, 蛋白被发现带有唾液酸末端。在苜蓿中表达的单克隆抗体 C5-1, N-聚糖的核心结构为 GlcNAc2Man3GlcNAc, 这个结构的半乳糖末端与动物具有相似性。因此, 这种苜蓿被认为有潜力表达出与动物源相同的 N-聚糖 (Bardor 等, 2005)。王洋等以农杆菌侵染法和花粉管通道法将人体白细胞介素-2 基因 (IL-2) 转入番茄、白菜、生菜和胡萝卜中。目前已经在番茄中获得具有生物活性的重组蛋白, 其他作物的转化及分子生物学检测工作正在进行中。

**3. 基于糖基转移酶的人源化策略** 应用抗体、核酶或 RNA 干预技术来对岩藻糖基转移酶和木糖转移酶进行抑制从而获得无植物特异性糖基修饰的转基因植株, 筛选 N-聚糖合成途径受阻的突变体植株进行转基因来表达生产重组蛋白。但大多植物的遗传背景复杂, 抑制岩藻糖基转移酶和木糖转移酶的效果不理想。

目前, 利用基因敲除技术对高尔基体酶进行修饰, 例如, 敲除基因以破坏  $\alpha-1,3$ -岩藻糖糖基转移酶和  $\beta-1,2$ -木糖糖基转移酶基因的表达产物的功能。苔藓具有与玉米、水稻、烟草拟南芥等高等植物完全一致糖基化模式。它具有高频同源重组特性的植物, 提供了一种高效、精确的基因敲除技术, 可操作性强。这项策略已取得了成功。Greenovation 公司利用高频同源重组特性将其  $\alpha-1,2$ -木糖残基转移酶和  $\beta-1,3$ -岩藻糖残基转移酶基因敲除, 获得了不带  $\alpha-1,2$ -木糖残基和  $\beta-1,3$ -岩藻糖残基, 但具有完整的植物糖基化模式的青苔表达人源化药用蛋白的生产体系。产物具有复杂型 N-聚糖, 不带有植物特异糖基末端的重组蛋白, 这种苔藓的生长发育与野生型并无差异 (Decke 和 Reski, 2004)。这无疑是一个鼓舞人心的人源化植物表达重组蛋白工程。

**4. 降低植物特异糖基化修饰, 转化哺乳动物特异糖基化酶** 高尔基体定位信号在动植物中是保守的, 在植物体内表达的动物源糖基转移酶和  $\alpha-2,6$ -唾液酸转移酶能够正确定位于高尔基体并发挥作用。Bakker 等 (2001) 首先获得能够稳定表达人源  $\beta-1,4$ -半

乳糖转移酶的烟草。然后，将这种转基因烟草与表达鼠抗体重链和轻链的烟草进行杂交。杂交后代中就有可以表达带有半乳糖末端的抗体。这种人源化的抗体的比例达到 30%，与动物杂交瘤细胞生物反应器的生产能力相当。

### 五、消除转基因对环境潜在的污染

转基因植物中的转基因随花粉、种子等的散落而进入环境中，最终进入食物链，给人们的生活带来潜在的危险；转基因植物生产药用蛋白，药用蛋白产物随植物的分泌物而挥发到环境中，给生产者的健康造成影响等。这些都是转基因植物生物反应器生产蛋白和多肽为人们接受所要求解决的问题。

可以从这几个方面着手解决：①在一个相对密闭的空间进行转基因植物的生产，如温室。②不进行核基因组的整合，在叶绿体等质体中表达目的产物。③将产物定位在种子中，避免向环境中泄露。④开发植物细胞培养技术，在如微生物发酵一样的密封空间中表达产物。⑤选择表型明显的选择标记，如颜色的变化等，很容易识别基因的流向。⑥用进行营养繁殖或自交的受体植物，避免花粉飘散导致转基因的漂移。⑦规范转基因植物生产的管理和员工相关的知识的教育等。

### 六、降低下游的分离、纯化的成本

微生物发酵纯化产物的许多技术和设备可用于从转基因植物中分离、纯化目的产物。但转基因植物生产蛋白和多肽一般储存在一个背景物质相对复杂的空间中，需要多工艺的流程才用纯化到应用要求，因而成本相对生产的环节来说较高。如何降低下游成本是另一制约植物生物反应器生产的因素。

就目前的研究，主要是在提高表达量的基础上，将产物富集在某个背景蛋白等少的细胞、器官空间，如质外体、油体，或进行分泌表达，产物在植物的乳液等分泌物中，或是悬浮培养的培养基中等。最近，研究利用种子中的油体来生产重组蛋白，除具有产物可长期保存，方便运输，增加农产品的附加值等优点外，最重要的是方便了下游的纯化。

油体是种子中的 TAG 分子分散形成的许多小的稳定的亚细胞微滴。油体表面除主要镶嵌有 oleosin 外，还镶嵌少量其他蛋白，如 caleosin。不同来源的 oleosin 除中部疏水区高度保守外，N 端和 C 端核苷酸差异很大，将外源的小分子量蛋白编码基因插入 oleosin 基因的 5' 和 3' 端，以 oleosin 启动子驱动目的蛋白与 oleosin 一起在转基因植物的油体中特异表达，不影响 oleosin 在植物油体上的定位。获得转基因植物种子后，将种子粉碎，利用油体的疏水性离心，将油相和水相分开，回收上层油体部分，即可除去种子中大部分 (80%) 的非目标成分，从而显著降低目的蛋白的分离纯化成本，因此，近年来备受关注。当融合的目的基因编码酶时，oleosin-融合酶可以直接使用，酶催化反应结束后还可以回收，用于下次的酶促反应，一般重复使用 2~3 次，仍保持较强的酶活力。若融合蛋白不具活性，则需要将目的蛋白从 oleosin 上切下来，在目的蛋白和 oleosin 融合之间引入一个蛋白酶切位点。

目前通过油体表达系统已成功地生产出有生物活性的葡萄糖，醛酸酶（GUS）（Gijs 等，1995；Witcher 等，1998）、木聚糖酶（Liu，1997）和水蛭素（Parmenter 等，1995）等。Moloney 等（2003）用 oleosin 融合，将重组蛋白定位油体中，方便分离纯化。总之，随着对油体蛋白基因及其启动子的研究的深入，以及基因工程技术的不断成熟，油体蛋白的应用将更为广泛。

## 七、小 结

随着基因工程领域的不断发展，植物体正在成为具有重要经济价值的异源蛋白的生产体系。据统计，迄今为止，已有几十种药用蛋白或多肽在植物中得到成功表达，其中包括人的细胞因子、表皮生长因子、促红细胞生成素、干扰素、生长激素单克隆抗体和可作为疫苗用的抗原蛋白等。异源蛋白在转基因植物中的表达水平最低的是人的表皮生长因子，占可溶性总蛋白的 0.001%，最高的为肌醇六磷酸酶，也仅占可溶性总蛋白的 14%。如何提高外源蛋白的表达量、如何保证表达产物的“忠实”加工、如何消除对环境和人类潜在的危险、如何有效、低成本地纯化产物，成为该植物生物反应器能否进行商业化生产的关键。今后应该着重从蛋白的表达调控、异源蛋白的分泌及细胞定位等方面来研究如何提高目的蛋白的表达量；用人源化植物蛋白修饰机制来表达“忠实”的产物；从人类与环境的安全来消除转基因的漂移；从商品化高度来降低纯化的成本等，使这个新的、极富经济价值的“生命”成长起来，为人类更多的生命生产药物、工业酶类、工业原材料、保健食品等。

## 参 考 文 献

- [1] 陈廷速，杨海杰，张军等．人表皮生长因子（hEGF）基因的合成、鉴定及植物表达质粒的构建．广西大学学报，2002，27(2)：122~127
- [2] 戴潍，施定基，张卉等．人表皮生长因子（hEGF）基因在蓝藻中的表达．植物学报，2001，43(12)：1260~1264
- [3] 李钱锋，刘巧泉，张达江等．转基因水稻中重组植酸酶的表达．中国水稻科学，2006，20(3)：243~247
- [4] 魏兰珍，金锐，马为良等．HGM-CSF 基因穿梭表达载体的构建及其在鱼腥藻 7120 中的克隆．植物研究，2005，25(4)：36~440
- [5] Bakker H, Bardor M, Molthoff JW, et al. Galactose - extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(5)：2899~2904
- [6] Bardor M, Loutelier - Bourhis C, Paccialet T, et al. M monoclonal C5 - 1 antibody produced in transgenic alfalfa plants exhibits a N - glycosylation that is homogenous and suitable for glyco - engineering into human - compatible structures. Plant Biotechnology Journal, 2005, 1(6)：451~462
- [7] Boehm R., Zoglauer K., Barth S., et al. Plant In - Vitro Culture as an Alternative for the Production of Recombinant Protein - Based Therapeutics. Conference Plant - Made Pharmaceuticals, 2005
- [8] Coello P, Maughan J P, Mendoza A, et al. Generation of low phytic acid Arabidopsis seeds express-

- ing a E. Coli phatase during embryog development. Seed Science Research, 2001, 11: 285~291
- [9] D' Aoust MA, Lerouge P, Busse U, et al. Efficient and reliable production of pharmaceuticals in alfalfa. In Molecular Farming: Plant - made Pharmaceuticals and Technical Proteins. Edited by Fischer R, Schillberg S. New York, John Wiley & Sons, 2005
- [10] Dai, Z. Y. et al. Improved plant - based production of E1 endoglucanase using potato: expression optimisation and tissue targeting. Mol. Breed, 2000, 6: 277~285
- [11] Decke rE L, Reski R. The moss bioreactor. Curr Opin Plant Biol, 2004, 7 (2): 166~170
- [12] De Wilde, C. et al. Expression antibodies and Fab fragments in transgenic potato plant: a case study for bulk production in crop plants. Mol. Breed. 2002, 9: 2871~2882
- [13] Fernandez - San Milan A, Mingo - Castel A, Miller M, et al. Achloroplast transgenic approach to hyper - express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible ti proteolytic degradation. Plant Biotechnol, 2003, 1: 77~79
- [14] Fischer, R. et al. Towards molecular farming in the future: using plant - cell - suspension cultures as bioreactors. Biotechnol. Appl. Biochem, 1999, 30: 109~112
- [15] Fischer R, Emans N. Molecular farming of pharmaceutical proteins. Transgen Res 2000, 9: 279~299
- [16] Fischer R, Schillberg S. New York: John Wiley & Sons, 2004
- [17] Gomord V, Faye L. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. Curr Opin Plant Biol, 2004, 7(2): 171~181
- [18] Hood, E. E. et al. Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. Mol. Breed, 1997, 3: 291~306
- [19] Witcher, D. R. et al. Commerical production of  $\beta$  - glucuronidase: a model system for the production of proteins in plants. Mol. Breed, 1998, 301~312
- [20] Kapila J, DeRycke R, VanMontagu M, et al. An Arrobacterium - mediated transient gene expression system for intact leaves. Plant Sci, 1997, 122: 101~108
- [21] Knäblein J. A New Era in the New Millennium - Biopharmaceutic Drugs Manufactured in Novel Expression Systems. Biotech, 2003
- [22] Ko k, Tekoah y, Rudd P M, et al. Function and glycosylation of plant - derived antiviral monoclonal antibody. Proc Natlaced Sci USA, 2003, 100(13): 8013~8018
- [23] Kunka Kamenarova<sup>1</sup>, Nabil Abumhadi<sup>1</sup>, Kostadin Gecheff, et al. Molecular farming in plants: An approach of agricultural biotechnology. Journal of Cell and Molecular Biology, 2005, 4: 77~86
- [24] Leelavathi S, Gupta N, Maiti S, et al. Overproduction of an alkali - and thermo - stable xylanase in tobacco chloroplasts and efficient recovery of the enzyme. Mol Breed, 2003, 11: 59~67
- [25] Lerouge P, Bardor M, Pagny S, et al. N - Glycosylation of Recombinant Pharmaceutical Glycoproteins Produced in Transgenic Plants: Towards an Humanisation of Plant N - Glycans. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2000, 1: 347~354
- [26] Li J, Hegeman C E, Hanlon R W, et al. Secretion of active recombinant phytase from soybean cell - suspension cultures. Plant Phusiol, 1997, 114: 1103~1111
- [27] Loïc, Fayea, Fayea, et al. Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. L. Faye et al. Vaccine, 2005, 23: 1770~1778
- [28] Matsumoto S, Ikura K, Ueda M. Characterization of a human glycoprotein(erythropoietin, EPO) produced in cultured tobacco cells. Plant Molecular Biology, 1995, 27: 1163

- [29] Michaud D, Anguenot R, Brunelle F. Method for increasing protein content in plant cells. US Patent application 2003
- [30] Moloney M. et al. Oil bodies and associated proteins as affinity matrices. US Patent, 2003
- [31] Obermeyer G, Gehwolf R, Sebesta W, et al. Over-expression and production of plant allergens by molecular farming strategies. *Methods*, 2004, 32(3): 235~240
- [32] Pen J, Verwoerd T C, van-Paridon P A, et al. Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *Bio/Technology*, 1993, 11: 811~814
- [33] Sardana R K, Alli Z, Dudani A, et al. Biological activity of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor is maintained in a fusion with glutelin peptide. *Transgenic Res*, 2002, 11(5): 521~531
- [34] Shadwick FS, Doran PM. Foreign protein expression using plant cell suspension and hairy root cultures. In *Molecular Farming: Plant-made Pharmaceuticals and Technical proteins*. Edited by Stoger, E. et al. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol. Biol.* 2002, 42: 583~590
- [35] Van der Vyver C, Schneideret J, Driscoll S, et al. Oryzacystatin I expression in transformed tobacco produces a conditional growth phenotype and enhances chilling tolerance. *Plant Biotechnol J*, 2003, 1: 101~112
- [36] Verwoerd T C, van-Paridon P A, van-Ooyen A J, et al. Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in transgenic tobacco leaves. *Plant Physiol*, 1995, 109: 1199~1205
- [37] Voinnet O, Rivas S, Mestre P, et al. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J*, 2003, 33: 949~956
- [38] Witcher D R, Hood E E, Peterson D. Commercial production of  $\alpha$ -glucuronidase, a model system for the production of proteins in plants. *Molecular Breeding*, 1998, 4: 301~312
- [39] Woodard, S. L. et al. Maize-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial production from transgenic plants. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 2003, 38: 123~130



## 第五章 转基因植物生产糖类物质

### 第一节 生产糖类物质的基本原理

糖类 (saccharide) 是细胞中非常重要的一类化合物, 作为生物体的结构成分, 为生命活动提供主要的能源物质, 在代谢活动中转化成氨基酸、核苷酸、脂肪酸的碳骨架, 同时, 也可以作为细胞识别的信息分子。糖类根据其聚合度分为单糖 (monosaccharide)、双糖 (disaccharide)、寡糖 (oligosaccharide) 和多糖 (polysaccharide, 20 个以上的单糖分子聚合而成)。多糖根据水解产物的不同质性分为同多糖 (homopolysaccharide) 和杂多糖 (heteropolysaccharide) 两种。

利用基因工程对糖类品质改良主要包括淀粉组成的改良和对糖——特别是某些具有特殊工业、医疗及保健用途的糖的含量的调控。直链淀粉在工业等方面有很重要的用途, 但分离困难, 而某些糖类具有很特殊的用途, 但它们在植物体内积累的浓度极低, 并且常分布在稀有植物的某些组织中。尽管有人试图采取一定的措施增大这些物质合成的量, 但皆因其合成的多酶促反应的复杂性而进展缓慢。因此, 用传统的方法分离、发酵生产或通过改善栽培措施来生产这些糖类物质不仅成本高, 而且产量低, 技术难度大, 很难达到应用上的大规模生产。利用转基因植物生产植物来源的糖类物质提供了一种安全、廉价、可靠、可大规模并持续生产糖类物质的新途径, 且有一些成功的报道。在植物中生产糖类物质涉及许多复杂的生理代谢过程, 因此, 成功地在转基因植物中生产糖类物质应从以下几个方面考虑:

一是对与糖类合成相关的代谢途径的研究及其相关基因的鉴定、特征分析及克隆。随着基因组学研究的深入, 大量的功能基因被发现和克隆, 为基因工程奠定了基础。另一方面, 植物中一些重要生理过程和产物的生化代谢途径被阐明, 为合理利用基因资源, 调节代谢途径, 定向地控制目的基因的表达, 以及进一步通过基因工程手段调控植物提供了条件。通过代谢调节, 可以调控植物的生长发育, 可使植物高水平积累某一有价值产物。研究富集人类所需某种糖类物质的植物的糖类合成及代谢过程无疑是一条快速地实现糖类物质通过转基因植物大规模生产的途径。

代谢转基因是通过基因工程技术对细胞内的代谢途径进行遗传修饰, 进而完成细胞特性改造。通过生物合成中间体的分析, 找到生物合成的速度限制步骤, 分离限速步骤的合成酶基因, 并导入细胞内增加限速酶的表达量, 从而提高目标代谢物的产量。人们已经克隆了许多代谢途径中的酶类基因, 对这些基因进行操作, 能够获得产生新的或改良的碳水化合物或次生代谢物的转基因植物。糖类物质 (如淀粉) 是许多植物的代谢物和储藏物。通过转基因植物可改善自身糖类的某些特性, 以便有利应用。

二是对受体植物遗传背景、代谢特征及转基因产物的影响进行较全面的研究。要充分利用作物的全部生物合成能力, 就需要全面了解植物的代谢途径和植物生化所涉及

的调控过程。当在植物代谢途径中通过基因工程引入新的支路时，应确保所导入的酶对底物具有足够高的亲和力，否则难以同内源性酶竞争。此外还要注意的，新的糖对植物生理发育的影响可能会限制所合成的产物的量，同时，产生这些产物的组织或细胞空间也可能阻抑产物的积累。例如，果聚糖在含有液泡定靶信号序列的果糖转移酶基因的烟草植株中的积累不会造成任何畸形表型，而含有非质体定靶信号序列的该基因的植株则表现为深度坏死。因此，工程产物对植物生长发育可能存在的某些消极影响，可以由于基因产物被定靶适当的细胞空间而抵消。通过使用组织特异性启动子即可达到这一目的。例如，用处在花椰菜花叶病毒（CaMV）增强型 35S 启动子控制下的大肠杆菌 ADP 葡萄糖焦磷酸化酶基因（*glgC16*）转化植物，所得到的能表达该基因的植株极少，而处于块茎特异性表达的马铃薯块茎蛋白启动子控制下的该基因却获得了大量表达。

三是发展成熟的遗传转化手段及转基因操作技术。目前在许多模式植物中可以很成功、方便、快速地实现多种基因的遗传转化，我们可以利用这些模式植物来研究一种新基因的功能、表达模式及其表达调控，甚至就利用这些模式植物作为反应器生产我们所需特征的糖类。同时，寻找某些遗传背景较简单、合成关键酶作用底物丰富的植物种类，建立其高频的转化体系，成功地在其中实现目的基因的遗传转化。

在转基因植物中生产满足工业生产和人们生活需要的糖类物质的转基因技术主要有正义、反义和 RNA 干涉技术。

正义技术是相对反义抑制技术来说，即将合成某种糖的关键酶基因导入受体植物中，使基因的剂量增加或在没有这种基因的物种中加进新的合成酶基因，从而达到在这种植物中高表达目的产物的方法。如将来自大肠杆菌  $K_{12}$  突变株系的 AGPase 基因——*glac16* 与质体转运肽基因融合，在马铃薯块茎特异表达启动子的操纵下表达，转化的马铃薯块茎淀粉的含量比对照增加 35%，有些株系甚至高出 60% 之多 (Visser, 1993)。

反义技术主要是设计一类能有效抑制某一目的基因表达的反义 RNA (antisense RNA, asRNA)、反义 DNA (antisense DNA, asDNA) 及核酶 (ribozyme)，将它导入细胞中，达到封闭该基因的表达或者造成新的突变表型。反义技术提供了直接有效地为人类控制基因表达的方法，现在已成为基因工程研究中一项重要的技术。目前反义技术正日益广泛地应用于基因表达调控的研究和基因工程中，成为基因工程操作中的一个强有力的工具。糖类物质的生产涉及多步酶促反应，用反义技术抑制某些或某步酶促反应可有效地达到改变代谢方式，生产出达到生产和生活要求特征的糖类物质。如把编码直链淀粉合成的关键酶 GBSS 的反义基因反向导入马铃薯中，可产生不含或只含少量直链淀粉的淀粉。这种淀粉适合食品和造纸业。

RNA 干涉作用 (RNA interference, RNAi) 是指在生物体细胞内，外源或内源的双链 RNA 引起与之同源的 mRNA 特异性降解，因而抑制其相应基因表达的过程。作为一种新的、强有力的研究工具，RNA 干扰在功能基因组学研究中显示了巨大应用潜力 (Hammond 等, 2001)。柴晓杰等构建分支酶基因 *sbe2b* 的 siRNA 表达体系转化玉米，有效地抑制内源淀粉分支酶 mRNA 的翻译，使淀粉分支酶活性明显降低，在淀粉总含量基本不变的情况下，大大提高直链淀粉的含量。

## 第二节 转基因植物生产糖类物质的进展

### 一、转基因植物生产蔗糖

蔗糖 (sucrose) 是一种重要的双糖。与蔗糖合成及代谢相关的酶主要包括蔗糖磷酸合成酶 (sucrosephosphate synthase, SPS)、蔗糖合成酶 (sucrose synthase, SS) 和转化酶 (invertase) 3 种。SPS 是一种可溶性酶, 活性最适 pH 约 7.0, 存在于细胞质中, 催化如下可逆反应:  $\text{UDPG} + 6\text{-磷酸果糖} \rightleftharpoons 6\text{-磷酸蔗糖} + \text{UDP}$ 。SPS 由 Leloir 在 1995 年首次在小麦胚芽中测到, 之后相继在玉米、菠菜、柑橘、苹果、甘蔗、水稻等作物中克隆到 SPS 基因。SS 是一种存在细胞质中的可溶性酶, 有些不溶的 SS 附着在细胞膜上, 催化果糖 + UDPG  $\rightleftharpoons$  蔗糖 + UDP。通常认为 SS 主要起分解蔗糖的作用。大多数植物中至少有两种 SS 的同工酶, 在基因调控上有明显不同, 基因表达有发育和器官特异性。转化酶将蔗糖水解为果糖和葡萄糖。目前转化酶基因已从番茄、玉米、马铃薯、甘蔗、葡萄、胡萝卜等中被克隆。Wornal 等将玉米的蔗糖磷酸合成酶基因导入番茄叶片, 观察到该酶的活性增加了 1 倍, 并引起转基因叶片的淀粉含量降低, 蔗糖含量升高。另外, 通过反义技术, 抑制淀粉等多糖的积累, 蔗糖等可溶性糖的含量就升高, 达到富含蔗糖的目的。

### 二、转基因植物生产海藻糖

海藻糖 (trehalose) 是一种安全的天然糖类, 1832 年由 Wiggers 从黑麦的麦角菌中首次提取出来。随后的研究发现, 人们日常生活中食用的蘑菇类、海藻类、豆类、虾、面包、啤酒及酵母发酵食品中都有含量较高的海藻糖。海藻糖是由两个葡萄糖分子以  $\alpha, \alpha, 1, 1$ -糖苷键构成的非还原性糖, 自身性质非常稳定, 并对多种生物活性物质具有神奇的保护作用。海藻糖在高温、高寒、高渗透压及干燥失水等恶劣环境条件下能稳定细胞膜和蛋白质的结构, 有效地保护细胞膜和蛋白质分子不变性、失活。这一独特的功能特性, 使海藻糖可作为防止食品化、保持食品新鲜风味, 提升食品品质的独特食品配料。随着生物技术、化妆品技术的进步, 海藻糖在皮肤的抗衰老、抗疲劳、补充能量、伤口修复、防晒、晒后修复中的应用将会产生突破性的进展。毫无疑问, 海藻糖对人类的美容、护肤、护发将会展示出越来越多的神奇功效。

现在使用的提取方法主要是从酵母中提取, 成本高达每千克 200 美元以上, 因此, 难以大规模推广使用, 只能作为科学实验和医药用途。要想将它作为一种大规模使用的配料, 对食品公司来说实在是太昂贵了。然而, 植物却有潜力成为低成本海藻糖的一个来源。Goddjin 等在烟草和马铃薯中导入大肠杆菌中海藻糖合酶基因, 结果在这些转基因植物中积累了少量的海藻糖, 并采用 *valida-myelin A* 抑制海藻糖酶的水解作用, 大大提高了海藻糖含量。荷兰 Mogen 公司与 D Tvander Have 公司于 1992 年开始从事利用重组植物生产海藻糖的研究, 设法提高如甜菜、马铃薯等农作

物中海藻糖含量，已取得了其生产技术的专利保护。最近，植物生物技术公司 Mogen（荷兰雷顿）和 Calgene（美国加州戴维斯）都报道了在转基因烟草中小量合成海藻糖。

### 三、转基因植物生产寡糖

寡糖（oligosaccharides）一般是指由 3~10 个分子的单糖（monosaccharide）组成的聚合物，其分子式为  $(C_6H_{10}O_5)_n$ ， $n=3\sim 10$ 。自然界中，寡糖类与蔗糖、麦芽糖和乳糖等一般双糖类不一样，很少以游离状态存在。寡糖及糖缀合物是生物体内重要的信息物质。最新的研究表明，寡糖不仅以它们的缀合物在起作用，很多寡糖本身就有重要的生理功能，加之其在食品工业上的应用与发展，有关寡糖的研究及应用已成为结构化学、分子生物学、医学和食品学的新兴研究领域。

环化糊精是含有 6 个 ( $\alpha$ )、7 个 ( $\beta$ ) 或 8 个 ( $\gamma$ ) $\alpha$ -1,4-键的吡喃葡萄糖单位的环状寡糖。它们那独有的圆筒结构可以携带“外来”分子，有可能用来传送药物、增加鲜味和香气，以及从食品中除去不需要的物质（如咖啡因等）。目前由于体外生产环化糊精的成本较高而限制了它的应用，但在植物体内进行环化糊精的大规模生物合成却是可行的。肺炎克氏杆菌的环糊精葡萄糖基转移酶（CGT）基因在马铃薯块茎造粉体中的表达，已合成出  $\alpha$ -和  $\beta$ -环糊精，但其含水量水平仅相当于淀粉总量的 0.001%~0.01%。这样低的含量可能是因为酶基因表达的差异所致，或者是只有极少数的酶接近淀粉底物的缘故。在商品加工过程中，可以通过预先水解克服后一弊病。因为这一处理增大了淀粉的可溶性，使之更易与酶接近。还可以通过向马铃薯转入环化糊精糖基转移酶（CGT）基因，使转基因马铃薯中表达环化糊精，这比利用学方法合成环化糊精的成本要低得多。

### 四、转基因植物生产淀粉

在绿色植物中，淀粉（starch）是仅次于纤维的第二类糖。淀粉是许多粮食作物种子和储藏器官的重要组成成分，是高等植物重要的储存多糖。在人类的生活中，淀粉有着举足轻重的作用。它不仅是人们的能量和营养来源，而且还是重要的工业原料。对淀粉合成的研究一直没有间断过。

淀粉根据结构的差异分为直链淀粉和支链淀粉两种。直链淀粉是由  $\alpha$ -1,4-糖苷键连接而成的多聚糖，一般占淀粉组成的 30%左右。支链淀粉是由  $\alpha$ -1,4-糖苷键和  $\alpha$ -1,6-糖苷键连接而成的多聚糖，它是淀粉的主要组成部分，占 70%左右。直链淀粉呈线状，分子量小，在水中加热易形成凝胶；而支链淀粉则高度分支，分子质量大（一般是直链淀粉的 1000 倍），水溶液的黏度较高。因此，直链淀粉和支链淀粉的含量比例影响着淀粉粒的结构和特点，进而影响淀粉的质量、功能和应用领域。20 世纪 90 年代以后，随着淀粉合成过程中相关酶的基因克隆以及各种植物遗传转化体系的相继建立，利用基因工程进行淀粉合成的调控已有大量报道。

### (一) 目前工业、医疗、保健急需特征淀粉的概念及其功能应用

**1. 直链淀粉** 直链淀粉 (amylose) 在淀粉深加工工业中已成为不可缺少的原料, 用途涉及 30 个领域, 尤其当今世界石油资源匮乏更显重要。由于直链淀粉的抗切力、强度高和良好的抗水性, 可用于起皱和胶黏剂工业。直链淀粉还可用于多种胶片和各种胶条的制造。用直链淀粉制造的胶片具有突出的透明度、弹性、抗拉强度和抗水性。直链淀粉可使淀粉发泡产品的密度下降, 硬度增大, 而剪切强度下降。直链淀粉不仅在强化食品的物性改良与品质方面应用广泛, 而且直链淀粉及其衍生物制品在食品、医药、工农业以及生态环境材料方面也有广泛的用途。用直链淀粉可制造一种半透明纸, 不透氧气和氮气, 透二氧化碳和脂肪也很少, 且这种纸可食用; 直链淀粉和环氧丙烷可合成羟丙基淀粉, 其具有成膜不透氧性、保水性、受 pH 影响小的非离子特性, 无毒、易溶于水, 具有良好的生物降解性。美国曾申请过直链淀粉生产薄膜的专利, 这种膜不管是在冷还是热的情况下都不溶化, 即可包装粉料又可包装速冻食品。美国玉米公司在内布拉斯加 (中西部研究所驻地) 建立了大型的直链淀粉膜的实验工厂。目前, 国外直链淀粉衍生物已广泛应用于食品、造纸、纺织、医药、皮革、选矿、涂料、塑料、铸造、环保和日用化妆品等工业部门。

目前, 直链淀粉及其衍生物在多个领域取得较显著的进展 (表 5-1)。国内淀粉和淀粉衍生物的研发主要以玉米和木薯这两类淀粉为主要原料。但从普通淀粉中分离直链淀粉成本很高, 随着与淀粉合成相关基因的克隆, 通过基因工程可实现对淀粉生物合成过程的调控, 从而选育具有高直链淀粉的作物新品种。其中通过导入淀粉分支酶基因的反义结构, 影响细胞内酶的含量或活性, 提高直链淀粉含量的研究受到重视。

表 5-1 直链淀粉及其衍生物的应用

| 应用方向  | 应用目标                      | 性能                              |
|-------|---------------------------|---------------------------------|
| 包装材料  | 食品包装、普通包装与覆盖层、药品及糖果类包装    | 高透明度、无毒、可食、不透油、不透氧、耐水、增塑、可生物降解等 |
| 食品添加剂 | 各种糕点、面包、果酱、果汁、肠类、果胶与胶质蜜饯等 | 改善品质、抗老化性、增稠、减少收缩、降低凝胶化时间       |
| 医药工业  | 药品造粒黏合剂、血浆增量剂、绷带、缝合线等     | 无毒、水溶性、黏合                       |
| 纺织工业  | 印花浆料、纺织浆料等                | 高黏度与所需求的不黏着的低稠度, 提高润滑性和耐磨性      |
| 建筑材料  | 吸声贴片、瓦楞板、混凝土等             | 黏合、高度保水性和成膜性                    |
| 日用化工  | 化妆品等                      | 成膜性、透明性、水溶性                     |
| 造纸工业  | 影印制版保护涂膜液、美术纸和涂料的涂饰薄膜等    | 高强度、高弹性、高硬度、高透明等                |

**2. 支链淀粉** 含支链淀粉高的淀粉成胶容易, 产生清澈的糊浆, 用做食品加工的稳定剂、稠化剂及色拉的乳化剂, 及造纸业。同时, 有较好的冻融稳定性, 可应用于



食品加工行业。

**3. 抗性淀粉** 抗性淀粉 (resistant starch, RS) 的定义从消化的角度看, 淀粉进入体内后, 绝大部分被小肠消化吸收, 一小部分可逃避胰腺淀粉酶和普鲁蓝酶等淀粉酶的水解而进入大肠, 被大肠微生物利用, 最终排出体外, 前者叫可消化淀粉 (digestible starch), 后者叫抗性淀粉。研究表明, RS 不能在小肠消化吸收和提供葡萄糖, 在大肠可被生理性细菌发酵, 产生短链脂肪酸和气体。RS 可以说是一种新型的膳食纤维, 在某些方面远优于普通膳食纤维。在体外实验中, RS 的定义是不能被  $\alpha$ -淀粉酶消化的淀粉。RS 由结晶区和无定形区组成。结晶区主要由直链淀粉双螺旋相互叠加而构成, 无定形区由无序排列的淀粉构成。RS 抗淀粉酶消化的能力源于直链淀粉晶体 (Bjock 等, 1987)。根据形成的方式不同, 将抗性淀粉分成不同的种类, 其中有些是化学修饰淀粉, 主要由基因改造或化学方法引起的分子结构变化产生, 如乙酰基、热变性淀粉及磷酸化的淀粉等 (Haralampu, 2000)。

抗性淀粉 (RS) 具有重要的生理功能, 表现在: ①降低血糖。食用富含 RS 食品后, 血糖的升高和血糖总量显著低于食用其他碳水化合物, 这对改善 H 型糖尿病的代谢控制具有良好的作用。②降血脂和控制体重。RS 作为减肥保健食品添加剂, 对心血管疾病和节制饮食、减肥、通便十分有益。③有利肠道健康。RS 比膳食纤维更易被大肠中的微生物所发酵, 产生挥发性的短链脂肪酸, 能抑制癌细胞的生长, 防止便秘, 预防胃肠道疾病, 尤其是结肠癌等。④促进矿物质的消化和吸收。⑤增加营养。RS 在大肠内发酵可产生多种短链脂肪酸, 且肠道的大肠杆菌还能合成泛酸、尼克酸、核黄素等人体不可缺少的生命物质。联合国粮农组织 (FAO) 和世界卫生组织 (WHO) 1998 年在《人类营养中碳水化合物专家论坛》一书中指出: “抗性淀粉的发现及其研究进展, 是近年来碳水化合物与健康关系的研究中一项最重要的成果”。

Niba 总结了开发 RS 功能食品的主要途径 (Niba, 2002): ①筛选高 RS 原料生产感官品质好, 受消费者喜爱的食品; ②采用加工技术提高食品中 RS 含量; ③开发自然界存在的 RS 基础产品; ④保持食品中 RS 水平的稳定; ⑤遗传改良直链淀粉和支链淀粉的比例。目前, 绝大多数的研究重点集中于以高直链含量的淀粉为原料, 通过加工提高 RS。开发的 novelose 等 RS 产品, 只作特殊人群的辅助食品利用 (Kishida 等, 2001)。

## (二) 植物淀粉合成关键酶的生化 and 分子生物学研究

**1. ADP 焦磷酸化酶** (ADP - AGpyrophosphorylase, ADP - AGPase) AGPase 的作用是把来自光合作用的葡萄糖 - 1 - 磷酸 (G-1-P) 和 ATP 转变成 ADP-葡萄糖 (ADP - glucose, ADP - Glc) 和 ADP, 其中 ADP - Glc 是合成淀粉的底物, 因此, AGPase 被认为是合成淀粉的限速酶。AGPase 是由成对的两个大小亚基构成的异源四聚体。大亚基 (LSU) 分子量为 51~60 ku, 小亚基 (SSU) 分子量 50~55 ku, 二亚基之间的进化关系非常近 (Doan 等, 1999)。在功能上, LSU 是酶活性的调节中心, 而 SSU 是酶活性的催化中心, 是酶别构效应的关键部位, 比 LSU 更为保守 (Johnson 等, 2003)。玉米 AGPase 的 LSU 突变体 Sh2 与 SSU 突变体 Bt2 内 AGPase 活性下降了 90%~95%, 淀粉含量降低了 75%; 拟南芥 AGPase 小亚基突变体 adg1-1 内几乎检测不到 AGPase 活

性 (Wang 等, 1998), 大亚基突变体 *adg2-2* 体内 AGPase 活性也仅为野生型的 5% (Li 和 Preiss, 1992)。这表明大小亚基功能上相互依赖, 缺一不可, 在 AGPase 的酶活性上有同样重要贡献。

3-磷酸甘油酸 (3-PGA) 和无机磷 (Pi) 能与 AGPase 结合, 调控 AGPase 的酶活性。大多数植物的 AGPase 受 3-PGA 激活, 而为 Pi 所抑制, 这两个别构效应因子在植物光合机构控制淀粉的合成中发挥着重要作用, 可能是因为当细胞内 ATP 数量较少时, Pi 能降低 AGPase 活性, 当高水平的碳流进入储藏组织时, 原先受 Pi 抑制的 AGPase 被 3-PGA 激活 (Gomez 和 Iglesias, 2002)。虽然光合器官中的 AGPase 对上述调控因子非常敏感, 但有研究发现, 一些植物营养物质储藏器官的 AGPase 对调控因子不敏感 (Weher 等, 1995)。

AGPase 分为胞质型与质体型两种, 在植物细胞中的分布具有组织特异性。在大多数植物细胞中, AGPase 主要是质体型, 催化形成 ADP-Glc 的反应也主要在质体中进行。然而, 在禾本科植物的胚乳中, AGPase 主要是胞质型的, 生成 ADP-Glc 的反应则主要在胞质中发生 (Tetlow 等, 2003); 而非禾本科植物中尚未发现胞质型 AGPase 的存在 (Beckles 等, 2001)。禾本科植物胞质 AGPase 类型的突变体, 如玉米的 *Sh2* 和 *Bt2*, 大麦的 *Ris-16* 等突变体内 AGPase 活性下降的幅度均超过了 95%, 淀粉含量均显著低于正常水平。表明禾本科 ADP-Glc 的合成主要是由胞质型 AGPase 所催化。

近年来的研究表明, 经 AGPase 催化合成的 ADP-Glc 需在质膜 ADP-Glc 核酸糖转运蛋白 (nucleotide sugar, NST) 的作用下, 跨过质体膜进入到质体中, 才能参与淀粉的合成。最早转运蛋白的研究集中在玉米上。玉米 *Bt1* 位点编码了位于质体内膜上的 NST, 它是质膜上 ADP-Glc 最重要的转运蛋白, 缺失或使此转运蛋白失活的突变体 *brittle1*, ADP-Glc 到质体的转运受阻, 在胞质中明显积累, 淀粉合成速率下降 80% (Shannon 等, 1998)。Patron 等 (2004) 在许多低淀粉含量的大麦突变体中, 发现了胞质内 ADP-Glc 含量异常高的 3 个突变体, 它们均在 *lys5* 位点上发生突变。从这些突变体内分离出的质体虽能合成淀粉, 但合成淀粉的底物不是来自于 ADP-Glc, 而是来自于 Glc-1-P, 表明胞质 ADP-Glc 到质体的运转受到了严重伤害。序列比较结果显示它与玉米 ADP-Glc 的转运蛋白 (BT1) 同源。编码此蛋白的基因 (*Hv.Nst1*) 定位在大麦第 6 染色体 (6H) 上, 3 个突变体的 *lys5* 等位基因位点均缺失 *Hv.Nst1* 基因。其中两个 *Hv.Nst1* 突变体产生的突变可导致氨基酸主域的改变, 而这一主域对所有 HVNST1 转运蛋白家族的成员来说是保守的。3 个突变体内淀粉含量非常低的特征, 表明 ADP-Glc 转运蛋白对淀粉合成的正常速率是必须的; *Hv.NST1* 蛋白与玉米 BT1 同源的结果可推测出同源的 ADP-Glc 转运蛋白存在于所有禾谷类植物中。

**2. 淀粉合成酶 (starch synthase, SSase or SS)** SS 是以寡聚糖为前体, ADP-Glc 作底物, 通过  $\alpha-1,4$  键连接, 把 ADP-Glc 上的 Glc 连到寡聚糖上, 形成直链淀粉或分支淀粉的延伸分支链。根据在提取液中与淀粉粒的结合程度, SS 分为颗粒结合淀粉合成酶 (granuleboundstarchsynthase, GBSS) 与可溶性淀粉合成酶 (solublestarchsynthase, SSs)。GBSS 与淀粉粒紧密结合在一起, 而 SSs 与淀粉粒结合程度较弱。GBSS 又分为 I 与 II 类, SSs 至少分为 (68~76 ku)、(75~95 ku) 和 (约 135 ku) 3 类。

GBSS 是研究最多的淀粉合成酶，分子量为 60 ku 左右，氨基酸序列在不同物种间具有很高的保守性。在植物的不同组织中存在一种或两种 GBSS (GBSS 和 GBSS, 或 GBSSa 和 GBSSb) 的同工酶。GBSS I 与 II 的主要功能是参与直链淀粉的合成。

一些植物 GBSS 突变体的胚乳内，检测不到直链淀粉的存在，合成的淀粉均是支链淀粉。另外，利用反义 RNA 技术特异抑制植物体 GBSS 基因表达，降低 GBSS 活性，也导致胚乳中直链淀粉的比例下降 (Edwards, 2002)，表明 GBSS 对胚乳直链淀粉的合成起着重要作用。但 GBSS 也对直链淀粉的合成起作用。大麦 GBSS 突变体胚乳中仍有少量直链淀粉的存在，占总淀粉含量的 0.4%~9%，Patron 等 (2002) 认为这可能是因为大麦胚乳中含有 GBSS 与 GBSS 两种同工酶，均与直链淀粉的合成有关。一种突变只造成胚乳直链淀粉数量的减少，只有两种同时突变才能使直链淀粉消失；而上述小麦胚乳中只存在 GBSS，它的突变可造成胚乳直链淀粉的完全消失。

GBSS 可能对胚乳支链淀粉的合成也具有一定影响。豌豆的 GBSS 与支链淀粉的亲合性要高于直链淀粉，表明它可能参与支链淀粉的合成 (Denyer 和 Smith, 1992)。在莱茵哈德衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 突变体 *sta2* 的胚乳中，在 GBSS 活性下降的同时，缺乏介于直链与支链淀粉之间的中间类型淀粉，表明 GBSS 对胚乳支链淀粉的合成有一定影响 (Delrue 等, 1992)。

SSs 主要参与了支链淀粉中分支链的合成，它有许多同工酶。如玉米的 SSs 分为 zSS、zSSa 和 zSSb，马铃薯的 SSs 也至少有 S、SS 和 SS3 种 (Kossmann 等, 1999)。但每种 SSs 占总活性的比例在不同植物中不尽相同。豌豆胚中的 SS 是 SSs 最主要的存在方式，它占 SSs 总活性的 60%；而马铃薯 SSs 最主要的形式为 SS，SSs 约 80% 的活性与它有关，而 S 活性所占总活性的比例仅为 10%~15%，SS 所占的比例则更小。每一种可溶性 SSs 在支链淀粉的合成中也发挥着不同作用。玉米的 SS 与 DP615 的短链合成有关。SSa 参与了 DP>24 的长链合成；马铃薯的 SS 催化了与 DP25~35 的长链合成，而 SS 在中等长度的支链淀粉合成中起着其他 SS 所不能替代的作用 (Edwards 等, 1999)。

不同的 SSs 同工酶在植物的不同组织中参与了淀粉的合成。Jiang 等 (2004) 从水稻中分离到 3 个 SS 同工酶 OsSS-1、OsSS-2 和 OsSS-3，编码它们的基因分别位于第 10、2 和 6 染色体上，其氨基酸序列与其他植物的 SS 家族成员同源性在 52%~73% 之间。OsSS-2 主要在叶中表达，参与非储藏器官内临时型淀粉的合成；OsSS-3 主要在胚乳中表达，与储藏器官中淀粉的合成有关；OsSS-1 在胚乳、叶片和根中表达，未发现有其同源性基因，表明它可能是一类新的 SS 基因。

**3. 分支酶 (branchingenzyme, BE)** BE 具有双重功能：一方面它能切开以  $\alpha$ -1,4 糖苷键连接的葡聚糖 (包括直链淀粉或支链淀粉的直链区)，另一方面它又能把切下的短链通过  $\alpha$ -1,6 糖苷键连接于受体上。由于能够在葡聚糖链上引入  $\alpha$ -1,6 糖苷键，故此酶被认为影响了植物淀粉的精细结构 (Sato 等, 2003)。植物体内有两种类型的 BE：BE 和 BE (如玉米、水稻、小麦、大麦等)，或 B (BE) 与 A (BE) (如豌豆、肾形菜豆、马铃薯等)。一些禾本科植物的 BE 又分为 BEa 和 BEb，它们的氨基酸同源性在 85% 左右 (Morell 等, 1997)。

不同植物的 BE 在开花后种子淀粉的积累过程中表达的时间顺序不尽相同。高粱的

BEa 和 BEb 的表达时间顺序一致, 花后 12 d 开始表达, 以后逐渐增加, 24 d 达到高峰。而大麦的 BE 与 BEb 的表达顺序则有所差异: BEb 在花后 7 d 已检测到有许多转录子的存在, 12 d 达到高峰, 而后逐渐减弱, 22 d 的表达量已非常弱, 27 d 时已检测不到其转录体; BE 的表达则迟于 BEb, 花后 15 d 开始表达, 24 d 才达到高峰(Mutisya 等, 2003)。

BEa 和 BEb 对  $\alpha$ -1,4 糖苷链的长度有不同作用。Nishi 等 (2001) 研究了水稻不同 BE 的作用, 他们发现缺乏 BEb 的突变体 (amylose extent, ae) 中, 支链淀粉中 DP13 的短链减少, 尤其是 DP811 链减少得最多, 认为 BEb 与水稻短链淀粉的合成有关, 并且这种作用不能被 BE 和 BEa 替代; 当突变体内 BE 缺乏时, 支链淀粉体内 16DP23 的中度类型链与 DP37 减少, 而 DP12 类型的短链比例增多, 表明 BE 在中等长度支链淀粉的合成中发挥着重要作用; BEa 则可能对 BEb 与 (或) BE 的功能起支持作用。但 Blauth 等 (2002) 研究发现, 玉米的 BEa 可直接参与支链淀粉中短链的合成。

**4. 淀粉去分支酶 (starch debranching enzyme, DBE)** 以往人们对 DBE 的作用主要局限于它在种子发芽过程中对支链淀粉的去分支作用。但近年来, 在许多植物 (如大麦、拟南芥、衣藻等) 的 DBE 突变体中, 发现淀粉的特性、结构与数量均发生了改变, 表明 DBE 也参与了淀粉的合成 (Dauvilee 等, 2001; Burton 等, 2002)。DBE 的主要作用是特异水解淀粉中的  $\alpha$ -1,6 糖苷键, 在淀粉合成中起最后修饰作用。植物的 DBE 主要有两大类: 异淀粉酶 (isoamylase, ISA) 与极限糊精酶或 R 酶 (pullulanase, PUL; renzyme; limitdexprinase)。PUL 以极限糊精等为底物, 而 ISA 则以糖原、藻糖原和支链淀粉作底物, 很少作用于极限糊精 (Fujita 等, 1999)。

植物中存在有多种类型的 ISA 同工酶, 在淀粉合成过程中发挥着不同作用。马铃薯含有 3 个 ISA 同工酶 (Stisa1, Stisa2 和 Stisa3), N 端均含有叶绿体靶向转移多肽, 引导酶进入质体中, 参与淀粉合成, 并且它们是被 3 个不同的基因家族所编码。Stisa1 与玉米 Su1、水稻 Sug1 等蛋白属于同一基因家族 (ISA1) 的产物; Stisa2 与拟南芥 Atisa2 属于第二个 ISA (ISA2) 基因家族产物; Stisa3 则属于一种新的 ISA。在功能上, Stisa1 与 Stisa3 单体均能单独发挥 ISA 功能, 而 Stisa2 单体则不能单独发挥 ISA 功能, 它可能调控 Stisa1 的活性。因为在 Stisa1 与 Stisa2 的混合液中, 对藻糖原的水解功能得到明显增强, 它们可能构成了一个复聚体, 在淀粉合成中共同作用除去可溶性葡聚糖分支, 而 Stisa3 可能是一个单体酶, 它参与淀粉的运转 (Hussainv 等, 2003)。

ISA 对植物淀粉粒的结构与品质有一定影响。Fujita 等 (2003) 发现, 在 ISA 反义表达的转基因植株胚乳内, ISA 蛋白含量下降了 94%, 支链淀粉转变成水不溶性支链淀粉 (water insoluble modified amylopectin) 和水溶性多聚糖 (water soluble polyglucan, WSP)。与野生型植株体内支链淀粉相比, 它们的分子量相似, 但水不溶性支链淀粉含有更多 DP5-12 聚体的短链; WSP 结构则与水稻 ISA 缺失突变体 (sugary 1) 内藻糖原相似, 分布在整个胚乳中, 占总  $\alpha$  多聚糖的 16%。在转基因植株体内, ISA 活性的降低, 使淀粉凝胶温度从 54 °C 迅速降到 43 °C, 并且黏度、X 射线衍射图最高峰的高度与陡度也下降, 淀粉粒形态由野生体中大小一致的尖缘型 (sharpedge) 转变成圆表面型 (round surfaces) 的小淀粉粒与有裂缝型 (cracked) 的大淀粉粒。

Beatty 等 (2002) 从玉米中分离出一个 PUL 基因 (zpu1), 它定位在第 2 染色体上,



氨基酸序列与水稻的 PUL 蛋白 (RE) 高度同源 (78%), 与菠菜叶片的 PUL 也有 59% 的同源性; 此酶只在胚乳中特异表达, 而在叶与根中未发现其转录子; *zpu1* 与基因组 DNA 杂交结果显示, 它是一个单拷贝基因。拟南芥和水稻的 PUL 也被一个单基因所编码, 以单拷贝形式出现 (Beatty 等, 2002; Yu 等, 2002)。

虽然 PUL 多以单拷贝形式出现, 但至今尚未发现植物 PUL 的突变体, 故在基因水平上对 PUL 功能的研究进展较缓。PUL 的功能可能与 ISA 的功能联系在一起, 因为在一些植物 ISA 突变体内, PUL 活性均丧失 (Beatty 等, 2002)。在玉米 ISA 突变体 (*sugary1*) 内, ISA 与 PUL 活性均丧失, 但其体内的 PUL 转录水平与野生型体内相似, 表明 PUL 活性受 ISA 表达的影响, 且 PUL 的表达属转录后调控 (Beatty 等, 2002)。

最近, Dinges 等 (2003) 在 PUL 功能研究上取得了较大进展。他们把一个增强子插入玉米 *zpu1* 位点 (编码 PUL) 中, 造成了后代 PUL 活性完全消失的无效突变 (*nullmutation*)。在突变后代纯合体 *zpu1 204* 的叶片、花后 20 d 的谷粒与萌发的种子内均检测不到 PUL 活性, 但植株的形态、开花期及表现型在大田条件下与野生型相似; 突变体内白天叶片的淀粉合成速率只有野生型的 50%, 并且夜间淀粉的分解也较缓, 暗示 PUL 与淀粉的合成与分解代谢均有关。他们分析, 突变体内因夜晚淀粉分解代谢减缓而积累了大量野生型体内所没有的麦芽低聚糖, 可能是造成白天叶片淀粉积累受阻的重要原因。在储藏器官中, 突变虽未改变淀粉的总量, 但明显减少了 WSP 的含量, 并且突变体的 WSP 经细菌  $\alpha$ -1,6 葡聚糖水解酶水解后, 产生了许多 DP5-8 的聚体, 表明玉米的 PUL 在淀粉积累过程中的功能是水解小分支多糖的  $\alpha$ -1,6 糖苷键。突变体内 BEa 活性明显下降, 但其蛋白含量与野生型相同, 意味着 PUL 突变对 BEa 转录后水平起到调控作用。*zpu1 204* 与玉米 *zpu* (编码 ISA) 突变体 *su1* 杂交, 后代双突变纯合体 *su1 st: zpu1 204* 出现了比 *su1* 体内更多的藻糖原, 并且籽粒外观比 *su1* 更皱, 籽粒内小淀粉粒数目比 *su1* 增加 1 倍, 这更进一步表明 PUL 参与了淀粉合成代谢, 在一些功能上与 ISA 相似, 部分程度上补偿了 ISA 的功能。

**5. 合成过程中酶与酶之间的相互作用及磷酸化反应** 近年来的基因与生化方面的研究表明, 淀粉合成过程中的每种酶都有多种同工酶形式, 每种同工酶又由独立的基因编码, 淀粉的合成是几个酶共同作用的结果。一个酶的突变能对其他酶产生多态性效应。如玉米 *ae* (编码 BEb 蛋白) 突变体内 BEb 不表达, 同时 BE 活性丢失, 并且 ISA 特性也发生了改变 (Colleoni 等, 2003); 水稻 *ae* 突变也造成了可溶性 SS 活性的显著下降; 玉米 PUL 与 ISA 的双突变体内检测不到 BEa 的活性。据此, 可以推测在造粉体中存在一个或几个酶复合体, 与淀粉合成有关的几个酶 (如 SS、BE 与 DBE 等) 在其中相互影响, 共同作用了淀粉的合成。

在催化淀粉合成过程中, 与淀粉合成相关的几个关键酶还需经历磷酸化过程。Telow 等 (2004) 发现完整的质体经  $\gamma$  32P ATP 培养后, 在检测出的质体可溶性磷酸蛋白中, 造粉体的 BE、BEa 与 BE 及叶绿体的 BE 与 BEa 均发生磷酸化反应, 位点在 Ser (丝氨酸) 残基上; 在颗粒结合磷酸蛋白中 BE 和两个 SS (包括 SSa) 也发生了磷酸化反应, 磷酸化能提高造粉体与叶绿体 BEa 及造粉体 BEb 的活性, 去磷酸化则降低这些酶的活性。但磷酸化与去磷酸化并不对所有与淀粉合成有关的酶起作用, 如磷酸化与去磷酸化不影响造粉



体与叶绿体 SBE 的活性，去磷酸化也不对造粉体的颗粒结合型 BEa 与 BEb 起作用。他们还发现 BEb 与淀粉磷酸酶通过依赖磷酸化方式均与 BE 产生共免疫沉淀，表明这些酶在造粉体中形成了一个蛋白复合体，并且共免疫沉淀蛋白复合体的去磷酸化能导致其解体。这些结果不仅证明了与淀粉合成有关的酶受蛋白磷酸化调节，而且也证明了磷酸化及蛋白与蛋白之间的相互作用在调控淀粉合成与分解中起着更广泛作用。

### (三) 基因工程对淀粉生物合成的调控

近年来，利用基因工程技术来调控淀粉合成的研究逐渐增多。因为通过基因工程可调控淀粉合成过程中特定酶的含量或几种酶之间的比例，从而达到增加淀粉含量或获得独特性质、新型的淀粉，以满足人们在食用及工业上的需求。

**1. 改变淀粉的含量** 淀粉含量的增加或减少，对作物而言，都有其利用价值。增加淀粉含量，就可能增加干物质，使起有更高的商业价值；减少淀粉含量，可生成其他储存物质。目前，在增加或减少淀粉含量的研究方面都有成功的报道。

Stark 等把大肠杆菌来源的 APGase 基因-*glgCl6* 转入拟南芥与烟草后，淀粉含量显著提高 (Stark 等, 1992); Visser 等将 APGase 基因-*glgCl6* 与质体转运肽基因融合，在马铃薯块茎特异表达启动子控制下表达，产生的转化株系块茎淀粉含量比对照平均增加 35%，有些株系甚至高出 60% 之多 (Visser, 1993)。同时，发现蓝藻的 APGase 也为同源四聚体，但其变构活性和高等植物相同，利用蓝藻的 APGase 基因转化马铃薯可能效果更好 (李枫和宋艳茹, 1995)。在玉米 APGase 大亚基基因 *sh2* 转入小麦中，与小麦小亚基基因互作后，产生的新酶对抑制因子 (Pi) 敏感性减弱，发育中的籽粒 APGase 活性提高，单株粒重平均提高 38%，整株生物产量也显著提高 (Smidansky 等, 2002)。Sakulsingharoj 等 (2004) 把大肠杆菌的 AG Pase 基因导入水稻中，发现它在质体中表达，籽粒产量才显著提高 (13%)。这些都显示基因工程在提高作物产量方面的巨大潜力。在减少淀粉含量方面，Müller-Rober 等利用含有不同启动子和反向连接的 AGPP 大或小亚基 cDNA 的融合基因构建表达载体，转化马铃薯。在 35S 加上反向连接的 AGPP 大亚基 cDNA 的融合基因转化植株中，叶片的 AGPP 活性仅为野生型的 5%~30%，块茎中 AGPP 的活性更低，仅为野生型的 2%。分析转化株淀粉含量，表明转化株块茎淀粉的含量仅为野生型的 5%~32.5%。伴随淀粉含量的降低，转化植株细胞中可溶性糖含量显著升高，蔗糖和葡萄糖分别占块茎干重的 30% 和 8%。Stark 等从大肠杆菌中分离出对调节因子异常不敏感的 ADPGPP，将这种变构酶的基因置于块茎特异性启动子的转录下，并将其导入马铃薯之中，结果转基因块茎中的淀粉含量比对照提高了 35%。但表达必须在叶绿体中进行，组成型表达是致死的。

**2. 改良淀粉的品质** 生产高直链淀粉含量的遗传改良。高直链的淀粉有许多优点，因此，每年在 USA 至少有 20 000 hm<sup>2</sup> 高产直链淀粉的玉米在订约的条件下种植。Schwall 等 (2000) 通过反义基因法抑制了马铃薯 BE 的 A 与 B 酶，使植株体内 BE 活性低于野生型的 1%，直链淀粉含量高达 74%~89%，淀粉中 Pi 的含量提高，淀粉的成分、结构也发生了明显改变。Visser 等在无直链淀粉的马铃薯块茎中导入 *gbss* 基因，成功地弥补了直链淀粉的缺乏 (Van 等, 1991)。在转 *gbss* 基因植株的根尖、气孔保卫细胞以及花粉中

都发现有直链淀粉，在块茎中的直链淀粉含量占总淀粉的 20%，基本恢复了正常水平。在谷物中通过获得编码 SBEb 的突变体而得到高直链淀粉的植株。在马铃薯中通过反义技术抑制 SBE 在块茎中的表达，达到富集直链淀粉的目的 (Jobling 等, 1999)。SBE 和 SBE 同时被反义抑制，直链淀粉的含量高达 60%。最近采用抗 SBE 的抗体能更有效地抑制 SBE，产生更高含量的直链淀粉的淀粉 (Jobling 等, 2003)。

生产无直链淀粉或低直链淀粉、高支链含量的淀粉。支链淀粉因其有良好的黏稠性，在工业、食品加工中有特殊的用途。自 1983 年，玉米 *Waxy* 位点突变株的发现以来，相继在玉米、大麦、高粱等作物中发生 *Waxy* 位点，产生了没有直链淀粉或极低直链淀粉含量的淀粉，并在玉米中实现了商业化生产。另一种生产支链淀粉的方法就是通过反义技术同时下调 GBSS、SS 的表达，产生短链的支链淀粉。把编码 GBSS 的反义基因导入马铃薯中，可产生不含或只含少量直链淀粉的淀粉。而把大肠杆菌糖原合成酶 (glycogen synthase) 基因引入马铃薯，使之在块茎中特异表达，则可产生支链淀粉含量高的淀粉。须指出的是支链淀粉的合成不像直链淀粉那样只有一种酶参加，其合成要求好几种酶的协同作用，而且每种酶都有自己的异构形式，抑制一种酶的活性很难生产符合要求的支链淀粉形式。

改变淀粉的长度，适合特殊的要求。Lloyd 等 (1999) 通过反义基因法同时抑制了马铃薯块茎中的两个 SS，发现转基因块茎中总淀粉含量与直链淀粉含量均变化不显著，支链淀粉中短链 ( $DP < 15$ ) 与长链数目 ( $DP > 80$ ) 明显增加，而中度链 ( $DP 15 \sim 80$ ) 减少。不同的转基因受体产生的直链淀粉的长度是不一致的，在马铃薯中产生的直链淀粉比在谷物中的长。也可以通过表达异源的 GBSS，如来自海藻的 GBSS 或是叶片特异表达的 GBSS 来产生长链的直链淀粉 (Wattebled 等, 2002; Edwards 等, 2002)。2003 年在大麦中发现 *sex6* 突变体产生一种新的直链淀粉。在这种突变体中，SSa 的活性完全丢失，支链淀粉的合成降低，相比于 SBE 受抑制产生的淀粉来说，支链淀粉中短链淀粉增加，成胶温度降低。

生产有某种修饰的淀粉，如抗性淀粉。另一个机遇恐怕是淀粉的改性。目前，有 80% 的马铃薯淀粉是在收获后进行改性处理的，如生产抗性淀粉。如果淀粉的改性能够直接在植物体内进行，那么就会具有很多优点，诸如生产出来的淀粉具有全新的特性，以及减少因化学改性处理而引起的废物排放问题。利用化学或物理的方法生产抗性淀粉成本高、工艺操作复杂、带有添加成分而安全性不高。自然界抗性淀粉的自然极有限，而弄清自然来源的抗性淀粉的特性及合成的途径，利用转基因植物生产磷酸化或乙酰基化的抗性淀粉可为抗性淀粉的需求提供一条廉价、安全、持续供应的途径。目前发现，在马铃薯中负责淀粉磷酸化的酶是  $\alpha$ -葡聚糖水合双激酶 ( $\alpha$ -glucan water dikinase, GWD) (Lorberth 等, 1998)，表达这种酶的马铃薯中磷酸化淀粉的含量比普通水平高 5 倍以上。我国杨朝柱等 (2005) 在建立高效间接富含 RS 稻米筛选技术的基础上，培育了首个高 RS 早籼稻突变新品种浙辐 201，并以我国主推杂交水稻恢复系 R7954 为起始材料，经航天搭载诱变，筛选创造了富含 RS 的突变体 RS111。研究表明，突变体 RS111 热米饭中 RS 的含量是一般普通品种的 3~5 倍。采取优化蒸煮方式，其热米饭中 RS 含量可高达 10%。最近，利用诱变技术和生物技术，我国育种学家又从我国主栽优质高产水稻和小麦

品种中直接筛选系列富含 RS 的突变新种质。为建立富含 RS 稻米育种体系,正开展 RS111 中淀粉的形态、大小、结构、合成代谢谱及其遗传控制与分子定位的相关研究。同时,配合富含 RS 功能稻米的开发,与医学和食品学科协作,正进行离体评价试验、临床医学评价和加工方式优化的研究。

## 五、转基因植物生产果聚糖等其他糖类物质

此外,可以通过改变淀粉的代谢途径从而在植物体内合成的其他糖类,或者说淀粉前体的去向可以改道成为其他储存糖类的合成途径。

### (一) 果聚糖

烟草和马铃薯植株是不能储存果聚糖的,但通过引入枯草杆菌的果糖基转移酶(fructosyl transferase)而能诱导积累果聚糖。分析表明,转基因烟草体内果聚糖的积累量已达干重的 3%~8%,转基因马铃薯植株中果聚糖的含量为叶片干重的 1%~3%,为块茎的 1%~7%。叶片中非结构糖总量从野生型中的 7%猛增到转基因植物中的 35%。因此,细菌果糖基转移酶的引入,使转基因马铃薯植物体内产生了一个新的糖库。

### (二) 糖醇

糖醇合成估计约占全球初级碳年产量的 30%。目前对糖醇合成研究的目的,虽然主要是为了保护作物免遭恶劣环境的侵袭,但同时也显示出将新的分支点引入糖代谢生产新化合物的可行性。用大肠杆菌的甘露醇-1-磷酸脱氢酶基因(mt1D)转化的烟草植株,所合成的甘露醇达到每克叶和根组织鲜重 6  $\mu\text{mol/L}$  以上,并且其耐受高盐的能力得到显著提高。同样,一种由肌醇衍生的环状糖醇——蕨立醇也已通过引入日中花(冰川植物)的肌醇-O-甲基转移酶基因(imt)而在烟草中被合成出来,该酶催化胁迫诱导积累蕨立醇的第一步反应。Imt1cDNA 的表达使转基因子苗中芒柄醇(1-D-4-O-甲肌醇)的积累达到蔗糖含量的 25%。

### (三) 戊聚糖

戊聚糖在小麦籽粒或面粉中,存在一种具有较高黏度的多糖,主要由戊糖——阿拉伯糖(Ara)和木糖(Xyl)组成,命名为戊聚糖(Pentosan),也称阿拉伯木聚糖。戊聚糖除了含有戊糖外,还含有己糖、蛋白质、糠醛酸和酚酸,它是谷物中非淀粉多糖和细胞壁多糖的重要组成成分(Fincher 和 Stone, 1986)。

戊聚糖对谷物品质的研究主要集中于黑麦和小麦。戊聚糖对黑麦的品质有重要影响,甚至比蛋白质的影响更重要。戊聚糖对小麦品质,尤其是面包烘焙品质也有重要影响(郑学玲等, 2002)。戊聚糖有良好的吸水性、持水性、高黏度、好的氧化交联特性及气体保持特性,从而对小麦等谷物的品质有重要的影响。从而可以通过育种的方法来提高或降低品种的戊聚糖含量,增强或减弱面粉的筋力,改善小麦的品质,使之符合制作不同类型食品的要求。戊聚糖作为一种天然的面粉改良剂,符合现代绿色食品发展的大趋势,越来越

越受到小麦品质育种、谷物化学研究者和食品业的重视。由于戊聚糖对黑麦品质的重要影响，人们已通过育种培养出新的黑麦品种，使其具有较高的戊聚糖含量和较高比例的水溶性戊聚糖含量，并且用该品种做出的面包品质较好。

#### (四) 葡聚糖

葡聚糖是一类以葡萄糖为基本构成单位的多糖类物质，分为 $\alpha$ 、 $\beta$ 型两种。自然界中的葡聚糖普遍是 $\beta$ 型的。 $\alpha$ -葡聚糖目前以人工合成为主，生物体内合成的尚未发现。普遍认为， $\beta$ -葡聚糖具有降低血脂和血清胆固醇的作用，对预防和治疗心脑血管疾病以及糖尿病有重要功效。2005年8月，美国农业部宣布，经10多年的努力，美国科研人员已成功首次培育出一种名为HiFi的燕麦新品种，这种燕麦新品种 $\beta$ -葡聚糖含量比普通燕麦高50%。这为研究 $\beta$ -葡聚糖的生物合成及转基因生产 $\beta$ -葡聚糖提供了良好的材料。相信在不久的将来，葡聚糖不再需要花高的成本从酵母、木耳、灵芝、青稞等中提取。

#### (五) 右旋肌醇甲醚

目前，已经在烟草中成功地表达了冰晶松叶菊来源的右旋肌醇甲醚酶基因，为工业用右旋肌醇甲醚提供了一条新的途径。

另外，阿拉伯胶作食品添加剂，可为乳化剂、稳定剂、成膜剂、成型剂和抗结晶剂提供相应的功能特性，以及作为水溶性膳食纤维以及为原生物效应提供营养属性，被广泛用于食品工业，主要来自金合欢属树种中，目前已开始对其代谢途径的研究。低聚木糖，甜度与麦芽糖差不多，热、酸、碱稳定性好，广泛用于焙烤食品中，能量低不引起肥胖，而且摄入后不会引起体内血糖值的大幅度升高，所以可作为高血压、糖尿病和肥胖症等患者食用的甜味剂；低聚木糖不能被突变链球菌 *Smutans* 作为发酵底物来生成不溶性葡聚糖，不提供口腔微生物沉积、产酸、腐蚀的场所（牙垢），是一种低腐蚀性的防龋齿甜味剂。现在低聚木糖主要从玉米芯等提炼出来或是通过酶促反应产生。相信通过对代谢途径的研究，可以在原就产生的组织中得到更高量的富集，满足生活需要。

### 第三节 存在问题与展望

糖类物质的合成是一个相当复杂的生理过程，需多种酶的参与及多种信号分子的调控来完成。目前与淀粉等糖类物质合成相关的多种酶已经得到分离、克隆和功能鉴定，并利用各种转基因的手段成功地实现了某些具人们生产和生活需求特征的糖类物质的生产。如通过基因工程的反义抑制来改变淀粉合成途径，产生侧链长度、分支度、直链和支链比、淀粉粒大小和胶稠度符合工业生产要求的淀粉。但目前利用这些有限的基因资源及理论知识还远达不到大规模生产糖类物质的需要。

转基因植物生产糖类物质存在的问题：①仍未能完全了解糖类物质生物合成过程中的酶类，需要继续寻找新的酶类资源，特别是对不同来源的酶类异构体的寻找及功能比较，包括在微生物中筛选各种有可能引入植物的新型酶，也可以增加植物所合成的糖类多样性。②对各种酶类之间的相互作用研究还待深入。目前，仍集中在对单个酶的分析



达,事实上生产某种特征的糖类是多个酶共同作用的结果,只有充分了解它们之间的相互作用,才能生产出合格的产品。③对控制酶活性的过程及信号分子了解甚少。控制糖类的合成方式是一个很复杂的过程,除酶活性外,信号分子也在调节酶的活性,继而影响糖的合成。近年来的研究表明,植物基因的表达受到许多代谢物的调节。如各种糖类、丁酸等能够调节植物中 $\alpha$ -淀粉酶基因的表达。2,6-二磷酸果糖(F2,6BP)是植物体内调节代谢流在蔗糖和淀粉合成之间分配的重要信号分子,而F2,6BP的水平取决于6-磷酸果糖2-激酶(PF2K)和2,6-二磷酸果糖酯酶(F2,6Bpase)的相对活性。Scott等将一种经修饰的鼠肝PF2K的基因导入烟草中,转基因植株中PF2K酶活力提高导致了光合暗反应末期F2,6BP的水平提高了2~3倍。分析结果表明,F2,6BP在光合作用中抑制了合成蔗糖的代谢流,促进了合成淀粉的代谢流量。④糖类的代谢过程研究不深。即使生产目标糖类,但不了解和控制糖的代谢,使其富集也达不到生产和生活要求的浓度。⑤转基因技术中存在抗性标记基因的敲除、表达量低、转基因沉默等问题,有待通过技术的改进来解决。

只有当我们很好回答了诸如淀粉合成生产过程中的——什么因素决定了植物淀粉不同聚体链的长度?哪些因子调控了淀粉聚体中链的数目?众多支链是从哪里衍生的?淀粉分支、链延长及去分支中酶的作用机制是什么?其他酶(如异化酶、磷酸化酶、淀粉酶等)是否参与了淀粉的合成?这些酶是如何相互作用的?等等问题之后,我们才能真正利用转基因植物生产糖类物质,满足生产和生活的需要。

## 参 考 文 献

- [1] 静国忠. 基因工程及其分子生物学基础. 北京: 北京大学出版社, 2003
- [2] 杨朝柱, 李春寿, 张磊等. 富含抗性淀粉水稻突变体的淀粉特性研究. 中国水稻科学, 2005, 19(6): 516~520
- [3] 郑学玲, 李利民, 朱永义等. 戊聚糖在小麦中的分布规律及其与灰分、白度相关性的研究. 中国粮油学报, 2002, 17(6): 19~22
- [4] Beatty MK, Rahman A, Cao H, et al. Purification and molecular genetic characterization of ZPU1, apullulanase type starch-debranching enzyme from maize. *Plant Physiol*, 2002, 119: 255~266
- [5] Beckles D M, Smith A M, après T. Acytosolic ADP-glucose pryophosphorylase is a feature of gramineaceous endosperms, but not of other starch storing organs. *Plant Physiol*, 2001, 125: 818~827
- [6] Bjock I, Nyman M, Pedersen B, et al. Formation of enzyme resitant starch during antocaving of wheat starch: Studies invitro and in vivo. *J Cereal Sci*, 1987, 6: 159~172
- [7] Blauth SL, Kimk N, Klucinec J, et al. Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzymel (she1) in Zeamays L. *Plant Mol Biol*, 2002, 48: 287~297
- [8] Burton RA, Jenner H, Carrangis L, et al. Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack is oamylase activity. *Plant J*, 2002, 31: 97~112
- [9] Colleoni C, Myers AM, James MG. One and two dimensional native-PAGE activity gel analyses of maize endosperm protein reveal functional interactions between specific starch metabolizing in teractions between specific starch metabolizing enzymes. *J Appl Glycosci*, 2003, 50: 207~212
- [10] Dauvilee D, Colleoni C, Mouille G, et al. Two loci controlphyto glycogen production in the monocellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 2001, 125: 1710~1722



- [11] Delrue B, Fontaine T, Routier F. Waxy *Chlamydomonas reinhardtii* monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis and granule bound starch synthase activity accumulate structurally modified amylopectin. *J Bacteriol*, 1992, 174: 3612~3620
- [12] Denyer K, Smith AM. The purification and characterization of the two forms of soluble starch synthase from developing pea embryos. *Planta*, 1992, 186: 609~667
- [13] Dinges J, Cleon C, James MG, et al. Mutation analysis of the pullulanase type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. *Plant Cell*, 2003, 15: 666~680
- [14] Doan D N P Rudi H, Olsen O A. The allosterically unregulated isoform of ADP - glucose pyrophosphorylase from barley endosperm is the most likely source of ADP - glucose incorporated into endosperm starch. *Plant Physiol*, 1999, 121: 965~975
- [15] Edwards A, Vincken JP, Suurs LC, et al. Discrete forms of amylose are synthesized by isoforms of GBSSI in pea. *Plant Cell*, 2002, 14: 1767~1785
- [16] Edwards A, Fullon DC, Hylton CM, et al. A combined reduction in activity of starch synthase II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *Plant J*, 1999, 17: 251~261
- [17] Fincher G B and Stone B A. Cell walls and their components in cereal grain technology. In: *Advances in Cereal Science and Tech. AACCC, St. Paul, Minnesota, USA, 1986, Vol II*
- [18] Fujita N, Kubo A, Francisco Jr PB, et al. Purification, characterization, and cDNA structure of isoamylase from developing endosperm of rice. *Planta*, 1999, 208: 283~293
- [19] Fujita N, Kubo A, Suh DS, et al. Antisense inhibition of isoamylase alters the structure of amylopectin and the physicochemical properties of starch in rice endosperm. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44: 607~618
- [20] Gomez Casati D F, Iglesias A A. ADP - glucose pyrophosphorylase from wheat endosperm: purification and characterization of an enzyme with novel regulatory properties. *Planta*, 2002, 214: 428~434
- [21] Gray J, Picton S, Shabbeer J, et al. Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense RNA. *Plant Mol Biol*, 1992, 19: 69
- [22] Hammond S M, Caudy A A, Hannon G J, et al. Post - transcriptional gene silencing by double - strand RNA. *Nature Rev Gen*, 2001, 2: 10
- [23] Haralampu S G. Resistant starch and view of the physical properties and biological impact of RS 3. *Carbohydrate Polymers*, 2000, 1: 285~292
- [24] Hussain H, Mantv A, Sealev R, et al. Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. *Plant Cell*, 2003, 15: 133~149
- [25] Jiang HW, Dian WM, Liu FY, et al. Molecular cloning and expression analysis of three genes encoding starch synthase II in rice. *Planta*, 2004, 218: 1062~1070
- [26] Jobling SA, Schwall GP, Westcott RJ, et al. A minor form of starch branching enzyme in potato (*Solanum tuberosum* L) tubers has a major effect on starch structure: cloning and characterization of multiple forms of SBE A. *Plant J*, 1999, 18: 163~173
- [27] Jobling SA, Jarman C, The MM, Holmberg N, et al. Immunomodulation of enzyme function in plants by single - domain antibody fragments. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 77~80
- [28] Johnson PE, Patron NJ, Bottrill A R, et al. A low starch barley mutant, Risa - 16, lacking the cytosolic small subunit of ADP - Glucose pyrophosphorylase, reveals the importance of the cytosolic isoform for maintenance of the plastidial small subunit. *Plant Physiol*, 2003, 131: 684~696
- [29] Kishida T, Nogami H, Himeno S, et al. Heat moisture treatment of high amylose corn starch in

- creases its resistant starch content but not its hysiological effects in rats. *J Nutr*, 2001, 131: 2716~2721
- [30] Kossmann J, Abel GJW, Wpringer F, et al. Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a starchsyn thase from potato (*Solanum tuberosum*L.) that is predominantly expressed in leaf tissue. *Planta*, 1999, 208: 503~511
- [31] Li L, Preiss J. Characterization of ADP - glucose pyrophosphorylase from a starch deficientmutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) . *Carbohydrate Res*, 1992, 227: 227~239
- [32] Preiss J, Ball K, Smith White B, et al. Starch biosynthesis and its regulation. *Biochem Soc Trans*, 1991, 19: 539~547
- [33] Lloyd FR, Landschutze V, Kossmann J. Simultaneous antisense inhibition of two starch - synthase isoforms in potato tubers leads to accumulation of grossly modified amyplpectin. *Biochem J*, 1999, 338: 515~521
- [34] Lorberth R, Ritte G, Willmitzer L, Kossmann J, Inhition of a starch - granule - bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 473~477
- [35] Morell MK, Blennow A, Koshar Hashemi B, et al. Differ entail expression and properties of starch branching is olorms in developing wheat endosperm. *Plant Physiol*, 1997, 113: 201~208
- [36] Mutisya J, Sathish P, Sun C, et al. Starch branching enzymes in sorghum (*Sorghumbicolor*) and barley (*Hordeumvulgare*): comparative analyses of enzyme structure and gene expression. *J Plant Physiol*, 2003, 160: 921~930
- [37] Niba L L. Resistant starch: a potential functional fooding redient. *Nutr Food Sci*, 2002: 3262~3267
- [38] Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, et al. Biochemical and genetic effects of amylose extender mutation in rice endosperm. *Plant Physiol*, 2001, 127: 459~472
- [39] Parton N J, Greber B, Fahy B F, et al. The lys5 mutations of barley reveal the nature and importance of plastidial ADP - Glc transporters for starch synthesis in cereal endosperm. *Plant Physiol*, 2004, 135: 2088~2097
- [40] Patron N J, Smith A M, Fahy B F, et al. The altered pattern of amylose accumulation in the endosperm of low amylosebarleycultivarsattributabletoasinglemutantalleleofgranule bound starch synthase I with adeletioninthe 5' non codingregion. *Plant Physiol*, 2002, 130: 190~198
- [41] Satoh H, Nishi A, Yamashita K, et al. Starch branchingenzyme I deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm. *Plant Physiol*, 2003, 133: 1111~1121
- [42] Sakulsinghavoij C, Choi SB, Hwang SK, et al. Engineering starch biosynthesis for increasing rice seed weight: the role of the cytoplasmicADP - glucose pyrophosphorylase. *Plant Sci*, 2004, 167: 1323~1333
- [43] Schwall GP, Schwall R, Wescott RJ, et al. Production of very high amylose potato starch by inhibition of SBEA and B. *Nature Biotech*, 2000, 18: 551~554
- [44] Shannon J C, Pien F M, Cao H, et al. Anadenylate translocator, facilitates transfer of exraplastidial synthesized ADP - glucose into amyloplasts of maize endosperms. *Plant Physiol*, 1998, 117: 1235~1252
- [45] Smidansky ED, Clancy M, Meyer FD, et al. Enhanced ADP - glucose pyropyosphory lase activity in wheat endosperm increases seed yield. *PNAS*, 2002, 99: 1724~1729
- [46] Stark DM, Tmmerman KP, Barry GL, et al. Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP - glucose pyrophosphorylase. *Science*, 1992, 258: 287~292

- [47] Tetlow I J, Davies E J, Vardy K A, et al. Subcellular localization of ADP - glucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of the properties of a plastidial isoform. *J Exp Bot*, 2003, 54: 1~11
- [48] Tetlow I J, Wait R, Lu Z X, et al. Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein interactions. *Plant Cell*, 2004, 16: 694~708
- [49] Wang S M, Lue W L, Yu T S, et al. Characterization of ADG1, an Arabidopsis locus encoding for ADPG pyrophosphorylase small subunit, demonstration of the presence of the small subunit required for large subunit stability. *Plant J*, 1998, 13: 63~70
- [50] Watted F, Buleon A, Bouchet B, et al. Granule - bound starch synthase 1. A major enzyme involved in the biogenesis of B - crystallites in starch granules. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 3810~3820
- [51] Weher H, Heim U, Borisjuk L, et al. Cell type specific, coordinate expression of two ADP - glucose pyrophosphorylase genes in relation to starch biosynthesis during seed development in *Vicia faba* L. *Planta*, 1995, 195: 352~361
- [52] Yu J, Hu S, Wang J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, 2002, 296: 79~92

## 第六章 转基因植物生产脂类物质

### 第一节 国内外脂类物质生产的情况及发展趋势

脂类是机体内的一类有机大分子物质。它包括的范围很广，其化学结构有很大差异，生理功能各不相同。其共同理化性质是不溶于水而溶于乙醚、氯仿、苯等非极性有机溶剂。脂类的生物学功能多种多样：甘油磷脂、鞘磷脂、胆固醇、糖脂等是生物膜的结构组分，甘油三酯是动物、油料种子的能量储存形式，萜类、固醇类是激素、维生素和色素的前体，糖脂参与信号识别和免疫。同时，脂类还可作为生长因子、抗氧化剂等。另外，动物的脂肪组织有保温，防机械压力等保护功能，植物的蜡质可以防止水分的蒸发。脂类还是工业生产中重要的原材料。

目前，人类食用、医用和工业使用的脂类主要来自矿物油提炼、加工。通过酶促反应法生成、化学合成法生成、植物产生或是动物通过消化植物原料在体内生成和积累。其中绝大部分脂类是由植物生产。化学反应法一般用于生产短链脂肪酸，反应在高温、无水的环境下进行，很难控制反应的特异性，产物一般是短链、中链和长链脂肪酸的混合物，而且同时生成许多难分离的副产物，给工业生产和人们生活带来危害。用脂肪酶催化生产脂克服了化学合成的盲目性，但酶促反应的条件很难调节，因而产量及产物的纯度受到很大影响。石油资源越来越贫乏，石油价格急剧上涨，从石油中提炼、加工生产脂类也变得越来越不现实。因此，植物是廉价、安全、可持续的脂类物质的来源。随着石油、深海鱼类资源的不断减少，工业用脂最终也将由植物提供。

世界上植物油脂的产量大约为 8 700 万 t，占领 400 亿美元的市场（Gunstone, 2001）。绝大部分植物油脂作为食用油，发达国家人口的近 25% 热量摄取来自脂肪酸。脂肪酸还是非食物产品的主要成分，如脂肪酸是肥皂、清洁剂、润滑剂、生物燃料、化妆品、油漆等的原料。对植物油脂的需求逐年增加，但还基本满足需要，价格不高，为 0.6 美元/kg，刺激着石油原料的工厂改用植物油脂代替石油。植物合成的脂肪酸含有许多功能基团，如羟基、环氧基、环丙基、乙炔基等，有着很重要的用途和特性。植物至少合成 200 多种不同的脂肪酸，人类现在利用的只有少数几种，来自主栽的几个农家作物。产油居第一位的是大豆，依次是油椰子、油菜籽和向日葵籽。这 4 种作物产油总量占目前世界植物油的 65%，产生的植物油脂主要包括亚油酸、棕榈油酸、月桂油酸、油酸。

目前，我国制油用油料总量 5 000 万 t，大豆产量 1 600 万 t，进口大豆 1 500 万 t，花生产量 1 500 万 t，油菜籽产量达到 1 270 万 t，棉籽产量 850 万 t。油脂社会总消费量 1 300 万 t，植物油人均年消费量 8.7 kg。食用油总产量 965 万 t。其中，菜籽油 350 万 t，棉籽油 180 万 t，豆油 185 万 t，花生油 200 万 t，葵花籽油 20 万 t，胡麻油 15 万 t，芝麻油 10 万 t，米糠油和玉米胚油 5 万 t。2002 年我国油料种植面积为 1 750 万  $\text{hm}^2$ ，比上年

增加 1.4%，全年油料产量 3 000 万 t。

近年来，随着人们食品观念的改变，植物油脂应用的比例将逐渐提高。因此，越来越多的人把目光放在改善植物油脂的品质上，以替代其他油脂产品。在食用油的主要成分甘油三酯，脂肪酸链长度和不饱和度直接影响油脂的品质。油脂食品的安全一直是困惑国民饮食生活的话题。食用油脂的组成对人类的健康有着重要的影响。高饱和脂肪的摄入易引起高血压、冠心病等，低饱和脂肪酸摄入导致免疫力下降、婴儿智力等发育不正常。目前，食用的植物油脂都通过工业的一系列的加工或半加工，如脱味、氢化增加稳定性等，不自然的引进了对人类健康造成巨大威胁的物质。如在氢化的过程中引入反式脂肪酸。反式脂肪酸 (trans fatty acids, TFAs) 比饱和脂肪酸的危害更大。美国最新研究证实，烘烤及油炸食物中常见的反式脂肪酸不仅与患心脏疾病有关，而且还是导致妇女患 II 型糖尿病的主要原因之一。而最近的人体研究证实，反式脂肪酸抑制生长发育。TFAs 能经胎盘转运给胎儿，母乳喂养的婴幼儿都会因母亲摄入人造黄油使婴幼儿被动摄入反式脂肪酸。反式脂肪酸对生长发育的影响包括使胎儿和新生儿比成人更容易患上必需脂肪酸缺乏症，影响生长发育；对中枢神经系统的发育产生不良影响，抑制前列腺素的合成，干扰婴儿的生长发育。反式脂肪酸的来源包括反刍动物（如牛、羊）的脂肪和乳与乳制品；食用油的氢化产品；经高温加热处理的植物油。调节脂肪酸代谢途径可控制脂肪酸的不饱和度和链长度，使之品质适合于各种工业及食品加工（李枏和宋艳茹，1998）。国外很多学者开始研究利用基因工程技术来改造脂质，使液体植物油替代氢化工艺生产出高硬脂酸含量的固体油脂，从而降低反式脂肪酸的摄入（Penny 等，2003；Liu 等，2002）。许多稀有的脂肪酸在工业或医药上有很重要的用途，但这些稀有脂肪酸富集在非常规栽培物种中，而且含量不高，很难达到应用的要求。工业合成这些脂肪酸往往达不到大规模应用的要求，必须寻找新的脂肪酸来源，满足人类保健和工业应用的要求。

随着新功能基因的分离、克隆以及各种农作物高效表达技术平台的逐步建立，在今后 15~20 年内，将会有相当数量的高新生物技术产品不断涌现并与消费者见面。这种分子农业的出现与普及将会对我国现有的农作物种植结构产生显著影响，对增强我国农产品的竞争能力、极大地提高农民的收入以及维护农业的可持续发展具有重要意义。同时，也有利形成新的产业链，培育出较大的产业集团。特别应该指出的是，我国植物生物反应器的研究和利用还主要集中在药用蛋白的研究和应用方面，而利用转基因植物生产特殊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、工农业用酶制剂的研究仍然未引起国家足够的重视，其实这些生物制剂的市场潜力也是非常可观的。要解决自然资源枯竭与非自然来源的产品对人类的危害问题，亟须研究天然稀有脂肪酸合成代谢的途径，克隆相关的酶基因，在高油脂含量的栽培油料作物中表达这些酶基因，即利用转基因植物来生产符合生产和生活要求品质和种类的脂肪酸无疑是解决工业和人类健康对特殊油脂需求的一种有效的方法。

产生低饱和脂肪酸含量的油料种子，满足人们健康的需要；培育更高饱和脂肪酸含量的品种，避免氢化引进反式脂肪酸、制造人造黄油和煎炸食品用油；更高油酸水平的品系，有益人类健康；更高中链饱和脂肪酸含量的油料作物，适合人造黄油、人造奶酪化工



应用；较低水平的硬脂酸含量，避免半氢化的同时，延长食品的保存期；产生一些稀有、具特殊性质的脂肪酸，用于工业生产等。这些是目前人们对利用基因工程培育转基因植物生产脂类物质的一些基本的目标。

利用常规育种的手段已经对植物脂肪酸的组成进行一些成功的修饰。向日葵突变体产生含 90% 的油酸，饱和低于 7% 的脂，而一般的栽培种只含 16%~20% 的油酸。这种高油酸的脂不需要酶促氢化来增加其稳定性。另外，高硬脂酸的大豆，高亚麻油的亚麻也相继出现。但常规育种只能对脂肪酸的品质和组成进行有限的改造，而且育种的时间长，很难适合目前对特性脂类的需求。

大多数与合成特异性脂的酶基因不存在于一般的产生食用植物油的植物中，研究者们必须在特殊物种中寻求这些基因资源。许多与双键的引入、碳链的延长、脂肪酸异构体的产生等相关的酶基因已经得到克隆，为转基因操作提供了重要的资源。转基因技术的不断成熟，使我们对转基因植物作为生物反应器生产脂类物质的设想变得可能。转基因植物生产工业、医用和保健食用的脂类的例子不断出现，可以肯定在未来将是一个用转基因植物生产脂类等生产、生活、医用物质的时代。本章与脂类生成相关的酶基因、相关的代谢途径、转基因植物生产脂类的应用研究、目前存在的问题等进行阐述，为转基因植物为人类提供满足各种需要的脂类提供一些借鉴。

## 第二节 脂肪酸的分类及其合成途径

### 一、脂肪酸的分类

组成脂肪的脂肪酸按其化学结构中是否含有不饱和键可分为两种形式：饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸。不饱和脂肪酸又分为单不饱和脂肪酸（含一个烯键）和多不饱和脂肪酸（含二个以上烯键）。绝大多数的脂肪酸含有偶数个碳原子，形成长而不分支的链（也有分支的或含环的脂肪酸）。不饱和脂肪酸有顺式和反式两种异构体。但生物体内大多数是顺式结构。

根据含碳原子数的不同，脂肪酸分 3 种形式：短链脂肪酸，中链脂肪酸和长链脂肪酸。短链脂肪酸含 2~6 个碳原子，是一种挥发性的脂肪酸，主要来自牛奶和黄油脂，能在人的胰胃脂肪酶的作用下完成水解吸收，提供低的热量。中链脂肪酸一般含 6~14 个碳原子，主要由油椰子和棕榈仁产生，经由肝脏进入各种组织的线粒体中，在体内迅速代谢，不造成积累而导致发胖症，但能引起血液中胆固醇含量的升高。长链脂肪酸含 14~24 个碳原子，在动物脂肪、植物油和深海鱼油中广泛存在，不能直接被消化道吸收，必须经过一系列的反应才能被机体利用。其中的某些种类是人体的必需脂肪酸，某些对人体的健康发挥重要的作用。如，DPA（二十二碳五烯酸）是一种人体必需脂肪酸，具有降血脂、软化血管和防治心血管疾病的显著功效；DHA（二十二碳六烯酸）作为另一种人体必需脂肪酸，是婴幼儿大脑发育不可缺少的物质，也是人体视觉神经发育必需营养素。

根据结合碳链的长度和不饱和度，脂肪酸又可分为中单不饱和脂肪酸（medium chain

monounsaturated fatty acids, MCMUFAs), 中多不饱和脂肪酸 (medium chain polyunsaturated fatty acids, MCPUFAs), 长单不饱和脂肪酸 (long chain monounsaturated fatty acids, LCMUFAs)、长多不饱和脂肪酸 (long chain polyunsaturated fatty acids, LCSUFAs)、长链饱和脂肪酸 (long chain saturated fatty acids, LCSFAs) 等。目前随着对不饱和脂肪酸用途研究的深入, 对脂类的研究和生产越来越多地集中在不饱和脂肪酸上。

## 二、酸合成及种子油脂形成的途径

自然界中植物脂肪酸在质体中合成, 乙酰 CoA 经过一系列的最终形成脂肪酸。在植物脂肪酸合成过程中所需的酶有乙酰 CoA 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase)、丙二酸单酰转移酶 (malonyl CoA: ACP transacylase)、3-酮酯酰 ACP 合成酶 I (3-ketoacyl-ACP synthase I)、3-酮酯酰 ACP 合成酶 II (3-ketoacyl-ACP synthase II)、3-酮酯酰 ACP 合成酶 III (3-ketoacyl-ACP synthase III)、硬脂酰 ACP 脱饱和酶 (stearoyl-ACP desaturase)、油酰基 ACP 硫酯酶 (oleoyl-ACP thioesterase) 以及中链酰基 ACP 硫酯酶 (medium-chain acyl-ACP dehydrase)。

在链的延长反应中, 除了 3-酮酯酰 ACP 合成酶之外, 还需要 3-酮酯酰 ACP 还原酶 (3-ketoacyl-ACP reductase)、3-羟酯酰 ACP 脱水酶 (3-hydroxyacyl-ACP dehydrase) 和烯酯酰 ACP 还原酶 (enoyl-ACP reductase)。

植物合成脂肪酸的机制与原核生物相似, 由一系列独立多肽酶在质体中合成脂肪酸, 碳链的引发和延长分别由乙酰基-CoA 和丙烯酰-CoA 催化各自的底物完成。合成的三分子的脂肪酸被活化成 CoA 酯, 从质体中释放出来, 在内质网中组装成甘油酯, 进一步进行各种修饰 (去饱和、水解、加长等)。在发育的种子中, 在内质网中的酰基链在甘油的三个位点上酯化形成三酰甘油, 低极性的三酰甘油最终以油体的形式储存在种子中 (图 6-1)。

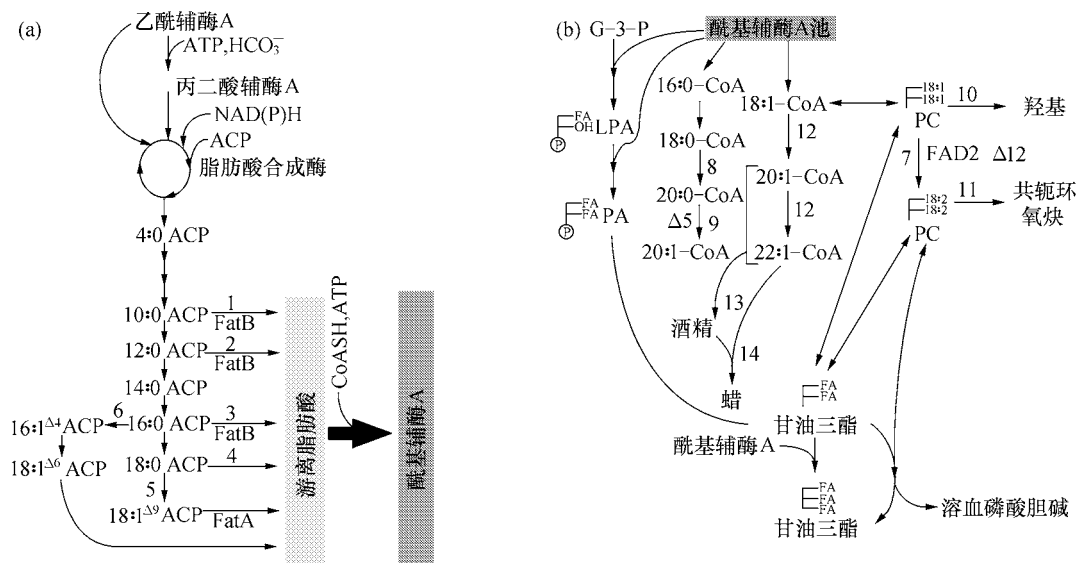


图 6-1 植物中脂肪酸的生物合成, 修饰, 组装成三酰甘油

### 三、利用转基因植物生产脂类物质的一般方法

利用转基因植物生产脂类物质是一个相当复杂的过程，不同于生产蛋白质和多肽，单个基因的导入就可以获得目的产物；也不同于生产糖类物质，只要通过植物的光合作用就可以生产并储存产物。正是因为每种物种都有各自不同的底物、合成相关的酶、代谢途径、生长环境、生理状态等，因而都含有具各自特征的脂肪酸。

植物油的代谢工程吸引工业和理论研究者主要有以下几个理由：①虽然植物细胞膜中脂肪酸的含量和组成是高度保守的，但种子油脂在不同的植物中有很大的不同。这就暗示脂肪酸的储存方式不受其化学结构的影响，对其进行基因修饰不会影响植物的生理反应。②超过 1/3 的植物油脂已经不作食用，化学工业熟悉其化学性质和开发应用。③植物中产生 200 多种具诱人功能特性的脂肪酸，而且它们的代谢途径许多已经得以鉴定，为脂肪酸的进一步开发利用拉开了序幕（Voelker 和 Kinney, 2001）。④石油价格急速上涨，迫使人们寻找新的资源进行生产。

因为植物油脂在食品和非食品的行业都有着非常广阔的应用前景，植物种子油脂的生物技术目标也是多方面。概括起来主要包括提高保健脂肪酸的含量，降低对健康有害的脂肪酸的含量；提高油脂的稳定性，进一步扩展应用领域，减少氢化加工过程；通过研究与脂肪酸合成和代谢相关的酶基因多样性和酶工程的研究，最大限度低成本、高产产地利用植物油脂；提高油脂的含量，降低生产、分离的成本。目前，在每一个研究目标上都取得了一定的进展。

脂类的合成和代谢受一系列酶促反应的控制，异源表达某种脂类必须对生产、富集这种脂的生物的代谢途径进行深入研究，包括基因的分离鉴定、合成反应、储存反应等。因此，在转基因植物中生产脂类的方法就是将一系列鉴定了作用、调节因子的基因导入高油脂产量的栽培种中，生产满足要求的脂类，即反向遗传工程，或是通过共抑制、反义抑制、RNA 干扰下调某些与不理想脂类合成相关的酶基因，是合成朝有利脂类的方向进行。依不同的目的，不同的物种，具体的方式而不同。但不管哪种方式，异源表达脂类都要求对脂类合成、分解、储存等作前后的细致研究，才有可能获得理想产量和品质的产品。

## 第三节 转基因植物生产脂类的应用研究

利用转基因植物生产脂类物质包括两个方面的内容：一是在栽培种中通过下调某些基因的表达，生产稳定性等较好的脂类；二是表达在原有的栽培种中不存在的某些脂肪酸，即稀有的脂肪酸，如生产原主要来自深海鱼油的多不饱和脂肪酸等。

### 一、提高或降低饱和脂肪酸的含量

改变脂肪酸的含量主要是指对现栽培的油料作物中饱和脂肪酸的含量进行调整。一方面，饱和脂肪酸摄入过多，可引起人血液中的胆固醇含量升高，因此，要降低饱和脂肪酸

的含量；另一方面，饱和脂肪酸的稳定性好，饱和脂肪酸含量高，种子油不需要氢化就有很好的稳定性，使人造黄油和制糕饼用的油脂天然化，不因氢化引入反式脂肪酸对人体造成危害或提高成本。

### （一）降低饱和脂肪酸的含量

饱和脂肪酸是指碳链上没有双键的脂肪酸，一般熔点较高，在室温下往往呈固态，多以脂的形式存在。这类脂肪酸的主要来源是家畜肉和乳类的脂肪，如牛油、猪油等动物脂肪，还有热带植物油（如棕榈油、椰子油和棕榈仁油）。这类脂肪摄入过多会导致血脂升高、动脉粥样硬化，诱发冠心病、心肌梗塞、脑血管等疾病。

Bleibaum 等将来自海狸的 3-酮酯酰 ACP 合成酶 II 基因导入甘蓝型油菜，发现该基因在油菜中过量表达，转基因油菜种子中的棕榈酸含量降低。把来自老鼠和酵母的一种膜结合脱饱和酶-硬脂酰 CoA 脱饱和酶下降，而棕榈油酸（palmitoleic acid）(16:1) 的含量增加了 6 倍。

Yao 等将酵母来源的酰基-CoA D9 去饱和酶和老鼠肝脏来源的硬脂酰-CoA D9 去饱和酶分别导入烟草中，发现饱和脂肪酸的含量得到一定程度的降低。同时，他们利用农杆菌 GV3101 侵染芸薹的下胚轴，所用的质粒是 pRB01，它含有拟南芥 *ads1* 的 cDNA（编码一个脂肪酸 D9 去饱和酶），并在种子特异 *napin* 启动子控制下，以卡那霉素（Kan）为抗性标记，*npt* 作为筛选标记基因。经过 PCR 和 Southern blot 检测后，将阳性植株与对照同时种植于温室中，收获成熟 T1 代种子，分析其脂肪酸组成，结果发现阳性植株饱和脂肪酸含量显著降低，只占 1%~2%。虽然其他饱和脂肪酸也有轻微的减少，但这种降低主要是因为软脂酸（棕榈酸）和硬脂酸的减少。而且，伴随着硬脂酸的减少，油酸的含量有所增加。这个结果说明，*ads1* 基因产物能以硬脂酸为底物去饱和产生不饱和脂肪酸。

Kinney 等（1996）通过抑制油酰去饱和酶的活性，培育出产氧化稳定型的液态油脂的大豆品种，油酸的含量提高到 86%，而 18:2 的含量从 55%降低到 1%，饱和脂肪酸的含量也只有 10%。这种油脂有很重要的经济价值，在煎炸的高温条件下仍然稳定。稳定性相当于矿物润滑油，因此，还可以作可降解的生物润滑油使用。

### （二）提高饱和脂肪酸的含量

实验研究发现，几种中等长度碳链的饱和脂肪酸，即月桂酸（C12:0）、豆蔻酸（C14:0）、棕榈酸（C16:0）、辛酸（C8:0）和癸酸（C10:0），不易被氧化，并具有较高的凝固温度，多用于制作人造黄油、糖果和油炸食品。月桂酸、辛酸和癸酸主要来源于热带树木和石油，可用于制作肥皂和去污剂。由于大多数植物种子的天然的饱和脂肪酸产量极低，因此，一般依赖化学方法对植物油氢化后获得饱和脂肪酸。但氢化反应带来的副产物——反式脂肪酸（油酸的异构体）被认为是引起冠心病的因素之一。对许多食用的脂肪酸来说，降低反式脂肪酸的含量是一个很重要的目标，这就要求生产出自然稳定性好的脂肪酸。通过共抑制、反义抑制、RNA 干扰等下调大豆、棉花、芸薹中硬脂酰-ACP 去饱和酶的活性，产生了含 40%硬脂酸的种子油，不需要额外的氢化加工，提供一种半

固态的人造黄油原料。

1992年 Calgene 公司把种子特异性启动子控制的硬脂酸去饱和酶反义基因导入油菜, 以抑制发育阶段的油菜籽中硬脂酸 ACP 去饱和酶活性。转基因油菜籽中硬脂酸的含量从 2% 跃升到 40%。这是利用基因工程手段调节脂类代谢的首例成功报道。Knutzon 等将来自甘蓝型油菜的硬脂酸 ACP 脱饱和酶的反义基因导入油菜后, 转基因植株中脱饱和酶的活性及酶本身都几乎检测不到, 而种子中硬脂酸的含量提高了 20 倍。其中一株橄榄型油菜转基因植株的饱和脂肪酸含量达 39%, 而且油脂含量和生活力都表现正常。

Yao 等报道, 拟南芥 *adsl* 基因编码脂肪酸 D9 去饱和酶, 它可用于降低油料作物中饱和脂肪酸的含量, 通过共表达酵母 D9 酰基-CoA 去饱和酶基因 (*ole1*), 已成功在转基因番茄中改变了饱和脂肪酸的含量。类似的结果也在转基因番茄中表达小鼠肝硬脂酰-CoA D9 去饱和酶基因 (*rds*) 获得。

## 二、转基因油料作物生产某些具特殊用途的脂肪酸

在植物提供的 200 多种脂肪酸中, 很多不存在通常栽培的油料作物中, 但具有很重要的性质, 在工业、医疗、保健等方面发挥着重要的作用。如有几种脂肪酸是含羟基、环氧基、环丙烯基和乙炔基的脂肪酸, 它们提供碳链次级反应的功能团, 能够对其进行聚合等其他化学修饰, 如果可以低成本、高产量生产的话, 它们有着很广阔的应用前景。几种不饱和脂肪酸, 如 DPA、DHA, 对人类抵抗多种疾病和婴儿的发育影响, 是人类的必需脂肪酸。将这些具有特殊性质的脂肪酸的合成途径在现有的油料植物主栽品种中, 使其廉价、大量地生产, 对人类的生产和生活无疑会产生重大的影响。

### (一) 转基因植物生产饱和脂肪酸

用 12:0-ACP 硫代酯酶基因导入拟南芥后, 拟南芥种子中积累的月桂酸成为脂肪酸的主要成分 (占 24%) (Voelker 和 Worrell, 1992)。此基因导入油菜中, 经自花授粉后, 转基因油菜子代种子中的月桂酸含量可达甘油三酯总量的 60%, 并可正常生长发育 (Voelker 等, 1996)。酯酰-ACP 硫代酯酶基因 (ChFatB2) 导入油菜中, 同样可得到积累辛酸和葵酸的转基因油菜 (Dehesh 等, 1996)。

在植物中, 长链饱和脂肪酸是指含 20 或 20 个以上碳原子的脂肪酸, 一般以三甘油酯、鞘脂类、表皮蜡质、软木脂等形式存在, 作为填充物充满周皮细胞壁, 周皮下细胞壁和根的内皮细胞等起保护作用。在其他生物, 如深海鱼类、细菌、微藻、酵母中也含有一定量的长链饱和脂肪酸。

蜡酯是从抹香鲸中获取的一种长饱和脂肪酸, 是工业润滑剂和传输流体的主要成分。目前, 抹香鲸的数量急剧减少, 已经禁止捕杀抹香鲸, 必须寻找新的资源来生产这些工业产品。在美洲的西南部沙漠中发现一种灌木, 叫加州希蒙得木, 以蜡 (占干重的 60%) 代替 TAG 作为种子的储存物, 是目前所知的以储存物的唯一物种。研究发现, 这些蜡是酒精经脂肪酸还原酶还原成油酸, 油酸再进一步经链的延长而合成, 或是直接来自 C20-C24 的单饱和脂肪酸, 由脂酰基 CoA: 酒精酰基转移酶催化最终形成蜡储存脂



(Metz 等, 2000)。目前, 已从加州希蒙得木中分离纯化出负责合成这种蜡的还原酶和酰基转移酶, 其相应的 cDNA 也得以克隆 (Metz 等, 2000)。在拟南芥中共表达月见草长链酰基-CoA 延长酶、加州希蒙得木还原酶和酰基转移酶, 发现在成熟的种子中蜡的含量占 70% 以上 (Lardizabal 等, 2000)。高富集量说明与生产这种蜡的所有必需基因都已经鉴定出来, 这条途径可用于经济作物的转化, 生产包括化妆品、工业润滑剂在内的多种用途的蜡脂。

Hangsik 等从 *Lesquerella fendleri* 分离出一个叫 *LfKCS45* 的基因, 与膜结合脂肪酸延长酶——3-酮酰-CoA 合成酶序列高度同源。在酵母中表达 *LfKCS45* 蛋白, 产生了两种新的长链脂肪酸, 分别为 C28:0 和 C30:0。这种酶不作用长度为 C16 到 C24 的酰基-CoA 底物。用 *LfKCS45* 启动子融合 GUS 转化拟南芥, 对 GUS 表达进行组织化学分析, 发现 *LfKCS45* 基因只在根冠的侧面细胞中转录。这项研究为在植物根中表达长饱和脂肪酸提供了一些理论认识。

## (二) 转基因植物生产不饱和脂肪酸

不饱和脂肪酸是存在双键的一类油脂中, 双键使其有许多特殊的化学和物理性质。因此, 在工业、医疗、保健等方面有着很重要的用途。根据含双键的数目, 分成单不饱和脂肪酸 (一个双键) 和多不饱和脂肪酸 (两个或两个以上的双键)。目前, 鱼油和其他海洋食物是某些人体必需脂肪酸 (EPA 和 DHA) 的主要来源。这些鱼类有令人讨厌的气味, 或可能污染了重金属, 加上不断的打捞, 海洋的鱼类资源已经严重枯竭, 很多鱼类现都禁止捕杀。这些都刺激着人们寻找新的方法生产这些资源, 转基因植物提供一个安全、廉价、可持续生产这些资源广阔空间。可以说, 目前研究转基因植物生产脂类物质的大部分研究都集中对不饱和脂肪酸的表达研究。

**1. 生产单不饱和脂肪酸** 单不饱和脂肪酸是指在碳链上含有一个双键的脂肪酸。天然植物油的单不饱和脂肪酸为顺式构型。流行病学研究发现, 地中海地区希腊的克里特岛 (Crete) 和意大利南部的萨卡 (Circa) 居民, 在 20 世纪 60 年代慢性心脏病的发病率是世界上最低的和寿命最长的地区。他们的饮食以谷类、豆类和蔬菜为主, 每月只吃少数几次肉类, 每次的量也很少。其膳食脂肪的主要来源为富含油酸 (C18:1 含 18 个碳原子的单不饱和脂肪酸), 并且富含维生素 E 的橄榄油。虽然他们的膳食总脂肪的摄入量达到占膳食总能量的 40%, 但其冠心病的发病率较低。近来的分析显示, 食用富含单不饱和脂肪酸的饮食可降低低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 对氧化作用的敏感性。目前有人建议饮食中单不饱和脂肪最好达到占总能量的 5%~15%。

单不饱和脂肪酸作为一类膳食脂肪酸, 有其特有物理化学特性和特殊生理功能。单不饱和脂肪酸中最有代表性脂肪酸——油酸是一种重要天然物质, 被广泛用于食品与医药工业中。研究者通过流行病学调查认为, 顺式单不饱和脂肪酸对胆固醇具有明显降低作用, 摄取大量橄榄油的人患冠心病几率较低 (橄榄油单不饱和脂肪酸含量较高)。科学家们认为, 摄入单不饱和脂肪酸含量高的食品能降低低密度脂蛋白 (LDL-C) 水平和冠心病发生几率, 特别是食用高单不饱和脂肪酸代替饱和脂肪酸和蔗糖的膳食时, 这种效果更加明显。高单不饱和脂肪酸型肠内营养制剂 (clucema) 能降低 II 型糖尿病患者血糖水平, 尤

其是对餐后血糖水平降低更加明显，在临床上比标准配方营养制剂更适于糖尿病患者。还能调节血脂，降低胆固醇。同时，提高单不饱和脂肪酸的含量也可以增加油脂的稳定性，改善口感，提高营养价值。

酵母、鼠、蓝藻的硬脂酰-CoA 去饱和酶在烟草中表达时，油脂中饱和酶含量下降，把大豆中的  $\Omega 6$  去饱和酶基因反向导入大豆中，则可得到几乎不含多不饱和脂肪酸的脂肪酸。这种油脂和 Calgene 公司反义抑制内源的  $\Delta 9$  去饱和酶基因所产生的油脂同为顺式脂肪酸，是一种健康的油脂成分，预计不久将可上市。

Broun 等 (1999) 通过修饰微粒体膜结合的油酸去饱和酶活性，提高了大豆中单不饱和脂肪酸的含量。

在拟南芥中表达经修饰的蓖麻 9 18:0-ACP 去 FAEI 饱和酶，产生了占种子脂肪酸总量 13% 的 16:1 $\Delta^9$  和 18:1 $\Delta^{11}$ ，20:1 $\Delta^{13}$  (Cahoon 和 Shanklin, 2000)。在拟南芥 *fab1* 突变体 (无 3-酮酰-ACP 合成酶活性) 中同样表达这种酶，三种产物达到种子油的 30%。

Edgar 等采用表达序列标签 (EST) 从皂荚中鉴定出一个脂肪酸链延长酶 I (FAEI) 同系物——一种  $\beta$ -酮酰-CoA 合成酶基因，并在大豆的胚中表达这个基因，发现花生一烯酸的含量达单胚全脂肪酸的 18%。同时，在大豆胚中与酰基-CoA 去饱和酶共表达，花生一烯酸和二十二烯醇的总量为全脂肪酸的 12%。

**2. 生产多不饱和脂肪酸** 多不饱和脂肪酸 (PUFA) 是一类含有两个或两个以上双键且碳原子数为 16~22 的直链脂肪酸，通常熔点较低，室温下多呈液态，往往以油的形式存在，如豆油、花生油、芝麻油等。按照  $\omega$  编号系统 (n 编号系统) 可将其分为  $\omega-9$  组、 $\omega-7$  组、 $\omega-6$  组、 $\omega-3$  组，其中具有重要生物学功能的通常是  $\omega-3$  组和  $\omega-6$  组。由于大多数哺乳动物体内缺少一种从脂肪酸链羧基端数起第九位碳原子以上引入双键的脱饱和酶系统，不能自身合成这些 n-3 和 n-6 多不饱和脂肪酸，必须由膳食获取，所以，将它们称为必需脂肪酸。常见的多不饱和脂肪酸有  $\omega-3$ PUFA 中的  $\alpha$ -亚麻酸 (ALA)、二十碳五烯酸 (EPA)、二十二碳五烯酸 (DPA) 和二十二碳六烯酸 (DHA)， $\omega-6$ PUFA 中的亚油酸 (LA)、 $\gamma$ -亚麻酸 (GLA)、双高- $\omega$ -亚麻酸 (DHGLA) 和花生四烯酸 (AA) 等。

研究表明，多不饱和脂肪酸是所有细胞膜的重要成分，对机体的激素代谢和许多酶的活性起调控作用，能降低心脏病发生率，抑制前列腺增生和乳腺肿瘤，延缓免疫功能衰退，对新生儿脑和视力的发育是必要的。它们参与细胞的生长、分化，血小板的凝集，炎症的发生，出血，血管收缩、舒张，免疫反应等；可以治疗冠心病、高血压、糖尿病、关节炎、癌症，及其他超敏反应或免疫紊乱症等。由于多不饱和脂肪酸在人体健康方面的重要作用，许多多不饱和脂肪酸强化产品被不断开发，多不饱和脂肪酸的研究与应用越来越受到人们的关注。

多不饱和脂肪酸合成相关的酶有去饱和酶 (desaturases) 和链延长酶 (elongases) 是生物合成多不饱和脂肪酸的关键酶。在过去的 10 多年中，这些酶类相继从藻类、真菌、苔藓和高等动植物中鉴定、克隆出来。

去饱和酶是一种膜结合蛋白，在长链脂肪酸的特定位置引入一个双键，分  $\Omega$  型和  $\Delta$  型两种。 $\Omega$  型定位在类囊体、内质网、质体的膜上，以单半乳糖基甘油二酯酰化的硬脂酸、油酸，或卵磷脂为底物。 $\Delta$  型定位在内质网上，以酰基-CoA 为底物 (表 6-1)。

表 6-1 目前发现的与多不饱和脂肪酸合成相关的酶基因

(Olga V 等, 2004)

| 酶                            | 生物类型      | 物种                  | 参考文献                    |                   |
|------------------------------|-----------|---------------------|-------------------------|-------------------|
| 好氧去饱和酶                       |           |                     |                         |                   |
| $\Delta^4$ -去饱和酶             | 藻类        | 破囊壶菌                | Qui 等, 2001             |                   |
|                              |           | 纤细眼虫                | Meyer 等, 2003           |                   |
| $\Delta^5$ -去饱和酶             | 哺乳动物      | <i>Homo sapiens</i> | Cho 等, 1999b            |                   |
|                              | 线虫        | 秀丽隐杆线虫              | Michaelson 等, 1998b     |                   |
|                              | 真菌        | 白被孢霉菌               | Michaelson 等, 1998a     |                   |
|                              |           | 拉曼被孢菌               | Hong 等, 2002a           |                   |
| $\Delta^6$ -去饱和酶             | 藻类        | 破囊壶菌                | Qui 等, 2001             |                   |
|                              |           | 哺乳动物                | <i>Homo sapiens</i>     | Cho 等, 1999a      |
|                              |           | 家鼠                  | Cho 等, 1999a            |                   |
|                              | 线虫        | 秀丽隐杆线虫              | Napier 等, 1998          |                   |
|                              | 植物        | 玻璃苣                 | Sayanova 等, 1997        |                   |
|                              |           |                     | 报春花                     | Sayanova 等, 2003  |
|                              |           |                     | 银莲花                     | Whitney 等, 2003   |
|                              |           |                     | 角齿藓                     | Sperling 等, 2000  |
|                              |           | 藓类                  | 小立碗藓                    | Girke 等, 1998     |
|                              |           | 真菌                  | 白被孢霉菌                   | Chaudhary 等, 1999 |
|                              | 拉曼被孢菌     |                     | Hong 等, 2002b           |                   |
| 双功能 $\Delta^5/\Delta^6$ 去饱和酶 | 鱼类        | 玫玛鱼                 | Hastings 等, 2001        |                   |
| $C_{20}\Delta^8$ -去饱和酶       | 原生生物 (绿藻) | 纤细眼虫                | Wallis 和 Browse, 1999   |                   |
| $C_{18-20}n-3$ 去饱和酶          | 线虫        | 秀丽隐杆线虫              | Spychalla 等, 1997       |                   |
| 好氧延长酶                        |           |                     |                         |                   |
| $\Delta^6$ -延长酶              | 线虫        | 秀丽隐杆线虫              | Beaudoin 等, 2000        |                   |
|                              | 藓类        | 拉曼被孢菌               | Zank 等, 2000            |                   |
|                              | 真菌        | 白被孢霉菌               | Parker - Barnes 等, 2000 |                   |
| PUFA-延长酶                     | 哺乳动物      | <i>Homo sapiens</i> | Leonard 等, 2002         |                   |
| $\Delta^9$ -延长酶              | 藻类        | 金藻                  | Qi 等, 2002              |                   |
| 厌氧酶                          |           |                     |                         |                   |
| EPA 聚酮合成酶                    | 细菌        | 腐败希瓦氏菌              | Takeyama 等, 1997        |                   |
| DHA 聚酮合成酶                    | 藻         | 裂殖壶菌                | Metz 等, 2001            |                   |
|                              | 细菌        | 白被孢霉菌               | Metz 等, 2001            |                   |

链延长酶已经从多种生物中克隆出来，在不同的生物作用的底物不同（ $n-6$  或  $n-3$  型）。脂肪酸的延伸包括四个步骤：聚合（condensation）、还原（reduction）、脱水（dehydration）、再还原（second reduction）。4 种酶参与相关的反应，即一个  $\beta$ -酮酰-CoA 合成酶、一个  $\beta$ -酮酰-CoA 还原酶、一个  $\beta$ -羟酰-CoA 水解酶、一个 酰-CoA 还原酶。这些酶存在同一植株中，表达水平各不相同。由  $\beta$ -酮酰-CoA 合成酶负责产生底物的特异性和总酶活，控制链最初的聚合。目前已鉴定的  $\beta$ -酮酰-CoA 合成酶分成两类。第一类包括 FAE 样植物酶，它在  $C18\sim 22$  饱和和脂肪酸的生物合成中起作用。目前，未发现其在多不饱和脂肪酸（PUFA）的合成中起作用。第二类聚合酶来自酵母 ELO 因家族，它为合成（神经）鞘氨（基）脂组分的 VLCFA 所必需。最近，人们证实 ELO 型 VLCFA 延伸酶参与 PUFA 的生物合成。例如，多种来自真菌、苔藓及线虫的  $C18\Delta^6$  特异延伸酶基因被克隆，并在酵母中成功获得表达。PUFA3 生物合成存在多条途径，为研究者通过转基因油料作物合成需求脂肪酸提供了广泛的选择空间。目前最优的途径是基于需氧的“前端”去饱和酶和延伸酶。为了在基因工程油籽中生成诸如 EPA 等 PUFAs，首先在番茄或拟南芥中表达琉璃苣的  $\Delta^6$  脂肪酸去饱和酶可生成  $18:3n-6$  和  $18:4n-3$ 。这清楚地说明，PUFAs 生物合成所需特别的脂肪酸可与宿主植株的甘油酯相结合。

$\omega 6$  和  $\omega 3$  型的 PUFAs 分别由亚油酸（LA）和  $\alpha$ -亚油酸（ALA）衍生而来。图 6-2 显示长多不饱和脂肪酸的合成过程。

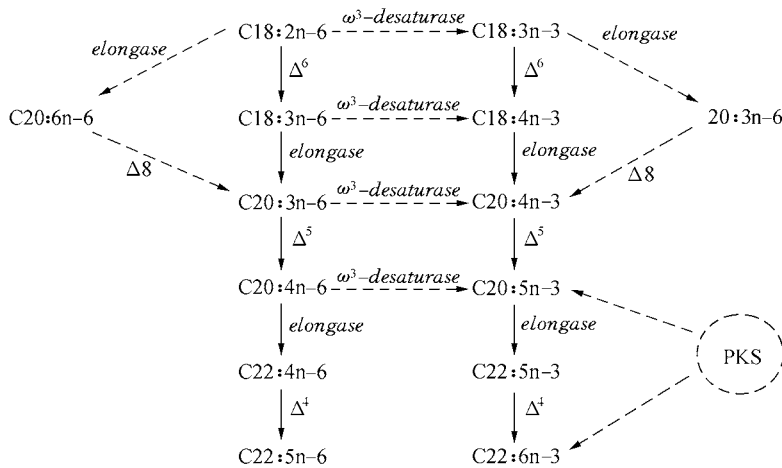


图 6-2 长链 PUFAs 的生物合成过程

### （三）转基因植物合成多不饱和脂肪酸的应用研究

**1. 亚油酸 (linoleic acid, LA)** 亚油酸含有十八个碳原子、二个烯键，在机体里是构成组织细胞的重要物质，参与磷脂合成，与胆固醇运输及代谢有关。一旦饮食供给不足会导致细胞膜正常功能障碍，胆固醇正常代谢受阻，易诱发动脉粥样硬化，还可使精细胞生成发生障碍，导致动物不育。亚油酸也是前列环素和血栓素 A2 的前体，对血管舒缩和血小板聚集有重要调节作用。同时，亚油酸是多种人体必需脂肪酸的前体，如转化成二十二碳五烯酸（EPA,  $C22:5, n-3$ ）、二十四碳六烯酸（DHA,  $C24:6, n-3$ ）、亚麻酸

(十八碳三烯酸)、花生四烯酸(二十碳四烯酸)。亚油酸在动物体内少量可转化为 EPA 和 DHA。在一般情况下,人体将亚麻酸转化为 EPA 和 DHA 的效率很低。

玉米油、芝麻油、葵花籽油和红花油等植物油中含有大量亚油酸(C18:2, n-6),通过高剂量表达与合成相关的基因,或是抑制转化代谢的基因,可以在这些玉米、芝麻、向日葵、红花中得到高含量的 LA。

**2.  $\gamma$ -亚麻酸( $\gamma$ -linolenic acid, GLA)** 豆油、亚麻子油和海藻中含有较多的 n-3 系的  $\gamma$ -亚麻酸(C18:3, n-3)。但因为栽培、收获及提取的高费用,来源于琉璃苣、报春花、茶子等富含 GLA 的植物提供的 GLA 价格昂贵,人们试图通过转基因油料作物生产 GLA。

GLA 产生的关键步骤是在 LA 的  $\Delta^6$  和  $\Delta^7$ -C 中插入双键,这个步骤可由  $\Delta^6$ -去饱和酶介导完成。这种酶可以从多种生物中分离得到。通常从微生物和植物中分离的  $\Delta^6$ -专一的作用磷酸酯-LA 底物,而从哺乳动物分离的作用于 CoA-LA 底物。

Kinney 等在转基因大豆中表达琉璃苣  $\Delta^6$ -去饱和酶,在种子特异启动子的控制下,GLA 的量占种子脂肪酸的 51%。由于 GLA 大量积累是生物合成 C20-PUFA 的先决条件,这些实验数据预示着今后试验有着极好的前景。最近,研究者尝试在植物中共表达  $\Delta^6$ -去饱和酶和  $\Delta^6$ -延伸酶及  $\Delta^5$ -去饱和酶。1997 年, Sayanova 等从琉璃苣中克隆到第一个既在 n-6 又在 n-3 代谢途径中起重要作用的基因  $\Delta^6$ -脂肪酸去饱和酶基因,并在烟草和酵母中表达,此研究揭示了 GLA 在外源 LA 和 ALA 存在下在转基因植物和酵母中的形成过程。

如今,绝大多数  $\Delta^6$ -去饱和酶已在酵母中获得表达,并具有生物功能。有些已在油料作物中测试。Yung-Sheng Huang 等在低亚油酸含量的芸薹中共表达来自 *M. alpina*  $\Delta^6$  和  $\Delta^{12}$ -去饱和酶,使 GLA 的量达到 40% 以上(Huang 等, 2001)。H. Hong 等在芸薹中表达 *P. irregulare*  $\Delta^6$ -去饱和酶,在种子中 GLA 含量达 25%~40%,并且因为芸薹中含丰富的 ALA,同时也产生 2%~10% 的硬脂二烯酸(SDA)(18:4 n-3)(Hong 等, 2002)。

Amene 等利用转基因番茄和亚麻子种子生产 C20-PUFA (ARA 和 EPA)。他们利用可编码两个不同的区域特异的去饱和酶( $\Delta^6$  和  $\Delta^5$ ) 和一个  $\Delta^6$ -延伸酶的异源 cDNA 序列,每个酶基因最多可由 3 个不同的种子特异性启动子控制。他们利用来自真菌、海藻、苔藓或高等植物的去饱和酶基因和延伸酶基因构建双价载体,并转化番茄和亚麻子,收集转基因植株种子,并用气相-液相色谱分析脂肪酸。在检测的 4 个重组中,只有重组 C、D 成功表达。通过农杆菌介导转化,获得了能表达重组 C 的 50 株转基因番茄和 46 株亚麻子。在 T2 代种子中, $\gamma$ -亚麻酸(18:3  $\Delta^{6,9,12}$ ) 和硬脂酸(18:4  $\Delta^{6,9,12,15}$ ) 占总脂肪酸(FA) 的比例较高,分别达到番茄中 2%~29% 和亚麻子中 3%~37%。C20-PUFA 也有较高的产量,在番茄中可达 1%~3%,亚麻子中 0.5%~8.3%。Huang 等(2001) 在加拿大油菜中共表达 *M. alpina*  $\Delta^6$  和  $\Delta^{12}$ -去饱和酶,它可聚集高达 50% 的 GLA。

**3. 二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)** EPA 在体内有协调前列环素和血栓素 A2 的作用,使凝血时间延长和血管舒张,对降低冠心病并发症危险有一定好处。EPA 主要存在鱼油中,尤其是深海冷水鱼油中含量较高。但目前世界上大多数人对 EPA 的摄入量不能满足人体需求,同时,鱼类资源却日渐匮乏,因此,研究人员将目光转向了植物。

从 ALA 到 EPA,包括三个步骤:首先 ALA 去饱和生成 SDA,接着 SDA 延伸成二



十碳三烯酸 (ETA) (C<sub>20</sub>: n - 3), 最后 ETA 去饱和生成 EPA。Δ<sup>6</sup>-去饱和酶、C18 - PUFA 特异延伸酶、Δ<sup>5</sup>-去饱和酶, 这三种酶都存在于 ω - 3 和 ω - 6 途径, 且富含 ALA 的植物同时也含有丰富的 LA, 所以在植物中往往合成 ARA 和 EPA 的混合物 (图 6 - 3)。为了在 EPA 的合成中减少 ARA 生成, 选用 ω - 3 - 去饱和酶使 n - 6 PUFA 的合成转向 n - 3 的途径。这种酶已从植物、低等真核生物和藻青菌中发现。之所以称呼它为 ω - 3 是因

脂肪酸(二十碳五烯酸/二十二碳六烯酸)的生物合成

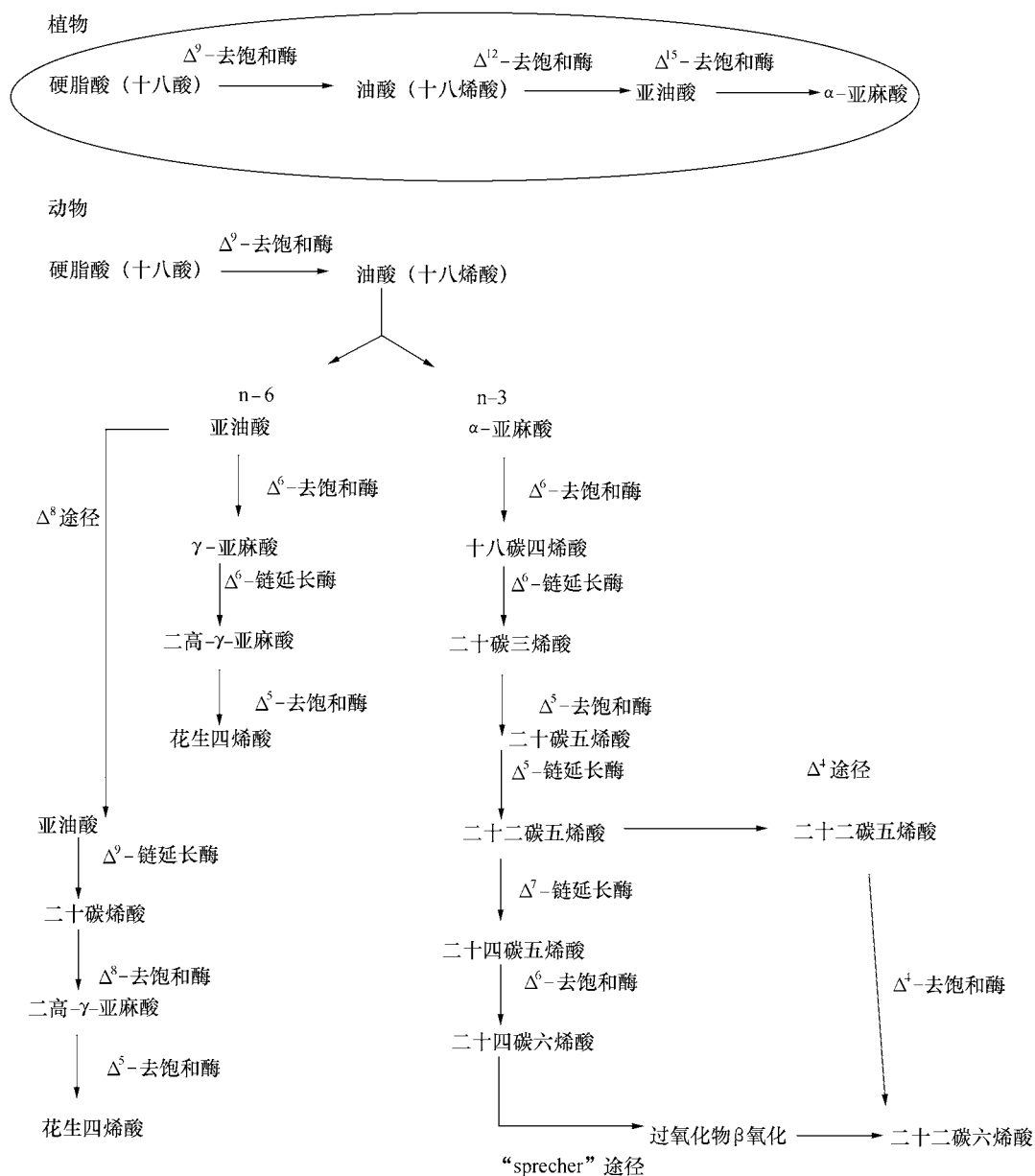


图 6 - 3 C<sub>20</sub> + PUFAs (EPA/DHA) 的生物合成

为它能够在离甲基端第 3 个碳原子引入双键。所有植物和藻青菌的  $\omega-3$  去饱和酶都专一作用于 C18-PUFA, 将 LA 转变成 ALA, 但在高 LA/ALA 比例的种子中效率并不是很高。

Pereira 等从真菌中鉴定了另外一个新的能特异将 ARA 转变成 EPA 的  $\omega-3$  去饱和酶, 并成功在油料作物中表达。这样,  $\omega-3$  去饱和酶具有催化 n-6 向 n-3 途径转变以生产 EPA。

拟南芥中在 35S 启动子的控制下共表达  $\Delta^9$ -链延长酶 (来自 *Isochrysis galbana*)、 $\Delta^8$ -去饱和酶 (来自 *Euglena gracilis*)、 $\Delta^5$ -去饱和酶 (来自 *Mortierella*), 转基因叶片中产生了 6.6%AA 和 3.0%EPA。

在烟草和亚麻中共表达种子特异表达的编码脂酰去饱和酶和链延长酶的 cDNAs, 植株中富集了  $\Delta^6$ -去饱和酶型去饱和 C18 脂肪酸, 包括 AA 和 EPA 在内, 近 5%的 C20 多不饱和脂肪酸。

英国布里斯托尔大学的科学家 Colin Lazarus 从海藻和蘑菇中分离出负责制造多不饱和脂肪酸的 3 个基因, 并植入水芹, 使它们的种子中 EPA 和类似的健康脂肪酸的含量占到了其油含量的 22%。

Kinney 等在大豆种子中特异共表达来自 *Mortierella alpina* 的  $\Delta^6$ -链延长酶和  $\Delta^5$ -去饱和酶, 来自拟南芥的  $\Delta^{15}$ -去饱和酶及来自 *Saprolegnia diclina* 的  $\Delta^6$ 、 $\Delta^{17}$ 去饱和酶, 在转基因植株的种子中产生了占总脂肪酸 20%的 EPA(Kinney, 2004)。

目前, 在植物中共表达 PUFA 生物合成基因, 成功产生 ARA 和 EPA 的例子不多。原因在于真菌和海藻来源的去饱和酶作用的底物是磷脂连接的 LA 和 ALA, 而 PUFA-特异的链延长酶作用的是酰基-CoA 底物。在植物中缺乏将磷脂转化成酰基-CoA 池的酰基转移酶 (Domergue 等, 2003)。因此, 必须进一步鉴定将磷脂连接的 PUFAs 转化成酰基-CoA 池的相关代谢途径及酶基因, 才能更成功地在转基因植物中表达 EPA。

**4. 二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA)** DHA (二十二碳六烯酸) 作为另一种人体必需脂肪酸, 是婴幼儿大脑发育和成人脑功能的维持不可缺少的物质, 也是人体视觉神经发育必需营养素, 占视网膜全脂肪酸的 60%。DHA 主要存在于鱼油中, 尤其是深海冷水鱼油中含量较高。DHA 很容易通过大脑屏障进入脑细胞, 存在于脑细胞及脑细胞突起中。人脑细胞脂质中有 10%是 DHA。因此 DHA 对脑细胞的形成和生长起着重要的作用, 对提高记忆力、延缓大脑衰老有着积极的意义。目前, 市售 DHA 产品一般来自深海鱼油, 但其中往往混有 EPA。EPA 虽有软化血管功效, 但美国国际脂肪酸研究机构的研究表明, 它对胎儿、婴幼儿以及儿童和青少年的生长发育有副作用, 所以生产不含 EPA 的 DHA 产品成为国际该领域科研人员关注的课题。目前除我国润科公司以外, 世界上还有美国的 Omega Tech 生物工程公司开发出的不含 EPA 的 DHA 微藻产品。鱼类资源日渐匮乏, 因此, 研究人员将目光转向了植物。

在低等真核生物中, DHA 经过两个步骤可由 EPA 合成而得。它包括 EPA 延伸成 n3-DPA, 接着在  $\Delta^4$ -去饱和酶作用下生成 DHA。已有许多哺乳动物源性链延长酶被证实它们可识别并延伸 C20-PUFA。在酵母中表达这些酶基因, 显示这些酶可识别多种长链-PUFA。例如 C18-、C20-、C22-PUFA 等。特异延伸 C20-PUFAs 的酶已从低等

真核生物中被鉴定，它在合成 DHA 中发挥生物活性。

第一个被证实的 4-去饱和酶来自富含 DHA 的海洋原核生物 (*Thraustochytrium*)。4-去饱和酶能够在 n3-DPA 的 4 号碳原子上引入双键，使 n3-DPA 生成 DHA，或在 ADA(C22: 4 n-6) 的 4 号碳原子上引入双键生成 DPA(C22: 5 n-6)。Qiu 等已在油料作物芸薹 (*B. juncea*) 中表达这个酶，在外源 n3-DPA 存在下，叶、茎、根中 DHA 的含量可达 3%~6%。最近，从 *E. gracilis*、*Pavlova*、*Isochrysis* 鉴定到另一种新的  $\Delta^4$ -去饱和酶基因。虽然在酵母中可通过共表达 C18 延伸酶， $\Delta^5$ -去饱和酶和 C20-延伸酶、 $\Delta^4$ -去饱和酶，产生 DHA，但类似的研究未在植物中做过。因此，在油料作物中生产 DHA 还包括共表达 C20-PUFA 延伸酶、 $\Delta^4$ -去饱和酶及其他 EPA 生产中需要的酶。

**5. 花生四烯酸 (arachidonic acid, ARA)** 从 LA 产生 ARA 包括三个过程。LA 在  $\Delta^6$ -去饱和酶的作用下生成 GLA，GLA 在 C18-PUFA 特异延伸酶作用下生成双单聚亚麻酸 (DGLA)(C20: 3 n-6)，随后在  $\Delta^5$ -去饱和酶的作用下生产 ARA。Kuntzon 等从富含 ARA 的真菌 *M. alpina* 中分离 C18-PUFA 特异延伸酶。此酶在酵母中能特异识别并延伸 n-6 C18-PUFA 底物，如 GLA 或 n-3 C18-PUFA 底物 SDA，但对单不饱和及饱和脂肪酸没有活性，从其他多种生物中也分离到类似活力的酶。这些酶被认为能够识别与 CoA 相连的底物，它区别作用酯载蛋白 (acylcarrier protein) 相连的底物，是延长长链饱和脂肪酸和单饱和脂肪酸的植物来源的延长酶。

在其他的生物中发现另一条 DGLA 生物合成途径。LA 首先延伸成二十碳二烯酸 (EDA)，随后其在 8-去饱和先生成 DGLA。在这一途径中的延伸酶已从海藻中鉴定，8-去饱和酶也已从生产 DHA 的海洋原核生物 *Euglena gracilis* 分离得到。

ARA 合成的最后一步即 DGLA 在 5-去饱和酶得到 ARA。 $\Delta^5$ -去饱和酶已从多种生物包括人中鉴定，某些已确定在酵母中有活性。当将 *M. alpina* 的  $\Delta^5$ -去饱和酶导入 *B. napus* 时，它能够使油酸-CoA 去饱和生成十八碳二烯酸 (taxoleic acid)(18: 2 $\Delta^{5,9}$ )，而 LA 转化成十八碳三烯酸 (pinolenic acid)(18: 3 $\Delta^{5,9,12}$ )。最近，QI 等将来源于 *M. alpina* 和来源于 *I. galbana* 的  $\Delta^9$ -特异延伸酶，*E. gracilis*  $\Delta^8$ -去饱和酶在拟南芥共表达，ARA 的产量很低。

**6. 二十二碳五烯酸 (docosa pentaenoic acid, DPA)** 国际医学研究表明，DPA (二十二碳五烯酸) 是一种人体必需脂肪酸。它具有降血脂、软化血管和防治心血管疾病的显著功效，并且在这些方面的功效比被称之为血管清道夫的 EPA (二十碳五烯酸) 还要强 10~20 倍，同时，DPA 还可以提高人体的免疫力。此前，DPA 唯一的商业来源是生活在北极的海豹，资源极其有限，而且从海豹中提纯 DPA 技术难度大、成本较高、质量难以稳定。因此长期以来，寻找含有 DPA 的植物资源已成为世界科研难题。目前发现大西洋鲑含有丰富的 DPA。在大豆的肉胚中表达了达脂肪酸总含量 0.8% 的 DPA。

#### 第四节 转基因植物生产脂类存在的问题与对策

随着人类对脂类合成代谢及分解代谢的研究不断地深入，与脂类合成相关的酶基因不断被鉴定和分离出来，并不断在各种现栽培的油料作物中验证这些基因的功能，人类以转

基因的油料作物成功生产人类所需脂类物质的时代离我们越来越近。但目前，能够理想表达脂类的转基因植株还极少甚或是没有，人类还有很长一段路程要走。总结现在转基因植物生产脂类不理想的原因主要有目前在植物表达某种异源基因，还存在转基因沉默、表达量低等问题；对脂类合成途径的了解还有待深入；合成的产物不能有效地积累到植株的种子中等。

## 一、提高转基因植物中外源基因的表达量

表达量低或是发生转基因沉默是目前转基因植物表达人类所需物质（蛋白质、多肽、糖类、脂类、次生代谢物等）面临的一个严重问题，在前面的章节已系统介绍，这里不再累叙。就表达脂类来说，是指提高酶基因的表达量，为其发挥催化功能提供必需的浓度，主要包括采用强启动子；优化酶基因的密码子序列，消除可能造成转录产物不稳定或翻译产物易降解的序列等。

## 二、深入研究合成途径，提高脂肪酸合成量

脂类的合成是一个相当复杂的过程，特别是某些稀有脂肪酸合成需要一系列酶的催化，这就需要同时表达多种酶才有可能更好地得到目的产物。因此，大量的酶需要发现、鉴定、克隆和验证功能。高通量筛选这些酶类成为首要的工作。采用表达序列标签（EST）可以找到一些与已知基因同源的序列，再进行少量的测序就可以很快将这些基因克隆出来，用这种方法已经鉴定出许多酶基因。因为编码脂肪酸合成的相关酶基因在其cDNA文库中占0.1%~1.0%的比例，大规模的任意测序也可以钓出相关的目的基因。一般单独表达一个或少数几个酶基因，脂肪酸的产量不会很高，采用表达一系列酶是理想的方式。

对合成途径的深入研究还包括研究某种脂肪酸原初来源物种中其他与合成相关的辅因子的作用。在不同的植物中同时表达一系列相同的酶，产物的量有很大的变化。如在大豆和亚麻子中同时表达6-链延长酶，发现产物的量有很大的变化。经检测，表明这种变化不是由启动子和酶活性引起的，而是由一种酰-CoA：脂肪-卵磷脂基转移酶的活性不同引起的。在大豆中，这种酶可以作用6-链去饱和酶的酰基基团，使其成为可被6-链延长酶的底物。

酶活的有效发挥还包括提供底物的种类和水平。不同的受体提供不同的底物。异源表达脂肪酸合成相关的酶，酶作用的底物在受体植物中不存在或甚少，严重影响催化作用的发挥。因此，对受体的选择很重要。

另外，许多人类需要的具特殊用途的脂肪酸往往都不存在于现在的栽培种中，而存在于深海的藻类、鱼类、苔藓、真菌、细菌和一些极地植物中，快速发现一种产生某种脂肪酸物种也是很重要的。目前已经发展了气相色谱等技术，可以快速地对蛋白质进行分离、纯化。

与植物表达蛋白一样，我们可以采用蛋白质工程对酶基因进行修饰，使其更适合在受

体表达, 或有更高的活性, 或是产物更适合往后的酶促反应等。

### 三、提高脂肪酸在油料种子中的有效积累

脂肪酸在种子中的高量积累对生产来说是至关重要的。目的脂肪酸达不到 90% 以上就很难低成本将其抽提出来, 用于工业或医疗。在现栽培的油料植物中表达某种在该植物中原不存在的脂肪酸, 会发现积累量很低。主要是表达某些原油料作物中不存在的脂肪酸导致脂肪酸的代谢进入一个不利于脂肪酸积累的循环; 脂肪酸的合成与脂肪酸在种子发育过程中的积累不同步进行; 合成的脂肪酸以磷脂的形式存在于细胞膜中。研究脂类合成后的代谢对脂肪酸合成后的积累很必要, 可以通过下调、抑制与脂肪酸转化成其他产物相关的代谢过程或酶活, 使脂肪酸朝高量向种子中积累的方向进行; 采用种子特异表达的启动子, 使脂肪酸的合成与种子发育过程中油脂的积累时间尽量一致; 共表达将磷脂转化成酰基化脂类, 向种子中积累, 以 TAG 的形式储存等。

在转基因油料作物中表达符合人类要求的脂类物质研究早已开始, 并取得了许多成就。可以预计在不久的将来, 我们就可以用到这些脂类物质, 保证我们的健康, 为我们提供保健、美味的食品, 不再压迫深海的鱼类为我们服务, 我们的工业也因为它们的出现变得“高枕无忧”。我们也可以将这个工程再扩展, 生产如类二十烷酸、磷脂和鞘脂、结合脂类、萜类和固醇类等具有重要用途的脂类衍生物。但目前, 我们还只处于研究的初级阶段, 只有当我们完全了解脂类合成和分解代谢的前前后后, 与其相关的基因的功能, 以及提出足够的证据让公众接受转基因的产物等, 我们才能真正得益于转基因的油脂产品。

## 参 考 文 献

- [1] Broun P, Gettner S, Somerville C. Genetic engineering of plant lipids. *Annu Rev Nutr*, 1999, 19 (1): 197~216
- [2] Cahoon E B and Shanklin J. Substrate - dependent mutant complementation to select fatty acid desaturase variants form etabolic engineering of plant seed oils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97: 12350~12355
- [3] Dehesh K, Jones A, Knutzon D S, et al. Production of high levels of 8: 0 and 10: 0 fatty acids in transgenic canola by overexpression of Ch FatB 2, a thioesterase cDNA from *Cuphea hookeriana*. *Plant J*, 1996, 9: 167~172
- [4] E Domergue, A Abbadi, C Ott, et al. Acyl carriers used as substrates by the desaturases and elongases involved in very long - chain polyunsaturases fatty acids biosynthesis reconstituted in yeast. *J. Biol. Chem.* 2003, 278: 35115~35126
- [5] Gunstone, F. D. Soybean pace boost in oilseed production. *Inform*, 2001, 11: 1287~1289
- [6] H. Hong, N. Datla, D. W. Reed, et al. High - level production of gamma - linolenic acid in brassica juncea using a delta6 desaturase from *Pythium irregulare*, *Plant Physiol*, 2002, 129: 354~362
- [7] Huang Y S, Mukerji P, Das T, et al. Transgenic production of long - chain polyunsaturated fatty acids. *World Rev. Nutr. Diet*, 2001, 88: 243~248



- [8] Kinney, et al. Patent application WO, 2004
- [9] Kinney A J. Development of genetically engineered soybean oils for food application. *Food Lipids*, 1996, 3: 935~937
- [10] Lardizabal K D, Metz J G, Sakamoto T, et al. Purification of a jojoba embryo wax synthase, cloning of its cDNA, and production of high levels of wax in seeds of transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2000, 122: 645~655
- [11] Metz J G, Pollard M R, Anderson L, et al. Purification of a jojoba embryo fatty acyl - coenzyme A reductase and expression of its cDNA in high erucic acid rapeseed. *Plant Physiol*, 2000, 122: 635~644
- [12] Penny M, Kris - Etherton, Terry D. Etherton. The impact of the changing fatty acid profile of fats on diet assessment and health. *Journal of Food Composition and Analysis* 2003, (16): 373~378
- [13] Liu Q, Singh S, Green A. High - oleic and high - stearic cotton seed oils: Nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. *Journal of the American College of Nutrition*, 2002, (21): 205~211
- [14] Voelker T A and Kinney A J. Variations in the biosynthesis of seed storage lipids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 2001, 52: 335~361
- [15] Voelker T A, Worrell A C, Anderson L, et al. Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants. *Science*, 1992, 257: 72~74
- [16] Voelker T A, Hayes T R, Cranmer A M, et al. Metabolic and genetic parameters influencing the accumulation of laurate in rapeseed. *Plant J*, 1996, 9: 229~241
- [17] YS Huang, JW Liu, S. De Michele, et al. Evaluation of the seed oils from a caola plant genetically transformed to produce high levels of  $\gamma$  - Linolenic Acid—Recent Advances in Biotechnology and Clinical Applications. AOCs Press, Champaign, IL, 2001: 61~71

## 第七章 转基因植物生产次生代谢产物 (可降解塑料、生物碱等)

目前,转基因植物已经应用于商业化生产。其中转基因植物生产次生代谢物是一个极具商业前景的领域。在医药、环境、农业等方面已有许多成功应用的实例。随着基因组学研究的深入,大量的功能基因被发现和克隆,为基因工程奠定了基础;另一方面,植物中一些重要生理过程和产物的生化代谢途径被阐明,为合理利用基因资源、调节代谢途径、定向地控制目的基因的表达,以及进一步通过基因工程手段调控植物提供了条件。通过代谢调节,可以调控植物的生长发育,可使植物高水平积累某一有价值产物。本章分别以可降解塑料与生物碱为代表介绍一些转基因植物生产次生代谢产物的研究。

### 第一节 利用转基因植物生产生物可降解塑料 (PHAs)

#### 一、生物可降解塑料简介

化学合成塑料因其质轻、强度高、稳定等优良性质与低廉的价格,已成为现代社会不可缺少的重要高分子材料,在国民经济中发挥着重要作用。但其固有的不可降解性却使大量的塑料废弃物对环境造成严重的污染,使昔日的“白色革命”演变成今日的“白色污染”。而且由于目前废弃塑料的回收利用率很低,又造成资源的巨大浪费。传统塑料废弃物处理以末端治理为主,虽在一定程度上减轻了污染,但代价昂贵。在人类渴求良好生存空间、环保意识日益提高的今天,开发可降解型塑料,从源头遏制污染已是全人类的共识。

目前世界上许多国家都在积极开展这方面的研究,并已有一系列产品问世。可降解塑料分为两大类:光解塑料和生物可降解塑料。光解塑料是把光敏感基因直接掺入共聚物主链中或作为附加成分。通过光解作用把共聚物分解为不可降解的小碎片,失去材料结构的完整性,从而达到缓解环境污染的目的。但目前对此类部分可降解塑料尚存争议,因为分解形成的微小碎片会破坏土壤结构,容易造成再次污染,这个缺陷限制了光解塑料的广泛应用。而理想的生物可降解性聚合物在使用过程中能够保持其各项性能,一旦废弃后也不产生任何有毒中间产物,而是被环境中的微生物分解为二氧化碳、水、甲烷及生物能量,完全进入生态循环,不会对环境造成任何污染。目前对已投入市场的大约 20 种生物可降解塑料的应用证明,生物可降解塑料的性能完全适合消费品的需要,是从源头上解决白色污染的新型材料。

在多种可降解塑料中,聚羟基烷酸酯 (polyhydroxyalkanoates, 简称 PHAs) 便是其中最重要,并已经开始投放市场的一种塑料原材料。PHAs 除具有完全的生物降解性外,

还具有与化学合成塑料相似的物理机械性能, 以及生物相容性、光学活性、无毒性、压电效应等优良特性, 在工业、农业、医学等领域均具广泛的应用前景。

聚羟基烷酸酯 (polyhydroxyalkanoates, PHAs) 共聚物完全来自细菌的发酵生产, 并且已进入商品化。但由于成本太高, 严重影响了 PHAs 的大规模生产和应用。30 年来, 英国、韩国、美国、日本、德国等许多国家研究人员对 PHAs 进行了微生物学、生物化学、遗传学以及分子生物学等多方面的研究, 在微生物合成 PHAs 的代谢途径的调控、遗传机制、PHA 的结构与理化性质等方面积累了丰富资料, 并且微生物发酵小规模生产已在进行。英国 Zeneca 公司是当今唯一商业化生产 PHAs 的厂家, 利用真氧产碱杆菌年产 1 000 t, 产品商标名 BIOPOL, 优惠价每千克 16 美元。日本、德国等国已有 BIOPOL 生产的香波瓶、一次性剃须刀、各种容器、一次性餐具等产品面市。但相对售价低于每千克 1 美元的化学合成塑料如聚乙烯而言, PHAs 生产成本太高, 无法占据市场。因此, 降低 PHAs 生产成本, 使其生产规模化, 是将其推向应用的关键所在。

PHAs 的研究已有 70 多年的历史。最早人们是在 *Azotobacter chroococuum* 中观测到这种可溶于氯仿的物质, 而后以聚羟基丁酸酯作为最简单的 PHAs 于 1926 年被 Lemoigne 等确定为标志, PHA 研究开始了它的第一个阶段, 这个阶段主要研究了 PHB 的功能。聚羟基丁酸酯 (PHB) 是细菌细胞内积累的一种能被微生物的酶所降解的一种高分子聚合物, 作为细胞内的能量和碳源物质。PHB 的性质与目前普遍使用的合成塑料有许多相似之处, 例如可压塑、成膜和拉丝等。此外, 它还具有生物可降解性和生物相容性等优点, 在医学尤其是在组织工程上, 具有重要的作用。因此, PHB 作为一种新型的塑料替代品以及生物医学材料, 利用微生物发酵法生产 PHB 已成为 PHB 研究领域的热点。有 65 个属 300 多种微生物能够积累 PHB, 其中真养产碱杆菌 (*Alcaligenes eutrophus*) 具有生长速度快、PHB 积累量大、生产技术较为成熟等优点, 已经能够用于工业化小规模生产 PHB 和 PHBV, 但价格仍比合成塑料贵。因此, 降低 PHB 生产成本的探索工作仍在继续着。直到 1974 年, Wallen 和 Rohwedder 才报道了除 PHB 外的其他 PHA, 由此进入了 PHA 研究的第二个阶段。这个阶段研究者们最大的成功便是实现了第一代 PHA (PHB) 和第二代 PHA [聚羟基戊酸聚酯—Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) 或 (PHBV)] 的工业化生产。而在这个阶段人们才广泛认识了中长链 PHA。1998 年第一个 PHA 合成基因被 Slater 等克隆出来, 这标志着 PHA 的研究进入了一个全新的时期——分子生物学时期。分子生物学技术和基因工程给 PHA 的研究带来了天翻地覆的变化, 人们可以更自由地调控 PHA 的生物合成, 许多新型 PHA 被合成出来。而且, 不同的短链和中长链羟基脂肪酸单体 (HA) 聚合物的合成都成为了现实。但是, 目前 PHA 在价格上还很难与传统的塑料工业竞争, 因此限制了 PHA 的广泛应用。当前对 PHA 的应用主要集中在能产生高附加值的领域。相信随着今后蛋白技术的不断发展, PHA 的研究也将进入一个新的阶段。

### (一) 研制生物可降解塑料的必要性

石油工业的兴起, 使得石油化工合成塑料在人类生活中扮演着重要的角色。石油化工合成塑料已成为现代社会不可缺少的重要材料, 无论是工业、农业、建筑业, 还是人们的

日常生活，无不与它密切相关。然而，目前所使用的化学合成塑料在自然环境中很难分解，也不易被腐蚀，燃烧处理又会产生有害气体，对环境造成巨大危害。

随着社会的发展，塑料污染问题将继续严重。为了保护环境，防止污染，并从长远考虑，发展生物可降解塑料十分必要。目前，世界上许多国家都在积极研制开发，并开始考虑用生物降解塑料代替部分石油化工合成塑料，还陆续颁布了一些法规禁用某些塑料制品。生物可降解塑料的研究一直是近年来国内外研究和开发最为活跃的领域。1996—2001年，生物可降解塑料的平均增长率为35%，其中美国的产量和消费量占50%以上，西欧占33%。因此，研究与开发生物可降解塑料已势在必行。

与化学塑料相比，生物可降解塑料最大的优点是以后能为生物所降解，不会对周围环境造成污染。废弃的生物可降解塑料进入土壤中可成为肥料；进入水域可成为水生生物的营养物；进入人体内无毒害，无免疫排斥反应，可被消化，完全纳入代谢循环系统。因此，被称为生态绿色塑料。在众多的可生物降解材料中，聚羟基烷酸酯（简称 PHAs）作为一种有光学活性的聚酯，不仅具有与化学合成塑料相似的性质，还具有生物可降解性和生物相容性等特殊性能，还可作为可再生利用的资源，已成为同类用途的石化合成塑料最有潜力的替代品，可避免或减少塑料废物对环境的污染，具有深远的环保意义。

## （二）PHAs 的结构和分类

约在 300 多种细菌（包括革兰氏阴性菌和阳性菌）中发现 PHAs 的存在，是某些处于非营养平衡生长状态下微生物细胞内合成的一种储藏性聚合物。PHAs 是一个庞大的家族，PHAs 的分子的骨架为 D(-)-羟基链烷酸单体（图 7-1），随 R 基、共聚单体、链长短及羟基位置不同而形成不同类型。R 代表侧链，多为不同链长的正烷基，也可以是支链的、不饱和的或带取代基的烷基。当侧链 R 为甲基， $x=1$  时单体为  $\beta$ -羟基丁酸（HB），其聚合物为聚羟基丁酸酯（简称 PHB），是结构最简单的一种 PHAs。

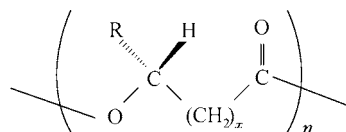


图 7-1 PHAs(R 型) 结构通式  
( $R = \text{Hor } C_1 \sim C_{11}$ ,  $x=1 \sim 4$ ,  $n=100 \sim 30\,000$ )

R 为乙基时，单体为  $\beta$ -羟基戊酸（HV），其聚合物为聚  $\beta$ -羟基戊酸（简称 PHV），其他依此类推。此外，在一定条件下两种或两种以上的单体还能形成共聚物，其典型代表是 3HB 和 3HV 组成的共聚物 P(3HB-co-3HV)，又写成 PHBV。由于合成过程中 PHAs 聚合酶的空间特异性，一般结构单元为 R 型，但极少数情况下也有 S 型单体。随微生物种类及其生存环境的不同，PHAs 分子量一般为 200~3 000 ku。

目前已有 100 多种不同的脂肪酸作为 PHA 的单体被发现，包括碳原子数从 3~14 的大量含饱和或不饱和键或支链的脂肪族以及芳香族 3-羟基脂肪酸。根据单体组成可将 PHAs 分为 3 类：①短链（short-chain-length, scl）脂肪酸共聚体，单体为含 3~5 个碳原子的羟基脂肪酸。PHB 和 PHBV 是结构最简单、研究较深入的 scl-PHAs，该类 PHAs 为结晶度很高的热塑性塑料。其缺点在于韧性较差。②中长链脂肪酸共聚体（medium-chain-length, mcl），单体为含 6~14 个碳原子的羟基脂肪酸。相当一部分

mclPHA 中含各种功能基团, 如烯、支链烷基、卤素、酚及氰等。在一定条件下两种或两种以上的单体还能形成共聚物。mcl-PHAs 与 PHB 一样是完全等规体, 其玻璃化温度远低于室温, 熔融温度也较热塑性塑料 PHB 低。③短链(多为 HB)与长链 HA 单体共聚物。*Pseudomonas pseudoflava* 是第一个被报道所产 PHAs 中同时含短链和长链单体的细菌。目前仅发现几种微生物可合成第三类 PHAs 共聚物 P(3HB-co-mcl 3HA), 大多数菌合成的 PHAs 属于前两种类型。

几乎所有 PHAs 都是 D 型羟基脂肪酸单体, 根据微生物和生长条件的不同, PHAs 颗粒的数目和大小不同, 分子量一般在  $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$  u。用冰冻蚀刻和扫描电镜技术可观察到在真氧产碱杆菌中 PHB 颗粒为 8~13 个, 直径 0.2~0.5  $\mu\text{m}$ 。最近通过对若干不同属的 PHAs 颗粒的研究发现, 由 PHAs 基因簇中专门基因编码的、形成 PHAs 颗粒边界排布形状的外膜蛋白是 PHAs 颗粒的超微结构特征。细胞中抽提出来的 PHAs 是结晶状态的, 而活细胞内的 PHAs 并不呈现为刚性的固体, 而是远高于其玻璃化温度的可动的无定形弹性体。Kawaguchi 和 Doi 用 X-衍射分析研究, 认为是脂质起着增塑剂的作用, 去掉 PHAs 表面的脂成分可启动 PHAs 的结晶化过程。

### (三) PHAs 的生物学形态

PHAs 颗粒由疏水性的无定型 PHAs 组成内核, 由磷脂和蛋白质围绕构成单层膜(图 7-2)。除 PHAs 合酶和内源 PHAs 降解酶外, PHAs 颗粒周围还存在一类与颗粒的形成和稳定直接相关的蛋白质, 被命名为 phasins。phasins 编码基因往往与 PHAs 合成基因处于基因组中相同位点。在分离出的 phasins 蛋白靠近 C 端部位有两个疏水性突起, 推测可能是蛋白质与 PHAs 的连接位点, 表明 phasins 蛋白有可能与细胞内 PHAs 颗粒的形成有关。研究表明, 在积累 PHAs 的菌中普遍存在 phasins 蛋白, 增强 PHAs 合酶活性或增加 phasins 的量均可使 PHAs 颗粒数量增加。

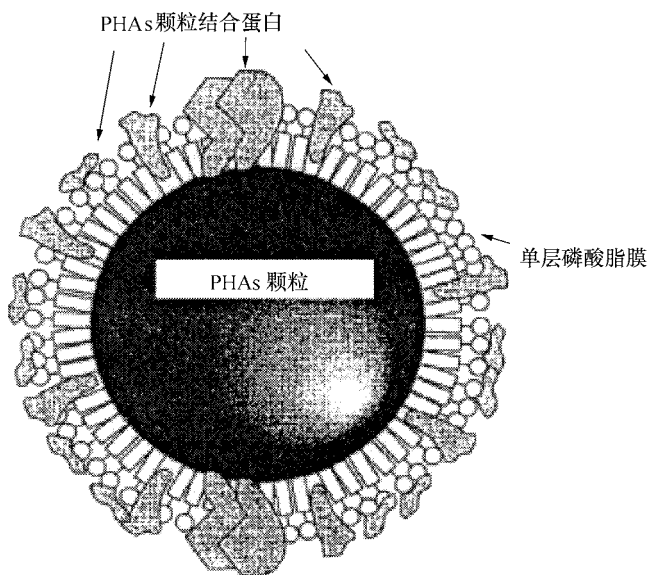


图 7-2 PHAs 颗粒及其结合蛋白的结构

### (四) PHAs 的物理化学性质

研究物理化学性能对 PHAs 的应用相当重要。与化学合成的高分子材料相比, 依单体的组成不同, PHAs 有从硬的晶体到软的弹性体等一系列不同聚合物的性质。此外, PHAs 还有生物相容性、光学活性、压电效应等独特性质。关于 PHAs 理化性质的研究



工作主要集中于 PHB。PHB 是研究最清楚的一种 PHAs，其玻璃化温度为 4℃，而熔化温度却高达 180℃左右。晶体化和无定型化 PHB 的密度分别为 1.26 和 1.18 g/cm<sup>3</sup>。提纯的 PHB 是高度结晶的晶体，物理性质甚至分子结构上与聚丙烯（PP）很相似，如熔点、结晶度、玻璃化温度和拉伸强度，具有相对密度大、透氧率低、抗紫外线照射的优点。但由于 PHB 的化学结构简单规整，有较硬、脆性大、易老化等缺点，且在稍高于其熔点的温度（约 200℃）下即发生热降解，使熔点加工过程难于控制，应用范围受到限制。人们已开始人为改善 PHB 的性质，使 PHAs 能够应用于更广阔的领域。目前认为最具工业前景和吸引力的是通过 3-羟基丁酸与 3-羟基戊酸的共聚合成 PHBV 共聚物。HV 单体的掺入能使聚合物结晶结构明显改变，使硬度、强度、熔点下降，但分解温度却未同步下降，使熔点加工过程易进行而不会发生降解。随 HV 的加入，结晶的整体规整性下降，且呈现不同结晶形态，抗冲击性能改善，韧性和挠性增强，对 PHAs 的性能有改善作用。

PHAs 的侧链结构会影响其物化性能，不同主链单体对它的热力学常数也会产生较大影响。如应用基因重组技术在 *E. coli* XL-Blue 生产的分子量达  $1.1 \times 10^6$  u 的 PHB，断裂伸长率高达 400%，在很大程度上克服了其性脆的缺点，为 PHAs 物化性质改良提供了新途径。Mcl-PHAs 具有一定的结晶度（25%），结晶部分起物理交联作用，但其熔融温度在 39℃到 61℃之间，40℃左右就会因失去交联而软化，而且结晶速率很低，这限制了它作为热塑性弹性体的应用。热分解温度远远高于熔点温度，具良好的加工性，并且其分子侧链长，可维持较大的分子量。mclPHA 降解速率与 PHB 相比要低的多，通过改变聚合物链中不同链长单体的比例，可以控制其制品的降解速率。

### （五）PHAs 的生理功能

多种微生物在一定条件下都能在胞内积累 PHAs 作为碳源和能源的储存物。以 PHB 为例，在微生物细胞内，PHB 被用来作为碳源和能源的储备物。由于其具有低水溶解性和高相对分子量，PHB 可以在胞内大量储存而不影响胞内和胞外的渗透压，比糖原、多聚磷酸或脂肪等更加普遍地存在于微生物中。其次，胞内 PHB 的存在还可以增强细胞对逆境的抵抗力，防止细胞自溶和死亡。研究表明，积累 PHB 的细菌，其存活率高于不积累的细菌。另外，在强因子如紫外线、干燥和渗透压等因素作用下，富含 PHB 的细胞死亡较慢。

### （六）PHAs 的应用

PHAs 是自然界中微生物体内合成的储藏性聚酯。作为一种储备物质，PHAs 不但能在必要时为微生物提供碳源及能源，而且可缓解饥饿条件下细胞内重要成分的降解，增强其对生存逆境的抵抗能力。PHAs 不但具有与热塑性塑料相似的物化性质，而且具有完全的生物可降解性，高度的生物相容性和绝缘性、压电性、气体阻隔性。因此，用途多种多样。

首先，PHAs 具有生物降解特性，它的废弃物在生态环境中彻底分解为 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O，不污染环境。它的最主要的用途是作为环境友好型材料替代聚烯烃产品，从源头解决白色

污染。PHAs 可制成生物可降解容器、薄膜、塑料袋及包装材料、一次性餐具等产品，用于人们日常生活。PHAs 用于一些回收时分离较困难的材料上其优势更为突出。PHAs 酯基衍生物可用作食品乳化剂或起酥油助剂。PHAs 具憎水性和气体阻隔性，在食品包装材料、食品和饮料包装内涂层等方面得到较广泛应用。

PHAs 可用作农药及肥料的生物降解载体，如长效除莠剂、抗真菌剂、杀虫剂等。废弃农用地膜不仅造成环境污染，残留碎片还会破坏土壤结构和性质，使用可降解塑料制成的农用地膜能从根本上解决这一问题。将杀虫剂包埋于 PHAs 制成的药丸内，随农作物一同播种到地里，药物随土壤害虫活动程度以不同速率释放，既能免去多次施药的麻烦，又可经济、合理地使用农药，节约人力、物力。在印刷业中采用直接静电喷涂技术，将 PHAs 沉积在绝缘基体上作静电印刷上色剂，有效的解决纸张回收塑性油墨难与纸张脱离的问题。

PHAs 具有良好的生物相容性，可作为医用高分子材料在医学、药学领域获得广泛应用。在健康成人血液中发现浓度为每 100 ml 血液 3~10 mg 的羟基丁酸酯，人血清和血细胞中亦发现有低分子量 PHAs (通常 100~200 个单体)。由此可见，PHAs 对人体无毒副作用，可应用于医学、食品等方面。在临床医学上可作为外科用作绷带及手术用手套，也可作血液相容性膜及制成血管替代物。在组织工程中还可作植入体内的固定材料 (肘钉、拭子)。pHAs 还可制成手术用缝合线，伤口愈合后缝合线亦为组织吸收。PHB 还可用作伤口敷料、血管替代品、骨骼替代品或骨板，手术后无需取出。用 PHB 还可制成医用手套、包扎材料、止血塞、医用薄膜等医疗用品。实验表明，应用激光技术可以改变 PHAs 的形态及物化特性，并且这些变化有益于细胞生长。这一发现为 PHAs 在医用移植领域中的应用奠定了基础。

在已知的 PHAs 中，4-羟基丁酸 (4HB，在医疗界称为 GHB) 有极大的潜在治疗应用价值。早在 1960 年人们就认识到 4HB 的治疗功能：4HB 作用于脑血栓很快产生类似睡眠的状态，并同时维持心脏血管稳定，因此，被用做静脉内麻醉剂。4HB 能够诱发低波段睡眠和快速眼球运动，被用于嗜眠症的治疗。研究表明，4HB 能减轻脑部和周围组织对底物的吸收，这就意味着它具有保护这些组织免受缺氧和代谢需求过多的危害。多年研究并未发现，4HB 在体内的降解产物对生物体本身有危害作用。结合 4HB 的可降解性、对人体的无毒、无害及生物相容性，可以建立人体药物缓释系统。PHAs 可以制成微胶囊，作为悬浮液进行皮下注射或压成口服药片。通过调节聚合物中 4HB 比例，从而调节药物释放速度，达到预期治疗效果。这一系统突出的优点是异体排斥反应小，在体内生物降解速度慢，并且调控降解速率。

PHAs 作为一种由微生物发酵合成的天然高分子材料，它不依赖石油化学工业，从长远观点来看，可解决石油危机导致的原材料紧缺。除了作为塑料外，由于 PHAs 具有手征性，还可用于化学合成光学活性物质的手性前体，特别是合成药物和昆虫信息素。同时 PHAs 还可以用做环境标记。原油严重污染地区的微生物大多数都具有在一定条件下合成 PHAs 的功能，我们可以根据某一地区微生物合成 PHAs 的能力，对该地区是否受到碳源污染做出初步判断。许多自然界中的 PHAs 合成菌适于在过营养环境中生长，我们可将生产 PHAs 与环境保护、废物处理结合起来，可谓一举两得。

## 二、PHAs 的生物合成及其分子机制

## (一) 微生物合成 PHAs

聚羟基烷酸酯 (PHAs) 是一类由许多原核生物在非平衡生长 (如缺乏氮、氧、磷、铁等) 条件下, 在胞内积累 PHAs 作为碳源和能源的储存物。自从 1926 年聚羟基丁酸酯 (PHB) 被首次发现后, 在 300 种细菌中发现有 80 多种不同的脂肪酸作为 PHAs 的单体, 这些结构单元的碳原子数在 3~14 之间, 有饱和或不饱和的侧链、脂肪族以及芳香族聚侧链等。与化学合成的高分子材料相比, 依单体的组成不同, PHA 具有从坚硬的晶体到柔软的弹性体等一系列不同聚合物的性质。

微生物可利用多种物质为碳源通过不同途径合成 PHAs。不同微生物合成 PHAs 的途径不同, 总的来说, 自然界存在的 PHAs 合成途径分为两大类:

以 *Ralstonla eutropha* 为代表的多数菌以三步法进行 PHB 合成:  $\beta$ -酮硫裂解酶 ( $\beta$ -ketothiolase) 催化两分子乙酰 CoA 缩合生成乙酰乙酰 CoA; 乙酰乙酰 CoA 经依赖 NADPH 的乙酰乙酰 CoA 还原酶 (acetoacetyl-CoA reductase) 的作用还原为 D-( $-$ )-3-羟丁酰 CoA; PHB 合酶 (PHB synthase) 催化单体 D-( $-$ )-3-羟丁酰 CoA 聚合成 PHB (图 7-3)。大多数细菌如 *Aicallgenes eutrophus*、*Aztohacter beijernekii*、*Zoogloca eutrophus* 是从乙酰 CoA (acetylcoenzyme A) 经三步合成的。

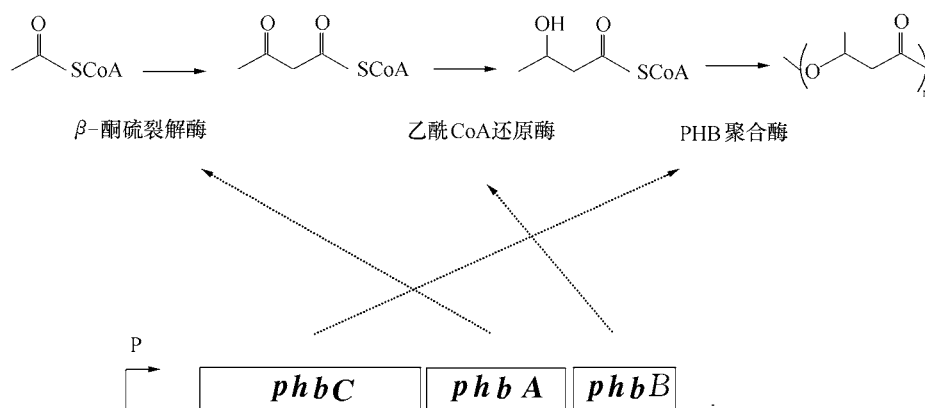


图 7-3 PHB 三步法合成途径中的酶及相应基因

少部分微生物如 *A. eutrophus* 和 *Rhodospisillum rubrum* 存在五步合成途径: 与上面的三步反应稍有不同, 依赖 NADH 的乙酰乙酰 CoA 还原酶 (NADH-dependent-acetoacetyl-CoA reductase) 将乙酰乙酰 CoA 还原为 3-羟基丁酰 CoA, 再由两个立体特异性的烯酰 CoA 水合酶 (enoyl-CoA hydratase) 将 1,3-羟基丁酰 CoA 转变成 D-3-3-羟基丁酰 CoA。

在自然状态下, 微生物能够利用多种碳源合成 PHAs。即使有些碳源与 PHA 在结构

上毫无共同之处，微生物也能先将其通过脂肪酸代谢、柠檬酸循环、氨基酸代谢等途径转换为一定的中间体，进而由此合成 HA-CoA，最终在不同类型合成酶的作用下合成各种 PHAs。PHAs 合成底物的广泛性与自身的完全降解性使其合成与降解形成循环，成为可以循环使用的材料。

## (二) PHAs 合成相关酶及基因

多种微生物能合成 PHAs 作为储藏物质，并形成了适合各自生存环境的合成途径，因而在自然界中存在多种与 PHAs 合成相关的基因。PHAs 所代表的聚酯种类繁多，合成途径不止一条，因而在自然界中存在多种合成相关酶。据 Rehm 等 1999 年统计，仅 PHAs 合酶基因便可从 38 种不同菌中克隆出 42 种。迄今为止，已经测定 30 多种 PHAs 合酶基因序列。目前已克隆了许多种 PHAs 生物合成有关的酶，其中 PHAs 合酶是关键酶。因为该酶在 PHAs 的合成中起主要作用，它决定了 PHAs 产物的组成。现在大体上形成对已发现基因的命名规则：与 PHAs 合成相关的基因按字母排序，分别为 *phaA* ( $\beta$ -ketothiolase)、*phaB* (Acetoacetyl-CoA reductase)、*phaC* (PHB synthase)、*phaG* (3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme A transferase)、*phaJ* (enoyl-CoA hydratase) 等。与 PHAs 降解相关的基因为 *phaZ*、*phaY*、*phaX*、*phaW* 等。编码 Phasins 蛋白的基因以 *phaP* 命名 (表 7-1)。

表 7-1 与 PHAs 相关的酶及其基因

| 基因          | 与基因相应的酶   | 相关途径        |
|-------------|---|-------------|
| <i>phaA</i> | $\beta$ -酮硫裂解酶 ( $\beta$ -ketothiolase)   | PHAs 生物合成途径 |
| <i>phaB</i> | 乙酰乙酰辅酶 A 还原酶 (acetoacetyl-CoA reductase)  |             |
| <i>phaC</i> | PHAs 合酶 (PHA synthase)  |             |
| <i>phaE</i> | Ⅲ型 PHAs 合酶第二亚基 (the second subunit of type III PHA synthase)                      |             |
| <i>phaG</i> | 3-羟酰基-酰基转移蛋白-辅酶 A 转移酶 (3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme A transferase) |             |
| <i>phaJ</i> | 烯酰基辅酶 A 水解酶 (enoyl-CoA hydratase)   | PHAs 降解途径   |
| <i>phaZ</i> | PHAs 降解酶 (PHA depolymerase)   |             |
| <i>phaP</i> | PHAs 附着蛋白 (phasin)  | 调控功能        |
| <i>phaR</i> | 假定调控蛋白 (putative regulator protein)   |             |
| <i>phaF</i> | 假定调控蛋白 (putative regulator protein)   |             |

根据氨基酸序列不同和催化底物的差异基因结构和底物特异性，聚合酶可分为 I 型、II 型、III 型 3 类。不同的 PHAs 合酶中的两个半胱氨酸中的一个高度保守的，这是保持酶活性所必须的，可能在聚合反应中起重要作用。PHAs 合酶的纯化为研究 PHAs 合成的起始、延伸和终止开启了大门。对 PHAs 合酶的进一步研究发现，大部分菌株只表达一种合成酶，要么催化合成短链 PHAs，要么催化合成中长链 PHAs，但也有少数菌株如 *Pseudomonas resinovorans* 能表达两种不同的 PHAs 合酶。

I型合酶和II型合酶都由单亚基（*phaG* 基因编码）构成，分子量在 61~68 ku 之间。其不同之处在于其底物特异性。虽然它们都催化短链单体形成 PHAs，但 I 型合酶催化合成 C3~C5 的 sc1PHAs，而 II 型合酶对 C5 以上的单体有专一性。III 型合酶由两个亚基组成：一个是 *phaC* 亚基，分子量约 40 ku，与 I 型和 II 型合酶在氨基酸序列上有 21%~28% 的同源性，另一个为 *phaE* 亚基，分子量 40 ku 左右，与前两种 PHAs 合酶没有同源性，该类合成酶的链长比第一类和第二类短 34%~40%，氨基酸相似性仅为 21%~27%。这种合成酶对短链 PHAs 的合成有专一性。

有些微生物的合成酶似乎并不属于以上 3 类。如 *T. pfennigii* 的合成酶由两个亚基组成，与 III 型合酶有 85% 的同源性，但却有更宽的底物范围，不但可以合成 sc1PHAs，而且可以合成 me1PHAs。从 *A. caviae* 中分离的 PHAs 合酶与 I 型合酶有 45% 的同源性，但可催化合成 HB 和 HHx 的共聚体。分析 PHAs 合酶的二级结构，发现主要由环状结构（49.7%）和  $\alpha$ -螺旋（39.9%）组成，仅有一小部分为  $\beta$ -片层结构上（10.4%）。纯化后的 PHAs 合酶处于二聚体和单体间的动态平衡状态，加入底物后则二聚体数目增多，表明二聚体很有可能是一种活性远高于单体的存在状态。

从产物分子量这一角度来看，I 型合酶产物的分子量主要为 500 ku 以上，II 型合酶产物为 50~500 ku，III 型合酶产物的分子量似乎介于二者之间。影响产物分子量的因素主要有以下几点：

1. 生理环境 细胞内所能利用的底物浓度。PHAs 降解酶、酯酶、脂肪酶的浓度都是决定产物分子量的重要因素，如果没有 PHAs 降解酶，将得到高分子量 PHAs。

2. 处于活性状态下 PHAs 合酶的浓度 活性 PHAs 合酶浓度越高，相应产物分子量越低。产物分子量对其物理化学性质有重要影响。因此，通过各种因素的调节，得到合适分子量的产物是生产 PHAs 的重要步骤之一。

与 PHAs 合成相关的基因一般在细菌基因组中成簇存在。Poirier 等采用酶活筛选、转座突变及异源探针等手段从 *R. eutropha* 中分离 *phbA*（编码  $\beta$ -酮硫裂解酶）、*phbB*（编码乙酰乙酰 CoA 还原酶）、*phbC*（编码 PHB 合酶）DNA 片段。分析表明，它们处于同一操纵子，由共同启动子控制，形成 *phaCAB* 操纵子（图 7-4）。除 *R. eutropha* 外，*B. cepacia* 中也存在 *phaCAB* 操纵子，在 *Acinetobacter* sp. 和 *Seudomonas* sp. 中，这些基因也成簇存在，但排列方式与 *R. eutropha* 不同。另一种 PHAs 合成相关基因的排列方式存在于 *Z. ramigera*、*M. extorquens*、*S. meliloti*、*N. corallina*、*R. ruber*、*P. denitrificans*、*R. sphaeroides*、*R. rubrum*、*R. capsulatus* 和 *A. caviae* 等菌中，与 *R. eutropha* 中不同的是其 *phaC* 基因并不与 *phaA*、*phaB* 及其他与 PHAs 代谢相关的基因相连排列，而显得相对较为独立。

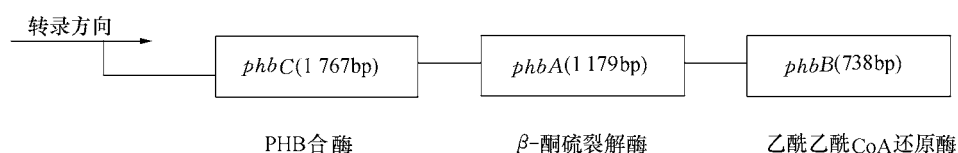


图 7-4 *R. eutropha* PHB 合成关键酶操纵子的结构



### (三) PHAs 合成相关基因的克隆及其结构组成

在所有 PHAs 合成途径中, 真氧产碱杆菌 H16 中 PHB 合成相关基因了解的最为清楚。1988 年、1989 年, 3 个不同实验室利用 4 种不同克隆策略克隆了 H16 合成 PHB 相关基因。

**1. 转座子诱导突变** Peter Schubert 等首先使 *E. coli* S17-1 与 H16 结合, 其中前者含有转座子 Tn5 的自杀载体 pSUP5011, 透过转座子诱导, 分离不产生 PHB 的 H16 突变株, 然后用 *EcoRI* 酶切, 建立该突变株基因组 DNA 黏粒文库, 并以 Tn-5-mob 为探针, 筛选 H16 突变株基因组文库, 获得一个 12.5 kb 的 *EcoRI* 片段。此片段具有编码 3 种酶的基因, 在 *EcoRI* 中异源表达合成 PHB 量达菌体干重的 30%。

**2. 异源探针筛选策略和突变体互补策略** Oliver P 等首先构建了 H16 的基因组文库, 然后以生枝动胶菌 (*Zoogloca pumigera*) 合成 PHB 的硫酯酶基因为探针, 筛选到含有两个表达框架 *phbA* 和 *phbB* 的克隆, 氨基酸序列分析发现, 真氧产碱杆菌硫解酶与生枝动胶菌, 以及两种哺乳动物中的硫解酶序列有同源性。他们又用 H16 突变株互补策略, 鉴定出 *phbC* 基因。在 *E. coli* 中表达 3 个基因, PHB 合成量达到菌体干重的 50%。

**3. 通过测定相关酶活性的间接克隆策略** Steven C 等首先建立了 H16 基因组文库, 通过测定  $\beta$ -酮硫裂解酶活性筛选克隆, 然后再在所选克隆中筛选有乙酰乙酰 CoA 还原酶活性的克隆, 最后筛选能合成 PHB 的克隆, 经过亚克隆得到一个 5.2 kb 的片段。将该片段克隆到 *E. coli* 中可直接合成 PHB, 合成量达菌体干重的 80%。

在真氧产碱杆菌中, PHB 合成相关基因 *phbA*、*phbB*、*phbC* 处于同一操纵子上, 3 个开放阅读框架顺序是 *phbC*、*phbB*、*phbA*。根据序列推算出氨基酸数量各为 589、393、246, 分子量各为 63 900 u、40 500 u、26 300 u。因为 3 个基因处于同一操纵子上, 所以可用 *phhC-LacZY* 嵌合基因鉴定该操纵子 5 端的调控序列。*phbC* 转录起点在翻译起始点上游 307 bp 处, *phbC* 前的启动子序列同 *E. coli* 670 启动子具有很高同源性。在 *phbA*、*phbB* 基因上游未发现启动子, 在 *phbC* 和 *phbA* 之间有一发夹结构, 但对转录和翻译无影响。然而在 *Z. ramigera* 中, *phbA*、*phbB*、*phbC* 不在一个操纵子上, 前两者处于同一操纵子上, 转录起始点位于 *phbA* 上游 85 bp 处, *phbB* 下游的噜璞区段是转录终止区, *phbC* 基因不处在 *phbA-phbB* 操纵子上。

### (四) PHAs 合成的调节

在氧、氮、硫、镁等必需元素缺乏时, 真氧产碱杆菌 PHB 积累量可达干重的 80%, 当以上限制条件除去后, PHB 又在 PHB 降解酶 (PHB depolymerase, PHBz) 的作用下分解为乙酰 CoA, 恢复到未诱导前的水平。对 PHAs 合成的研究表明, 合成什么样的 PHAs, 合成多少 PHAs 与培养条件有关。

改变培养基中的碳源, 会改变 PHAs 的组成。*Rhodococcus ruber* 在以葡萄糖为碳源时, 合成 PHAs 75% 为戊酸, 25% 为丁酸。产生该现象的原因是 PHAs 合成酶的广谱特异性。在含葡萄糖培养基中加入丙酸或戊酸, 真氧产碱菌可合成 PHB-co-HV; 如果培养中只加入戊酸, PHAs 中戊酸单体可达 90%。在真氧产碱杆菌中, 还发现了两种不同

的酮硫裂解酶，催化从 C<sub>4</sub>~C<sub>10</sub> 的不同反应。

能合成中长链 PHAs 的菌株中也存在类似的调节过程。如 *Pseudomonas oleovorans* 在以辛酯（C<sub>8</sub>）为底物时，形成的 PHAs 中 89% 的单体为 C<sub>8</sub>，11% 为 C<sub>6</sub>；在以十二烷酸为底物时，形成的 PHAs 中，31% 为 C<sub>12</sub>，36% 为 C<sub>10</sub>，31% 为 C<sub>8</sub>，2% 为 C<sub>6</sub>。

### （五）PHAs 的生物降解

PHAs 具有可降解性。对 PHAs 在不同环境中降解速率、降解程度及降解产物去向的测定结果表明，PHAs 在多种环境（土壤、海水、湖水）中都可被降解，特别是在潮湿、有氧情况可完全降解。其降解产物可被环境中微生物利用，重新进入生态循环。研究表明，PHAs 降解的速度与 PHAs 的结构、结晶程度、表面积以及环境的温度、湿度、pH 和养分供应等相关。在降解过程中，PHAs 的分子量几乎保持不变。

在 3 种情况下可发生 PHAs 的降解：

**1. 热降解** PHB 是一种对热较敏感的聚酯性塑料，其熔融温度（173~180 °C）和分解温度（230 °C）非常接近。其热降解产物中 90% 为巴豆酸。当 PHB 中含有少量杂质时会加速这一降解过程。

**2. 水降解** PHB 水降解速度与温度和 pH 密切相关。在高温和高 pH 环境条件下 PHB 水解过程加速，但在空气中水分对 PHB 力学功能影响极小。

**3. 环境降解** 土壤、空气、淤泥、海水、湖水、温泉、肥料中都存在大量能分泌胞外 PHB 降解酶的细菌和真菌，将固体 PHB 颗粒降解为水溶性的单体和二聚体，进一步被用为细胞的营养物质。

PHB 解聚酶由单条多肽链构成，分子量为 37~60 ku，在 N 端有接触反应区域，C 端有底物结合区域，由一链状结构将两个区域连接起来。对 *A. faecalis* 的 PHB 胞外解聚酶研究的较为详细，其降解产物主要为二聚体，一小部分为单体。将 PHB 进行末端标记，研究解聚酶的作用机制，发现降解是从羟基端开始的，具有聚合物内部键的水解活性酶。由于 PHB 颗粒不溶于水，而解聚酶溶于水，因此，降解过程分两步进行，即吸附和降解。首先降解酶通过结合区结合到 PHB 颗粒表面，然后通过酶的活性区对 PHB 的长链进行水解。PHB 在自然状态下降解的时间与降解的速度与降解酶的浓度有很大关系。随着解聚酶浓度的增加，其降解能力逐渐增加，但达到一定的峰值后，则会出现缓慢降低。

PHAs 本身的结构对降解速度也有影响。随 HB 和 HV 比例不同，不同种类 PHAs 的降解速率不同。P(3HB-co-4HB) 共聚物中 4HB 由 40% 增至 100%，PHB 解聚酶分解共聚物速率降低。1992 年 Mukai 等对 3 种 PHB 解聚酶分解不同共聚物 P(3HB-co-4HB)、P(3HB) 和 P(3HB-co-4HV) 进行研究，发现 3 种解聚酶（两种解聚酶来自 *P. lemoignei* 培养上清，另一种源自 *A. faecalis* T1）酶解趋势相似，其中 P(3HB-co-4HB) 降解速率最快，P(3HB-co-4HV) 降解最慢。PHAs 颗粒的晶体化程度越高，解聚速度越慢，无定形状态下 PHAs 解聚速度会比晶体状态下高约 20 倍。同时，还发现 PHAs 的侧链增加时，解聚速度会明显减慢。因此，可以通过控制 PHAs 的结构来调节其降解速度，从而满足不同类型的需要。

### 三、PHAs 的主要生产途径

目前,国内外出现了多种可生物降解的塑料。其中有完全可降解的,例如 PHB、PHBV 以及 PHB 与 PLA (聚乳酸)、淀粉、纤维素等的共混物;也有部分可降解的,例如 PHB 可以与聚乙烯 (PE)、聚丙烯 (PP)、聚苯乙烯 (PS)、聚氯乙烯 (PVC) 共混。生产生物可降解塑料有 4 条途径:①纯化学合成;②利用微生物或组建基因工程菌发酵生产;③通过改性人工合成;④运用现代生物技术构建转基因植物生产。

#### (一) 化学法合成

普通微生物发酵法生产 PHAs 的工艺路线和操作条件决定了其原料昂贵、生产周期长、产量低、萃取和精制工艺成本较高,从而使 PHAs 成本太高,PHAs 的售价高于化学合成塑料而使应用受到限制。因此,化学法合成 PHAs 作为开发生产 PHAs 的另一途径,因其生产成本相对较低,也在进一步研究之中。PHAs 及其单体 3-羟基丁酸在实验室化学合成路线有多种,主要有利用化学催化法制备 PHAs,由化学法合成的 PHB 与发酵法合成的 PHB 基本上具有同样的性质。采用化学法合成 PHB,虽然可以克服发酵法生产的缺陷,提高 PHB 的产量,降低生产成本。但是,化学法合成 PHB,其原料一般都比较贵,而且大部分具有毒性,反应条件严格,大部分反应收率较低,副反应也较多,而且反应产物的分离也很困难,还会对环境造成二次污染。

#### (二) 利用微生物或组建基因工程菌发酵生产

PHB 最初是由法国人 Lemoign 于 1925 年首先发现的,他从巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterzawn*) 中分离并鉴定了该物质。PHB 的大量积累是在某种营养物受限制的不平衡条件下发生的,受限的因素诸如碳氮比、磷、溶氧等。早期研究 PHB 代谢的主要目的在于将 PHB 消除,以便利用菌体生产单细胞蛋白,后来才转向 PHB 的生物合成和积累的研究。早在 1975 英国 Zeneca 公司 (原 ICI) 就率先采用葡萄糖 *A. eutrophus* 的一个突变株为生产菌株生产 PHB,在限磷而其他盐过量的条件下,PHBV 终产量可达菌体干重的 70%~80%。目前是世界上唯一规模化商品化生产 PHB 和 PHBV 的厂家,年产量已达数千吨,商品名为 BIOPOL,生产菌种为真养产碱杆菌 (*Alcaligenes eutrophus*)。美国的 Berlin 包装公司已开始向护发用品公司销售 BIOPOL 为材料制作的包装瓶,奥地利 Chemie Linz Gmb H 公司以 *A. eutrophus* 连续发酵方法生产 PHB,产量也可达每周 1 t。日本、德国等国已有 PHB 二次开发产品,如香波瓶、各种容器、一次性剃须刀和碗碟等。但是,细菌发酵法因发酵底物和复杂的发酵过程导致价格昂贵,所以无法同化学合成塑料相竞争。

PHB 生物合成酶是 PHB 生物合成途径的关键酶。20 世纪 80 年代后期人们开始将重组 DNA 技术应用于生物合成 PHB,多种细菌的 PHB 生物合成酶在分子水平已进行了详细的研究,并成功克隆了它们的 PHB 生物合成酶基因。例如带有真养产碱杆菌 PHB 生物合成基因的重组大肠杆菌 XLI-Blue,在 2.5 L 发酵罐中分批补料培养 42 h,它的细胞

干重达 116.6 g/L, PHB 浓度为 88.8 g/L, 显示了重组 DNA 技术在生物合成 PHB 领域的巨大潜力。

目前通过细菌发酵工程已初步实现 PHAs 商品化。由 PHAs 本身的代谢特点决定细菌发酵生产一般采用二步法。第一阶段细菌快速生长达到高菌体密度, 第二阶段通过对营养元素的适当限制使细菌代谢更多地流向 PHAs 合成途径, 达到提高 PHAs 积累量的目标。发酵工程采用的菌种主要有自然界中存在的 PHAs 合成菌和经过基因工程改造后具有 PHAs 合成功能的工程菌两大类。由于发酵所需底物造价高, 因而生产出的塑料价格昂贵, 无法在市场上同化学合成塑料竞争。科研人员致力于改变现有菌株遗传结构, 寻找新菌种以合成具更佳物理、机械特性的 PHAs 来增强细菌发酵法所得产品的市场竞争力。他们尝试将 PHB 合成关键酶基因转入能利用廉价底物的菌株中或通过基因工程技术在菌株中建立新型合成途径以生产质优价廉的 PHAs。影响 PHAs 价格另一重要因素是下游提取工艺不成熟, 如提取工艺能有所突破, 生物可降解塑料价格有望降低。但即使采取上述措施, 据乐观估计, 细菌发酵法生产 PHAs 价格也难降到与化学合成塑料相似水平。这是细菌发酵法生产 PHAs 难以攻克的障碍。当前利用细菌发酵生产 PHAs 的研究主要集中在通过基因工程的方法对 PHAs 生产菌株进行改造, 不但有助获得一些具有新颖结构的 PHAs 分子, 而且通过对代谢途径的调控, 可以更好的降低生产成本, 提高生产率, 从而达到与传统石油塑料竞争的目的。

### (三) 人工合成

自然界中有 90% 的微生物在一定条件下都能积累 PHB。Wallen 和 Rohwedder 等在 1974 年利用气相色谱手段检测到活性污泥中的含有 PHB 和 PHBV 成分, 随后人们开始利用活性污泥生产和提取 PHB。以活性污泥中的微生物作为发酵菌群, 利用污水合成 PHB 无需在无菌环境中操作, 不但大大降低了生产成本, 也减少了各种烦琐的运作过程, 方便, 易行。实验表明, 利用工厂的活性污泥在自制的污水中发酵生产出来 PHB 重量达到污泥干重的 4.86%, 纯度在 70.61% 以上。同时, 在活性污泥中添加 8% 的球衣菌, PHAs 含量在原来的基础上提高了 50%。这是由于球衣菌是活性污泥中的主要丝状菌, 胞内又能积累相对较高的 PHAs, 因此, 在活性污泥中添加球衣菌有利提高 PHAs 的产量。虽然利用活性污泥和污水生产 PHB 具有一些有优点, 并且可以降低成本。但是, 污水的成分复杂, 在污水中合成的 PHB 的含量很低, 并且化学结构复杂多样, 获得的 PHB 纯度也就较低, 这些因素都增加了后期提取纯化的难度和成本。

### (四) 运用现代生物技术构建转基因植物生产

随着分子生物学的发展, 许多植物的转基因技术日趋成熟, 外源基因在植物中的稳定整合与表达已不成障碍。同细菌发酵系统相比, 植物具有以下特点: 自身便具有丰富碳源, 不需要昂贵的发酵底物; 生产成本相对低廉; 可对真核蛋白进行正确的翻译后加工, 形成具有活性的分子, 不需要复杂的发酵产物后加工。此外, 植物本身含有 PHAs 合成第一个关键酶——酮硫裂解酶, 使人们逐渐看到植物生物反应器的巨大潜力。随着不可降解塑料对环境的污染愈来愈烈, 通过基因工程方法改变植物的代谢途径, 使碳源流入



PHAs 合成途径的尝试引起了科研人员的兴趣,并取得了一些成果。20 世纪 80 年代研究人员开始通过分子生物学技术将 PHAs 合成关键酶基因转入是油菜等植物中,利用基因工程技术合成 PHAs。迄今为止,已有拟南芥、油菜、马铃薯和棉花等植物作为 PHB 合酶基因表达受体合成,并获得少量的 PHB,从而证明了利用转基因植物生产 PHB 的可行性。利用转基因植物生产 PHAs,极有可能使 PHAs 的价格降低到和淀粉与脂肪相似的水平,使生物可降解塑料逐步乃至完全替代化学合成塑料成为可能。

#### 四、利用转基因植物生产 PHAs

##### (一) 利用转基因植物生产 PHAs 的必要性

基因工程技术的飞速发展使我们利用植物为天然工厂生产有价值的产品成为现实。1983 年诞生了世界上首例转基因植物,1986 年首批转基因植物进入田间实验,1994 年首例转基因植物产品投入商业化生产,从此人们对转基因植物开始大规模的研究和生产。全球转基因植物的种植面积呈逐年上升趋势,1996—1998 年,全球种植面积增长了 15 倍。迄今世界范围内种植转基因植物的国家多达 45 个,田间种植的转基因植物已超过了 90 种,种植面积已超过 3 900 万  $\text{hm}^2$ 。主要种植的转基因植物有玉米、番茄、大豆、马铃薯、棉花等。在所研究的转基因植物中,主要是用于抗除草剂、抗虫型、抗病毒和抗逆境基因工程。我国在 1998 年统计结果表明,研究开发的转基因植物已有 47 种,涉及 103 个不同的基因,种植的转基因植物主要为转基因烟草和棉花。当前利用植物基因工程已实现提高农作物产量、改良品质、增强抗性目标,并可生产植物本身不具备的生物大分子,如抗原和抗体等。

随着分子生物学的发展,植物转基因技术的日趋成熟,人们逐渐看到植物作为生物反应器生产 PHAs 的巨大潜力。众所周知,植物可用于大量生产淀粉、蔗糖、脂肪酸或维生素等物质,且成本很低。植物本身虽然不能合成 PHAs,但是,植物具备 PHAs 合成所需底物乙酰 CoA,若将微生物编码 PHAs 合成相关酶基因转入植物,则可赋予植物合成 PHAs 的能力。如果将微生物体内编码 PHB 合成相关酶的基因转入植物中,可以预料,PHAs 将能被合成并出现在该植株中,并且植物自身以二氧化碳为碳源,具有丰富碳源可利用,无需昂贵发酵底物,利用光能为能源进行 PHAs 的合成,生产成本相对低廉;无需复杂的产物后加工过程等,而且是清洁生产,不会带来环境污染,体现从源头治理“白色污染”,这是细菌发酵法生产 PHAs 无法企及的优势。转基因植物生产 PHAs 在分子水平调节其 PHAs 代谢途径,使碳源更多流向 PHAs 的合成,从而生产出价格能为人们所接受的 PHAs 产品,给生物可降解塑料逐步乃至完全取代化学合成塑料提供可能。随分子生物学的发展,植物转基因技术的日趋成熟,为生产 PHAs 提供了新的机遇。利用转基因植物生产 PHAs 已成为人们关注的热点。

##### (二) 利用模式植物拟南芥生产 PHAs

拟南芥是进行遗传和分子研究的模式植物。1992 年, Poirier 等人最先尝试用转基因



拟南芥植物生产 PHB，他们首先克隆了真氧产碱杆菌中 PHB 合成相关基因 *phbB* 和 *phbC*，然后将由 CaMV 35S 启动子控制的 *phbB*、*phbC* 基因转入模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中。在合成 PHB 的三个酶中， $\beta$ -酮硫裂解酶存在于高等植物的细胞质中，参与合成甲羟戊酸，因此 Poirier 等只把 *phbB*、*phbC* 基因克隆到表达载体 pBI121 中，并利用根癌农杆菌 Ti 质粒二元系统转化模式植物拟南芥，最后通过杂交获得能合成 PHB 的纯系拟南芥。Southern blot 和 Northern blot 分析结果表明，两种外源基因已整合于植物基因组中，并实现转录。拟南芥利用内源的  $\beta$ -酮硫裂解酶和外源的 *phbB*、*phbC* 基因表达产物乙酰乙酰 CoA 还原酶和 PHB 合酶合成了一定量的 PHB (100  $\mu\text{g/g}$  鲜重, 0.14% 干重)。电子显微镜观察表明，转基因拟南芥中 PHB 颗粒为 0.2~0.5  $\mu\text{m}$ ，与微生物合成的 PHB 颗粒大小类似，并且 PHB 的电子密度、大小、形态及组成等都类似于细菌中的 PHB。植物细胞内 PHB 颗粒不仅只存在细胞质，还存在液泡和细胞核等部位。细胞质和液泡中颗粒最大直径达 0.5  $\mu\text{m}$ ，核中最大直径为 0.2  $\mu\text{m}$ 。质体和线粒体中均未发现 PHB 颗粒，造成该现象的原因可能是 PHB 颗粒的疏水性使其能通过单层膜结构，但不能通过双层膜。*phbB*、*phbC* 的启动子是 CaMV35S，使得转基因植株的各个组织中包括根、茎、叶、子叶和种子中都有 PHB 的分布。但由于拟南芥生物量低，合成 PHB 的产量低。酶活分析表明，是 PHB 合成关键酶的活性而非由于质体中乙酰 CoA 的量不足限制了 PHB 的进一步积累。Wasman 等人也做了相同的工作，并获得类似的结果。对植物和微生物合成 PHB 进行光谱分析发现，真氧产碱杆菌合成的 PHB 为均匀性分子，分子量一般为  $10^6$  u，而植物合成的 PHB 大小范围较大，从  $10^4$ ~ $10^6$  u，造成该结果的原因可能是细菌内的某些蛋白或附属因子对 PHB 的合成有调节功能。

尽管实验证实了利用生产 PHB 的可能性，但也存在许多问题。首先，转基因植株生长受到严重抑制，仅 *phbB* 基因在细胞质中高水平表达就已导致拟南芥植株生长迟缓，相应的种子产量也下降，*phbB*、*phbC* 基因同时表达，这种现象更为严重。造成该现象的原因可能是细菌的乙酰乙酰 CoA 还原酶的高效表达，合成了在植物细胞质中不存在的 3-羟基丁酸 CoA，它可能抑制了细胞内源的代谢途径，也可能是细胞质内乙酰乙酰 CoA 含量少，部分碳源转移到合成 PHB，使细胞内类异戊二烯和类黄酮减少，影响了细胞的正常代谢；*phbB* 和 *phbC* 均表达的转基因植物比只表达前者的转基因植物生长量少，可能的原因是 PHB 在细胞质和细胞核的积累对细胞产生了毒害；PHB 的合成虽少，只达干重的 0.14%，*phbA*、*phbB*、*phbC* 同时转化到拟南芥中，合成 PHB 的量并未增加，表明乙酰 CoA 的含量是影响 PHB 积累最重要因素。实验表明，异源 PHB 合成消耗细胞质中约 50% 的乙酰 CoA。可能因乙酰 CoA 分流过多，导致内源异戊二烯类和类黄酮等重要物质合成底物不足，影响植株正常生长发育。同时 PHB 在细胞质、液泡和细胞核中积累可能对植物生长产生毒害作用，尤其是细胞核中 PHB 可能会与 DNA 相作用，也会对植物的生长发育产生不利影响。

### (三) 利用植物细胞器定位合成 PHAs

乙酰 CoA 含量是限制 PHB 合成量的重要因素。尽管 Poirier 等人的工作证实了在植物体内生产 PHB 的可行性，同时，也揭示了植物基因工程生产 PHAs 中亟需解决 PHAs

的产量过低和在植物体内的积累危害植物生长发育两大问题。在植物质体中进行脂肪酸的合成,乙酰 CoA 的代谢旺盛,故质体中乙酰 CoA 含量极其丰富,人们设想如将 PHB 合成途径定位于质体,将获得丰富的合成底物,可能会提高 PHB 产量,而且 PHB 颗粒不会透过质体双层膜到细胞质中,PHB 颗粒在质体中的积累不会影响其他细胞器生理功能,可保证植物生长发育正常进行。Somerville 研究组将源于 *Ralstonia eutropha* 的 *phbA*、*phbB*、*phbC* 基因的产物定位于拟南芥的质体。透射电镜观察到 PHB 仅积累于质体,颗粒大小为 0.2~0.7  $\mu\text{m}$ ,其他细胞器没有 PHB 积累。聚酯含量随植物生长逐渐增加,PHA 在拟南芥中含量随植物体所处的发育时期不同而异。老叶中 PHB 含量达到干重的 14%,鲜重的 1%,比定位在细胞质提高了 100 倍,并且对拟南芥的生长和种子的产量未造成明显影响,只在积累量很高时(每克新鲜细胞中含 PHB 为 3 mg 以上)老叶有轻微黄化现象,可能是 PHB 的过量积累,影响了叶绿体的正常发育。PHB 在拟南芥中的高水平表达为用植物大规模生产 PHB 提供了可能。

Hahn 等通过基因枪转化墨西哥黑色甜玉米细胞,将 *Ralstonia eutropha* 中合成 PHB 所需的酶定位于植物细胞过氧化物酶体。气相色谱测定 PHB 含量最高达 2 mg/g 细胞鲜重。酶活测定结果表明,当 PHB 产量超过 0.1 mg/g 鲜重时,细胞培养物中 PHB 合酶活性与其产量呈正相关。电镜观测到 PHB 颗粒仅在过氧化物酶体中存在,细胞质中无 PHB 积累。1998 年 Mittendorf 等人把 *Pseudomonas aeruginosa* 的 PHAc1 合成酶基因定位在拟南芥微粒体内。免疫化学法检测显示,在光照条件下,PHAc1 合成酶定位在过氧化物酶体,在黑暗条件下,PHAc1 合成酶定位在乙醛酸循环体。1999 年 Houmiel 等将 *Ralstonia eutropha* 中分离出 3 个 PHB 合成相关酶基因,分别与 *Lesquerella fendleri* 油酸 12-羟化酶种子特异性启动子和叶绿体导肽 *ctp* 相连,构建表达载体并转化油菜,将目的基因产物定位于种子白色体。转基因油菜白色体 (leukoplast) 中 PHB 含量是成熟种子鲜重 7.7%。电镜观察表明,白色体体积增大,但仍具有完整性。

#### (四) 利用植物特定器官定位合成 PHAs

马铃薯产量高、适应范围广、具良好的无性繁殖方式和转化系统等,作为生产 PHB 的靶目标,抑制淀粉的合成,使碳源更多地流向乙酰 CoA,是提高 PHB 合成酶基因在马铃薯块茎中表达的关键。Muller-Robert 等人将淀粉合成的关键酶 AGPase 的反向基因转入马铃薯,淀粉含量可降至原来的 5%,同时,蔗糖含量大大增加。另外,马铃薯块茎在储藏期间丧失了淀粉合成的原动力,呼吸作用相对加强,PHB 合成的底物量也相应增加,因此,可以利用储存期间储藏器官的呼吸作用来调节 PHA 的生产。Zeneca 公司的研究人员利用从拟南芥的 12S 种子储存蛋白 CRB 的编码基因中分离出来的启动子,连同叶绿体导肽,将 PHB 的合成定位于油菜种子的胚中,PHB 最终含量达种子鲜重的 1%。

#### (五) 利用植物合成 PHAs 改善棉纤维品质

棉花作为纺织工业的主要天然纤维,对其纤维强度、长度、化学染料结合、吸水性、热特性、皱缩性等具有较高的要求。从纤维改性出发,以提高棉花品质为目的,1996 年 John 等利用 PCR 技术对 PHB 合成相关基因 *phbB*、*phbC* 基因编码区进行扩增,在其 3

末端连接一段农杆菌胭脂碱合酶基因（Nos）的 poly(A) 附加信号序列，并与棉花启动子 E6（或 FbL2A）相连，基因枪法转化棉花获得转基因棉花植株。色谱分析发现，棉纤维中 66% 的 PHB 分子量在  $0.6 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^6$  u，转基因棉花的纤维由于 PHB 颗粒的存在，表现出更强的绝缘性，对热的摄取和减少均减慢，具有更强的保热能力，为通过基因工程改变棉纤维的特性开辟了一条新途径。与转基因植物拟南芥相比，转基因棉花的生长和发育未受影响。这可能是由于特异启动子的缘故，E6 启动子只在棉纤维发育早期起作用，FbL2A 启动子只在棉纤维发育后期起作用。在 C6 启动子起作用时，乙酰 CoA 含量高，合成的 PHB 相对较多，而在 FbL2A 启动子起作用时，乙酰 CoA 含量低，合成的 PHB 相对较少。

### （六）植物中生产 PHAs 发展的问题与设想

从第一代转基因植物开始，人们就发现 PHAs 在植物体内的合成对转基因植物生长、发育会造成不良影响，使植物生长迟缓、种子产量下降、转基因植物种子萌发力降低。这是因为首先在植物细胞中乙酰 CoA 是作为合成甲羟戊酸的前体，而异源 PHB 合成消耗细胞质中约 50% 的乙酰 CoA，导致内源异戊二烯类和类黄酮类等重要物质合成底物不足，严重影响植株正常生长发育，而且 PHBV 的合成造成氨基酸代谢途径中底物的竞争，导致植物中必需氨基酸的含量不足，也同样影响植株正常生长。例如 PHAs 在油料作物种子中的合成与积累，使得脂肪酸的合成底物减少，造成脂肪酸含量下降，从而种子在萌发过程中营养不足，同时，种子在萌发过程中又不断地积累 PHAs，种子萌发力下降，影响了植株正常生长。PHAs 在植物体内的积累也可能对生长产生毒害作用。植物体内许多有害的物质都被储存于液泡中，以尽量减少有害物对植物体的损害，如能将 PHAs 储存在液泡中，可能会减少它对细胞的毒害。1998 年 Mittendorf 等将 PHAs 的合成定位于过氧化物酶体中，发现 PHAs 不仅在过氧化物酶体中积累，还在液泡中积累，为在植物细胞液泡中大量积累 PHAs 提供了可能性。选择 PHAs 合成底物丰富的植物和部位。如马铃薯的块茎，淀粉产量高，块茎中 PHAs 合成底物相对含量低，但绝对含量高，且马铃薯可无性繁殖，可不受种子育性的影响。降低 PHAs 合成关键调控基因的底物专一性，即通过扩大合成 PHAs 底物的范围来增加植物体内合成 PHAs 的底物含量。

转化率低也是利用转基因植物合成 PHB 遇到的一个问题。Bohmert 等通过研究指出， $\beta$ -酮酯酰 CoA 硫解酶在转基因植株中的组成型表达是转化率低的首要原因。他们的解决办法是在启动子与  $\beta$ -酮酯酰 CoA 硫解酶之间加入玉米转座子或是利用诱导型启动子来调控  $\beta$ -酮酯酰 CoA 硫解酶的表达，转化率有所提高。PHAs 在转基因植物中的合成产率低，只有 PHAs 在植物中的积累量超过 20% 时，利用植物合成的 PHAs 才具有商业价值。但迄今为止，只有 Bohmert 等报道在拟南芥叶片中获得了 40% 的产率，而在其他植物中均未见有超过 20% 的积累量。如何进一步提高 PHAs 在转基因植物中的合成产率、降低对植株正常生长发育的副作用，已成为亟待解决的问题。

外源基因自身结构及在宿主染色体上的存在方式是影响基因表达效率的主要因素。启动子、导肽等表达元件是影响外源基因在基因组中表达活性重要的因素。PHAs 合成体系较为复杂，在植物中建立此体系需转入多个外源基因。为了减少“共抑制”的发生，对不

同的 PHAs 合成基因尽量采用不同表达框架。

细胞质或质体中合成 PHAs 的底物为乙酰 CoA。欲提高 PHAs 产量，一要选择乙酰 CoA 丰富的部位，二要利用反义乙酰 CoA 羧化酶基因抑制胞内乙酰 CoA 羧化酶 (ACC) 活性，从而将植物体内的乙酰-CoA 引向 PHAs 合成。抑制脂肪酸多酶复合体中一个或多个酶活性，也可达到调控代谢途径从而提高 PHB 产量的目的。随着研究的不断深入，寻找引入合成途径与植物代谢途径新的交叉点将很可能是今后一定时期内研究的重点。

越来越多种类 PHAs 的问世将标志着生物可降解塑料由单一化小型生产阶段向多元化大型生产阶段迈进。合成具有不同物理、化学、机械加工特性的 PHAs 以充分满足社会生产与人们生活中的各种需要将是今后发展的主导方向。寻找新型 PHAs 最初使用的方法是不断从自然界中分离新型的 PHAs 合成菌，对其积累物进行分析以得到未知类型的 PHAs。PHAs 在自然界中是一个庞大的家族，虽然迄今为止已发现约 150 种 PHAs，肯定还有多种 PHAs 处于未知状态，经过不懈的努力一定能发现对人类有价值的类型。

生产 PHAs 的发展同生物技术的更新是分不开的。细菌发酵法生产 PHB 虽能实现小规模生产，但耗费特定底物，成本过高，无法推广使用。植物作为反应器的出现带来了翻天覆地的变化。转基因植物生产 PHA 是获得低成本可生物降解塑料的可行途径。然而，植物体内的代谢体系及调控机制远比细菌复杂，合成 PHAs 的能力较弱，易出现基因沉默现象，且对植物自身生长发育会造成一定影响。现在生产绿色生物可降解塑料面临的最大问题是如何提高合成 PHA 的水平。这一问题不解决，实现商业化生产将成为一句空话。优化表达框架，选择不同合成场所，采用多基因表达载体等是改善 PHAs 合成相关基因表达的主要手段。

## 第二节 转基因植物生产有用次生代谢物质

植物是人类赖以生存的食物和药品的重要来源之一，人们已知的 3 万多种天然产物中有 80% 来源于高等植物。

次生代谢 (secondary metabolism) 是指存在于植物、动物和微生物中有别于初生代谢 (primary metabolism) 的一类特殊而又复杂的代谢类型。初生代谢是所有生物的共同代谢途径，合成糖类、氨基酸类、普通的脂肪酸类、核酸类，以及由它们形成的聚合物 (多糖类、蛋白质类、RNA、DNA 等)。初生代谢物对生物的生存和健康是必需的；而次生代谢物是一大类无明显生理功能或者非生长发育所必需的小分子有机化合物。通常认为次生代谢是生物通过渐变或突变获得的一种适应生存的方式，是生物体在长期的进化中对生态环境适应的结果。但在某些情况下，初生代谢和次生代谢之间有着不太清晰的界限，次生代谢的概念仍在进一步的发展和完善之中。

植物多种多样的代谢途径产生了丰富的次生代谢产物，遗憾的是这些次生代谢产物往往在植物中的合成量极少，因此，提取费用昂贵，限制了它们的用途。随着世界人口的增长和对植物次生代谢物质需求的急剧增加，如何对植物次生代谢进行遗传改良，以培育能



够大量合成和积累目标次生代谢物的植物品种，受到愈来愈多的关注。应用常规育种方法改良植物次生代谢目前已有成功的经验。芥子油苷是抗癌变的标识酶（苯醌还原酶）的诱导物，人们认为它具有预防癌症的功效。通过常规方法育成的富含芥子油苷（glucosinolate）的花椰菜杂交种在诱导此酶的能力上提高了 100 倍。然而，植物次生代谢物种类繁多，生物合成途径也千差万别，应用常规技术改良植物次生代谢的遗传特性进展缓慢。随着有机化学、分析化学、植物生理生化、植物化学以及分子克隆和遗传转化技术的研究的深入，以及对植物次生代谢网络的研究和认识的深入，应用基因工程对植物次生代谢途径的遗传特性进行改造的研究日益增多，已发展为具有广阔应用前景的热点研究领域，取得了一些令人鼓舞的成果。本节对利用转基因植物生产有用次生代谢物质的研究现状作一综述。

## 一、植物的次生代谢物质及其功能

### （一）次生代谢与次生代谢产物

生物体内的化合物通过一系列化学反应被合成或降解的过程统称为代谢作用。卡尔文循环、糖酵解、三羧酸循环和戊糖磷酸途径是有机体代谢的主干，是各种有机物代谢的基础。这个主干来源于光合作用，形成蔗糖和淀粉，通过呼吸作用，分解糖类，产生各种中间产物，进一步为脂类、核酸和蛋白质的合成提供底物。Kossel 在 1891 年首次明确地将植物的代谢分为初生代谢（primary metabolism）与次生代谢（secondary metabolism）。绿色植物及藻类通过光合作用将二氧化碳和水转化成糖类，并释放出氧气，生成的糖则进一步产生核糖、丙二酸单酰辅酶 A(malmyl CoA) 等物质，并通过固氮反应得到一系列的氨基酸，用于合成多肽和蛋白质。这些过程对维持植物生命活动过程来说是至关重要的，存在于几乎所有的绿色植物中，把这些过程称为初生代谢。初生代谢所产生大分子物质是维系自身生长和繁衍的基本物质，它们对植物有机体生命活动来说是不可缺少的，被称为初生代谢产物（primary metabolites）。初生代谢产物存在于所有植物中，是维持细胞生命活动所必需的。

在高等植物中，除了具有以上所说的初生代谢产物外，还含有丰富的小分子有机化合物，这些有机化合物通常是由初生代谢派生而来，并且具有自己独特的代谢途径，即次生代谢。植物次生代谢是相对初生代谢而言。次生代谢是植物体利用某些初生代谢产物为“原料”，在一系列酶的催化下，形成一些特殊的化学物质有别于初生代谢的一类特殊而复杂的代谢过程。植物次生代谢产物指从有限的初生代谢产物经不同的生物代谢途径生成的一系列分类不同的中间或最终产物，这些化合物并非生物有机体或细胞生长繁殖所必需，但对植物自身在复杂环境中的生存和发展却起着不可替代的作用。它是植物中一大类小分子有机化合物，其产生和分布通常有种属、器官组织和生长发育期的特异性。次生代谢物在植物体中合成与分解的过程称为植物次生代谢。次生代谢产物储存在液泡或细胞壁中，是代谢的最终产物，除了极少数之外，大部分不再参加代谢活动。植物为适应环境而产生的次生代谢物的主要作用是防虫害、病害、毒物、气候、酸碱、雨量等。通常认为次



生代谢产物的产生是植物在长期进化中对生态环境适应的结果，是通过渐变或突变获得的一种适应生存的方式。如某些植物产生对植物本身无毒而对动物或微生物有毒的次生代谢产物，防御天敌吞食，保护自己；许多次生代谢产物为人类提供了丰富的药物、香料和工业原料，植物次生代谢物与人类生活密不可分。对植物次生代谢的研究和利用，具有理论和实践意义。

事实上，初生代谢和次生代谢之间的分界线是相当模糊不清的，一些小分子有机物在代谢途径上与次生产物比较相似，但具有明显的生理功能，如萜类成分赤霉素、脱落酸均为植物激素。陈晓亚等认为这些植物激素和植物生长调节物质由于具有生理功能而不属于次生代谢物，而王学臣等却将以上二者也归为次生代谢物。随着植物次生代谢认识的深入，植物次生代谢的概念必将得到进一步发展完善。

## (二) 次生代谢产物的主要类型及其功能

植物次生代谢是植物在长期进化过程中与环境相互作用的结果。在植物与植物、植物与微生物及植物与昆虫之间的关系中行使着重要的功能，在植物提高自身保护和生存竞争能力、协调植物与环境关系中充当着重要的角色。植物次生代谢物质种类繁多、性质各异。目前已知结构的就有 2 万种以上，包括酚类、黄酮类、香豆素、木质素、生物碱、糖苷、萜类、皂苷、多炔类和有机酸等。植物的次生代谢产物依据其化学结构和性质一般可分为酚类化合物、萜类化合物、含氮有机物 3 大类型。

**1. 酚类化合物** 酚类化合物是芳香族环上的氢原子被羟基或功能衍生物取代后生成的化合物，种类繁多，是重要的次级产物之一，有些只溶于有机溶剂，有些是水溶性羧酸和糖苷，有些是不溶的大分子多聚体。酚类化合物广泛分布于植物体，以糖苷或糖脂状态积存于液泡中。根据芳香环上带有的碳原子数目的不同，可将酚类化合物分为黄酮类、简单酚类和醌类。

黄酮类化合物是色原酮 (chromone) 的 2-或 3-苯基衍生物，泛指由 2 个芳香环 (A 和 B) 通过中央三碳链相互连接而成的一系列化合物，其生物合成的前体是苯丙氨酸和马龙基辅酶 A。根据 B 环上的连接位置不同可分为 2-苯基衍生物 (黄酮、黄酮醇类)、3-苯基衍生物 (异黄酮) 和 4-苯基衍生物 (新黄酮)。类黄酮类也可分为花色素苷、黄酮、黄酮醇和异黄酮。基本类黄酮骨架会有许多取代基，羟基常位于 4、5、7 位，它也常带糖。羟基和糖增加类黄酮的水溶性，而其他替代物 (例如甲酯或修改异戊基单位) 则是类黄酮成脂溶性。

花色素苷是最普遍的有色类黄酮化合物，存在于细胞液中，在植物界中分布极广。植物的花、果由于具有花色素苷而大部分呈红、淡红、紫和蓝等颜色。这些鲜艳的花色有助吸引昆虫帮助植物进行授粉。同时，鲜艳果实可吸引动物食用而帮助植物种子的传播。由于受多种因子的影响，使得植物的花和果实的颜色各异，这些因子包括 B 环上的羟基和甲氧基数目、芳香酸对主要骨架的酯化和液泡中的 pH 等。B 环上取代基不同花色有差异。当羟基数目增多时，吸收光向长波迁移，使得颜色偏蓝；当羟基被甲氧基替代时，吸收光向短波迁移，使得颜色偏红。植物中同一花色素受细胞液中 pH 的影响它的颜色也会有变化。偏酸性呈红色，偏碱性为蓝色。此外，低温、缺氧和缺磷等不良环境条件也会

促进植物体内花色素的形成和积累。

植物受到外界伤害或者其他一些逆境作用下都会产生许多次生代谢产物,其中酚类化合物与紫外辐射存在密切的联系。植物表层及液泡内所富集的大量酚类次生代谢产物(如类黄酮、苯丙烷类衍生物等)能吸收 UV-B,避免 UV-B 的直接伤害。同时,这两类物质允许可见光通过,不影响植物进行正常的光合作用。在缺乏查尔酮合酶活性的拟南芥突变体中没有类黄酮生成,与野生型相比,这个突变体对 UV-B 较敏感,在正常条件下生长极差。当将 UV-B 过滤除掉时,这个突变体就能正常生长了。Day 等用石英微探针测定多种植物的结果表明,UV-B 穿透表层的能力与植物叶片表层中酚类甲醇粗提物含量成反比。这个实验证实类黄酮类是植物的紫外光保护剂。黄酮类化合物还具有其他功能,例如鱼藤根中的鱼藤酮有很强的杀虫作用。许多异黄酮是植保素,受细菌或真菌感染后植物可以形成植物防御素,限制病原微生物进一步在体内的扩散。很多黄酮类成分用于心血管疾病的治疗,如槐树槐米中的芦丁用于治疗毛细血管脆性引起的出血症及辅助治疗高血压。

简单酚类是含有一个被烃基取代苯环的化合物,广泛分布于维管植物。根据其结构可分为 3 类:①简单苯丙酸类化合物,具苯环-C<sub>3</sub> 的基本骨架,例如,反-桂皮酸、对-香豆酸、咖啡酸、阿魏酸。②苯丙酸内酯(环酯)类化合物,亦称香豆素类,也具苯环-C<sub>3</sub> 基本骨架,但 C<sub>3</sub> 与苯环通过氧环化,例如伞形酮、补骨脂内酯、香豆素等。③苯甲酸衍生物类,具苯环-C<sub>3</sub> 的基本骨架,例如水杨酸、香兰素等。

许多简单酚类化合物在植物防御草食昆虫和真菌侵袭中起重要作用。同时,简单酚类的某些成分有调节植物生长的作用,还有一些是植保素的重要成分。

醌类是由苯系多环烃碳氢化合物(如萘、蒽等)衍生的芳香二氧化合物。根据其环系统可分为苯醌、萘醌和蒽醌。醌类的存在是植物呈色的主要原因之一。有些醌类是抗菌、抗癌的主要成分,如胡桃醌和紫草宁。

**2. 萜类化合物** 萜类化合物是由异戊二烯单元(5 碳)通过异戊二烯途径(又称甲羟戊酸途径)组成的一类链状或环状的次生代谢物质,在植物界中广泛存在。根据异戊二烯数目,它的种类有单萜、倍半萜、双萜、三萜、四萜和多萜。萜类的骨架是以 C<sub>5</sub> 为基础递增,曾经认为最小的萜类是 C<sub>10</sub> 家族的萜类,于是命名为单萜,据此法命名了倍半萜(C<sub>15</sub>)、二萜(C<sub>20</sub>)、(C<sub>25</sub>)、三萜(C<sub>30</sub>)、四萜(C<sub>40</sub>)和多萜(>C<sub>40</sub>)。异戊二烯(C<sub>5</sub>)在 20 世纪 60 年代发现是天然产物,被命名为半萜。在植物细胞中,挥发油是低相对分子质量的萜,树脂、胡萝卜素等较复杂的化合物是相对分子质量较高的萜,橡胶等高分子化合物则是更大相对分子质量的萜,一般由 1 500~15 000 个异戊二烯单位所组成。

萜类化合物种类繁多,现已从生物界中鉴定了 30 000 种以上。大多数萜类是从植物中分离得到的。一些萜类在初生代谢中起重要作用,如几种植物激素、叶绿醇和叶绿素;一些则是生态交感作用的关键物质,如针对食植动物和病原生物的化学防卫反应中的成分,传粉引诱物质和异种克生中的成分等。许多萜类有重要的经济价值,如抗肿瘤(紫杉醇)、精油(柠檬烯)、类胡萝卜素和天然橡胶。萜类对植物的作用是多方面的。单萜和倍半萜是植物挥发油的主要成分,也是香料的主要成分,许多倍半萜和二萜化合物是植保素。有些萜类成分具有重要的药用价值,如短叶红豆杉中的红豆杉醇(亦称紫杉醇),是强烈的抗癌药物。目前治疗疟疾最佳药物的青蒿素是倍半萜成分,裸子植物红豆杉中存在

的抗癌药物紫杉醇是二萜类生物碱。某些萜类对植物的生长发育有一定的影响，例如，属于双萜的赤霉素用于调节植物的高度；属于三萜固醇与磷脂是膜的必需的组成成分；属于四萜衍生物的类胡萝卜素（胡萝卜素、叶黄素、番茄红素等）常能决定花、叶和果实的颜色；胡萝卜素和叶黄素也吸收光能，参与光合作用，同时也是维生素 A 的主要来源；胡萝卜素也可转变成脱落酸，用于种子成熟和植物抗逆性信号转导途径。

许多植物的萜类对哺乳动物和昆虫有毒，用于防止自己被哺乳动物和昆虫吞食。在菊花的叶片和花瓣中含有的拟除虫菊酯是极强的杀虫剂；许多双萜对草食动物有毒，使它们不愿食用。松树的松枝中含有苧烯和桂叶烯对昆虫有毒害作用。同时，在松树的树脂中含有大量的冷杉酸，在害虫取食穿刺树脂道时，流出的树脂阻止害虫取食，最后封闭伤口。薄荷、柠檬等植物中含有挥发油，它们的气味可以防止被害虫侵袭。

**3. 含氮有机物** 大多数含氮化合物是从普通氨基酸合成的。主要有生物碱、胺类、生氰苷、芥子油苷和非蛋白氨基酸等。胺类通常由氨基酸脱羧或醛转氨而产生。生氰苷是一类由脱羧氨基酸形成的 O-糖甙，氰基来自  $\alpha$ -碳和氨基。生氰苷是植物生氰过程中产生 HCN 的前体。生物碱是一类含氮的天然产物，现已深入研究的有烟草的烟碱、吡咯啉生物碱、毒藜碱，毛茛科的小檗碱，曼陀罗的莨菪碱、东莨菪碱等。植物次生代谢产物中有许多是含氮的，大多数含氮次生产物是从普通的氨基酸合成的。这里着重介绍植物含氮次生代谢产物中的生物碱和含氰苷等，它们都具有防御功能。

生物碱是一类含氮杂环化合物，通常有一个含 N 杂环。生物碱的种类很多，已知 5 500 种以上。目前已发现含有生物碱的植物将近 100 多个科，其中豆科、夹竹桃科、罂粟科、毛茛科、防己科、马钱科、茄科、芸香科、茜草科及石蒜科等多含生物碱。许多生物碱是药用植物的有效成分，如莨菪碱，还有些是植保素。生物碱在植物体内的分布并不一致，如古柯碱（可卡因）集中在叶内，奎宁碱集中在树皮，石蒜碱集中在鳞茎。生物碱是植物体代代代谢的中间产物，是有不同氨基酸衍生来的，尤其是赖氨酸、酪氨酸、色氨酸。烟碱是烟草中的主要生物碱。植物器官中的生物碱含量很低，一般在万分之几到百分之一二。不同生长时期植物所含生物碱的成分及含量常有不同。有些多年生的植物，随年龄增长，某部分的含量逐渐增加，如金鸡纳树皮的奎宁碱含量随树龄的增长而增加。植物生物碱含量亦受外界条件的影响而改变，如氮肥多时，烟碱含量就高。

生物碱是核酸的组成成分，又是维生素 B<sub>1</sub>、叶酸和生物素的组成成分，所以具有重要的生理意义。它对生物往往有毒性，所以也有防御敌害的意义。生物碱是重要药物的有效成分，它在医药上甚为重要。许多重要的有效成分往往是生物碱，比如有平喘作用的麻黄和有抗菌效果的黄连以及止痛作用的元胡，其有效成分都是生物碱。许多现在常用的利血平、奎宁等重要的西药药品，最初还是从植物分离出来经证实有效后才进行化学合成的。

含氰苷广泛分布于植物界，其中以豆类、禾谷类和玫瑰一些种类最多。含氰苷本身无毒，但植物破碎后就会释放出有挥发性的毒物氰化氢（HCN）。在完整植物中，含氰苷存在叶表皮的液泡中，而分解含氰苷的酶——糖苷酶则存在叶肉中，互不接触。当叶片被咬碎后，含氰苷就与酶混合，含氰苷中的氰醇和糖分开，前者再在羟基腈裂解酶作用下或自发分解为酮和 HCN。昆虫和其他草食动物（如蛇、蛞蝓）取食植物后，产生 HCN，呼吸就被抑制。木薯块茎含较多含氰苷，一定要经磨碎、浸泡、干燥等过程，除去或分解大部

分含氰苷后，才能食用。

**4. 其他** 除了上述的主要 3 大类外，植物还产生多炔类、有机酸等次生代谢物质。多炔类是植物体内发现的天然炔类，有机酸广泛地分布于植物各个部位。

## 二、次生代谢在植物进化过程中的生物学意义

随着对次生代谢物研究的深入，人们已清楚地认识到植物次生代谢物在植物与植物、植物与微生物及植物与昆虫之间的关系中具有重要的生物学意义。

### （一）植物通过次生代谢抵御不良物理环境

植物生长环境中的温度、水分、光照、大气、盐分、养分等都会对植物的生长产生各种各样的影响甚至胁迫。为了提高植物对物理环境的适应性，植物一方面可在形态结构上发生变化，另一方面可以在生理生化上发生变化，而一些次生物质则成为后一种适应的物质基础。在植物耐旱、抗寒和耐盐性研究中都发现，次生代谢产物都在其中发挥重要作用。许多盐生植物体内有甜菜碱和脯氨酸的大量积累，也有一些植物中累积的则是山梨醇、右旋肌酸甲醚等。盐生植物通过在细胞内积累这些无毒溶质可以平衡由于液泡内无机离子（如  $\text{Na}^+$  等）积累所造成的细胞质渗透压的变化，从而对细胞起保护作用。在干旱胁迫下，植物组织中次生代谢产物的浓度常常上升，包括氰苷、其他硫化物、萜类化合物、生物碱、单宁和有机酸。产生的有些次生代谢产物意义尚不清楚，但其含量高低与抗旱性强弱之间的这种相关性，至少说明它与抗旱性有关。在一些植物中发现有与抗低温有关的多元醇，如甘油、山梨醇、甘露醇等的积累。光强、光质和日照长短都会对植物化感化合物有影响。植物中的酚含量与植物受到的光照强度呈正相关。

植物受到外界伤害或者其他一些逆境作用下都会产生许多次生代谢产物，其中酚类化合物与紫外辐射存在密切的联系。植物表层及液泡内所富集的大量酚类次生代谢产物（如类黄酮、苯丙烷类衍生物等）能吸收 UV-B，避免 UV-B 的直接伤害。Day 等用石英微探针测定多种植物的结果表明，UV-B 穿透表层的能力与植物叶片表层中酚类甲醇粗提取物含量成反比。山毛榉（*Fagus*）、斗菜近缘种（*Aquilegia*）、水稻（*Oryza sativa*）对 UV-B 的耐性与 UV 吸收的化合物含量成正相关。Gitz 等用苯丙氨酸解氨酶（PAL）抑制剂 AIP(2-氨基 2-磷酸英丹) 处理甘蓝（*Brassica oleraceae*）悬浮细胞以降低细胞总酚量后，再对这种悬浮细胞进行 UV-B 辐照处理，结果其光系统 II (PS II) 反应中心的活性降低 50% 以上。对酚类代谢关键酶缺失的拟南芥和大麦突变体进行 UV-B 辐照处理的实验，证实各种酚类化合物对 UV-B 有防御作用。

### （二）植物次生代谢物与化学防御

植物次生代谢物可影响昆虫的行为，具有抗虫或刺激取食作用。有多种组成型次生代谢物对昆虫表现出毒性和排趋性。例如，单宁类化合物对棉叶螨、棉蚜和棉铃虫，单宁酸对苜蓿象甲，多酚对果园秋尺蛾，槲皮素对棉红铃虫、玉米穗螟和烟芽夜蛾，黄酮、槲皮素、黄烷醇和黄酮对纹棘胚小蠹，桑色素对烟芽夜蛾等，具有影响发育或抑制生长等效



应。树皮素对墨西哥棉铃虫， $\alpha$ -铁杉内酯和桑色素对纹棘胚小蠹具有刺激取食的效应。(E) $\beta$ -金合欢烯是蚜虫警戒信息素(alarm pheromone)，植物释放的(E)- $\beta$ -金合欢烯可使蚜虫因兴奋而离开其寄主植物，可增强蚂蚁对蚜虫的攻击作用。(E)- $\beta$ -金合欢烯在一定的浓度下还对蚜虫及白蝇有毒杀作用。植物中的生氰糖苷可合成并释放HCN毒杀取食的草食性昆虫。此外，植物界也存在诱导型抗虫次生代谢物，在节肢食草昆虫取食诱导作用下的利马豆、玉米、黄瓜等作物中发现挥发性异戊二烯及莽草酸等代谢途径合成的次生代谢物，吸引捕食者或寄生蜂等昆虫。例如，玉米在甜菜黏虫幼虫取食诱导下，可合成并释放芳樟醇等萜类挥发性次生代谢物，具有一定的抗虫作用。当烟草被烟夜蛾幼虫取食时，可诱导合成并释放出特定次生代谢物，从而抑制烟夜蛾产卵；当蜘蛛、螨取食菜豆叶片，未被取食的叶片可诱导合成并释放罗勒烯等萜类次生代谢物用于抵抗蜘蛛、螨取食，并可诱导体内几种植物防御反应基因的表达。

植物在防御天敌(昆虫和食草动物)摄食过程中，次生物质作为阻食剂发挥着重要的作用。阻食剂是通过影响动物体内的激素平衡或自身的毒性、降低植物的适口性或营养价值起作用。植物能生成很多种类毒性物质，如生物碱、皂角苷、葫芦素、烯羧酸内酯、 $\beta$ -硫代葡萄糖苷等。大多数植物还具有较强的诱导防御能力，当植物被取食后可以产生应激的次生代谢产物，使植物的防御水平在短时间内迅速提高，以威慑、毒害入侵昆虫或食草动物。大量的研究表明，植物次生代谢物对植食性哺乳动物的食物摄入量、代谢、蛋白质利用率、体组织成分及脂肪沉积、酶活性、内源性蛋白质分泌、肝脏和肾脏细胞膜的完整性、生长速率、繁殖及存活均具有显著的抑制作用。

### (三) 植物次生代谢与植物病原菌之间的作用

危害植物生存的又一重要因素是致病微生物的侵袭，在提高植物抗病能力方面次生代谢产物也起着举足轻重的作用。植物次生代谢物参与了植物的抗病反应。其中，角质、木栓质、木质素、胼胝质和类黑色素等组成型高分子量次生代谢物可充当病原菌侵入的物理障碍；单宁酸、多酚类低分子量组成型次生代谢物可在病原菌侵入后起抗病作用。植物在病原菌或其他诱发因子诱导作用下合成的萜类、异黄酮类、芪类、生物碱类等小分子量次生代谢物(phytoalexin, 植保素)，具有重要的抗病作用。在与植物对真菌的抗性有关的因子中，被称为植保素的一类物质是较为著名的。植保素是在植物受到感染后被诱发产生的，它对病原真菌具高度毒性，且对真菌无特异性，被认为是植物产生的抗真菌物质中最重要的一类。植保素中最简单的是苯甲酸，其他较复杂的有异黄酮类、萜类、生物碱等。例如木本植物的心材部分含有较高的萜类和酚类物质，具有很强的抗腐性。

### (四) 植物与植物间的化感作用

化感作用(allelopathy)是化学生态学研究的一个重要方面。1937年德国科学家Molish首次提出此词。它是指各种植物(包括微生物)之间存在的一种化学相互作用，包括促进和抑制两个方面。植物化感作用是活体植物合成的某些次生代谢物通过地上部分茎叶挥发、茎叶淋溶、根系分泌等途径进入环境，对周围其他植物(植株)产生相生或相克作用。化感物质多为植物次生代谢产物。温度、光照、水分胁迫、养分含量、生物因素



会影响化感作用。化感作用是近 10 年来逐步受到重视的一个新的研究领域。这种作用在范围上包括种群内部和物种间促进和抑制两个方面的相互作用。广义的化感作用还包括植物对周围微生物的作用，以及由于植物残株的腐解而带来的一系列影响。化感化合物（allelochemicals）一般有简单的水溶性有机酸、直链醇、脂肪醛、简单非饱和内酯、脂肪酸、炔属化合物、萘醌、蒽醌、复合醌、酚、苯甲酸、酚酸、肉桂酸及其衍生物、类黄酮类、芪类、单宁、萜类、生物碱、生氰糖苷等。植物的化感作用广泛存在，它影响植物分布、群落的形成和演替、种子的保存和萌发、真菌孢子萌发、氮循环等，与植物对光照、水分、养分和空间的竞争一起构成植物间的相互作用。化感作用在森林抚育、植物保护、生物防治等方面有着广阔前景。作物化感作用在可持续除草手段的开发、合理作物轮换顺序的设计及合理作物复合群体的构建等方面有重要应用价值。

### （五）植物次生代谢与植物的形态分化的关系

次生代谢产物的积累与培养细胞的分化程度之间存在着正相关性。植物次生代谢的一个基本特征是次生代谢产物在植物体内不是普遍存在的，而是限制在一些特定的器官或组织与细胞中。合成或储存这些次生代谢产物的细胞在内部结构上必须达到一定的分化程度。可见次生代谢途径的表达也正是某些特化细胞的特征的表达。30 多年来植物细胞大量培养的研究结果证实，大多数植物的培养细胞在生长周期的后期才开始大量合成次生代谢产物。

### （六）植物的次生代谢与信号传递

作为植物间信号传递的分子主要是次生代谢产物。信号分子可以在植物胞间扩散，亦可通过输导组织传送到远处的器官。水杨酸是近年来研究甚多的一种信号分子，它是一种在植物界普遍存在的酚类化合物。由于水杨酸对一些重要的植物代谢过程起调控作用，一些科学家把它作为一种新的植物激素来看待。对于与根瘤菌共生的豆科植物，一些苯丙氨酸类物质可以促进或抑制结瘤基因的表达。壳聚糖是甲壳质的一级衍生物，它可以诱导植物产生病程相关蛋白，积累次生代谢产物，并参与植物—病原菌之间的信号传导，在植物抗病诱导中起着重要作用。茉莉酸类是一类在植物中广泛存在的重要的信号传递物质。茉莉酸类化合物（jasmonate, JA）是诱导植物防卫反应的重要信号分子。JA 不仅是系统素信号转导途径的重要组分，而且在植物长距离信号转导中发挥重要作用。JA 还能单独或与其他激素相互作用调节与植物防卫反应相关的次生代谢物质芥子油苷的生物合成，从而影响植物的防卫反应。在对环境各种胁迫的反应中可调节植物防卫基因的表达，还可刺激多种次生代谢产物的合成，而且与植物的多种形态建成有关。

### （七）次生代谢产物在植物进化中的作用

在漫长的植物进化过程中，不同的植物总是合成不同的次生代谢物质。当植物中出现某一种特定的次生代谢物质，而这种产物又使得此种植物在其环境中处于有利地位时，这种植物便增加了繁衍生存的机会。相比较而言，那些不能合成这种特定次生产物的植物就有被自然界淘汰的危险。伴随这种现象，这种特定的次生物质本身也相对地得到了发展，其分布也就更加广泛。次生代谢产物在整个代谢活动中的重要地位表现在，在植物的某个

发育期或某个器官里，次生物质甚至成为代谢库的主要成分，其中一个典型例子就是橡胶树大量产生橡胶。

### 三、植物次生代谢产物与作物品质

植物次生代谢物还与作物（植物）的营养、保健等品质密切相关，具有不同的作用。例如维生素 A、维生素 B、维生素 C、维生素 D、维生素 E、维生素 H 和维生素 K 等是人类健康所必需的。萜类中的  $\beta$ -胡萝卜素、黄酮类或异黄酮类中多种成分也都与人类健康密切相关；茶叶中茶多酚的主要成分 EGCG(epigallocatechin gallate) 具有很强的抗氧化、降低血脂和胆固醇及抗肿瘤作用。葡萄果实中的白藜芦醇（一种芪类植保素）具有抗氧化、抗肿瘤和预防心血管疾病等功效；红豆杉的二萜次生代谢物紫杉醇具有抗癌作用，是目前治疗乳腺癌的首选药物。另一方面，部分次生代谢物对人类健康也具有不良的作用。例如，棉酚及其衍生物对人和动物有毒，老鼠、狗、兔和鸡等非反刍动物吃了棉酚以后会发生慢性中毒。棉酚能抑制精子的形成，从而造成男性育性障碍。饲料木质素过高，则降低动物对饲料的消化率。木材木质素过高，影响其在造纸业中的利用价值。植物次生代谢物中还有一些具有抗营养作用，例如，植物单宁的含量高时，影响人和动物对蛋白质、纤维素、淀粉和脂肪的消化，从而降低食物或饲料的营养价值。

### 四、植物次生代谢合成途径及其调节

植物次生代谢物种类繁多，这些次生代谢产物在植物体内主要通过苯丙烷代谢途径、异戊二烯代谢途径和生物碱合成途径形成。另外，莽草酸途径在植物次生代谢途径中也起到了中心作用。植物次生代谢的研究是一项非常复杂和巨大的工程，它包括次生代谢途径的中间产物和终产物的来龙去脉，参与各步反应的酶和基因的表达与调控，以及次生代谢产物产生的细胞学定位等。迄今，在庞大的植物次生代谢途径网络中，已明确功能的酶和已克隆的基因是极其有限的（图 7-5）。

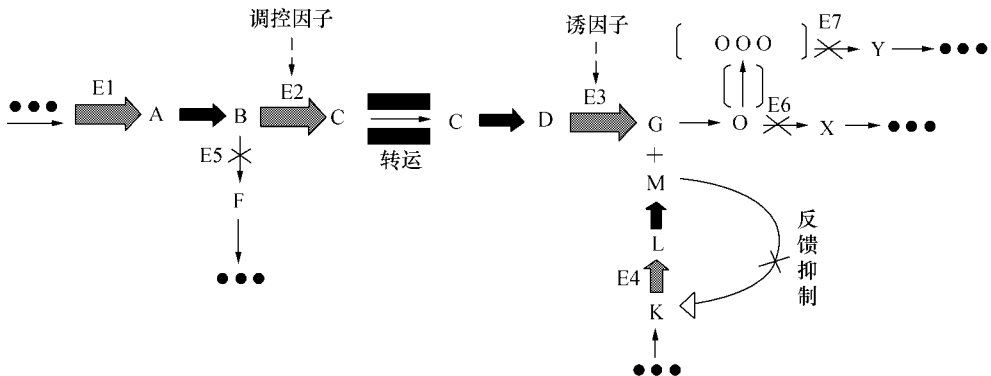


图 7-5 植物次生代谢途径及代谢调控

...: 物质; →: 物质流方向; ➡: 原有代谢途径; ➡: 可通过基因工程改进途径; ×: 阻断; O: 目标产物

### （一）酚类合成代谢途径及其调节

**1. 酚类合成代谢途径** 酚类化合物主要是通过苯丙基类生物合成途径合成的（图 7-6）。苯丙烷合成途径中，苯丙氨酸经过多次酶促反应，可分别合成水杨酸、绿原酸、木质素、芪、原色酮、类黄酮（包括黄酮、黄酮醇、花青素苷等）和异黄酮等多酚类次生代谢物。其中，异黄酮类、芪类在次生代谢物中，有多种次生代谢物在植物中充当植保素的作用。异戊二烯代谢途径可分别合成包括激动素、赤霉素、类胡萝卜素、甾醇、叶绿素等在内的单萜、倍半萜、二萜和多萜等次生代谢物。莽草酸途径在植物次生代谢中起中心作用，许多次生代谢物的芳香族氨基酸前体均来自莽草酸代谢途径所合成的芳香族氨基酸及其中间代谢产物。

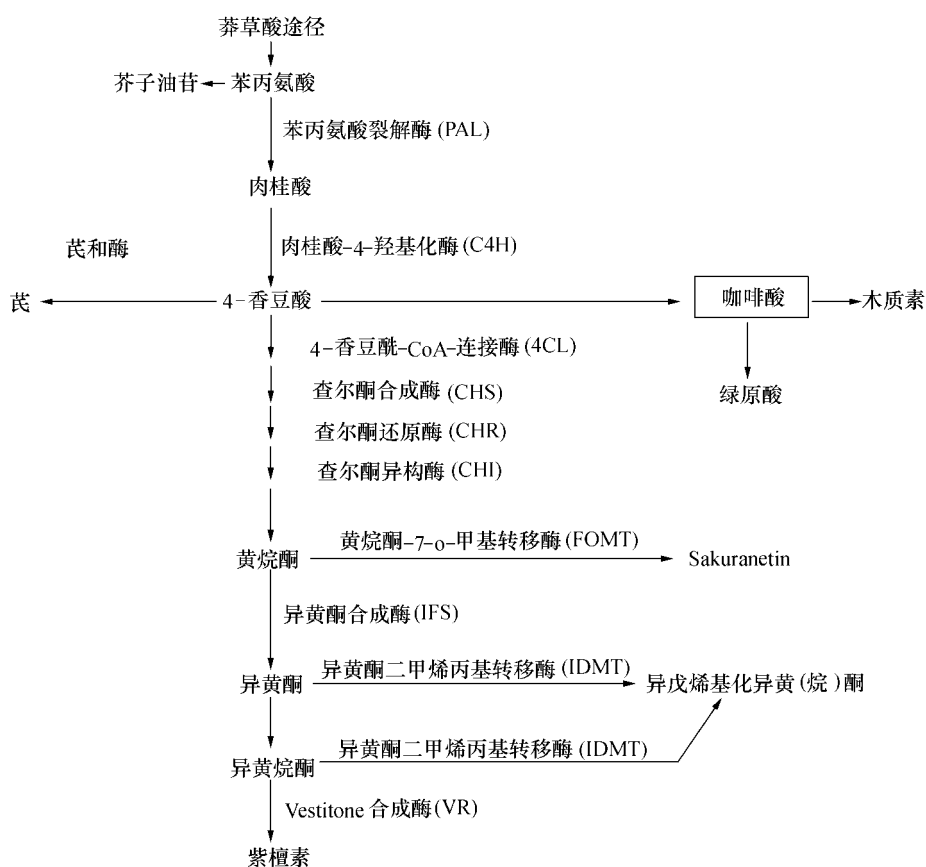


图 7-6 酚类合成代谢途径

**2. 酚类合成代谢调节** 植物可合成多种次生代谢物，越来越多的证据表明，植物次生代谢物的合成途径通常是以不同类别的次生代谢物合成途径为单位即代谢频道（metabolic channel）的形式存在。不同代谢频道分布在植物不同的器官、组织、细胞或细胞内不同的细胞器即分隔（compartment）内，不同代谢频道 QTL(quantitative trait loci)可能分布在不同的染色体上，它们受发育进程的调控，分别在植物不同发育阶段启动，

也可以受不同的诱发因子作用而启动。特定代谢频道的启动及其相关的特定次生代谢物的合成由代谢频道中的关键酶的表达来决定,而合成量则取决于限速酶的表达情况。其中的关键酶或限速酶往往是多基因家族编码的同工酶中的特定成员,负责特定次生代谢物的合成。代谢频道内的有关酶可以多酶复合体的形式存在于细胞内的不同部位,并可协同表达,代谢频道内的多个酶活性的协同提高,可显著地提高次生代谢物的产量。苯丙烷中央代谢途径、类黄酮和异黄酮合成支路均以代谢频道存在。例如,拟南芥细胞中的查尔酮合成酶(CHS)、查尔酮异构酶(CHI)、二氢黄酮醇还原酶(DFR)和黄烷酮-3-羟化酮酶(F3H)之间相互联系,这些酶在空间上呈现球形排列,CHS不仅与CHI(均与内质网膜相互联系)相连,而且还与F3H和DFR相连,在这些多酶复合体中,阿魏酰-5-羟基化酶、F3H、肉桂酸242羟基化酶(C4H)等细胞色素P450酶多充当细胞膜“锚”的作用,将相关的酶组装固定在内质网膜上,组成代谢频道,这些酶组成代谢频道彼此间协同表达。苯丙氨酸裂解酶(PAL)肉桂酸-4-羟基化酶(C4H)、4-香豆酰-CoA-连接酶(4CL)是苯丙烷类代谢途径中的关键酶,也是合成途径中的限速酶,它们在植物苯丙烷次生代谢物合成途径中位于代谢支路的分叉口或位于次生代谢物合成途径的下游,负责合成酚类次生代谢物一般合成前体。查尔酮合成酶(CHS)是将苯丙烷类代谢途径引向黄酮类合成的第一个酶,该酶基因的表达也会受到病原菌的诱导。

## (二) 萜类合成代谢途径及其调节

**1. 萜类合成途径** 所有的萜类都来自于一个共同的前体焦磷酸异戊烯酯(isopentenyl diphosphate, IPP)。IPP在IPP异构酶的作用下形成dimethylallyl diphosphate(DMAPP)。IPP和DMAPP在异戊烯基转移酶的作用下形成geranyl diphosphate(GPP)、farnesyl diphosphate(FPP)和geranylgeranyl diphosphate(GGPP)。这些非环化的中间体现在萜类合酶(terpene synthases, Tps)的作用下,形成各类萜类物质(单萜来自于GPP、倍半萜来自于FPP、二萜来自于GGPP)。萜类合酶通常也称为环化酶,因为此类酶的产品通常为环化的产物。萜类合酶把3种非环化的中间体转化成不同的单萜、倍半萜和二萜。萜类合酶家族催化的是一类庞大的天然产物的生物合成,随着大量有价值的萜类被发现,萜类合酶正成为萜类化合物生物合成及调控研究的焦点。

近几年的研究使得对IPP的生物合成的来源有了新的认识。从20世纪50年代末开始一直认为经典的acetate-mevalonate途径(图7-7, A)是萜类生物合成必经的途径。然而在一种细菌中发现有一条不依靠mevalonate的途径(图7-7, B),随后在低等和高等植物中都发现了这条途径。现在认为萜类在植物体中的合成分为两部分:一部分是acetate-mevalonate途径在细胞质中进行,产生倍半萜和三萜;另一部分是非mevalonate途径在细胞的质体中进行产生单萜、二萜和四萜。每部分都有IPP异构酶和异戊烯基转移酶,都可以独立完成相应萜类的生物合成。

异戊二烯代谢途径可分别合成包括激动素、赤霉素、类胡萝卜素、甾醇、叶绿素等在内的单萜、倍半萜、二萜和多萜等生代谢物。在异戊二烯代谢途径中由乙酰辅酶A反应而成的焦磷酸异戊烯酯(IPP)可进一步合成焦磷酸香叶酯(GPP)、焦磷酸金合欢酯

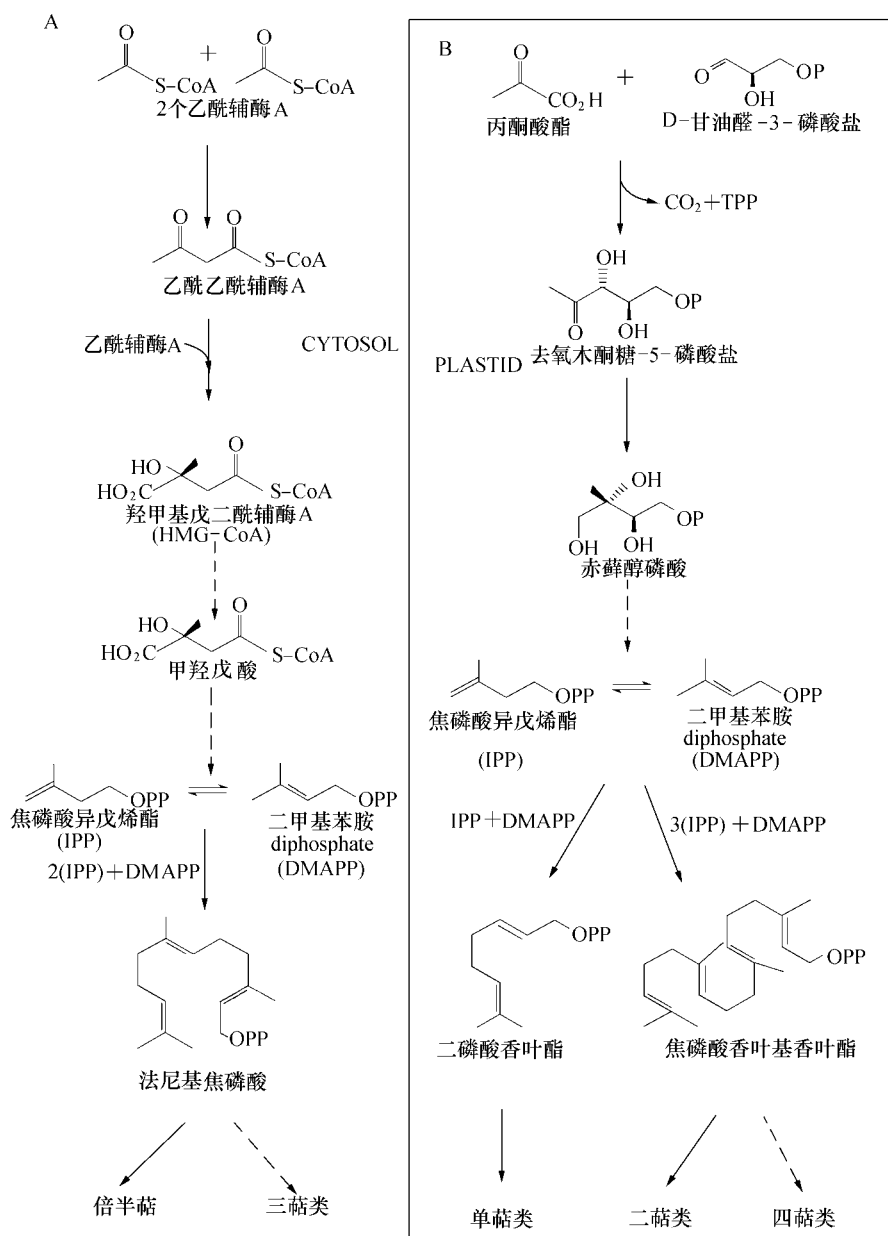


图 7-7 植物中萜类合成的两种途径

(FPP) 和焦磷酸香叶基香叶酯 (GGPP)。后者分别在单萜化酶、倍半萜环化酶和二萜环化酶的催化作用下被分别环成单萜、倍半萜和二萜次生代谢物。由 FPP 也可进一步合成鲨烯、甾醇及多萜次生代谢物。植物 IPP 的合成有两条不同的途径：一条是由乙酰-CoA 经过甲羟戊酸合成，该途径合成的 IPP 主要用于合成甾醇、半萜和三萜次生代谢物；另一条 IPP 合成途径是 1-脱氧-木酮糖-5-磷酸合成支路，该途径合成的 IPP 主要用于合成质体中的二萜、单萜、类胡萝卜素、异戊二烯等次生代谢物。

## 2. 萜类的代谢途径的调节 植物异戊二烯代谢途径中也存在代谢频道。单萜合成途



径并非倍半萜和二萜等高级萜类合成途径的分支，而是具有独特的酶促反应机制的单独合成途径。各种萜类次生代谢物的合成在细胞内具有明显的分隔，其中倍半萜主要在细胞质内合成，而二萜和单萜则在质体内合成。次生代谢物生物合成“代谢频道”的存在，有效地隔绝了次生代谢物合成过程的中间产物在细胞内扩散，有利底物与酶的有效结合和酶促反应的顺利进行，减少次生代谢途径中不同支路之间争夺底物的现象及有毒中间产物对细胞的伤害，并使细胞内多种类型次生代谢物的合成途径得以同时存在。其中 3-羟甲基戊二酰-CoA 还原酶 (HMGR)、单萜还原酶 (MC)、二萜环化酶 (DC)、倍半萜环化酶 (SC)、鲨烯合成酶是异戊二烯代谢途径中的限速酶。例如，番茄果实甾醇和胡萝卜素的合成分别由不同的 HMGR 等位基因所控制。马铃薯中 HMG1 负责机械损伤诱导的甾醇的合成，HMG2 和 HMG3 负责诱发因子作用下倍半萜植保素的合成。在 *Salvia* 的上表皮富含腺的细胞中含有异戊烯基转移酶及单萜合成有关酶，只能合成 GPP，而不能催化合成 FPP 和 GGPP 等异戊二烯代谢途径的中间产物。可见，半萜合成途径并非倍半萜和二萜等高级萜类合成途径的分支，而是具有独特的酶促反应机制的合成途径。各种萜类次生代谢物的合成在细胞内具有明显的分隔，其中倍半萜主要在细胞质内合成，而二萜和单萜则在质体内合成。

### (三) 生物碱合成途径及其调节

**1. 生物碱合成途径** 生物碱产生有以下几种情况：植物的所有细胞都合成；合成和储存在特殊的组织和器官中；合成在某一特殊的细胞类型中，然后被转运到别的组织中积累。在我们所研究过的为数不多的植物中，后两种情况比较普遍。植物生物碱中萜类吲哚生物碱、苄基异喹啉生物碱、莨菪碱和烟碱、嘌呤生物碱等均有其特定的生物合成途径。吲哚生物碱含有吲哚环和次番木鳖苷，由香叶醇合成的次番木鳖苷和色胺在 STR(strictosidine synthase) 的催化作用下可合成萜类吲哚生物碱的共同合成前体 strictosidine，再由 strictosidine 进一步合成长春碱等多种吲哚类生物碱；酪氨酸在 TYDC 酶等催化作用下转化为多巴胺和 4-羟基-苯乙醛，多巴胺和 4-羟基-苯乙酸进一步缩合，生成苯基异喹啉生物碱合成的主要前体 (s)-norcoclaurine，再进一步合成各种苯丙异喹啉生物碱；烟碱和莨菪碱等生物碱生物合成起始于鸟氨酸或精氨酸的脱羧反应，在鸟氨酸或精氨酸脱羧酶催化作用下，均脱羧合成腐胺，再在腐胺-N-甲基转移酶的催化作用下合成 N-甲基-4-氨基-丁醛，并快速转化为 1-甲基-吡咯啉正离子，后者进一步分别转化为烟酸和托品酮，其中托品酮在托品酮还原地酶 (TR) 和 TR 催化作用下，分别合成  $\psi$ -托品和托品，托品与来自于苯丙氨酸的托品酸反应，合成东莨菪胺，在东莨菪胺羟基化酶催化作用下进一步羟基化，相继生成 6- $\beta$ -羟基-东莨菪胺万和东莨菪胺等生物碱。

**2. 生物碱合成代谢调节** 在植物细胞中生物碱生物合成过程分别在细胞质、液泡、液泡膜、内质网膜、类囊体膜等 5 个以上细胞分隔区内完成。苯基异喹啉生物碱的合成途径中除了 BBE 外，其他主要酶均依赖于细胞色素 P450，位于内质网膜或内质网延伸膜分隔内。生物碱合成过程中的吲哚-3-甘油磷酸酶 (BX1)、STD、酪氨酸/多巴脱羧酶 (TYDC)、小檗碱桥酶 (BBE) 等可能是限速酶。以上代谢途径还有待进一步从植

物分子生物学、生物细胞酶动力学、植物细胞工程学等许多方面加以研究，深入阐明各个未知环节。在植物细胞中，生物碱长春多灵生物合成过程分别在细胞质、液泡、液泡膜、内质网膜、类囊体膜等 5 个以上细胞分隔区内完成。苯基异喹啉生物碱的合成途径中除了 BBE 外，其他主要酶均依赖于细胞色素 P-450，位于内质网膜或内质网延伸膜分隔内。

### 五、植物次生代谢产物合成的调控

次生代谢物生物合成“代谢频道”的存在，有效地隔绝了次生代谢物合成过程的中间产物在细胞内扩散，有利底物与酶的有效结合和酶促反应的顺利进行，减少次生代谢途径中不同支路之间争夺底物的现象及有毒中间产物对细胞的伤害，并使细胞内多种类型次生代谢物的合成途径得以同时存在。

植物次生代谢物合成途径中的关键酶的分离及其基因的克隆是植物次生代谢酶促反应机制研究的基础。近年来，植物次生代谢物合成途径中有关酶的基因克隆及其分子生物学研究备受重视，已克隆了多个有关基因（图 7-8）。植物次生代谢物合成途径中的酶依其底物专一性程度可分为两种类型，一种类型是催化合成具有次生代谢物特定立体结构基本骨架的专一性酶。属于这种类型的酶有异戊二烯代谢途径中的 HMGR、半萜环化酶、倍半萜环化酶和二萜环化酶；苯丙烷代谢途径中的 PAL、CHS、STS、IFS 等以及生物碱合成途径中的 TR、BBE、氧甲基转移酶等。例如，生物碱合成过程中，TR1 和 TR2 将莨菪酮分别合成具有不同手性结构的  $\alpha$ -莨菪碱和  $\beta$ -莨菪碱。茄科植物中的倍半萜环化酶负责 FPP 的环化，合成的倍半萜类前体经过进一步修饰反应，可合成各种倍半萜次生代谢物。倍半萜环化酶不仅是 C 流从异戊二烯中央代谢途径进入倍半萜合成支路的关键调节位点，而且倍半萜环化酶催化 FPP 环化的产物具有特定的立体结构框架并影响后续各种修饰反应及所合成倍半萜的结构。第二种类型酶负责对第一种类型酶催化反应的产物做进一步的修饰反应，如羟基化酶、脱氢酶和单氧化酶等。这些酶对其底物基团的置换方式的专一性程度不高，是导致植物组织往往合成一系列相关次生代谢物的主要原因之一。

植物次生代谢物质的合成与积累量取决于其合成途径中的限速酶，在植物次生代谢物生物合成途径中这些酶往往位于代谢支路分叉口或位于次生代谢物合成途径的下游，负责催化合成次生代谢物合成前体。例如，苯丙烷代谢途径中的 PAL、4CL、CHS、IFS；异戊二烯代谢途径中的 HMGR、各种萜类环化酶、鲨烯合成酶；生物碱合成过程中的 BX21、STD、TYDC、BBE 等可能是限速酶。但是，由于植物次生代谢往往涉及多个层次的酶促反应，给特定次生代谢物合成的关键酶的确定带来了困难。有报道指出，动物细胞异戊二烯代谢途径中 HMGR 酶可能是决定动物细胞中的甾醇含量的关键酶，但是，在植物中 HMGR 在控制异戊二烯合成过程中是否起关键作用还不清楚。研究表明，HMGR 在烟草细胞甾醇含量提高中并不起主要作用。倍半萜环化酶是将异戊二烯中央代谢途径引向倍半萜合成支路的关键酶。倍半萜环化酶基因在病原菌、诱发因子或紫外线等作用下，与其利用相同底物的鲨烯合成酶活性被抑制。实际上，倍半萜等次生代谢物的合成是多酶

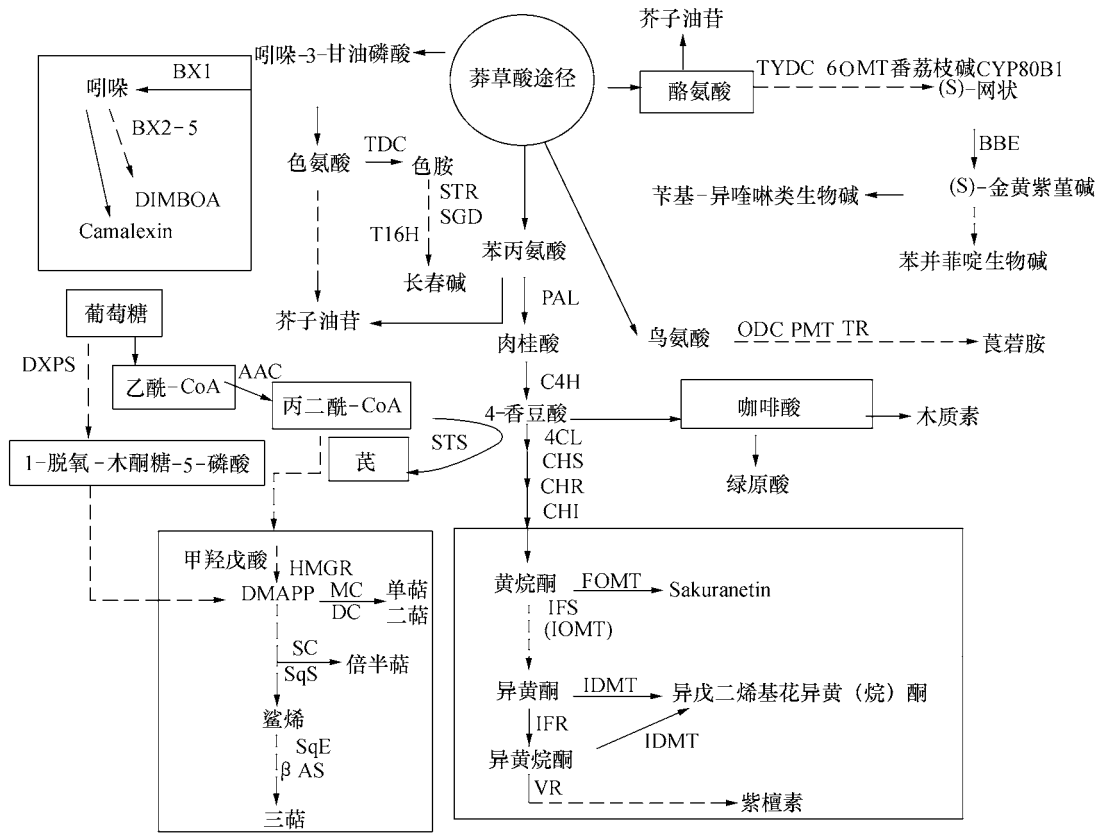


图 7-8 植物主要次生代谢途径及已克隆的部分有关基因

参见文献 [Dixon R. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 2001, 411 (14): 843~847]。图中 TYDC 为酪氨酸/多巴脱羧酶, ODC 为鸟氨酸脱羧酶, TDC 为色氨酸脱羧酶, 6OMT 为 norcochlorine262 甲氧基转移酶, CYP80B1 为 (S)-N-甲基乌药碱 3'-羟基化酶, BBE 为小檗碱桥酶, PMT 为腐胺-N-甲基转移酶, TR 为托品酮还原酶, BX1 为吲哚-3-甘油磷酸裂解酶, BX2-5 为催化 DIMBOA 合成细胞色素 P450 单氧化酶, STR 为 strictidine 合成酶, SGD 为 strictidine-β-D-葡萄糖苷酶, T16H 为水甘草碱 16-羟基化酶, PAL 为苯丙氨酸裂解酶, C4H 为肉桂酸-4-羟基化酶, 4CL 为 4-香豆酰-CoA 连接酶, CHS 为查尔酮合成酶, CHR 为查尔酮还原酶, CHI 为查尔酮异构酶, STS 为芪合酶, FOMT 为黄烷酮 27-O-甲基转移酶, IFS 为异黄酮合成酶, IOMT 为异黄酮 24-O-甲基转移酶, IDMT 为异黄酮(异黄酮)二甲基丙基转移酶, IFR 为异黄酮还原酶, VR 为 vestitone 合成酶, DXPS 为 1-脱氧-木酮糖-5-磷酸合成酶, AAC 为乙酰-CoA 羧化酶, HMGR 为 3-羟-甲基戊二酰-CoA 还原酶, SC 为倍半萜环化酶, MC 为单萜还原酶, DC 为二萜环化酶, SqS 为鲨烯合成酶, SqE 为鲨烯环氧化酶, βAS 为 β 脂素合成酶。

作用的结果, 并且可能还受到底物供给的影响, 单倍半萜环化酶活性不足以完全决定倍半萜次生代谢物合成量。

不同的编码基因的调控序列中均含有保守的顺式作用元件。对玉米 maysin 的合成而言, 代谢频道中各种酶活性的协同表达及关键酶活性的高低, 是影响特定次生代谢物产量的主要因素。McMullen 等通过 QTL 分析, 发现玉米 maysin 的生物合成量按程度依次为转录调节因子 P1、关键酶的编码基因 (whp1 和 sm1) 的活性、供给不同支路相同中间产物的量和代谢频道等所控制。

## 六、转基因植物生产次生代谢物的研究现状和发展

### （一）提高植物细胞现存代谢途径中天然产物的产量

通过生物合成中间体的分析，找到生物合成的速度限制步骤，分离限速步骤的合成酶基因，并导入细胞内增加限速酶的表达量，从而提高目标代谢物的产量。在植物中，淀粉合成需要 3 个关键性的特征酶，其中 ADP 焦磷酸化酶（ADPGPP）是该合成途径的限制酶，是一种变构酶，被 3-磷酸甘油酸激活，受 Pi 抑制。Stark 等从大肠杆菌中分离出对调节因子异常不敏感的 ADPGPP，将这种变构酶的基因置于块茎特异性启动子的转录下，并将其导入马铃薯之中，结果转基因块茎中的淀粉含量比对照提高了 35%。

### （二）引入转录调节因子

植物细胞中许多物质的合成受到多个基因的协同控制，对代谢途径中单个酶基因的修饰和改造往往达不到人们所期望的目标。转录因子是调节复合基因共同表达的有效工具。因此，导入转录因子是植物代谢转基因的一条重要策略。Van der Fits 等从长春花属植物中分离出一种茉莉酸转录调节因子基因（ORCA3），该基因在长春花悬浮细胞中超量表达，增强了生物碱合成相关基因的共同表达，导致了吲哚生物碱的大量积累。最近的研究表明，单萜生物合成基因的诱导在发育的薄荷腺毛状体中是受转录因子协同控制的，油的积累很大程度上也受控在转录水平。因此，导入转录因子可以对植物的代谢途径进行协调控制。

### （三）引入信号分子和植物激素合成基因

信号分子是植物体内的一类小分子代谢物。近年来的研究表明，植物基因的表达受到许多代谢物的调节，如各种糖类、丁酸等能够调节植物中  $\alpha$ -淀粉酶基因的表达。2,6-二磷酸果糖（F2,6BP）是植物体内调节代谢流在蔗糖和淀粉合成之间分配的重要信号分子，而 F2,6BP 的水平取决于 2,6-二磷酸果糖-2-激酶（PF2K）和 2,6-二磷酸果糖酯酶（F2,6BPase）的相对活性。Scott 等将一种经修饰的鼠肝 PF2K 的基因导入烟草中，转基因植株中 PF2K 酶活力提高导致了光合暗反应末期 F2,6BP 的水平提高了 2~3 倍。分析结果表明，F2,6BP 在光合作用中抑制了合成蔗糖的代谢流，促进了合成淀粉的代谢流量。植物激素在调控植物的代谢方面发挥着重要的作用。外源引入激素合成基因或降解基因来控制植物激素的水平，可以改变植物的代谢流。Oeller 等用反义 ACC 合成酶基因转化番茄获得了转基因植株，其果实的乙烯含量减少了 99.5%，在室温或植株上可保存 120 d 左右而不腐烂。澳大利亚的 Florigene 公司将反义 ACC 合成酶基因导入香石竹，转基因香石竹的寿命延长了 2 倍。

### （四）扩展代谢途径

扩展代谢途径就是通过基因工程手段引入外源基因，使原有代谢途径进一步向前或向后延伸，从而可利用新的原料用于合成目标产物或产生新的代谢产物。在对农作物品质的



生理代谢过程进行充分了解的基础上,对植物的代谢过程进行改造,从而改善农作物的营养品质。水稻未成熟胚能够合成 $\beta$ -胡萝卜素的早期中间产物焦磷酸二香脂(GGPP)。GGPP在八氢番茄红素合成酶(psy)的作用下形成无色的八氢番茄红素,在八氢番茄红素脱饱和酶(ctrl)的作用下形成番茄红素,经番茄红素 $\beta$ -环化酶(ley)再作用,产生 $\beta$ -胡萝卜素及其他类胡萝卜素。作为人类主要食物的大米胚乳中缺乏 $\beta$ -胡萝卜素。将psy, ctrl和ley基因以及相应的启动子和其他调控序列转化水稻。转基因水稻种子的胚乳中含 $\beta$ -胡萝卜素,呈现黄色,因此被称为“金米”。初步分析表明,胚乳中类胡萝卜素的含量大于 $1.6\ \mu\text{g/g}$ ,以 $\beta$ -胡萝卜素为主。 $\alpha$ -Vitamin E是一种脂溶性抗氧化剂,对人体健康很重要,可以增强免疫功能,降低心血管病和癌症的发病几率。植物油是 $\alpha$ -Vitamin E的主要来源,但是植物油中 $\alpha$ -Vitamin E含量很低,而主要以其前体 $\gamma$ -Vitamin E存在。 $\gamma$ -维生素甲基转移酶是 $\gamma$ -Vitamin E合成代谢中最后的关键酶。Shimtani等利用基因组学方法从拟南芥中克隆了该酶,将其导入油料农作物(大豆、油菜、棉籽等)中表达这种酶,可以将种子中大量的 $\gamma$ -维生素前体转化成 $\alpha$ -维生素,提高 $\alpha$ -维生素的水平,从而改善油料农作物的营养价值。

### (五) 构建新的代谢途径

植物生物反应器将是未来基因工程发展的另一个重要领域之一。通过引入外源基因来改造和修饰代谢网络,使植物细胞从不能合成某种代谢产物转变为能够合成此代谢产物。如可以生产植物本身所没有的具有生物活性的医药蛋白如脑啡肽、抗原、抗体等。

### (六) 优化细胞的生物学特征

农作物基因工程已经在抗生物逆境(如抗虫)方面取得了相当的成就。随着人们对非生物逆境的作用机制和植物对非生物逆境信号反应的分子机制的了解,克隆与非生物逆境信号传导(signal transduction)相关的基因,并转入植物将可能使转基因植物获得对非生物逆境的抗性。农作物所处的非生物逆境包括干旱、盐渍、冷冻、高温、营养贫瘠、重金属胁迫、水灾、紫外线等。世界上可耕地的30%为碱性土壤。在碱性土壤中,金属离子,特别是铁离子很难溶解。禾谷类作物分泌铁载体——高铁离子螯合剂(mugineicacids, MAs),与铁 $\text{Fe(III)}$ 结合,形成 $\text{Fe(III)-MAs}$ 合物,通过质膜中的 $\text{Fe(III)-Mas}$ 转运蛋白被吸收到根部。但不同禾谷类作物分泌MAs的能力不同。大麦的根具有较高的分泌MAs的能力,能较好地利用碱性土壤中的铁,而水稻在碱性土壤中表现明显的缺铁症状。研究表明,烟草胺合成酶(NAS)和烟草胺转氨酶(NAAT)是MAs生物合成的关键酶,在缺铁时NAS和NAAT的活性增加,MAs的分泌增加。将在大麦中分离的烟草胺转氨酶基因naat-A和naat-B转化水稻获得转基因水稻,将36个转基因的株系种在pH 8.5的碱性土壤中生长,其中有10个株系表现出明显的耐性。近年来,环境问题已引起人们越来越多的关注。土壤中缺乏植物生长必要的无机盐也是一种逆境,通过基因工程手段也可以使植物获得抵抗这种逆境的能力。例如,山梨醇合成能力强的转基因烟草对硼缺乏具有一定的抗性。重金属是一类严重的污染源,散布在土壤和水分中,会给人类和动植物造成很大伤害。重金属又不同于有机污染物,不能用化学方法或生物方法降解除去。



转基因植物在清除重金属污染物方面已经表现出一定的作用。例如，高表达谷胱甘肽合成酶的油菜可以在体内积累镉，高表达锌转运蛋白的拟南芥菜可以大量积累锌，通过这些转基因植物将有望抵抗诸如镉、锌等重金属离子的毒害，有效清除环境中的重金属污染物。

### （七）定向改良植物性状

从一种植物中分离全长目的基因，构建其反义基因，然后将反义基因转化该植物，转录的反义 RNA 结合到目的基因的 mRNA 上，阻止或封闭 mRNA 的翻译或加工，从而调控代谢途径中关键酶的相对活性，实现定向改良植物的性状。例如乙烯控制果实成熟，ACC 合成酶是乙烯生物合成途径中的关键酶，S-腺苷甲硫氨酸（SAM）经 ACC 合成酶催化转换为乙烯的直接前体 ACC。将从番茄中分离出全长的 ACC 合成酶基因的反义基因转化番茄，转录成反义 RNA 抑制番茄果实成熟。Northern 杂交表明，这种植株内 ACC 基因的正常表达受抑，果实无论是留在植株上，还是摘下放在空气中，都不能变红、变软，并产生香味。但是，这些转基因果实经乙烯处理后可以加速成熟，在颜色、质地和香味等方面与普通番茄成熟果实无异。

## 七、利用转基因植物生产次生代谢物质

随着对植物次生代谢网络的认识和研究的深入，以及分子克隆和遗传转化技术的飞速发展，应用基因工程对植物次生代谢途径的遗传特性进行改造，即植物次生代谢基因工程的研究日益增多，目前已发展为具有广阔应用前景的热点研究领域。迄今，已建立多种植物次生代谢途径基因修饰策略更有效地调控植物次生代谢，以提高特定化合物的积累。

### （一）次生代谢途径中关键酶的基因工程

通过强启动子与关键酶基因的嵌合转化或者次生代谢物合成途径中下游一个或若干个有关酶基因的协同转化两种方法，利用基因工程提高控制某一特定次生代谢物合成的限速酶活性或在植物中引入新的次生代谢物合成途径，可提高转基因植物目标次生代谢物含量或合成外源次生代谢物。He 等将与 CaMV35S 连接的 IOMT（异黄酮-4-O-甲基转移酶）基因转入苜蓿获得转基因苜蓿。对照植株的 IOMT 和其他有关异黄酮合成酶的基因仅在病原菌诱导后表达，而转基因植物在病原菌侵染后 IOMT 基因的快速组成型表达，使其较对照合成苜蓿素（*medicarpin*）的速度快，且产量高，抗病水平也有显著的提高。强化转基因植物中与生物碱合成有关的 TYDC 和 TDC 基因的表达，可减少吲哚芥子油苷的含量，增加吲哚生物碱的含量。将长春花的 TDC 基因转入到长春花，转基因长春花中色胺的含量有显著增加，将长春花中 TDC 和 STR 的嵌合基因转入长春花，转基因长春花培养细胞中萜类吲哚生物碱含量有所提高。

将次生代谢物合成途径的下游关键酶基因转入目标植物，外源基因在植物细胞内存在反应底物时的表达，可使转基因植物启动新的次生代谢物合成支路。例如，将葡萄 STS 基因转入烟草，结果使转基因烟草表达了 STS 酶活性，合成了白藜芦醇，并使转基因烟

草的抗病水平有了显著的提高。将葡萄 STS 基因转入水稻和小麦等作物,也使转基因植物提高了抗病水平。将真菌 *Fusarium sporotrichioides* 中的倍半萜环化酶 (trichodiene synthase) 基因转到烟草,转基因烟草培养细胞在诱发因子作用下可合成 15-hydroxytrichodiene 等倍半萜类次生代谢物。将 (E)- $\beta$ -金合欢烯合成酶基因即使转入不能合成倍半萜的植物中,也能使转基因植物合成 (E)- $\beta$ -金合欢烯等倍半萜,从而使植物获得对蚜虫的抗性。将高粱中负责催化生氰糖苷合成的 2 个细胞色素 P450 基因 (CYP79A1 和 CYP71E1) 转入拟南芥,转基因拟南芥合成了蜀黍苷,对十字花科植物害虫跳甲 (*Phyllotreta nemorum*) 具有抗性。将植物维生素 A 的合成前体  $\beta$ -胡萝卜素合成途径下游的 4 个酶 (八氢番茄红素合成酶、八氢番茄红素去饱和酶、 $\zeta$ -胡萝卜素去饱和酶和番茄红素环化酶) 基因共转化到不合成胡萝卜素的水稻中,这 4 个基因的协同表达,可使水稻中的 GGPP 最终合成  $\beta$ -胡萝卜素和其他具有营养价值的萜类次生代谢物,并在转基因水稻胚乳中积累,使水稻胚乳呈黄色即“黄金稻”。将拟南芥的 IFS 基因转入烟草和玉米等非豆科植物,可将柚皮素转化为染料木黄酮、大豆黄素等仅存在豆科植物的异黄酮类植保素。同样,对部分不利营养品质或加工品质提高的植物次生代谢物,可通过反义基因的遗传转化抑制其合成途径中有关基因的表达,减少植物合成特定次生代谢物,从而提高植物产品的品质。

## (二) 次生代谢途径中调节基因或转录因子的基因工程

对涉及多基因表达的植物次生代谢来讲,同时增强多个基因的协同表达是提高次生代谢物产量所必需的。次生代谢频道中多个酶基因的协同表达与这些基因调控序列中相同或相似的顺式作用元件受到相同的转录因子或调节基因的作用有关。目前已分离了多种有关次生代谢基因表达的调节基因或转录因子基因,为开展植物次生代谢基因工程开辟了新途径。例如,从拟南芥中分离了 AN11、TTG1、PAP1 等类黄酮合成的调节蛋白基因,从长春花中分离了 ORCA3 (茉莉酸诱导型的 AP2 区域转录因子),从玉米中分离了 Mvb 区域和 bHLH 转录因子基因 R、B、C1 和 P。将玉米的 R 和 C1 基因置于强启动子控制之下的转基因拟南芥中,花色苷大量合成;ORCA3 基因在长春花中的组成型表达,使生物碱合成途径中的酶的表达增强,导致了萜类吲哚生物碱合成量的提高。

**1. 黄酮类生物合成途径的基因修饰** 黄酮类化合物是一种小分子酚类物质,广泛存在于植物界,具有调节植物生长,保护植物免受紫外线的损伤,抗氧化活性,抗病虫等多种生物功能。因此,具有较高的富含黄酮类化合物的植物食品有利人类健康和疾病预防。由于对黄酮类生物合成途径研究的较清楚,而且其生物合成途径的改变能很容易通过花色的改变来鉴定。自 20 世纪 90 年代早期以来,黄酮类和花青素的生物合成一直是植物次生代谢基因工程的主要目标之一。查尔酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 是黄酮类代谢途径中的早期酶,也是增加黄酮醇产物的关键酶。Verhoeyen 等将矮牵牛 CHI 在番茄中超表达,转基因番茄果皮中黄酮类含量比对照增加 78 倍、果肉中黄酮醇含量比对照增加 21 倍。植株及果实的其他性状在转基因植株和对照之间没有区别。将查尔酮合成酶和黄酮醇合成酶基因导入番茄后,使这两个目标合成酶基因协同表达的转基因果肉中黄酮醇类物质积累显著增加。豆类植物的异黄酮是一类植物抗毒素,在植株受微生物侵染后,这些

抵抗微生物的活性化合物可被诱导合成。正常情况下，拟南芥、烟草和玉米等植物缺少合成这类化合物的能力。Jung 等将一种细胞色素 P450 单加氧酶—异黄酮合成酶的基因导入这些植物，使该基因超表达，这些转基因植物均能合成异黄酮类物质。因此，苯丙烷类代谢途径的基因工程可进一步应用于提高异源植物中异黄酮的生物合成。

植物代谢途径大多是由多种酶参与的多步反应，受发育、环境等因素的影响，对单个基因进行修饰有时难以奏效。研究发现，一些转录因子可调控多个参与代谢途径基因的表达。例如，Broun 在玉米籽粒中通过转录因子的分子操作两种转录因子即 R 和 C1，通过共同作用调节花青素生物合成。MYB 类转录因子参与黄酮类物质的生物合成的调节。Grotewold 等将转录因子 R 和 C1 在离体培养的未分化玉米细胞超表达，成功地诱导了完整的黄酮类合成途径。Borevitz 等应用 TDNA 激活标签技术在拟南芥中鉴定出一种 MYB 类转录因子，它的超表达能激活许多参与花青素生物合成途径的基因表达，使植物体中紫色素的含量明显增加。在水稻中，玉米转录因子 R、C1 和查尔酮合成酶基因的协同超表达也激活了花青素生物合成途径，增强了对真菌的抗性。

植物体内自然产物合成的抑制子的转录因子则采用基因沉默技术关闭这类转录因子的表达，同样能促使相关化合物的合成。Aharoni 等克隆和鉴定了一个参与草莓果实黄酮类代谢途径的转录因子 *FaMYB1*。该转录因子抑制黄酮类合成下游一些步骤。*FaMYB1* 基因在烟草中的超表达引起了花青素和黄酮类化合物减少。相反，抑制或降低 *FaMYB1* 就会增加花青素和黄酮类化合物的积累。拟南芥转录因子 *AtMYB4* 是参与芥子酸酯合成的关键酶——桂酸 4-单加氧酶 (C4H) 的抑制子。Jin 等将 *AtMYB4* 基因剔除，结果导致了 C4H 的大量表达，叶子中芥子酸酯增加，提高了抗紫外辐射的能力。通过一种或几种转录因子的超表达，可以改变植物生长发育过程中自然产物的合成和积累，甚至在异源植物种中也是可行的。

**2. 生物碱生物合成途径的基因修饰** 长春碱、长春新碱及喜树碱萜类等吲哚生物碱具有重要的医药和工业价值，因此，吲哚生物碱代谢途径是次生代谢途径基因工程研究的重要靶标。与黄酮类生物合成途径的基因修饰策略相似，吲哚生物碱代谢途径的遗传改良可以通过对一些编码生物合成的基因和转录因子进行基因操作而实现。不同植物生物碱的合成是从 strictosidine 处开始分支的。对控制这一代谢途径的上游步骤进行基因修饰，可使代谢物流通向目标吲哚生物碱的合成。Canel 等应用长春花 (*Catharanthus roseus*) 细胞培养实验体系，对色氨酸脱羧酶 *TDC* 和 strictosidine 合成酶 *STR* 的基因进行操作，以期提高目标生物碱的合成。结果显示，编码 *TDC* 的基因超表达导致直接产物色胺增多。但是，生物碱水平没有提高，而 *STR* 基因的超表达则使生物碱水平提高。若用含有色胺和萜类的介质培养这两种转基因细胞系，其细胞可合成大量的生物碱。由此可见，该代谢途径中的萜类分支是限速因素，也可能存在其他限速步骤。在其他不合成此类生物碱的植物中超表达编码 *TDC* 和 *STR* 的基因，同样也可以导致这些植物细胞合成此类生物碱。对这些异源表达 *TDC* 和 *STR* 基因植物细胞中吲哚生物碱合成水平变化的分析表明，pH 等体内细胞生理状态以及控制转运的基因对目标产物合成和积累也有重要影响。

Memelink 等对 *C. roseus* 植物体内吲哚生物碱生物合成途径研究发现，转录因子 OR-CA2 和 ORCA3 受茉莉酮酸酯调控，控制着该次生代谢途径中的几个步骤，但不影响催化

番木鳖甙生物合成第一步的酶——香叶醇单加氧酶 (geraniol 10-hydroxylase, G10H), 尽管 G10H 也受茉莉酮酸酯调控。因而, 在仅超表达 ORCA3 的转基因细胞系中生物碱含量并没有增加。如果在细胞培养介质中加入一定量番木鳖甙的前体马钱苷 (loganin) 后, 转 ORCA3 基因的细胞系生物碱合成比非转基因对照细胞系高 3 倍。同时研究发现, ORCA2 和 ORCA3 也可调控其他代谢产物的合成, 表明一些转录因子可用于调控代谢途径中一系列酶的活性。

黄连素、吗啡和可待因等异喹啉生物碱是重要的医用药物, 对合成这类生物碱的次生代谢途径进行基因工程改良的经济价值很高。对黄连素生物合成途径的研究发现, 参与从酪氨酸到黄连素合成过程的 13 种不同的酶中, S-金黄紫堇碱 9-O-转甲基酶 (S-scoulerine 9-O-methyltransferase, SMT) 是关键酶, 它控制黄连 (*Coptis japonica*) 细胞中的黄连碱 (coptisine) 与黄连素 (berberine) 和非洲防己碱 (columbamine) 的比率。通过对某一条代谢途径分支处的酶基因进行遗传操作, 可改变次生代谢分支处的代谢物流向。Sato 等研究发现, 在黄连细胞中超表达 SMT 基因导致该酶活力增加 20%, 而且转基因细胞中黄连素和非洲防己碱从占原野生型细胞总生物碱的 79% 增加到 91%。Frick 等通过对具有不同底物特异性的酶进行基因修饰, 从而使植物能够合成新的生物碱。他们对块根唐松草 (*Thalictrum tuberosum*) O-转甲基酶亚基进行重组使其形成异型二聚体酶, 底物特异性与同型二聚体酶的底物特异性不同, 这一异型二聚体酶的表达导致细胞新的生物碱的合成。东莨菪碱和颠茄碱等莨菪烷生物碱是一类重要的药物, 这些次生物质主要在茄科天仙子属 (*Hyoscyamus*)、颠茄属 (*Atropa*)、*Dudaisia* 属和莨菪属 (*Scopolia*) 等植物中合成。天仙子属的埃及莨菪 (*Hyoscyamus muticus*) 是一种草本植物, 可制取解痉药和镇静药。Jouhikainen 等将编码 H6Hd 的基因在埃及莨菪毛状根细胞中超表达。与主要生产天仙子胺生物碱的对照植物相比, 该转基因植物细胞系中东莨菪碱含量高 100 倍, 而天仙子胺含量在转基因植物根部和非转基因对照植株根部则基本相近。

在某个次生代谢途径中, 某特定步骤可能是一个限速步骤。但是, 如果超表达控制这一限速步骤的基因时, 将会发现其他一些新的限速步骤。腐胺 N-转甲基酶 (putrescine N-methyltransferase, PMT) 是莨菪生物碱和吡咯烷生物碱生物合成途径的限速酶, 它催化此类生物碱合成途径的第一步反应, 即甲基腐胺的形成。将烟草 PMT 基因分别在颠茄 (*Atropabelladonna*) 和一种野生烟草 (*Nicotiana sylvestris*) 植株中超表达, 结果显示在一些转 PMT 基因的 *N. sylvestris* 植株中, PMT 活性增加 4~8 倍, 烟碱水平高 40%。在转 PMT 基因的颠茄 (*A. belladonna*) 植物中, PMT 活力增加了 3.3 倍, 甲基腐胺水平也有所提高, 但是莨菪生物碱含量没有增加。

**3. 萜类化合物生物合成途径的基因修饰** 萜类化合物是迄今所发现的植物次生代谢产物中最大的一个家族, 包括单萜、倍半萜、双萜和类胡萝卜素等具有重要营养价值和药用及工业用的次生物质。Broun 和 Sommerville 研究发现, 高等植物体内萜类化合物的合成可来源于胞质途径, 即依赖甲羟戊酸 (mevalonate-dependent) 的途径, 或者来源于质体途径 (又称 DXPS 途径)。植物通过胞质途径合成倍半萜和三萜, 其他大多数萜类由 DXPS 途径合成。参与 DXPS 途径中的几个基因也已被相继克隆。

薄荷属植物精油的主要成分是单萜化合物。研究单萜化合物的代谢途径时, 常用的模



式植物是胡椒薄荷 (*Mentha piperita*)。Mahmoud 和 Croteau 将 CaMV 35S 启动子控制的 *DXR* 基因导入胡椒薄荷基因组，以期提高精油的含量。*DXR* 基因超表达的转基因植株的 *DXR* 活性比未转基因对照植株高 2~4 倍，精油含量则高 50%，油分组成等其他性状无差异。转基因沉默植株，生长缓慢，单萜产物减少。薄荷呋喃是合成途径单萜代谢网中竞争性分支途径之一。抑制薄荷呋喃的合成，可使更多的代谢物流通向薄荷油中薄荷醇生物合成。Mahmoud 等应用薄荷呋喃合酶 (menthofuran synthase, MFS) 的反义基因进行转化获得的一些转基因植物，薄荷呋喃含量比野生型植株低 35%~55%，而薄荷醇含量则较高。这一研究工作可借鉴用于提高其他植物有用萜类化合物的积累。通过萜类代谢基因工程改良植物的香味也有成功的实例。芳樟醇 (linalool) 是影响番茄果实及其加工食品香味品质的一种主要挥发性萜类物质。它也存在番石榴、李子、甜橘和菠萝等果实中。Lewinsohn 等将来自 *Clarkia breweri* 的 S-芳樟醇合酶基因 (*lis*) 在番茄果实中特异超表达，转基因番茄果实中 S-芳樟醇比对照高 123~833 倍，其他类萜含量没有观察到明显变化。

在提高植物抗性和增加一些药物生物合成方面，萜类代谢基因工程也取得了成功。烟草毛状腺体中一种细胞色素 P450 单加氧酶参与萜类化合物合成的下游步骤，Wang 等采用共抑制和反义策略敲除烟草毛状腺体中该酶基因的表达，结果导致了毛状腺体中萜类化合物组成的改变，转基因烟草对蚜虫的抗性也明显提高。Chen 等应用农杆菌介导的转化技术将来自棉花的法呢基二磷酸合酶 *FDS* 基因导入黄花蒿 (*Artemisia annua*) 中，在该基因超表达的转基因植株体内，通向倍半萜生物合成途径的代谢流明显增加，导致青蒿素比野生株系高 2~3 倍。类胡萝卜素是构成植物花、果实和食物颜色的重要色素化合物，具有抗氧化作用。对类胡萝卜素合成代谢途径的基因工程改良也取得了一些实质性的突破。例如，Ye 等将编码八氢番茄红素合成酶、去饱和酶和  $\beta$ -环化酶的 3 个基因 (*PSY*, *CTR1*, *LCY*) 导入水稻，使水稻获得了合成类胡萝卜素的能力，转基因水稻胚乳中的  $\beta$ -胡萝卜素 (维生素 A 原) 含量高达 2 mg/kgDW，成为富含 VA 的“金米”稻。转基因实验表明，对类胡萝卜素代谢途径的一些重要基因进行遗传修饰，可以增加目标化合物的含量，提高不同植物食品的营养价值。

**4. 安息香酸衍生物** 紫草 (*Lithospermum erythrorhizon*) 植物所合成的一种次生代谢物——紫草素 (又称萘醌紫草素, naphthoquinone shikonin), 具有抗菌、消炎、抗肿瘤和助伤口愈合的功效。4-羟基安息香酸 (4-hydroxybenzoic acid, 4HB) 是紫草素生物合成的重要前体物质。在紫草植株中, 通过苯丙氨酸途径生成 4HB。然而, 细菌能在分支酸丙酮酸裂解酶 (CPL, 由 *ubiC* 基因编码) 的作用下, 将分支酸直接转化成 4HB。增加代谢途径一个中间产物的合成量可能会导致意外产物的生成。例如 *ubiC* 基因在烟草植株中超表达导致了一种新的合成 4HB 途径的产生。Sommer 等将 *ubiC* 基因导入紫草, 在转基因紫草的毛状根中也获得了由分支酸产生 4HB 的新的代谢途径。该途径合成的 4HB 占根部积累的 4HB 总量的 20%。

水杨酸 (salicylic acid, SA) 是植物中重要的信号分子, 参与植物受病原体感染后所产生的系统获得性抗性反应。植物在病原体感染后在异分支酸合成酶 (isochorismate synthase, ICS) 的催化下, 将分支酸 (chorismate) 转化为异分支酸 (isochorismate) 产生



SA。在细菌细胞中，ICS 催化分支酸转化为异分支酸，然后在异分支酸丙酮酸盐裂解酶 (isochorismate pyruvate lyase, IPL) 作用下，将丙酮酸基团裂解，形成 SA。与野生型植株相比，Verberne 等超表达编码细菌 ICS 和 IPL 酶基因的转基因烟草植株 SA 含量高出了 1 000 倍，相关防御基因持续组成性表达，抵抗病毒和真菌的能力明显提高。证明在转基因烟草中，IPL 的活性是 SA 合成的限制因素。将这两种细菌酶的融合基因导入拟南芥细胞质中表达此类融合蛋白的转基因植物的 SA 水平增加了 2~3 倍；在质体中表达该融合蛋白的转基因植物，SA 水平则提高了 20 倍。在代谢基因工程要使目标代谢途径中两个或者更多个超表达的酶活力保持平衡，才能避免对其他代谢途径的前体物质造成负效应。同时，超表达 *ics* 和 *ipl* 这两个基因的转基因植株，由于 *ics* 催化产生足够多异分支酸，能满足维生素 K 和 SA 的生物合成的需要，因此植株生长不受影响。

## 参 考 文 献

- [1] 戈进杰. 生物降解高分子材料及其应用. 北京: 化学工业出版社, 2002
- [2] 何聪芬, 冯婷, 赵华等. 代谢转基因植物的研究现状与展望. 中国生物工程杂志, 2003 (11): 19~23
- [3] 何水林, 郑金贵, 王晓峰等. 植物次生代谢: 功能、调控及其基因工程. 应用与环境生物学报, 2002 (5): 558~563
- [4] 孙环星, 王玉华, 吴忠义等. 用转基因植物合成生物可降解材料聚羟基脂肪酸酯. 生物技术通报, 2004 (2): 5~9
- [5] 吴桂芳, 沈忠耀. 转基因植物生产生物可降解塑料的研究进展. 科技进展, 2002 (2): 5~10
- [6] 唐中华, 于景华, 杨逢建等. 植物生物碱代谢生物学研究进展. 植物学通报, 2003 (6): 696~702
- [7] 汤洪敏. 聚羟基脂肪酸酯 (PHAs) 的应用前景. 贵州大学学报 (自然科学版), 2002 (3): 268~273
- [8] 严群, 李寅, 陈坚等. 微生物合成中链聚羟基烷酸酯研究进展. 生物工程学报, 2001, (5): 485~490
- [9] 杨致荣, 毛雪, 李润植. 植物次生代谢基因工程研究进展. 植物生理与分子生物学报, 2005 (1): 11~18
- [10] 杨涛, 曾英. 植物萜类合酶研究进展. 云南植物研究, 2005 (1): 1~10
- [11] 于慧敏, 沈忠耀. 可生物降解塑料- $\beta$ -羟基丁酸酯 (PHB) 的研究与发展. 生物化工, 2001 (8): 11~14
- [12] 赵淑娟, 刘涤, 胡之璧. 植物次生代谢基因工程. 中国生物工程杂志, 2003 (7): 52~56
- [13] 赵炜, 王佰义, 张晓华. 生物合成聚  $\beta$  羟基丁酸酯 (PHB) 的研究现状与应用前景. 甘肃科技, 2006 (3): 129~130
- [14] 周桂飞, 徐茂军. 植物次生代谢物质生物合成的研究. 生物学通报, 2005 (12): 12~15
- [15] Broun P. Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants. Curr Opin Plant Biol, 2004 (7): 202~209
- [16] Capell T, Christou P. Progress in plant metabolic engineering. Curr Opin Biotechnol, 2004 (15): 148~154
- [17] Davies KM. Plant colour and fragrance. In: Verpoorte R, Alfermann AW(eds). Metabolic Engineer-

- ing of Plant Secondary Metabolism. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002: 127~164
- [18] Dixon R. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 2001 (14): 843~847
- [19] Morgan J A, Rhodes D. Mathematical modelling of plant metabolic pathways , *Metabolic Engineering*, 2002 (4): 80~89
- [20] Teresa Capell and Paul Chtistou. Progress in plant metablic engineering, *Current Opinion in Biotechnology*, 2004 (15): 148~154
- [21] Verpoorte R. Secondary metabolism. In: *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Verpoorte R, Alfermann A W. Kluwer Academic Publishers, 2000: 1~85

# 第八章 植物生物反应器下游技术

## 第一节 植物生物反应器下游技术简介

转基因植物中有效成分的分离、提取、精制是植物生物反应器工程的一个重要组成部分，指的是从植物细胞中分离、纯化生物产品的过程，或称后处理技术。它是生物技术转化为生产力时所不可缺少的重要环节。为表明其在植物生物反应器工程中的地位和作用，常称它为植物生物技术下游技术（downstream processing）。

### 一、植物生物反应器工程下游技术的特点

植物生物技术产品的下游技术首先要进行产品的分离纯化。唯有经过分离和纯化等下游加工过程，才能制得符合使用要求的产品。因此，产品的分离纯化是植物生物技术工业化的必需手段，具有不可缺少或取代的作用。下游加工过程的进行是十分艰难的，且代价很大。这是由特殊的植物材料和高度的纯产物之间的巨大变化和差异造成的。其回收率不会高，分离、纯化的方法也十分复杂和昂贵。从现有的资料分析可知，在大多数生物产品的开发研究中，下游加工过程的研究费用占全部研究费用的 50% 以上，在产品的成本构成中，分离与纯化部分占总成本的 40%~80%，精细、药用产品的比例更高，生产过程中下游加工过程的人力、物力占全部过程的 70%~90%。显然开发新的分离和纯化工艺是提高经济效益或减少投资的重要途径。

### 二、生物技术下游加工过程的一般步骤

由于人们所需的生物技术产品不同（如酶或代谢产物），用途各异，对产品的质量（纯度）要求也是多方面的，所以，分离与纯化步骤可有不同的组合，提取和精制的方法也是多种多样的。但按生产过程的顺序大多数生物技术下游加工过程常分为 3 个类似步骤：

**1. 植物细胞的破碎及碎片的分离**（或称不溶物的除去） 在这一步骤中，过滤和离心是基本的单元操作。为了加速两相分离，采用了凝聚和絮凝等技术。这一步对产物浓缩和产物质量的改善作用很小。

**2. 初步纯化** 在这一步骤中，主要是除去与目标产物性质有很大差异的物质，一般会发生显著的浓缩和产物质量的增加。典型的分离方法有吸附、萃取等。

**3. 高度纯化及精制** 在这一步骤中，出于对产物有高度的选择性，主要是除去有类似化学功能和物理性质的不纯物，得到最终的成品。典型的方法有层析、电泳、结晶等。

其中各阶段都有若干单元操作可以选用，应根据具体情况而定。

## 第二节 转基因植物中有效成分的提取方法

从复杂的植物成分中提取出有活性的成分，不同的植物材料，所需的活性成分不同，提取的方法也不同。如果提取方法设计合理，操作正确，不但能将所需的有效成分提出，而且有利下一步的分离纯化。植物有效成分的提取方法，主要有溶剂提取法，其次还有水蒸气蒸馏法、升华法、压榨法等。

### 一、溶剂提取法

#### (一) 基本原理

溶剂提取法是根据植物中各种成分在不同溶剂中的溶解度不同，选用对有效成分溶解度大，不需要溶出成分溶解度小的溶剂，将有效成分从植物组织内溶解出来的方法。

具体操作步骤是根据所要提取的性质的性质，加入合适的溶剂。当溶剂加到植物材料(需适当粉碎)中时，溶剂由于扩散、渗透作用，逐渐通过细胞壁透入到细胞内，溶解了可溶性物质，而造成细胞内外的浓度差，于是细胞内的浓溶液不断向外扩散，溶剂又不断进入植物组织细胞中，如此多次往返，直至细胞内外溶液浓度达到动态平衡时，将此饱和溶液滤出，继续多次加入新溶剂，就可以把所需要的成分近于完全溶出或大部溶出，合并浓缩液，即为含有所需有效成分的混合液。

一般来讲，“相似物容易溶解在相似物中”，“相似”就溶解度关系而论，是指在分子的极性上。极性液体互相混合并溶解盐类和极性固体，而非极性化合物溶剂是低极性或没有极性的液体。在有机化合物分子结构中，如果亲水性基团多，则其极性大；如果亲水性基团少，则其极性小。植物化学成分不同，分子极性就不同。要做到最大限度地有效成分从植物中提取出来，需遵循“相似相溶”的原理。植物中的亲水性成分有蛋白质、单糖及低聚糖、氨基酸、水溶性有机酸、鞣质、苷及水溶性色素、生物碱盐等。植物中的亲脂性成分有游离生物碱、非水溶性有机酸、树脂、挥发油、脂溶性色素、油脂和蜡。

溶剂的性质同样也与其分子结构有关。例如甲醇、乙醇的分子比较小，有羟基存在，与水的结构很相似，能够和水任意混合，是亲水性比较强的溶剂；丁醇和戊醇分子中虽都有羟基，保持和水有相似处，但分子逐渐地加大，碳链增长，与水的性质也就逐渐疏远，虽能与水彼此部分互溶，但达到饱和状态之后，丁醇或戊醇都能与水分层。氯仿、苯和石油醚是烃类或氯烃衍生物，分子中没有氧，属于亲脂性强的溶剂。

实验室常用的有机溶剂的极性强弱顺序可以表示如下：

石油醚<苯<氯仿<乙醚<乙酸乙酯<丙酮<乙醇<甲醇

#### (二) 溶剂的选择

运用溶剂提取法提取植物有效成分的关键是选择适当的溶剂。植物有效成分在溶剂中

的溶解度直接与所采用的溶剂性质相关。溶剂选择适当, 就可以比较顺利地将需要的成分提取出来。常见的提取溶剂可分为 3 类: 水、亲水性有机溶剂及亲脂性有机溶剂。植物材料提取的常用溶剂性质见表 8-1。

表 8-1 植物材料提取常用溶剂的性质

| 溶剂       | 极性指数 | 折射率<br>(20 °C) | 沸点<br>(°C) | 黏性<br>(cpoise) | 水中溶解度<br>(% w/w) |
|----------|------|----------------|------------|----------------|------------------|
| 水        | 9.0  | 1.333          | 100        | 1.00           | 100              |
| 丙酮       | 5.1  | 1.359          | 56         | 0.32           | 100              |
| 苯        | 2.7  | 1.501          | 80         | 0.65           | 0.18             |
| 乙酸丁酯     | 4.0  | 1.394          | 125        | 0.73           | 0.43             |
| 正丁醇      | 3.9  | 1.399          | 118        | 2.98           | 7.81             |
| 氯仿       | 4.1  | 1.446          | 61         | 0.57           | 0.815            |
| 1,2-二氯乙烷 | 3.5  | 1.444          | 84         | 0.79           | 0.81             |
| 二甲基酰胺    | 6.4  | 1.431          | 155        | 0.92           | 100              |
| 二甲基亚砷    | 7.2  | 1.478          | 189        | 2.00           | 100              |
| 二氧杂环乙烷   | 4.8  | 1.422          | 101        | 1.54           | 100              |
| 乙醇       | 5.2  | 1.360          | 78         | 1.20           | 100              |
| 乙酸乙酯     | 4.4  | 1.372          | 77         | 0.45           | 8.7              |
| 二乙醚      | 2.8  | 1.353          | 35         | 0.32           | 6.89             |
| 正己烷      | 0.0  | 1.375          | 69         | 0.33           | 0.001            |
| 甲醇       | 5.1  | 1.329          | 65         | 0.60           | 100              |
| 甲基丁基(甲)酮 | 4.7  | 1.379          | 80         | 0.45           | 24               |
| 戊烷       | 0.0  | 1.358          | 36         | 0.23           | 0.004            |
| 异丙醇      | 3.9  | 1.377          | 82         | 2.30           | 100              |
| 甲苯       | 2.4  | 1.496          | 111        | 0.59           | 0.51             |
| 三氯乙烯     | 1.0  | 1.477          | 87         | 0.57           | 0.11             |
| 二甲苯      | 2.5  | 1.500          | 139        | 0.61           | 0.018            |

**1. 水** 水是一种强的极性溶剂。植物材料中亲水性的成分, 如无机盐、多糖、鞣质、氨基酸、蛋白质、有机酸盐、生物碱等都能被水溶出。但是, 根据其分子大小及极性的不同, 亲水性不同。例如分子比较小的葡萄糖、蔗糖等多羟基化合物具有强亲水性, 极易溶于水; 羟基数目多且分子大的淀粉难溶解于水; 属于酸碱两性化合物的蛋白质和氨基酸具有一定程度的极性, 所以能溶于水, 不溶或难溶于有机溶剂; 鞣质是多羟基的化合物, 为亲水性的物质; 多数游离的生物碱是亲脂性化合物, 不溶或难溶于水。

**2. 亲水性的有机溶剂** 指与水能混溶的有机溶剂, 如乙醇、甲醇、丙酮等。一般以乙醇最常用。乙醇为有机溶剂, 虽易燃, 但毒性小, 价格便宜, 来源方便, 有一定设备即可回收反复使用, 而且乙醇的提取液不易发霉变质。用乙醇提取时, 乙醇的用量、提取时



间皆比用水提取节省,溶解出来的水溶性杂质也少。乙醇的溶解性能比较好,对植物细胞的穿透能力较强。植物中的亲水性的成分除蛋白质、黏液质、果胶、淀粉和部分多糖、油脂和蜡等外,其余成分在乙醇中皆有一定程度的溶解度;一些难溶于水的亲脂性成分,在乙醇中的溶解度也较大,而且乙醇的浓度还可以根据被提取物质的性质而变化,采用不同浓度的乙醇进行提取。因此,乙醇是实验室和工业生产中应用范围最广的一种溶剂,是历来提取最常用的一种溶剂。

**3. 亲脂性的有机溶剂** 与水不能互溶的有机溶剂,如石油醚、苯、氯仿、乙醚、乙酸乙酯、二氯乙烷等。这些溶剂的选择性能强,易提取亲脂性的物质,如油脂、挥发油、蜡、脂溶性色素等强亲脂性的成分。这类溶剂容易挥发,多易燃(氯仿除外),一般有毒,价格较贵,设备要求也比较高,操作需要有通风设备。另外,这类试剂透入植物组织的能力较弱,往往需要长时间反复提取才能提取完全。植物材料中水分的存在,会降低这类溶剂的穿透力,很难浸出其有效成分,影响提取率,所以,对原料的干燥度要求较高。鉴于以上原因,在大量提取植物材料时或工业生产时,直接应用这类溶剂有一定的局限性。

为了提高溶剂的浸出效果或提高制品的稳定性,有时亦可应用一些浸出辅助剂。如适当用酸,可以促进生物碱的浸出;适当用碱,可以促进某些有机酸的浸出。溶剂具有适宜的pH也有助于增加制剂中某些成分的稳定性。此外,应用适宜的表面活性剂常能提高浸出溶剂的浸出效能。

### (三) 具体的溶剂提取方法

用溶剂提取植物材料有效成分,常用浸渍法、渗滤法、煎煮法、回流提取法、连续回流提取法等。

**1. 浸渍法** 浸渍法适用于所提取的有效成分遇热易挥发和易破坏的植物材料的提取。按溶剂的温度分为热浸、温浸和冷浸等。首先将植物材料粉末或碎片装入适当的容器中,然后加入适宜的溶剂(如水、乙醇或丙酮等),浸渍植物材料以溶出其中有效成分的方法。本法比较简单、易行,但提出率较低,最好采用2次或3次浸渍,提高提取率。

**2. 渗滤法** 将植物材料粗粉置于渗滤器内浸润24~48h使其膨胀,然后不断把溶剂连续地从渗滤器的上部加入,从渗滤器下部流出、收集浸出液的一种浸出方法。当溶剂渗透进植物细胞内溶出成分后,由于其比重加大而向下移动时,上层新加入的溶液便置换其位置,造成良好的浓度差,使扩散能较好地进行,提取的过程是一种动态过程,故浸出的效果优于浸渍法。根据操作方法的不同,可将渗滤法分为单渗滤法、重渗滤法、加压渗滤法、逆流渗滤法等。其中单渗滤法所用溶剂较多;重渗滤法中一份溶剂能多次利用,溶剂用量较单渗滤法减少,同时渗滤液中有效成分浓度高,不必再加热浓缩,可避免有效成分受热分解或挥发损失,成品质量好。但所占容器较大,操作麻烦,较为费时;加压渗滤可使溶剂及浸出液较快通过粉柱,使渗滤顺利进行,提高浸出效果,提取液浓度大,溶剂耗量小;逆流渗滤法是植物材料与溶剂在浸出容器中沿相反方向运动,连续而充分地进行接触提取的一种方法,属于动态逆流提取。

**3. 煎煮法** 煎煮法是将植物材料或粗粉置煎煮器中,加水浸没药材,浸泡适宜时间,加热至沸,并保持沸腾状态至一定时间的提取方法。此法简便易行,一般比浸渍法提取效

果好。但由于煎煮法多采用水为溶剂，温度较高，仅适用于有效成分溶于水，且对湿、热较稳定的植物材料。一般植物材料宜煎2次。加热时最好时常搅拌，以免局部植物材料受热太高，容易焦糊。如果在夹层锅、多能提取罐等提取设备上增设搅拌器、泵等，可实现强制循环，提高提取效率。

**4. 回流提取法** 应用有机溶剂加热提取植物材料有效成分时，须采用回流加热装置，以免溶剂挥发损失，同时也减少有毒溶剂对实验操作者的毒害。小量操作时，可在圆底烧瓶上连接回流冷凝器，加热前先开冷凝水。装植物材料的量约为圆底烧瓶容量的 $1/3 \sim 1/2$ 为最佳，溶剂浸过植物材料表面 $1 \sim 2$  cm，多采用水浴加热。第一次提取以保持沸腾回流约1 h为宜，放冷后过滤，再在植物材料中添加新的溶剂，做第二次、第三次加热回流提取，分别约0.5 h，或通过薄层检测有效成分基本提尽为止。此法提取效率较冷浸法高。但由于操作的局限性，大量生产中多采用连续提取法。

**5. 连续提取法** 应用挥发性有机溶剂提取植物材料有效成分，不论小型实验或大型生产，均以连续提取法为好。这种提取法，需用溶剂量较少，提取成分也较完全，但一般需数小时（常 $6 \sim 8$  h）才能完成，所以，遇热不稳定易变化的植物材料成分不宜采用此法。实验室通常用脂肪提取器或称索氏提取器来完成。

超声提取技术是以超声波辐射压强产生的骚动效应、空化效应引起机械搅拌、加速扩散溶解的一种新型提取方法，能够加速所提取成分的扩散，并与溶剂充分混合，增大物质分子运动频率和速度，增加溶剂穿透力，提高植物有效成分溶出速度和溶出次数，缩短提取时间，大大提高有效成分的提取效率。植物有效成分大多为细胞内产物，提取时往往需要将细胞破碎，而现有的机械或化学破碎方法有时难于取得理想的破碎效果，超声波在植物有效成分的提取中已显示出了明显的优势。

**6. 微波辅助提取** 被提取植物有效成分在微波电磁场中快速转向及定向排列，从而产生撕裂和相互摩擦引起发热，可以保证能量的快速传递和充分利用，易溶出和释放。是新发展起来的利用微波能来提高提取效率的新技术。

## 二、水蒸气蒸馏法

### （一）水蒸气蒸馏原理

水蒸气蒸馏是分离和纯化与水不相混溶的挥发性有机物常用的方法（图8-1）。只适用于难溶或不溶于水、与水不会发生反应、能随水蒸气蒸馏而不被破坏的植物材料成分的提取。这类成分的沸点多在 $100$  °C以上，当温度接近 $100$  °C时存在一定的蒸气压，与水在一起加热时，当其蒸气压和水的蒸气压总和为一个大气压时，液体就开始沸腾，水蒸气将挥发性物质一并带出。

它的适用范围：①从大量树脂状杂质或不挥发性杂质中分离有机物；②除去不挥发性的有机杂质；③从固体多的反应混合物中分离被吸附的液体产物；④水蒸气蒸馏常用于蒸馏那些沸点很高，且在接近或达到沸点温度时易分解、变色的挥发性液体或固体有机物，除去不挥发性的杂质。但是，对那些与水共沸腾时会发生化学反应的或在 $100$  °C左右时蒸

气压小于 1.3 kPa 的物质，这一方法不适用。

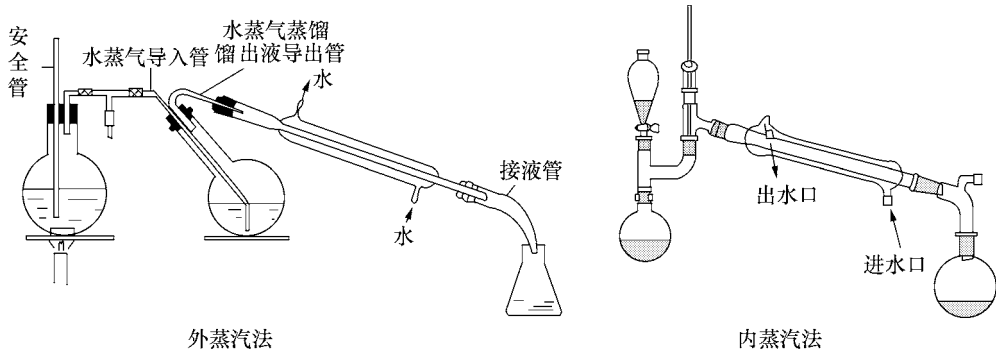


图 8-1 水蒸气蒸馏装置

在具体实验室操作时，在水蒸气发生瓶中，加入约占容器 3/4 的水，待检查整个装置不漏气后，旋开 T 形管的螺旋夹，加热至沸。当有大量水蒸气产生并从 T 形管的支管冲出时，立即旋紧螺旋夹，水蒸气便进入蒸馏部分，开始蒸馏。蒸馏瓶中的植物材料和水总体积为蒸馏瓶容量的 1/2 为宜，不宜超过 2/3。在蒸馏过程中，通过水蒸气发生器安全管中水面的高低，可以判断水蒸气蒸馏系统是否畅通，若水平面上升很高，则说明某一部分被阻塞了，这时应立即旋开螺旋夹，然后移去热源，拆下装置进行检查（通常是由于水蒸气导入管被树脂状物质或焦油状物堵塞）和处理。如由于水蒸气的冷凝而使蒸馏瓶内液体量增加，可适当加热蒸馏瓶。但要控制蒸馏速度，以 2~3 滴为宜，以免发生意外。当馏出液无明显油珠，澄清透明时，表示蒸馏已基本完成，便可停止蒸馏。其顺序是先旋开螺旋夹，然后移去热源，否则可能发生倒吸现象。

### 三、微波萃取技术

微波萃取又称微波辅助提取（microwave-assisted extraction, MAE），是利用微波能强化萃取的一种很有潜力的新型萃取技术。1986 年，Ganzler 首先报道了利用微波萃取技术从土壤、种子、食品、饲料中分离各种类型化合物的样品制备新方法，并与传统的水蒸气蒸馏、索氏抽提等技术比较，微波萃取技术可以缩短实验和生产时间、降低能耗、减少溶剂用量以及废物的产生，同时可以提高收率和提取物的纯度，降低实验操作费用和生产成本。

#### （一）微波加热的原理

微波加热的原理有两个方面：一是通过“介电损耗”（或称为“介电加热”）。具有永久偶极的分子在 2 450 MHz 的电磁场中所能产生的共振频率高达  $4.9 \times 10^9$  次/s，使分子超高速旋转，平均动能迅速增加，从而导致温度升高。二是通过离子传导。离子化的物质在超高频电磁场中以超高速运动，因摩擦而产生热效应。热效应的强弱取决于离子的大小、电荷的多少、传导性能及溶剂的相互作用等。一般来讲，具有较大介电常数的化合物

如水、乙醇、乙腈等，在微波辐射作用下会迅速被加热，而极性小的化合物（如芳香族化合物和脂肪烃类）、无净偶极的化合物（如二氧化碳、二氧六环和四氯化碳等）以及高度结晶的物质，对微波辐射能量的吸收性能很差，不易被加热微波辐射导致细胞内的极性物质，尤其是水分子吸收微波能量而产生大量的热量，使细胞内温度迅速上升，液态水气化产生的压力，将细胞膜和细胞壁冲破，形成微小的孔洞。再进一步加热，细胞内部和细胞壁水分减少，细胞收缩，表面出现裂纹。孔洞和裂纹的存在使细胞外溶剂易进入细胞内，溶解并释放细胞内的物质。微波具有很强的穿透力，可以在反应物内外部分同时均匀、迅速地加热，故提取效率较高。因此，利用微波提取植物有效成分具有简便、快速、加热均匀的优点。但不适用于热敏性成分的提取。

## （二）微波萃取的原理

微波萃取的原理就是不同物质的介电常数不同，对微波的吸收程度也不同，由此产生的热量和传递给周围环境的热量也不同。在微波场中，利用不同结构的物质吸收微波能力的差异，使基体物质中的某些区域或萃取体系中的某些组分被选择性加热，从而使被萃取物质从基体或体系中分离，进入到介电常数较小、微波吸收能力相对差的萃取剂中。

## 四、反胶束萃取技术

在生物工程中，生物成品的分离和提纯常用的方法有沉淀、盐析、过滤及各种层析技术。此类方法具有处理量小、成本高和间歇操作等缺点，而且由于分离中一般要保持产品的生物活性（如蛋白质在 40~50℃ 开始变性，遇有机溶剂也易变性），使传统液液萃取难以应用，于是学术界在 20 世纪 70 年代末提出反胶束萃取这一新技术。

### （一）反胶束萃取的优点

反胶束（reversed micelle），也称反胶团，是表面活性剂在非极性有机溶剂中超过临界胶团浓度（CMC）时自发形成的热力学稳定、光学透明的球状或圆柱状聚集体。表面活性剂的疏水的非极性尾部指向有机溶剂，亲水的极性头部指向聚集体内部，形成一个纳米级大小的极性腔（polar core）。此极性腔容纳一定量的水，其内部接近细胞内环境，不仅能溶解亲水性分子如氨基酸、多肽和蛋白质等，而且能保持它们的活性。近年来，此项技术又有了诸多新进展，如设计新表面活性剂和添加亲和性配基、反胶团乳化液膜萃取、用反离子表面活性剂反萃取胶团中酶蛋白及设计新的萃取设备等，大大促进其工业应用的发展。

反胶束萃取技术之所以日益受到了广泛的重视，是因其具有甚多突出优点：①有很高的萃取率和反萃取率并具有选择性；②分离、浓缩可以同时进行，过程简单；③条件温和，不会引起酶蛋白的变性，并能解决酶蛋白（如细胞内酶）在非细胞环境中迅速失活的问题；④由于构成反胶束的表面活性剂往往具有细胞破壁功效，因而可直接从完整细胞中提取有活性的酶蛋白；⑤反胶束萃取技术的成本低，溶剂和表面活性剂可反复使用。

## (二) 反胶束萃取的原理和制备

表面活性剂溶于水中，当其浓度超过临界胶速浓度（CMC）时，便形成聚集体，称为正常胶束；表面活性剂溶于有机溶剂，当浓度大于临界胶团浓度时，会在有机相中形成聚集体，称为反胶束。反胶束中极性头朝内，非极性尾朝外排列，形成亲水内核，称为“水池”。如图 8-2 所示，在萃取时，待萃取的原料液以水相形式与反胶束体系接触，调节各种参数，使其中要提取的物质以最大限度转入反胶束体系（前萃取），后将含该物质的前萃液与另外一个水相接触。再次调节 pH、离子强度等参数，分出要提取的物质。反胶束体系的性质常用参数  $W_0$ （或 R）、 $\theta$  与 N 来表示，其中  $W_0$  为水与表面活性剂的摩尔比， $\theta$  是增溶水相对总体积的浓度，N 是组成每个反胶束微粒的表面活性剂分子个数（聚焦数）。当  $W_0$  一定时， $\theta$  与 N 决定了胶束微粒的相对浓度，其中最重要的参数为  $W_0$ 。反胶束萃取制备方法目前常用转移法、注入法、溶解法等。

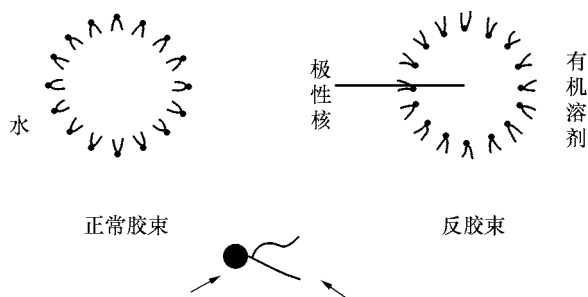


图 8-2 正常胶束与反胶束示意图

## 第三节 植物有效成分的分离纯化方法

采用上述方法提取所得的植物材料提取物仍然是混合物，须进一步除去杂质，进行分离、纯化、精制，才能得到所需要有效成分或有效部位。具体的方法要根据各种成分的性质来选择。成分不同，所采用的分离纯化的方法也有所不同。实验室和工业生产中通常采用溶剂分离法、两相溶剂萃取法、盐析法、透析法、结晶法等。

### 一、溶剂分离法

#### (一) 利用极性由小到大采用不同的溶剂依次抽提分离

植物材料的化学成分，在不同极性溶剂中的溶解度不同，根据溶解度的差异进行分离纯化是最常用的方法。一般是将总提取物，选用 3~4 种不同极性的溶剂，由低极性到极性分步进行提取分离。

具体操作是将上一节中提取得到总提取物，拌入适量吸附剂，然后低温或自然干燥，粉碎后，置布氏漏斗中，选用 3~4 种不同极性的溶剂，由低极性到极性分步依次进行抽提，使总提取物中各组分，依其在不同极性溶剂中溶解度的差异而得到分段分离。常用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇依次提取。有时根据所要成分的性质也用苯、乙醚等溶剂。



广而言之，自植物材料提取溶液中加入另一种溶剂，析出其中某种或某些成分，或析出其杂质，也是一种溶剂分离的方法。植物材料的水提液中常含有树胶、黏液质、蛋白质、糊化淀粉等，可以加入一定量的乙醇，使这些不溶于乙醇的成分自溶液中沉淀析出，而达到与其他成分分离的目的。目前，提取多糖及多肽类化合物，多采用水溶解、浓缩、加乙醇或丙酮析出的办法。

## (二) 利用酸碱度进行抽提分离

利用某些成分能在酸或碱中溶解，当加碱或加酸调整溶液的 pH 后，所需成分又变回不溶物而析出，以达到分离的目的。具体操作是将上一节的总提取物用酸水（或碱水）处理成盐，然后再经碱水（或酸水）处理，恢复原来的结构，使欲分离成分得以沉淀析出，最后可以离心或利用与水不相混溶的有机溶剂把这些化合物萃取分离出。例如内酯类化合物不溶于水，但遇碱开环生成羧酸盐溶于水，再加酸酸化，又重新形成内酯环从溶液中析出，从而与其他杂质分离。生物碱一般不溶于水，遇酸生成生物碱盐而溶于水，再加碱碱化，又重新生成游离生物碱。有机酸、酚类成分则可以先用碱液提取，然后加酸酸化使之沉淀析出。这些化合物可以利用与水不相混溶的有机溶剂进行萃取分离。一般植物总提取物用酸水、碱水先后处理，可以分为 3 部分：溶于酸水的为碱性成分（如生物碱），溶于碱水的为酸性成分（如有机酸），酸、碱均不溶的为中性成分（如甾醇）。还可利用不同酸、碱度进一步分离，如酸性化合物可以分为强酸性、弱酸性和酷热酚性 3 种。它们分别溶于碳酸氢钠、碳酸钠和氢氧化钠，借此可进行分离。有些总生物碱，如长春花生物碱、石蒜生物碱，可利用不同 pH 进行分离。但有些特殊情况，如酚性生物碱紫堇定碱（corydine）在氢氧化钠溶液中仍能为乙醚抽出，蝙蝠葛碱（dauricins）在乙醚溶液中能为氢氧化钠溶液抽出，而溶于氯仿溶液中则不能被氢氧化钠溶液抽出。有些生物碱的盐类，如四氢掌叶防己碱盐酸盐在水溶液中仍能为氯仿抽出。这些性质均有助于各化合物的分离纯化。

## 二、水溶液两相溶剂萃取法

水溶液两相溶剂萃取法又称双水相萃取技术（two-aqueous phase extraction），是近年来出现的、引人注目的、极有前途的新型分离技术。为适应生物工程的迅猛发展，经过几十年的研究，已涉及酶、生长激素、病毒等各种活性有效成分的分离及提纯。由于它具有活性损失小、分离步骤少、操作条件温和，且不存在有机溶剂残留的问题等优点，无疑在植物中有效成分的提取方面颇有前途。

### (一) 水溶液两相溶剂萃取法的基本原理

将两种不同的水溶性聚合物的水溶液混合时，当聚合物浓度达到一定值，体系会自然的分成互不相溶的两相。双水相体系的形成主要是由于高聚物之间的不相溶性，即高聚物分子的空间阻碍作用，相互无法渗透，不能形成均一相，从而具有分离倾向，在一定条件下即可分为二相。水溶液两相溶剂萃取原理是依据物质在两相间的选择性分配，当物质进

入双水相体系后，由于表面性质、电荷作用和各种力（如憎水键、氢键和离子键等）的存在和环境的影响，使其在上、下相中的浓度不同。分配系数等于物质在两相的浓度比，各种物质的值不同，因而双水相体系对生物物质的分配具有很大的选择性。萃取时如果各组分在两相溶剂中的分配系数相差越大，则分离效率越高，分离的效果就越好。

实验室萃取常用的有机溶剂有石油醚、氯仿、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇等。如果水提取液中的欲分离的成分是亲脂性的物质，一般多用亲脂性有机溶剂，如石油醚、苯、氯仿或乙醚与水相之间进行两相萃取；如果有效成分是亲脂性弱的物质，在亲脂性溶剂中难溶解，就需要改用亲脂性弱的有机溶剂，例如乙酸乙酯、正丁醇等与水相之间进行两相萃取。另外，还可以根据需要在氯仿、乙醚中加入适量乙醇或甲醇以增大有机溶剂的亲水性，利于有效成分的溶出。不过，一般有机溶剂亲水性越大，与水作两相进行萃取的效果就越不好。因为较多的亲水性杂质也会被萃取出来，影响到有效成分的进一步精制。

## （二）水溶液两相溶剂萃取技术的特点

系统含水量多达 75%~90%，两相界面张力极低（ $10^{-7} \sim 10^{-4}$  N/m），有助于保持生物活性和强化相际间的质量传递。分相时间短（特别是聚合物/盐系统），自然分相时间一般只有 5~15 min。目标产物的分配系数一般大于 3，大多数情况下，目标产物有较高的收率。双水相分配技术易连续化操作。大量杂质能够与所有固体物质一起去掉，与其他常用固液分离方法相比，双水相分配技术可省去 1~2 个分离步骤，使整个分离过程更经济。设备投资费用少，操作简单，不存在有机溶剂残留问题。

## （三）水溶液两相溶剂萃取技术的工艺流程（图 8-3）

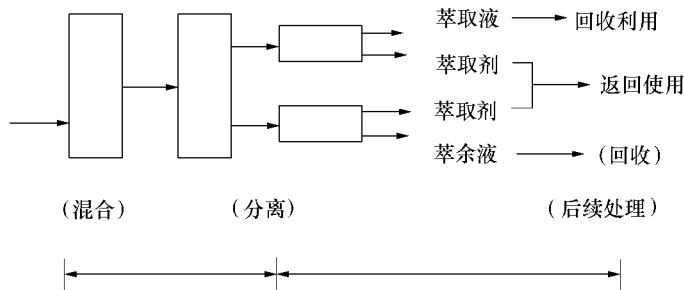


图 8-3 水溶液两相溶剂萃取工艺流程

两相溶剂萃取一般是在分液漏斗或萃取罐中进行。如为小量萃取，可在分液漏斗中进行；如系中量萃取，可在较大的适当的下口瓶中进行。在水提液中加入约 1/3 的有机溶剂，缓缓振摇几分钟，放置令其自然分层。要避免猛烈摇动，以免产生乳化，影响分层。如果容易产生乳化，大量提取时要避免猛烈振摇，可延长萃取时间。如碰到乳化现象，可将乳化层分出，再用新溶剂萃取，或将乳化层稍稍加热，或较长时间放置，并不时旋转，令其自然分层，有时加适量的氯化钠也有助于分层。乳化现象较严重时，也可以采用两相

溶剂逆流连续萃取装置。

控制水提取液的浓度最好在相对密度 1.1~1.2 之间。过浓容易萃取不完全；过稀则溶剂用量太大，影响操作。每次所用溶剂与水溶液应保持一定的比例。第一次提取时，溶剂要多一些，一般为水提取液的 1/3~1/2 为宜，以后的用量可以少一些，一般为 1/6~1/4 即可。一般萃取 3~4 次即可完成。但亲水性较大的成分不易转入有机溶剂层时，须增加萃取次数，或改变萃取溶剂。

#### (四) 逆流连续萃取法

逆流连续萃取法是一种连续的两相溶剂萃取法。其装置可具有一根、数根或更多的萃取管。管内用小瓷圈或小的不锈钢丝圈填充，以增加两相溶剂萃取时的接触面。检查萃取是否完全，可取样品用薄层层析、纸层析及显色反应或沉淀反应进行。

#### (五) 逆流分配法

逆流分配法 (counter current distribution, CCD) 又称逆流分溶法、逆流分布法或反流分布法。与两相溶剂逆流萃取法原理相似，是一种加样量一定，在一定容量的两相溶剂中，经多次移位萃取分配而使混合物分离的分离方法。本法所采用的逆流分布仪是由若干管子组成。若无此仪器，小量萃取时可用分液漏斗代替。溶剂选择的原则是对混合物分离效果较好，即分配系数差异大的两种不相混溶的溶剂。预先选择对混合物分离效果较好，即分配系数差异大的两种不相混溶的溶剂，并参考分配层析的行为分析推断和选用溶剂系统，通过试验测知要经多少次的萃取移位而达到真正的分离。逆流分配法对于分离具有非常相似性质的混合物，往往可以取得良好的效果。但操作时间长，萃取管易因机械振荡而损坏，消耗溶剂较多，应用上常受到一定限制。

#### (六) 液滴逆流层析

液滴逆流层析又称液滴逆流层析法，是近年来在逆流层析法基础上改进的两相溶剂萃取法。对溶剂系统的选择基本同逆流层析法，但要求能在短时间内分离成两相，并可生成有效的液滴。由于移动相形成液滴，在细的分配萃取管中与固定相有效地接触、摩擦，不断形成新的表面，促进溶质在两相溶剂中的分配，故其分离效果往往比逆流层析法好，且不会产生乳化现象，用氮气压驱动移动相，被分离物质不会因遇大气中氧气而氧化。本法必须选用能生成液滴的溶剂系统，处理样品量较小 (1 g 以下)，并要求有一定设备。应用液滴逆流分配法曾有效地分离多种微量成分如柴胡皂甙，但对高分子化合物的分离效果较差。液滴逆流分配法的装置，近年来虽不断在改进，但是，装置和操作均较繁琐，所以应用较少。目前，对适用于逆流分配法进行分离的成分，可采用两相溶剂逆流连续萃取装置或分配柱层析法替代。

### 三、盐析法

盐析法是在中草药的水提液中加入无机盐至一定的浓度 (半饱和或饱和状态) 后，可

使提取液中的某些成分在水中的溶解度降低而与水溶性大的杂质分离析出沉淀，从而达到与水溶性大的杂质分开的一种分离方法。一般的生物碱、皂苷、挥发油等都可用盐析从水溶液中分离出来。有些成分如原白头翁素、麻黄碱、苦参碱等水溶性较大，在提取时，亦往往先在水提取液中加入一定量的食盐，再用有机溶剂萃取。常用作盐析的无机盐有氯化钠、氯化钾、氯化钙、硫酸钠、硫酸镁、碳酸钾等。

#### 四、透析法

透析法是利用小分子物质在溶液中可通过半透膜，而大分子物质不能通过半透膜的性质来达到分离的一种纯化方法。例如分离和纯化皂甙、蛋白质、多肽、多糖等物质时，可用透析法以除去无机盐、单糖、双糖等杂质。反之也可将大分子的杂质留在半透膜内，而将小分子的物质通过半透膜进入膜外溶液中，而加以分离精制。透析是否成功与透析膜的规格关系极大。透析膜的膜孔有大有小，要根据欲分离成分的具体情况而选择。透析膜有动物性膜、火棉胶膜、羊皮纸膜（硫酸纸膜）、蛋白质胶膜、玻璃纸膜等。实验室操作多用市售的玻璃纸或动物性半透膜扎成袋状，外面用尼龙网袋加以保护，小心加入欲透析的样品溶液，悬挂在清水容器中。经常更换清水使透析膜内外溶液的浓度差加大，必要时适当加热，并加以搅拌，以利透析速度加快。为了加快透析速度，还可应用电透析法，即在半透膜旁边纯溶剂两端放两个电极，接通电路，则透析膜中的带有正电荷的成分如无机阳离子、生物碱等向阴极移动，而带负电共荷的成分如无机阴离子、有机酸等则向阳极移动，中性化合物及高分子化合物则留在透析膜中。透析是否完全，须取透析膜内溶液进行定性反应检查。

一般透析膜可以通过把动物半透膜（如猪、牛的膀胱膜）用水洗净，再以乙醚脱脂制成。蛋白质胶（明胶）膜可用 20% 含量的明胶涂于细布上，阴干后放入水中，再加甲醛使膜凝固，冲洗干净即成；羊皮纸膜的制作是将滤纸浸入 50% 的硫酸 15~60 min，取出铺在板上，以水冲洗制得，其膜孔大小与硫酸浓度、浸泡时间以及用水冲洗速度相关；火棉胶膜的制作是将火棉胶溶于乙醚及无水乙醇，涂在板上，干后放于水中制得，其膜孔大小与溶剂种类、溶剂挥发速度有关。使膜孔增大可在溶剂中加入适量水，使膜孔缩小可在溶剂中加入少量醋酸。

#### 五、结晶、重结晶和分步结晶法

结晶是把含有固体溶质的饱和溶液加热蒸发溶剂或降低温度后，使原来溶解的溶质成为有一定几何形状的固体（晶体）析出的过程。一般地说，植物的化学成分在常温下多半是固体物质，常具有结晶的通性。因此，可以根据溶解度的不同，用结晶法来达到分离和纯化的目的。结晶法在植物有效成分分离的后期是实验室常用的纯化方法。一旦获得结晶，就能有效地进一步精制成为单体纯品。求得结晶并制备成单体纯品，就成为鉴定植物有效成分、研究其分子结构重要的一步。但是，并非由前面所述方法提取得到的所有的提取液都可以直接用结晶法分离、纯化，过多杂质的存在会干扰结晶的形成，有时少量的杂质也会阻碍晶体的析出。因此，结晶前应该先尽可能地除去杂质。



### (一) 杂质的除去及溶剂的选择

植物材料经过溶剂提取和初步分离后所得到的成分，大多仍是混合的组分，仍然含有杂质。混合物中的杂质，有时即使是少量或微量杂质存在，也能阻碍或延缓结晶的形成。所以，在制备结晶时，必须注意尽可能除去杂质对结晶的干扰。除去杂质的方法很多，可采用前面提到的溶剂法，可选用溶剂溶出杂质，或只溶出所需要的成分；有时可用少量活性炭等进行脱色处理，以除去有色杂质，沉淀法、透析法、超滤法等也是常用的除去杂质的方法。也可将粗提物通过装有氧化铝、硅胶、硅藻土、大孔吸附树脂等的柱子层析处理后，再进行结晶。选择柱层析用填料时，应根据所要成分的性质，注意使其不被吸附而损失。

如果一再处理仍未达到纯品的成分结晶化，则可先制备其晶态的衍生物，再纯化还原后，可望得到结晶。例如游离生物碱常可先制备成生物碱盐类，羟基化合物可先转变成乙酰化物，羰基化合物可先制备成苯腙衍生物结晶。美登碱就是反复分离精制仍难以得到结晶，但如果先制备成3-溴丙基美登碱结晶后，再经水解除去溴丙基，美登碱就能制备成为结晶。

合适的溶剂是结晶的关键。制备结晶，要注意选择合宜的溶剂和应用适量的溶剂。适宜的结晶溶剂，最好是在冷时对所要的成分溶解度较小，而热时溶解度又较大的溶剂。溶剂的沸点亦不宜太高。一般常用甲醇、丙酮、氯仿、乙醇、乙酸乙酯等。但有些化合物在一般溶剂中不易形成结晶，而在某些溶剂中则易形成结晶。例如在冰醋酸中葛根素、逆没食子酸易形成结晶；在吡啶中大黄素易结晶；在丙酮-水中穿心莲亚硫酸氢钠加成物较易得到结晶；蝙蝠葛碱通常为无定形粉末，但能和氯仿或乙醚形成为加成物结晶。

### (二) 结晶溶液的制备

一般是用适量的溶剂在加温的情况下，将化合物溶解使之成为过饱和的溶液，然后再放置冷处。如果在室温中可以析出结晶，就不一定放于冰箱中，以免伴随结晶析出更多的杂质。制备结晶溶液，除选用单一溶剂外，在生产上也常采用混合溶剂。一般是先将化合物溶于易溶的溶剂中，再在室温下滴加适量的难溶的溶剂，直至溶液微呈浑浊，并将此溶液微微加温，使溶液完全澄清后放置。如虎杖苷重结晶时，可先溶于水，制成饱和水溶液，在已精制饱和的水溶液上再加一层乙醚放置，既有利于溶出其共存的脂溶性杂质，又可降低水的极性，促使虎杖苷的结晶。

一般在结晶过程中，溶液浓度越高，降温越快，析出结晶的速度也就越快。但是，其结晶的颗粒较小，杂质也可能多些。有时自溶液中析出的速度太快，超过化合物晶核的形成分子定向排列的速度，往往只能得到无定形粉末。有时溶液太浓，黏度大反而不易结晶。如果溶液浓度适当，温度慢慢降低，有可能析出结晶较大而纯度较高的结晶。

### (三) 制备结晶的操作方法

制备结晶的方法通常有浓缩结晶法和降温结晶法两种。浓缩结晶法是将溶液加热蒸发(或慢慢挥发)，过饱和的溶质就能成固体析出的方法，对溶解度受温度变化影响不大的固体溶质适用。降温结晶法是用适量的溶剂在加温的情况下，将化合物溶解制成饱和溶



液，然后再放置冷处，通常放于冰箱中让其溶质从溶液中析出，适用于溶解度受温度变化的固体溶质的结晶。

#### (四) 重结晶及分步结晶

第一次结晶得到晶态物质往往不是很纯，可以用溶剂溶解再次结晶精制，这个过程叫重结晶，这种方法称为重结晶法。在制备结晶时，通常在形成一批结晶后，立即吸出上层的母液于干净的容器中，母液放置后可以得到第二批结晶，如此下去可以得到各级的结晶。另外，结晶经重结晶后所得的母液，也通常再经上述处理又可分别得到第二批、第三批结晶。这种方法则称为分步结晶法或分级结晶法。在分级结晶过程中，结晶的析出速度总是越来越快，纯度也是越来越高。所以，分步结晶法各部分所得结晶，其纯度往往有较大的差异，在检查前最好不要贸然混在一起，以免纯度又下降。

## 六、超滤技术

超滤技术是膜提取分离技术的一种，是根据分子量的差异，选择一定截留分子量的膜除去杂质，富集有效部位或有效成分的分选方法。自 20 世纪 90 年代以来以其高效、节能和绿色等特点，在中药提取分离中的应用越来越多。超滤技术能耗低，分离效率高，可用于热敏性物质分离，主要用于注射液、口服液的澄清，不同分子量的截留，有效成分的分选纯化等方面。注射液如生脉散、伸筋草、枳实、补骨脂、丹参等；口服液如人参精、生脉饮、海龙蛤蚧精、四逆汤等，有效成分如绞股蓝总苷、黄芩苷等。

#### (一) 超滤技术概念

超滤 (UF) 是以压力为推动力，利用超滤膜不同孔径对液体进行分离的物理筛分过程。其分子切割量 (CWC) 一般为 6~500 ku，孔径为 100 nm。超滤同反渗透技术类似，是以压力为推动力的膜分离技术。在从反渗透到电渗析的分离范围的谱图中，居于纳滤 (NF) 与微滤 (MF) 之间，截留分子量范围为 50~500 000 u，相应膜孔径大小的近似值为 5~100 nm。

#### (二) 超滤膜的分类

超滤膜主要分为卷式、板框式、管式和中空纤维式。其中，中空纤维式是国内应用最为广泛的一种。其典型特点为没有膜的支撑物，是靠纤维管的本身强度来承受工作压力的。根据膜的致密层是在中空纤维的内表面或者外表面，又分为内压式和外压式。现在应用的为清一色全为外压式。主要优点为单位容积内装填的有效膜面积大，且占地面积小。

#### (三) 超滤技术分离原理及特点

超滤技术是通过膜表面的微孔结构对物质进行选择性的分离。当液体混合物在一定压力下流经膜表面时，小分子溶质透过膜 (称为超滤液)，而大分子物质则被截留，使原液中大分子浓度逐渐提高 (称为浓缩液)，从而实现大、小分子的分离、浓缩、净化的目的。

中空纤维超滤膜组件具有装填密度大、结构简单、操作方便等特点。分离过程为常温操作，无相态变化，节省能源，并且不产生二次污染。

膜装置有微电脑自动控制型和一般手动控制型，可采用正向清洗与反向清洗两种方式，也可以在线清洗。

#### (四) 超滤过程原理

超滤是以压力差为推动力的膜分离过程，一般用于液相分离。超滤所用的膜为非对称膜，其表面活性分离层平均孔径为 1~20 nm，能够截留分子量为 500 u 以上的大分子与胶体微粒，所用操作压差在 0.1~0.5 MPa。微滤所用的膜为微孔膜，原料液在压差作用下，其中水（溶剂）透过膜上的微孔流到膜的低压侧，为透过液，大于膜孔的微粒被截留，从而实现原料液中的微粒与溶剂的分离。微滤过程对微粒的截留机理是筛分作用，决定膜的分离效果是膜的物理结构、孔的形状和大小。原料液在压差作用下，其中溶剂透过膜上的微孔流到膜的低压侧，为透过液，大分子物质或胶体微粒被膜截留，不能透过膜，从而实现原料液中大分子物质与胶体物质和溶剂的分离。超滤膜对大分子物质的截留机理主要是筛分作用，决定截留效果的主要是膜的表面活性层上孔的大小与形状。除了筛分作用外，膜表面、微孔内的吸附和粒子在膜孔中的滞留也使大分子被截留。实践证明，有的情况下，膜表面的物化性质对超滤分离有重要影响。因为超滤处理的是大分子溶液，溶液的渗透压对过程有影响。从这一意义上说，它与反渗透类似。但是，由于溶质分子量大、渗透压低，可以不考虑渗透压的影响。

超滤膜一般为非对称膜，其制造方法与反渗透法类似。超滤膜的活性分离层上有无数不规则的小孔，且孔径大小不一，很难确定其孔径，也很难用孔径去判断其分离能力，故超滤膜的分离能力均用截留分子量来予以表述。定义能截留 90% 的物质的分子量为膜的截留分子量。目前用作超滤膜的材料主要有聚砜、聚砜酰胺、聚丙烯腈、聚偏氟乙烯、醋酸纤维素等。微滤膜一般均为均匀的多孔膜，孔径较大，可用多种方法测定，可直接用测得的孔径来表示其膜孔的大小。

超滤是以压差作为推动力的膜分离过程。它们组成了可以分离溶液中的离子、分子、固体微粒的这样一个三级分离过程，根据所要分离物质的不同，选用不同的方法。

#### (五) 超滤过程与操作

一般而言，超滤的膜孔堵塞问题十分严重，往往需要高压反冲技术予以再生。与反渗透过程相似，超滤过程也必须克服浓差极化和膜孔堵塞带来的影响。因此，在设计超滤过程时，除要注意膜面流速的选择、料液的湍动、预处理以及膜的清洗等因素以外，尚需特别注意对膜的反冲洗以恢复膜的通量。由于超滤过程膜通量远高于反渗透过程，因此，其浓差极化更为明显，很容易在膜面形成一层凝胶层，此后膜通量将不再随压差增加而升高，这一渗透量称之为临界渗透通量。对一定浓度的某种溶液而言，压差达到一定值后渗透通量达到临界值。所以，实际操作应选在接近临界渗透通量附近操作，此时压差一般在 0.4~0.6 MPa，过高的压力不仅无益反而有害。

超滤过程操作一般均呈错流，即料液与膜面平行流动，料液流速影响着膜面边界层的

厚度,提高膜面流速有利降低浓差极化影响,提高过滤通量,这与反渗透过程机理类似。微滤过程以前大都采用折褶筒过滤,属终端过滤,对固相含量高的料液无法处理,近年来发展起来的错流微滤技术的过滤过程类似反渗透和超滤,设计时可以借鉴。微滤、超滤过程的操作压力、温度以及料液预处理、膜清洗过程的原理与反渗透极为相似,但其操作过程亦有自己的特点。

常用的超滤过程操作模式有单段间歇操作、单段连续操作和多段连续操作3种。

**1. 单段间歇操作** 在超滤过程中,为了减轻浓差极化的影响,膜组件必须保持较高的料液流速,但膜的渗透通量较小,所以,料液必须在膜组件中循环多次才能使料液浓缩到要求的程度,这是工业过滤装置最基本的特征。两种回路的区别在于闭式回路中料液从膜组件出来后不进料液槽而直接流至循环泵入口,这样输送大量循环液所需能量仅仅是克服料液流动系统的能量损失,而开式回路中的循环泵除了须提供料液流动系统的能量损失外,还必须提供超滤所需的推动力即压差,所以闭式回路的能耗低。

间歇操作适用于实验室或小规模间歇生产产品的处理。

**2. 单段连续操作** 与间歇操作相比,其特点是超滤过程始终处于接近浓缩液的浓度下进行,因此渗透量与截留率均较低。为了克服此缺点,可采用多段连续操作。

**3. 多段连续操作** 各段循环液的浓度依次升高,最后一段引出浓缩液,因此前面几段中料液可以在较低的浓度下操作。这种连续多段操作适用于大规模工业生产。

## 七、大孔树脂吸附技术

大孔吸附树脂是20世纪60年代初开发出的一类新型高分子分离材料,是一种高聚物吸附剂。大孔树脂吸附分离技术是采用特殊的吸附剂,从植物提取液中有选择地吸附其中的有效成分,除去无效成分的一种提取精制新工艺。大孔吸附树脂是在离子交换树脂的基础上发展起来的。1935年英国的Adams和Holmes开创了离子交换树脂领域。20世纪50年代末大孔离子交换树脂的合成是离子交换树脂发展的一个里程碑。20世纪60年代末合成了大孔吸附交换树脂,并于70年代末用于植物有效成分的分离。我国80年代后开始大孔吸附交换树脂工业规模的生产和应用。大孔吸附树脂目前多用于工业废水处理、食品添加剂的分离精制、中草药有效成分、维生素和抗菌素等的分离提纯和化学制品的脱色、血液的净化等方面。

### (一) 大孔树脂吸附技术概念

大孔树脂吸附技术是利用特殊的吸附剂——大孔吸附树脂的吸附性和分子筛相结合的原理,从植物提取液中有选择性地吸附其中的有效成分,富集有效成分、除去杂质的一种分离技术。其操作的基本程序大多是中药提取液、通过大孔树脂吸附有效成分、乙醇溶液梯度洗脱、回收溶剂得到液浸膏、干燥、半成品。

### (二) 大孔吸附树脂的特性及原理

大孔吸附树脂(macroporous absorptionresin)是吸附树脂的一种,属于功能高分子

材料，是近 30 余年来发展起来的一类有机高聚物吸附剂。由聚合单体和交联剂、致孔剂、分散剂等添加剂经聚合反应制备而成。聚合物形成后，致孔剂被除去，在树脂中留下了大大小小、形状各异、互相贯通的孔穴。因此，大孔吸附树脂在干燥状态下其内部具有较高的孔隙率，且孔径较大，在 100~1 000 nm 之间，故称为大孔吸附树脂。大孔树脂具有表面积较大、交换速度较快、机械强度高、抗污染能力强、热稳定好的特点，在水溶液和非水溶液中都能使用。

大孔吸附树脂理化性质稳定，对有机物选择性较好，不溶于酸、碱及有机溶媒，不受无机盐类及强离子低分子化合物存在的影响，具有很好的吸附性能，它可以通过物理吸附从水溶液中有选择地吸附有机物质。根据大孔树脂是吸附性和筛选性原理相结合的分选材料的原理，有机化合物可以根据吸附力的不同及分子量的大小，在大孔吸附树脂上经一定的溶剂洗脱而分开。

由于大孔吸附树脂的固有特性，可用于单一或复方的分离与纯化。但大孔吸附树脂型号很多，性能用途各异，而植物有效成分又极其复杂，因此，必须根据功能明确其有效成分的类别和性质，根据“相似相溶”的原则，即一般非极性吸附剂适用于从极性溶液（如水）中吸附非极性有机物；而高极性吸附剂适用于从非极性溶液中吸附极性溶质；中等极性吸附剂，不但能够从非水介质中吸附极性物质，同时具有一定的疏水性，所以，也能从极性溶液中吸附非极性物质。

### （三）大孔吸附树脂的优点

与传统的除杂方法和工艺相比，采用大孔树脂吸附技术对提取的植物材料进行除杂精制，有以下优点。

经大孔树脂吸附技术处理后得到的精制物可使植物有效成分高度富集，杂质少，提取得率比一般水煮法和醇沉法高，剂量缩小了，杂质少了，内在质量提高了，有利质量控制。如人参茎叶中也含人参皂甙，可以提取出来作为药用，但含量低，用一般方法提取麻烦，而用大孔树脂吸附技术提纯后人参皂甙含量可达 70% 以上，很方便。再如，中药水煎提取物体积大，有效成分含量低，剂量太大剂型选择困难，给生产带来难题，如果用大孔树脂吸附技术处理，问题就较好解决。

传统工艺制备的中成药大部分具有较强的吸潮性，是中药生产及储藏中长期存在的难题。而经大孔树脂吸附技术处理后，可有效地除去水煎液中大量的糖类、无机盐、黏液质等吸潮成分，有利增强产品的稳定性。

大孔树脂吸附技术能缩短生产周期，所需设备简单，免去了静置沉淀、浓缩等耗时多的工序。节约包装，降低成本。

## 第四节 色谱技术

色谱法，又称层析法，是分离纯化和定性定量鉴定植物有效成分的重要方法之一。色谱法的基本原理是利用混合样品的各组分在互不相溶的两“相”溶剂之间的分配系数之差异（分配色谱）、组分对吸附剂吸附能力不同（吸附色谱）、分子的大小的差异（排阻色



谱)或其他亲和作用的差异,来进行反复地吸附或分配,从而使混合物中的各组分得以分离。

色谱法有两种不同的相:一种为固定相,即固定的物质(可以是固体或液体),另一种为流动相,即流动的溶液或气体。以气体为流动相的称为气相色谱,液体为流动相的称为液相色谱。根据各组分在固定相中的作用原理不同又可分为吸附色谱、分配色谱、离子交换色谱、排阻色谱等。根据载体及操作条件的不同,又可分为纸色谱、薄层色谱、柱色谱、高效液相色谱、气相色谱等。

## 一、纸 色 谱

### (一) 纸色谱的原理

纸色谱(纸层析)是分配色谱的一种。滤纸是水的支持物或载体,附着在纸上的水是固定相,流动相为有机溶剂和水组成。样品溶液点在纸上,作为展开剂的有机溶剂自下而上移动,样品混合物中各组分在水—有机溶剂两相发生溶解分配,并随有机溶剂的移动而展开,最后由于各组分在两相中分配系数不同,迁移速度也就不同,从而使不同的组分在滤纸上得以分离。各组分的位置一般用比移值  $R_f$  (点样线到样品展开完毕后斑点的位置之间的距离与点样线到展开溶剂前沿距离的比值)表示。 $R_f$  值的大小与化合物的结构、性质、展开的溶剂系统、温度、展开方式等有关。纸色谱在糖类化合物、氨基酸和蛋白质、天然色素等有一定亲水性的化合物的分离中有广泛的应用。

### (二) 纸色谱的操作

色谱所用溶剂应与试样不起化学反应,并应用纯度较高的溶剂。色谱时的温度,除气相色谱法或另有规定外,系指在室温下操作。选择的滤纸要质地均一、厚薄适宜、平整无折痕,杂质要少。含有过多的杂质会影响分析的结果。一般定性分析需要使用较薄的滤纸,而分离制备则需要厚质滤纸。

选择纸色谱条件主要是选择合适的展开剂。纸色谱的展开剂常由有机溶剂和水组成,往往不是单一溶剂。合适的展开剂一般有一定的极性,难溶于水。在有机溶剂和水相之间,不同的有机物有不同的分配性质。在水相中分配得多的是水溶性大或能形成氢键的化合物,而极性弱的化合物在有机相中分配多。展开剂借毛细管的作用沿滤纸上行时,带着样品中的各组分以不同的速度向上移动。水溶性大或能形成氢键的化合物移动较慢,极性弱的化合物移动较快。随展开剂的不断上移,混合物中各组分在两相之间反复进行分配,从而把各组分分开。展开剂的选择原则上要求欲分离样品的各组分在该溶剂系统中的  $R_f$  值差异较大,且该系统对样品有良好的溶解性能,不会与样品发生化学反应,组成的比例也不应该受温度影响。样品的浓度一般配制成 0.5~15 mg/ml 的溶液,然后用毛细点样管点于离滤纸底边 2~4 cm 的点样线上。点样时可以采用少量多次点样的方法,点样量不宜过大,超载会导致拖尾现象,影响分离效果。

根据溶剂的移行方向,可分为上行法和下行法。在分离一些复杂的组分时,还常采用



双向纸层析，就是先用一种展开系统展开后，冷风吹干后，再采用另一种展开系统在与前一次展开垂直的方向做第二次展开。展开结束后，取出滤纸，马上用铅笔记下溶剂前沿的位置，吹干滤纸后进行检识。

## 二、薄层色谱

### (一) 薄层色谱的原理

薄层色谱 (thin layer chromatography, TLC)，也称薄层层析，属固-液吸附色谱，是色谱法中的一种，是快速分离和定性分析少量物质的一种很重要的实验技术。常用的有吸附色谱和分配色谱两类。是将适宜的固定相涂布于玻璃板、塑料或铝基片上，成一均匀薄层。待点样、展开后，与适宜的对照物按同法所得的色谱图作对比，用以进行药品的鉴别、杂质检查或含量测定的方法。它兼备了纸色谱和柱色谱的优点。一方面适用于少量样品（几微克甚至  $0.01 \mu\text{g}$ ）的分离；另一方面在制作薄层板时，把吸附层加厚加大，因此，又可用于精制样品。此法特别适用于挥发性较小或较高温度易发生变化而不能用气相色谱分析的物质。此外，薄层色谱法还可用来跟踪有机反应及进行柱色谱之前的一种“预试”。常用作柱色谱的先导，用来预试摸索柱色谱的洗脱条件。

吸附色谱 (adsorption chromatography) 的原理是利用混合物中的各组分对固体吸附剂的吸附能力不同而达到分离的层析方法。液-固吸附色谱是运用较多的一种方法，特别适用于很多中等分子量的样品（相对分子质量小于  $1000 \text{ u}$  的低挥发性样品）的分离，尤其是脂溶性成分；一般不适用于高分子量样品如蛋白质、多糖或离子型亲水化合物等的分离。吸附层析的分离效果，决定于吸附剂、溶剂和被分离化合物的性质这 3 个因素。

分配色谱 (partition chromatography) 是利用混合物在互不相溶的两相中分配系数不同而将混合物分离开。

### (二) 薄层色谱的操作

制薄层板的主要原料是吸附剂（支持剂）和黏结剂。薄层吸附色谱用的吸附剂是氧化铝、硅胶、聚酰胺，薄层分配色谱的支持剂为硅藻土和纤维素。其颗粒大小，一般要求直径为  $10 \sim 40 \mu\text{m}$ 。薄层涂布，一般可分无黏合剂和含黏合剂两种。前者系将固定相直接涂布于玻璃板上，后者系在固定相中加入一定量的黏合剂，一般常用  $10\% \sim 15\%$  煅石膏混匀后加水适量使用，或用羧甲基纤维素钠水溶液 ( $0.5\% \sim 0.7\%$ ) 适量调成糊状，均匀涂布于玻璃板上。也有含一定固定相或缓冲液的薄层。

薄层层析所用的玻璃板，除另有规定外，用  $5 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ ， $10 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$  或  $20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$  的规格，要求光滑、平整，洗净后不附水珠，晾干。玻璃板洗净干燥后，将 1 份固定相和 3 份水在研钵中向一方向研磨混合，除去表面的气泡后，倒入涂布器中，在玻板上平稳地移动涂布器进行涂布（厚度为  $0.2 \sim 0.3 \text{ mm}$ ），使之成薄层。然后把铺好的薄层板放在平台上晾至干透。将干透的薄层板置于  $105 \sim 110 \text{ }^\circ\text{C}$  烘箱中加热活化  $0.5 \sim 1 \text{ h}$ ，活性板置于干燥器中保存备用。使用前检查其均匀度（可通过透射光和反射光检视）。

在离薄层板距底边 2.0 cm 处，用铅笔轻轻地画一条线作为点样基线。点样器点样于薄层板上，一般为圆点，点间距离可视斑点扩散情况以不影响检出为宜。点样时必须注意勿损伤薄层表面。

薄层层析中多组分的样品的分离关键在于展开剂的选择。展开剂的选择主要根据样品的极性、溶解度和吸附剂的活性等因素来考虑。一般地说，在薄层板上凡溶剂的极性越大，对化合物的洗脱力越大，即溶质在薄层板上移动的距离也越大（如果样品在溶剂中有一定的溶解度），极性越小，对化合物的洗脱力越小。薄层的展开在密闭的容器中进行。根据薄层板的大小，选用不同的器皿。先将选择的展开剂放入色谱器中，使色谱器内空气饱和 5~10 min，再将点好试样的薄层板放入色谱器中进行展开，展开的方式可分为上行展开、下行展开、平卧展开及径向展开。通常用上行法，但软板（未加黏合剂）只能用倾斜上行。点样的位置必须在展开剂液面之上，当展开剂上升到薄层的前沿（离前端 5~10 mm）或多组分已明显分开时，取出薄层板放平晾干，用铅笔画出溶剂前沿的位置后，即可显色。由于薄层色谱要在短的距离内（10~20 cm）使化合物得到分离，用单一溶剂常不宜达到分离效果，一般都用两个或两个以上的溶剂按不同比例混合而成。

如果化合物本身有颜色，薄层板（硅胶 G、氧化铝 G）分离后可以直接在日光下观察它的斑点；如果本身无色，可先在紫外灯光下观察有无荧光斑点（有苯环的物质都有），用铅笔在薄层板上画出斑点的位置；对在紫外灯光下不显色的，可放在含少量碘蒸气的容器中显色来检查色点（因为许多化合物都能和碘成黄棕色斑点），显色后，立即用铅笔标出斑点的位置。另外，还有许多种显色剂，可以根据不同的化合物，选用不同的显色剂。检识到化合物后，记下各斑点中心位置，通常用比移值  $R_f$  表示物质移动的相对距离。 $R_f$  值随分离化合物的结构、固定相、流动相的性质、温度等多种因素的不同而变化。当各因素固定时， $R$  就是一个特定的常数，因而可以作为定性分析的依据。但是，由于影响的因素太多，实验数据往往与文献报道的不完全一致，因此在鉴定时常采用对照品同步展开分析。

### 三、制备型薄层色谱

制备型薄层色谱（PTLC）在植物有效成分的分离过程中，用薄层色谱法探索柱层析的洗脱条件，是实验室的常规方法。在进行柱层析分离时，首先要考虑选用合适的吸附剂与洗脱剂。通过薄层的预试验，就可以摸索到比较满意的分离条件，即可将此条件用于柱层析。常与常压柱色谱配合使用，尤其是在一些还没有现代分离手段的实验室。虽然制备型薄层色谱可以用来分离克量级的样品，但在大多数情况下，人们只是用来分离毫克级的样品。

#### （一）薄层色谱的吸附剂

硅胶是最常用的吸附剂，可用来分离亲脂性或亲水性物质，粒度与孔径大小和相应的薄层色谱级吸附剂相似。适宜的薄层吸附剂的厚度为 0.5~2 mm，板的尺寸一般为 20 cm×20 cm 或 20 cm×40 cm。薄层板和薄层厚度的尺寸限制了制备型薄层色谱可以分离的样

品量。

薄层色谱板可以自己制备，也有预制板市售。自制最大的好处是吸附剂的厚度及组成可以调节（最厚可达 5 mm），在吸附剂中可掺入硝酸银和缓冲物质。薄层板的制备方法根据吸附剂的类型而定。

## （二）薄层色谱的上样

进行薄层色谱分离的一个最关键的步骤是上样。薄层板最好先用溶剂展开 1 次，以减少杂质的混入。上样前将样品用挥发性的溶剂溶解（低挥发性溶剂可引起点样带变宽），浓度应在 5%~10%。点样带应该尽量窄，以获得更好的分离效果。可用自动点样仪或手动点样（点样毛细管或微量进样器）。如果点样带太宽，可先用高极性的溶剂将薄层板展开至点样带上端 2 cm 处，以起到浓缩的作用，然后将薄层板晾干，再用所需展开剂展开。

## （三）薄层色谱的展开

展开剂的选择可用分析型薄层色谱预试验来确定。由于两者的吸附剂颗粒大小几乎相同，可将分析型薄层色谱的展开剂条件直接用于制备型薄层色谱展开。正己烷—乙酸乙酯，正己烷—丙酮，氯仿—甲醇等这几种两相溶剂系统的不同比例，经常被用来进行制备型薄层色谱的展开。在溶剂系统中加入少量的乙酸（或二乙胺）可以改进对酸性（或碱性）物质的分离效果。

展开时可将多块制备型薄层色谱板放在一大玻璃容器内同时展开。展开前要让展开剂在展开缸充分饱和。如果一次展开分离效果不好，还可采用多次展开以提高各组分的分离程度。前一次展开后需干燥薄层板，挥干溶剂后方可进行下一次的展开。

## （四）回收分离物质

展开结束后，有紫外吸收的化合物，可以在紫外灯下确认色带位置，无紫外吸收的化合物，可采用在板上面覆盖一块玻璃板，然后在板的边缘喷洒显色剂来确认色带的位置。在确定各组分色带的位置后，用刮刀将该色带从板上刮下，然后用极性尽量低（极性越高，往往被提出的杂质的量就越大），对该化合物溶解度好的溶剂洗脱，过滤除去吸附剂，收集洗脱液，回收溶剂，即可。甲醇可溶解硅胶及其中含有的一些杂质，因此并不适合用来洗脱。较合适的溶剂是丙酮、乙醇或氯仿。

# 四、柱 色 谱

柱色谱属于液—固吸附色谱，是基于吸附和溶解性质的分离技术。柱色谱（柱层析）常用的有吸附柱色谱、分配柱色谱、凝胶过滤柱色谱、离子交换柱色谱等。

## （一）柱色谱的原理

当混合物溶液加在固定相上，固体表面借各种分子间力（包括范德华力和氢键）作用于混合物中各组分，以不同的作用强度被吸附在固体表面。由于吸附剂对各组分的吸附能

力不同,当流动相流过固体表面时,混合物各组分在液—固两相间分配。吸附牢固的组分在流动相分配少,吸附弱的组分在流动相分配多。流动相流过时各组分会以不同的速率向下移动,吸附弱的组分以较快的速率向下移动。随着流动相的移动,在新接触的固定相表面上又依这种吸附—溶解过程进行新的分配,新鲜流动相流过已趋平衡的固定相表面时也重复这一过程,结果是吸附弱的组分随着流动相移动在前面,吸附强的组分移动在后面,吸附特别强的组分甚至不会随流动相移动,各种化合物在色谱柱中形成带状分布,实现混合物的分离。柱色谱的分离效果,决定于吸附剂、溶剂和被分离化合物的性质这3个因素。

**1. 柱色谱吸附剂(固定相)** 吸附剂一般是一些具有较大的比表面积的多孔物质,在其表面有许多吸附中心。常用的吸附剂有氧化铝、硅胶、活性炭、硅藻土等。吸附剂对有机物的吸附作用有多种形式。吸附剂的吸附作用主要是因为其表面的吸附中心。吸附中心的多少及其吸附能力的强弱直接影响吸附剂的性能。

硅胶是柱色谱中常用的吸附剂,可用于分离各种有机物,是应用最为广泛的固定相材料之一。分子式为 $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ,是在颗粒表面有很多硅醇基的具有硅氧烷的交链结构的多孔性物质。硅胶中具有吸附力的活性基团是硅醇基,它能与极性化合物或不饱和化合物形成氢键或发生其他形式的互相作用,被分离组分由于极性和不饱和程度不同,和硅醇基互相作用的程度也不同,因而得以分离。硅胶的分离效率与其粒度、孔径及表面积等有关。硅胶的粒度越小,均匀性越好,分离效率越高;硅胶的表面积越大,则与样品的相互作用越强,吸附力越强。

因制备方法和处理方法的差异,色谱用的氧化铝分为碱性、中性和酸性3种。酸性氧化铝的pH在4~5之间,适于分离酸性物质,如酸性色素、氨基酸等;中性氧化铝的pH为7.5,适于分离生物碱、挥发油及在酸碱中不稳定的苷类、内酯类等化合物,应用最广;碱性氧化铝的pH在9~10.5之间,适用于分离一些碱性和中性植物有效成分,如对生物碱类的分离颇为理想。

活性炭是使用较多的一种非极性吸附剂,常用于分离极性较弱或非极性有机物。层析用的活性炭,一般分为粉末状活性炭、颗粒状活性炭和锦纶活性炭3种。

活性炭在水溶液中吸附力最强而在有机溶剂中吸附力较弱。故水的洗脱能力最弱,而有机溶剂则较强。主要用于分离水溶性成分,如氨基酸、糖类及某些苷。活性炭对极性基团多的化合物的吸附力大于对活性基团少的化合物的吸附力,对大分子化合物的吸附力大于小分子化合物。

**2. 柱色谱展开剂(流动相)** 在柱层析时所用的溶剂习惯上称洗脱剂,由单一溶剂或混合溶剂组成,用于薄层或纸层析时常称展开剂。展开剂对选定了固定相的色谱分离有重要的影响。在色谱分离过程中混合物中各组分在吸附剂和展开剂之间发生吸附—溶解分配。强极性展开剂对极性大的有机物溶解的多,弱极性或非极性展开剂对极性小的有机物溶解的多。随展开剂的流过不同极性的有机物以不同的次序形成分离带。洗脱剂的选择,需根据被分离物质的性质与所选用的吸附剂性质这两者结合起来加以考虑。分离强极性成分,宜选用活性低的吸附剂,选用极性溶剂为洗脱剂;分离极性弱的组分,宜选用活性高的吸附剂,一般选用弱极性溶剂为洗脱剂;中等极性组分则选用中间条件进行分离。当一



种溶剂不能实现很好的分离时，选择使用不同极性的溶剂分级洗脱。如一种溶剂作为展开剂只洗脱了混合物中一种化合物，对其他组分不能展开洗脱，需换一种极性更大的溶剂进行第二次洗脱。这样分次用不同的展开剂可以将各组分分离。

洗脱时应该由小极性溶剂开始，逐渐增大洗脱的极性。这种极性的增大是一个十分缓慢的过程，称为梯度洗脱，使吸附在层析柱上的各组分逐个被洗脱。如果极性增大过快（梯度太大），就不能获得满意的分离效果。

**3. 被分离物质** 被分离的物质与吸附剂、洗脱剂共同构成吸附层析中的 3 个要素，彼此紧密相连。吸附剂与洗脱剂固定的情况下，各组分的分离情况直接与被分离物质的结构与性质有关。对极性吸附剂而言，成分的极性越大，吸附性就越强。例如分子中极性基团的数目愈多，被吸附的可能就会更大些。要根据被分离物质的性质，首先要考虑被分离物质的极性，来选择合适的吸附剂与洗脱溶剂。通常欲分离的混合物不同，采用的条件也不同，具体应用时还要通过大量的摸索实践才能找到最合适的分离条件。

## （二）吸附柱色谱

利用混合物中的各组分对固体吸附剂（固定相）的吸附能力不同而达到分离的层析方法。液—固吸附色谱是运用较多的一种方法，特别适用于很多中等分子量的样品（相对分子质量小于 1 000 的低挥发性样品）的分离，尤其是脂溶性成分，一般不适用于高分子量样品如蛋白质、多糖或离子型亲水性化合物等的分离。

吸附柱色谱操作分为装柱、加样和洗脱 3 个步骤。

装柱的方法通常有干法装柱和湿法装柱两种。干法装柱是将吸附剂经漏斗慢慢地加入到柱中，填充完后，打开下端的活塞，用初始的洗脱剂缓缓加入洗脱，除尽层析柱中的气泡，平衡柱子。湿法装柱是把适量的吸附剂和洗脱用的初始的洗脱液调成糊浆状，沿层析柱内壁慢慢的灌入柱中，同时打开下端活塞，让洗脱液缓缓滴出。湿法装柱是采用较多的一种装柱方法，其填充比较均匀，且不易产生气泡。

采用干法（或选用初始的洗脱液将样品溶解后）将被分离样品加入柱中。要求样品溶液尽量体积小，浓度高，才能形成谱带狭窄的原始带，以利于分离。

加样完毕后，就开始用合适的洗脱剂不断冲洗，分段定量收集洗脱液，不断进行薄层色谱（TLC）检测或其他分析，合并组分相同的流分。注意在梯度洗脱过程中，极性要缓慢地渐进地提高，才有利混合物的完全分离。

## （三）分配柱色谱

分配柱色谱是利用混合物在互不相溶的两相中分配系数不同而将混合物分离的层析方法。将溶剂（固定相）吸附于某种惰性固体物质（支持剂）的表面，将吸有固定液的支持剂装入层析柱中，加上欲分离的混合物，用与固定液相不相溶的溶剂（流动相）进行洗脱。通常作为固定相的都是极性大的溶剂，如水、甲醇、甘油等；流动相则常为亲脂性溶剂。混合物就在流动相和固定相之间不断进行分配。不同的物质由于分配系数的差异而在柱上得以分开。分配柱层析所用的仪器、操作过程都与一般吸附柱层析相同。

作为分配柱层析的支持剂需要中性、多孔粉末，无吸附作用，不溶于层析的溶剂系



统，而且能吸附尽量大的固定相，流动相能自由通过。通常用的支持剂有硅胶、硅藻土、纤维素粉等。

先将固定相溶剂和支持剂拌匀，在布氏漏斗上抽去多余的固定相后，倒入事先选好的流动相溶剂中，剧烈搅拌，使两相互相饱和平衡，按湿法装柱。加样的方式基本和吸附柱层析相同。

反相分配层析是用亲脂性溶剂作固定相，极性溶剂作流动相的分配方法。因和上述的两相系统极性相反，故称反相分配层析或逆相分配。在反相分配中，通常用硅油或液体石蜡作固定相。支持剂则是将硅胶中的硅羟基酸化，增强它们的亲脂性，或将硅藻土加热到110℃，冷却后置于含有二氯二甲基硅烷的干燥器中，经如此处理后就可与非极性溶剂混合，而获得一牢固的固定液相。由于这两种分配层析的固定相和流动相的极性正好相反，所以，它们的分配对象完全不同。正常的分配层析适于亲水性物质，如生物碱、苷类、酚性物质、有机酸、糖类等，而反相分配层析则用于亲脂性物质的分离。

#### (四) 离子交换柱色谱

离子交换是利用一种不溶性高分子化合物，它的分子中具有解离性基因（交换型），在水溶液中能与溶液中的其他阳离子或阴离子起交换作用。此种交换反应都是可逆的，并都遵循化学平衡的规律。在层析柱上进行时，由于连续添加新的交换溶液，平衡不断按正反应方向进行，直至完全，因此，可以把离子交换剂上的原有离子全部洗脱下来。如有两种以上的成分被吸着在离子交换剂上，用另一洗脱液洗脱时，它们的被洗脱能力决定于各自洗脱反应的平衡常数。利用各自被洗脱能力的不同进行分离即为离子交换层析。大多用于植物大分子蛋白质、核酸、酵素及多糖体的分离精制。

离子交换柱色谱（ion exchange chromatography）是以离子交换树脂为固定相，以水或含水溶剂为流动相。当上样后流动相流过交换柱时，中性分子和具有与离子交换基团相反电荷的离子将不被交换从柱子下端随流动相一起流出，而具有与离子交换基团相同电荷的离子则被交换吸附到柱子上，用适当流动相洗脱下来，即可达到混合物分离的目的。用离子交换树脂分离不同离子时，样品组分子离子与流动相离子在树脂上产生竞争交换，交换能力弱的离子被流动相洗脱。离子的交换能力可用选择系数表示。选择系数大的离子交换能力强，保留时间长。结果是离子按选择系数的大小顺序洗脱出来。离子交换一般都在柱中进行。如果有两种以上的离子，可利用交换能力的差异把各成分分别洗脱下来。

离子交换树脂是一种不溶、不熔的高分子化合物，外形为球形颗粒，不溶于水，但可在水中膨胀。离子交换基团有磺酸基、羧基、氨基等。根据交换基团的不同，分为阳离子（酸性）交换树脂和阴离子（碱性）交换树脂两种类型。阳离子（酸性）交换树脂含有活泼的酸性基团，能交换阳离子。根据其活性基团的解离度不同，可进一步细分为强酸型、弱酸型和中等酸型。强酸型含有强酸性离子交换基团，中等酸型含有中等酸性离子交换基团，弱酸型是含有弱酸性离子交换基团。阴离子（碱性）交换树脂含有活泼的碱性基团，能交换阴离子。据碱性强弱，可分为强碱型、弱碱型和中等碱型。强碱型含有强碱性离子交换基团——季铵基团，弱碱型是含有弱碱性离子交换基团——伯胺、仲胺或叔胺基团，中等碱型主体结构上既结合有强碱性离子交换基团，又结合有弱碱性离子交换基团。

## 五、制备型加压液相色谱

加压液相色谱是指施加压力于色谱柱进行的液相色谱。根据分离中所用压力的大小分为低压液相色谱、中压液相色谱和高压液相色谱 3 种。可分离的样品量从毫克级到千克级。

### (一) 基本原理

加压液相色谱借助溶质在两相间的分配系数、亲和力、吸附能力、分子大小、离子交换的不同引起的排阻作用的差异使不同的组分得以分离。从进样开始到组分在柱上出现最大浓度所需的时间为保留时间，通常用  $t_R$  表示。在这段时间内流动相流过的体积为保留体积，以  $V_R$  表示。加压液相色谱可以加快洗脱剂的流速，提高分离速度；允许在分离过程中使用颗粒更小的吸附剂，从而获得更好的分离效果。

### (二) 高压液相色谱（高效液相色谱）

制备型高效液相色谱（HPLC）因具有高的柱效和大的载样量，在植物有效成分的分离中扮演重要角色。制备型高效液相色谱系统中色谱柱内填装的粒度范围较窄，直径通常为  $5\sim 30\ \mu\text{m}$ 。为了使流动相流出，需采用较高的压力，系统的复杂性和成本增大，但分辨率得到提高。在许多分离工作中，需要从大量物质中分离纯化微量的所需成分，这种分离工作难度很大，在分离的最后阶段，常需要使用  $10\ \mu\text{m}$  或更小颗粒的高效填料。

制备型高效液相色谱根据其分离样品的量将其分为分析型、半制备型和制备型。分析型制备的样品为  $1\sim 2\ \text{mg}$ ，分析时间较短，制得的样品纯度高，大多能达到 99%；半制备型通常能制备  $10\sim 200\ \text{mg}$  的样品；而制备型通常能制备  $0.5\sim 1.0\ \text{g}$  的样品。但随着上样量的加大，其分离度也将下降。为提高每次分离获得的纯品数量，制备型高效液相色谱分离通常在超载的情况下运行。生产型的色谱也属于制备型色谱的范畴，它所制备的样品量在几百克至几千克之间，所用色谱柱直径经常大于  $150\ \text{mm}$ 。

制备型高效液相色谱常用的分离模式是正相层析、反相层析以及较小范围使用的凝胶渗透和离子交换层析。柱填充材料的选择主要根据目标代谢产物以及样品中存在的其他产物的物理化学性质等来确定。用于 HPLC 的层析洗脱液通常是由有机溶剂的混合物或有机溶剂和水组成（表 8-2），通常含有添加剂，如缓冲盐、酸、碱和离子对试剂等。流动相是根据需要层析的样品的性质和所采用的固定相的兼容性来选择。

表 8-2 常用于正相和反相 HPLC 的溶剂

| 溶剂   | 分子量   | 沸点<br>( $^{\circ}\text{C}$ ) | 折射率<br>( $20\ ^{\circ}\text{C}$ ) | 相对于水的密度<br>( $4\ ^{\circ}\text{C}$ ) | 洗脱值<br>(硅胶) |
|------|-------|------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------|
| 丙酮   | 58.1  | 56                           | 1.359                             | 0.79                                 | 0.43        |
| 四氯化碳 | 153.8 | 77                           | 1.460                             | 1.59                                 | 0.14        |
| 氯仿   | 119.4 | 60.5~81                      | 1.426                             | 0.78                                 | 0.03        |

(续)

| 溶剂   | 分子量  | 沸点<br>(°C) | 折射率<br>(20 °C) | 相对于水的密度<br>(4 °C) | 洗脱值<br>(硅胶) |
|------|------|------------|----------------|-------------------|-------------|
| 乙酸乙酯 | 88.1 | 76.5~77.5  | 1.372          | 0.90              | 0.45        |
| 乙醇   | 46.1 | 78         | 1.360          | 0.79              | —           |
| 甲醇   | 32.0 | 64.6       | 1.329          | 0.79              | 0.73        |
| 甲基亚砷 | 78.1 | 189        | 1.479          | 1.10              | —           |
| 甲苯   | 92.1 | 111        | 1.496          | 0.87              | 0.22        |
| 水    | 18.0 | 100        | —              | 1.00              | >0.73       |

正相层析涉及一个极性固定相（通常是硅烷醇）和较低极性的色谱级洗脱液。在溶质通过柱子的整个过程中，通过吸附到固定相颗粒的表面进行分离，并可被溶剂分子取代洗脱下来。相互作用的强度取决于溶质分子功能团的性质。因此，由于非极性被分析物和高极性的吸附剂颗粒表面的相互作用强度较小，它们比极性被分析物洗脱的更快。洗脱受控于色谱级溶剂的极性；保留时间随着溶剂极性的增加而减少。反相层析中固定相是非极性的而洗脱液是极性的。洗脱液通常由有机溶剂和水的混合物组成。其他的添加物，如缓冲盐、酸、碱和离子对试剂可与洗脱溶剂溶在一起。最常用的固定相是键合相材料。

### (三) 中压液相色谱

中压液相色谱常用的固定相颗粒一般在 25~200  $\mu\text{m}$  之间，最常用的填料尺寸是 15~25  $\mu\text{m}$ ，25~40  $\mu\text{m}$  和 40~63  $\mu\text{m}$ 。中压液相色谱使用比高压液相色谱更小的压力来维持适当的流速。该技术已被应用于制药、食品、化工领域的分离纯化。

### (四) 低压液相色谱

在柱上所施加压力小于 0.5 MPa，需用适于提供压力最高可达 0.6 MPa 的输液泵。颗粒度一般为 40~60  $\mu\text{m}$ 。因此，可保持较高的流速。这种低压液相分离技术应用非常广泛，有时接近 HPLC。

## 六、气相色谱

气相色谱法是在以适当的固定相做成的柱管内，利用气体（载气）作为移动相，使试样（气体、液体或固体）在气体状态下展开，在色谱柱内分离后，各种成分先后进入检测器，用记录仪记录色谱谱图。它主要是一种分析工具，制备量级的应用并不常见，小量制备的气相色谱只是在一般分析型气相色谱的基础上加上设在柱输出端口收集系统构成，这样的装置系统一般能处理毫克级或次毫克级的样品，且需要多次重复进样。如需要处理大量的样品，则柱子的直径就需加大。

根据色谱上出现的物质成分的峰面积或峰高进行定量。峰面积可用面积测定仪测定，按半宽度法求得（即以峰 1/2 处的峰宽 $\times$ 峰高求得）。峰高的测定方法是从峰高的顶点向

记录纸横座标准垂线，找出此垂线与峰的两下端连接线的交点，即以此交点至峰顶点的距离长度为峰高。定量方法可分以下 3 种：

### （一）内标准法

按依次增加或减少的已知阶段量标准被测成分，各自分别加入各单体所规定的定量内标准物质中调制标准溶液。分别取一定量此标准液注入色谱柱，根据色谱图取标准被测成分的峰面积和峰高及内标物质的峰面积和峰高的比例为纵坐标，取标准被测成分量和内标物质量之比（或标准被测成分量）为横坐标，制成标准曲线。然后按单体中所规定的方法调制试样液。在调制试样液时，预先加入与调制标准液时等量的内标物质。然后按制作标准曲线时的同样条件下得出的色谱，求出被测成分的峰面积或峰高和内标物质的峰积或峰高之比，再按标准曲线求出被测成分的含量。所用的内标物质，应采用其峰面积的位置与被测成分的峰的位置尽可能接近，并与被测成分以外的峰位置完全分离的稳定的物质。

### （二）绝对标准曲线法

按依次增加或减少阶段法取标准被测成分，各自调制标准液，注入一定量后，按色谱图取标准被测成分的峰面积或峰高为纵坐标，而以标准被测成分的含量为横坐标，制成标准曲线。然后按单体中所规定的方法制备试样液。取试样液按制标准曲线时相同的条件作出色谱，求出被测成分的峰面积和峰高，再按标准曲线求出被测成分的含量。

### （三）峰面积百分率法

以色谱中所得各种成分的峰面积的总和为 100，按各成分的峰面积总和之比，求出各成分的百分率。

## 七、高速逆流色谱技术

高速逆流色谱技术（high-speed counter-current chromatography, HSCCC）是一种液-液分配分离技术。利用特殊的流体动力学现象（单向性流体动力平衡），既具有基本流体动力平衡特征，又能实现移动相高流速时稳定的固定相保留，从而获得高效的逆流分离色谱。

### （一）高速逆流色谱技术的特性

HSCCC 的流动相、固定相均为液体，且互不相溶。利用螺旋柱运动时产生的离心力，使两相溶剂系统不断混合。固定相保留在聚四氟乙烯管中，利用恒流泵连续输入流动相，随流动相进入螺旋柱的溶质在两相间持续分配，按分配系数大小被先后洗脱。HSCCC 中聚四氟乙烯管中的固定相无需载体，为液-液色谱系统，故而消除了气-液和固-液色谱中因使用载体而带来的吸附现象，特别适于分离极性物质和生物活性物质。同时，由于流动相和固定相均为液体，样品可全部回收，分离纯化与制备可同步完成，故特别适于制备性分离。因固定相为液体，体系更换与平衡方便、快捷。与 HPLC 相比，HSCCC

进样量较大，最多可达数克，是 HPLC 的数百倍；与常压、低压色谱相比，HSCCC 的分离能力强，且分离时间短，数小时即可完成，纯度多在 98% 以上。分离效果主要与溶剂体系的选择和旋转速度、样品制备、洗脱方法等有关。目前，此项目技术已用于生物化学、生物工程、医学、药学、天然产物化学、有机合成、化工、食品、环境等领域，开展此项技术研究的科学家遍及世界各地。

## （二）分离原理

高速逆流色谱的基础是螺旋管内溶剂相的特殊分布状态和特征。利用单向性流体动力平衡这一特殊的流体动力学现象，使被分离物质在两相溶剂系统中进行分配和分离。首先在螺管中注满一相为固定相（事先与另一相互相饱和），另一相为移动相。在每个螺旋单元中都能保留相当量的固定相。当溶质从移动相入口处引入后，就会不断经历各螺旋单元中的两相分配过程，各组分按其不同的分配系数得以分离，形成无载体液—液分配色谱。

高速逆流色谱对样品前处理要求较低，样品处理量较大（可达数百毫克），而且操作方式灵活多样，除了上、下相均可作为移动相外，还可连续进样。另外，还可将存留于管柱中的溶于固定相的组分改用固定相作为流动相洗脱出来，或直接用  $N_2$ （空气）推出柱外进行回收。在分离复杂或难分离的组分时，可采用不同溶剂系统进行多次分离。溶剂回收后还可重复使用。因此，HSCCC 可用做分离、制备纯品，做 HPLC 的前处理。采用小管柱内径，高转速的分析型仪器连接积分仪可做定量分析。

## （三）操作步骤

首先制备两相溶剂系统。将固定相注满管柱，排净柱中空气，仪器配重。按选定流速泵入移动相，至移动相到达螺旋管柱时，使仪器按选定转速运转，此时，尾端排出的固定相体积相当于溶剂瓶至首端的管柱容积，也可在主机转动后先以高速泵入移动相，稍后将流速调为正常。当尾端有移动相流出时，说明管柱内两相分布的平衡态已建立，此时，对检测器和记录仪调零，走基线，进样，并分别收集分离后的馏分。

## （四）溶剂系统的选择

HSCCC 分离的成功与否决定于溶剂系统的正确选择。可采用二元、三元或四元系统来制备两相溶剂。如果用的 DCCC 溶剂基本双相系统有正丁醇—水，氯仿—水，正庚烷—乙腈和正庚烷—甲醇，可用辅助溶剂甲醇、乙醇、丙酮、乙酸、正丙醇、异丙醇、氯烷烃等调整系统的极性。

一般溶剂系统选择原则是不造成样品的分解或变性，有适当的溶解度及分配系数（注意温度的影响）固定相能实现足够高的保留（一般  $>50\%$ ，可在分液漏斗中先进行简单的分层试验，要求分层时间不超过 30 s），分离效果好。

## （五）洗脱方法

若采用疏水性溶剂系统，按顺时针方向转动，以上相为移动相时应由尾端至首端洗脱，而以下相为移动相时应由首端到尾端洗脱；若采用亲水性溶剂系统则反之。除了一般



洗脱方式外，还可采用分级洗脱和梯度洗脱的方式。

### (六) 仪器运行参数的确定

影响两相分布和分离效果的因素十分复杂。在溶剂系统选定之后，仪器体系及其运行参数是主要因素。

仪器体系的影响因素主要有螺旋单元数（分离效率正比于螺旋单元数）、螺旋管内径（分配效率反比于螺旋管内径）、螺旋直径、管柱材质及离心力场。仪器的运行参数主要是螺旋的转速和移动相的流速，可根据固定相保留值及分离效果来进行选择。

### (七) 样品溶液的制备及进样

制备样品溶液时溶剂的选择及进样量对 HSCCC 的固定相保留值和色谱峰分辨率均有影响。若选用固定相溶解样品，进样后样品混入固定相，洗脱时组分按  $K$  值的大小顺序洗出，峰的分辨率较高，分配效率低。若采用移动相溶解样品，进行后各组分易随移动相前进，较早出现的峰分辨率将严重降低。一般说来，进样量加大时，固定相保留值将会减小，峰形分辨率也会降低。如果用等量的上下相混合溶解样品时，样品溶液保持两相共存的状态，进样后较早或较迟出现的峰均能保持较好的分辨率。因此，应选择适当的进样量。

## 八、反相液相色谱

反相液相色谱是一种以疏水作用为基础的色谱分离模式。由于它具有分辨率高、重复性好、回收率高等优点，在蛋白质及多肽的分离分析中得到了极为广泛的应用。它能有效地分离各种多肽混合物，特别适用于分子量不大的蛋白质和多肽物质的分离、纯化和鉴定，在蛋白质及多肽研究中已得到了广泛的应用。RPLC 在 20 世纪 50 年代就已用于许多有机小分子的分离和分析，80 年代后逐步应用于生物大分子如蛋白质、多肽、核酸的鉴定，并用于制备规模的分离。反相液相色谱与各种质谱技术的结合也已成为蛋白质结构分析的重要手段和发展方向。

### (一) 简介

反相液相色谱 (reverse-phase liquid chromatography, RPLC) 是目前液相色谱分离中使用最为广泛的一种模式，它的特点是固定相的极性比流动相弱。由于 RPLC 固相载体的疏水性，它可以根据流动相中被分离物质分子疏水性的不同而发生强弱不同的相互作用，从而使不同分子在反相柱中彼此分离。疏水性较弱的样品分子和固定相间的相互作用较弱，因此较快流出；反之，疏水性相对较强的分子和固定相间存在较强的相互作用，在柱内保留时间相对较长。与其他色谱方法相比，RPLC 具有分辨率和回收率高、重复性好、操作简便等优势，已成为广泛使用的一种分离模式，普遍用于多肽和蛋白质的分离分析。

### (二) 反相液相色谱分离原理

RPLC 分离与流动相中溶质分子与固定相配基间的疏水相互作用有关。溶质在 RPLC

上的保留是吸附机制和分配机制共同作用的结果。对于多肽和蛋白质这样的生物大分子，由于其分子尺度往往比固定相表面疏水键合相大得多，通常以表面部分区域与固定相发生作用，其保留机制多被认为是主要基于它们在疏水固定相上的吸附。在多肽及蛋白质的RPLC中，初始洗脱条件下洗脱液中有机成分浓度较低，分子与固定相疏水作用较强，几乎完全被固定相吸附。而一旦洗脱液中有机成分达到特定浓度，使得多肽或蛋白质与固定相作用小于流动相与固定相的作用时，分子完全从固定相上洗脱下来，几乎不再与固定相发生作用。这一保留机制也被人称为“on-off”机制。正由于多肽和蛋白质这种特殊的保留机制，洗脱液成分极微小的改变就会大大影响多肽和蛋白质的保留行为，从而保证疏水特征相近的多肽或蛋白质得以充分分离。

## 九、膜色谱技术

膜色谱技术是液相色谱和膜分离相结合的一种新技术，将膜分离和色谱这两种技术有机地结合起来，发挥各自的长处，选择制备合适的膜，将对生物大分子有特异性和选择性的基团连接到膜的表面及孔壁中去，从而制备一种新型的色谱介质（称为膜色谱介质，或称为膜吸附剂），融合了二者之长，具有快速、高效、高选择性、易于放大等特点，能满足生物大分子高效分离与纯化的需要，在生物大分子的分离与纯化中已日益受到人们的重视，必将得到广泛的应用。

### （一）膜色谱的原理和特点

膜色谱采用具有一定孔径的膜作为介质，连接配基，利用膜配基与蛋白质等目标分子之间的相互作用进行分离纯化。当料液以一定流速流过膜的时候，目标分子与膜介质表面或膜孔内基团特异性结合，而杂质则透过膜孔流出，待处理结束后再通过洗脱液将目标分子洗脱下来。其纯化倍数可达数百乃至上千倍。膜色谱是目前生物大分子分离中最为有效的方法之一，其特点为：

膜色谱中的每一片膜都相当于一个短而粗的吸附床层，膜厚相当于床层高度，当床层体积一定时，这种结构有利于在相同压降下获得更高的流速，从而提高了分离速度和处理量；与液相色谱技术相比，膜表面的配基与液流主体间的扩散路径很短，膜介质只受表面液膜扩散及吸附动力学的影响，消除了传统色谱中占主要地位的孔扩散阻力，传质极快，大大改善了传质效果，提高了配基的利用率和总的分离速度，缩短了分离时间，一次循环操作时间一般只是普通填料柱的1/10，提高了生产效率，并有利于保持配基和目标蛋白的生物活性；采用了膜介质，整个床层的压降大为降低，一般只用低压蠕动泵即可满足分离要求，这样既降低了设备投资和运行费用，也避免了液流与泵体直接接触，便于无菌操作和防止蛋白质失活；配基修饰过的膜介质选择性与填充柱相当，在采用足够的膜堆和梯度洗脱技术之后，可以获得较高的分离纯化效果；膜介质具有良好的刚性，能够承受较高的压力，且便于进行放大。

与普通的膜技术相比，用膜色谱分离时，由于它不单是利用膜孔径的大小，更主要的是利用其特异性和选择性，不受相对分子质量大小的限制，原则上讲，只要选择合适的膜，采用有效的活化手段，键合上能与这种物质产生亲和相互作用的配位基，它就可以从

复杂体系，尤其是细胞培养液和发酵液中分离和制取出任何一种目标物。可以预见，膜色谱分离是生物大分子分离纯化的有力工具。

## （二）膜色谱分类

根据配基与目标蛋白的相互作用方式，膜色谱可分为四类：亲和膜色谱（affinity membrane chromatography, AMC），离子交换膜色谱（ion-exchange membrane chromatography, IMC），疏水作用膜色谱（hydrophobic interaction membrane chromatography, HIMC），多级膜色谱（multistage membrane chromatography, MMC）。亲和膜色谱（AMC）分离原理与亲和色谱基本相同，主要是基于欲分离物质和键合在膜上的亲和配位基之间的生物特异性相互作用。疏水作用膜色谱（HIMC）由于疏水配基结构简单，通用性好且成本较低，已成为蛋白质分离纯化的常用技术之一。疏水膜色谱上的配基，常用的有甲基、丁基、苯基、辛基、己二胺、聚乙二醇等，通过目标物质与这些配基之间疏水作用的不同而实现分离。离子交换膜色谱（IMC）主要是利用膜介质表面的离子交换基团与目标蛋白等分子间的相互作用进行分离的，它主要用于蛋白质的分离纯化，根据离子交换基团的性质，可分为强酸型、弱酸型、强碱型和弱碱型。多级膜色谱（MMC）即将不同类型的膜介质组合在一起形成新的色谱柱进行分离，这里的技术关键是根据目标产物选择适当的膜介质排列顺序和缓冲液条件，以便使上一层洗脱下来的目标蛋白能够被下一层吸附。如果安排合理，多级膜色谱可以大大缩短混合产品的分离时间，提高分离效率。

## （三）膜色谱的制备

在膜材料选定以后，常采用以下两种路线制备成膜色谱柱：①膜材料→成膜→活化→配基偶联。这条路线主要是利用现有的商品膜，通过对其进行偶联改性来获得所需膜色谱柱。②膜材料→活化→配基偶联→成膜。这条路线是从最简单的膜材料入手，先制备功能化的膜材料，再使之成膜。配基一般是指能够与目标产物进行可逆的和特异性结合的分子或基团，按其来源可分为天然配基（凝集素、肝素、核苷酸、蛋白 A、蛋白 G 等）和人工合成配基（活性染料、过渡金属离子、人工合成肽段、烷基等）两类。按作用对象，配基又可分为特异性配基和通用性配基。特异性配基能够与目标分子高度特异性结合，基本上是一一对应的关系，通用性配基则能对具有特定基团的某一类分子进行特异性吸附但是纯化倍数不如特异性配基。配基在与载体偶联后，才能形成有分离作用的亲和介质。偶联的流程有两种：一种是先将普通载体的表面进行活化，再将配基偶联上去；另一种方法则是先将配基偶联到载体原料上，再利用偶联后的原料制备亲和载体。一般来说，前一种方法（先活化再偶联）配基用量较少、利用率较高，故应用较广。配基偶联方法较为常用的有溴化氰法、环氧乙烷法、三嗪法、羰基二咪唑活化法、高碘酸盐氧化法、硼氢化钠还原法、磺酰氯法、碳二亚胺法、混合酸酐法和氟甲基吡啶盐法等，其中前四种方法目前应用最为普遍和有效。

## 十、疏水色谱法

在生物工程下游技术中通常需要从复杂的混合体系中分离提纯生物活性物质，疏水相

互作用色谱法 (hydrophobic interaction chromatography, HIC) 作为一种新的色谱技术, 具有柱容量大、洗脱条件温和、不易使生物大分子丧失活性等的优点, 从而引起了人们广泛的兴趣。疏水相互作用色谱法是利用蛋白质表面疏水性区域与固定相上疏水性配基相互作用力的差异, 将不同蛋白质组分分离开来。与离子交换色谱法、亲和色谱法相比, 疏水相互作用色谱法中蛋白质与固定相的相互作用力较弱, 蛋白质活性在色谱分离过程中不易丧失, 近几年来, 疏水相互作用色谱法得到了广泛的应用。

和其他色谱方法一样, 疏水相互作用色谱法是利用样品中各组分与色谱填料上配基相互作用力的差异, 在洗脱时由于各组分移动速度的不同而达到分离的目的。配基通常是一些疏水性基团, 如丁基、苯基等。蛋白质表面多由亲水性基团组成, 也有一些由疏水性较强的氨基酸 (如亮氨酸、缬氨酸和苯丙氨酸等) 组成的疏水性区域。不同种类蛋白质的表面疏水性区域多少不同, 疏水性强弱也不同; 对于同一种蛋白质在不同介质中, 其疏水性区域 (裂隙) 伸缩程度也不同, 从而使疏水性基团暴露的程度呈现出一定的差异。疏水相互作用色谱法正是利用盐—水体系中样品组分的疏水性基团和色谱填料的疏水性配基相互作用力的不同而使样品组分得以分离的。

## 十一、亲和层析

亲和层析 (affinity chromatography, AC) 是依据蛋白质等生物大分子能够通过范德华力、疏水力、空间和静电相互作用, 与配位体特异、可逆地结合在一起的特性, 从复杂的生物样品中分离得到所需的目标产物。亲和层析是蛋白质纯化的一种重要的方法, 是利用偶联亲和配体的亲和吸附介质为固定相亲和吸附目标产物, 使目标产物得到分离纯化的液相层析法。它具有很高的选择和分离性能以及较大的载量。只需要一步处理即可使某种待分离的蛋白质从复杂的蛋白质混合物中分离出来, 达到千倍以上的纯化, 并保持较高的活性。近几十年来, 亲和层析技术发展十分迅速, 并在生物技术产品、生物分子及组织的分离和纯化领域取得令人瞩目的成就。目前亲和层析技术被广泛的应用在蛋白质研究和制备领域, 是分离纯化以及分析生物大分子尤其是蛋白质的有力工具。亲和层析技术是基于蛋白质可与另一种称做配体的分子能发生特异的可逆结合, 所谓配体是指能被蛋白质所识别并为之结合的原子、原子团和分子。把待纯化的某种蛋白质的特异配体, 通过化学反应共价连接到载体表面的功能基上构成配基。载体性能方面允许蛋白质自由通过。当含有目的蛋白的混合样品加到该配基上时, 目的蛋白即和其特异性的配体结合而吸附在配基表面, 而其他杂蛋白则被洗出。被特异地结合在配基上的目的蛋白质可用自由配体分子或通过改变缓冲液的条件使之解吸附, 并进一步收集。

### (一) 常规亲和层析

亲和层析方法根据配体的来源不同可分为生物特异亲和层析和人工配体亲和层析。生物特异亲和层析法包括免疫亲和层析、凝集素亲和层析、核酸亲和层析等, 另外还有以酶或底物为配体的亲和层析或以黏附蛋白或受体蛋白为配体的亲和层析, 其特点是配体为生物分子。



免疫亲和层析 (IAFC) 是用抗体与其相应抗原的作用具有高度的特异性和高度结合力的特点, 用适当的方法将抗原或抗体结合到层析载体上, 便可有效的分离和纯化各自互补的免疫物质。影响免疫亲和层析纯化的因素主要有三方面, 首先是抗原或抗体的初浓度, 其次是两者之间的亲和力, 再次是抗原抗体是否容易解离。单克隆抗体技术的出现极大地推动了免疫亲和层析技术的发展。只要得到特定单抗, 利用其作为配体, 通过亲和层析, 即可从复杂的混合物中分离、纯化特定抗原成分。凝集素亲和层析 (LAFC) 是助于凝集素亲和层析对一些寡糖或糖肽进行结构分析的方法, 它具有特异、敏感、快速的特点, 使得凝集素成为糖链结构分析的一种常用工具。更重要的是, 该技术可用于分离糖基化的蛋白, 对于几乎所有膜蛋白, 这项技术是极其有用的。核酸亲和层析 (DNA/RNA2AFC) 极大地促进了核酸结合蛋白以及调节蛋白特性的研究, 是目前分离多聚核苷酸及其结合蛋白的最有力方法。

人工配体亲和层析也称为通用配体亲和层析, 是指利用一些人工配体对不同的蛋白质有亲和性的特点, 通过亲和层析来纯化这些蛋白质的方法。主要包括金属螯合亲和层析和染料配体亲和层析等。

金属螯合亲和层析 (IMAC) 也称固相化金属离子亲和层析, 该方法是利用蛋白质表面暴露的一些氨基酸残基和载体之上的金属离子之间的相互作用而进行的亲和纯化。这些氨基酸残基包括组氨酸、色氨酸、赖氨酸等。目前采用的固定金属离子螯合剂主要有亚氨基二乙酸 (IDA) 和次氨基三乙酸 (NTA) 两种。金属螯合亲和层析具有配体简单、吸附量大、分离条件温和、通用性强等特点。

染料配体亲和层析 (DAFC) 所用的染料主要有两类, 一类是 Cibacron, 另一类是 Procion。这些染料结构中都有三嗪环, 环上有 1~2 个可被取代的氯原子。三嗪环可与羟基反应偶联到载体上, 在它们之间形成醚键。染料的结构类似于某些酶类的底物, 如 Cibacron Blue F3GA 与 NAD 的分子结构类似, 它是许多酶和蛋白质的极有效的吸附剂, 是纯化脱氢酶、激酶、血清蛋白、干扰素、多种血浆蛋白等极好的配体。染料配体亲和层析具有蛋白结合容量大, 是天然配体蛋白质结合量的 102 100 倍, 配体偶联方法简单、易于操作、蛋白质洗脱容易, 适于大规模应用, 而且廉价易得等优点。具有普遍适用性。

## (二) 新型亲和层析

新型的亲和技术包括膜亲和过滤、亲和萃取、亲和沉淀和亲和电泳。

**1. 膜亲和过滤** 膜亲和过滤技术是将亲和作用同膜分离过程结合起来的技术。这一技术方法包括两个分支: 亲和错流过滤与亲和膜分离技术。亲和错流过滤 (affinity cross-flow filtration, 简称 ACFF) 是将水溶性或非水溶性高分子亲和载体产物进行特异性反应, 然后用膜进行错流过滤。这一技术是生物化学、化学工程和生物工程等多门学科前沿的交叉点, 它将亲和层析和膜过滤特别是超滤技术有机结合, 兼有亲和层析和膜过滤的优点, 从而成为目前研究的热点。亲和膜分离技术 (affinity membrane chromatography 简称 AMC) 是将亲和层析同膜分离技术有机结合起来, 相得益彰。与 ACFF 相比, AMC 是带有亲和配基的分离膜直接进行产物分离, 因此, “亲和膜”就成了该种纯化技术的“中心”。不论是 ACFF 还是 AMC, 其应用在很大程度上受膜的限制。一般来说, 膜亲和过滤



中要求膜对溶剂（水）具有高渗透压，分子截留范围窄，以获得高的分离效能，有一定的机械强度、化学和热稳定性，抗污染能力强，容易清洗和灭菌；对于亲和膜还要求膜表面具有足够多可利用的化学基团，使其能够进行活化，接上合适的间隔臂和配基以及足够高的表面积和足够大的孔径。另外，在 ACFF 中要注意亲和载体和膜之间的作用。亲和载体吸附到膜上可能导致膜的渗透率下降，并且可能形成水力膜而具有自身排斥的特性。

**2. 亲和萃取** 亲和萃取（affinity partition）就是将亲和层析同双水相有机结合，极大地丰富和发展了双水相。在亲和萃取中，一种配基与另一种成相聚合物以共价相结合，由于这种配基与欲提取的目的产品有很强的亲和力，这样体系不但具有双水相处理量大的特点，而且具有亲和层析专一性高的优点。能否有效回收和循环利用连接有配基的聚合物是亲和萃取能否成功应用的关键。

**3. 亲和沉淀** 亲和沉淀（affinity precipitation）是配基—产品复合物的沉淀。亲和沉淀利用了诸如核苷酸一类的双功能配基，这些配基之间通过“间隔臂”分子（bis-NAD<sup>+</sup>）连接起来。双功能配基能同多亚基蛋白质的活性部位以非共价的形式结合，因而发生沉淀。亲和沉淀被认为是分离纯化酶及蛋白质的强有力的技术手段，这种方法可以较经济有效地使用配基，能够大规模、快速、特异性地分离纯化酶及蛋白质。但是，同膜亲和过滤和亲和萃取比较而言，亲和沉淀的发展较为缓慢。

**4. 亲和电泳** 亲和电泳（affinity electrophoresis，简称 AEP）是亲和层析和电泳技术的结合。将亲和层析的吸附剂包埋到琼脂凝胶板上制得 AEP 载体，电泳时对配基具有亲和作用的化合物迁移率下降或保留在起点。现在，AEP 已经成为分析生物分子间特异作用常用的生物化学技术之一，已被广泛用于生物样品的分离纯化与鉴定。AEP 包括外原凝集素亲和电泳与毛细管亲和电泳等。外原凝集素亲和电泳（lectin affinity electrophoresis, LAE）是利用外原凝集素（lectin）对目的蛋白质的特异性作用进行亲和电泳的技术。毛细管电泳是 20 世纪 80 年代初发展起来的一种新型分离技术，具有速度快、分离效率高、样品用量少等特点，从而成为 90 年代最重要分离分析手段之一。将亲和技术应用在毛细管电泳中，形成了毛细管电泳的一个新的分支：毛细管亲和电泳（capillary affinity electrophoresis, CAE）。

## 第五节 植物有效成分提取的其他技术

### 一、超临界流体萃取技术

超临界流体萃取（supercritical fluid extraction, SFE）技术是 20 世纪 60 年代兴起的一种新型分离技术，广泛用于化工、石油、食品、医药、香料等许多领域。由于其选择分离效果好、提取率高、产物没有有机溶剂残留、有利热敏物质和易氧化物质的萃取等特点。SFE 技术逐渐被应用到植物活性代谢产物的提取分离上，并且与 GC、IR、GC-MS、HPTLC 等联用形成有效的分析技术。

传统的提取方法，如水蒸气蒸馏法、减压蒸馏法、溶剂萃取法等。其工艺复杂、产品纯度不高，而且以残留有毒、有害的有机溶剂。而超临界流体萃取技术是利用流体在超临

界状态时具有密度大、黏度小、扩散系数大等优良的传质特性而成功开发的。它具有提取率高、产品纯度好、流程简单、能耗低等优点，并且其操作温度低，系统密闭，尤其是适合不稳定、易氧化的挥发性成分和脂溶性、分子质量小的物质的提取分离，为此类成分的提取分离提供了目前最先进的办法。

有多种物质可作为 SPE 用溶剂，但最常用的是二氧化碳。对极性较强、分子量较大的物质，采用在超临界 CO<sub>2</sub> 中加入适宜的夹带剂或改良剂，如甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、水等，改善流体溶解性质，使超临界流体萃取对生物碱、黄酮类、皂苷类等非挥发性有效成分的应用也日趋普遍。可见，这项技术在未来具有广阔的发展前景。典型的 SPE 系统见图 8-4。

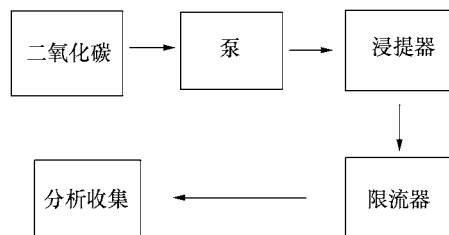


图 8-4 典型的 SPE 系统

### （一）超临界流体萃取的基本原理

超临界流体是处于临界温度和临界压力下的物质状态，在其临界点附近的范围内，由于非常大的流体密度变化，流体兼有了气、液体双重特性，以临界流体状态形式存在，气体冷凝及液体蒸发在临界状态下不发生，流体的扩散系数与气体状态接近，具有较快的传质速率；流体的密度与液体状态接近，单位流体的溶解能力较大。超临界流体的特性使其成为理想的萃取溶剂。溶质在 SCF 中的溶解度，随压力和温度的变化而明显变化，最敏感区域为临界点附近区域，在此区域内，温度和压力的微小变化导致流体密度极大的改变，溶质的溶解度也有较大的改变，由此可达到选择性分离的目的。

超临界流体萃取分离过程的实现是利用超临界流体的溶解能力与其密度的关系，即利用压力和温度对超临界流体溶解能力的影响而进行的。当气体处于超临界状态时，成为性质介于液体和气体之间的一种特殊的单一相态的超临界流体（SF）。SF 具有十分独特的物理化学性质，具有和液体相近的密度，黏度只是气体的几倍，但远低于液体，扩散系数比液体大 100 倍左右。因此，更有利于传质，对物料有较好的渗透性和较强的溶解能力，能够将物料中某些成分提取出来。某些超临界流体的物理性质和其他参数见表 8-3。由表 8-3 可以看出，二氧化碳具有温和的临界温度和适中的相对临界压力，为最常用的超临界流体。一般情况下，超临界温度在 0~100℃ 范围的流体，适合于植物有效成分的提取。SPE 过程包括 5 个步骤：流体在被提取介质周围形成膜；流体穿透进入固体介质，并在介质中扩散；化合物从介质中解吸，并溶于流体；提取物从介质中扩散出来；提取物通过包围介质的流体膜，扩散到流体中。

表 8-3 某些超临界流体的物理参数

| 物质               | 超临界温度 (°C) | 临界压力 (MPa) | 相对分子量 | 偶极性 |
|------------------|------------|------------|-------|-----|
| CO <sub>2</sub>  | 31.04      | 7.38       | 44    | 0.0 |
| N <sub>2</sub> O | 36.5       | 7.24       | 44    | 0.2 |
| NH <sub>3</sub>  | 132.5      | 11.35      | 17    | 1.5 |

SF 具有选择性溶解物质的能力, 并且这种能力随超临界条件 (温度、压力) 的变化而变化。在超临界状态下, 将 SF 与待分离的物质接触, 使其有选择性地溶解其中的某些组分。SF 的密度和介电常数随着密闭体系压力的增加而增大, 因此, 利用程序升压可将不同极性的成分进行分步提取。当然, 对应各压力范围所得到的萃取物不可能是单一的, 但可以通过控制条件得到最佳比例的混合成分。临界点附近, 温度、压力的微小变化, 都会引起  $\text{CO}_2$  密度显著变化, 从而引起待萃取物的溶解度发生变化, 因此, 可通过控制温度或压力的方法达到萃取目的。然后通过减压、升温或吸附的方法使超临界流体变成普通气体, 让被萃取物质分离析出, 从而达到分离提纯的目的。这就是超临界流体萃取的基本原理。这种化工分离的手段被称为超临界流体萃取。

## (二) 超临界流体萃取的工艺流程

超临界流体萃取的工艺流程包括萃取和分离步骤。首先将萃取剂由常温、常压状态转变为超临界流体状态, 然后将萃取流体导入样品管内进行萃取; 萃取流体导入吸附柱分离溶质, 减压挥发溶剂; 选用适当溶剂洗脱待测组分。其萃取过程基本上由萃取和分离两个阶段组成。如图 8-5 所示, 典型的流程一般有变压萃取 (等温法)、变温萃取分离 (等压法)、吸附萃取法、稀释萃取分离 (惰性气体法) 4 种。

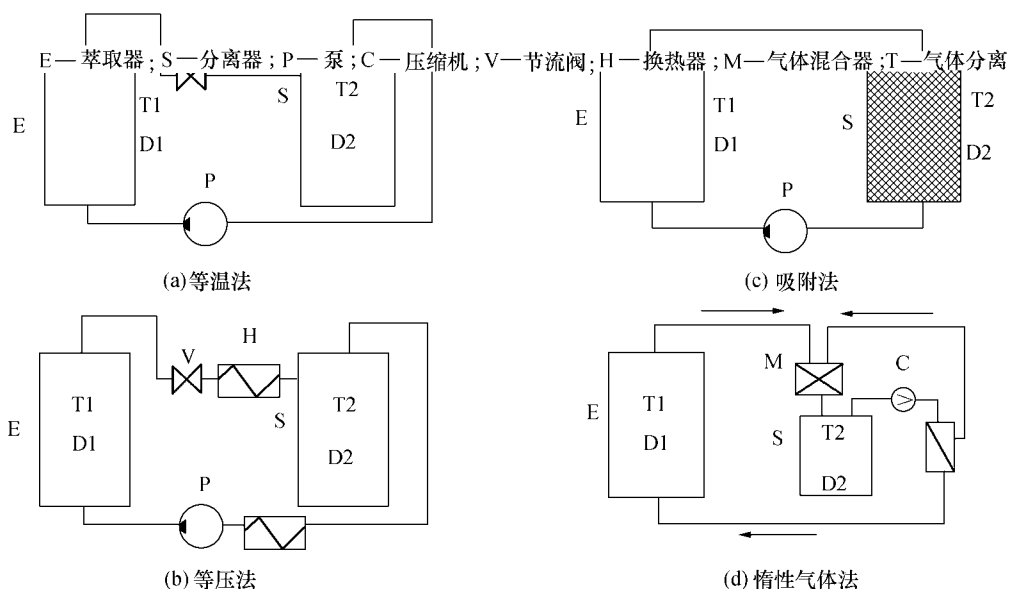


图 8-5 超临界萃取典型流程

**1. 变压萃取分离** 等温变压法是目前应用最为方便的一种流程。超临界萃取相经膨胀阀进入分离槽, 萃取相的溶解度随压力下降而下降, 析出萃取质。如图 8-5(a), 溶液经压缩升压达到临界状态, 经换热后冷却进入萃取器与被提取原料接触。由于超临界流体所具有的高扩散性特点, 传质过程很快就达到了平衡。在这个过程中, 维持压力不变, 随后提取物进入分离器减压分离。经分离器分离后的超临界流体的溶解能力下降, 溶媒开始从流体中析出。减压了的流体再经压缩机升压回到临界状态, 循环使用。

**2. 变温萃取分离** 超临界萃取相从萃取槽进入加热器, 萃取相溶解能力随温度升高而下降, 分离出萃取质, 萃取相可循环利用。根据操作压力的不同, 也可以加热萃取, 而后降温冷却分离再生萃取剂。在等压条件下, 通过改变过程的温度可实现溶质与溶媒的分离。当等压升温时, 超临界流体密度下降, 溶解能力同时下降, 此时溶质的蒸汽压升高, 溶解能力会有所增加。但是, 等压变温流程要根据压力及物料来确定升温还是降温。

## 二、离子交换层析技术

### (一) 概述

离子交换是利用一种不溶性高分子化合物在水溶液中与溶液中的其他阳离子或阴离子进行交换。此种交换反应都是可逆的, 并都遵循化学平衡的规律。根据这一原理可以用离子交换法直接从植物油抽提液中交换含游离离子基因的酸、碱及两性成分, 使与糖类等无游离离子基因的中性物质分开, 而被吸着的物质也可用另一洗脱下来, 这就是常用的离子交换法。如有两种以上的成分被吸着在离子交换剂上, 用另一洗脱液洗脱时, 它们的被洗脱能力决定于各别洗脱反应的平衡常数。利用各别被洗脱能力的不同进行分离即为离子交换层析。

最早使用的离子交换剂是天然的无机化合物硅铝酸钠。由于它交换量小, 纯度及物理性能均较差, 加上高分子化学的发展, 目前大部分采用合成离子交换剂, 其中用途最广的是离子交换树脂。另外, 也有在纤维素或多聚糖上人工引入交换基所成的离子交换剂, 大多用于植物大分子蛋白质、核酸、酵素及多糖体的分离精制。

### (二) 离子交换原理

用离子交换树脂分离不同离子时, 样品组离子与流动相离子在树脂上产生竞争交换, 交换能力弱的离子被流动相洗脱。结果是离子按选择系数的大小顺序洗脱出来。以离子交换树脂为固定相, 以水或含水溶剂为流动相, 当上样后流动相流过交换柱时, 柱中随流而下的样品相继与新树脂接触进行可逆交换, 中性分子和具有离子交换基团相反电荷的离子将不被交换从柱子下端随流动相一起流出, 而具有与离子交换基团相同电荷的离子则被交换吸附到柱子上, 用适当流动相洗脱下来, 即可达到混合物分离的目的。如果有两种以上的离子, 可利用交换能力的差异把各成分分别洗脱下来。

### (三) 层析柱的准备

把树脂放在烧杯中, 加水充分搅拌, 将气泡全部赶掉。放置几分钟使大部分树脂沉降, 倾去上面的泥状微粒。反复上述操作到上层液透明为止。粒度小的树脂, 搅拌后要放置稍久, 因为较难沉降。如果急于倒水, 往往损失较大。准备如图 8-6 的层析管, 在底部放一些玻璃丝。玻璃丝一般含有少量水溶性碱, 因此, 要用水煮沸后反复洗涤到洗涤液呈中性为止。用玻璃棒或玻璃管将其压平, 厚 1~2 cm 即可。上述准备好的树脂, 加少量水搅拌后倒入保持垂直的层析管中, 使树脂沉下, 让水流去。如果把粒度大小范围较大的

树脂和多量的水搅拌后分几次倒入，柱子上下部的树脂粒度往往会不一致。另外，在离子交换中要注意不让气泡进入树脂层。如果有气泡进来，样品溶液和树脂的接触就不均匀。因此，要注意把液面经常保持在树脂层的上面。

#### (四) 柱填料的选择

阳离子交换树脂根据交换基团活性大小，分强酸性、弱酸性阳离子交换树脂。强酸性阳离子交换树脂在母核上连许多磺酸基 ( $-\text{SO}_3\text{H}$ )，交换反应是同磺酸基中的  $\text{H}^+$  进行交换。弱酸性阳离子交换树脂在母核上连有许多羧基 ( $-\text{COOH}$ ) 或磷酸基 ( $-\text{PO}_3\text{H}_2$ )，母体有芳香族和脂肪族两种。脂肪族中用甲基丙烯酸和二乙烯基苯聚合的较多，芳香族类型用二羟苯甲酸和甲醛聚合的较多。交换反应是同羧基中的  $\text{H}^+$  进行交换。一些酸性阳离子交换树脂的性质见表 8-4。

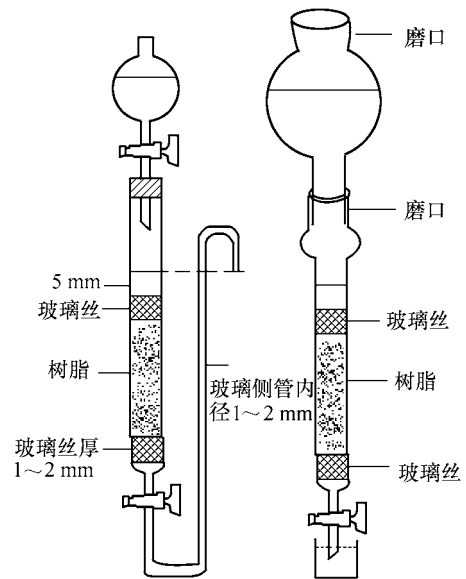


图 8-6 离子交换层析柱

表 8-4 一些酸性阳离子交换树脂的性质

| 树脂                  | 官能团     | 带相反电荷的离子      | 支持剂              | 容量 (meq/100 mL) | pH 范围    | 网孔范围和大小 ( $\mu\text{m}$ ) |
|---------------------|---------|---------------|------------------|-----------------|----------|---------------------------|
| Dowex - IX2 - 100   | 三甲基苄基苯胺 | $\text{Cl}^-$ | 聚苯乙烯<br>凝胶 2% 交联 | 70              | 0~14.0   | 50~100<br>150~200         |
| Amberlite IRA - 400 | 季胺      | $\text{Cl}^-$ | 聚苯乙烯<br>凝胶 8% 交联 | 140             | 0~14.0   | 16~50<br>500~1 000        |
| Diaion SA20A        | 二甲基苄基苯胺 | $\text{Cl}^-$ | 聚苯乙烯<br>凝胶       | 130             | 0~14.0   | 40~60<br>350~550          |
| QAE - Sephadex      | 季胺      | $\text{Cl}^-$ | 右旋糖苷             | 50              | 2.0~12.0 | 100~400<br>40~120         |
| A - 25 TSKgel       | 季胺      | $\text{Cl}^-$ | 聚苯乙烯             | >370            | 1.0~14.0 | >400                      |
| SAX                 |         |               | 二乙烯基苯            |                 |          | 5                         |
| DEAE - Sephadex     | 二乙基氨基乙基 | $\text{Cl}^-$ | 右旋糖苷             | 50              | 2.0~12.0 | 100~400<br>40~120         |
| A - 25 Amberlite    | 二乙基氨基乙基 | 游离碱           | 丙烯酸的 DVB         | 110             | 0~9.0    | 16~50                     |
| IRA - 35            |         |               | 大孔树脂             |                 |          | 500~1 000                 |
| Diaion WA 10        | 二乙基氨基乙基 | 游离碱           | 聚丙烯酸<br>凝胶       | 120             | 0~9.0    | 40~60<br>350~550          |



阴离子交换树脂也同样可分为强碱性和弱碱性。强碱性阴离子交换树脂在母核上连许多季胺基  $[-N(CH_3)_3^+ OH^-]$ ，母体同苯乙烯强酸性树脂相同。交换反应是在  $-N(CH_3)_3^+ OH^-$  中的  $OH^-$  与被分离的阴离子之间进行的。这种强碱性树脂对酸、碱、有机溶剂也比较稳定，但在浓硝酸中不稳定。游离型(OH型)比盐型(如Cl型)耐热性差，超过  $40\sim 50\text{ }^\circ\text{C}$  就不稳定，因此一般用Cl型。弱碱性阴离子交换树脂在母核上连有许多  $-NH_2$ 、 $=NH$ 、 $\equiv N$  等伯胺、仲胺、叔胺，交换反应是在胺基上进行。一些弱碱性阴离子交换树脂的性质见表 8-5。

表 8-5 一些碱性阴离子交换树脂的性质

| 树脂                      | 官能团 | 带相反电荷的离子 | 支持剂            | 容量<br>(meq/100 mL) | pH 范围    | 网孔范围和大小 ( $\mu\text{m}$ ) |
|-------------------------|-----|----------|----------------|--------------------|----------|---------------------------|
| Dowex -<br>50X2 - 100   | 磺酸  | $H^+$    | 聚苯乙烯<br>2%交联度  | 60                 | 0~14.0   | 50~100                    |
| Diaion<br>SK 1B         | 磺酸  | $Na^+$   | 聚苯乙烯<br>凝胶     | 190                | 0~14.0   | 40~60<br>400~600          |
| Amberlite<br>IR - 122   | 磺酸  | $Na^+$   | 聚苯乙烯<br>10%交联度 | 210                | 0~14.0   | 16~50<br>500~1000         |
| TSKgel<br>SCX           | 磺酸  | $Na^+$   | 聚苯乙烯<br>二乙烯基苯  | >420               | 1.0~14.0 | >400<br>5                 |
| CM - Sephadex<br>A - 25 | 羧甲基 | $Na^+$   | 右旋糖苷           | 56                 | 2.0~12.0 | 100~400<br>40~120         |
| Duolite<br>C - 433      | 羧基酸 | $H^+$    | 聚苯乙烯<br>凝胶     | 420                | 5.0~14.0 | 16~50<br>500~1000         |
| Cellex CM<br>(螯合)       | 羧甲基 | $H^+$    | 纤维素            | 70                 | 5.0~12.0 | 200~400                   |
| TSKgel<br>CM - 3SW      | 羧甲基 | $Na^+$   | 硅胶             | >30                | 2.0~7.5  | >400<br>10                |

选择哪一种离子交换树脂，主要考虑被分离物质带何种电荷以及电性的强弱。被分离的物质如生物碱或无机阳离子时，选用阳离子交换树脂；如是有机酸或无机阴离子时，选用阴离子交换树脂。被分离的离子吸附性强(交换能力强)，选用弱酸或弱碱性离子交换树脂。

### (五) 树脂的预处理与再生

预处理是使用一切离子交换树脂前必不可少的程序。一般的树脂都含有在合成时混入的可溶性小分子有机物和铁、钙等杂质。因此，进行离子交换以前需做预处理，将杂质除去。首先把新树脂浸在蒸馏水中  $1\sim 2\text{ d}$ ，使它膨润后，装在层析管中。

强酸性阳离子交换树脂的预处理是先用树脂体积的 20 倍的  $2\text{ mol/L}$  盐酸进行交换，使它变为 H 型后用水洗到流出液呈中性。然后用树脂体积的 10 倍量的  $1\text{ mol/L}$  氢氧化钠

(食盐) 进行交换。使它变为 Na 型。再用水洗到流出液不含  $\text{Na}^+$  为止。再重复一次盐酸、氢氧化钠 (或食盐) 处理。最后用树脂体积的 10 倍量的 1 mol/L 盐酸进行交换, 使它变为 H 型, 然后用蒸馏水洗到流体液呈中性为止。强碱性阴离子交换树脂的预处理是先用树脂体积的 20 倍的 1 mol/L 氢氧化钠溶液使它变为 OH 型, 用树脂体积的 10 倍量的水洗涤。然后用树脂体积的 10 倍量的 1 mol/L 盐酸溶液使它变为 Cl 型。用蒸馏水洗到流出液近中性为止。再重复一次氢氧化钠、盐酸处理。最后用树脂体积的 10 倍量的 1 mol/L 氢氧化钠溶液进行交换, 使它变为 OH 型。

弱酸性阳离子交换树脂的预处理是先用树脂体积的 10 倍量 1 mol/L 盐酸溶液使它变为 H 型。用水洗到流出液呈中性为止。然后用树脂体积的 10 倍量的 1 mol/L 氢氧化钠溶液使它变为 Na 型, 此时体积膨胀。用树脂体积的 10 倍量的水洗涤, 流出液仍然呈弱碱性。再重复一次盐酸、氢氧化钠处理。最后用树脂体积的 10 倍量的 1 mol/L 盐酸溶液使它变为 H 型。用水洗到中性。弱碱性阴离子交换树脂的预处理与强碱性阴离子交换树脂基本相同。变为 Cl 型后用水洗涤时因为水解的关系不容易洗到中性。一般用树脂体积的 10 倍量水洗涤。

用过的树脂, 如还要交换同一种样品, 把盐型变为游离型即可。如要交换其他样品, 要用预处理的方法再生。不用时加水, 保存在广口瓶中。

## (六) 上样

离子交换用的柱子有玻璃、有机玻璃、塑料及不锈钢各种制品, 但都要耐酸碱。装柱法同吸附柱层析中的湿法装柱。将样品溶在水中或酸碱溶液中配成样品溶液, 加入柱内, 溶液中的离子与树脂上的离子发生交换而被吸附在树脂上。为了使交换反应进行得完全, 要把流速控制在  $1\sim 2 \text{ ml}/(\text{cm}^2 \cdot \text{min})$ , 待样品溶液流完, 用蒸馏水冲洗树脂柱, 洗去残液, 再进行洗脱。

## (七) 洗脱

不同成分所用洗脱剂不同, 原则上是用一种吸着物质更活泼的离子把吸着物质替换出来。常用洗脱剂是酸、碱、盐的水溶液及各种不同离子浓度的缓冲液。如在阳离子交换树脂通常用醋酸、磷酸缓冲液。在阴离子交换树脂中常用氨水、吡啶等缓冲液, 对复杂得多组分可用梯度洗脱法, 洗出液按体积分段收集, 层析检识, 合并相同组分, 回收溶剂即可得单一化合物。简单的梯度混合器见图 8-7。

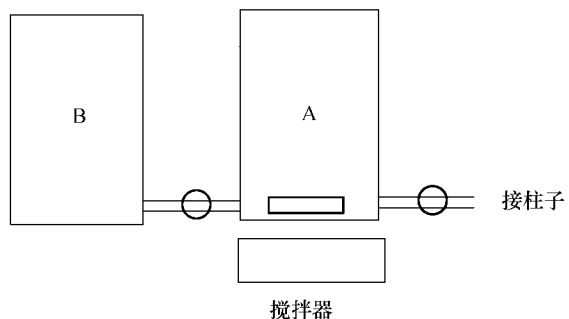


图 8-7 代表性的梯度混合器

## (八) 影响离子交换色谱分离的因素

**1. 离子交换树脂的交联度和交换容量** 离子交换树脂中交联剂的含量称为交联度 (degree of cross linking)。通常以重量百分比表示。交换容量 (exchange capacity) 是指

每克树脂能参加交换反应的活性基团数。通常以每克干树脂或每毫升溶胀后的树脂能交换离子的毫摩尔数来表示,一般为1~10 mmol/g。它反映了离子交换树脂进行交换反应的能力。在一定范围内树脂的交联度越大,交换容量越大,组分的保留时间越长。交联度与树脂孔隙大小有关。交联度大,形成网状结构紧密,网眼小,选择性高。但是,交联度也不宜过大,否则网孔结构过于紧密,网眼过小,反而阻碍溶液中离子进入树脂内部,降低离子交换反应的速度,体积较大的离子甚至扩散到树脂内部,而降低了交换容量。

**2. 溶液的酸碱度** 当交换溶液中氢离子的浓度显著增高时,则因同离子效应,抑制了阳离子交换剂中的酸性基团的电离,故离子交换反应就很少进行,甚至不进行。

**3. 对交换离子的选择性** 离子交换剂主要取决于化合物的解离离子的电荷、半径及酸碱性的强弱。解离常数大,酸碱性强者置换容易,但洗脱相对来说较难。解离离子价数越高,电荷越大,则它的吸附性越强,越易交换在交换树脂上。

**4. 被交换溶质的浓度** 欲交换分离的化合物,离子交换操作通常是在水溶液或含有水的极性溶剂中进行,这样有利解离与交换。浓度低的溶液对离子交换的选择性大。在高浓度时,解离度会趋向减少,有时会影响吸附次序及选择性;浓度过高时,亦会引起树脂表面及内部交联网孔收缩,影响离子进入网孔。

**5. 流动相的组成和 pH** 交换能力强的配衡离子组成的流动相有较强的洗脱能力。一价离子的保留与流动相中配衡离子的浓度成正比。但强离子交换树脂的交换容量在很密的范围内不随流动相的 pH 变化。调节 pH 的作用主要体现在对弱电解质离解的控制,溶质的离解受到抑制则保留时间变短。

**6. 溶质离子的电荷和水合半径** 在一般情况下,价态高的离子选择系数大。同价阳离子在酸性阳离子交换树脂上选择系数随其水合离子半径的增大而变小。在常温下,稀溶液中阳离子对强酸性阳离子交换树脂的交换顺序:  $\text{Fe}^{3+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ni}^{2+} \geq \text{Cu}^{2+} \geq \text{Mn}^{2+} \geq \text{Mg}^{2+} > \text{K}^{+} > \text{Na}^{+} > \text{H}^{+}$ 。常见阴离子在强碱性阴离子交换树脂上的交换顺序通常为  $\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{NO}_3^{-} > \text{CN}^{-} > \text{Cl}^{-} > \text{OH}^{-}$ 。

**7. 温度** 稀溶液的改变对交换的性能影响不大,但在 0.1 mol/L 以上浓度时,温度升高对水合倾向大的离子容易交换吸附。一般温度升高,离子交换速度加快,在洗脱时亦可提高洗脱能力。但对不耐热的交换剂应注意提高温度的条件,避免引起交换树脂的破坏。

### 三、膜分离技术

膜分离技术(membrane separation technique, MST)是一项新兴的高效分离技术,是21世纪现代分离技术中重点研究、开发和应用的技術之一,已被国际公认为最有发展前途的一项重大高新生产技术,是利用有选择性的薄膜,以压力为推动力实现混合物组分分离的技术。可将溶液中的物质按分子量大小进行分离,从而达到分离、分级、纯化、浓缩的目的。膜分离技术包括微滤、超滤、纳滤和反渗透等。

以超滤技术为代表的膜分离技术是现代分离技术领域先进的技术之一,具有明显的

优越性：可在原生物体系环境下实现物质分离，有效膜面积大，滤速快，无二次污染；富集产物或滤除杂质效率高：无需加热浓缩，适用于热敏性成分。因其在常温下操作无相变，能耗低等优点，特别适用于热敏性物质和生物活性物质的处理，因而在植物有效成分分离提取中有着极为广阔的应用前景。

### （一）膜分离技术的基本原理

膜分离技术的基本原理是以压力为推动力，实现溶质与溶剂的分离（表 8-6）。当液体体系进入滤器时，在滤器内的滤膜表面发生分离，溶剂（水）和其他小分子质量溶质透过具有不对称微孔结构的滤膜，大分子溶质和微粒（如蛋白质、细菌、胶体等）被滤膜阻留，从而达到分离、提纯和浓缩产品的目的。

表 8-6 各种膜分离法的原理

| 膜分离法    | 传质动力             | 分离原理 | 应用对象        |
|---------|------------------|------|-------------|
| 微滤（MF）  | 压差（0.05~0.5 MPa） | 筛分   | 消毒、澄清收集细胞   |
| 超滤（UF）  | 压差（0.1~1.0 MPa）  | 筛分   | 大分子物质分离     |
| 反渗透（RO） | 压差（1.0~10 MPa）   | 筛分   | 小分子溶质浓缩     |
| 透析（DS）  | 浓度差              | 筛分   | 小分子有机物和无机离子 |

滤膜的工作面是极薄的致密层。该层上微孔的孔径小至 2~15 nm，下面是结构较疏松的支撑层，空隙大于 15 nm。这种典型的膜结构，使得液体在分离过程中大分子溶质的微粒随溶液切向流经膜表面时，由于液体的快速流动，使得这些物质既不能进入致密细孔，引起膜内堵塞，也不会停留在膜面上形成表面的堵塞。而小分子物质和溶剂则在压力驱动下穿过致密层上的微孔后，即能顺利穿过下部的疏松支持层，进入膜的另一侧，从而使膜在长期连续运行中能保持较恒定的产量和分离效果，可长期、反复使用。

### （二）膜技术的优越性

- 1. 选择范围广，适用性强** 膜技术包括反渗透、纳滤、超滤、微滤、透析、电渗析、渗透蒸发、液膜、膜萃取、膜蒸馏等，为满足各种生产的需求提供了广阔的选择空间。
- 2. 富集产物效率高** 根据活性物质或杂质分子质量的情况，选择一定孔径范围的滤膜，一次或两次即可完成富集和杂质的除去。其操作方便，过程简单，分离效率高。
- 3. 常温操作，不破坏活性成分** 根据分子质量大小选择不同孔径膜，达到富集有效物质的目的。该技术不需要加热，能耗低，尤其是适用于热不稳定性活性物质的分离。
- 4. 可分级分离** 可分离不同分子质量范围的溶质，在中草药制剂特别是注射液的制备中备受青睐。
- 5. 简化工艺** 缩短生产周期，节约资源（尤其是乙醇），从而降低成本，提高经济效益。

## 四、超声波提取技术

超声提取技术是以超声波辐射压强产生的骚动效应、空化效应引起机械搅拌，加速扩

散溶解的一种新型提取方法，能够加速所提取成分的扩散并与溶剂充分混合，大大提高了有效成分的提取效率。

其原理主要是利用超声的空化作用对细胞膜的破坏，有助于有效成分的溶出与释放。超声波使提取液不断震荡，有助溶质扩散。同时，超声波的热效应使水温基本在 57℃，对原料有水浴作用。超声波提取与传统的回流提取、索氏提取法等比较，具有提取速度快、时间短、收率高、无需加热等优点，已被许多分析过程选为供试样处理的手段。

植物粉末提取过程中，与超声波直接作用的主要是粉末粒子表面上的植物细胞。这些细胞破碎后可以很快提取出目标产物。但在粉末颗粒内部的大量细胞在超声波作用下，提取出的目标产物须经过颗粒内部的扩散才能到达颗粒表面，扩散穿过颗粒表面的液膜进入液相主体中。

超声提取的效果不仅取决于超声波的强度和频率，而且与被破碎物质的机构功能有一定关系。超声提取的频率和时间都会影响有效成分的得率。植物有效成分大多为细胞内产物，提取时往往需要将细胞破碎，而现有的机械或化学破碎方法有时难以取得理想的效果，所以，超声破碎在提取中已显示出明显的优势。超声提取避免了高温加热对有效成分的破坏。但操作时对容器壁的厚薄、放置的位置要求比较高。目前实验研究都处于小规模阶段，要用于大规模生产，还需要解决有关工程设备的放大问题。

## 五、分子印迹技术

分子印迹技术来源于免疫学的发展，早在 20 世纪 40 年代，著名的诺贝尔奖获得者 Pauling 在研究抗体生物合成理论时就提出了以抗原为模板来合成抗体的理论，为分子印迹的发展奠定了一定的理论基础。1949 年，Dickey 在制备硅胶吸附剂时提出了“专一性吸附”的概念。1972 年，德国的 Wulff 研究小组首次报道了人工合成分子印迹聚合物，分子印迹才越来越得到学术界和工业界的关注。1993 年瑞典 Lund 大学的 Mosbach 等在《Nature》上发表有关茶碱分子印迹聚合物的报道，提出了非共价 MIT 方法，并将这项技术运用于色谱固定相的制备。近 10 年来，MIT 技术发展极其迅速，在许多领域展现了独特的魅力。分子印迹技术逐渐成为国内外的研究热点。

### （一）分子印迹技术的基本概念和原理

分子印迹技术，又称分子烙印（molecular imprinting technology, MIT），是一种高选择性分离技术，是指为获得空间结构和结合位点上与某一分子（模板分子）完全匹配的聚合物的实验制备技术。这种技术是选用能与印迹分子产生特定相互作用的功能性单体，在印迹分子周围与交联剂进行聚合，形成三位交联的聚合物网络，然后，通过合适的溶剂除去印迹分子，在聚合物网络中形成空间和化学功能与印迹分子互补的空穴（图 8-8）。整个聚合过程可分为三步：印迹、聚合、去除印迹分子。首先以具有适当功能基的功能单体与模板分子结合形成单体——模板分子复合物；然后，选择适当的交联剂将功能单体互相交联起来形成共聚物，从而使功能单体上的功能基在空间排列和空间定向上固定下来；最后，通过一定的方法把模板分子脱去，这样就在高分子共聚物中留下一个与模板分子在



空间结构上完全匹配，并含有与模板分子专一结合的功能基的三维空穴。这个三维空穴可以选择性的重新与模板分子结合，即对模板分子具有专一性识别作用。

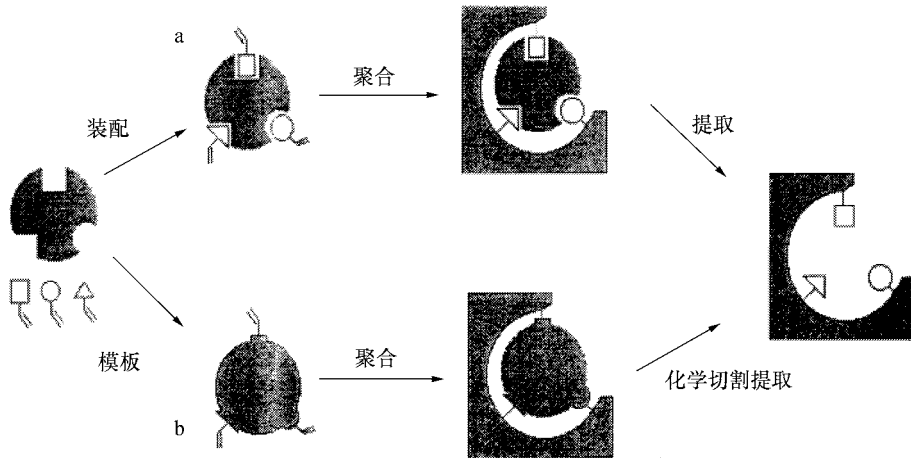


图 8-8 分子印迹技术的基本作用原理

MIT 制备出来的分子印迹聚合物 (molecular imprinting polymer, MIP) 不仅具有特定的选择性和高亲和性的分子识别材料，而且还具有很好的物理化学稳定性，能多次重复使用而不损失其分子记忆效应。

## (二) 分子印迹聚合物的制备方法

将印迹分子和功能单体按照一定比例混合后在一定条件下反应，印迹分子和功能单体之间存在一定的分子间作用力 (如氢键、范德华力或共价键)；加入交联剂，使之与前面的印迹分子功能单体复合物通过聚合反应形成聚合物；将印迹分子从聚合物中抽提出来，形成具有一定空穴的分子印迹聚合物。分子印迹聚合物中的空腔和印迹分子形状、大小完全一样，可以对印迹分子实现特异性识别。具体的制备方法有以下几种：

**1. 传统方法 (沉淀聚合)** 将功能单体在溶液中排列在印迹分子周围，交联干燥后，将其研磨、破碎、筛分，得到一定粒径的分子印迹介质，最后洗脱除去模板分子。

**2. 原位聚合** 针对沉淀聚合的缺点 (如处理过程繁杂，规则粒子的柱效低，模板难以除去等)，Svec 和 Frechet 发展了一种在色谱柱中聚合的原位聚合方法，制得可直接使用的分子印迹色谱柱。

**3. 乳液聚合** 将模板分子、功能单体、交联剂溶于有机溶剂中，然后将溶液移入水中，搅拌、乳化，最后加入引发剂交联、聚合，可直接制备粒径较均一的球形分子印迹介质。

**4. 悬浮聚合** 采用全氟化碳液体作为悬浮介质，代替传统的有机溶剂——水悬浮介质，从而消除了非共价印迹中存在的不稳定的预组织体。

**5. 表面印迹** 通过对粒子表面进行修饰，制备分子印迹聚合物材料。这种方法不仅可以利用粒子的机械稳定性，还可以通过对粒子本身性能的调节来适应应用的需要。

### (三) 分子印迹技术的分类

按照单体与模板分子间作用力的不同,分子印迹技术可分为分子自组装(非共价法)和分子预组织(共价法)。两者的主要区别在于单体与模板分子结合的机理不同。分子自组装是指单体和模板分子之间通过弱的相互作用来合成。分子预组织是通过单体和模板分子之间形成可逆性共价键来合成单体—模板分子复合物。

**1. 自组装法(非共价法)** 印迹分子与单体通过非共价键作用力结合,包括氢键、偶极作用、离子化作用、疏水作用等。分子识别作用是通过多重分子间作用实现的,具有立体效应。这些分子在交联剂参与下,在空间上被固定形成三位交联的聚合物网络,然后用溶剂将印迹分子除去,得到的中间具有空穴的分子。用这种方法合成的 MIP 具有高度的记忆性。

**2. 预先组组法(共价法)** 印迹分子与单体通过共价键结合,当加入交联剂共聚后,印迹分子通过化学过程从聚合物网络上断开,然后再用某种溶液将印迹分子洗脱下来,形成具有空腔的分子印迹聚合物。这类聚合物曾用于多种化合物的特定性识别,如糖类及其衍生物、氨基酸及其衍生物、芳基酮类等。

除了这两种基本模式外,还有一种技术是两者的结合,即聚合时单体与印迹分子间的作用力是共价键,而在对印迹分子的识别过程中,两者的作用是非共价键。这种高产量组合分子印迹技术简化了条件,优化了工作,大大提高了 MIP 的制备效率。预计这种方法将成为今后制备 MIP 的重要发展方向。

## 六、电泳亲和色谱技术

亲和色谱利用亲和配体与目标组分间的特异性结合作用实现对目标组分的纯化,在生物物质的分析和分离领域得到日益广泛的应用。在亲和色谱的分离过程中,液相主体中的溶质分子必须经过一系列扩散过程才能进入到固定相颗粒孔内完成吸附或解吸等质量置换反应,被置换出的物质再由颗粒内扩散出固定相颗粒进入流动相。与质量置换反应过程相比,扩散过程由于速度较慢而常成为亲和色谱分离过程的速度控制步骤。袁乃驹等把亲和色谱与制备电泳技术相结合,利用电场强化扩散过程以加速分离过程的进行将多通道流动电泳与亲和色谱相结合,形成一种新型制备规模的生物分离技术,即电泳亲和色谱技术。

电泳亲和色谱的分离过程在由膜隔开的多通道电泳槽中进行,电场方向与各腔室中的溶液流动方向垂直。带不同电荷的蛋白质混合物进入进样室,带电的目标组分在电场作用下迁移进入介质室,被亲和介质吸附。带电性质与目标组分相近的杂质蛋白在电场作用下通过介质室,继续迁移进入冲洗室并被冲洗溶液带出;而带电性质与目标组分相反的杂质蛋白质在电场作用下直接迁移进入另一侧的冲洗室,然后被冲洗液带出,减少了杂质蛋白质在介质中的非特异性吸附,从而提高了分离过程的选择性。吸附完成后,引入洗脱缓冲溶液,在电场作用下将目标组分从介质上洗脱下来,并迁移入冲洗室被冲出,完成分离过程。电泳亲和色谱实验流程如图 8-9 所示。实验时,首先用泵将吸附缓冲溶液连续输入电极室、冲洗室和进样室,然后开启电泳仪电源。当亲和介质与吸附缓冲溶液达到平衡

后，将含蛋白质的样品缓冲溶液泵入进样室，开始电泳吸附。电泳吸附过程持续约 60 min 后，进行 15 min 左右的电泳淋洗。之后关闭电泳仪电源，将缓冲溶液更换为洗脱缓冲溶液，再打开电泳仪电源，进行电泳洗脱。实验结束后，用 6 mol/L 尿素再生介质。

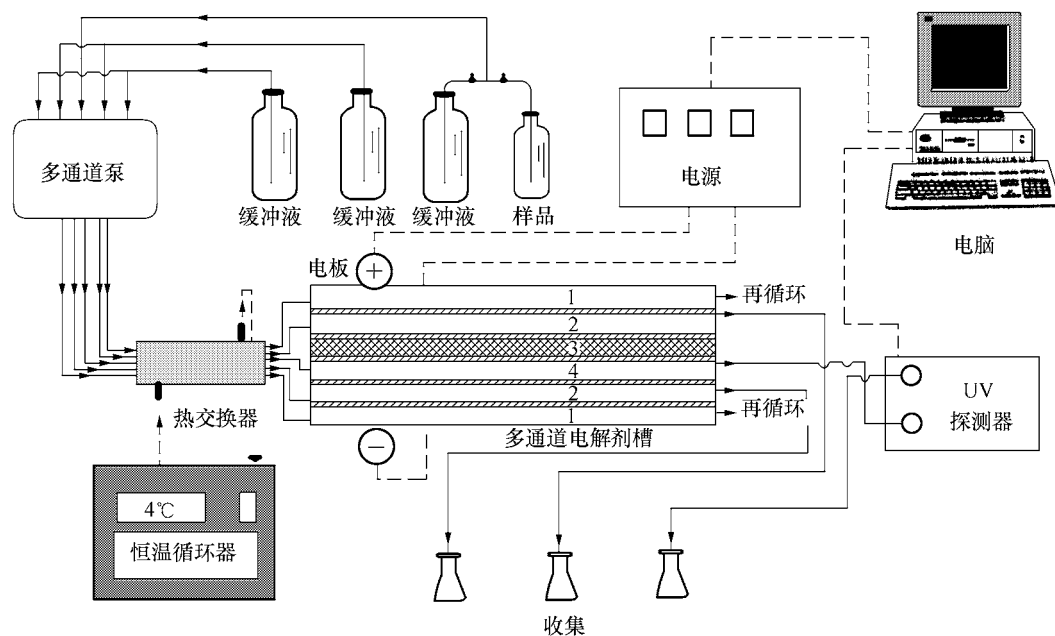


图 8-9 电泳亲和色谱实验流程

## 七、浊点萃取技术

浊点萃取 (cloud point extraction, CPE) 是近年来出现的一种新型液-液萃取技术，它是中性表面活性剂胶束水溶液的溶解性和浊点现象为基础，通过改变实验参数 (如温度、压力、电解质 P 等) 而引起相分离，从而将水溶性物质与亲油性物质分离。由于该法不需使用挥发性有机溶剂，因而不污染环境，具有经济、安全、高效、操作简便、应用范围广等特点，且能用于大规模生产中的分离纯化。目前，它已成功地应用于金属螯合物、生物大分子的分离与纯化，环境样品的前处理，以及分析检测的前处理过程中。它经济、安全、高效、操作简便、应用范围广。作为分离纯化方法，易于大规模生产，作为样品前处理方法可与高效液相色谱 (HPLC)、流动注射分析 (FIA) 等后序仪器分析方法联用。

表面活性剂的重要功能之一是它的增溶作用。增溶作用是表面活性剂在水溶液中浓度达到临界胶束浓度而形成胶束后，能使不溶或微溶于水的有机物的溶解度显著增大，形成澄清透明溶液的现象。形成的增溶体系是热力学稳定体系。表面活性剂胶束溶液的形成和浊点现象表面活性剂分子通常由疏水和亲水两部分组成。疏水部分在水溶液中聚集成核，亲水部分向外张开形成胶束。表面活性剂在水溶液中形成胶束的最小浓度称为临界胶束浓

度 (CMC), 最低温度称为临界胶束温度 (CM T)。表面活性剂类型不同, 溶液条件不同, 胶束形态各异, 如圆形、椭圆形、圆柱形。平时应用表面活性剂性质最多的是它的增溶作用, 很多微溶于水或不溶于水的物质可以与表面活性剂结合后溶于水。CPE 法除了利用增溶作用外, 还利用了表面活性剂另一个重要性质——浊点现象。一个均一的表面活性剂水溶液在外界条件 (如温度) 变化时, 因为引发相分离而突然出现浑浊的现象叫浊点现象, 此时的温度叫做浊点温度 (CP)。静置一段时间 (或离心) 后会形成两个透明的液相: 一为表面活性剂相 (约占总体积的 5%), 另一为水相 (胶束浓度等于 CMC)。外界条件 (如温度) 向相反方向变化, 两相便消失, 再次成为均一溶液。溶解在溶液中的疏水性物质如膜蛋白, 与表面活性剂的疏水基团结合, 被萃取进表面活性剂相, 亲水性物质留在水相, 这种利用浊点现象使样品中疏水性物质与亲水性物质分离的萃取方法就是浊点萃取。图 8-10 显示了由温度变化引发的这种相分离现象。温度的改变, 引起水化层的破坏, 增强了表面活性剂的疏水性。相分离是熵 (倾向于水与胶束相溶) 与焓 (倾向于水与胶束相分离) 竞争的结果。一般说来, 表面活性剂的浊点随其憎水部分的碳链的增长而降低, 随亲水链的增长而升高; 随浓度的增大而升高。表面活性剂溶液的相分离行为与表面活性剂的种类有关。

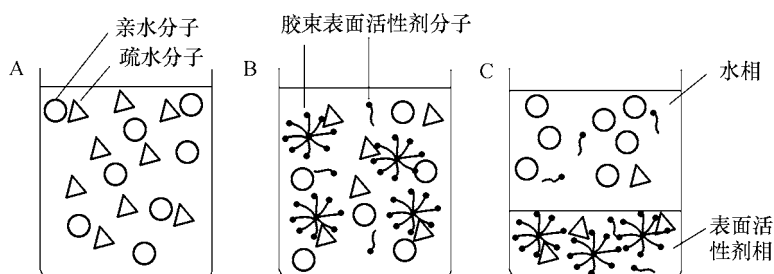


图 8-10 温度引发表面活性剂相分离现象

(A) 含有疏水性萃取物的初始溶液

(B) 加入表面活性剂后萃取物与胶束结合

(C) 改变溶液条件发生相分离

## 参 考 文 献

- [1] 成坚. 双水相体系萃取分离技术及其在生物技术中的应用. 仲恺农业技术学院学报, 2000 (2): 52~58
- [2] 陈灏, 陈欢林. 膜色谱技术在生物大分子分离与纯化中的应用. 膜科学与技术, 2001 (5): 65~71
- [3] 邓修, 吴俊生. 化工分离工程. 北京: 科学出版社, 2000
- [4] 酆韶骅, 刘铮, 丁富新等. 电泳亲和色谱技术分离蛋白质. 生物工程学报, 1999 (3): 408~412
- [5] 国大亮, 朱晓薇. 双水相萃取法在天然产物纯化中的应用. 天津药学, 2006 (18): 64~67
- [6] 何炳林, 史作清. 大孔离子交换树脂及新型吸附树脂的结构与性能. 高分子通报, 2005 (8): 13~19
- [7] 胡松青, 李琳, 郭祀远等. 双水相萃取技术研究新进展. 现代化工, 2004 (6): 22~26

- [8] 姜忠义, 吴洪. 分子印迹技术. 北京: 化学工业出版社, 2003
- [9] 蒋福龙. 生物技术产品分离纯化技术研究进展. 化工时刊, 2000 (12): 13~15
- [10] 李洪利, 黄捷, 周丽. 亲和层析技术在现代蛋白质研究中的应用及新发展. 海洋湖沼通报, 2005 (3): 86~94
- [11] 李洁, 何德. 生物大分子分离技术: 过去、现状和未来. 生物技术通报, 2006 (3): 49~53
- [12] 李杨, 韩梅. 亲和层析技术在生物学中的应用及发展. 生命科学研究, 2006 (1): 12~17
- [13] 黎海彬, 李小梅. 大孔吸附树脂及其在天然产物研究中的应用. 广东化工, 2005 (3): 22~25
- [14] 凌均建, 宗敏华, 杜伟. 新型亲和技术在下游过程中的应用. 工业微生物, 2001 (2): 54~57
- [15] 刘彬果, 郭文勇, 钟蕾, 宓鹤鸣. 大孔树脂吸附技术在中药制剂中的应用. 解放军药学学报, 2003 (6): 452~455
- [16] 刘国诠. 生物工程下游技术. 北京: 化学工业出版社, 1993
- [17] 娄文勇, 宗敏华, 刘森林等. 反胶束萃取酶蛋白的研究进展. 工业微生物, 2001 (4): 54~58
- [18] 卢艳花, 魏东芝, 蒋晓萌. 中药有效成分提取分离技术. 北京: 化学工业出版社, 2005
- [19] 骆健美, 卢学英, 张敏卿. 微波萃取技术及其应用. 化工进展, 2001 (12): 46~49
- [20] 马岳, 阎哲, 黄骏雄. 浊点萃取在生物大分子分离及分析中的应用. 化学进展, 2001 (1): 25~32
- [21] 王锦, 雷孝, 何文礼等. 分子印迹技术的应用进展. 化学与生物工程, 2006 (4): 4~6
- [22] 王云, 王峥. 疏水色谱法在生化研究中的应用. 常熟高专学报, 2000 (4): 78~80
- [23] 王云, 常玲, 吴金男. 疏水色谱法及其在生物大分子分离纯化中的应用. 烟台师范学院学报 (自然科学版), 2002 (2): 135~140
- [24] 王洋. 大孔吸附树脂研究进展. 中国中药杂志, 2006 (31): 961~965
- [25] 袁帅, 张文英. 膜分离技术在生化产品制备中的应用. 湘潭师范学院学报 (自然科学版), 2005 (1): 54~56
- [26] 汪洪武, 刘艳清. 大孔吸附树脂的应用研究进展. 中药材, 2005 (4): 353~356
- [27] 严希康. 生化分离技术. 上海: 华东理工大学出版社, 2001
- [28] 杨宏顺, 陈复生, 于志玲等. 反胶束萃取技术在食品科学中的研究进展. 郑州工程学院学报, 2001 (4): 42~45
- [29] 姚红娟, 王晓琳. 膜分离技术在低分子量生物产品分离纯化中的应用. 化工进展, 2003 (2): 146~152
- [30] 张学红. 超临界流体萃取技术. 知识介绍, 2006 (6): 33~34
- [31] 张玉忠, 肖长发. 膜色谱技术的进展. 天津工业大学学报, 2004 (4): 94~97
- [32] 翟孔嘉. 现代生物技术导论. 北京: 高等教育出版社, 1999
- [33] 鄧文波, 顾铭, 宋江楠, 欧阳藩. 高速逆流色谱技术在生物大分子分离纯化中的应用. 生物技术通讯, 2005 (1): 96~99
- [34] 朱晓因, 苏志国. 反相液相色谱在蛋白质及多肽分离分析中的应用. 分析化学, 2004 (2): 248~254
- [35] 周思翔, 华慧, 王正荣. 基因工程的下游技术. 国外医学生物医学工程分册, 2003 (4): 173~180
- [36] Aguilar M I, Hearn T W. Methods Enzymol., 1996 (270): 3~26
- [37] Chen S H, Ho C T, Hsiao K Y, Chen J M. J. Chromatogr. A, 2000 (891): 207~215
- [38] Hearn M T W. Protein Purification 2nd ed, New York: John Wiley & Sons Inc., 1998: 239~282
- [39] Fahrner, R. L. et al. Industrial purification of pharmaceutical antibodies: development, operation, and validation of chromatography processes. Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 2001, 18: 301~327
- [40] Fischer R, Emans N. Molecular farming of pharmaceutical proteins. Transgenic Reserch, 2000 (9):



279~299

- [41] George A. Schreiber. Challenges for methods to detect Genetically modified DNA in foods. *Food Control*, 1999 (10): 351~352
- [42] Hancock JF. A framework for assessing the risk of transgenic crops. *BioSci*, 2003 (3): 512~519
- [43] Hellwig, S. et al. Plant cell cultures for the production of recombinant diagnostic and therapeutic proteins. *Nat. Biotechnol.*, 2004 (22): 1415~1422
- [44] Julian K - C. Ma, Rachel Chikwamba, Penny Sparrow. et al. Plant - derived pharmaceuticals the road forward. *Trends in Plant Science*, 2005 (12): 580~585
- [45] Le Buanec. Bernard Plant Breeding and Sustainable Agriculture. *Sustainable Agriculture Solutions*, Novello Press Ltd, London, 1999: 190~195
- [46] Ma, J. K - C. et al. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet.*, 2003 (4): 794~805
- [47] Menkhaus, T. J. et al. Considerations for the recovery of Recombinant proteins from plants. *Biotechnol. Prog.*, 2004, 20: 1001~1014
- [48] Snow AA. et al. A Bt transgene reduces. *Ecol Appl.*, 2003, 13 (2): 279~286
- [49] Stoger, E. et al. Recent progress in plantibody technology. *Curr. Pharm. Des.*, 2005 (11): 2439~2457
- [50] Stone C. Is there a precautionary principle. *Environment Law Rep.* 2001, 31: 10790~10799
- [51] Strauss SH. Genomics genetic engineering and domestication of crops. *Sci.*, 2003, 300: 61~62
- [52] Kaczmarek K, Prus W, Kowalska T. *J. Chromatogr. A*, 2000, 869: 57~64
- [53] McNay J L M, Fernandez E J. *Biotech. Bioengi.*, 2001 (3): 224~232
- [54] Schluter H. *Protein Liquid Chromatography*. New York : Elsevier Science , 1999: 223~234
- [55] Vailaya A , Horvath C. *J. Chromatogr. A* , 1998 (829): 1~27

# 第九章 转基因植物生物反应器产品的产业化现状和安全性评价

## 第一节 转基因植物生物反应器产品及其产业化现状

### 一、已经达到商业化的转基因植物生物反应器产品

进入 21 世纪的生物科学主流仍然是分子生物学、基因和以基因为核心的生物技术的研究与应用。随着转基因技术的日趋成熟,在全球范围内以植物基因工程为核心的农业生物技术产业已形成。

自从 1983 年世界上诞生了第 1 例转基因植物,1994 年首例转基因植物产品——耐贮存番茄进入市场,1996 年后转基因植物的产业化迅速发展,势不可挡。至 2005 年在全球 21 个国家转基因植物推广应用总面积达到 9 000 万  $\text{hm}^2$ ,1996—2005 年十年间全球转基因作物种植面积增长近 53 倍,累计种植面积已达 4.746 亿  $\text{hm}^2$ ,相当于我国耕地面积的 3.75 倍。目前,大面积推广应用的转基因植物主要是抗虫、抗除草剂的品种。

利用转基因植物作生物反应器生产药物、疫苗和工业原料是 21 世纪转基因技术在农业上应用的新潮流。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(表 9-1)。

表 9-1 利用转基因植物生产的高经济附加值生物制剂

| 产品              | 转基因植物 | 用途      | 年份   |
|-----------------|-------|---------|------|
| 脂类化合物           |       |         |      |
| 三酰甘油酸酯          | 油菜    | 食品、去垢剂  | 1992 |
| 饱和脂肪酸           | 油菜    | 食品、工业   | 1992 |
| $\beta$ -羟基丁酸盐  | 油菜、大豆 | 生物可降解塑料 | 1992 |
| 碳水化合物           |       |         |      |
| 改性淀粉            | 马铃薯   | 食品、工业   | 1991 |
| 环糊精             | 马铃薯   | 食品、制药   | 1991 |
| 糖醇              | 马铃薯   | 食品、工业   | 1994 |
| 工农业用酶           |       |         |      |
| $\alpha$ -淀粉酶   | 烟草、苜蓿 | 食品、工业   | 1994 |
| 植酸酶             | 烟草    | 饲料      | 1993 |
| $\beta$ -葡聚糖酶   | 大麦    | 啤酒酿造    | 1995 |
| 药用蛋白多肽          |       |         |      |
| $\alpha$ -天花粉蛋白 | 烟草    | 艾滋病毒抑制剂 | 1993 |

(续)

| 产品                    | 转基因植物                        | 用途        | 年份        |
|-----------------------|------------------------------|-----------|-----------|
| 表皮生长因子                | 烟草                           | 细胞生长      | 1993      |
| 促红细胞生成素               | 烟草                           | 调谐红细胞水平   | 1993      |
| 生长激素                  | 烟草、拟南芥                       | 生长调节剂     | 1994      |
| 水蛭素                   | 油菜                           | 抗凝血药物     | 1994      |
| 人血白蛋白                 | 烟草、马铃薯                       | 药用        | 1990      |
| 干扰素                   | 芜菁                           | 抗病毒       | 1989      |
| 抗原蛋白                  | 烟草、马铃薯、番茄、莴苣<br>紫花苜蓿、羽扇豆、花生等 | 疫苗        | 1992—2004 |
| GLP1 蛋白               | 水稻                           | 治疗糖尿病     | 2002      |
| 次生代谢产物                |                              |           |           |
| 八氢番茄红素合成酶<br>和番茄红素环化酶 | 水稻 (金色大米)                    | 维生素 A 缺乏症 | 2000      |

据统计,从 20 世纪 80 年代至今,通过 DNA 重组技术所生产的生物医药年销售额已超过 100 亿美元。由于生物医药产业被许多国家视为强劲的经济增长点而加以重点扶持,生物医药的年销售规模从 1996 年的 101 亿美元扩大到 2006 年的 320 亿美元,平均年增长率将达 12% 以上,其中治疗药物年平均增长 16%,诊断试剂年平均增长 9%。利用植物反应器生产药用蛋白和疫苗已成为当前生物制药产业重点开发的热点领域,具有其他方式所不具备的优势,最受人们关注,同时研究进展也最快。美国、英国、荷兰、芬兰和日本等发达国家都已把植物反应器开发列入国家生物技术革命的战略计划。目前世界上已有多种药物蛋白在番茄、马铃薯、莴苣和香蕉等上成功表达。随着该领域研究的进展,转基因植物用于生产低成本可食用疫苗的产业化将显示出越来越良好的发展前景。

从商业的角度来看,植物是生产药物蛋白最具诱惑力的生产系统之一,转基因植物作为生产药物蛋白的生物反应器,为人类提供了一个更加安全和廉价的生产体系。第一个进入临床试验的转基因植物表达的药物蛋白是 Planet Biotechnology 公司的新药 CaroRx™ (商品名)。CaroRx™ 是转基因烟草表达的分泌性免疫球蛋白 A (sIgA),具有杀灭龋齿致病菌 *S. mutans* 链球菌的功效。除 CaroRx™ 外,该公司目前还致力于研究开发基于 sIgA 治疗口腔、呼吸、消化、生殖和泌尿等黏膜上皮疾病的新药。Monsanto 公司开发的转基因玉米用于生产人抗体,其产量可达到 22.5kg/hm<sup>2</sup>,现正计划将该产品进入临床试验。另外,该公司正在开发转基因大豆,用于生产单疱疹病毒 2 (HSV-2) 人源化抗体。Prodi Gene 公司与 EPIcyte 医药公司联合开发转基因玉米生产人黏膜抗体, Large Scale Biology 公司和斯坦福大学的科学家联手开发转基因植物生产恶性肿瘤疫苗,都获得了突破性进展。

随着转基因植物来源的药用蛋白质 (plant-derived pharmaceutical proteins, PDPs) 研究的进展,其产品的商业化热潮即将到来。已有 3 种来源于转基因植物的药用蛋白上市,它们是 Prodigene 公司利用转基因玉米生产的抗生物素蛋白、胰蛋白酶和  $\beta$ -葡糖醛酸酶。还有很多公司在大规模生产生物技术蛋白作为商业释放的前奏,其中包括 Large Scale Biology 公司和 Sigma-Aldrich 公司合作的干扰素  $\alpha$ -2a 和  $\alpha$ -2b、Sigma-Aldrich 公司和 Chlorogen 有限公司合作的四种未公开的蛋白。据不完全统计,目前已有几十种药

物蛋白或多肽在植物中得到成功表达，其中包括人的细胞因子、表皮生长因子、促红细胞生成素、干扰素、生长激素、单克隆抗体和可作为疫苗用的抗原蛋白等。转基因植物生产的药用蛋白即将市场化，目前很多研究已进入临床试验阶段（表 9-2），为转基因植物生物反应器的产业化奠定了基础。

表 9-2 已进入临床试验的转基因植物生产的药用蛋白

| 产品                     | 传染病                     | 产品来源               | 研究阶段                  |
|------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------|
| 疫苗                     |                         |                    |                       |
| <i>E. coli</i> 热敏毒素    | 腹泻                      | 玉米, 马铃薯            | 分别进行临床 I 期试验          |
| 乙肝病毒表面抗原               | 乙型肝炎                    | 莴苣, 马铃薯            | 分别进行临床 I 期试验          |
| 诺沃克病毒衣壳蛋白              | 呕吐, 腹泻                  | 马铃薯                | 临床 I 期                |
| 狂犬病糖蛋白                 | 狂犬病                     | 菠菜                 | 临床 I 期                |
| 抗体                     |                         |                    |                       |
| LSBC scFVs             | 非何杰金氏淋巴瘤                | 烟草                 | 至少 12 种人用抗体进行临床 I 期试验 |
| Avicidin               | 结肠癌                     | 玉米                 | 临床二期结束                |
| CaroRX                 | 龋齿                      | 烟草                 | 临床二期                  |
| 其他产品                   |                         |                    |                       |
| 胃脂肪酶                   | 囊性纤维化, 胰腺炎              | 玉米                 | 临床二期                  |
| Human intrinsic factor | 维生素 B <sub>12</sub> 缺乏症 | <i>Arobidopsis</i> | 临床二期                  |
| 乳铁蛋白                   | 胃肠感染                    | 玉米                 | 临床 I 期                |

虽然相对于人的转基因植物口服疫苗的研究畜禽转基因植物口服疫苗较为落后，但相关的研究也正在迎头赶上。动物用疫苗受到的障碍较少，优先得到商业化批准。第一个上市的动物疫苗是由 Dow Agro Sciences 开发的家禽疫苗。

另外一个引起全球关注的转基因植物研究成果是，瑞士联邦技术研究所的 Ingo Potrykus 教授及其同事研制出一种富含  $\beta$ -胡萝卜素（维生素 A 前体）的水稻，品种名称 T309，每克稻米含 1.6 mg  $\beta$ -胡萝卜素，由于稻米色泽金黄，故称为“金色大米”。发展中国家目前大约有 2.5 亿~10 亿人患维生素 A 缺乏症，正是由于此症，这些国家每年有 1 000 万~2 000 万儿童死亡。食用富含铁质和维生素 A 的这种转基因水稻，将大大减少发展中国家儿童贫血症和维生素 A 缺乏症的发病率。据英国《新科学家》杂志报道，位于英国剑桥的兴根塔育种公司的研究人员称，他们已经培育出了一种命名为“金稻-2”的新型转基因水稻，其原维生素 A 的含量比传统水稻提高了 20 多倍。兴根塔育种公司拥有富含  $\beta$ -胡萝卜素的金稻-2 的产权。麦尔说：“我们已收到许可证，允许这种水稻在印度和菲律宾种植，这两个国家的水稻种植面积很大，会产生很大的影响。”

我国从 20 世纪 80 年代已经开始转基因植物的研究，到 1990 年我国自行研制的抗烟草花叶病毒烟草在辽宁进行商业化种植，成为世界上第一例商品化的转基因植物。我国目前有 6 种转基因植物被批准进入商品化生产，它们包括转基因耐贮藏番茄、转查尔酮合成酶基因矮牵牛、抗病毒甜椒、抗病毒番茄、抗虫棉和保铃棉。我国在转基因植物生物反应器方面的研究和利用主要集中在药用蛋白。获得了高效表达乙型肝炎病毒包膜的蛋白基因的马铃薯和番茄、高效表达产毒素大肠杆菌热敏毒素 b 亚基及定居因子 CS6B 抗原蛋白基

因的马铃薯，相关转基因植物已进入环境释放阶段。已成功地利用 TMV 载体大量表达出与 TMV 外壳蛋白融合的多个口蹄疫病毒表面抗原小肽，可从 100 g 烟草叶片中得到 1~2 g 含口蹄疫病毒“OK1”株系抗原决定小肽（11 肽和 14 肽）的融合蛋白。

在制订“十五”、“863”计划时，我国进一步加大了在植物生物反应器研究方面的投资力度。其中“利用植物生物反应器生产动物口蹄疫、结核病等兽用疫苗”、“降钙素和人乳铁蛋白等功能蛋白植物生物反应器的研制”、“组织和器官特异性基因表达启动子研究及高效表达载体构建”、“高效转化系统的研究”和“外源蛋白在受体植物中高效和稳定表达机制的研究”等课题被列为重大课题而予以了资助。当上述重大专项主要技术经济指标实现以后，我国医药市场上将出现几种用植物生物反应器生产的药物、疫苗或其他保健食品。

## 二、GMP 标准下的转基因植物生物反应器产品

“GMP”是英文 Good Manufacturing Practice 的缩写，中文的意思是“良好作业规范”，或是“优良制造标准”，是一种特别注重制造过程中产品质量与卫生安全的自主性管理制度。它是一套适用于制药、食品等行业的强制性标准，要求企业从原料、人员、设施设备、生产过程、包装运输、质量控制等方面按国家有关法规达到卫生质量要求，形成一套可操作的作业规范帮助企业改善企业卫生环境，及时发现生产过程中存在的问题，加以改善。随着 GMP 的发展，国际间实施了药品 GMP 认证。GMP 提供了药品生产和质量管理的基本准则，药品生产必须符合 GMP 的要求，药品质量必须符合法定标准。我国卫生部于 1995 年 7 月 11 日下达卫药发（1995）第 35 号“关于开展药品 GMP 认证工作的通知”。药品 GMP 认证是国家依法对药品生产企业（车间）和药品品种实施 GMP 监督检查并取得认可的一种制度，是国际药品贸易和药品监督管理的重要内容，也是确保药品质量稳定性、安全性和有效性的一种科学的先进的管理手段。食品 GMP 认证由美国在 60 年代发起，当前除美国已立法强制实施食品 GMP 外，其他如日本、加拿大、新加坡、德国、澳大利亚、中国等国家均只是采取劝导方式引导从业者自动自发实施。

GMP 最初建立在化学合成药品的生产上，后来又适用于在封闭、精密监测和控制条件下的细胞培养和微生物发酵技术生产的药物。把 GMP 的准则用在转基因植物生物反应器来源的药物，尚有一些争议。在陆生植物生长过程中，自然界的变化及植物的生长、土壤、天气状况的不恒定性，限制我们建立同等水准的控制系统。某些限制可以通过在温室或其他可控环境种植或进行水培，但是这些解决方法限制了生产规模，这是用植物生产药物的主要优势。另一个替代方案是利用植物细胞培养生产药物，可以保持精确的可控环境，能够消除微生物和动物细胞生产药物的一些主要缺陷——在细胞或培养介质中病原体或致癌性 DNA 得以表达的危险性。但这不仅会降低生产规模，而且使整个生产周期依赖于培养罐和有专业知识和技术的员工进行操作，这抹杀了利用陆生植物生产药物的另一个优势——生产周期的大部分可由没有专业知识和技能的工人来完成。

在利用微生物或动物细胞培养生产药物时，有一排排的微生物或动物细胞库为生产提供生产起始材料。对于转基因植物来说，确立一个同样的库并不简单，建立一个种子库似乎是最合理的，但是没有指导原则来说明应该贮存什么样的种子（来自开始的半合子转化



体种子、来自自身的纯合转基因种子还是来自表达产物的杂交种子)、贮存多少、贮存条件和可贮存的周期。这些问题均需要管理机构和相关机构立法来说明和处理,只有这样转基因植物来源的药用蛋白质(PDPs)才能成为主流技术。

植物材料收获之后,GMP也同样要用于药物生产的下游生产过程,这包括药物从植物体中分离和纯化。生产的开始阶段(收获、提取、净化)变化最大,需要优化系统和方法。即使非临床药物,下游生产也占整个生产成本的80%以上,当然产品实际成本有赖于所要求的纯度。有人认为转基因植物药用蛋白的下游生产过程没有理由不遵守其他生物药物生产系统的标准。2002年美国出台了GMP条件下植物生物技术药物生产的管理指导,这仅仅是个草案,至今相关管理机构对植物生物技术药物生产几乎没有帮助。

### 三、转基因植物生物反应器产品在发展中国家的应用前景

#### (一) 转基因植物生物反应器药用蛋白和疫苗的优势

转基因植物生物反应器是20世纪90年代转基因植物的又一发展新方向,药物蛋白和疫苗是转基因植物生物反应器最主要的产品。利用转基因植物生产疫苗具有微生物发酵和动物细胞培养方式不可比拟的优势。

能够生产重组药用蛋白和疫苗的系统包括:动物病毒(痘苗病毒、鸡痘腺病毒、逆转录病毒)、细菌(大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)、酵母(酿酒酵母)、昆虫细胞和哺乳动物细胞。然而,它们也存在弊端,限制了其商品化应用。例如:细菌细胞不能完成许多病毒蛋白质的转录后修饰作用、不利于蛋白质的重新折叠、导致其免疫性通常较弱;酵母菌对有些蛋白质的过分糖基化可能影响针对特定蛋白质的免疫反应,妨碍了酵母菌在一些疫苗生产中的应用。目前,利用重组DNA技术生产的大多数治疗用血液蛋白几乎都是在哺乳动物细胞表达系统中生产出来的。该系统的主要优点是所表达的重组蛋白能够进行正确的折叠及完成其他翻译后加工过程的机会比较高。然而,有许多因素仍然限制哺乳动物细胞表达系统的广泛应用,这些因素包括:①即使在最适的培养条件下,重组蛋白在哺乳动物细胞中的表达水平仍很低,通常为每天每升数十毫克;②重组蛋白最后必须从培养液中分离提纯出来,这会进一步导致产量损失和增加生产成本;③哺乳动物细胞表达系统日常维护费用非常高,这也使产品的生产成本居高不下;④哺乳动物细胞对外力比较敏感,而振荡培养通常又是工业化大规模生产所不可缺少的,这就使扩大生产规模变得相当困难;⑤胎牛血清是哺乳动物细胞生长所不可缺少的,它的价格昂贵,而且不同批次之间成分相差很大,这些变化会导致细胞的生长情况不一致,进而影响到细胞发酵过程及下游的提纯加工过程;⑥哺乳动物细胞对一些环境因素如温度、pH值、含氧量和次生代谢产物的变化非常的敏感,因此需要对培养条件进行精确的监控;⑦利用哺乳动物细胞培养表达系统不能避免病原生物体的污染。

利用转基因植物生物反应器表达系统生产药用蛋白和疫苗与现行生产系统相比,具有许多潜在的优势:

(1) 植物细胞具有全能性，能够再生植株，转基因植物的种植不需要特殊技术和复杂的生产设备、设施，只要有阳光、养分和水，就可通过大面积栽培转基因植株进行大规模生产，只需增加耕种面积就能扩大其产量，是最经济有效的疫苗生产系统。例如，生产人类葡萄糖脑苷脂酶：hGC 是当今世界最昂贵的药物，治疗遗传病高歇斯症 (Gausherdisease) 的特效药，每生产一个剂量的 hGC 要消耗 2 000~8 000 个人类胎盘，故该药物一直供不应求。美国 Virginia Polytechnic Institute (VPI) 把克隆出的 hGC 基因，经改造导入烟草并得到表达。在转基因烟草叶片中，hGC 的表达量竟达到 1 mg/g 鲜重，一株转基因植株就等于 2 000~8 000 个胎盘生产出的药物。

(2) 与动物细胞比较，植物培养条件简单，便于遗传操作。与微生物系统比较，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、亚基可以正确装配等转译后加工，使三维空间结构更趋于自然状态，表达产物具有与天然产物蛋白相似的免疫原性和生物活性。

(3) 常规疫苗和其他新技术疫苗在大规模培养过程中，很容易发生病原性细菌污染，特别是霉形体污染极其普遍，而转基因植物疫苗不含致病微生物或潜在致病微生物，转基因植物生产的疫苗中植物病毒不感染人体，故表达产物安全可靠，无毒性 and 副作用，无残存 DNA 污染和潜在致病、致癌性。利用重组植物生产的生物药不论提纯与否，都不存在潜在的人类病原，因而是相当安全。免除了使用活病原的风险和疫苗的灭活问题，对人畜安全，不会引起负反应。

(4) 转基因植物疫苗不需要特殊容器分装，不需低温保存和冷藏运输。部分转基因疫苗可直接口服，既节省了提取、纯化和保存成本，而且不需要注射器之类的设备，可以避免因使用了消毒不完善的注射器而感染通过血液传染的疾病，如艾滋病和乙肝等。

## (二) 转基因植物生物反应器产品在发展中国家的应用前景

每年全球新增 8 600 万人口，每天全球有 4 000 人死于饥饿，而所有这些都发生在发展中国家。目前几乎每个发展中国家都面临着人口增长与耕地面积减少的巨大压力，解决这一问题的唯一办法就是通过高新技术来提高农业生产效率，转基因技术的大规模应用可以显著地降低生产成本，提高生产效率。

转基因疫苗在人类医学历史上起到重要作用，全世界每年有  $1.2 \times 10^8$  个新生儿，新生儿需要注射水痘、黄热病、乙型脑炎、脊髓灰质炎等 16 种疫苗，因而全世界对疫苗的需求量非常巨大。现行疫苗系统建立在重组细胞培养系统之上，用动物或微生物生产口服疫苗需要严格的设备和昂贵的培养基，需要发酵技术和严格的纯化程序，特殊的专业知识和特殊的贮藏条件，发展中国家难以承受，基因重组疫苗价格昂贵和接种程序复杂也严重影响其普及与推广。

利用转基因植物生物反应器生产药用蛋白和疫苗的巨大优势，给发展中国家带来希望的曙光，它将会把农业和医药联系起来，使以农业为主的发展中国家能够利用农业来改善健康状况以及其他需求。PDPs 低成本的巨大优势将能够帮助发展中国家控制传染病，特别是 HIV/AIDS。没有便利的交通和贮存系统，把易变质的疫苗分发到偏僻地区并接种成为传染病防疫的主要障碍，PDPs 提供了解决这一障碍的巨大优势，偏僻地区的人们可

以种植转基因植物来生产自己所需要的疫苗。发展中国家通常能够大量生产农作物，有很多果汁、蔗糖、小麦和玉米加工厂，有大量的初级加工设备，可以从这项转基因技术获得最大的利益。转基因植物生物反应器技术可以把重组蛋白定位到种子，或者利用食品加工技术（如冷冻干燥），使重组疫苗容易保存，能够克服传统疫苗从生产地运送到各地及贮存都需要冷藏设备的缺点，可以简单地方便地生产、贮藏和发放疫苗。同样，使抗原疫苗在水果和蔬菜中表达有更好的前景，可直接口服免疫，并产生较强的体液和黏膜免疫反应。美味可口的水果、蔬菜代替了打针、吃药，便于在发展中国家推广和普及。这对于世界上偏僻落后贫穷的国家和地区的人们、对动荡不安的发展中国家的人们而言可以通过服用廉价的植物疫苗获得抵抗疾病的免疫力。

1990年9月举行的世界儿童问题首脑会议上儿童疫苗计划小组表示要生产一种口服全价新生儿疫苗的目标，把香蕉作为首选的转基因植物，并且植物学家已经筹划了可用于全球免疫接种的足量香蕉，大家都为21世纪控制和消灭传染病的前景乐观。

## 第二节 转基因植物生物反应器产品安全性评价

之所以要对转基因作物及其食品进行安全性评估，是由于转基因技术可以使基因在动物、植物、微生物之间相互转移，甚至可以将多基因的大片段导入生物体中表达，因此需要进行科学的评估。近年来，转基因生物的安全性已成为国际社会争论的热点。转基因植物在给人类带来巨大的经济效益的同时，也可能给人类和环境带来一定的危险和长期的负面影响。而生物安全的风险是一种综合的、长期的效应，它可能对其他生物和环境带来一些潜在的、间接的影响，也可能在近期并不表现出来，在经过一个较长的潜伏期后才表现危害。由于目前科学技术水平不能精确地预测转基因生物可能产生的所有表现效应，因此，农业转基因生物及其产品对人类及环境的安全性等问题已刻不容缓地摆在人类的面前。转基因生物反应器属于转基因植物的范畴，同样要进行安全性评价。

### 一、转基因植物安全性评价内容

目前国际上对转基因植物的安全性评价主要集中在两个方面，一个是环境安全性，另一个是食品安全性。通过安全性评价，可以为农业转基因生物的研究、试验、生产、加工、经营、进出口提供依据，同时也向公众证明安全性评价是建立在科学的基础上的。因此，对农业转基因生物实施安全评价是安全管理的核心和基础。

#### （一）环境安全性评价

转基因植物的风险性是指它作为一个新物种进入生态系统，对生态平衡可能产生负面效应。环境安全性评价要回答的核心问题是转基因植物释放到田间去是否会将基因转移到野生植物中，或是否会破坏自然生态环境，打破原有生物种群的动态平衡。

**1. 转基因植物演变成农田杂草的可能性** 美国杂草科学委员会（WSSA）将杂草简单定义为：对人类行为或利益有害或有干扰的任何植物。杂草常有一些特定的生理和结构

特征，杂草往往生长迅速并且具有强大生存竞争力，能够生产大量长期有活力的种子，而且这些种子具有远、近不同距离的传播能力，甚至能够以某种方式阻碍其他植物的生长。由于杂草具有以上特征，所以常常给世界农业生产造成巨大损失。

一种植物是否成为难以控制的杂草，取决于它内在的遗传特性及其特征表现所需要的特定环境，两者缺一不可。植物在获得新的基因后会不会增加其生存竞争性，在生长势、越冬性、种子产量和生活力等方面是否比非转基因植株强。若转基因植物可以在自然生态条件下生存，势必会改变自然的生物种群，打破生态平衡。从目前的水稻、玉米、棉花、马铃薯、亚麻和芦笋等转基因植物的田间试验结果来看，大多数植物的生存竞争力并没有比常规植物增加，也就是说大多数转基因植物的生存竞争力并没有增加，故一般不会演变为农田杂草。不过最近有报道，加拿大转基因油菜在麦田中已经变成了杂草，而且难以治理。所以，那些原本具有杂草特性的植物如向日葵、油菜、草莓等在进行基因遗传转化时，也同样应该重视可能出现的杂草化问题。

以改善植物产品品质为目标的转基因植物与非转基因植物相比，二者在生存竞争方面的遗传特性没有差别，因此这类转基因植物不会转化为不可控制的杂草。转抗病、抗虫、抗除草剂基因的植物，与非转基因植物相比，生存竞争方面的遗传特性发生了变化，具有了转化为难控制的杂草的潜力。如散落在田间的抗除草剂转基因植物的种子，对下一茬作物而言，就可能转变为用除草剂难以杀灭的杂草。评价一种转基因植物是否有转变成杂草的可能性，应考虑它在引入地能否持久生存，能否扩散到邻近栖息地。

**2. 基因漂流到近缘野生种的可能性** 基因漂移是指基因通过花粉授精、杂交等途径在种群之间扩散的过程。在自然生态条件下，转基因植物基因通过花粉向周围生长的近缘非转基因植物转移，使得近缘物种有获得选择优势的潜在可能性，使这些植物含有了抗病、抗虫或抗除草剂基因而成为“超级杂草”。在进行转基因植物安全性评价时，我们应从两个方面考虑这一问题。一个是转基因植物释放区是否存在与其可以杂交的近缘野生种。若没有，则基因漂流就不会发生。如在加拿大种植转基因棉花，因没有近缘野生种存在则不可能发生基因转移。同样，在中国种植转基因玉米，因没有野生大刍草，所以也不会发生基因漂流。另一个可能是存在近缘野生种，基因可从栽培植物转移到野生种中。这时就要分析考虑基因转移后会有什么效果。如果是一个抗除草剂基因，发生基因漂流后会使得野生杂草获得抗性，从而增加杂草控制的难度。特别是若多个抗除草剂基因同时转入一个野生种，则会带来灾难。但若是品质相关基因等转入野生种，由于不能增加野生种的生存竞争力，所以影响也不大。

目前已发展了多种技术控制基因漂流，如叶绿体基因工程、细胞遗传、雄性不育、种子不育、基因组不相容、利用化学诱导型启动子、降低杂交后代的适应性、闭花受精和孤雌生殖等来控制基因漂移。

**3. 对自然生物类群的影响** 在植物基因工程中所用的许多基因是与抗虫或抗病性有关的，其直接作用对象是其他生物。如转入 Bt 杀虫基因的抗虫棉，其目标昆虫是棉铃虫和红铃虫等植物害虫，如大面积和长期使用，昆虫也会对抗虫棉产生适应性或抗性，迄今，在田间和实验室研究中已发现有十多种昆虫对 Bt 杀虫毒蛋白产生了抗性，这不仅会使抗虫棉的应用受到影响，而且会影响 Bt 农药制剂的防虫效果。为了解决这个问题，在



抗虫棉推广时一般要求种植一定比例的非抗虫棉，或实行抗虫棉与非转基因植物的轮作，以延缓昆虫产生抗性。例如，美国环保署规定，在转 Bt 基因玉米种植区，如果周围没有 Bt 棉，非 Bt 玉米面积占 20%，Bt 玉米面积占 80%；如果周围有 Bt 棉，非 Bt 玉米与 Bt 玉米面积各占 50%。在转 Bt 基因棉花种植区，非 Bt 棉花占 20%，Bt 棉花占 80%。抗性管理已引起了美国农业部的重视，它们计划 2000 年在全国建立 8~12 个抗性管理中心，监督抗性问题。该策略的有效性依赖于当选择压力不连续或变化至另外一种毒素时，害虫种群对该选择压力敏感性的恢复。

除了 Bt 毒素蛋白基因外，尚可用如蛋白酶抑制剂基因，包括豇豆胰蛋白酶抑制剂 (CpTi) 基因、马铃薯蛋白酶抑制剂-II (Pin II) 和水稻疏基蛋白酶抑制剂基因、淀粉酶抑制剂基因、外源凝集素基因等，可以将它们与 Bt 基因一起转入作物，具有不同结合位点的 2 种以上的 Bt 基因也可同时转入同一作物，用于提高转基因抗虫作物延迟害虫抗性能力。但是昆虫种群具有天生的快速适应环境压力的能力，使抗虫生物技术的长期有效性受到了严重的威胁，而昆虫和其他有害生物对害虫防治机制的适应，可能会对环境 and 人类健康产生严重不良后果。

除了目标昆虫外，我们还要考虑转基因植物对非靶昆虫的影响。如有人用 Bt 蛋白饲料喂棉田中 6 种非靶昆虫，当杀虫蛋白浓度高于控制目标昆虫浓度 100 倍时，对非靶昆虫均未出现可见的生长抑制。另外，Bt 蛋白对有益昆虫如蜜蜂、瓢虫等都无毒性。但是，Daly 的实验结果说明种植转 Bt 的马铃薯田中节肢动物的多样性降低，还有研究发现用转 Bt 的植物饲养的靶昆虫来喂养它的天敌，可使它的天敌死亡率增加或发育受到抑制。已有试验证实转基因抗虫作物对有益捕食性昆虫如草蛉 (*Chrysoperla carnea*)、瓢虫 (*Adalia bipunctata*)、美洲大斑蝶 (*Danaus plexippus*) 幼虫和土壤生物等具有负作用。

抗虫转基因作物的对土壤微生物的影响。土壤并非是无生命的泥土，土壤中存在着各种各样的生物，如细菌、病菌、真菌、蠕虫、甲虫和其他昆虫。研究表明。种植 Bt 转基因农作物的大田土壤的 Bt 毒素含量往往超过土壤自然背景水平或正常值。若 Bt 毒素通过转基因作物沉淀到土壤中，可能会土壤生物种群、土壤生物对腐体的分解与养分循环受到负面影响。Bt 毒素 ICPs 可被土壤中黏土矿物（如蒙脱石和高岭土及绿泥石）、腐殖质、有机矿物聚合体等具有活性表面的微粒组分吸收，并紧密结合，其残留期可达 234 d 或更久。于是经过改造或修饰的 Bt 毒素在土壤中可能积累形成群体。Bt 转基因植物根系分泌的 Bt 毒素 (Cry 蛋白) 可很快被土壤中表面活性颗粒吸收其杀虫活性可保持 180 d。结合态毒素的杀虫活性一般可保持数月活数周。目前，人们只是对外源基因产物在土壤中的残留进行了研究，对自然环境的影响程度有待研究。

抗病毒转基因作物对生物多样性的影响也引起了科学家的关注。首先，外源抗病毒基因可能会漂移到转基因作物的近缘植物，使那些原本对某种病毒并不敏感的植物成为此病毒的寄主而感病，也就是扩大了病毒的寄主范围。其次，抗病毒转基因植物可能会改变病毒侵染植株的过程，而这些改变有可能导致出现致病性更强的病毒。

## (二) 食用安全性评价与保障

### 1. 食用安全性评价 食用安全性主要是指食品与药品的安全性评价，主要考虑是否



含有有毒物质和过敏原，要求所转入基因对人畜无毒、不形成过敏原。转基因植物大多被用做人类食品、药物或动物饲料，因此，食用安全性是转基因植物安全评价的一个重要方面。

(1) 有毒物质 许多食品本身含有大量的毒性物质和抗营养因子，如蛋白酶抑制剂、神经毒素等用以抵抗病原菌的侵害。但是在转基因植物生产和加工过程中由于基因的导入使得毒素蛋白发生过量表达或降低表达水平。例如，导入基因直接产生蛋白质或酶或者导入的新基因本身都可能增加或减少受体内原来的某些蛋白质或酶的表达，结果就是改变了植物体内物质，这两个过程都可能改变了特定作物体内的蛋白质构成，因此，需要评估关于它们对人类或动物的潜在毒性。

必须确保转入外源基因或基因产物对人畜无毒。由于目前转基因植物大量使用来源于细菌或病毒中的基因序列作为外源基因的组成部分，消费者担心这些外源基因会像细菌或病毒一样对人体有毒害作用。目前，转基因作物大多是直接用于饲料，有的则通过加工转化成其他食品。例如用转基因大豆、油菜籽等榨油，生产的色拉油含有转基因成分。有些转基因生物加入了原来生物体所没有的抗害虫或抗除草剂基因，其本体有何变化，饲料中转基因成分被家禽食用后是消化分解排泄，还是在肌肉或器官中富集，人食后有何影响，在环境中如何循环转化，潜在风险如何目前尚不得而知。如转 Bt 杀虫基因玉米除含有 Bt 杀虫蛋白外，与传统玉米在营养物质含量等方面具有实质等同性。要评价它作为饲料或食品的安全性，则应集中研究 Bt 蛋白对人畜的安全性。目前已有大量的实验数据证明 Bt 蛋白只对少数目标昆虫有毒，对人畜绝对安全。

转基因食品有无毒性是人们最为关注的问题。1944 年第一次批准转基因番茄上市以来，迄今还没有报告表明转基因农产品给人体健康造成了危害。遗传改良的玉米和大豆产品，包括婴儿食品，至今在美国市场上已接近 4 000 种，并未报道有一例食品安全事件。美国对食品安全的高标准是举世公认的，FDA 有严格的标准，因而赢得公众的信任。FDA 的评估批准一般需 12~18 个月，而转基因植物品种需经 FDA、EPA、USDA 批准后方可上市，可能长达 6 年。没有任何人已发现用转基因作物制成的卵磷脂、大豆油或大豆淀粉食用后对健康有任何潜在危险。当然，也不可全然否定转基因植物存在不可预见负效应的可能性。对每个转基因作物上这种可能存在的负效应，应当逐个地做出科学的评价（“个案评估”原则）。这类大家关心的问题许多属于技术问题，可以通过研究来解决。另外，食品安全是相对的，不可能 100% 安全，如麦角中毒、黄曲霉毒素及细菌毒素污染食物等至今仍有发生，农药残留和重金属污染等问题日益严重等，因此，食品安全与否还与界定的标准有关。

(2) 过敏原 过敏原是一类能与某些个体免疫球蛋白反应的蛋白质。过敏反应是免疫球蛋白与过敏原相互作用引起的。来源于病毒等其他生物的外源基因，在转基因植物中通过表达可以产生相应的蛋白质分子，这些蛋白质分子是传统食品中不具有的新成分，这些新蛋白质可能引起食用者或接触者出现过敏反应，人类在自然环境中发育进化形成的人体免疫系统可能难以或无法适应转基因生成的新型蛋白质诱发的过敏症。同时导入的基因也可能打破了原有的过敏原基因的表达，从而去除或减少过敏原。

转基因食品的过敏性是人们关注的焦点之一。有资料表明，世界上有近 2% 的成年人

和 4% 的儿童对食物过敏，这一比例还在不断增加，而且在发达国家表现尤为突出。

在自然条件下存在着许多过敏原。在基因工程中如果将控制过敏原形成的基因转入新的植物中，则会对过敏人群造成不利的影 响。所以，转入过敏原基因的植物不能批准商品化。如美国有人将巴西坚果中的 2S 清蛋白基因转入大豆，对巴西坚果 2S 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳和与巴西坚果过敏者的血清进行免疫杂交，证明该蛋白是主要过敏原。虽然使大豆的含硫氨基酸增加，但也未获批准进入商品化生产。

(3) 抗生素抗性基因与抗生素抗药性问题 在转基因植物研制过程中，为了帮助筛选转化细胞，大量使用抗生素抗性基因作为选择标记，因此，大多数转基因植物中都含有此类抗生素抗性基因。抗生素基因本身及其编码的蛋白产物对人体有无危害、对微生物的抗生素抗性有何影响是人们最关心的问题。

由于抗生素抗性基因编码产生的蛋白质可以改变抗生素的分子结构，使抗生素失效，因此，公众担心食用此类转基因植物是否会产生抗生素抗药性。另外，转基因植物中的标记基因是否会通过食物在肠道中水平转移至微生物，从而影响抗生素治疗的有效性。编码抗生素抗性标记基因的 DNA 从植物细胞中释放出来后，很快被降解成小片段甚至核苷酸。因此，植物 DNA 在进入有肠道微生物存在的小肠下段、盲肠及结肠前已被降解，其余极小部分 (<0.1%) 的安全性如何呢？抗生素标记基因是否会水平转移到肠道微生物或上皮细胞中，从而降低抗生素临床治疗的有效性？目前的结论是：这种可能性非常小。已经对一些主要标记基因的安全性有了较充分的认识，部分标记基因已被列为可安全使用的标记基因。如美国 FDA 食品顾问委员会 (1994) 的结论“番茄中的卡那霉素抗性 npt II 基因极不可能在消化道中转移到微生物，不会引起安全性问题”。欧盟委员会的食品科学委员会 (SCF) 和动物营养委员会 (SCAN) 也认为使用氨卞青霉素抗性基因不会引起安全性问题。应该看到，与人畜疾病中抗生素的滥用相比，转基因作物引起的抗性增加是微不足道的。

(4) 转基因植物中外源基因的次生效应问题 目前科学技术虽然可以让研究人员在体外对基因进行准确切割和重组，但当外源基因导入到受体植物细胞时，对外源基因在受体植物染色体上的具体插入位点却无法控制，由此产生了转基因植物中外源基因的次生效应问题。

(5) 转基因植物食品中的外源基因的转移问题 公众担心来源于细菌或其他生物体的外源基因被人体摄入后，是否会转移至人体肠道上皮细胞或肠道正常微生物中，从而对人体产生不良影响。

综合自然界的各种因素，GM 植物和细菌间的 DNA 体内基因转移的可能性极小，但也不是绝对不可能。deVries 和 Wackernagel 就报道过，在理想化的实验室条件下，来自 GM 植物的 DNA 可以低频率地转化到土壤中常见的细菌中。

(6) 营养水平 通过有目的地导入编码营养成分的基因，可以使一种植物具有全面的营养成分，但是导入的基因可能改变植物体内原来的营养成分。已经关注到了有些转基因通过改变了内生的养分而对食物的营养质量产生有害的影响。当一个特殊的转基因食物是某种养分重要的来源时，考虑是否对原来的养分产生有害影响是非常重要的，改变养分的含量水平，理论上在几个方面都可能发生，第一，插入的基因可能干扰或改变了正常表达

的植物基因的表达；第二，导入基因的表达（通过蛋白质合成）可能减少用于正常植物化合物合成的氨基酸的可用性；第三，如果插入蛋白质表达转移了其他蛋白质代谢作用的途径的底物，那么正常植株化合物的生产可能也受到影响；最后，表达的蛋白质或改变了其他蛋白质含量水平可能产生反营养的影响。

由于转基因作物的发展历史不长，对一些长期效应还需要做跟踪监测，如 Bt 作物害虫的抗性治理、除草剂抗性的长期生态效应、病毒的重组和异源包装、食品的毒性和过敏性等。

## 2. 食用安全性的保障

(1) 转基因食品安全管理法规 相关法律法规是转基因食品安全性的重要保障。我国 1993 年出台了《基因工程安全管理办法》，后又发布了《转基因农产品安全管理临时措施》和《新资源食品卫生管理办法》等法规。

(2) 销后监测 转基因食品和药品需经过一系列的安全评价得到批准之后方可上市，上市后还应在更广泛的人群中继续进行跟踪和监测。

(3) 技术把关 转基因食品的检测是指对生加工食品和食品料中的转基因成分进行检测，是保证该类食品质量和安全的必要手段，关于转基因食品检测方法的发展已有十多年。

目前可利用的最精确的检测方法是 PCR 法。此方法的缺点是要求待分析的基因组 DNA 样品应尽可能得到纯化，否则会干扰反应，降低检测的灵敏度和重现性；另外用于大量检测时费用也很昂贵。

其次利用的最快捷的检测方法是 ELISA 法（酶联免疫检测法），此法只需 5 min 就可得到结果，其检测过程相对简洁。只需从待测样品中提取蛋白质放入聚丙烯塑料板的小孔中加入抗体进行免疫反应，通过显色反应在酶联免疫仪上即检出相应的重组蛋白产物，其灵敏度较高（ $> 0.1\%$ ），在日本已出现了定量检测新蛋白的试剂盒。ELISA 法在转基因外源蛋白的检测上虽具有快速、方便、重复性好的特点，但它只能对某一特定的蛋白进行检测，在实际应用中受到了一定的限制。

基因芯片又称 DNA 芯片或 DNA 微阵列，通常采用原位合成与合成点样法制作，其能以高信息量、高通量，同时检测、分析大量的 DNA/RNA。此项技术是将大量的探针分子固定在支持物上，与标记的样品分子杂交，通过检测每个探针分子杂交信号的强度，对结果进行数据分析，可以获取样品分子的序列和数量信息，判断该样品是否含有转基因的成分，鉴定该食品是天然的还是转基因的，是否在安全的限度内。利用该技术可检测食用成品和鲜活的动植物材料，灵敏性强、自动化程度高、特异性强、假阳性低、简便快速。随着该技术的发展，成本的降低，此技术在将来转基因食品的检测中必将处于里程碑的地位。

Southern 杂交技术在分子生物学中用于基因组 DNA 特定序列定位，在转基因食品中应用 Southern 杂交技术是要在知道该转基因食品转入外源基因片断的情况下使用。以放射性或荧光标记的外源目的基因的同源序列作为探针与该食品原料农产品的总 DNA 进行杂交。Southern 杂交技术用于食品外源基因的检测可检测出外源基因与内源基因有高度同源性的片断，且准确可靠，但对样品 DNA 的纯度要求较高，费用也

较高。

另外还有选择性标记基因和报告基因鉴定法，此法是利用生化法或免疫学法检测白产物、抗生素、除草剂等的抗性表现。

## 二、转基因生物安全性评价体系

对农业转基因生物实施安全管理是国际上的普遍做法。国际经合组织（OECD）、联合国粮农组织（FAO）、环保规划署（UNEP）、生物安全议定书、食品法典委员会，都对转基因生物的安全提出了明确的要求。安全性评价是国际上的通行做法。由于各国农业、环境和生物多样性的差异，决定了只有本国确认了安全性之后，转基因生物才能投入商业应用或由输出国引进。

### （一）我国的安全性评价管理体系

我国国家科学技术委员会于1993年12月24日发布《基因工程安全管理办法》，以此为基础，农业部于1996年7月颁布了《农业生物基因工程安全管理实施办法》，成立了农业生物基因工程安全委员会和农业基因工程安全管理办公室。农业部是生物技术安全管理的主管部门，1997年3月开始受理在中国境内从事基因工程研究、试验、环境释放和商品化生产的转基因植物、动物、微生物的安全评价与审批，对转基因生物及其产品的商品化生产进行了严格的安全评价。

随着农业生物技术的迅速发展与农业转基因作物的快速增加，对生物安全的管理与认识水平不断提高。2001年5月23日发布中华人民共和国国务院第304号令《农业转基因生物安全管理条例》，紧接着农业部于2002年1月5日分别发布了《农业转基因生物安全评价管理办法》、《农业转基因生物进口安全管理办法》、《农业转基因生物标识管理办法》3个配套文件和《转基因农产品安全管理临时措施》，明确规定我国农业转基因生物安全的监督管理工作由国务院农业行政主管部门和地方各级人民政府农业行政主管部门负责；国务院建立农业转基因生物安全管理部际联席会议制度，由科技、农业、环境保护、卫生、外经贸、检验检疫等有关部门的负责人组成，负责研究、协调农业转基因生物安全管理工作中的重大问题，以加强对农业转基因生物安全管理，保障人体健康和动植物、微生物安全，保护生态环境，促进农业转基因生物技术。

在进行基因工程实验、中间试验、环境释放和商品化生产前，必须在农业转基因生物及其产品安全性评价的基础上，确定其安全性等级，制定相应的安全控制措施。农业转基因生物安全性评价的主要内容是根据受体生物、基因操作、农业转基因生物及其产品的生物学特性、应用前途和释放环境等，将对人类健康和生态环境可能带来的潜在威胁与影响进行综合评价，并且确定其安全等级，提出相应的检测、监测和控制技术与措施。一般按以下流程进行安全性评价：

确定受体生物的安全等级→确定基因操作对受体生物安全等级影响的类型→确定农业转基因生物的安全等级→确定生产、加工活动对转基因生物安全性的影响→确定农业转基因产品安全等级→确定释放环境对安全性的影响以及确定监控技术措施的有效性→提出综



合评价结论与建议。

以科学数据为依据,经得起历史的考验,是安全性评价必须遵守的基本原则。一个产品被批准上市一般需经6~7年时间的评估。各国政府和生物安全委员会正是本着这个原则,对转基因植物及其食品对人体健康和生态环境的安全性做出实事求是的科学评价。我国在制定《农业转基因生物安全管理条例》及其配套规章的过程中,对国外的相关法规进行了比较研究。在安全评价中,遵循“实质等同性”原则、“个案评估”原则、“逐步评估”原则、“熟悉性”原则等。

(1)“实质等同性”原则(substantial equivalence) 1996年FAO和WHO的专家咨询会议将实质等同性分为三类:第一,与传统食品和食品成分具有等同性:该食品与传统食品具有相同的安全性,无须做进一步的安全性分析。如转病毒外壳蛋白基因的抗病毒植物及其产品与田间感染病毒的植物生产的产品都带有外壳蛋白,这类产品应该认为是安全的。第二,除某些特定差异外,与传统食品和食品成分具有等同性:进一步的安全分析应集中在特定的差异上,包括引入的遗传物质和基因产物及产生的其他物质。如转Bt的抗虫植物的Bt基因及其表达的蛋白。第三,与传统食品和食品成分无实质等同性:应全面严格分析食品的营养成分和安全性。

(2)“个案评估”原则(case-by-case) 由于转基因植物及其产品中导入的基因来源、功能各不相同,受体植物及基因操作也可能不同,因此必须逐个地进行评估。目前世界大多数国家立法当局都采取个案评估原则。

(3)“逐步评估”原则(step-by-step) 转基因植物及其产品的开发过程需要经过实验室研究、中间试验、环境释放的商业化生存等几个环节。“逐步评估”原则要求依次在每个环节上对转基因植物及其产品进行安全性评价,并以前步积累的相关试验数据和经验为基础,确定是否进入下一个开发阶段。

(4)“熟悉性”原则 以上各项工作的开展,使我国农业生物基因工程安全管理从无到有,逐步走上规范管理的轨道,对于促进我国农业生物技术研究的健康发展,维护我国民族生物技术产业的发展和转基因农产品的安全,保护农业生态环境和人类健康,起到了重要的作用。

## (二) 美国的安全性评价管理体系

美国对于转基因生物的管理始于20世纪70年代中期,当时生物技术研究还处于实验室(温室)的封闭阶段,国家卫生研究所制订了《重组DNA分子研究指南》,规定从事重组DNA研究项目的审查、评价和监控主要由本单位生物安全委员会负责,并报国家卫生研究所备案。

80年代初随着转基因农业生物田间释放试验的开展,原有的管理方式不能适应转基因生物发展的要求。因此,美国政府于1986年颁布了《生物技术法规协调框架》。协调框架将基因工程工作纳入现有法规进行管理,即现有的《联邦杀虫剂、杀菌剂、杀鼠剂法》、《有毒物质控制法》、《联邦食品、药物和化妆品法》、《联邦植物病虫害法》、《植物检疫法》同样适用于转基因产品的管理。同时在上述法规中增加转基因生物的有关内容。协调框架还规定,美国农业部(USDA)、环保署(EPA)和食品与药物管理局(FDA)是农业生



物技术及其产品的主要管理机构，它们根据各自的职能对基因工程工作及其产品实施安全性管理。上述三个机构既有分工，又有协作，使美国基因工程研究和应用步入了健康发展的轨道，促进生物技术的发展。

**1. 环境安全性的管理** 美国农业部和环保署负责转基因植物环境释放的审批，但环保署只负责评价抗病虫害转基因植物中杀病虫害物质的安全，例如转 Bt 抗虫棉花中 Bt 蛋白的安全，不针对植物本身。

美国农业部（USDA）管理有两个层次，即环境释放（或称田间试验）和解除监控状态。批准田间试验的依据是，转基因植物不会带来任何危险，不会引起植物病虫害问题。农业部还规定，田间试验要在一定的隔离范围内进行，试验一旦结束，所有的试验材料都必须从试验地清除掉，并进行安全性处理。

批准解除监控状态的依据是：田间试验的资料和文献上收集的资料能证明新的转基因植物不存在任何风险引起植物病虫害的发生。具体要求转基因植物：不具有任何植物病原体的特性；不会比非转基因植物更容易变成杂草；不可能使性亲和的植物成为杂草；不会对加工的农产品造成损害；不会对其他农业有益生物产生危害。解除监控状态意味着新的转基因作物像其他常规作物一样自由种植，不受任何约束。

美国动植物检疫局（APHIS）在 1987 年管理转基因植物田间试验时，实行许可证制度，通过几年的实践和资料积累，APHIS 于 1993 年简化了审批程序，采用了比较快的报告（Notification）程序，审批时间由原来的 6 个月缩短为 30 d。适用于报告程序的有玉米、棉花、马铃薯、大豆、烟草、番茄 6 种作物，但仍强调田间试验要隔离，转基因作物及其种子要做安全处理，防止遗留在环境中。

1994 年美国环保署（EPA）将植物杀虫剂纳入法规管理。对小规模试验，EPA 主要关心田间试验是否封闭。随着面积的增加，达到十英亩时，田间试验必须得到 EPA 的许可。一般来说，EPA 主要考虑：植物杀虫蛋白的表达水平、表达部位或组织（例如花粉、种子等）、表达时期、环境中是否存在、对非靶生物的影响以及急性毒性试验对非靶生物的影响。

**2. 食品的安全性的管理** 转基因食品的安全性由 FDA 和 EPA 共同管理，分别负责转基因蛋白质和植物杀虫剂的食物安全性。

(1) 食品与药物管理局（FDA）1992 年美国政府在《联邦食品、药物和化妆品法》中增加了转基因食品和饲料安全管理的内容。由于目前还没有一种由转基因生产的食品成分不存在于现有食品中，因此 FDA 对转基因食品的管理比较宽松，不需上市前的批准，采取自愿咨询程序。FDA 要求研制者把转基因食品投入市场前向 FDA 咨询，提交有关研究报告，得到 FDA 的认可。

FDA 评价转基因食品安全性的主要原则是“实质同等性”，主要考虑的因素有：食品中引入的新成分（蛋白质、脂肪等）是否安全；食品成分的改变，例如食品中天然毒素（如果存在的话）的水平是否在常规安全范围内；食品中主要营养成分是否在常规范围内；食品中新引入蛋白质引起过敏反应的可能性。

FDA 还规定，转基因食品只有与常规食品具有显著不同时，例如存在过敏反应的可能性时，才必须贴标签标出。

(2) 环保署 (EPA) EPA 按照《联邦食品、药物和化妆品法》负责确定食品中杀虫剂残留限量以及是否免除残留限量的要求。杀虫剂残留限量是指在作物收获后法律允许的杀虫剂含量。EPA 主要依据急性口服毒素试验和体外消化试验来确定蛋白质类杀虫剂的潜在毒性。Bt 是目前最普遍使用的抗病虫基因,但由于 Bt 蛋白普遍存在和 Bt 生物农药的普遍使用,且经过几十年的研究和应用,Bt 蛋白对人类无任何危险,因此 EPA 免除了对 Bt 残留量的限制。

**3. 转基因生物的监管** 在美国,转基因生物的审批由 USDA、EPA 和 FDA 负责,因此,其监管也就由上述部门及其在各州的直属机构负责。以 USDA 为例,如果某一种转基因作物被批准在某个州进行田间试验,那么动植物检疫局及其该州的分支机构就会对该田间试验的全过程进行监管,确保试验的安全。

### 三、国内外转基因植物安全评价的管理现状

世界主要发达国家和部分发展中国家都已制定了各自对转基因生物(包括植物)的管理法规,负责对其安全性进行评价和监控。由于各国在法规和管理方面存在着很大的差异,特别是许多发展中国家尚未建立相应的法律法规,一些国际组织如国际经合组织(OECD)、联合国工业发展组织(UNIDO)、联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)等在近年来都组织和召开了多次专家会议,积极组织国际间的协调,试图建立多数国家(尤其是发展中国家)能够接受的生物技术产业统一管理标准和程序。但由于存在许多争议,目前尚未形成统一的条文。

#### (一) 放松要求,可以随进随出

持有这一态度的国家主要是美国。美国政府从 1983 年起就设立专项研究基金,对 GM 植物等生物技术产品的生物安全研究给予持续、重点的支持,目前美国拥有先进的 GM 农产品安全评价的实施。但是在 GM 农作物管理法规上不够严格,美国农业部、食品与药物管理局、环保署等管理部门不指导科学审议,制造商也无需向食品、药品部咨询(申请是自愿的),但是生产者有确保他们的食品是安全的,并符合法律要求的义务。FDA 认为,在研究和开发的早期阶段,要求生产者用新技术来证实产品的安全及管理方面的问题是一件荒谬的事情。采取以产品为基础 Product-base 的管理模式,原则是以基因工程为代表的现代生物技术与传统生物技术没有本质区别,管理应针对生物技术产品而不是生物技术本身。它在原联邦法律的基础上增加转基因生物的内容,分别由美国农业部动物检疫局、美国环保署和食品和药品管理局负责环境和食品两方面的安全性评价与审批。主要观念是对于转基因生物及其食品“一日未能证明它是不安全的,它便是安全的”。美国的 FDA 不要求对 GMF 转基因食品加贴标签而是在各公司自愿的基础上审查与公共健康和安全有关的问题。只有那些与现有的相应食品有重大差别的食品,即不具备“实质等同”性的食品才要求加贴标签,而且标签只需说明产品性质的改变,不需要谈及该产品系转基因产品。

## (二) 严格管理制度，允许符合要求的入内

主要是欧盟以及瑞士、日本、中国等国家。

**1. 欧盟** 1998年，欧盟在世界上签署了第一个法案，要求凡是转基因产品都要进行标签说明，1999年还规定凡出口到欧盟的非转基因产品不得含有 $\geq 1\%$ 的转基因成分。2002年欧盟在关于预防原则的沟通机制中表示，欧洲有权规定保护的水平和，特别是关于环境、人类和动植物健康的保护。预防原则是欧洲政策的核心支柱。欧盟更多的关注消费者、农民和市民的权益，避免GMO（基因修饰生物）可能对生态环境造成的损害，并坚持预防为主的原则，要求在市场上实施食品的标签制度，使GMO的身份保持明显化，并用独特代码ID标记。2002年欧洲议会和欧洲理事会通过《关于转基因食品和饲料的条例》，率先在世界上对于食品销售实行严格的标签制度，以处理方法为基础学说（Process-base）的管理模式实行严格的立法与监管。欧洲消费者普遍不接受转基因食品，他们认为只要不能否定转基因食品的危险性，就应该加以限制。从研究水平上来说，欧洲国家，特别是英国、法国、德国等在农业生物技术领域都开展了广泛深入的研究，开发出一批可用于生产的转基因作物。但直到现在，欧洲产业化种植的转基因作物还很少。欧洲国家实施严格的生物技术安全管理制度既有科学方面的考虑，也有经济利益、公众态度等因素。

2003年，欧盟会议批准了《生物安全议定书》，该议定书允许各国在认为没有足够的科学依据可以证明转基因产品安全性的情况下可以禁止转基因产品的进口。欧盟的批准意味着15个欧盟成员国将陆续批准，新规定已在2003年底实施。欧盟法令规定凡转基因生物含量超过0.5%的所有食品和饲料都必须进行强制性标识并建立可追踪的制度，而其他成员国规定的阈值为0.9%。欧盟采取以技术为基础Technology-based的管理模式，认为生物技术本身具有潜在危险性，因此只要与生物技术有关的活动都要进行安全性评价并接受严格管理。除允许个别作物可进口外，基本采取禁止在环境中释放培育，并严格禁止GMF上市，对GMF产品也要贴上标签。

**2. 瑞士** 同欧盟的态度一样。瑞士也对外来转基因产品监控很严，即严格实施标签制度，凡含有任何转基因成分的所有实物制品及动物饲料（包括添加剂在内）都要贴上“转基因生物”或“含有转基因生物”的标签。2000年成为世界上第一个把含GMO的药品纳入标签制度的国家。

**3. 日本** 日本政府一直对转基因食物执行自愿安全检验的原则，但自2001年4月1日起实施“零容忍度”进口政策，规定所有转基因食物都必须经过安全检查和测试，同时规定凡转基因成分超过0.5%的食品要执行强制性标签制度。另外，部分转基因生物被严格禁止，其中包括“星联”玉米。2002年日本批准3种转基因玉米和转基因大豆可以供人类安全食用，其中包括美国道化学公司的Herculex I的抗虫、耐除草剂的转基因玉米和法德制药集团AventisAs公司生产的2种耐除草剂大豆。2003年，日本众议院批准颁布对有关转基因生物在日本应用进行管理的法律，并于2004年生效。这为日本签署《生物安全议定书》提供了法律框架。日本这项法律规定的内容有基因工程改造的管理、用于清洁环境或害虫控制的微生物遗传图谱的管理、转基因生物环境释放的批准与影响评估、

转基因生物的标准安全检验、转基因食品的强制性检验与规定等。

**4. 中国** 中国生物技术处于不断发展但还不完善的阶段，也制定了相应的法律法规予以规范，1993年发布了《基因工程安全管理办法》，2001年发布的《农业转基因生物安全管理条例》（以下简称《条例》），2002年1月5日分别发布了《农业转基因生物安全评价管理办法》。2002年4月8日出台的《转基因食品卫生管理办法》规定从2002年7月1日起，对“转基因动植物、微生物或其直接加工品为原料生产的食品和食品添加剂”必须进行标识。这些法规的颁布实施，标志着我国对农业生物技术产品的安全管理纳入了法制化的轨道。

在中华人民共和国境内从事农业转基因生物的研究、试验、生产、加工、经营和进口、出口活动，都需申报和审批，依照《条例》规定需要进行安全评价。《农业转基因生物安全评价管理办法》规定了安全等级和评价步骤，以科学为依据，以个案审查为原则，实行分级分阶段管理；说明了申报手续和委托技术检测机构应当具备的基本条件及职责任务；对从事农业转基因生物试验和生产的单位作了具体要求并制定了罚则；农业部负责农业转基因生物安全的监督管理，建立全国农业转基因生物安全监管和监测体系。

这些都表明我国政府更加重视转基因作物的生物安全问题。加强生物安全立法，加强转基因生物及其产品的安全性评估，严格推行“预警准则”，防范因各国的标准和认证程序的差别而导致的贸易障碍，重视有关生物安全的信息情报工作，特别是转基因生物有关信息的传播。

### （三）明确拒绝，坚决抵制

主要是意大利和英国。意大利农业部长2002年对外宣布：意大利绝不容许任何意外的“基因污染”，并投入5000万欧元执行相关对策。意大利的立场是“零容许度”，即不论任何转基因，也不论含量多少，都严禁进入意大利。意大利种植的1500万 $\text{hm}^2$ 玉米和大豆都是非转基因的原栽培种，不允许含有任何转基因生物以保证生物安全。

英国人也坚决反对让未成年人食用GMF，大多数英国人要求GMO商品贴上标签。2002年英国广播公司报道，1996年批准销售的T225转基因玉米喂的鸡死亡数目是传统非转基因玉米喂养鸡死亡数的2倍。随后英国社会立即对T225转基因玉米的潜在风险高度关注，消费者普遍明确拒绝转基因食物。

## 四、全球转基因生物及其产品安全性评价的热点问题

### （一）法规的协调（Harmonization of Regulation）

生物安全性是联合国环发大会和生物多样性公约的重要内容，联合国环境署（UNEP）正致力于在全球协调统一生物技术安全法规。但由于存在许多争议，目前尚未形成统一的条文。

生物安全性的核心是风险（或安全性）评估机制，美国等国认为安全性评价应建立在



科学基础之上，不应成为贸易技术壁垒，这必将是 UNEP 以后关注的核心。

## (二) 标签 (Labeling)

标签问题看似简单，其实是一个非常复杂的问题。转基因产品要不要在标签上标明一直是全球争论的热点。关于标签有两种观点，以科学为基础的观点和消费者信息权观点。以科学为基础的观点认为：只有在科学上有充足理由认为存在健康安全时，才能在标签上标明，例如转基因食品与传统食品实质上不同等（目前还没有不同等的），有可能对健康和安全产生影响时才需要标明。这一观点只涉及产品本身，不在乎产品的加工过程，而且是美国法律和政策的一贯观点，因此美国对一般的转基因食品不要求用标签标明。另一个观点认为公众有权知道技术过程。因此，任何用生物技术得到的食用粮食或产品应该标记，以便消费者在购买食品时知道这个信息。欧盟采用这个观点，然而它已经认识到不能用这一方法简单地把食品分成传统的和生物技术的。

标签在实施时还存在一个技术问题。标签将增加费用且难以在大范围内实施，其最大的技术障碍是以什么为基础来决定是否需要标签标明。例如，如何标出含有极少量转基因产品的食品。如果食品中含有外来基因表达的物质（如从抗除草剂大豆中提取的精炼油）是否需要标签标明等等许多问题。日本经过几年的争论于去年发布转基因食品暂时不用标签标明的法令。标签问题已成为新的国际贸易障碍，并阻碍了生物技术的发展。

## (三) 实质同等性

实质同等性已是各国评价食品安全性的原则。实质同等性意思是遗传工程作物或产品做成食品、饲料后的主要成分实质上与它的传统组成是同等的。在美国，如果遗传修饰没有引入毒性物质到食品中；没有改变已经存在的毒性物质水平；没有改变营养物质的生物有效组成；没有加入过敏物质，那么就认为该新食品与传统食品是同等的。如何看待实质同等性在美国和欧盟是有差异的。美国认为实质同等性是安全评价的终点，而欧盟则把实质同等性视为安全评价过程的一个组成部分。这又与美欧的法规体系有关，美国的体系是以产品为基础制定的，而欧盟则是以转基因过程或技术为基础制定的。

## (四) 转基因生物的安全管理与 WTO

WTO 的宗旨之一是农产品在全球自由贸易，而很多国家（包括欧盟）已存在一种倾向，即把转基因生物的安全评价作为贸易技术壁垒来限制农产品的进口。美国政府认为，生物安全管理应遵循公开、公平、高效、科学四大原则，转基因生物的安全管理应建立在科学基础之上，而不是基于政治和贸易。转基因生物的安全管理与贸易应当是彼此分离的。

## (五) 伦理问题

现代生物技术可以将基因在种间进行转移，如果番茄中含有猪的基因，回民如何接



受? 类似这样的问题也是一个全球性问题, 目前没有解决办法。

## (六) 农业环境方面的问题

在转基因植物引起的环境问题中, 人们最关心的是“超级杂草”和成片地大面积种植抗虫作物引起的害虫抗性增强。其中“超级杂草”包括转基因植物本身演变成“超级杂草”和由基因漂移导致的近缘种成为“超级杂草”。

## 参 考 文 献

- [1] 毕喜红, 张兴国. 转基因植物及其安全性评价. 西南园艺, 2005 (4): 26~29
- [2] 常惠芸, 侯顺利. 植物反应器生产口蹄疫疫苗的研究进展. 中国兽医科技, 2002, 32 (6): 21~23
- [3] 陈乃用. 实质等同性原则和转基因食品的安全性评价. 工业微生物, 2003 (3): 44~51
- [4] 段承俐, 萧凤回. 植物基因工程的商品化应用及前景. 云南农业大学学报, 2001 (3): 221~226
- [5] 关海宁, 徐桂花. 转基因食品安全评价及展望. 食品研究与开发, 2006 (4): 172~175
- [6] 刘雨芳, 尤民生. 中国农业转基因生物的安全性管理与评价方法. 武夷科学, 2002, 18: 46~50
- [7] 司马杨虎. 转基因作物和转基因技术的发展与未来. 生物学通报, 2001, 36 (8): 12~14
- [8] 唐浩, 段武德. 转基因食用植物的食用安全性问题. 农业科技管理, 2005 (6): 55~58
- [9] 王德平, 王丽伟. 我国转基因植物研究与产业化现状及发展对策. 农业科技管理, 2004 (5): 7~10
- [10] 谢杰, 余沛涛, 王全喜. 转基因植物的安全性问题及其对策. 上海农业学报. 2006, 22 (1): 80~84
- [11] 张大兵. 转基因植物的安全性与检测. 上海预防医学杂志, 2001 (9): 407~408
- [12] 张明洲, 应华冠. 转基因植物生物反应器的研究进展. 中国计量学院学报, 2005 (3): 242~246
- [13] 张永军, 吴孔明, 彭于发等. 转基因植物的生态风险. 生态学报, 2002, 22 (11): 1951~1959
- [14] Bergvinson D, Willcox M, Hoisington D. Efficacy and deployment of transgenic plants for stem-borer management. Insect Sci Applic, 1997, 17 (1): 157~167
- [15] Birch RG. Plant transformation: problems and strategies for practical application. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol, 1997, 48: 297~326
- [16] Crawley, MJ. Brown SL, Hails RS, et al. Transgenic crops in natural habitats. Nature, 2001, 40 (9): 682~683

## 附录一

# 基因工程安全管理办法

中华人民共和国科技委员会第 17 号令

1993 年 12 月 24 日

## 第一章 总 则

**第一条** 为了促进我国生物技术的研究与开发，加强基因工程工作的安全管理，保障公众和基因工程工作人员的健康，防止环境污染，维护生态平衡，制定本办法。

**第二条** 本办法所称基因工程，包括利用载体系统的重组体 DNA 技术，以及利用物理或者化学方法把异源 DNA 直接导入有机体的技术。但不包括下列遗传操作：

- (一) 细胞融合技术，原生质体融合技术；
- (二) 传统杂交繁殖技术；
- (三) 诱变技术，体外受精技术，细胞培养或者胚胎培养技术。

**第三条** 本办法适用于在中华人民共和国境内进行的一切基因工程工作，包括实验研究、中间试验、工业化生产以及遗传工程体释放和遗传工程产品使用等。

从国外进口遗传工程体，在中国境内进行基因工程工作的，应当遵守本办法。

**第四条** 国家科学技术委员会主管全国基因工程安全工作，成立全国基因工程安全委员会，负责基因工程安全监督和协调。

国务院有关行政主管部门依照有关规定，在各自的职责范围内对基因工程工作进行安全管理。

**第五条** 基因工程工作安全管理实行安全等级控制、分类归口审批制度。

## 第二章 安全等级和安全性评价

**第六条** 按照潜在危险程度，将基因工程工作分为四个安全等级：

安全等级 I，该类基因工程工作对人类健康和生态环境尚不存在危险；

安全等级 II，该类基因工程工作对人类健康和生态环境具有低度危险；

安全等级 III，该类基因工程工作对人类健康和生态环境具有中度危险；

安全等级 IV，该类基因工程工作对人类健康和生态环境具有高度危险。

**第七条** 各类基因工程工作的安全等级的技术标准和环境标准，由国务院有关行政主管部门制定，并报全国基因工程安全委员会备案。

**第八条** 从事基因工程工作的单位，应当进行安全性评价，评估潜在危险，确定安全

等级，制定安全控制方法和措施。

**第九条** 从事基因工程实验研究，应当对 DNA 供体、载体、宿主及遗传工程体进行安全性评价。

安全性评价重点是目的基因、载体、宿主和遗传工程体的致病性、致癌性、抗药性、转移性和生态环境效应，以及确定生物控制和物理控制等级。

**第十条** 从事基因工程中间试验或者工业化生产，应当根据所用遗传工程体的安全性评价，对培养、发酵、分离和纯化工艺过程的设备和设施的物理屏障进行安全性鉴定，确定中间试验或者工业化生产的安全等级。

**第十一条** 从事遗传工程体释放，应当对遗传工程体安全性、释放目的、释放地区的生态环境、释放方式、监测方法和控制措施进行评价，确定释放工作的安全等级。

**第十二条** 遗传工程产品的使用，应当经过生物学安全检验，进行安全性评价，确定遗传工程产品对公众健康和生态环境可能产生的影响。

### 第三章 申报和审批

**第十三条** 从事基因工程工作的单位，应当依据遗传工程产品适用性质和安全等级，分类分级进行申报，经审批同意后方可进行。

**第十四条** 基因工程实验研究，属于安全等级Ⅰ和Ⅱ的工作，由本单位行政负责人批准；属于安全等级Ⅲ的工作，由本单位行政负责人审查，报国务院有关行政主管部门批准；属于安全等级Ⅳ的工作，经国务院有关行政主管部门审查，报全国基因工程安全委员会批准。

**第十五条** 基因工程中间试验，属于安全等级Ⅰ的工作，由本单位行政负责人批准；属于安全等级Ⅱ的工作，报国务院有关行政主管部门批准；属于安全等级Ⅲ的工作，由国务院有关行政主管部门审批，并报全国基因工程安全委员会备案；属于安全等级Ⅳ的工作，由国务院有关行政主管部门审查，报全国基因工程安全委员会批准。

**第十六条** 基因工程工业化生产、遗传工程体释放和遗传工程产品使用，属于安全等级Ⅰ至Ⅱ的工作，由国务院有关行政主管部门审批，并报全国基因工程安全委员会备案；属于安全等级Ⅳ的工作，由国务院有关行政主管部门审查，报全国基因工程安全委员会批准。

**第十七条** 从事基因工程工作的单位应当履行下列申报手续：

- (一) 项目负责人对从事的基因工程工作进行安全性评价，并填报申请书；
- (二) 本单位学术委员会对申报资料进行技术审查；
- (三) 上报申请书及提交有关技术资料。

**第十八条** 凡符合下列各项条件的基因工程工作，应当予以批准，并签发证明文件：

- (一) 不存在对申报的基因工程工作安全性评价的可靠性产生怀疑的事实；
- (二) 保证所申报的基因工程工作按照安全等级的要求，采取与现有科学技术水平相适应的安全控制措施，判断不会对公众健康和生态环境造成严重危害；
- (三) 项目负责人和工作人员具备从事基因工程工作所必需的专业知识和安全操作知

识，能承担本办法规定的义务；

(四) 符合国家有关法律、法规规定。

## 第四章 安全控制措施

**第十九条** 从事基因工程工作的单位，应当根据安全等级，确定安全控制方法，制定安全操作规则。

**第二十条** 从事基因工程工作的单位，应当根据安全等级，制定相应治理废弃物的安全措施。排放之前应当采取措施使残留遗传工程体灭活，以防止扩散和污染环境。

**第二十一条** 从事基因工程工作的单位，应当制定预防事故的应急措施，并将其列入安全操作规则。

**第二十二条** 遗传工程体应当贮存在特定设备内。贮放场所的物理控制应当与安全等级相适应。

安全等级Ⅳ的遗传工程体贮放场所，应当指定专人管理。

从事基因工程工作的单位应当编制遗传工程体的贮存目录清单，以备核查。

**第二十三条** 转移或者运输的遗传工程体应当放在与其安全等级相适应的容器内，严格遵守国家有关运输或者邮寄生物材料的规定。

**第二十四条** 从事基因工程工作的单位和个人必须认真做好安全监督记录。安全监督记录保存期不得少于10年，以备核查。

**第二十五条** 因基因工程工作发生损害公众健康或者环境污染事故的单位，必须及时采取措施，控制损害的扩大，并向有关主管部门报告。

## 第五章 法律责任

**第二十六条** 有下列情况之一的，由有关主管部门视情节轻重分别给予警告、责令停止工作、停止资助经费、没收非法所得的处罚：

- (一) 未经审批，擅自进行基因工程工作的；
- (二) 使用不符合规定的装置、仪器、实验室等设施的；
- (三) 违反基因工程工作安全操作规则的；
- (四) 违反本办法其他规定的。

**第二十七条** 审批机关工作人员玩忽职守、徇私舞弊，由所在单位或者其上级主管部门对直接责任人员给予行政处分。情节严重，构成犯罪的，依法追究刑事责任。

**第二十八条** 违反本办法的规定，造成下列情况之一的，负有责任的单位必须立即停止损害行为，并负责治理污染、赔偿有关损失；情节严重，构成犯罪的，依法追究直接责任人员的刑事责任：

- (一) 严重污染环境的；
- (二) 损害或者影响公众健康的；
- (三) 严重破坏生态资源、影响生态平衡的。

**第二十九条** 审批机构的工作人员和参与审查的专家负有为申报者保守技术秘密的责任。

## 第六章 附 则

**第三十条** 本办法所用术语的含义是：

(一) DNA，系脱氧核糖核酸的英文名词缩写，是贮存生物遗传信息的遗传物质。

(二) 基因，系控制生物性状的遗传物质的功能和结构单位，是具有遗传信息的 DNA 片段。

(三) 目的基因，系指以修饰宿主细胞遗传组成并表达其遗传效应为目的异源 DNA 片段。

(四) 载体，系指具有运载异源 DNA 进入宿主细胞和自我复制能力的 DNA 分子。

(五) 宿主细胞，系指被导入重组 DNA 分子的细胞。宿主细胞又称受体细胞。

(六) 重组 DNA 分子，系指由异源 DNA 与载体 DNA 组成的杂种 DNA 分子。

(七) 有机体，系指能够繁殖或者能够传递遗传物质的活细胞或者生物体。

(八) 重组体，系指因自然因素或者用人工方法导入异源 DNA 改造其遗传组成的机体。

(九) 变异体，系指因自然或者人工因素导致其遗传物质变化的有机体。

(十) 重组体 DNA 技术，系指利用载体系统人工修饰有机体遗传组成的技术，即在体外通过酶的作用将异源 DNA 与载体 DNA 重组，并将该重组 DNA 分子导入宿主细胞内，以扩增异源 DNA，并实现其功能表达的技术。

(十一) 遗传工程体，系指利用基因工程的遗传操作获得的有机体，包括遗传工程动物、遗传工程植物和遗传工程微生物。

下列变异体和重组体不属于本办法所称遗传工程体：用细胞融合或者原生质体融合技术获得的生物；传统杂交繁殖技术获得的动物和植物；物理化学因素诱变技术改变其遗传组成的生物；以及染色体结构畸变和数目畸变的生物。

(十二) 遗传工程产品，系指含有遗传工程体、遗传工程体成分或者遗传工程体目的基因表达产物的产品。

(十三) 基因工程实验研究，系指在控制系统内进行的实验室规模的基因工程研究工作。

(十四) 基因工程中间试验，系指把基因工程实验研究成果和遗传工程体应用于工业化生产（生产定型和鉴定）之前，旨在验证、补充相关数据，确定、完善技术规范（产品标准和工艺规程）或者解决扩大生产关键技术，在控制系统内进行的试验或者试生产。

(十五) 基因工程工业化生产，系指利用遗传工程体，在控制系统内进行医药、农药、兽药、饲料、肥料、食品、添加剂、化工原料等商业化规模生产，亦包括利用遗传工程进行冶金、采油和处理废物的工艺过程。

(十六) 遗传工程体释放，系指遗传工程体在开放系统内进行研究、生产和应用，包括将遗传工程体施用于田间、牧场、森林、矿产和水域等自然生态系统中。



(十七) 遗传工程产品使用, 系指遗传工程产品投放市场销售或者供人们应用。

(十八) 控制系统, 系指通过物理控制和生物控制建立的操作体系。

物理控制, 系指利用设备的严密封闭、设施的特殊设计和安全操作, 使有潜在危险的DNA 供体、载体和宿主细胞或者遗传工程体向环境扩散减少到最低限度。

生物控制, 系指利用遗传修饰, 使有潜在危险的载体和宿主细胞在控制系统外的存活、繁殖和转移能力降低到最低限度。

不具备上述控制条件的操作体系, 称为开放系统。

**第三十一条** 国务院有关行政主管部门按照本办法的规定, 在各自的职责范围内制定实施细则。

**第三十二条** 本办法由国家科学技术委员会解释。

**第三十三条** 本办法自发布之日起施行。

## 附录二

# 农业转基因生物安全管理条例

中华人民共和国国务院第 304 号令

2001 年 5 月 23 日

## 第一章 总 则

**第一条** 为了加强农业转基因生物安全管理，保障人体健康和动植物、微生物安全，保护生态环境，促进农业转基因生物技术研究，制定本条例。

**第二条** 在中华人民共和国境内从事农业转基因生物的研究、试验、生产、加工、经营和进口、出口活动，必须遵守本条例。

**第三条** 本条例所称农业转基因生物，是指利用基因工程技术改变基因组构成，用于农业生产或者农产品加工的动植物、微生物及其产品。主要包括：

(一) 转基因动植物（含种子、种畜禽、水产苗种）和微生物；

(二) 转基因动植物、微生物产品；

(三) 转基因农产品的直接加工品；

(四) 含有转基因动植物、微生物或者其产品成分的种子、种畜禽、水产苗种、农药、兽药、肥料和添加剂等产品。

本条例所称农业转基因生物安全，是指防范农业转基因生物对人类、动植物、微生物和生态环境构成的危险或者潜在风险。

**第四条** 国务院农业行政主管部门负责全国农业转基因生物安全的监督管理工作。

县级以上地方各级人民政府农业行政主管部门负责本行政区域内的农业转基因生物安全的监督管理工作。

县级以上各级人民政府卫生行政主管部门依照《中华人民共和国食品卫生法》的有关规定，负责转基因食品卫生安全的监督管理工作。

**第五条** 国务院建立农业转基因生物安全管理部际联席会议制度。

农业转基因生物安全管理部际联席会议由农业、科技、环境保护、卫生、外经贸、检验检疫等有关部门的负责人组成，负责研究、协调农业转基因生物安全管理工作中的重大问题。

**第六条** 国家对农业转基因生物安全实行分级管理评价制度。

农业转基因生物按照其对人类、动植物、微生物和生态环境的危险程度，分为 I、II、III、IV 四个等级。具体划分标准由国务院农业行政主管部门制定。

**第七条** 国家建立农业转基因生物安全评价制度。

农业转基因生物安全评价的标准和技术规范，由国务院农业行政主管部门制定。

**第八条** 国家对农业转基因生物实行标识制度。

实施标识管理的农业转基因生物目录，由国务院农业行政主管部门商国务院有关部门制定、调整并公布。

## 第二章 研究与试验

**第九条** 国务院农业行政主管部门应当加强农业转基因生物研究与试验的安全评价管理工作，并设立农业转基因生物安全委员会，负责农业转基因生物的安全评价工作。

农业转基因生物安全委员会由从事农业转基因生物研究、生产、加工、检验检疫以及卫生、环境保护等方面的专家组成。

**第十条** 国务院农业行政主管部门根据农业转基因生物安全评价工作的需要，可以委托具备检测条件和能力的技术检测机构对农业转基因生物进行检测。

**第十一条** 从事农业转基因生物研究与试验的单位，应当具备与安全等级相适应的安全设施和措施，确保农业转基因生物研究与试验的安全，并成立农业转基因生物安全小组，负责本单位农业转基因生物研究与试验的安全工作。

**第十二条** 从事Ⅲ、Ⅳ级农业转基因生物研究的，应当在研究开始前向国务院农业行政主管部门报告。

**第十三条** 农业转基因生物试验，一般应当经过中间试验、环境释放和生产性试验三个阶段。

中间试验，是指在控制系统内或者控制条件下进行的小规模试验。

环境释放，是指在自然条件下采取相应安全措施所进行的中规模的试验。

生产性试验，是指在生产和应用前进行的较大规模的试验。

**第十四条** 农业转基因生物在实验室研究结束后，需要转入中间试验的，试验单位应当向国务院农业行政主管部门报告。

**第十五条** 农业转基因生物试验需要从上一试验阶段转入下一试验阶段的，试验单位应当向国务院农业行政主管部门提出申请；经农业转基因生物安全委员会进行安全评价合格的，由国务院农业行政主管部门批准转入下一试验阶段。

试验单位提出前款申请，应当提供下列材料：

- (一) 农业转基因生物的安全等级和确定安全等级的依据；
- (二) 农业转基因生物技术检测机构出具的检测报告；
- (三) 相应的安全管理、防范措施；
- (四) 上一试验阶段的试验报告。

**第十六条** 从事农业转基因生物试验的单位在生产性试验结束后，可以向国务院农业行政主管部门申请领取农业转基因生物安全证书。

试验单位提出前款申请，应当提供下列材料：

- (一) 农业转基因生物的安全等级和确定安全等级的依据；
- (二) 农业转基因生物技术检测机构出具的检测报告；

(三) 生产性试验的总结报告；

(四) 国务院农业行政主管部门规定的其他材料。

国务院农业行政主管部门收到申请后，应当组织农业转基因生物安全委员会进行安全评价；安全评价合格的，方可颁发农业转基因生物安全证书。

**第十七条** 转基因植物种子、种畜禽、水产苗种，利用农业转基因生物生产的或者含有农业转基因生物成分的种子、种畜禽、水产苗种、农药、兽药、肥料和添加剂等，在依照有关法律、行政法规的规定进行审定、登记或者评价、审批前，应当依照本条例第十六条的规定取得农业转基因生物安全证书。

**第十八条** 中外合作、合资或者外方独资在中华人民共和国境内从事农业转基因生物研究与试验的，应当经国务院农业行政主管部门批准。

### 第三章 生产与加工

**第十九条** 生产转基因植物种子、种畜禽、水产苗种，应当取得国务院农业行政主管部门颁发的种子、种畜禽、水产苗种生产许可证。

生产单位和个人申请转基因植物种子、种畜禽、水产苗种生产许可证，除应当符合有关法律、行政法规规定的条件外，还应当符合下列条件：

(一) 取得农业转基因生物安全证书并通过品种审定；

(二) 在指定的区域种植或者养殖；

(三) 有相应的安全管理、防范措施；

(四) 国务院农业行政主管部门规定的其他条件。

**第二十条** 生产转基因植物种子、种畜禽、水产苗种的单位和个人，应当建立生产档案，载明生产地点、基因及其来源、转基因的方法以及种子、种畜禽、水产苗种流向等内容。

**第二十一条** 单位和个人从事农业转基因生物生产、加工的，应当由国务院农业行政主管部门或者省、自治区、直辖市人民政府农业行政主管部门批准。具体办法由国务院农业行政主管部门制定。

**第二十二条** 农民养殖、种植转基因动植物的，由种子、种畜禽、水产苗种销售单位依照本条例第二十一条的规定代办审批手续。审批部门和代办单位不得向农民收取审批、代办费用。

**第二十三条** 从事农业转基因生物生产、加工的单位和个人，应当按照批准的品种、范围、安全管理要求和相应的技术标准组织生产、加工，并定期向所在地县级人民政府农业行政主管部门提供生产、加工、安全管理情况和产品流向的报告。

**第二十四条** 农业转基因生物在生产、加工过程中发生基因安全事故时，生产、加工单位和个人应当立即采取安全补救措施，并向所在地县级人民政府农业行政主管部门报告。

**第二十五条** 从事农业转基因生物运输、贮存单位和个人，应当采取与农业转基因生物安全等级相适应的安全控制措施，确保农业转基因生物运输、贮存的安全。

## 第四章 经 营

**第二十六条** 经营转基因植物种子、种畜禽、水产苗种的单位和个人，应当取得国务院农业行政主管部门颁发的种子、种畜禽、水产苗种经营许可证。

经营单位和个人申请转基因植物种子、种畜禽、水产苗种经营许可证，除应当符合有关法律、行政法规规定的条件外，还应当符合下列条件：

- (一) 有专门的管理人员和经营档案；
- (二) 有相应的安全管理、防范措施；
- (三) 国务院农业行政主管部门规定的其他条件。

**第二十七条** 经营转基因植物种子、种畜禽、水产苗种的单位和个人，应当建立经营档案，载明种子、种畜禽、水产苗种的来源、贮存、运输和销售去向等内容。

**第二十八条** 在中华人民共和国境内销售列入农业转基因生物目录的农业转基因生物，应当有明显的标识。

列入农业转基因生物目录的农业转基因生物，由生产、分装单位和个人负责标识；未标识的，不得销售。经营单位和个人在进货时，应当对货物和标识进行核对。经营单位和个人拆开原包装进行销售的，应当重新标识。

**第二十九条** 农业转基因生物标识应当载明产品中含有转基因成分的主要原料名称；有特殊销售范围要求的，还应当载明销售范围，并在指定范围内销售。

**第三十条** 农业转基因生物的广告，应当经国务院农业行政主管部门审查批准后，方可刊登、播放、设置和张贴。

## 第五章 进口与出口

**第三十一条** 从中华人民共和国境外引进农业转基因生物用于研究、试验的，引进单位应当向国务院农业行政主管部门提出申请；符合下列条件的，国务院农业行政主管部门方可批准：

- (一) 具有国务院农业行政主管部门规定的申请资格；
- (二) 引进的农业转基因生物在国（境）外已经进行了相应的研究、试验；
- (三) 有相应的安全管理、防范措施。

**第三十二条** 境外公司向中华人民共和国出口转基因植物种子、种畜禽、水产苗种和利用农业转基因生物生产的或者含有农业转基因生物成分的植物种子、种畜禽、水产苗种、农药、兽药、肥料和添加剂的，应当向国务院农业行政主管部门提出申请；符合下列条件的，国务院农业行政主管部门方可批准试验材料入境，并依照本条例的规定进行中间试验、环境释放和生产性试验：

- (一) 输出国家或者地区已经允许作为相应用途并投放市场；
- (二) 输出国家或者地区经过科学试验证明对人类、动植物、微生物和生态环境无害；
- (三) 有相应的安全管理、防范措施。



生产性试验结束后，经安全评价合格，并取得农业转基因生物安全证书后，方可依照有关法律、行政法规的规定办理审定、登记或者评价、审批手续。

**第三十三条** 境外公司向中华人民共和国出口农业转基因生物用作加工原料的，应当向国务院农业行政主管部门提出申请；符合下列条件，并经安全评价合格的，由国务院农业行政主管部门颁发农业转基因生物安全证书：

- (一) 输出国家或者地区已经允许作为相应用途并投放市场；
- (二) 输出国家或者地区经过科学试验证明对人类、动植物、微生物和生态环境无害；
- (三) 经农业转基因生物技术检测机构检测，确认对人类、动植物、微生物和生态环境不存在危险；
- (四) 有相应的安全管理、防范措施。

**第三十四条** 从中华人民共和国境外引进农业转基因生物的，或者向中华人民共和国出口农业转基因生物的，引进单位或者境外公司应当凭国务院农业行政主管部门颁发的农业转基因生物安全证书和相关批准文件，向口岸出入境检验检疫机构报检；经检疫合格后，方可向海关申请办理有关手续。

**第三十五条** 农业转基因生物在中华人民共和国过境转移的，货主应当事先向国家出入境检验检疫部门提出申请；经批准方可过境转移，并遵守中华人民共和国有关法律、行政法规的规定。

**第三十六条** 国务院农业行政主管部门、国家出入境检验检疫部门应当自收到申请人申请之日起 270 日内作出批准或者不批准的决定，并通知申请人。

**第三十七条** 向中华人民共和国境外出口农产品，外方要求提供非转基因农产品证明的，由口岸出入境检验检疫机构根据国务院农业行政主管部门发布的转基因农产品信息，进行检测并出具非转基因农产品证明。

**第三十八条** 进口农业转基因生物，没有国务院农业行政主管部门颁发的农业转基因生物安全证书和相关批准文件的，或者与证书、批准文件不符的，作退货或者销毁处理。进口农业转基因生物不按照规定标识的，重新标识后方可入境。

## 第六章 监督检查

**第三十九条** 农业行政主管部门履行监督检查职责时，有权采取下列措施：

- (一) 询问被检查的研究、试验、生产、加工、经营或者进口、出口的单位和个人、利害关系人、证明人，并要求其提供与农业转基因生物安全有关的证明材料或者其他资料；
- (二) 查阅或者复制农业转基因生物研究、试验、生产、加工、经营或者进口、出口的有关档案、账册和资料等；
- (三) 要求有关单位和个人就有关农业转基因生物安全的问题作出说明；
- (四) 责令违反农业转基因生物安全管理的单位和个人停止违法行为；
- (五) 在紧急情况下，对非法研究、试验、生产、加工、经营或者进口、出口的农业转基因生物实施封存或者扣押。

**第四十条** 农业行政主管部门工作人员在监督检查时，应当出示执法证件。

**第四十一条** 有关单位和个人对农业行政主管部门的监督检查，应当予以支持、配合，不得拒绝、阻碍监督检查人员依法执行职务。

**第四十二条** 发现农业转基因生物对人类、动植物和生态环境存在危险时，国务院农业行政主管部门有权宣布禁止生产、加工、经营和进口，收回农业转基因生物安全证书，销毁有关存在危险的农业转基因生物。

## 第七章 罚 则

**第四十三条** 违反本条例规定，从事Ⅲ、Ⅳ级农业转基因生物研究或者进行中间试验，未向国务院农业行政主管部门报告的，由国务院农业行政主管部门责令暂停研究或者中间试验，限期改正。

**第四十四条** 违反本条例规定，未经批准擅自从事环境释放、生产性试验的，已获批准但未按照规定采取安全管理、防范措施的，或者超过批准范围进行试验的，由国务院农业行政主管部门或者省、自治区、直辖市人民政府农业行政主管部门依据职权，责令停止试验，并处1万元以上5万元以下的罚款。

**第四十五条** 违反本条例规定，在生产性试验结束后，未取得农业转基因生物安全证书，擅自将农业转基因生物投入生产和应用的，由国务院农业行政主管部门责令停止生产和应用，并处2万元以上10万元以下的罚款。

**第四十六条** 违反本条例第十八条规定，未经国务院农业行政主管部门批准，从事农业转基因生物研究与试验的，由国务院农业行政主管部门责令立即停止研究与试验，限期补办审批手续。

**第四十七条** 违反本条例规定，未经批准生产、加工农业转基因生物或者未按照批准的品种、范围、安全管理要求和技术标准生产、加工的，由国务院农业行政主管部门或者省、自治区、直辖市人民政府农业行政主管部门依据职权，责令停止生产或者加工，没收违法生产或者加工的产品及违法所得；违法所得10万元以上的，并处违法所得1倍以上5倍以下的罚款；没有违法所得或者违法所得不足10万元的，并处10万元以上20万元以下的罚款。

**第四十八条** 违反本条例规定，转基因植物种子、种畜禽、水产苗种的生产、经营单位和个人，未按照规定制作、保存生产、经营档案的，由县级以上人民政府农业行政主管部门依据职权，责令改正，处1000元以上1万元以下的罚款。

**第四十九条** 违反本条例规定，转基因植物种子、种畜禽、水产苗种的销售单位，不履行审批手续代办义务或者在代办过程中收取代办费用的，由国务院农业行政主管部门责令改正，处2万元以下的罚款。

**第五十条** 违反本条例规定，未经国务院农业行政主管部门批准，擅自进口农业转基因生物的，由国务院农业行政主管部门责令停止进口，没收已进口的产品和违法所得；违法所得10万元以上的，并处违法所得1倍以上5倍以下的罚款；没有违法所得或者违法所得不足10万元的，并处10万元以上20万元以下的罚款。

**第五十一条** 违反本条例规定，进口、携带、邮寄农业转基因生物未向口岸出入境检验检疫机构报检的，或者未经国家出入境检验检疫部门批准过境转移农业转基因生物的，由口岸出入境检验检疫机构或者国家出入境检验检疫部门比照进出境动植物检疫法的有关规定处罚。

**第五十二条** 违反本条例关于农业转基因生物标识管理规定的，由县级以上人民政府农业行政主管部门依据职权，责令限期改正，可以没收非法销售的产品和违法所得，并可以处1万元以上5万元以下的罚款。

**第五十三条** 假冒、伪造、转让或者买卖农业转基因生物有关证明文书的，由县级以上人民政府农业行政主管部门依据职权，收缴相应的证明文书，并处2万元以上10万元以下的罚款；构成犯罪的，依法追究刑事责任。

**第五十四条** 违反本条例规定，在研究、试验、生产、加工、贮存、运输、销售或者进口、出口农业转基因生物过程中发生基因安全事故，造成损害的，依法承担赔偿责任。

**第五十五条** 国务院农业行政主管部门或者省、自治区、直辖市人民政府农业行政主管部门违反本条例规定核发许可证、农业转基因生物安全证书以及其他批准文件的，或者核发许可证、农业转基因生物安全证书以及其他批准文件后不履行监督管理职责的，对直接负责的主管人员和其他直接责任人员依法给予行政处分；构成犯罪的，依法追究刑事责任。

## 第八章 附 则

**第五十六条** 本条例自公布之日起施行。

## 附录三

# 农业转基因生物安全评价管理办法

中华人民共和国农业部第8号令

2002年1月5日

## 第一章 总 则

**第一条** 为了加强农业转基因生物安全评价管理，保障人类健康和动植物、微生物安全，保护生态环境，根据《农业转基因生物安全管理条例》（简称《条例》），制定本办法。

**第二条** 在中华人民共和国境内从事农业转基因生物的研究、试验、生产、加工、经营和进口、出口活动，依照《条例》规定需要进行安全评价的，应当遵守本办法。

**第三条** 本办法适用于《条例》规定的农业转基因生物，即利用基因工程技术改变基因组构成，用于农业生产或者农产品加工的植物、动物、微生物及其产品，主要包括：

（一）转基因动植物（含种子、种畜禽、水产苗种）和微生物；

（二）转基因动植物、微生物产品；

（三）转基因农产品的直接加工品；

（四）含有转基因动植物、微生物或者其产品成分的种子、种畜禽、水产苗种、农药、兽药、肥料和添加剂等产品。

**第四条** 本办法评价的是农业转基因生物对人类、动植物、微生物和生态环境构成的危险或者潜在的风险。安全评价工作按照植物、动物、微生物三个类别，以科学为依据，以个案审查为原则，实行分级分阶段管理。

**第五条** 根据《条例》第九条的规定设立国家农业转基因生物安全委员会，负责农业转基因生物的安全评价工作。农业转基因生物安全委员会由从事农业转基因生物研究、生产、加工、检验检疫、卫生、环境保护等方面的专家组成，每届任期三年。

农业部设立农业转基因生物安全管理办公室，负责农业转基因生物安全评价管理工作。

**第六条** 凡从事农业转基因生物研究与试验的单位，应当成立由单位法人代表负责的农业转基因生物安全小组，负责本单位农业转基因生物的安全管理及安全评价申报的审查工作。

**第七条** 农业部根据农业转基因生物安全评价工作的需要，委托具备检测条件和能力的技术检测机构对农业转基因生物进行检测，为安全评价和管理提供依据。

**第八条** 转基因植物种子、种畜禽、水产种苗，利用农业转基因生物生产的或者含有农业转基因生物成分的种子、种畜禽、水产种苗、农药、兽药、肥料和添加剂等，在依照

有关法律、行政法规的规定进行审定、登记或者评价、审批前，应当依照本办法的规定取得农业转基因生物安全证书。

## 第二章 安全等级和安全评价

**第九条** 农业转基因生物安全实行分级评价管理。

按照对人类、动植物、微生物和生态环境的危险程度，将农业转基因生物分为以下四个等级：

安全等级Ⅰ：尚不存在危险；

安全等级Ⅱ：具有低度危险；

安全等级Ⅲ：具有中度危险；

安全等级Ⅳ：具有高度危险。

**第十条** 农业转基因生物安全评价和安全等级的确定按以下步骤进行：

- (一) 确定受体生物的安全等级；
- (二) 确定基因操作对受体生物安全等级影响的类型；
- (三) 确定转基因生物的安全等级；
- (四) 确定生产、加工活动对转基因生物安全性的影响；
- (五) 确定转基因产品的安全等级。

**第十一条** 受体生物安全等级的确定。

受体生物分为四个安全等级：

(一) 符合下列条件之一的受体生物应当确定为安全等级Ⅰ：

1. 对人类健康和生态环境未曾发生过不利影响；
2. 演化成有害生物的可能性极小；
3. 用于特殊研究的短存活期受体生物，实验结束后在自然环境中存活的可能性极小。

(二) 对人类健康和生态环境可能产生低度危险，但是通过采取安全控制措施完全可以避免其危险的受体生物，应当确定为安全等级Ⅱ。

(三) 对人类健康和生态环境可能产生中度危险，但是通过采取安全控制措施，基本上可以避免其危险的受体生物，应当确定为安全等级Ⅲ。

(四) 对人类健康和生态环境可能产生高度危险，而且在封闭设施之外尚无适当的安全控制措施避免其发生危险的受体生物，应当确定为安全等级Ⅳ。包括：

1. 可能与其他生物发生高频率遗传物质交换的有害生物；
2. 尚无有效技术防止其本身或其产物逃逸、扩散的有害生物；
3. 尚无有效技术保证其逃逸后，在对人类健康和生态环境产生不利影响之前，将其捕获或消灭的有害生物。

**第十二条** 基因操作对受体生物安全等级影响类型的确定。

基因操作对受体生物安全等级的影响分为三种类型，即：增加受体生物的安全性；不影响受体生物的安全性；降低受体生物的安全性。

类型1 增加受体生物安全性的基因操作。包括：除去某个（些）已知具有危险的基



因或抑制某个（些）已知具有危险的基因表达的基因操作。

类型 2 不影响受体生物安全性的基因操作。包括：

1. 改变受体生物的表型或基因型而对人类健康和生态环境没有影响的基因操作；
2. 改变受体生物的表型或基因型而对人类健康和生态环境没有不利影响的基因操作。

类型 3 降低受体生物安全性的基因操作。包括：

1. 改变受体生物的表型或基因型，并可能对人类健康或生态环境产生不利影响的基因操作；

2. 改变受体生物的表型或基因型，但不能确定对人类健康或生态环境影响的基因操作。

### 第十三条 农业转基因生物安全等级的确定。

根据受体生物的安全等级和基因操作对其安全等级的影响类型及影响程度，确定转基因生物的安全等级。

（一）受体生物安全等级为 I 的转基因生物：

1. 安全等级为 I 的受体生物，经类型 1 或类型 2 的基因操作而得到的转基因生物，其安全等级仍为 I。

2. 安全等级为 I 的受体生物，经类型 3 的基因操作而得到的转基因生物，如果安全性降低很小，且不需要采取任何安全控制措施的，则其安全等级仍为 I；如果安全性有一定程度的降低，但是可以通过适当的安全控制措施完全避免其潜在危险的，则其安全等级为 II；如果安全性严重降低，但是可以通过严格的安全控制措施避免其潜在危险的，则其安全等级为 III；如果安全性严重降低，而且无法通过安全控制措施完全避免其危险的，则其安全等级为 IV。

（二）受体生物安全等级为 II 的转基因生物：

1. 安全等级为 II 的受体生物，经类型 1 的基因操作而得到的转基因生物，如果安全性增加到对人类健康和生态环境不再产生不利影响的，则其安全等级为 I；如果安全性虽有增加，但对人类健康和生态环境仍有低度危险的，则其安全等级仍为 II。

2. 安全等级为 II 的受体生物，经类型 2 的基因操作而得到的转基因生物，其安全等级仍为 II。

3. 安全等级为 II 的受体生物，经类型 3 的基因操作而得到的转基因生物，根据安全性降低的程度不同，其安全等级可为 II、III 或 IV，分级标准与受体生物的分级标准相同。

（三）受体生物安全等级为 III 的转基因生物：

1. 安全等级为 III 的受体生物，经类型 1 的基因操作而得到的转基因生物，根据安全性增加的程度不同，其安全等级可为 I、II 或 III，分级标准与受体生物的分级标准相同。

2. 安全等级为 III 的受体生物，经类型 2 的基因操作而得到的转基因生物，其安全等级仍为 III。

3. 安全等级为 III 的受体生物，经类型 3 的基因操作得到的转基因生物，根据安全性降低的程度不同，其安全等级可为 III 或 IV，分级标准与受体生物的分级标准相同。

(四) 受体生物安全等级为Ⅳ的转基因生物：

1. 安全等级为Ⅳ的受体生物，经类型 1 的基因操作而得到的转基因生物，根据安全性增加的程度不同，其安全等级可为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ或Ⅳ，分级标准与受体生物的分级标准相同。

2. 安全等级为Ⅳ的受体生物，经类型 2 或类型 3 的基因操作而得到的转基因生物，其安全等级仍为Ⅳ。

**第十四条 农业转基因产品安全等级的确定。**

根据农业转基因生物的安全等级和产品的生产、加工活动对其安全等级的影响类型和影响程度，确定转基因产品的安全等级。

(一) 农业转基因产品的生产、加工活动对转基因生物安全等级的影响分为三种类型：

类型 1 增加转基因生物的安全性；

类型 2 不影响转基因生物的安全性；

类型 3 降低转基因生物的安全性。

(二) 转基因生物安全等级为Ⅰ的转基因产品：

1. 安全等级为Ⅰ的转基因生物，经类型 1 或类型 2 的生产、加工活动而形成的转基因产品，其安全等级仍为Ⅰ。

2. 安全等级为Ⅰ的转基因生物，经类型 3 的生产、加工活动而形成的转基因产品，根据安全性降低的程度不同，其安全等级可为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ或Ⅳ，分级标准与受体生物的分级标准相同。

(三) 转基因生物安全等级为Ⅱ的转基因产品：

1. 安全等级为Ⅱ的转基因生物，经类型 1 的生产、加工活动而形成的转基因产品，如果安全性增加到对人类健康和生态环境不再产生不利影响的，其安全等级为Ⅰ；如果安全性虽然有增加，但是对人类健康或生态环境仍有低度危险的，其安全等级仍为Ⅱ。

2. 安全等级为Ⅱ的转基因生物，经类型 2 的生产、加工活动而形成的转基因产品，其安全等级仍为Ⅱ。

3. 安全等级为Ⅱ的转基因生物，经类型 3 的生产、加工活动而形成的转基因产品，根据安全性降低的程度不同，其安全等级可为Ⅱ、Ⅲ或Ⅳ，分级标准与受体生物的分级标准相同。

(四) 转基因生物安全等级为Ⅲ的转基因产品：

1. 安全等级为Ⅲ的转基因生物，经类型 1 的生产、加工活动而形成的转基因产品，根据安全性增加的程度不同，其安全等级可为Ⅰ、Ⅱ或Ⅲ，分级标准与受体生物的分级标准相同。

2. 安全等级为Ⅲ的转基因生物，经类型 2 的生产、加工活动而形成的转基因产品，其安全等级仍为Ⅲ。

3. 安全等级为Ⅲ的转基因生物，经类型 3 的生产、加工活动而形成转基因产品，根据安全性降低的程度不同，其安全等级可为Ⅲ或Ⅳ，分级标准与受体生物的分级标准相同。

(五) 转基因生物安全等级为Ⅳ的转基因产品：

1. 安全等级为Ⅳ的转基因生物，经类型 1 的生产、加工活动而得到的转基因产品，根据安全性增加的程度不同，其安全等级可为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ或Ⅳ，分级标准与受体生物的分级标准相同。

2. 安全等级为Ⅳ的转基因生物，经类型 2 或类型 3 的生产、加工活动而得到的转基因产品，其安全等级仍为Ⅳ。

### 第三章 申报和审批

**第十五条** 凡在中华人民共和国境内从事农业转基因生物安全等级为Ⅲ和Ⅳ的研究以及所有安全等级的试验和进口的单位以及生产和加工的单位和个人，应当根据农业转基因生物的种类和安全等级，分阶段向农业转基因生物安全管理办公室报告或者提出申请。

**第十六条** 农业部每年组织两次农业转基因生物安全评审。第一次受理申请的截止日期为每年的 3 月 31 日，第二次受理申请的截止日期为每年的 9 月 30 日。农业部自收到申请之日起两个月内，作出受理或者不予受理的答复；在受理截止日期后三个月内作出批复。

**第十七条** 从事农业转基因生物试验和进口的单位以及从事农业转基因生物生产和加工的单位和个人，在向农业转基因生物安全管理办公室提出安全评价报告或申请前应当完成下列手续：

(一) 报告或申请单位和报告或申请人对所从事的转基因生物工作进行安全性评价，并填写报告书或申报书（见附录 V）；

(二) 组织本单位转基因生物安全小组对申报材料进行技术审查；

(三) 取得开展试验和安全证书使用所在省（自治区、直辖市）农业行政主管部门的审核意见；

(四) 提供有关技术资料。

**第十八条** 在中华人民共和国从事农业转基因生物实验研究与试验的，应当具备下列条件：

(一) 在中华人民共和国境内有专门的机构；

(二) 有从事农业转基因生物实验研究与试验的专职技术人员；

(三) 具备与实验研究和试验相适应的仪器设备和设施条件；

(四) 成立农业转基因生物安全管理小组。

**第十九条** 报告农业转基因生物实验研究和中间试验以及申请环境释放、生产性试验和安全证书的单位应当按照农业部制定的农业转基因植物、动物和微生物安全评价各阶段的报告或申报要求、安全评价的标准和技术规范，办理报告或申请手续。

**第二十条** 从事安全等级为Ⅰ和Ⅱ的农业转基因生物实验研究，由本单位农业转基因生物安全小组批准；从事安全等级为Ⅲ和Ⅳ的农业转基因生物实验研究，应当在研究开始前向农业转基因生物安全管理办公室报告。

研究单位向农业转基因生物安全管理办公室报告时应当提供以下材料：

- (一) 实验研究报告书；
- (二) 农业转基因生物的安全等级和确定安全等级的依据；
- (三) 相应的实验室安全设施、安全管理和防范措施。

**第二十一条** 在农业转基因生物（安全等级Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ）实验研究结束后拟转入中间试验的，试验单位应当向农业转基因生物安全管理办公室报告。

试验单位向农业转基因生物安全管理办公室报告时应当提供下列材料：

- (一) 中间试验报告书；
- (二) 实验研究总结报告；
- (三) 农业转基因生物的安全等级和确定安全等级的依据；
- (四) 相应的安全研究内容、安全管理和防范措施。

**第二十二条** 在农业转基因生物中间试验结束后拟转入环境释放的，或者在环境释放结束后拟转入生产性试验的，试验单位应当向农业转基因生物安全管理办公室提出申请，经农业转基因生物安全委员会安全评价合格并由农业部批准后，方可根据农业转基因生物安全审批书的要求进行相应的试验。

试验单位提出前款申请时，应当提供下列材料：

- (一) 安全评价申报书；
- (二) 农业转基因生物的安全等级和确定安全等级的依据；
- (三) 农业部委托的技术检测机构出具的检测报告；
- (四) 相应的安全研究内容、安全管理和防范措施；
- (五) 上一试验阶段的试验总结报告。

**第二十三条** 在农业转基因生物生产性试验结束后拟申请安全证书的，试验单位应当向农业转基因生物安全管理办公室提出申请，经农业转基因生物安全委员会安全评价合格并由农业部批准后，方可颁发农业转基因生物安全证书。

试验单位提出前款申请时，应当提供下列材料：

- (一) 安全评价申报书；
- (二) 农业转基因生物的安全等级和确定安全等级的依据；
- (三) 农业部委托的农业转基因生物技术检测机构出具的检测报告；
- (四) 中间试验、环境释放和生产性试验阶段的试验总结报告；
- (五) 其他有关材料。

**第二十四条** 农业转基因生物安全证书应当明确转基因生物名称（编号）、规模、范围、时限及有关责任人、安全控制措施等内容。

从事农业转基因生物生产和加工的单位和个人以及进口的单位，应当按照农业转基因生物安全证书的要求开展工作，并履行安全证书规定的相关义务。

**第二十五条** 从中华人民共和国境外引进农业转基因生物，或者向中华人民共和国出口农业转基因生物的，应当按照《农业转基因生物进口安全管理办法》的规定提供相应的安全评价材料。

**第二十六条** 申请农业转基因生物安全评价应当按照财政部、国家计委的有关规定交纳审查费和必要的检测费。

**第二十七条** 农业转基因生物安全评价受理审批机构的工作人员和参与审查的专家，应当为申报者保守技术秘密和商业秘密，与本人及其近亲属有利害关系的应当回避。

#### 第四章 技术检测管理

**第二十八条** 农业部根据农业转基因生物安全评价及其管理工作的需要，委托具备检测条件和能力的技术检测机构进行检测。

**第二十九条** 技术检测机构应当具备下列基本条件：

- (一) 具有公正性和权威性，设有相对独立的机构和专职人员；
- (二) 具备与检测任务相适应的、符合国家标准（或行业标准）的仪器设备和检测手段；
- (三) 严格执行检测技术规范，出具的检测数据准确可靠；
- (四) 有相应的安全控制措施。

**第三十条** 技术检测机构的职责任务：

- (一) 为农业转基因生物安全管理和评价提供技术服务；
- (二) 承担农业部或申请人委托的农业转基因生物定性定量检验、鉴定和复查任务；
- (三) 出具检测报告，做出科学判断；
- (四) 研究检测技术与方法，承担或参与评价标准和技术法规的制修订工作；
- (五) 检测结束后，对用于检测的样品应当安全销毁，不得保留。
- (六) 为委托人和申请人保守技术秘密和商业秘密。

#### 第五章 监督管理与安全监控

**第三十一条** 农业部负责农业转基因生物安全的监督管理，指导不同生态类型区域的农业转基因生物安全监控和监测工作，建立全国农业转基因生物安全监管和监测体系。

**第三十二条** 县级以上地方各级人民政府农业行政主管部门按照《条例》第三十九条和第四十条的规定负责本行政区域内的农业转基因生物安全的监督管理工作。

**第三十三条** 有关单位和个人应当按照《条例》第四十一条的规定，配合农业行政主管部门做好监督检查工作。

**第三十四条** 从事农业转基因生物试验与生产的单位，在工作进行期间和工作结束后，应当定期向农业部和农业转基因生物试验与生产应用所在的行政区域内省级农业行政主管部门提交试验总结和生产计划与执行情况总结报告。每年3月31日以前提交农业转基因生物生产应用的年度生产计划，每年12月31日以前提交年度实际执行情况总结报告；每年12月31日以前提交中间试验、环境释放和生产性试验的年度试验总结报告。

**第三十五条** 从事农业转基因生物试验和生产的单位，应当根据本办法的规定确定安全控制措施和预防事故的紧急措施，做好安全监督记录，以备核查。

安全控制措施包括物理控制、化学控制、生物控制、环境控制和规模控制等。

**第三十六条** 安全等级Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ的转基因生物，在废弃物处理和排放之前应当采取



可靠措施将其销毁、灭活，以防止扩散和污染环境。发现转基因生物扩散、残留或者造成危害的，必须立即采取有效措施加以控制、消除，并向当地农业行政主管部门报告。

**第三十七条** 农业转基因生物在贮存、转移、运输和销毁、灭活时，应当采取相应的安全管理和防范措施，具备特定的设备或场所，指定专人管理并记录。

**第三十八条** 发现农业转基因生物对人类、动植物和生态环境存在危险时，农业部有权宣布禁止生产、加工、经营和进口，收回农业转基因生物安全证书，由货主销毁有关存在危险的农业转基因生物。

## 第六章 罚 则

**第三十九条** 违反本办法规定，从事安全等级Ⅲ、Ⅳ的农业转基因生物实验研究或者从事农业转基因生物中间试验，未向农业部报告的，按照《条例》第四十三条的规定处理。

**第四十条** 违反本办法规定，未经批准擅自从事环境释放、生产性试验的，或已获批准但未按照规定采取安全管理防范措施的，或者超过批准范围和期限进行试验的，按照《条例》第四十四条的规定处罚。

**第四十一条** 违反本办法规定，在生产性试验结束后，未取得农业转基因生物安全证书，擅自将农业转基因生物投入生产和应用的，按照《条例》第四十五条的规定处罚。

**第四十二条** 假冒、伪造、转让或者买卖农业转基因生物安全证书、审批书以及其他批准文件的，按照《条例》第五十三条的规定处罚。

**第四十三条** 违反本办法规定核发农业转基因生物安全审批书、安全证书以及其他批准文件的，或者核发后不履行监督管理职责的，按照《条例》第五十五条的规定处罚。

## 第七章 附 则

**第四十四条** 本办法所用术语及含义如下：

一、基因，系控制生物性状的遗传物质的功能和结构单位，主要指具有遗传信息的DNA片段。

二、基因工程技术，包括利用载体系统的重组DNA技术以及利用物理、化学和生物学等方法把重组DNA分子导入有机体的技术。

三、基因组，系指特定生物的染色体和染色体外所有遗传物质的总和。

四、DNA，系脱氧核糖核酸的英文名词缩写，是贮存生物遗传信息的遗传物质。

五、农业转基因生物，系指利用基因工程技术改变基因组构成，用于农业生产或者农产品加工的动植物、微生物及其产品。

六、目的基因，系指以修饰受体细胞遗传组成并表达其遗传效应为目的的基因。

七、受体生物，系指被导入重组DNA分子的生物。

八、种子，系指农作物和林木的种植材料或者繁殖材料，包括籽粒、果实和根、茎、苗、芽、叶等。

九、实验研究，系指在实验室控制系统内进行的基因操作和转基因生物研究工作。

十、中间试验，系指在控制系统内或者控制条件下进行的小规模试验。

十一、环境释放，系指在自然条件下采取相应安全措施所进行的中规模的试验。

十二、生产性试验，系指在生产和应用前进行的较大规模的试验。

十三、控制系统，系指通过物理控制、化学控制和生物控制建立的封闭或半封闭操作体系。

十四、物理控制措施，系指利用物理方法限制转基因生物及其产物在实验区外的生存及扩散，如设置栅栏，防止转基因生物及其产物从实验区逃逸或被人或动物携带至实验区外等。

十五、化学控制措施，系指利用化学方法限制转基因生物及其产物的生存、扩散或残留，如生物材料、工具和设施的消毒。

十六、生物控制措施，系指利用生物措施限制转基因生物及其产物的生存、扩散或残留，以及限制遗传物质由转基因生物向其他生物的转移，如设置有效的隔离区及监控区、清除试验区附近可与转基因生物杂交的物种、阻止转基因生物开花或除去繁殖器官、或采用花期不遇等措施，以防止目的基因向相关生物的转移。

十七、环境控制措施，系指利用环境条件限制转基因生物及其产物的生存、繁殖、扩散或残留，如控制温度、水分、光周期等。

十八、规模控制措施，系指尽可能地减少用于试验的转基因生物及其产物的数量或减小试验区的面积，以降低转基因生物及其产物广泛扩散的可能性，在出现预想不到的后果时，能比较彻底地将转基因生物及其产物消除。

**第四十五条** 本办法由农业部负责解释。

**第四十六条** 本办法自2002年3月20日起施行。1996年7月10日农业部发布的第7号令《农业生物基因工程安全管理实施办法》同时废止。

## 附录四

# 转基因食品卫生管理办法

中华人民共和国卫生部第 28 号令

2002 年 4 月 8 日

## 第一章 总 则

**第一条** 为了加强对转基因食品的监督管理，保障消费者的健康权和知情权，根据《中华人民共和国食品卫生法》（以下简称《食品卫生法》）和《农业转基因生物安全管理条例》，制定本办法。

**第二条** 本办法所称转基因食品，系指利用基因工程技术改变基因组构成的动物、植物和微生物生产的食品 and 食品添加剂，包括：

- （一）转基因动植物、微生物产品；
- （二）转基因动植物、微生物直接加工品；
- （三）以转基因动植物、微生物或者其直接加工品为原料生产的食品和食品添加剂。

**第三条** 转基因食品作为一类新资源食品，须经卫生部审查批准后方可生产或者进口。未经卫生部审查批准的转基因食品不得生产或者进口，也不得用作食品或食品原料。

**第四条** 转基因食品应当符合《食品卫生法》及其有关法规、规章、标准的规定，不得对人体造成急性、慢性或其他潜在性健康危害。

**第五条** 转基因食品的食用安全性和营养质量不得低于对应的原有食品。

**第六条** 转基因食品的生产企业须达到国家有关食品生产企业卫生规范的要求。

转基因食品的生产经营者应当保证所生产经营的转基因食品的食用安全性和营养质量。

转基因食品的生产者应当保留转基因食品进（出）货记录，包括进（出）货单位、地址、数量，相关记录至少保留二年备查。

## 第二章 食用安全性与营养质量评价

**第七条** 卫生部建立转基因食品食用安全性和营养质量评价制度。

卫生部制定和颁布转基因食品食用安全性和营养质量评价规程及有关标准。

**第八条** 转基因食品食用安全性和营养质量评价采用危险性评价、实质等同、个案处理等原则。

**第九条** 卫生部设立转基因食品专家委员会，负责转基因食品食用安全性与营养质量

的评价工作。委员会由食品安全、营养和基因工程等方面的专家组成。

**第十条** 卫生部根据转基因食品食用安全性和营养质量评价工作的需要，认定具备条件的检验机构承担对转基因食品食用安全性与营养质量评价的验证工作。

### 第三章 申报与批准

**第十一条** 生产或者进口转基因食品必须向卫生部提出申请，并提交下列材料：

- (一) 申请表；
- (二) 国家有关部门颁发的批准文件；
- (三) 企业标准；
- (四) 食用安全性的保证措施；
- (五) 设计包装及标识样稿；
- (六) 与食用安全性和营养质量评价有关的技术资料；
- (七) 申请单位对转基因食品食用安全性和营养质量评价报告和卫生部认定的检验机构出具的对转基因食品食用安全性和营养质量评价的验证报告；
- (八) 其他有助于转基因食品食用安全性与营养质量评价的资料。

**第十二条** 本办法第十一条第(六)项规定的转基因食品食用安全性和营养质量评价有关的技术资料包括：

- (一) 转基因食品的(物种)名称；
- (二) 转基因食品的理化特性、用途与需要强调的功能；
- (三) 转基因食品可能的食品加工方式与终产品种类以及主要食物成分(包括营养和有害成分)；
- (四) 基因修饰的目的与预期技术效果，以及对食品产品特性的预期影响；
- (五) 基因供体的名称、特性、食用史；载体物质的来源、特性、功能、食用史；基因插入的位点及特性；
- (六) 引入基因所表达产物的名称、特性、功能及含量；
- (七) 表达产物的已知或可疑致敏性和毒性，以及含有此种表达产物食用安全性的依据；
- (八) 可能产生的非期望效应(包括代谢产物的评价)。

**第十三条** 申请进口转基因食品的除必须提交本办法第十一条、第十二条规定的材料外，还应当提供出口国(地区)政府批准在本国(地区)生产、经营、使用的证明文件。

**第十四条** 卫生部自受理转基因食品申请之日起六个月内作出是否批准的决定。

**第十五条** 批准的转基因食品，由卫生部列入可用于食品生产、经营的转基因食品品种目录。

### 第四章 标 识

**第十六条** 食品产品中(包括原料及其加工的食品)含有基因修饰有机体或/和表

达产物的，要标注“转基因××食品”或“以转基因××食品为原料”。

转基因食品来自潜在致敏食物的，还要标注“本品转××食物基因，对××食物过敏者注意”。

**第十七条** 转基因食品采用下列方式标注：

- (一) 定型包装的，在标签的明显位置上标注；
- (二) 散装的，在价签上或另行设置的告示牌上标注；
- (三) 转运的，在交运单上标注；
- (四) 进口的，在贸易合同和报关单上标注。

**第十八条** 转基因食品的标签应当真实、客观，不得有下列内容：

- (一) 明示或暗示可以治疗疾病；
- (二) 虚假、夸大宣传产品的作用；
- (三) 卫生部规定的禁止标识的其他内容。

## 第五章 监 督

**第十九条** 卫生部对已经批准生产或者进口的转基因食品发现有下列情形之一的，进行重新评价：

- (一) 对转基因食品食用安全性和营养质量的科学认识发生改变的；
- (二) 转基因食品食用安全性和营养质量受到质疑的；
- (三) 其他原因需要重新评价的。

**第二十条** 卫生部对转基因食品的生产经营组织定期或者不定期监督检查，并向社会公布监督检查结果。

**第二十一条** 卫生部认定的转基因食品食用安全性和营养质量检验机构须按照卫生部制定的规程及有关标准进行评价。

对出具虚假检验报告或者疏于管理难以保证检验质量的，由卫生部责令改正，并予以通报批评；情节严重的，收回认定资格。

**第二十二条** 从事转基因食品检验、评审和监督工作的人员应当具备相应的专业素质和职业道德。

**第二十三条** 转基因食品生产经营的经常性卫生监督管理，按照《食品卫生法》及有关规定执行。

## 第六章 附 则

**第二十四条** 违反本办法，由卫生行政部门按照《食品卫生法》的有关规定进行处罚。

**第二十五条** 本办法由卫生部负责解释。

**第二十六条** 本办法自2002年7月1日起施行。



图书在版编目 (CIP) 数据

转基因植物生物反应器/周鹏主编. —北京: 中国农业出版社, 2008.11

ISBN 978-7-109-13020-3

I. 转… II. 周… III. 基因转变-植物-生物工程-反应器 IV. Q943.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 154582 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100125)

责任编辑 石飞华

---

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行  
2009 年 4 月第 1 版 2009 年 4 月北京第 1 次印刷

---

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 20.5

字数: 420 千字 印数: 1~2 600 册

定价: 46.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

封面设计 姜欣

ISBN 978-7-109-13020-3



9 787109 130203 >

定价：46.00 元