



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102595876 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201080051277. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 08. 12

A01H 4/00 (2006. 01)

C12N 15/82 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A01H 5/12 (2006. 01)

61/241613 2009. 09. 11 US

A01H 5/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 05. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2010/001537 2010. 08. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02011/030083 EN 2011. 03. 17

(71) 申请人 帝国创新有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 F·米舒克斯 P·尼克松

J·G·麦卡锡

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理

有限公司 11280

代理人 刘丹妮

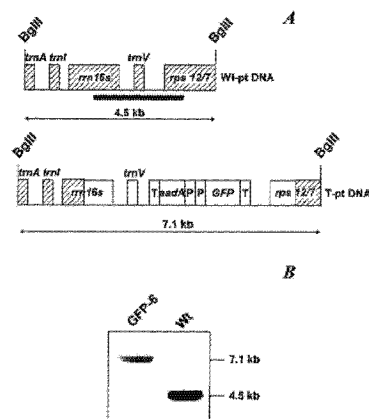
权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图 6 页

(54) 发明名称

方法

(57) 摘要

一种用于从未分化植物细胞制备叶生物质的方法,所述方法包括:提供未分化细胞;将它们与促进细胞分化为叶组织的试剂接触;和使细胞在临时液体浸渍培养体系中生长。本发明的这种方法可以用于制备多肽和天然药用物质,并且可以用于捕获二氧化碳。一种在体外植物细胞中制备多肽的方法,其包括:提供含有叶绿体的未分化植物细胞,该叶绿体携带编码多肽的转基因核酸分子,其中所述植物细胞显示同型异源性;和根据以上的方法使细胞增殖,从而制备含有多肽的叶生物质。



1. 一种用于从未分化植物细胞制备叶生物质的方法,所述方法包括:提供未分化细胞;将所述未分化细胞与促进细胞分化为叶组织的试剂接触;和使细胞在临时液体浸渍培养体系中生长。

2. 根据权利要求1的方法,其中所述植物细胞是来自单子叶植物或双子叶植物的细胞。

3. 根据权利要求2的方法,其中所述双子叶植物是烟草、番茄、马铃薯、豆、大豆、胡萝卜、木薯或拟南芥(*Arabidopsis*)中任意的。

4. 根据权利要求2的方法,其中所述单子叶植物是玉米(corn)、黑麦、燕麦、小米、甘蔗、高粱、玉米(maize)、小麦或水稻中任意的。

5. 根据权利要求1的方法,其中所述植物细胞来自药用植物,其中主要的药用物质在叶中产生。

6. 根据权利要求5方法,其中所述植物是颠茄属(*Atropa* sp)、莨菪属(*Hyoscyamus* sp)、曼陀罗属(*Datura* sp)、罂粟属(*Papaver* sp)、赛莨菪属(*Scopolia* sp)、毛地黄属(*Digitalis* sp)、油麻藤属(*Macuna* sp)、红豆杉属(*Taxus* sp)、喜树属(*Camptotheca* sp)、三尖杉属(*Cephalotaxus* sp)或者长春花属(*Catharanthus* sp.)、蒿属(*Artemisia* sp)例如黄花蒿(*Artemisia annua*)中任意的。

7. 根据权利要求1的方法,其中所述植物是能源作物。

8. 根据权利要求7的方法,其中所述植物是芒属(*Miscanthus* sp)、麻风树属(*Jatropha* sp)、黍属(*Panicum* sp)、柳树、棕榈树、玉米(maize)、木薯或杨树中任意的。

9. 根据前述任一项权利要求中方法,其中所述促进细胞分化为叶组织的试剂是植物激素,优选是细胞分裂素。

10. 根据权利要求9的方法,其中所述细胞分裂素是属于腺嘌呤型或苯脲型的天然或人工的细胞分裂素中任意的。

11. 根据权利要求10的方法,其中所述细胞分裂素是腺嘌呤、激动素、玉米素、6-苄氨基嘌呤、二苯脲、噻苯隆(TDZ)及其各自的具有细胞分裂素活性的衍生物中任意的。

12. 根据权利要求9的方法,其中所述细胞分裂素是噻苯隆(TDZ)。

13. 根据权利要求9至12中任一项的方法,其中将所述试剂与另一种植物激素,例如生长素联合使用。

14. 根据前述任一项权利要求的方法,其中所述试剂以0.01-100 μ M,优选以0.1-10 μ M的浓度加入所述培养基中。

15. 根据前述任一项权利要求的方法,其中所述试剂在临时液体浸渍培养开始时或在临时液体浸渍培养过程中加入。

16. 根据前述任一项权利要求的方法,其中所述浸渍时间为每2-24小时浸渍1-30分钟,优选为每2-6小时浸渍1-10分钟。

17. 根据前述任一项权利要求的方法,其中所述临时液体浸渍培养物中液体的体积为1-10,000升,优选为1-5,000升,更优选为1-1,000升,最优选为1-500升。

18. 根据前述任一项权利要求的方法,其中所述包含临时液体浸渍培养体系的容器为1-10,000升,优选为1-5,000升,更优选为1-1,000升,最优选为1-500升。

19. 根据前述任一项权利要求的方法,其中所述植物细胞不经基因工程改造。

20. 根据权利要求 1 至 19 中任一项的方法,其中所述植物细胞为经基因工程改造的,例如用于表达多肽。

21. 一种在体外植物细胞中制备多肽的方法,所述方法包括:

提供含有叶绿体的未分化植物细胞,所述叶绿体携带编码多肽的转基因核酸分子,其中所述植物细胞显示同型异源性;和

根据权利要求 1 的方法来增殖细胞,从而制备含有多肽的叶生物物质。

22. 根据权利要求 21 的方法,其中所述提供未分化细胞的步骤包括:

将转基因核酸分子导入植物细胞的叶绿体中;

诱导含有转基因核酸分子的植物细胞从而形成未分化细胞的愈伤组织;和

将所述愈伤组织在有效实现同型异源性的条件下繁殖。

23. 根据权利要求 21 或 22 的方法,其中所述同型异源性使用抗生素选择来实现,例如使用壮观霉素、链霉素或卡那霉素选择。

24. 根据权利要求 21 至 23 中任一项的方法,其中控制所述可利用光的量和/或可利用蔗糖的量,以优化多肽的制备。

25. 根据权利要求 21 至 24 中任一项的方法,所述方法还包括从叶生物物质中获得多肽。

26. 根据权利要求 21 至 25 中任一项的方法,其中所述多肽是治疗性多肽、酶、生长因子、免疫球蛋白、激素、结构蛋白、植物应激反应相关蛋白、生物药物或疫苗抗原中的任意一种。

27. 一种通过使用根据权利要求 21 至 26 中任一项的方法获得的多肽或通过处理权利要求 1 至 20 中任一项的方法获得的叶生物物质后获得的多肽。

28. 通过权利要求 1 至 20 中任一项所述的方法获得的叶生物物质。

29. 一种用于获得存在于叶生物物质中的成分的方法,所述方法包括根据权利要求 1 至 20 中任一项的方法制备叶生物物质,和从所述叶生物物质中获得所述成分。

30. 根据权利要求 29 的方法,其中所述成分通过叶生物物质的分泌或通过叶从叶生物物质中提取获得,所述提取例如通过压碎叶生物物质以释放所述成分。

31. 根据权利要求 29 或 30 的方法,其中所述成分是药用物质、重组表达多肽、碳水化合物、脂质、油、挥发性芳香族化合物、抗氧化剂、色素、风味剂或风味剂前体;并且其中所述成分可以是内源性的或外源性的。

32. 根据权利要求 29 至 31 中任一项的方法,其中将所述成分加工成进一步产品,例如生物燃料、食品或药用产品。

33. 一种用于在植物细胞中体外制备多肽的系统,所述系统包括:

促进未分化植物细胞分化为叶组织的试剂;和

编码多肽的核酸分子,所述核酸分子适用于导入到叶绿体中并在叶绿体中表达。

34. 一种捕获二氧化碳的方法,所述方法包括进行权利要求 1 至 20 所述的方法。

35. 一种纯化样品的的方法,所述方法包括将准备纯化的样品暴露于得自权利要求 1 至 20 的叶生物物质中。

36. 根据权利要求 35 的方法,其中所述纯化过程是去除一种或多种毒素。

37. 一种制备药物组合物的方法,所述方法包括配制通过权利要求 29 至 31 所述的方法获得的成分和药学上可接受的载体稀释剂、赋形剂或载体。

38. 一种医药产品,其包含通过权利要求 30 至 32 中任一项所述的方法获得的成分和药学上可接受的载体稀释剂、赋形剂或载体。

39. 一种制备生物燃料的方法,所述方法包括通过权利要求 29 至 31 所述方法获得成分的发酵或酯基转移。

40. 一种通过权利要求 39 所述的方法获得的生物燃料。

方法

[0001] 本发明涉及用于在培养物中制备叶生物质的方法。

[0002] 在本说明书中明显地先前公开的文件列出和讨论不应必然地被认为是承认该文件是现有技术的一部分或者是公共知识。

[0003] 培养物中制备生物质可用于制备基因工程多肽；制备包括药用物质、多糖、木质素和脂质的内源性植物产品；通过代谢工程制备自然条件下在植物中未发现的新的简单和复杂化学品，所述化学品包括新形式的多糖、木质素、糖、芳香族和脂肪族化合物；以及捕获二氧化碳。所述生物质也可以用来做某些环境下的燃料。

[0004] WO 00/57690 涉及从分化植物碎片微繁殖(micropropagation)和生成植物药物(phytopharmaceutical)植物。尤其是 WO 00/57690 涉及刺激提取自成株的分化细胞的小碎片生成新的小植株，所述新的小植株可以生长为完整的生成植物药用的植物，该植物能够在典型植物培养基(例如，土壤、堆肥)中进行正常植物生长。

[0005] WO 01/94602 涉及用于再生植物的方法和其应用固体生长培养基繁殖和/或转化植物的用途。由 WO 01/94602 中描述的方法生成的植物为可存活植物，该可存活植物可以在典型植物生长培养基(例如，土壤、堆肥)中在正常生长下生长。

[0006] WO 2008/028115 涉及通过使用转基因的单一容器体系在短时间内生成大量转基因玉米植株，并生长成为可存活植物的高通量方法。所生成的玉米植株是具有根、茎和叶结构的可存活植株，并且该玉米植株在典型植物生长培养基(例如，土壤、堆肥)中能够进行正常植物生长。

[0007] 例如在 Etienne&Berthouly(2002)Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69, 215-231, Hanhineva& Kärenlampi (2007)BMC Biotechnology 7, 11-23, 以及在 Ducos 等人(2007)In Vitro Cellular&Developmental Biology-Plant43:652-659 中已知临时液体浸渍培养体系(例如临时浸渍生物反应器或TIB)的使用。例如，Hanhineva& Kärenlampi (2007) 描述了 TIB 在生成转基因草莓植株中的用途，其中产生的植株包含外源基因和包含根和苗两者的形成，使得它们能够在例如土壤或堆肥中进行正常植物生长。

[0008] 为什么研究者们选择了植物来表达生物药物和其他高值蛋白，主要的原因之一是与植物生长关联的尺度放大的强大可能性和非常低的维持成本。然而，使用转基因植物具有其缺点，即公众关心的转基因向周围的非转基因作物的转移和食物链污染的可能性(Fox, 2003)。

[0009] 很长一段时间以来，人们假定大多数物种中的质体基因组在花粉中不存在并且由母体遗传(Hagemann, 2004; Zhang 等人, 2003; Scott and Wilkinson, 1999)。因此，认为将基因插入到叶绿体基因组或原质体系中从而产生转质体植物(transplastomic plant)对花粉介导的转基因流提供固有天然屏障。然而，一些最近的出版物表明，叶绿体 DNA 包含物的渗漏比最初认为的更加频繁和广泛。例如，估计叶绿体 DNA 到花粉的转移，在粟(Setaria italica) (foxtail) 中达到 0.03%(Wang 等人, 2004)、在烟草中达到 0.01-0.00029%(Ruf 等人, 2007; Svab 和 Maliga, 2007) 以及在拟南芥(Arabidopsis thaliana) 中达到 0.0039%(Azhagiri 和 Maliga, 2007)。

[0010] 关注的另一点在于随着时间推移叶绿体 DNA 转移到核基因组的可能性 (Sheppard 等人, 2008), 所述转移从其可以传递的地方到附近的非转基因物种, 并采用与传统核转化体相同的方式。烟草中检测到的频率为每 16000 个花粉粒中一个叶绿体 DNA 转移到核 DNA (Huang 等人, 2003)。考虑到, 根据烟草物种, 每英亩地可以生长 5000-16000 株烟草植物的事实, 叶绿体 DNA 转移到核的风险不容忽视。

[0011] 还引起关注的是, 抗生素抗性盒例如用于选择叶绿体转化体的 *aadA* 基因可以被转移到土壤细菌 (Monier 等人, 2007) 和在植食性昆虫的肠道内发现的细菌中 (Brinkmann and Tebbe, 2007)。

[0012] 为了避免在田地中种植转质体种子可以产生的任何环境问题, 一种方案是植物细胞悬浮培养物中制备重组蛋白, 所述培养物是在限制性条件下生长的。实际上, 已经将植物细胞悬浮液改性为表达多种异源蛋白 (Hellwig 等人综述, 2004)。对于制备重组蛋白植物细胞悬浮液相对于完整的植物显示出一些优点, 例如收获前的时间段较短、生长完全受控制 and 不受天气状况或疾病限制。也可以容易地应用基于细菌生产系统的现行药品生产质量管理规范, cGMP, 导致联邦药品管理局 (FDA) 或欧洲药品评价局 (EMA) 的更快监管批准 (Ma 等人综述, 2003; Fischer 等人, 2004; Twyman 等人, 2003)。

[0013] 与细菌一样, 植物细胞悬浮培养物的生长和维持成本低廉。由于植物细胞悬浮培养物既不隐藏人病原体, 也不产生内毒素, 因而它们在本质上也是安全的。植物细胞悬浮液可以在简单的合成培养基中维持, 但是也可以如动物细胞一样合成复杂的多聚蛋白质。与田地生长的植物相反, 培养的植物细胞的特性与气候、土壤质量、季节和日长无关。没有霉菌毒素、除草剂或杀虫剂 (Doran, 2000) 污染的风险, 并且副产品 (例如, 纤维、油、蜡、酚类化合物) 较少。相对于完整植株, 植物细胞悬浮培养物最重要的优点也许是产品的分离和纯化过程简单很多 (Fischer 等人, 1999)。

[0014] 然而, 植物细胞悬浮培养物的主要缺点是生长缓慢和通过核转化生产重组蛋白的产量通常较低 (Hellwig 等人, 2004)。另一个弱点是, 植物细胞培养物的产率可以变化相当大, 其重组蛋白水平通常为可溶性总蛋白 (TSP) 的 0.0064%-4%, 虽然在特殊情况下可以达到 TSP 的 20% (Huang 等人, 2001)。

[0015] 一般来说, 叶绿体转化比传统的核转化的重组蛋白更好地出产重组蛋白。例如, 将大肠杆菌 (*E. coli*) 不耐热肠毒素 B 亚单位 (LTB) 在烟草中通过核转化和质体转化两者表达。当将肠毒素基因插入到质体基因组时, 重组蛋白收率高 250 倍 (Kang 等人, 2003)。同样地, 当由核和质体 DNA 表达霍乱毒素 B 抗原 (CTB) 时, 烟草叶绿体中的抗原产量比由核中高 410 倍 (Daniell 等人, 2001)。即使对于一些蛋白的过表达而言叶绿体转化看起来是更优的, 但关于在转质体中重组 GFP 的可能产量高于植物细胞悬浮液, 仅发表了一个报道 (Langbecker 等人, 2004)。该研究描述了黑暗生长的烟草植物细胞培养物的质体转化, 但是没有对表达的潜力进行估计。

[0016] 在实施例描述的工作中, 已经研究了质体编码的重组蛋白的表达水平, 在这种情况下, 叶组织、愈伤组织和细胞悬浮液中的绿色荧光蛋白 GFP+ 的变体在不同条件下生长 (Scholz 等人, 2000)。结果表明, 在细胞悬浮培养物中的表达, 对于叶绿体中外源蛋白的高水平和限制性表达是可行的途径, 尽管表达水平远低于在植物叶中的表达水平。还描述了基于临时浸渍生物反应器开发的新表达体系, 该表达体系能够从细胞悬浮培养物开始制备

非常高水平的重组蛋白,并且能够由未分化植物细胞制备高水平的叶生物质。

[0017] 本发明的第一方面提供了用于从未分化的植物细胞中制备叶生物质的方法,该方法包括:提供未分化的植物细胞;将其接触促进细胞分化为叶组织的试剂;和使该细胞在临时液体浸渍培养体系中生长。

[0018] 所谓“未分化植物细胞”我们包括以下的含义,即细胞大体上没有显示分化为任何特定植物组织如苗或叶的迹象,并且在不存在诱导未分化细胞分化的试剂的条件下,尤其是应当没有诱导未分化细胞分化为苗的试剂的条件下,它们将在这种状态下保持至少一个月。所述未分化细胞可以是转基因细胞或非转基因细胞。

[0019] 通常,未分化细胞可以得自永久愈伤组织或愈伤组织材料。永久愈伤组织是未分化植物细胞的细胞培养物。这种永久愈伤组织细胞保持未分化的形式至少一个月。

[0020] 未分化细胞也可以从分化的植物材料在体外得到,所述分化的植物材料例如叶、茎、花、种子或根,将所述叶、茎、花、种子或根切割并与某些植物激素,例如生长素接触放置。

[0021] 当该植物材料与激素接触时,在植物材料的某些区域将会形成愈伤组织。认为通过激素对未分化植物材料诱导形成的愈伤组织不是永久愈伤组织。

[0022] 当植物不是转基因植物时,提供未分化细胞的步骤包括:

[0023] 放置植物切割碎片(植物材料)与植物激素接触,然后该植物激素在那些切割碎片的边缘生成愈伤组织;

[0024] 然后将所述愈伤组织作为愈伤组织继代培养,并保持没有任何选择性。

[0025] 所述切割植物材料可以是整个或部分的根、叶、茎、花或种子。

[0026] 当植物是质体转基因植物时,提供未分化细胞的步骤包括:

[0027] 通过靶向叶绿体 DNA 的同源重组方法将转基因核酸分子引入到植物细胞的叶绿体中。

[0028] 诱导含有转基因核酸分子的植物细胞,从而形成未分化细胞的愈伤组织;和

[0029] 将该愈伤组织在有效实现同型异源性的条件下繁殖。

[0030] 本发明工作的愈伤组织是永久性愈伤组织,所述永久性愈伤组织作为未分化细胞已经培养和维持至少一个月。

[0031] 优选地,当与试剂接触时仅存在的细胞为未分化细胞。通常,当与试剂接触时,存在的细胞中至少 90%、或 95%、或 99%、或 99.9%、或 99.99% 为未分化细胞。

[0032] 优选地,基本上所有的叶和叶状生物质材料是由未分化细胞接触试剂之后分化产生。通常,由使用试剂处理未分化细胞制备的植物材料应为至少 50%,优选地 70%,和更优选地大于 85% 的叶生物质。

[0033] 所谓“叶”和“叶状”生物质,我们包括植物材料为叶或“叶状”组织的形式的含义。通过组织碎片的形状、叶绿体的数量和显著的光合作用活性将这些叶组织与其他植物组织区分开。例如,对于任何给定的植物,按照植物组织共聚焦显微分析计数,叶材料有更多的叶绿体和发育中的叶绿体,并且如植物组织吸收二氧化碳检测的,这些叶绿体比非叶材料的叶绿体具有更高的光合作用活性(使用荧光计测定 F_v/F_m) 和更高的叶绿素含量(通过吸收分光光度法分析提取的色素)。该确定方法对于技术人员来说是熟知的,例如在(Baker (2008) Ann. Rev. Plant Biol. 59:89-113) 中描述的。

[0034] 所述临时液体浸渍培养体系可以是如本领域已知的任何此种体系(例如参见 Etienne&Berthouly(2002)Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69, 215-231, Hanhineva& Kärenlampi (2007)BMC Biotechnology 7, 11-23, 并且也可以来自 Ducos 等人 (2007)In Vitro Cellular&Developmental Biology-Plant 43:652-659, 将它们所有引入本文作为参考。通常,所述体系包括细胞居住在其上的多孔固体基质(例如,网或海绵或泡沫),如以下进一步描述的该多孔固体基质浸入液体生长培养基中持续短的时间。

[0035] 所述植物细胞可以是来自单子叶植物或双子叶植物的细胞。

[0036] 适合的双子叶植物包括烟草、马铃薯、番茄、豆、大豆、胡萝卜、木薯或拟南芥(*Arabidopsis*)中任意的。

[0037] 适合的单子叶植物包括玉米(corn)、黑麦、燕麦、小米、甘蔗、高粱、玉米(maize)、小麦或水稻中任意的。

[0038] 在优选的实施方案中,植物细胞来自药用植物,该药用植物中主要的药用物质在叶中产生。应理解到,该方法代表通过从叶生物质提取药用物质从而获得它们的有利方法。

[0039] 适合的药用植物包括:颠茄属(*Atropa* sp)、莨菪属(*Hyoscyamus* sp)、曼陀罗属(*Datura* sp)、罂粟属(*Papaver* sp)、赛莨菪属(*Scopolia* sp)、毛地黄属(*Digitalis* sp)、油麻藤属(*Macuna* sp)、红豆杉属(*Taxus* sp)、喜树属(*Camptotheca* sp)、三尖杉属(*Cephalotaxus* sp)或者长春花属(*Catharanthus* sp.)、蒿属(*Artemisia* sp)例如黄花蒿(*Artemisia annua*)中任意的。可以得自这些药用植物的药品包括但不限于:莨菪烷类生物碱,例如阿托品、东莨菪碱和莨菪碱以及它们的前体和衍生物;吗啡烷型生物碱,例如可待因、吗啡、蒂巴因、去甲血根碱、血根碱和隐品碱以及它们的前体和衍生物;强心苷,例如毛地黄毒苷、毛地黄毒苷配基、芰皂配基、双羟洋地黄毒甙、吉托洛苷(*Gitaloxigenin*)以及它们的前体和衍生物;L-DOPA (L-3, 4-二羟基苯丙氨酸)及其前体和衍生物;抗肿瘤化合物,例如紫杉醇及其前体和衍生物、喜树碱及其衍生物、高三尖杉酯碱、三尖杉酯碱、异三尖杉酯碱和三尖杉碱以及它们的前体和衍生物;和长春花生物碱,例如长春花碱、长春新碱、长春花朵灵、长春碱,它们的前体和衍生物;疟疾药物,例如青蒿素,其前体和衍生物。

[0040] 由叶生物质制备的药用化合物可以通过与药学上可接受的赋性剂、稀释剂或载体组合加入药物组合物中。

[0041] 在进一步优选的实施方案中,所述植物可以是能源作物。所谓能源植物,我们指用于制备包括乙醇或生物柴油的生物燃料的植物物种。本发明使生物质能够不依赖于季节和植物物种地连续制备,所述生物质可以用于生物燃料的连续制备。所生成的生物质可以内源性含有相对升高水平的多糖,所述多糖用于基于发酵的乙醇制备过程,或相对高水平的一种或多种脂质,所述脂质可以进一步加工用于制备生物柴油。这些升高水平的有益化合物也可以通过基因工程由生物质生成。适当地,所述植物是芒属(*Miscanthus* sp)、麻风树属(*Jatropha* sp)、黍属(*Panicum* sp)、柳树、棕榈树、玉米、木薯或杨树中任意的。

[0042] 通常,促进细胞分化为叶组织的试剂是植物激素(植物激素(phytohormone)或植物生长调节剂),优选为细胞分裂素。细胞分裂素为一组主要影响细胞分裂和芽形成的化学品,但是也具有延迟细胞衰老的作用、负责介导生长素贯穿植物中的运输并且影响节间长度和叶生长。生长素是对细胞膨大、芽形成和根发生有正面影响的化合物。它们还促进其

他激素的生成,并与细胞分裂素共同控制茎、根、果实的生长和将茎转变为花。

[0043] 所述细胞分裂素可以是任意属于腺嘌呤型或苯脲型的天然或人工细胞分裂素。优选地,所述细胞分裂素是具有细胞分裂素活性的腺嘌呤、激动素、玉米素、6-苄氨基嘌呤、二苯脲、噻苯隆(TDZ)和它们各自的衍生物中任意的。

[0044] 所述试剂可以促进、诱导和激发分化,使得苗从得自本发明的愈伤组织/细胞悬液的任何单个未分化植物细胞开始快速生长,优选地以指数方式快速生长。这些苗发育为叶生物物质或叶状生物物质。

[0045] 优选地,促进细胞分化为叶组织的试剂是噻苯隆(TDZ)。

[0046] 所述试剂可以方便地与另一种植物激素联合使用,所述另一种植物激素例如生长素,如天然存在的生长素:4-氯-吲哚乙酸、苯乙酸(PAA)、吲哚-3-丁酸和吲哚-3-乙酸,或合成的生长素类似物:1-萘乙酸(NAA)、2,4-二氯苯氧乙酸。

[0047] 通常,将所述试剂以 0.01-100 μ M 的浓度加入到培养基中。优选地,所述浓度为 0.1-10 μ M。

[0048] 所述试剂可以在在临时液体浸渍培养步骤的开始时或过程中加入。

[0049] 为了优化叶生物物质的制备或用于优化叶生物物质中特定产物的浓度,可以选择任何合适的浸渍方案,所述产物如目的多肽或药用物质。通常,每培养 2-24 小时浸渍时间为 1-30 分钟。优选地,每培养 2-6 小时浸渍时间为 1-10 分钟。

[0050] 为了以最有效的方式,即以最合适速度、数量和质量生成用于特定目的特定生物物质,技术人员能够根据植物物种和来源容易地选择最合适的浸渍培养参数,例如时间、温度和生长培养基。

[0051] 临时液体浸渍培养物中液体的体积可以是任何合适的体积,但通常为 1-10000 升。可供选择地,所述体积可以为 1-5000 升、1-1000 升或 1-500 升。

[0052] 含有所述临时液体浸渍培养体系的容器可以是任意合适的大小,并且通常为 1-10000 升。可供选择地,所述体积可以为 1-5000 升、1-1000 升或 1-500 升。

[0053] 在本发明的一个实施方案中,将所述植物细胞不经基因工程改造。如熟知的,植物在它们的叶子中内源地产生许多重要的产物,如上面描述的药用物质,还有油、色素、抗氧化剂、简单和复杂的生物化学品,例如糖(碳水化合物)、脂类、氨基酸、挥发性芳香族化合物和多种香料/香料前体。

[0054] 目的植物材料也可以能够浓缩、捕获或降解样品中,例如给水源的样品中的毒性污染物(基于植物的体外净化/纯化)。

[0055] 所述植物材料也可以用于将包含在临时反应溶液中的一种化合物转化为一种或多种其他化合物。

[0056] 在本发明的另一个实施方案中,将所述植物细胞经基因工程改造为,例如表达多肽。所述多肽可以是任意的目的多肽,但是优选是治疗多肽、酶、生长因子、免疫球蛋白、激素、结构蛋白、植物应激反应中涉及的蛋白、生物药物、肽或疫苗抗原中的任意一种。当多肽是酶时,其可以用于改变叶材料的代谢,从而使得能够产生新型聚合物和代谢物。也可以在叶材料内表达一种或多种多肽,以增强叶组织纯化或降解在样品中例如水源中发现的污染物的能力。

[0057] 所述经基因工程处理的植物细胞(重组的或转基因的植物细胞)可以为:(i)核转

化植物细胞,其中外源核酸(转基因)存在于核中;(ii)转质体植物细胞,其中外源核酸(转基因)存在于质体例如叶绿体中;或(iii)既是核转化的也是转质体的植物细胞。

[0058] 制备核转化植物和转质体植物的方法是本领域熟知的。例如,可以使用粒子轰击、微注射、聚乙二醇-电穿孔、农杆菌介导的转化、植物病毒等方法将核酸分子引入植物细胞中(参见,例如 Birch 1997, Maliga 2004, Gleba 等人, 2008)。

[0059] 如果所述植物是转质体植物,则是优选的。

[0060] 也可以采用多种本领域认可的方式来转化植物。本领域技术人员将理解,方法的选择可以依赖于靶向转化的植物的类型。转化植物细胞的适当方法的实例包括微注射(Crossway 等人, BioTechniques 4:320-334(1986))、电穿孔(Riggs 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5602-5606(1986))、农杆菌介导的转化(Hinchee 等人, Biotechnology 6:915-921(1988))、直接基因转移(Paszkowski 等人, EMBOJ. 3:2717-2722(1984))和使用得自 Agracetus, Inc., Madison, Wisconsin and Dupont, Inc., Wilmington, Delaware 的装置的冲击粒子加速(参见例如, Sanford 等人第 4,945,050 号美国专利)。通常,农杆菌介导的转化对于单子叶植物是无效的,而对于单子叶植物,上面提到的其他方法是优选的。

[0061] 可以通过熟知的技术鉴定成功转化的细胞,即含有本发明的 DNA 构建体的细胞。例如,一个选择技术涉及将编码转化细胞中可选性状的 DNA 序列(标记物)合并到表达载体中。这些标记物包括二氢叶酸还原酶、针对真核细胞培养物的 G418 或新霉素抗性基因,和用于在大肠杆菌和其他细菌中培养的四环素、卡那霉素或氨苄青霉素抗性基因。可供选择地,该种可选性状的基因可以位于用于共转化需要的宿主细胞的另一个载体上。

[0062] 所述标记基因可以用于鉴定转化体,但是希望确定哪一个细胞含有重组 DNA 分子和哪一个细胞含有自身连接载体分子。这可以通过使用克隆载体来实现,所述克隆载体中 DNA 片段的插入破坏了存在于分子上的基因中的一个的完整性。因而,由于该基因功能的丢失,可以鉴定重组体。

[0063] 另一种鉴定成功转化细胞的方法涉及使由本发明的表达构建体的引入所产生的细胞生长,从而制备本发明的多肽。可以使用例如由 Southern(1975) J. Mol. Biol. 98, 503 或 Berent 等人(1985) Biotech. 3, 208 描述的方法来收获和裂解细胞,并且检查其 DNA 含量来检查 DNA 的存在。可供选择地,上清中蛋白质的存在,可以使用如下描述的抗体来检测。

[0064] 当重组 DNA 能够直接表达蛋白质时,除了直接检测重组 DNA 的存在以外,可以通过熟知的免疫学方法验证成功的转化。例如,用表达载体成功转化的细胞产生显示适当抗原性的蛋白质。收获怀疑被转化的细胞样品并使用适当的抗体检测蛋白质。

[0065] 本领域的技术人员将会理解,可以通过植物转化技术来制备稳定或不稳定(临时)的转化体。所述临时的转化体仅临时表达含有由 DNA 构建体编码的本发明化合物的产品。该临时表达系统可以用于分子遗传研究也用于某些特定商业应用,其中在转化后不久,收获负责制备有价值蛋白的转化细胞。

[0066] 当异源 DNA 序列整合到宿主基因组中时,可以产生稳定的转化体。对于植物而言,可以将所述异源 DNA 插入到染色体的一个中或插入到细胞器基因组中(线粒体,叶绿体)。

[0067] 本领域技术人员将理解,大肠杆菌可以用作中间宿主,并且其可以用于使用标准的或修饰的质粒载体来构建各种包含编码序列的质粒。植物转化可以使用从该中间宿主中回收的并用于例如通过基因枪装置直接转化细胞的质粒 DNA 来实现。可供选择地,可以将

含有编码序列的嵌合 DNA 构建体链接到用于在农杆菌属(*Agrobacterium tumefaciens*)或农杆菌根群菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中繁殖的基于 Ti 或 Ri 质粒的载体中,并且随后通过农杆菌属(*Agrobacterium*)介导的基因转移转化到植物细胞中。

[0068] 载体的实例包括克隆载体、表达载体和穿梭载体。克隆载体包括,为了制备更多 DNA 序列的目的,用于携带 DNA 片段进入受体的试剂。表达载体含有携带 DNA 序列进入宿主,并且在宿主中指导特定产物例如蛋白或反义转录物合成的试剂。表达载体可通过将编码 DNA 序列插入到载体中含有插入位点的表达盒中来制备。穿梭载体包括遗传元件,所述遗传元件被构建成具有用于两个宿主的复制原点,以使其可以用于携带外源序列到一个以上的宿主。例如,穿梭载体可以具有用于大肠杆菌和农杆菌根群菌(*A. tumefaciens*)的复制原点。

[0069] 通常,将 DNA 以表达的适当方向和正确阅读框插入到载体中。如果必要,可以将所述 DNA 与由需要的宿主识别的合适的转录和翻译调节控制核苷酸序列相连,虽然通常载体中有这些控制。调节元件可以得自植物或得自替代来源,所述替代来源包括植物病毒或农杆菌属的 Ti/Ri 质粒。

[0070] 可以将所述 DNA 插入物可操作地与合适的启动子连接,所述启动子例如植物病毒启动子或植物启动子。优选的启动子包括组成型启动子、诱导型启动子、临时调控启动子、发育调控启动子、细胞优选启动子和 / 或细胞特异启动子、组织优选启动子和 / 或组织特异启动子和化学调节启动子。所述启动子也可以是由转录因子结合位点的人工组合构建的合成启动子或人工启动子。

[0071] 组成型启动子包括 CaMV 35S 和 19S 启动子 (Fraley 等人, 第 5, 352, 605 号美国专利)。可以将 McElroy 等人, *Mol. Gen. Genet* 231, 150-160 (1991) 描述的启动子表达盒容易地进行修饰用于编码序列的表达, 并且其特别适用于在单子叶植物宿主中使用。

[0072] 再另一个优选的组成型启动子得自泛素, 所述泛素是已知在许多细胞类型中积累的另一种基因产品。所述泛素启动子已从几个物种中克隆, 在转基因植物中使用 (例如 Binet 等人, *Plant Science* 79, 87-94 (1991))。

[0073] 诱导型启动子包括对非生物和生物环境刺激有应答的启动子。非生物环境刺激包括光、温度和水分有效性。生物环境刺激包括病原体 (包括病毒诱导的启动子、细菌诱导的启动子、真菌诱导的启动子、昆虫诱导的启动子和线虫诱导的启动子), 与共生生物和食草动物的相互作用。所述启动子也可以对移动、触摸、组织损伤和植物激素 (包括脱落酸、细胞分裂素、生长素、赤霉素、乙烯、油菜素内酯和肽, 所述肽如系统素和结瘤因子) 有应答。

[0074] 临时调节启动子包括昼夜节律调节启动子 (circadian regulated promoter), 以及那些响应非昼夜节律的守时机制的启动子。所述发育调节启动子包括用于器官和其他结构的组织特异启动子和细胞类型特异启动子, 所述其他结构包括叶、茎、根、花、种子、胚、花粉和胚珠。

[0075] 用于表达植物中, 特别是玉米和甜菜中编码序列的组织特异启动子或组织优选启动子是那些在根、髓、叶或花粉中指导表达的启动子。实例是来自拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) b1- 微管蛋白基因的 TUB1 启动子 (Snustad 等人, *Plant Cell* 4, 549, 1992)、来自豌豆 (*Pisum sativum*) 的类金属硫蛋白基因的 PsMTA 启动子区域 (Evans 等人, *FEBS Letters* 262, 29, 1990)、来自拟南芥 (*A. thaliana*) 的 RPL16A 和 ARSK1 启动子和在 WO

97/20057 和 WO 93/07278 中公开的另外的启动子。此外,化学诱导启动子用于指导表达,且也是优选的(参见 WO 95/19443)。

[0076] 尤其优选的是 16S rRNA、psbA 和 rbcL 启动子。

[0077] 除了启动子以外,可以将多种转录终止子引入到本发明的 DNA 构建体中。所述转录终止子负责终止超出转基因的转录和它的正确多聚腺苷酸化作用。所述转录终止子可以得自与启动子相同的基因或可以得自不同的基因。在优选实施方案中,将所述编码序列与它的天然存在的多聚腺苷酸信号序列可操作地连接。合适的转录终止子和那些已知在植物中发挥作用的终止子包括 CaMV 35S 终止子、tml 终止子、pea rbcS E9 终止子和本领域已知的其他终止子。合适的终止区域也可以得自农杆菌群菌(*A. tumefaciens*)的 Ti 质粒,例如章鱼碱合成酶和胭脂碱合成酶终止区域。参见,例如 Rosenberg 等人, *Gene*, 56, 125 (1987); Guerinneau 等人, *Mol. Gen. Genet.*, 262, 141-144 (1991); Proudfoot, *Cell*, 64, 671-674 (1991)。

[0078] 除上述以外,本发明的 DNA 构建体也可以包含可以调节表达水平的任意其他序列。已经发现许多序列从转录单元内增强基因表达,并且这些序列可以与编码序列共同使用,以提高在转基因植物中的表达。已经表明许多内含子序列增强表达,尤其是在单子叶细胞中的表达。例如,已经发现,当玉米 Adh1 基因的内含子导入玉米细胞时,显著增强其同源的启动子下的野生型基因的表达 (Callis 等人, *Genes Develop.* 1, 1183-1200 (1987))。内含子序列常规地引入到植物转化载体中,通常是引入到非翻译的前导区内。

[0079] 所述构建体也可以包括与合适的核苷酸序列可操作地连接的调控子,所述调节子例如叶绿体定位信号、叶绿体特异启动子、用于驱动同源同源重组的叶绿体特异序列、核定位信号 (Lassner 等人, *Plant Molecular Biology* 17, 229-234 (1991))、植物翻译共有序列 (Joshi, C. P., *Nucleic Acids Research* 15, 6643-6653 (1987))、内含子 (Luehrsen and Walbot, *Mol. Gen. Genet.* 225, 81-93 (1991)) 等。

[0080] 通常使用的植物转化载体为通过感染递送 DNA 的农杆菌属载体。其他载体包括基因枪载体和适用于 DNA 介导的转化的载体。这些方法对于本领域的技术人员来说是已知的。参见,例如, C. P. Lichtenstein 和 S. L. Fuller, 的综述“Vectors for the genetic engineering of plants”, *Genetic Engineering*, ed. P. W. J. Rigby, vol. 6, 104-171 (Academic Press Ltd. 1987)。

[0081] 本发明的第一个方面的方法也可用于捕获二氧化碳。空气可以用于这种捕获,虽然如果空气富含二氧化碳时其是优选的,例如空气可以含有高达 10% 的二氧化碳。此外,为了使能够更有效地捕获二氧化碳,其允许进一步凭借制备可用于植物细胞的额外的碳来生产物质。

[0082] 可以通过将含有二氧化碳的空气提供给临时浸渍生物反应器来实现二氧化碳的捕获。二氧化碳的来源可以来自任何来源,包括大气二氧化碳、二氧化碳罐,发电厂的废气或燃烧和 / 或发酵室的废气。

[0083] 为了调节临时浸渍生物反应器中生长培养基的 pH 和叶生物质的生长,可以有利地控制二氧化碳的浓度。

[0084] 生物燃料可以通过具有以下步骤的方法制备:使叶生物质在以上描述的临时浸渍生物反应器中生长,例如所述生物反应器为一个或多个封闭的临时浸渍生物反应器;以连

续的、半连续的或分批模式方法收获叶生物质；以及将来自叶生物质的脂质或碳水化合物转变为生物燃料。所述脂质或碳水化合物从叶生物质中的提取可以在转变为生物燃料之前或者作为转变为生物燃料的过程的一部分。可供选择地，所述脂质或碳水化合物可以由叶生物质分泌到培养基中，并从培养基中收获，用于转变为生物燃料。

[0085] 为了改进由叶生物质制备生物燃料，可以将生物质经受环境压力或几个压力的组合，从而提高脂质或碳水化合物的产量。为了改进将要转变为生物燃料的脂质或碳水化合物的产量和可达性（例如通过促进分泌到培养基中），所述叶生物质也可以是经基因工程改造的。

[0086] 生物柴油可以通过酯基转移过程由油 / 脂质制备，并且是一种组成上与化石 / 矿物柴油类似的液体。它的化学名称是脂肪酸甲酯（或乙酯）（FAME）。将油与氢氧化钠和甲醇（或乙醇）混合，而化学反应生成生物柴油（FAME）和甘油。

[0087] 生物醇化合物是生物制备的醇，最常见的是乙醇（生物乙醇）和不太常见的是丙醇和丁醇，并且其是通过微生物和酶的作用，经糖、淀粉或纤维素的发酵制备的。

[0088] 本发明的第二个方面提供了在体外植物细胞中制备多肽的方法，所述方法包括：

[0089] 提供含有叶绿体的未分化植物细胞，所述叶绿体携带编码所述多肽的转基因核酸分子，其中所述植物细胞显示同型异源性；和

[0090] 根据本发明的第一个方面的方法增殖植物细胞，以制备含有多肽的叶生物质，

[0091] 换句话说，所述细胞通过包括以下步骤的方法增殖，即提供未分化植物细胞，将植物细胞与促进细胞分化为叶组织的试剂接触，和使细胞在临时液体浸渍培养体系中生长。

[0092] 可以使用以上描述的及实施例中的方法将转基因核酸分子导入到叶绿体中。

[0093] 所谓同型异源性，我们指植物细胞的每个叶绿体中大部分或所有的多拷贝叶绿体 DNA 都被转化的情况。同型异源性可以通过在含有选择性剂的培养基上继代培养转质体材料数代来实现。所述选择性剂与转化构建体中使用的选择性标记相结合，并且可以是任何适当的选择性标记，如抗生素的抗性基因，所述抗生素如壮观霉素或卡那霉素。

[0094] 应用 DNA 印迹法对同型异源性的实现进行标准验证。

[0095] 提供其中植物不是转基因植物的未分化细胞的步骤包括：

[0096] 放置植物切割碎片（植物材料）与植物激素接触，然后该植物激素在这些切割碎片的边缘生成愈伤组织；

[0097] 然后将所述愈伤组织亚培养为愈伤组织，并保持没有任何选择性。

[0098] 所述切割植物材料可以是整个或部分的根、叶、茎、花或种子。

[0099] 提供其中植物是转基因植物的未分化细胞的步骤包括：

[0100] 通过靶向叶绿体 DNA 的同源重组方法将转基因核酸分子导入到植物细胞的叶绿体中。

[0101] 诱导含有转基因核酸分子的植物细胞，从而形成未分化细胞的愈伤组织；和

[0102] 将该愈伤组织在有效实现同型异源性的条件下繁殖。

[0103] 所述转基因构建体应包含：至少两个与靶向叶绿体 DNA 相似（例如 85% 同源性以上）的核酸序列，从而实现同源重组（所谓的左右边界）；选择性标记基因和编码的肽或多肽序列；

[0104] 关于转质体未分化细胞的使用，同型异源性通过使用抗生素选择来实现，例如使

用链霉素、壮观霉素或卡那霉素选择。

[0105] 可以通过本领域技术人员熟知的各种方法来实现愈伤组织的同型异源性,所述方法包括但不限于:

[0106] (i) 将核酸导入叶的叶绿体 DNA 中,再生成(生长)植物,将该植物继代培养(将其切片,置于选择性培养基上,从而从叶部分再生苗)至少 2 次以达到同型异源性。当例如通过 DNA 印迹检测到同型异源性时,将选择的植物转移到新的培养基中从而生成根,并在最后将选择的植物转移到土壤中,直到其长出花和种子。然后将种子种于选择性培养基上,并且将长出的苗用于生成愈伤组织。

[0107] (ii) 按照上述 (i) 的方法,但是没有将植物转移到土壤中并开花。一旦达到同型异源性,便将所述植物的叶用于生成愈伤组织。

[0108] (iii) 将核酸导入到叶的叶绿体 DNA 中,然后当第一个叶子长出时,在选择性培养基上诱导愈伤组织(该植物材料为异源质体,因为其含有转化的与未转化的叶绿体 DNA 的混合物,其可以通过 DNA 印迹来验证),然后将愈伤组织(callus)在选择性培养基上继代培养为多个愈伤组织(calli),直到其最后达到同型异源性。

[0109] (iv) 将所述核酸导入到未分化细胞的叶绿体 DNA 中,并在选择性培养基上将转质体愈伤组织继代培养为愈伤组织,直到达到同型异源性。

[0110] 优选地,所述核酸分子包含选择性标记基因。通常,所述选择性标记基因是抗生素抗性基因,例如 aadA、nptII、AphVI。

[0111] 通常,将核酸分子插入到载体或 PCR 片段中。

[0112] 通常,载体是质粒,并且通常载体可以在大肠杆菌、酵母、昆虫或哺乳动物细胞中增殖。优选地,所述质粒是叶绿体转化质粒。

[0113] 优选的是,多肽的表达是通过强的叶绿体特异启动子来驱动的。适当的启动子包括 16S rRNA 启动子、psbA 启动子和 rbcL 启动子。

[0114] 植物细胞和叶绿体转化的方法是本领域技术人员熟知的,并且包括以上所讨论的和如 Sambrook and Russell(2001),Molecular Cloning,Alaboratory manual;Grierson and Covey(1988)Plant molecular biology 和 Watson 等人(1997)Recombinant DNA 中描述的转基因方法。

[0115] 在生长培养基中可利用的光的量和/或蔗糖的量可以影响多肽的制备。为了制备每个特异性多肽,技术人员可以基于使用的植物材料和制备需要的生物质,容易地优化所述生长培养基和包括气体混合物(例如,二氧化碳浓度)的条件。

[0116] 本发明的第二个方面的方法优选地包括进一步从叶生物质中获得多肽的步骤。如此获得的多肽也包括在本发明中。适当地,所述多肽通过压碎叶组织从而生成组织提取物并从该组织提取物中分离多肽而获得。

[0117] 适当地,使用过滤、HPLC、离子交换树脂提取、疏水相互作用树脂提取、亲和层析或油水相分离法中的至少一种,从所述组织提取物中纯化多肽。

[0118] 所述多肽可以含有用于纯化多肽的标签。所述标签可以为可裂解或不可裂解的标签,例如 GST、生物素、6His、Strep、HA 或 myc 标签中的任一种。

[0119] 本发明还包括通过本发明的第一个方面的方法获得的叶生物质。

[0120] 由所述方法获得的多肽可以是治疗性多肽、酶、生长因子、免疫球蛋白、激素、结构

蛋白、植物应激反应中牵涉的蛋白、生物药物或疫苗抗原中的任一种。

[0121] 本发明的第三个方面提供了用于获得存在于叶生物质中的成分的方法,所述方法包括根据本发明的第一个方面制备叶生物质和从所述叶生物质中获得所述成分。通常,所述成分以大体上纯的形式获得,因而所述方法可以包括纯化所述成分的进一步的步骤。所述的大体上纯的形式通常包含 > 90%、或 > 95% 或 > 99% 的所述成分。

[0122] 所述成分可以通过其从叶生物质中的分泌或通过从叶生物质中提取获得,所述提取例如通过压碎叶生物质以释放所述成分。

[0123] 所述获得的成分可以是药用物质、重组表达多肽、碳水化合物、脂质、油、挥发性芳香族化合物、抗氧化剂、色素、香味剂或香味剂前体;并且所述成分可以是内源性的或外源性的。

[0124] 本发明还提供了将所获得的成分加工为进一步产品,例如生物燃料、食品或药用产品。

[0125] 本发明还包括用于在体外植物细胞中生产多肽的系统,所述系统包括:

[0126] 促进未分化细胞分化为叶组织的试剂;和

[0127] 编码多肽的核酸分子,所述核酸分子适用于导入到叶绿体中并在叶绿体中表达。

[0128] 本发明的再一个方面提供了捕获二氧化碳的方法,所述方法包括进行本发明的第一个方面所述的方法。

[0129] 纯化样品的方法包括将所纯化的样品暴露于得自本发明的第一个方面的方法的叶生物质。

[0130] 所述纯化过程可以是去除一种或多种毒素。

[0131] 还提供了生产药物组合物的方法,所述方法包括配制:

[0132] 通过本发明的其他方面的方法获得的成分和药学上可接受的载体稀释剂、赋形剂或载体。

[0133] 此外,提供了医药产品,所述医药产品包含通过本发明其他方面的方法获得的成分和药学上可接受的载体稀释剂、赋形剂或载体。

[0134] 在本发明的另一个方面中,提供了生产生物燃料的方法,该方法包括将通过本发明的其他方面的方法获得的成分进行发酵或酯基转移。还提供了通过这种生产方法获得的生物燃料。

[0135] 现参考以下的非限制性实施例和附图来更详细地描述本发明。

[0136] 图 1. 转质体 GFP-6 系的 DNA 印迹分析

[0137] (A) 靶向的叶绿体区域中野生型烟草(*Nicotiana tabacum*)品种 petitHavana(Wt-pt DNA)和转化的(T-pt DNA)烟草原质体系的物理图谱。每个图谱下的箭头表示各自的基因组 DNA 经 BglIII 酶消化后预测的 DNA 片段大小。白色表示载体序列,而橙色为烟草原质体系序列。(B)转基因系 GFP-6(GFP-6)和野生型烟草的全基因组 DNA 使用 BglIII 消化后的 DNA 印迹分析。将消化的基因组 DNA 在 0.7% (w/v) 的琼脂糖凝胶上跑胶,然后转移到尼龙膜上,并使用对应于由引物 PHK40-F 和 rps12-out-R(黑色条)扩增靶向区域的 Dig- 标记的 PCR 片段进行探测。

[0138] 图 2. 在转质体 GFP-6 烟草系中 GFP+ 的检测。

[0139] 在 GFP-6 同型异源系(GFP-6)中在 UV 及可见光下可视化 GFP 表达(A),对照为野

生型(wt)烟草植株。(B)来自 GFP-6 和野生型系的可溶性蛋白质的蛋白质电泳。将每种植物的 5 μ g 全可溶性蛋白提取物和预染色的蛋白质标记物(New England Biolabs, UK)点样于 12.5%(w/v)SDS-PAGE 凝胶上,通过银染可视化蛋白质分离。使用特异性抗 GFP 抗体,通过蛋白质印迹特异性检测 GFP。也显示了与染色的标记的迁移。

[0140] 图 3. 在不同转质体烟草组织中 GFP+ 的表达。

[0141] 生成了来自 GFP-6 和野生型烟草的愈伤组织、细胞悬浮液和叶的全部可溶性蛋白质提取物。对于愈伤组织和细胞悬浮液,在 12.5%(w/v)SDS-PAGE 凝胶上,每个泳道点样 5 μ g 全可溶性蛋白,然而对于叶提取物每个泳道只点样 1 μ g。(A)对应于银染凝胶,然而(B)代表使用 GFP 抗体的相应蛋白质印迹。GFP 标准品购自 Roche Life Science, UK,而预染色的蛋白质标记购自 New England Biolabs, UK。标记蛋白的梯状大小以 kDa 计。Wt 代表烟草(*Nicotiana tabacum*)品种 Petit Havana,而大肠杆菌(*E. coli*)对应于从使用 pFMGFP 转化的 *E. coli* KRX 菌株中提取的蛋白质。

[0142] 图 4. 在不同条件下 GFP-6 转质体愈伤组织的生长。

[0143] 在 25°C 下生长 4 周后拍摄同型异源愈伤组织 GFP-6 的照片。采用与烟草育苗相似的密度,以 16/8h 光照生长平板(A, B, C 和 D)和在黑暗中生长(E, F, G 和 H)。只有 A、B、E 和 F 的培养基中含有 3%(w/v)的蔗糖。所有的培养基含有 500mg/L 的壮观霉素和 500mg/L 的链霉素。在 490nm 下激发后,使用 Axiovert 200M 倒置显微镜(Carl Zeiss, Goettingen, Germany)以及 Axiovision 软件(Version 3.0),在 520nm 下检测荧光发射。对于 A、D 和 E、H 的荧光曝光分别是 30ms、100ms 和 600ms。在 A、D、E 和 H 中的显微镜放大倍数相同,为 40X。

[0144] 图 5. 在不同条件下生长的 GFP-6 愈伤组织中 GFP+ 的检测。

[0145] 从光(L)或黑暗(D)下生长的愈伤组织以及光和糖下生长的野生型(Wt)中提取全可溶性蛋白。培养基中蔗糖的存在以(+)表示,然而没有蔗糖的培养基以(-)表示。将各个愈伤组织的 5 μ g 全可溶性蛋白点样于 12.5%(w/v)SDS-PAGE 凝胶上(L-, L+, D+, D-, wt),并通过银染检测全蛋白的含量(A)。M 代表预染色的蛋白标记(New England Biolabs, UK),并且在左侧以 kDa 表示相应的大小。(B)GFP+ 的存在使用抗 GFP 抗体进行特异性检测。将 GFP 标准品(Upstate, USA)按纳克显示的含量加入。

[0146] 图 6. 在来自临时浸渍生物反应器的新形成的绿色生物质中 GFP+ 的表达。

[0147] 6 周的孵育期后,将 GFP-6 系(A)的烟草生物质从临时浸渍生物反应器中移去。使用丙酮提取方案从新形成的叶中提取全蛋白,并将全蛋白连同预染色的低范围的 SDS-PAGE 标准品(Bio-Rad Laboratories, UK)点样于 10%(w/v)SDS-PAGE 凝胶上。使用考马斯亮蓝染色,使来自野生型(wt)和 GFP-6 系(GFP-6)的蛋白可视化。将不同稀释度的丙酮粉通过使用抗 GFP 抗体的免疫印迹分析(C),并与已知含量的 GFP 蛋白(Upstate, USA)进行比较。

[0148] 图 7. 丙酮沉淀方案期间 GFP 的检测。

[0149] 表示来自丙酮提取方案中不同步骤的几个样品中 GFP 存在的蛋白质印迹。将沉淀直接重悬浮在上样缓冲液中,然而在上样缓冲液加入前将清洗物在 speedvac(Savant, NY, USA)中干燥过夜。沉淀(P)样品只点 5 μ l,然而来自清洗物(W)的所有上清液为 1-4 倍。

[0150] 图 8. 烟草(*Nicotiana tabacum*)品种 Petit Havana 细胞悬浮液的干重和鲜重。

[0151] 在 18 天的生长期间中每 2 天测定一次烟草野生型细胞的鲜重和干重。干重为将

新鲜烟草细胞在 80℃ 下放置 24h 后测量得到。测量重复进行三次。

[0152] 实施例 1：使用临时浸渍生物反应器在植物叶绿体中约束的高水平制备重组蛋白

[0153] 概要

[0154] 叶绿体转化是用于植物重组蛋白的商业制备的有前途的方法。然而，对于本领域中大规模培养转质体植物仍旧存在基因约束的问题。这里，我们评价了使用烟草转质体细胞悬浮液在模型蛋白质的完全约束制备中的潜力，所述模型蛋白质为绿色荧光蛋白(GFP+)的修饰形式。转质体叶中，GFP+ 的表达达到全可溶性蛋白(TSP)的大约 60%。细胞悬浮培养物中的表达少得多(1.5%的 TSP)，但是每升液体培养物仍旧产生约 7.2mg。我们进一步研究了影响愈伤组织中 GFP+ 制备的不同因素和强调了作为输入的光的重要性。最后，我们描述了新蛋白质的制备平台的开发，在该平台中，在噻苯隆的存在下，将转基因细胞悬浮培养物置于临时浸渍生物反应器中，以开始苗的形成。GFP+ 的产量达到了可观的每 L 的生物反应器 660mg。这个新的制备平台与转质体细胞悬浮培养物的快速生成和临时浸渍生物反应器的使用组合，是用于重组蛋白的完全约束的低成本制备的有前途的途径。

[0155] 结果

[0156] 表达 GFP+ 的同型异源性烟草苗的产生

[0157] 构建用于表达烟草叶绿体中的 GFP+ 的载体得自 pJST10，所述 pJST10 用于表达烟草叶绿体中的 TetC 抗原 (Tregoning 等人, 2003)。质粒 pJST10 靶向烟草叶绿体基因 rrn16S 和 rps12/7 之间的表达和选择盒的插入(图 1A)。轰击后，由 10 次独立轰击生成一些壮观霉素抗性苗，并在分析的 6 个中的 4 个苗中通过 PCR 分析检测 gfp+ 整合(数据未显示)。选择 GFP-6 用于进一步的试验，并在 MS 选择性培养基上进行了四轮继代培养。

[0158] 为了证实将所有 GFP-6 系的叶绿体转化，从该植物的叶子中提取全基因组 DNA，用 BglIII 消化，并进行 DNA 印迹分析(图 1)。和预期的一样，对应于插入位点的探针与野生型烟草 DNA 中的 4.5kb 的单一条带杂交。相反地，在 GFP-6 系中检测到了 7.1kb 条带，该 GFP-6 系与 gfp+ 基因和选择性标记的插入一致。GFP-6 中 4.5kb 条带的缺少也表明 GFP-6 是同型异源性的(图 1B)。

[0159] GFP-6 系中 GFP+ 的表达

[0160] 将烟草 GFP-6 系在土壤中生长，并通过将植物暴露于 UV/ 蓝色光源来检测 GFP+ 的表达(图 2A)。强的绿色荧光可以在 GFP-6 中观察到，但是在野生型中观察不到，表明了 GFP-6 中 GFP+ 的表达。为了证实 GFP 的累积，从 GFP-6 和野生型系中提取全可溶性蛋白，并在 SDS-PAGE 凝胶上将其分离(图 2B)。使用特异性抗 GFP 抗体的免疫印迹分析证实了 GFP+ 的累积和显著分解产物的缺乏。银染(图 2B)和考马斯亮蓝染色的凝胶(数据未显示)显示迁移至 27kDa 的 GFP+ 高度表达，并且是可溶性提取物中的主要蛋白。

[0161] GFP-6 烟草系在叶子、愈伤组织和细胞悬浮液中表达水平的比较

[0162] 将从 GFP-6 系获得的 T0 种子在 MS 平板上体外发芽，并且将得到的幼嫩叶子用于产生相应的转质体愈伤组织和细胞悬浮液。在亲本植物 GFP-6 的愈伤组织状态、细胞悬浮培养物和叶子中，通过 SDS-PAGE (图 3A)和半定量免疫印迹分析(图 3B)，使用已知量的在市场上可得到的 GFP 作为标准，来评价 GFP+ 的表达。

[0163] 该对比的最明显的结果是，与愈伤组织和细胞悬浮液相比，烟草叶子中极高水平的 GFP+ 表达(图 3A)。免疫印迹表明，叶子中 GFP+ 的表达是 TSP 的约 60%，其等于按鲜重计

约 5mg/g, 然而在愈伤组织和细胞悬浮液中的表达为 TSP 的约 1.5% (图 3B)。考虑到细胞悬浮液的生长(补充的图 8), 将转质体细胞悬浮液中 GFP+ 生产的速率估计为大约 0.4mg/L/天。

[0164] 光和糖对愈伤组织中 GFP 表达的影响

[0165] 为了评估光和外源蔗糖对 GFP+ 表达的重要性, 将来自 GFP-6 系的转质体愈伤组织在使用或不使用光和使用或不使用蔗糖(图 4), 但是在用于维持选择的 500mg/L 壮观霉素的存在下, 在愈伤组织诱导培养基上生长大约一个月。如图 4 所示, 通过添加蔗糖, 愈伤组织生长得到显著促进, 其与光的强度无关。当将光和糖两者都用于转质体愈伤组织时, 可以鉴定到大量的表达 GFP+ 的小叶绿体 / 质体, 所述小叶绿体 / 质体分散在胞质溶胶中(图 4A)。如果没有为愈伤组织提供光和糖, 则 GFP 荧光减少和叶绿体 / 质体的量降低并分布于细胞中心(图 4D 和 4E)。在缺乏光和糖下生长的愈伤组织中没有检测到 GFP 表达(图 4H)。

[0166] 免疫印迹实验证明, 在完全黑暗中生长的细胞表达的 GFP 很少或几乎不表达, 然而在有光下, 不考虑蔗糖的存在与否, 表达均升高(图 5)。

[0167] 当在光和蔗糖(L+) 存在下生长时, 通过免疫印迹估计 GFP+ 表达的水平为 TSP 的约 4% (图 5)。当正常化到愈伤组织的鲜重和干重时, 该估计值分别相当于高达 48 μ g/g f. w. (鲜重) 或约 1mg/g d. w. (干重) 的 GFP+ 表达水平。

[0168] 用于转质体生物物质的制备的临时浸渍生物反应器的使用

[0169] 考虑到叶组织中转质体基因的表达似乎是最高的, 我们寻求开发用于从愈伤组织 / 细胞悬浮液中快速制备叶组织的方法。在预实验中, 我们发现已知促进烟草中体细胞胚生长的噻苯隆(TDZ)的添加, 能够诱导由在固体 MS 培养基上生长的 GFP-6 愈伤组织形成苗(数据未显示)。为了扩大生产能力, 将来自烟草 GFP-6 系的转质体细胞悬浮液装载于 2L 的生物反应器中, 并临时浸入到补加了 0.1 μ M TDZ 的 MS 培养基中。约 6 周后, 产生了大量的苗(图 6A)。在第一个 14 天期间, 没有检测到生长, 并且苗仅在这个期间后才开始生长。可能该停滞期与细胞从愈伤组织再分化为烟草叶组织需要的时间有关, 所述细胞再分化与在拟南芥中观察到的愈伤组织和分生组织间的转换方式相似 (Gordon 等人, 2007)。

[0170] 40 天后, 将全部生物物质从生物反应器中移除用于分析。植物材料的检查揭示存在的主要为健康叶片, 少量为玻璃化的。

[0171] 2L 的生物反应器中产生总量为鲜重约 470g 的生物物质。为了估计在该生物物质中产生的 GFP+ 的量, 基于丙酮中的蛋白质沉淀开发了蛋白质沉淀方案。使用该方法生产了粉末, 称重后, 将其点样于 SDS-PAGE 凝胶上以检测生成的 GFP+ (图 6B)。检测到约 27kDa 大小的清晰条带, 而野生型中没有。为了定量转质体生物物质中 GFP+ 的产量, 将几个量的丙酮粉末点样, 并通过免疫印迹将 1 μ g 这种粉末估计为含有大约 150ng GFP+ (图 6C)。这表明表达水平达到了约 2.8mg/g 鲜重。

[0172] 在该生物反应器中, 在 40 天生长时间内, 在近似速率 17mg/L/ 天的 GFP 下, 总的 GFP 产量达到了约 660mg/L。这个值比 0.4mg/L/ 天的细胞悬浮液可潜在达到的速率高约 42 倍。

[0173] 讨论

[0174] 烟草转质体细胞悬浮培养物

[0175] 到目前为止, 在叶绿体转化领域中大部分工作集中在用于表达数个目的基因的叶

片上。已经对转质体马铃薯块 (Sidorov 等人, 1999) 和转质体番茄果实 (Ruf 等人, 2001) 中的表达进行了一些工作, 但是表达量相对很少 (分别为 TSP 的 0.05% 和 0.5%)。然而, 种植转基因植物, 即使它们是转质体的, 但大量公众仍然领会到严重性并且可能的环境问题可以对任何未来的发展产生严重影响。此外各个新的转质体领域的获准有非常显著的监管费用。在基于约束转质体细胞的培养物中制备重组蛋白将克服许多这样的问题并且由于这种新制备体系的高度约束本性能显著降低调节费用。

[0176] 为了对比不同类型的表达系统, 我们首次创建了烟草的同型异源性系, 该同型异源性系表达绿色荧光蛋白变体 (GFP+) 的变体。先前已经显示, GFP 在包括烟草 (Khan 和 Maliga, 1999; Newell 等人, 2003)、马铃薯 (Sidorov 等人, 1999) 和莴苣 (Kanamoto 等人, 2006) 在内的一系列不同植物的叶绿体中能够高度表达。此处描述的 GFP 表达的水平在叶中 TSP 的大约 60%, 处于表达的高端, 并且与莴苣中观察到的 GFP 表达的值相似, 在莴苣中 GFP 实现了 TSP 的 36% (Kanamoto 等人, 2006)。

[0177] 我们的结果清楚地显示, 与叶中的在 TSP 的 1.5 到 4% 变化的水平 (图 3 和 5) 相比, 愈伤组织和细胞悬浮培养物中 GFP+ 表达的水平较低, 所述叶的 GFP+ 表达水平与临时转质体莴苣愈伤组织中 GFP 的表达为 TSP 的 1% 相似 (Lelivelt 等人, 2005)。

[0178] 转质体细胞悬浮液中 GFP+ 的表达达到 TSP 的约 1.5%, 其对应于 7.2mg/L, 生产速率为 0.4mg/L/天 (图 5)。该表达水平可能通过优化培养基, 例如通过添加聚乙烯吡咯烷酮和 / 或明胶来提高, 该提高有助于改进在核转化植物细胞中蛋白质表达的量 (Kwon 等人, 2003; Lee 等人, 2002)。我们也显示当光和糖的量更好地优化时, GFP+ 水平可提高至约 TSP 的 4% (图 5)。如果该结果外推至细胞悬浮液生长期, GFP 的产量可以潜在地达到约 1mg/L/天。

[0179] 影响转质体愈伤组织中 GFP+ 产量的因子

[0180] 转质体愈伤组织和细胞悬浮液中通常较低的表达水平可以直接通过叶绿体转化载体的选择和特别地通过驱动 GFP+ 表达的各个启动子来解释。pFMGFP 中使用的 RNA16S 基因的启动子, Prn, 与来自水稻的 RNA16S 启动子相似, 所述 RNA16S 启动子在水稻胚胎发生细胞中的活性与其在叶子中的活性相比降低了 7 倍 (Silhavy 和 Maliga, 1998)。由于细胞悬浮液质体相对于叶片叶绿体分化较少, 此处可能发生了相同的现象。然而, 进一步的工作将必须评估叶和愈伤组织两者中 GFP mRNA 的水平从而能够区分 mRNA 水平的降低或可能的叶绿体数目改变。

[0181] 光对于显著 GFP+ 表达似乎是明显必需的 (图 5), 然而蔗糖表现为与增加的细胞生长更为相关。然而, 这些结果可能是有偏见的, 由于尽管在黑暗中一个月的培养期, GFP+ 非常稳定并且在黑暗下的补充蔗糖的培养基上生长的愈伤组织中检测到的表达可以相当于在将其转移到黑暗中前, 来自烟草细胞的残留 GFP+ 的量。事实上, 在马铃薯微管中由相同启动子驱动 GFP 的表达只达到 TSP 的 0.05% (Sidorov 等人, 1999), 其可能表明在 prn 启动下 GFP 的表达的真实基线远远低于此处观察到的基线。

[0182] 在我们的实验中, 可注意的到, 愈伤组织和细胞悬浮液保持绿色, 并且具有大量的叶绿体广泛散布在细胞各处 (图 4A)。在这些细胞中 GFP+ 达到约 TSP 的 4%, 并且此种高的水平可能表明这些细胞实际上是临时的细胞悬浮液, 所述临时的细胞不能完全去分化, 并且在这些细胞中, 质体仍与功能性叶绿体相似。

[0183] 临时浸渍生物反应器中转质体生物质的生产

[0184] 叶中 GFP+ 产量远远优于未分化细胞中的 GFP+ 产量(图 3),因此尝试促进从转质体愈伤组织的诱导苗。向固体培养基中添加噻苯隆(TDZ),6 周后能够诱导苗由愈伤组织的形成(数据未显示)。有趣地,在洋红色盒子中观察到的生长不是线性的,并且在前三周内没有检测到特别的生长。

[0185] 然而,当将转质体细胞悬浮液置于临时浸渍条件下时,“叶”材料的制备是有效和显著的,并且最终生物质的生成非常丰富,在所述条件下使用临时浸渍类型生物反应器将细胞材料偶尔浸入液体中,仅持续短的时间(图 6A)。在基于固体培养基的诱导和基于临时浸渍生物反应器的诱导两者中都观察到生物质生长中相似的停滞期,在所述临时浸渍生物反应器中,在最初的 2 周内没有检测到生长。

[0186] 所述材料主要由健康小叶组成并且估计所述 GFP+ 的含量达到约 0.66g/L(图 6C)。这些值稍微低于在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(Wilke 和 Katzek, 2003)中观察到的产量,但却是基于植物的系统中获得的最高产量之一。另外,该表达水平是在没有任何优化的情况下获得的,并且将来的发展应该改进工艺的产量和可扩展性。例如,以玻璃瓶换成一次性袋子使得采用临时浸渍生成的咖啡体细胞胚的量几乎翻倍(Ducos 等人, 2008),这可能是由于更好地光透过和再分配。如果将相似的系统用于转质体烟草苗,产量可以达到超过 1g/L。

[0187] 这里描述的适当规模的系统应比温室中制备整个植株所花费的劳动强度少很多,并且也不需要温室防护设施。其也可以为来自转化组织的靶蛋白的制备提供潜在更快的途径,因为不需要生成种子。实际上,一旦鉴定了同型异源性烟草系,则要获得适于临时浸渍生物反应器的细胞悬浮培养物只需要一个月,然而,如果需要生成种子,则约 3 个月是必需的(Molina 等人, 2004)。因而,转质体苗的临时浸渍生长与最近描述的一次性生物反应器(Terrier 等人 2007; Ducos 等人, 2008)的组合是植物中生物药物的低成本制备的有希望的途径。

[0188] 实验过程

[0189] 烟草苗、愈伤组织和细胞悬浮液的生成

[0190] 在 25℃ 下,将烟草品种 Petit Havana(烟草)幼苗、愈伤组织和细胞悬浮液在 30% 湿度的 Fi-Totron 600H 培养箱(Sanyo, Watford, UK)中,在 16 小时光周期(约 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)下生长。将烟草幼苗在 MS 培养基(Murashige 和 Skoog, 1962)上萌发,并通过将叶的小碎片置于愈伤组织诱导培养基(CIM)上来生成愈伤组织,所述愈伤组织诱导培养基为补加了 1mg/L 的 1-萘乙酸(NAA)和 0.1mg/L 激动素(K)的 MS 培养基。细胞悬浮液通过将大量的愈伤组织在缺少琼脂的 CIM 培养基中,于 140rpm 的恒速搅拌下孵育产生。所有的植物激素和培养基均购自 Sigma, St Louis, MO, USA。

[0191] 叶绿体转化载体的构建

[0192] 通过使用 NdeI 和 XbaI 限制性位点双酶切先前表征的烟草叶绿体载体 pJST10(Tregoning 等人, 2003),将 TeTC 基因用 gfp+ 基因(Scholz 等人, 2000)替代来创建叶绿体转化载体 pFMGFP。

[0193] 转质体烟草植物的生成

[0194] 使用具有 1100psi 的爆破片的 PDS1000/He(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)基因枪设备,在其组成以 MS 培养基为基础的 RMOP 培养基(Svab 等人, 1990)上用烟草叶绿体转化载

体 pFMGFP 对 6 周龄野生型烟草叶进行基因枪转化,所述 MS 培养基补加有 1mg/L 的硫酸素、100mg/L 的肌醇、1mg/L N6-苄基腺苷(BAP)和 0.1mg/L 的萘乙酸(NAA)。根据生产商的建议,将 pFMGFP 载体包被于 550nm 的金粒子(SeaShell, La Jolla, CA, USA)上。轰击之后,将叶片在黑暗中保持 48 小时,然后在将植物材料切成小碎片(5mm x 5mm)并置于补加有 500mg/L 盐酸壮观霉素的 RMOP 培养基中。将壮观霉素抗性苗在相同的培养基上继代培养 4 代。

[0195] DNA 印迹分析

[0196] 整合到烟草原生质体系的载体使用在 gfp+ 开始处退火的一个引物,和另一个位于烟草基因组载体 pFMGFP 的同源区域之外的引物通过 PCR 进行评价(数据未显示),并且选择了转质体 GFP-6 系用于所有进一步实验。通过来自野生型和转质体 GFP-6 系两者的经酶切的全基因组 DNA 的 DNA 杂交来评价同型异源性状态。用 BglIII 酶切约 7 μ g 的基因组 DNA,并在 0.7% (w/v) 的琼脂糖凝胶上跑胶。通过毛细作用将 DNA 凝胶转移到尼龙膜上,在 20 x SSC 缓冲液中过夜。

[0197] 使用 DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (RocheApplied Science, UK),在 37°C 下将探针进行 DIG 标记过夜。通过 PCR 获得与靶区域同源的 3kb 探针,所述 PCR 使用引物 pJST10-F 5' AATTCACCGCCGTATGGCTGACCGGCGA 3' 和 Rps 12-OUT-R 5' TTCATGTTCCAATTGAACACTGTCCATT 3',并用烟草基因组 DNA 作为模板。按照生产商的推荐以最终浓度为 25ng/ml,进行探针标记和杂交。按照生产商的指导,通过 X 射线胶片(Amersham, Uppsala, Sweden)检测具有给定的 CSPD 的特异性信号检测。在通过 DNA 印迹分析证实同型异源性后,将 GFP-6 小植株转移到土壤中,并使其产生种子。将该 T₀ 种子在补加有 500mg/L 壮观霉素的 MS 培养基上发芽,并将幼嫩的 T₀ 叶子用于愈伤组织和细胞悬浮液的生成。

[0198] 蛋白质提取

[0199] 首先,根据(Kanamoto 等人,2006)进行总可溶性蛋白质的提取。将植物材料(叶片、愈伤组织、细胞悬浮液)使用液氮研磨成细粉末,并与总可溶性提取缓冲液混合(50mM HEPES pH 7.6、1mM DTT、1mM EDTA、2% (w/v) 聚乙烯吡咯烷酮和一片完全蛋白酶抑制剂不含 EDTA 的混合物(complete protease inhibitors EDTA-free cocktail) (Roche Products Ltd, Welwyn Garden City, UK))。将植物混合物涡旋混合 1 分钟,并在 4°C 下,以 13,000rpm 旋转 30 分钟。将上清液等分并储存在 -20°C 下,直至进一步使用。

[0200] 第二种方法是以总蛋白提取方案为基础的丙酮沉淀法。将植物材料在液氮中研磨成细粉。将 30ml 提取缓冲液(80% (v/v) 丙酮,5mM 抗坏血酸盐)加入到 2g 植物细粉或叶等同物中,并将该混合物使用 Ultra-Turrax (IKA, Heidelberg, Germany) 在冰上均质 15s。通过在 4°C 下,以 5000g 离心 5 分钟来沉淀蛋白质。弃去上清液,将沉淀用相同的提取缓冲液和相同的离心条件洗涤 4 次。然后,将沉淀重新悬浮在纯丙酮中,并再次均质。将所述蛋白在 4°C 下,以 10,000g 旋转一次以上,每次 5min。弃去上清液,并将沉淀用纯丙酮洗涤 3 次以上。在最后一次洗涤中,将该缓冲液等分,并使用 Speed-Vac (Savant, Holbrook, NY, USA) 干燥,并且将残留的粉末称为丙酮粉末。通过蛋白质印迹分析检测沉淀和不同的洗涤液中 GFP 的存在(补充的图 7)。

[0201] 电泳和蛋白质印迹分析

[0202] 将来自转质体和野生型样品的蛋白质连同蛋白质标记和可商购获得的重组

GFP (Upstate, Waltham, MA, USA) 用 12.5%(w/v) SDS-PAGE 凝胶再溶,用于定量目的。将蛋白凝胶直接用考马斯亮蓝或银染染色。电泳后,根据生产商的建议,使用 mini Trans-Blot® system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 或通过使用 iBlot 干转移系统 (Invitrogen, UK), 将蛋白质转移到 0.2 μm 的硝酸纤维膜 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 上。转移之后,通过使用以 1 : 20,000 稀释的第一兔多克隆抗 GFP 抗体 (由 Prof Nixon, Imperial College London, UK 提供) 进行 GFP 特异性检测,而将第二抗体 (辣根过氧化物酶缀合的羊抗兔免疫球蛋白 G, Amersham, Uppsala, Sweden) 稀释为 1 : 10,000。使用 ECL SuperSignal® West PicoChemiluminescence Substrate 试剂盒 (Pierce Biotechnology Inc., UK) 进行生物化学检测。

[0203] 临时浸渍生物反应器

[0204] 通过将大约 7 克的烟草品种 Petit Havana 细胞悬浮液置于 2L 的临时浸渍生物反应器中生成烟草生物质 (Ducos 等人, 2007)。在 40 天的时间内,每三小时使用 1L 补加有 0.1 μM 噻苯隆 (TDZ, Sigma, UK) 的 MS 培养基浸渍 5 分钟。此外,所述培养基包含 100mg/L 的壮观霉素来防止污染和选择转质体细胞。据雀巢公司的研究人员估计,基于培养皿中愈伤组织固体诱导,MS 培养基中 TDZ (噻苯隆) 的浓度最优为 0.1 μM (数据未显示)。将培养基在 3 分钟内通过空气泵推入 2L 的容器中,并使其通过重力在 2 分钟以上退回到原始瓶中。光的条件和温度与愈伤组织和细胞悬浮液的生长实验类似。

[0205] 荧光显微镜

[0206] 使用 Axiovert 200M 倒置显微镜 (Carl Zeiss, Goettingen, Germany) 和 AxioVision 软件 (3.0 版) 观察表达 GFP 并来源于 GFP-6 系的转质体烟草愈伤组织和细胞悬浮液。将对于 GFP+ 检测优化的激发波长和发射波长分别设置在 491nm 和 512nm (Scholz 等人, 2000)。曝光和放大倍数根据实验改变,并将其显示于每个图。

[0207] 表 S1. 鲜重、干重和丙酮粉末之间的比率。

[0208] 计算这些比率以确定 GFP 的稳健定量。对于鲜重 (f. w.)、干重 (d. w.) 和丙酮粉末 (粉末), 数值代表至少 4 次重复的平均值。在它们各自生长期的最后, 收获愈伤组织和悬浮液 (细胞), 并对在 2-3 周幼嫩小植株 (每株大约有 4 片叶子, 与临时浸渍生物反应器中产生的生物质相似) 进行叶子的测量。

[0209]

组织	d.w./f.w.(%)	粉末/d.w. (%)
叶	6.6 ± 0.9	28.3 ± 1.1
细胞	4.4 ± 0.3	14.1 ± 1.4
愈伤组织	3.6 ± 0.4	12.4 ± 1.3

[0210] 参考文献

[0211] Azhagiri AK and Maliga P (2007) Exceptional paternal inheritance of plastids in *Arabidopsis* suggests that low-frequency leakage of plastids via pollen may be universal in plants. *Plant J* 52:817-823.

[0212] Birch RG (1997) PLANT TRANSFORMATION: Problems and Strategies for Practical Application. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 48:297-326.

- [0213] Brinkmann N and Tebbe CC(2007) Leaf-feeding larvae of *Manduca sexta*(Insecta, Lepidoptera) drastically reduce copy numbers of *aadA* antibiotic resistance genes from transplastomic tobacco but maintain intact *aadA* genes in their feces. *Environmental biosafety research* 6 :121-133.
- [0214] Daniell H, Lee SB, Panchal T and Wiebe PO(2001) Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *Journal of molecular biology* 311 :1001-1009.
- [0215] Doran PM(2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Current opinion in biotechnology* 11 :199-204.
- [0216] Ducos J, Labbe G, Lambot C and Pétiard V(2007) Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 43 :652-659.
- [0217] Ducos J, Terrier B, Courtois D and Pétiard V(2008) Improvement of plastic-based disposable bioreactors for plant science needs. *Phytochemistry Reviews* 7 :607-613.
- [0218] Farran I, Rio-Manterola F, Iniguez M, Garate S, Prieto J and Mingo-Castel AM(2008) High-density seedling expression system for the production of bioactive human cardiotrophin-1, a potential therapeutic cytokine, in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant biotechnology journal* 6 :516-527.
- [0219] Fischer R, Emans N, Schuster F, Hellwig S and Drossard J(1999) Towards molecular farming in the future: using plant-cell-suspension cultures as bioreactors. *Biotechnology and applied biochemistry* 30(Pt 2) :109-112.
- [0220] Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P and Twyman RM(2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current opinion in plant biology* 7 :152-158.
- [0221] Fox JL(2003) Puzzling industry response to ProdiGene fiasco. *Nature biotechnology* 21 :3-4.
- [0222] Gill R and Saxena PK(1993) Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. : induction by thidiazuron of direct embryo differentiation from cultured leaf discs. *Plant Cell Reports* 12 :154-159.
- [0223] Gleba Y, Klimyuk V and Marillonet S(2007) Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol.* 18 :134-41.
- [0224] Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, Ohno C, Das P and Meyerowitz EM(2007) Pattern formation during de novo assembly of the Arabidopsis shoot meristem. *Development (Cambridge, England)* 134 :3539-3548.
- [0225] Hagemann R(2004) The Sexual Inheritance of Plant Organelles, in *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles* pp 93-113.
- [0226] Halioua E(2006) Status of biomanufacturing in the world. Eurobio conference 2006. www.eurobio2006.com/DocBD/press/pdf/41.pdf (accessed 3/3/09)

- [0227] Hellwig S, Drossard J, Twyman RM and Fischer R(2004) Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature biotechnology* 22 :1415-1422.
- Huang CY, Ayliffe MA and Timmis JN(2003) Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature* 422 :72-76.
- [0228] Huang J, Sutliff TD, Wu L, Nandi S, Bengé K, Terashima M, Ralston AH, Drohan W, Huang N and Rodriguez RL(2001) Expression and purification of functional human α -1-Antitrypsin from cultured plant cells. *Biotechnology progress* 17 : 126-133.
- [0229] Kanamoto H, Yamashita A, Asao H, Okumura S, Takase H, Hattori M, Yokota A and Tomizawa K(2006) Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic research* 15 :205-217.
- [0230] Kang TJ, Loc NH, Jang MO, Jang YS, Kim YS, Seo JE and Yang MS(2003) Expression of the B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin in the chloroplasts of plants and its characterization. *Transgenic research* 12 :683-691.
- [0231] Khan MS and Maliga P(1999) Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nature biotechnology* 17 : 910-915.
- [0232] Kwon TH, Seo JE, Kim J, Lee JH, Jang YS and Yang MS(2003) Expression and secretion of the heterodimeric protein interleukin-12 in plant cell suspension culture. *Biotechnology and bioengineering* 81 :870-875.
- [0233] Langbecker CL, Ye GN, Broyles DL, Duggan LL, Xu CW, Hajdukiewicz PT, Armstrong CL and Staub JM(2004) High-frequency transformation of undeveloped plastids into tobacco suspension cells. *Plant physiology* 135 :39-46.
- [0234] Lee JH, Kim NS, Kwon TH, Jang YS and Yang MS(2002) Increased production of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures. *Journal of biotechnology* 96 :205-211.
- [0235] Lelivelt CL, McCabe MS, Newell CA, Desnoo CB, van Dun KM, Birch-Machin I, Gray JC, Mills KH and Nugent JM(2005) Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant molecular biology* 58 :763-774.
- [0236] Ma JK, Drake PM and Christou P(2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature reviews* 4 :794-805.
- [0237] Maliga P(2004) Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol.* 55 :289-313.
- [0238] Molina A, Hervas-Stubbs S, Daniell H, Mingo-Castel AM and Veramendi J(2004) High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant biotechnology journal* 2 :141-153.
- [0239] Monier JM, Bernillon D, Kay E, Faugier A, Rybalka O, Dessaux Y, Simonet P and Vogel TM(2007) Detection of potential transgenic plant DNA recipients among

soil bacteria. *Environmental biosafety research* 6 :71-83.

[0240] Murashige K and Skoog F(1962)A revised medium for rapid growth and bio assays withTobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 :473 :497.

[0241] Newell CA, Birch-Machin I, Hibberd JM and Gray JC(2003)Expression of greenfluorescent protein from bacterial and plastid promoters in tobacco chloroplasts. *Transgenic research* 12 :631-634.

[0242] Ruf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H and Bock R(2001)Stable genetic transformationof tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature biotechnology* 19 :870-875.

[0243] Ruf S, Karcher D and Bock R(2007)Determining the transgene containment levelprovided by chloroplast transformation. *Proceedings of the National Academy ofSciences of the United States of America* 104 :6998-7002.

[0244] Saxby S(1999)Commercial production of monoclonal antibodies. In : *Proceedings of theProduction of Monoclonal antibodies Workshop* (Eds. McArdle JE and Lund CJ). <http://altweb.jhsph.edu/topics/mabs/ardf/saxby.htm> (accessed 3/2/09)

[0245] Scholz O, Thiel A, Hillen W and Niederweis M(2000)Quantitative analysis of geneexpression with an improved green fluorescent protein. p6. *European journal ofbiochemistry/FEBS* 267 :1565-1570.

[0246] Scott SE and Wilkinson MJ(1999)Low probability of chloroplast movement from oilseedrape (*Brassica napus*) into wild *Brassicarapa*. *Nature biotechnology* 17 :390-392.

[0247] Sheppard AE, Ayliffe MA, Blatch L, Day A, Delaney SK, Khairul-Fahmy N, Li Y, MadesisP, Pryor AJ and Timmis JN(2008)Transfer of plastid DNA to the nucleus is elevatedduring male gametogenesis in tobacco. *Plant physiology* 148 :328-336.

[0248] Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PT, Staub JM and Nehra NS(1999) Technical Advance :Stable chloroplast transformation in potato :use of green fluorescentprotein as a plastid marker. *Plant J* 19 :209-216.

[0249] Silhavy D and Maliga P(1998)Plastid promoter utilization in a rice embryogenic cellculture. *Current genetics* 34 :67-70.

[0250] Svab Z, Hajdukiewicz P and Maliga P(1990)Stable transformation of plastids in higherplants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States ofAmerica* 87 :8526-8530.

[0251] Svab Z and Maliga P(2007)Exceptional transmission of plastids and mitochondria fromthe transplastomic pollen parent and its impact on transgene containment. *Proceedingsof the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 :7003-7008. Terrier B, Courtois D, Henault N, Cuvier A, Bastin M, Aknin A, Dubreuil J and Petiard V(2007)Two new disposable bioreactors for plant cell culture :The wave and undertowbioreactor and the slug bubble bioreactor.

Biotechnology and bioengineering 96 :914-923.

[0252] Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg J, van Wijk KJ, Dougan G and Maliga P(2003)Expression of tetanus toxin Fragment C into tobacco chloroplasts. Nucleic acids research 31 :1174-1179.

[0253] Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P and Fischer R(2003)Molecular farming in plants : host systems and expression technology. Trends in biotechnology 21 :570-578.

[0254] Verma D and Daniell H(2007)Chloroplast vector systems for biotechnology applications. Plant Physiology 145 :1129-1143.

[0255] Wang T, Li Y, Shi Y, Reboud X, Darmency H and Gressel J(2004)Low frequency transmission of a plastid-encoded trait in *Setaria italica*. Theoretical and applied genetics 108 :315-320.

[0256] Wilke D and Katzek J(2003)Primary production of biopharmaceuticals in plants - An economically attractive choice ? In : European Biopharmaceutical Review (Autumn). www.biomitteldeutschland.de/files/pdf/Biopharmaceuticalsinplants.pdf (accessed 3/2/09) Zhang Q, Liu Y and Sodmergen(2003)Examination of the Cytoplasmic DNA in Male Reproductive Cells to Determine the Potential for Cytoplasmic Inheritance in 295 Angiosperm Species, in Plant Cell Physiology 44 :941-951.

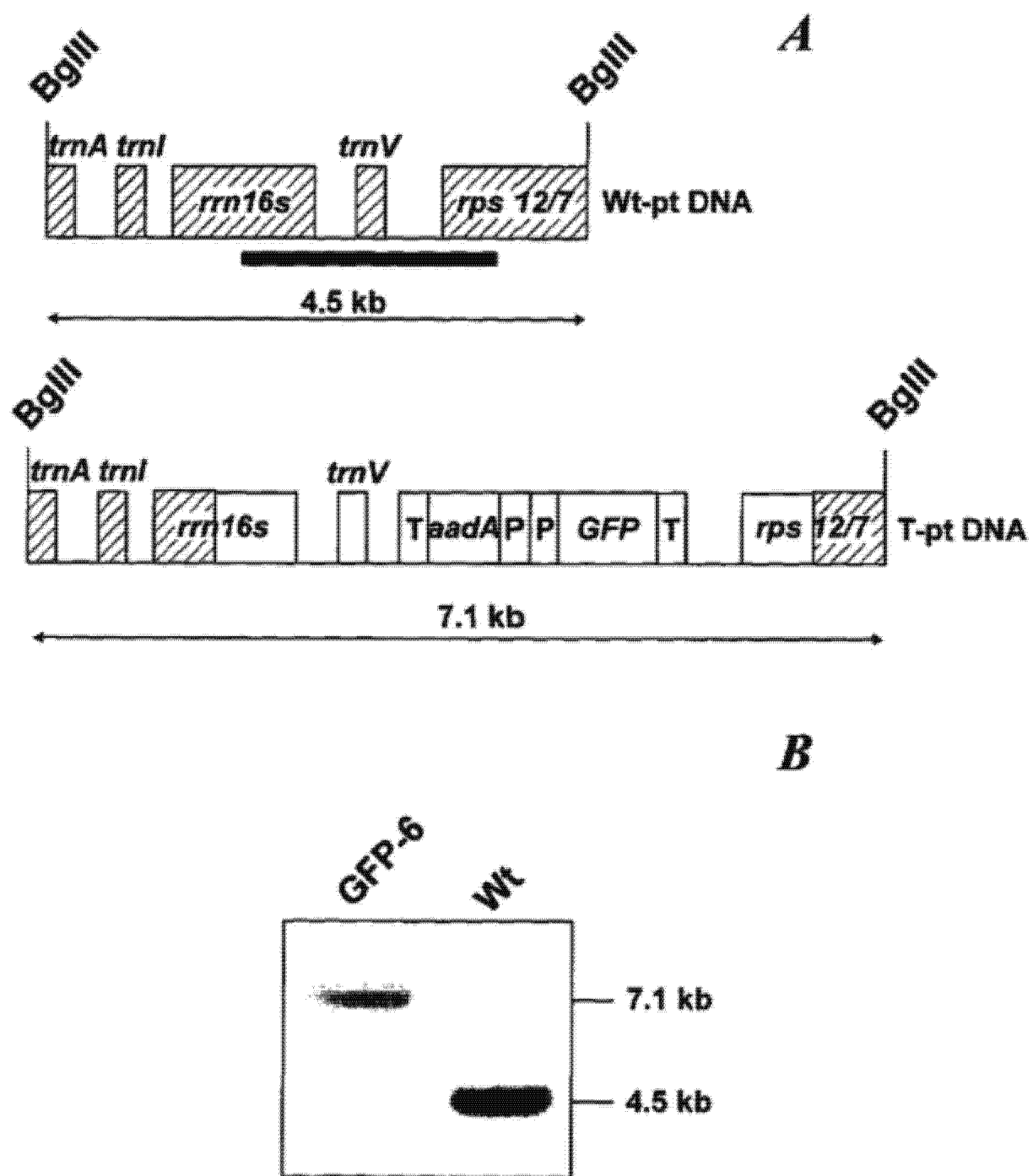


图 1

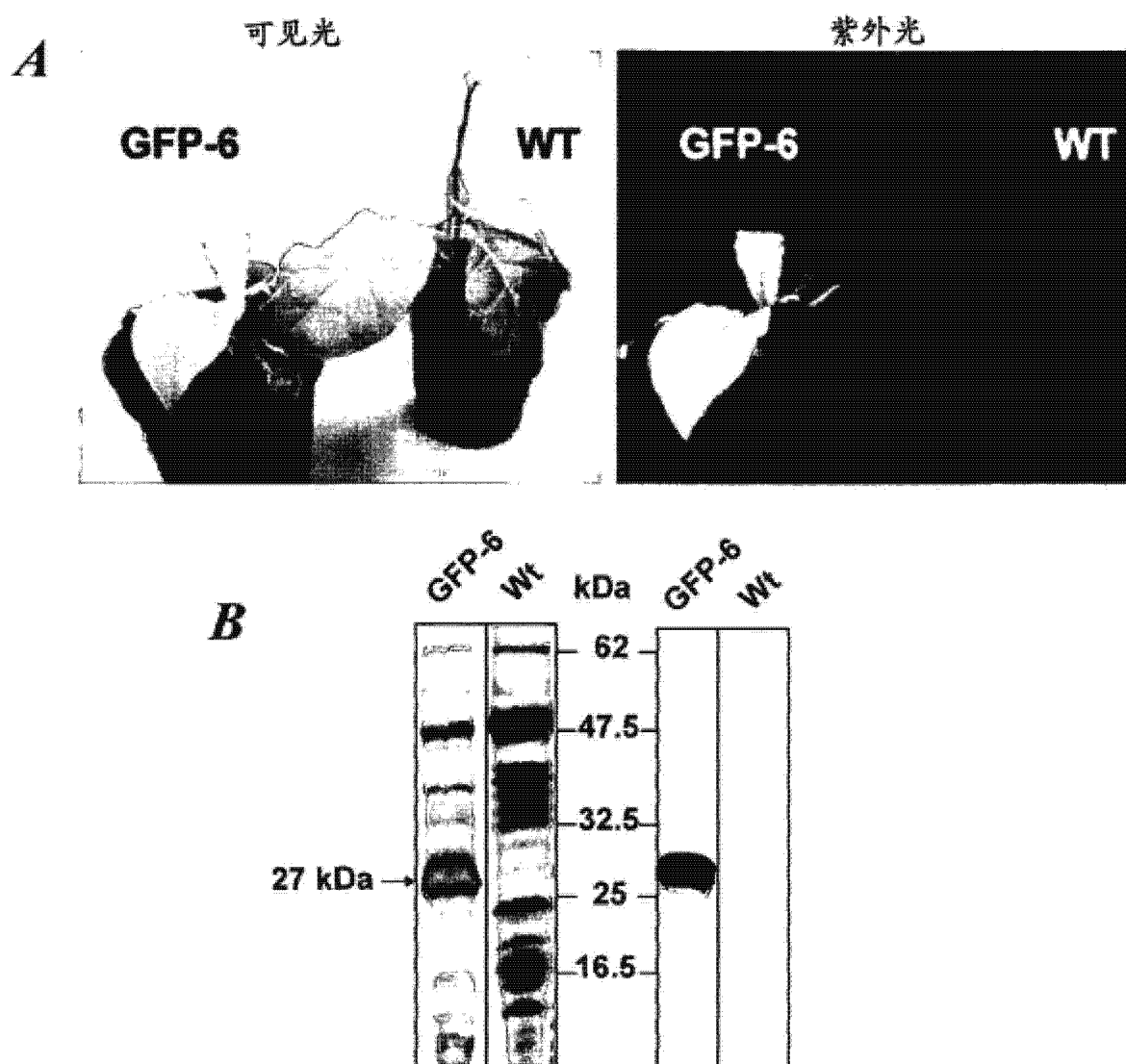


图 2

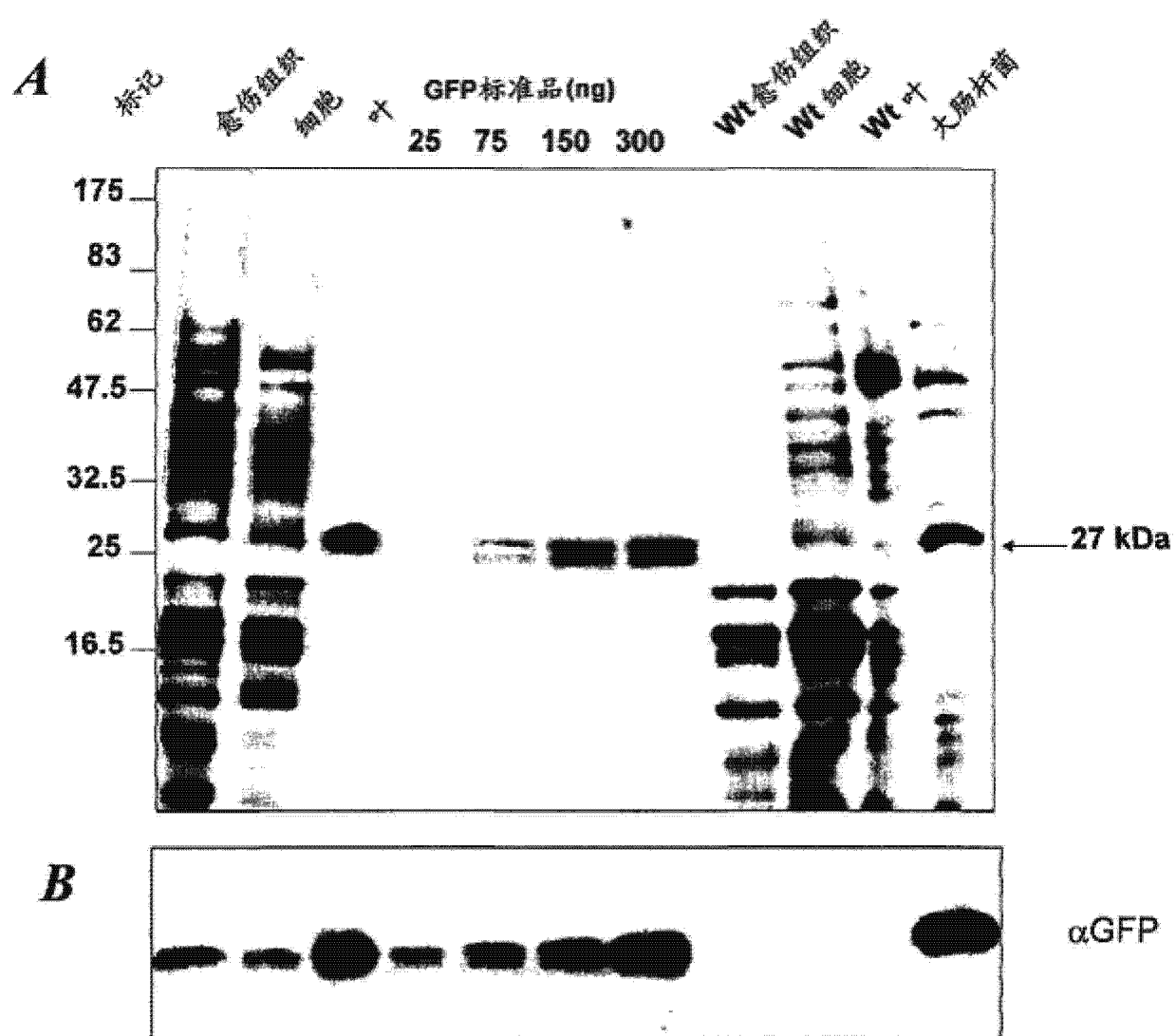


图 3

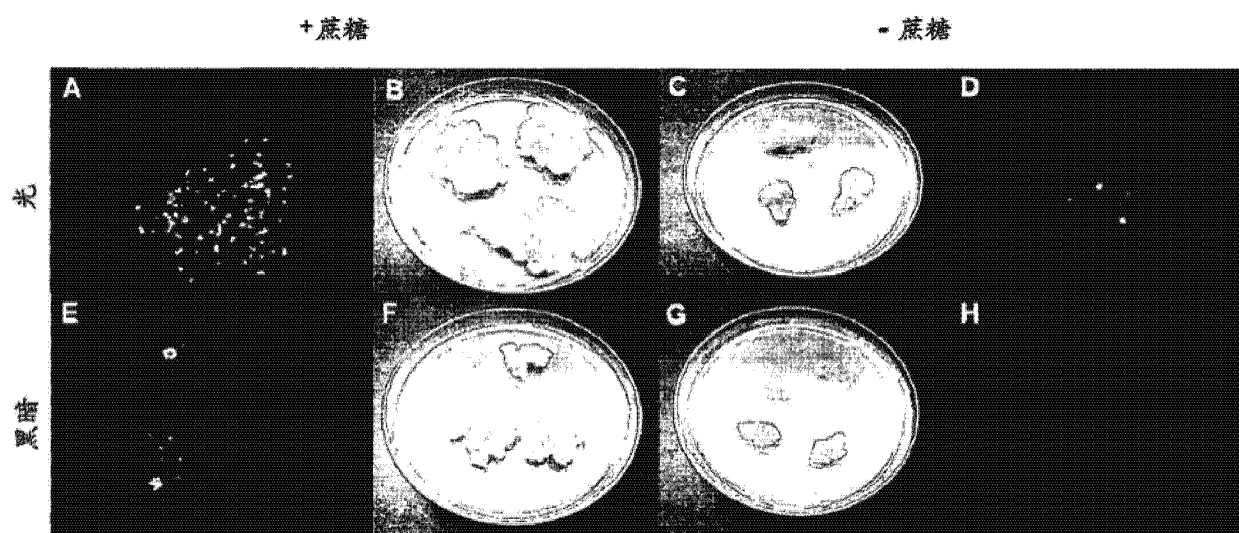


图 4

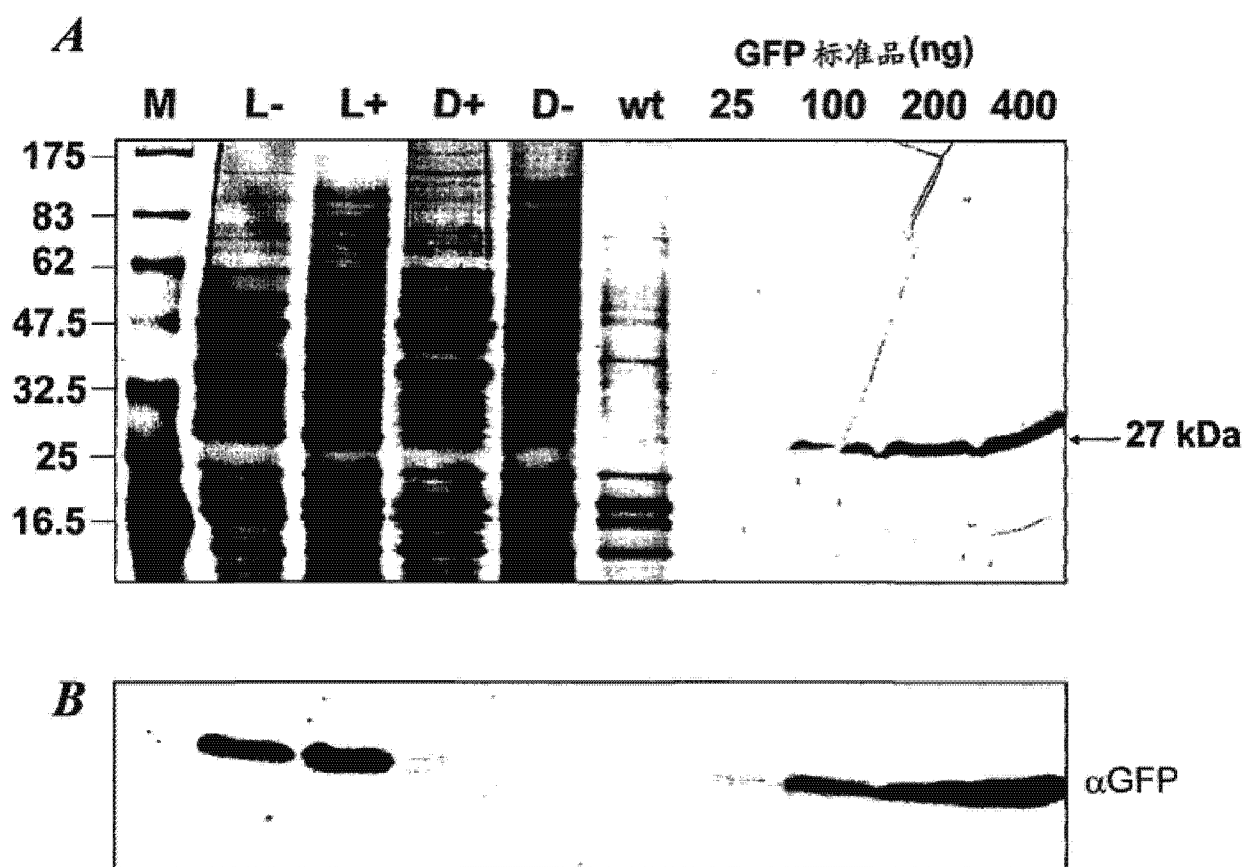


图 5

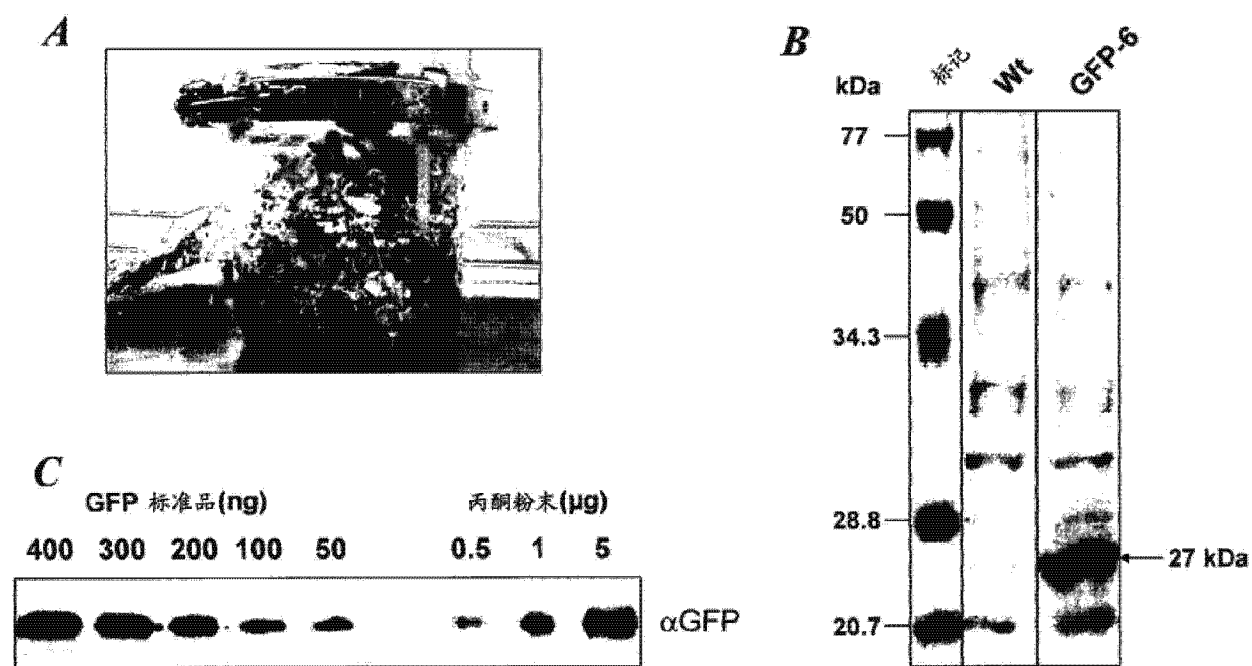


图 6

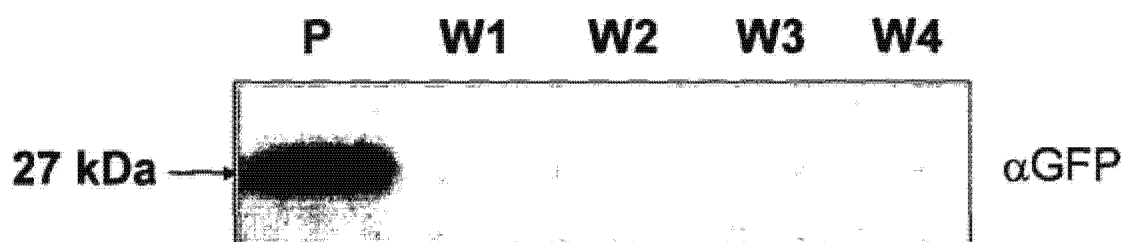


图 7

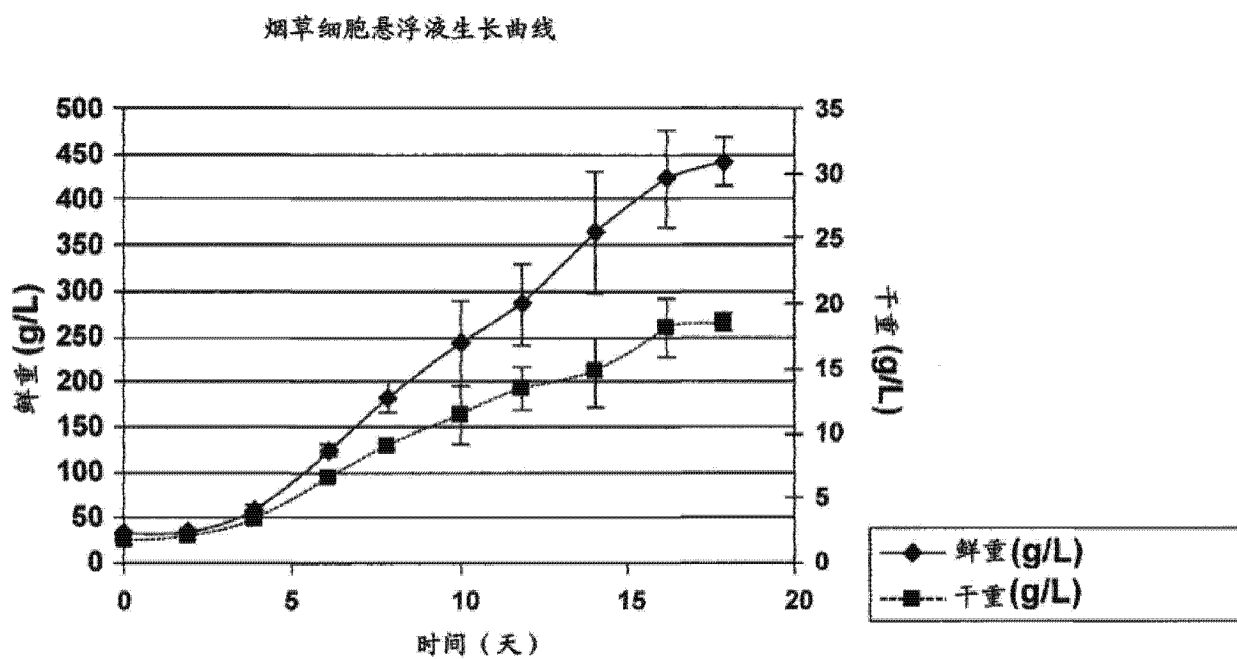


图 8