

· 综 述 ·

基于植物重组蛋白产量提高的研究进展

武兆云, 张倩, 郭玉鸽, 杨惠娟, 杨铁钊

河南农业大学 烟草学院, 河南 郑州 450002

武兆云, 张倩, 郭玉鸽, 杨惠娟, 杨铁钊. 基于植物重组蛋白产量提高的研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2784-2797.
WU ZY, ZHANG Q, GUO YG, YANG HJ, YANG TZ. Improving the production of plant-based recombinant protein: a review.
Chin J Biotech, 2022, 38(8): 2784-2797.

摘 要: 重组蛋白为疾病治疗提供了新手段, 同时创造了可观的经济效益。利用经济作物 (主要是烟草)、谷类作物、豆科作物和蔬菜作物生产具有药用价值的重组蛋白是“分子农业”最热门的研究内容。尽管许多重组蛋白已在植物中表达, 但只有一小部分已成功投入使用。为了极大地克服限制植物生产重组蛋白发展的问题, 研究人员改进表达系统以增加重组蛋白的产量。本文从分析植物产生重组蛋白产量低和/或生物活性低等问题入手, 综述了近几年来解决这些问题的优化策略, 同时提出了提高植物生产重组蛋白产量的研究方向。

关键词: 重组蛋白; 本氏烟草; 产量; 优化策略

Improving the production of plant-based recombinant protein: a review

WU Zhaoyun, ZHANG Qian, GUO Yuge, YANG Huijuan, YANG Tiezhao

College of Tobacco, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China

Abstract: Recombinant proteins provide new means for disease treatment, while creating considerable economic benefits. Using commercial crops (mainly tobacco), cereal crops, legumes, and vegetable crops to produce recombinant proteins with medicinal value is a hot-spot for research in “molecular farming”. Although many recombinant proteins have been expressed in plants, only a small number have been successfully put into use. To overcome the problems that greatly hamper the development of

Received: May 7, 2022; **Accepted:** June 14, 2022; **Published online:** June 21, 2022

Supported by: Henan Tobacco Company Pingdingshan Company Science and Technology Project (PYKJ202207); Henan Agricultural University Science and Technology Innovation Fund Project (KJCX2015A09)

Corresponding author: YANG Tiezhao. E-mail: yangtiezhao@outlook.com

基金项目: 河南省烟草公司平顶山市公司科技项目 (PYKJ202207); 河南农业大学科技创新基金项目 (KJCX2015A09)

recombinant protein production in plants, researchers have improved expression systems to increase the yield of recombinant proteins. Starting from analyzing the problems of low yield and/or low biological activity of recombinant proteins produced by plants, the optimization strategies to solve these problems were reviewed, and future research directions for improving the yield of recombinant proteins produced by plants were proposed.

Keywords: recombinant proteins; *Nicotiana benthamiana*; yield; optimization strategy

1986年,人类利用植物第一次表达了重组人生长激素。1989年,Hiatt等在*Nature*杂志上发表一篇描述在烟草植物中产生功能性重组抗体的文章并提出“分子农业”(molecular farming)这一概念^[1]。1990年,科研人员在烟草和马铃薯植物以及烟草悬浮细胞中产生了功能性人血清白蛋白。这些开创性的研究正式开启利用植物生产重组蛋白的时代。研究人员很快意识到,利用植物生产重组蛋白与其他表达系统(例如大肠杆菌、某些酵母菌和一些哺乳动物细胞系,尤其是中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞系)相比具有很多优势(表1)^[2]。第一,植物作为生物反应器不会存在与哺乳动物细胞培养中相同的病原体污染的问题,具有安全性高的特点^[3];第二,与传统的细胞培养系统相比,植物培养系统在规模上具有很强的可扩展性^[4];第三,植物作为自养生物,植物系统不需要昂贵的细胞培养设施和生物反应器,因此生长要求简单且成本低廉;第四,植物具备了真核翻译后修饰的能力,例

如糖基化和二硫键桥接,这通常对许多哺乳动物产生蛋白质的生物活性至关重要^[5-6]。

分子农业的概念提出至今已有30多年的时间,利用植物生产重组蛋白的种类越来越多^[5,7],例如人生长激素、胰岛素、人表皮生长因子、人凝血因子、白细胞介素^[8]、单克隆抗体^[9-10](片段)^[11]、病毒样颗粒^[12]等;禽类重组亚单位疫苗^[13]、禽类血凝素^[14]、抗体片段等。越来越多的重组蛋白已经通过了临床试验并经过全面审查。

然而,与大量研究相比,进入市场的分子农业产品数量较少,这表明商业开发存在瓶颈,特别是在制药行业。分子农业最为人知的局限性包括植物生产力低、下游加工成本高以及转化为应用过程缓慢。为了克服限制植物生产药用蛋白的问题,人们努力改进表达系统以增加重组蛋白的数量和提高质量策略。本文综述了为提高植物性药物蛋白的产量方面取得的技术进步,并讨论了提高植物生产重组蛋白产量的研究方向。

表1 用于生产重组蛋白的各种表达系统的比较

Table 1 Comparison of various expression systems used to produce recombinant proteins

Item	Production cost	Post-translational modifications	Function	Protein stability	Mammalian pathogen contamination risk
Bacteria	Medium	No	High	High	No
Mammalian cell	High	Yes	Medium	High	Yes
Transgenic plants	Low	Yes	High	High	No
Plant cell	Low	Yes	High	High	No

1 提高蛋白质表达的策略

在植物细胞中生产重组蛋白产量低和/或生物活性低, 主要问题出现在密码子的偏好性、蛋白不正确或不充分折叠、非人源化 *N*-糖基化、宿主沉默效应和蛋白水解等方面。这就要根据其产生原因, 可事先查阅多篇最新文献中的方法进行尝试, 采取相关优化策略来解决问题。

1.1 密码子的偏好性

植物中表达的药用重组蛋白来源于人类/动物基因组或来自人类/动物病原体, 这些蛋白质的编码序列使用的是与人类/动物相匹配的密码子, 而不是植物中的密码子。对于某个特定的氨基酸密码子因生物体而异, 并且与该氨基酸可用的 tRNA 水平相关。优化转基因对宿主生物体的密码子使用是表达研究的标准做法^[15-16]。密码子优化程序根据对来自大量生物体和细胞器序列的分析, 可用于定制序列以匹配宿主的密码子使用。然后可以修改或合成该序列以插入到载体中。现在有很多的相关软件或网站可供使用^[17-19]。许多研究表明, 重组蛋白质氨基酸序列密码子的优化是使用宿主的密码子, 是提高翻译效率和蛋白质产量的有效手段^[20]。Wang 等将密码子优化后的重组干细胞因子 (stem cell factor, SCF) 基因转入烟草 BY-2 细胞后, 其蛋白产量增加了 25-30 倍^[21]。最近研究表明, 在某些情况下密码子优化可能会影响有效蛋白质合成所必需的 mRNA 结构特征。了解源生物和宿主生物中的密码子使用将有助于寻求最佳的密码子以提高翻译效率^[22]。

1.2 启动子、终止子和非翻译区域 (untranslated region, UTR)

基因转录起始、终止和多聚腺苷酸化是基因表达的关键组成部分, 并且具有基因启动子和终止子的正确组合对于构建正确的转基因表

达盒至关重要。终止子的有效多聚腺苷酸化对基因转录和 mRNA 从细胞核到细胞质的翻译过程有很大影响。5'-UTR 和 3'-UTR 在决定 mRNA 稳定性和翻译方面也发挥着重要作用^[23]。启动子是基因结构的重要组成部分, 很大程度上决定了靶基因的 mRNA 水平及其对外部条件的依赖性, 以及转基因表达的空间 (各种组织和器官) 和时间模式。目前, 有多种启动子可以在植物细胞中有效发挥作用, 包括天然的和合成的、组成型的和诱导型的、从植物及其病原体中分离出来的。组成型启动子是生产重组蛋白最常用的启动子, 例如花椰菜花叶病毒 (cauliflower mosaic virus, CaMV) 的 35S RNA 及其衍生物、泛素启动子 (ubiquitin, Ubi) 和农杆菌衍生的胭脂碱合酶 (nopaline synthase, NOS) 启动子。然而, 这类启动子的用途主要限于在双子叶植物中的表达。

有些重组蛋白在植物种子中的产生则更偏向于组织特异性启动子, 以实现目标蛋白质高水平 and 稳定的表达, 同时不影响植物正常生长发育。天然种子贮藏蛋白的基因启动子, 贮藏蛋白包括谷蛋白 (GluB-1 和 GluB-4)、醇溶蛋白和球蛋白 (Glb-1), 而这些启动子是通常用于水稻种子胚乳组织中蛋白质表达的强而特异的启动子。Holásková 等研究结果表明, 大麦 B1 醇溶蛋白基因的天然种子特异性启动子在产生人源抗菌肽 LL-37 的产量和胚乳特异性积累方面均显示出优于玉米泛素启动子的优势^[24]。

胭脂碱合酶终止子和章鱼碱合酶 (octophobasic synthase, OCS) 终止子是最普遍采用的, 很多研究发现在靶蛋白表达方面比 NOS 终止子更有效的终止子, 例如, 拟南芥热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 终止子、大豆 vspB 终止子、烟草无内含子伸展蛋白 (extensin) 终止子 (EU)^[25]和本氏烟草肌动蛋白 3 (NbACT3)

终止子。伸展蛋白是富含羟脯氨酸糖蛋白 (hydroxyproline-rich glycoprotein, HRGP) 超家族的成员, 是构成细胞壁的主要蛋白质成分。有研究表明, 与本氏烟草叶片中的 NOS 终止子相比, 去除了天然内含子的伸展蛋白终止子使绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 表达增加了 13.5 倍^[25]。

非翻译区域也是决定蛋白质合成整体效率的关键因素。典型的有效 5'-UTR 大小在 40–80 个核苷酸之间变化; 它不应包含任何替代的 AUG 起始密码子, 并且不应形成高度稳定的二级结构。二级结构通常会减慢 40S 核糖体亚单位沿 5'-UTR 的移动, 这也会对翻译效率产生不利影响。分析和优化 5'-UTR 特征是高效翻译转基因 mRNA 所必需的。通过对各种 5'-UTR 和 3'-UTR (包括终止子) 的比较分析, 证明有几种在增强植物重组蛋白生产方面是非常有效的。例如, 来自拟南芥和本氏烟草的两个截短的 5'-UTR 与著名的烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV) omega 前导序列相比, 光系统 IK 基因 (*PsaK*) 表现出更好的蛋白质产量增强能力, 而与 NOS 终止子相比, EU 的蛋白质产量增加了 10 倍以上^[26]。此外, 许多终止子在两者串联使用时表现出协同效应, 与单独使用相比, 蛋白质产量增加了 1 倍以上, 例如, CaMV35S 终止子与 NOS 终止子结合、EU 与 NbACT3 终止子结合、HSP 终止子与烟草延伸结合使用终结子^[27–28]。

2 重组蛋白的细胞内定位

重组蛋白在细胞中的定位是影响其产量和质量的关键因素之一。每个细胞器都有自己的代谢特征、蛋白酶活性水平以及酶促、物理和化学环境。此外, 重组蛋白的性质通常需要对其功能活性所必需的某些修饰。蛋白质在不同的细胞区室中经历各种修饰; 因此, 蛋白质可

能需要被引导到细胞的某些部位才能正确加工。另一个需要考虑的因素是重组蛋白对宿主细胞的潜在毒性。影响重组蛋白的细胞内定位并改变它, 可以减少或消除其毒性作用。一些重组药物蛋白 (如候选疫苗、抗菌肽和抗体片段) 在靶向质外体、内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 或叶绿体时通常具有更高的产量。

2.1 质外体

一般而言, 蛋白质保留在胞质溶胶中, 即使在高 mRNA 水平下, 它通常也会以非常低的量积累 (小于总可溶性蛋白质 (total soluble protein, TSP) 的 0.1%)。这个需要在重组蛋白的 N 端加上信号肽以引导蛋白质进入内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 腔, 蛋白质折叠包装后运输到高尔基体、其他细胞器以进行进一步修饰 (例如 N-糖基化) 和最终将蛋白质释放到质外体。质外体是指植物细胞原生质体外围, 由细胞壁、胞间隙和导管组成的系统。在烟草 BY-2 细胞培养、毛根培养和水稻细胞培养等植物细胞培养平台若将重组蛋白靶向质外体, 可将其直接分泌到培养基中并获得相对高产量, 而且便于下游纯化过程。现在已发现很多种类的信号肽, 例如, 来自本氏烟草的 SS^{Pr1} 和 NbSS^{Ext}、普通烟草的 NtSS^{Ext}、水稻的 Ramy3sp 和 33KDsp、大豆的 SS^{VspA}、玉米的 ZmCKX1sp、蚕豆的 LeB4sp、紫花苜蓿的 PDIsp 等。Jiang 等通过比较几种常见的信号肽发现其对成熟干扰素 γ (mIFN γ) 的产量有着显著的影响, 其中天然伸长蛋白分泌信号 NbSS^{Ext} 在本氏烟草中在产量和分泌方面是最有效的一种, 与水稻 Ramy 信号肽相比其产量可达 28 倍差异^[29]。

2.2 内质网

内质网是细胞所有蛋白质大约三分之一的成熟部位, 也是最常见的重组蛋白定位场所之一。内质网富含分子伴侣确保正确折叠; 内质网

的氧化/还原环境有利于二硫键的形成^[30]；在内质网中，蛋白酶活性相对较低，并且在那里进行保守类型的糖基化^[31-32]。这对一些重组蛋白（如单克隆抗体、抗体片段、糖蛋白）显得尤为重要。

人类和植物的糖蛋白质涉及新生蛋白质通过内质网，部分糖基化的蛋白质进入高尔基体。一般认为人类和植物糖蛋白修饰在内质网是相同的高甘露糖型 *N*-聚糖，但在高尔基体的修饰则不同：植物糖蛋白被哺乳动物中不存在的 β -1,2-木糖和核心 α -1,3-岩藻糖残基修饰，而哺乳动物蛋白质被植物中不存在的 β -1,4-半乳糖和唾液酸残基修饰^[33-34]。这就会有潜在的免疫原性问题。近年来已经进行了广泛的研究工作来调节植物特异性糖基化机制以使糖基化人源化。这 4 种方法包括在 ER 中保留重组蛋白以产生通用的高甘露糖聚糖、敲除植物特异性糖残基的酶、将参与糖基化途径的酶抑制剂（例如 kifunesine）直接添加到培养基中或者将编码 β -1,4-半乳糖基转移酶或聚唾液酸转移酶^[33]的外源基因引入植物基因组以产生类似人类的聚糖。

最常见的是前两种方法。第一种做法是在 N 端添加信号肽和 C 端添加 ER 保留信号 HDEL/(SE)KDEL 来靶向保留在 ER 中的重组蛋白，从而最大限度地减少植物特异性 *N*-聚糖。2016 年有文献报道了使用转录激活样效应因子核酸酶（transcription activator-like effector nuclease, TALEN）技术敲除本氏烟草中的 2 个 *XylT* 和 2 个 *FucT* 基因，这消除了 *XylT* 活性，但没有消除 *FucT* 活性^[35]。近年，Jansing 等^[36]在本氏烟草中使用 CRISPR/Cas9 同时敲除 2 个 *XylT* 和 4 个 *FucT* 基因。六重敲除植物缺乏 *XylT* 和 *FucT* 活性，并产生了重组单克隆抗体 2G12。结果表明基因编辑 FX-KO 系和 CHO 细胞中产生的单克隆抗体 2G1 与 CD64 结合亲和力相当。最近，有文献报告了水稻中采用 CRISPR/Cas9 同时敲

除了 *OsXylT* 和 *OsFucT* 基因^[37]。虽然在该品系中未检测到 α -1,3-岩藻糖和 β -1,2-木糖残基，但检测到了 α -1,4-岩藻糖和 β -1,3-半乳糖植物特异性残基。*OsXylT* 和 *OsFucT* 的双重敲除可能不足以使水稻中的 *N*-聚糖结构人源化。这表明参与复杂 *N*-聚糖生物合成过程的每种酶可能在水稻中独立发挥作用。

糖工程的研究促进了植物衍生糖蛋白 *N*-糖基化的定制。然而，除单克隆抗体外，在重组糖蛋白中很难实现类人的 β -1,4-半乳糖基化。尽管为优化 β -1,4-半乳糖基转移酶的表达进行了很多研究，但许多植物来源的糖蛋白仍然表现出不完全加工的具有异质末端半乳糖基化的 *N*-聚糖。来自糖基水解酶家族 GH35 的 β -半乳糖苷酶（ β -galactosidase, BGAL）很有可能参与修剪末端半乳糖残基。近期研究表明 NbBGAL1 可以去除 N-和 O 上的 β -1,4-和 β -1,3-半乳糖残基-聚糖。通过 RNA 干扰（RNAi）和基因组编辑敲除 *BGAL1* 显著降低了本氏烟草中的 β -半乳糖苷酶活性，并增加了植物产生的糖蛋白上完全半乳糖基化的复合 *N*-聚糖的产量^[38]。

在谷类作物胚乳细胞中有两个主要的细胞器负责蛋白质储存：(1) ER 衍生的蛋白质体（protein body, PB），主要用于醇溶蛋白的积累；(2) 含有后高尔基体蛋白质储存液泡（protein storage vacuoles, PSV），主要用于球蛋白和谷蛋白的积累。谷物胚乳组织中这些特定的蛋白质储存细胞器为重组蛋白的稳定积累和长期储存提供了孤立的微环境。迄今为止，已经在稳定的转基因谷类植物（主要是水稻、大麦和玉米）的种子中产生了高产量和生物活性的药用蛋白质。Holásková 等在大麦胚乳中产生人源抗菌肽 LL-37 的产量可达 550 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[24]。

2.3 液泡

2012 年，Protalix Biotherapeutics 公司纯化

的重组人 β -葡萄糖脑苷脂酶(商品名: Ellyso)成为美国食品和药品管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的第一个用于戈谢病酶替代治疗的植物药物。这种重组蛋白正是利用烟草几丁质酶A的储存液泡靶向信号DLLVDTM在胡萝卜细胞培养中产生的。 β -葡萄糖脑苷脂酶需要某些转录后修饰以产生末端甘露糖残基,而胡萝卜细胞满足了这一要求,其产生的酶具有与哺乳动物细胞中产生的酶等效。一种小麦来源的液泡靶向序列6-SFT(蔗糖:果聚糖6-果糖基转移酶)用于3种蛋白质(GFP、GUS和抑肽酶)靶向甘蔗茎薄壁组织的液泡,从而从甘蔗汁中获得高产量的重组蛋白^[39]。

2.4 叶绿体

烟草叶绿体提供了一种替代核转化的稳定表达系统,该系统已被证明可以积累大量的重组蛋白,这是第一个优势;第二个优势是转基因遏制。在植物中,后代的叶绿体和线粒体等细胞器仅起源于母体,即母体遗传。因此,在叶绿体以及其他质体中表达的基因不能通过花粉传播;第三,叶绿体转化没有表观遗传或沉默效应,不存在转基因沉默或不表达;第四,细菌样多顺反子转录单位和翻译机制允许多个转基因在单个操纵子中表达^[40]。

其实,在叶绿体中表达重组蛋白的历史也比较悠久^[41]。每个植物叶肉细胞含有40–100多个叶绿体,每个叶绿体含有至少15个叶绿体基因组。因此,每个叶细胞都有叶绿体基因组的拷贝,数量从数千到数万不等^[42–43],这使得叶绿体转化与传统的核转化相比具有极大的优势——转质体细胞中转基因的高拷贝数会引起重组蛋白的高表达。

通过叶绿体转运肽的N端融合,重组蛋白通常靶向叶绿体进行积累。这种策略通常对蛋

白积累产生显著的积极影响,因此已被广泛使用,特别是用于人类和动物的植物性疫苗的开发。人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)导致了超过99%的宫颈癌病例,这是最常见的癌症之一,极大地威胁着全世界女性的健康。Zahin等^[44]使用MagnICON表达系统从烟草植物中成功表达和纯化HPV16 L1病毒样颗粒(virus-like particles, VLP)。L1蛋白被设计为在叶绿体中积累,这产生了主要是35–55 nm VLP的组装,具有目前已知的最大蛋白质表达水平(>2.5%的TSP)。HPV E7蛋白是恶性肿瘤发生和维持的必需癌蛋白之一,因此是理想的治疗性疫苗靶点。重组HPV-16 E7癌蛋白与美洲鲑抗脂多糖因子片段(LALF 32-51)在瞬时表达的本氏烟草叶中产生,作为具有保护和治疗特性的候选疫苗。LALF 32-51-E7在本氏烟草中瞬时表达,与定位在细胞质中相比,它在靶向叶绿体时积累得更高。与未靶向细胞室的蛋白质相比,当靶向叶绿体时,LALF 32-51-E7的积累水平提高了27倍^[45]。

叶绿体转化产生重组蛋白因其高产量极其吸引人,但其存在的缺点限制了广泛应用。首先,叶绿体转化与常规的核基因组转化不同,叶绿体转化通常通过序列特异性同源重组整合到叶绿体基因组的精确基因间区域(在*rbcL*和*accD*基因之间)^[46],这就意味着充分认识到植物物种之间叶绿体基因间和调控序列的高度差异,必须针对每个物种专门构建叶绿体转化载体。只有那些充分掌握的叶绿体基因组的植物物种才可成为转化对象。其次,叶绿体的细菌样翻译机制利用了一组最小的tRNA,这可能对一些外来转基因造成翻译限制。最后,叶绿体表达的蛋白质保留在细胞器内,无法完成某些重组蛋白的糖基化,这是包括单克隆抗体在内的许多药物糖蛋白所必需的修饰。对于不需要

糖基化的蛋白质，叶绿体表达系统是最大化蛋白质产量、稳定性和积累的理想选择^[47]。

不同亚细胞位置的微环境往往具有不同的转录后修饰、pH 和蛋白水解活性，这可能对重组蛋白的稳定性和生物活性产生有利或不利的影 响，其特点见表 2。这就需要根据表达的每种蛋白质（除糖蛋白、单克隆抗体以外）的特性，可在多个位置（细胞质、叶绿体、ER、液泡和质外体等）进行尝试以寻求重组蛋白的稳定和高效积累的最佳位点。Margolin 等总结了一系列疾病（包括流感、艾滋病毒和埃博拉病毒等）的病毒糖蛋白候选疫苗在植物中表达的例子^[5]。

3 蛋白质伴侣/载体/肽标签的融合

重组蛋白在植物细胞中糖基化不足或异常折叠会导致可溶性蛋白产量低甚至没有。目前做法是将各种肽标签和蛋白质伴侣或伴侣与靶蛋白融合以提高它们的表达和溶解度，并有助于下游纯化^[48]。谷胱甘肽-S-转移酶（glutathione-S-transferase, GST）、麦芽糖结合蛋白（maltose binding protein, MBP）、硫氧还蛋白（thioredoxins, TRX）和小泛素相关修饰剂（small ubiquitin-

related modifier, SUMO）是广泛用于提高重组蛋白溶解度和表达的促溶标签。此外，GST 和 MBP 还可作为纯化标签单独使用或与其他亲和和标签组合使用，例如 c-myc、Flag、6xHis、HA 和 StrepII。近些年发现了更多的蛋白质伙伴。Zera[®]是来自玉米 γ -玉米醇溶蛋白的 N 末端富含脯氨酸区域，主要包含 PPPVHL 六肽单元的 8 个重复序列，已被证明可有效稳定多种药物蛋白，例如降钙素、表皮生长因子、人类生长激素和 HPV E7 蛋白等。弹性蛋白样多肽（elastin-like polypeptide, ELP）是五肽序列 VPGXG 的重复序列，其中 X 代表除脯氨酸以外的任何氨基酸，重复次数范围为 5 至 160。已证明 ELP 融合可显著增强瞬时和稳定转化许多异源重组蛋白的积累。有研究表明，抗菌肽（antimicrobial peptides, AMP）/ELP 融合肽具有抗菌活性，这比从大肠杆菌系统中表达的许多 AMP 大一个数量级^[49]。疏水蛋白 I（hydrophobin I, HFBI）是一种来自丝状真菌里氏木霉的疏水蛋白，在瞬时表达的本氏烟草叶片中形成蛋白体来增强融合蛋白的 ER 积累。HFBI 的两亲特性还可以通过基于表面活性剂的水性两相系统进行有效的蛋白质纯化。这 3 种蛋白质融合伙

表 2 不同亚细胞位置产生重组蛋白的特点

Table 2 Characteristics of recombinant proteins produced at different subcellular locations

Subcellular location	Protease activity	Glycosylation	Signal peptide
Apoplast	Very low	Secretory pathway-dependent	<i>Nicotiana benthamiana</i> SS ^{Pr1} , NbSS ^{Ext} Common tobacco NtSS ^{Ext} Rice Ramy3sp, 33KDsp Soy bean SS ^{VspA} Maize ZmCKX1sp Broad Bean LeB4sp <i>Medicago sativa</i> PDIsp
Endoplasmic reticulum	Low	Yes	HDEL/(SE)KDEL
Vacuole	High	Yes	Tobacco Dllvdtm Wheat 6-Sft
Chloroplast	Low	No	Chloroplast transit peptide (CTP)

伴 (即 Zera[®]、ELP 和 HFBI) 促进了 ER 靶向重组蛋白的大量积累并诱导 ER 衍生的蛋白体的形成, 从而重组蛋白被稳定地隔离和保护。此外, ELP 和 HFBI 独特的物理化学特性使之成为优良的融合标签, 不仅可以增强重组蛋白的表达, 还有助于快速轻松地进行下游纯化。常见融合和亲和标签的优缺点见表 3。

羟脯氨酸-*O*-糖基化肽 (HypGP) 标签的融合已被证明可显著提高重组蛋白的产量^[50-51]。重组蛋白在植物细胞中的表达与从头设计的 HypGP 标签融合, 称为 HypGP 工程技术, 该技术使得分泌蛋白产量显著增加。这是由于 HypGP 标签作为分子载体在促进结合蛋白有效运输到培养基中并保护蛋白质免受蛋白水解降

表 3 常见融合和亲和标签优缺点比较

Table 3 Comparison of advantages and disadvantages of common fusion and affinity tags

Tag type	Tags name	Advantage	Disadvantage
Fusion tags	GST	Reduce protein degradation; Improve the stability of recombinant protein; Reduce protein degradation; Is also affinity tag	Weak ability to promote solubility; Form dimers
	MBP	High solubilization efficiency; Increase protein expression and folding; Is also affinity tag	Poor protein purification
	TRX	High solubility-promoting ability; Good thermal stability	Affinity tag is required
	SUMO	High solubility-promoting ability; Increase protein expression; Easy tag removal	Affinity tag is required
	Zera [®]	Improve the stability of recombinant protein; reduce protein degradation	Affinity tag is required
	Elastin-like polypeptide (ELP)	Significantly enhance the expression and stability of recombinant proteins; Reduce protein degradation; Is also affinity tag	Intein cleavage efficiency decreases as protein molecular weight decreases
	HFBI	Enhance protein accumulation; Reduce protein degradation; Is also affinity tag	Weak solubilizing ability
Affinity tags	c-myc	Easy to detect	High cost of purification
	FLAG	Easy to remove; There are corresponding commercial antibodies	High cost of affinity fillers
	HA	Easy to detect	High cost of purification
	His-tag	Low cost of filler; Widely used; There are corresponding commercial antibodies; Small label size	Low specificity; Poor protein purification
	StrepII	High specificity	The purification cost is slightly higher

解的功能。HypGP 由 20 个串联重复的“Ser-Pro”基序或 (SP)₂₀ 组成,在烟草 BY-2 细胞中的 SCF 的 N 端或 C 端进行了工程改造。(SP)₂₀ 标签将 SCF 的分泌产量显著提高至 2.5 μg/mL^[21]。

可结晶片段 (crystallizable fragment, Fc) 结构域融合方法已在植物表达系统中得到应用,并取得了可喜的成果。它已被用于生产多种生物活性疫苗,包括源自登革热糖蛋白 E 的共有域 III 的登革热候选疫苗^[52]和治疗性蛋白,例如人促红细胞生成素、人骨桥蛋白和人血管紧张素转换酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2)^[53-56]。有研究在本氏烟草中瞬时产生了与人 IgG1 的 Fc 区融合的人 ACE2 重组蛋白,在体外评估了中和功效。在浸润后第 6 天,重组 ACE2-Fc 融合蛋白在本氏烟草中以 100 μg/g 叶鲜重表达。重组融合蛋白显示出与严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 的受体结合域的有效结合。重要的是,植物产生的融合蛋白在体外表现出有效的抗 SARS-CoV-2 活性^[57]。

4 尽量减少分泌途径的蛋白降解

尽管使用植物细胞生产重组蛋白的各种优化策略和平台,蛋白降解仍然是导致低产量的一大障碍。蛋白的降解主要原因是:(1) 植物细胞含有大量的内源性蛋白酶^[58-59],需要指出并非所有蛋白酶都参与了蛋白的水解。蛋白酶存在于细胞内和细胞外,这就造成了外源重组蛋白表达严酷的环境;(2) 缺乏重组蛋白天然的伴侣蛋白和折叠酶。

直接抑制蛋白酶活性是保护靶蛋白的最经济和有效的策略。现在一般采用以下方法。

(1) 蛋白酶抑制剂的使用例如 SICYS8、NbPot1、NbPR4 和 HsTIMP。番茄半胱氨酸蛋白酶抑制剂 SICYS8 用于提高在本氏烟草中瞬时表达的完全组装且具有生物活性的 IgG 抗体

片段的产量^[60]。基于活性的蛋白质分析表明 SICYS8 表达特异性抑制仅限木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶活性。来自本氏烟草的 NbPR4、NbPot1 和人类 HsTIMP 显著增加了本氏烟草中 α-半乳糖苷酶、促红细胞生成素和广泛中和 HIV 抗体 VRC01 的积累。有趣的是,尽管针对不相关类别的蛋白酶,当所有 3 种蛋白酶抑制剂共表达时,没有观察到协同效应。研究结果表明在测试条件下蛋白质产量提高了 27 倍^[60]。

(2) 调节分泌途径的 pH 值。分泌途径的蛋白水解活性依赖于 pH 值,通过 Matrix-2 质子通道蛋白的表达调节 pH 可减轻蛋白水解降解。植物中流感病毒 M2 质子通道蛋白的表达使高尔基体的局部 pH 值升高,据报道这可以改善酸不稳定蛋白的积累,包括某些流感病毒血凝素^[61]。

(3) 使用 RNAi、TALEN 或 CRISPR/Cas9 等技术敲除蛋白酶基因。早些年就有科研人员采用 RNAi 方法敲除了本氏烟草 BY-2 悬浮细胞中最丰富的天冬氨酸、半胱氨酸和金属蛋白酶,以获得产生更高水平抗体 2F5。尽管未见基因组编辑技术应用于蛋白酶基因,但随着多基因编辑技术的发展^[62-63],将这项技术应用于产生特定蛋白酶基因敲除,只是时间和兴趣问题。

外源重组糖蛋白在植物细胞中由于不正确地折叠从而导致降解引起产量降低。越来越多的文献证明了与外源蛋白来源相同的关键伴侣的共表达可改善其折叠并增加积累。在瞬时转化的本氏烟草和稳定的转基因烟草植物中,来自相同细菌分泌系统的 CesT 伴侣共表达显著增强了肠出血性大肠杆菌 3 型分泌系统效应蛋白 Tir 的积累^[64]。人类凝集素伴侣钙网蛋白 (calreticulin, CRT) 的共表达显著提高了可溶性 HIV-1 gp140 抗原的蛋白质产量,同时减轻了本氏烟草的 ER 应激反应^[65]。CNX、CRT、BIP、PDI 和 ERp57 等几种主要植物伴侣蛋白和折叠

酶的蛋白质序列与其人类同源物的相似性较低,表明可能存在外源蛋白质的植物内源折叠机制不相容或不足。因此有理由推测,与靶向重组蛋白来自同一物种来源的特定天然伴侣蛋白和折叠酶的鉴定和共表达可能会对基于植物的生物制药生产产生积极影响。

5 抑制转录基因沉默 (TGS) 和转录后基因沉默 (PTGS)

重组蛋白在植物体内低或不表达的另一个可能原因是异源基因的转录基因沉默 (transcriptional gene silencing, TGS) 或转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)^[66]。这是植物具有复杂的自然防御系统来防止病原体入侵和去除外来 (病原体) 遗传物质的特性。TGS 可能是因为异源基因的启动子甲基化造成的,而 PTGS 导致其 RNA 转录物的降解,从而极大地影响重组蛋白的产量。目前,已从各种植物病毒中鉴定出 70 多种沉默抑制蛋白,其中大多数通过与 siRNA、dsRNA 的相互作用阻碍 RNA 诱导的沉默复合物的形成。最广泛使用的病毒沉默抑制因子之一可能是番茄丛矮病毒 P19 蛋白。通过用 P19 替换竹花叶病毒载体上的运动蛋白,共表达沉默抑制蛋白导致人干扰素 γ 积累增加 40%^[67]。

另一种提高重组蛋白生产水平的有效策略是通过完全或部分抑制宿主植物中的 RNAi 途径。早在 2004 年首次报道了使用具有抑制 PTGS 的拟南芥 *RDR6* (*sgs2* 和 *sgs3*) 突变体作为实现转基因高水平表达。近些年通过传统的 RNAi^[68] 和 CRISPR/Cas9 基因编辑^[69] 实现了 *DCL2* 和 *DCL4* 基因同时敲低。瞬时基因表达测定表明,与 $\Delta D2$ 、 $\Delta D4$ 和野生型植物相比, $\Delta D2\Delta D4$ 植物积累了更大量的 GFP 和人酸性成

纤维细胞生长因子。在 5 d 处理之后, $\Delta D2$ 、 $\Delta D4$ 和野生型植物含有几乎等量的 GFP mRNA 积累,而 $\Delta D2\Delta D4$ 植物含有几乎是野生型植物的 2 倍^[68]。使用 CRISPR/Cas9 方法完全敲除本氏烟草中的 *RDR6* 基因功能 ($\Delta RDR6$), $\Delta RDR6$ 植物中的 GFP 表达比 WT 植物中的高 2.5 倍^[70]。此外,应用 CRISPR/Cas9 技术敲除了本氏烟草 *AGO2* 基因导致病毒衍生的重组 GFP 的积累增加^[71]。使用锌指核酸酶 (zinc-finger nuclease, ZFN)、TALEN 和 CRISPR/Cas9 技术成功地敲除了大豆的 *Dicer-like3* (*Gmdcl1*)、*Gmdcl4*、*GmDrb2* 和 蒺藜苜蓿 (*Hua enhancer1*, *MtHen1*),这些突变体可作为重组蛋白生产的优秀宿主^[72]。

6 总结与展望

2012 年 5 月, FDA 批准了 ELELYSO[®] (塔利昔酶 α) 人类重组葡萄糖脑苷脂酶,这是一种由 Protalix BioTherapeutics 及其合作伙伴辉瑞公司在基因工程胡萝卜细胞中生产的用于治疗 I 型戈谢病 (Gaucher disease) 的酶。2019 年一种基于植物的流感病毒疫苗已完成了 3 期临床试验并取得良好效果^[73]。在新型冠状病毒大流行期间,植物分子农业可提供快速且可扩展的蛋白质抗原 (作为候选疫苗)、抗体和其他治疗性蛋白质的供应^[74]。2021 年 3 月针对全球肆虐的 SARS-Cov-2 的佐剂植物疫苗 (CoVLP) 的 3 期临床试验 (NCT04636697) 已开始^[75-76]。据统计 2018 年全球治疗性蛋白市场价值约 931.4 亿美元,预计 2022 年将增长至 1 728.7 亿美元,年增长率为 16.7%。迄今为止,已有 130 多种重组药物获 FDA 批准用于临床,其中 200 多种在全球上市,还有更多处于临床开发阶段^[77-78]。提高植物性药物蛋白的产量和质量方面也取得了

一些进步。目前植物细胞培养系统其重组蛋白的产量——通常在 0.01–10.00 mg/L 之间，低于传统平台的产量。可以说，分子农业是一条光明而崎岖的道路。

重组蛋白产量是制约分子农业发展的瓶颈因素之一。要获得理想的重组蛋白产量需考虑以下 3 个方面。首先，表达重组蛋白首先考虑该蛋白是否需要糖基化修饰，若需要则确定细胞内内质网为表达场所；若不需要则细胞内表达场所选择面更宽一些，可在多个细胞器内(质外体、液泡和叶绿体)表达尝试；其次，考虑载体的构造。载体上含有复杂的表达调控结构，例如，启动子、终止子、非翻译区域、基因沉默抑制子、融合/亲和标签和重组蛋白密码子等，这些都是可以优化的；最后，考虑重组蛋白表达的植物对象。正如上文提及一些特殊的植物材料，例如敲除了 β -1,2-木糖和核心 α -1,3-岩藻糖、蛋白酶、DCL2 和 DCL4 的材料是提高蛋白产量的优良对象。未来需要对蛋白的水解、蛋白伴侣、TGS 和 PTGS 等方面进行基础研究。可以预见基础研究的突破将有力地提高蛋白产量。

REFERENCES

- [1] Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 1989, 342(6245): 76-78.
- [2] Santoni M, Gecchele E, Zampieri R, et al. Plant-based systems for vaccine production. *Methods Mol Biol*, 2022, 2412: 95-115.
- [3] Moustafa K, Makhzoum A, Trémouillaux-Guiller J. Molecular farming on rescue of pharma industry for next generations. *Crit Rev Biotechnol*, 2016, 36(5): 840-850.
- [4] Buyel JF, Twyman RM, Fischer R. Very-large-scale production of antibodies in plants: the biologization of manufacturing. *Biotechnol Adv*, 2017, 35(4): 458-465.
- [5] Margolin E, Chapman R, Williamson AL, et al. Production of complex viral glycoproteins in plants as vaccine immunogens. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16(9): 1531-1545.
- [6] Schillberg S, Raven N, Spiegel H, et al. Critical analysis of the commercial potential of plants for the production of recombinant proteins. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 720.
- [7] Schillberg S, Finern R. Plant molecular farming for the production of valuable proteins-critical evaluation of achievements and future challenges. *J Plant Physiol*, 2021, 258/259: 153359.
- [8] Alqazlan N, Diao H, Jevnikar AM, et al. Production of functional human interleukin 37 using plants. *Plant Cell Rep*, 2019, 38(3): 391-401.
- [9] Nessa MU, Rahman MA, Kabir Y. Plant-produced monoclonal antibody as immunotherapy for cancer. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 3038564.
- [10] Chen Q. Development of plant-made monoclonal antibodies against viral infections. *Curr Opin Virol*, 2022, 52: 148-160.
- [11] Satheeshkumar PK. Expression of single chain variable fragment (scFv) molecules in plants: a comprehensive update. *Mol Biotechnol*, 2020, 62(3): 151-167.
- [12] Marsian J, Lomonosoff GP. Molecular pharming-VLPs made in plants. *Curr Opin Biotechnol*, 2016, 37: 201-206.
- [13] Lucero MS, Richetta M, Chimeno Zoth S, et al. Plant-based vaccine candidate against infectious bursal disease: an alternative to inactivated vaccines for breeder hens. *Vaccine*, 2019, 37(36): 5203-5210.
- [14] Phan HT, Pham VT, Ho TT, et al. Immunization with plant-derived multimeric H5 hemagglutinins protect chicken against highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *Vaccines*, 2020, 8(4): 593.
- [15] Zhou ZP, Dang YK, Zhou M, et al. Codon usage is an important determinant of gene expression levels largely through its effects on transcription. *PNAS*, 2016, 113(41): E6117-E6125.
- [16] Webster GR, Teh AYH, Ma JKC. Synthetic gene design-the rationale for codon optimization and implications for molecular pharming in plants. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(3): 492-502.
- [17] Şen A, Kargar K, Akgün E, et al. Codon optimization: a mathematical programming approach. *Bioinformatics*, 2020, 36(13): 4012-4020.
- [18] Taneda A, Asai K. COSMO: a dynamic programming algorithm for multicriteria codon optimization. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020, 18: 1811-1818.
- [19] Fu HG, Liang YB, Zhong XQ, et al. Codon

- optimization with deep learning to enhance protein expression. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 17617.
- [20] Mauro VP. Codon optimization in the production of recombinant biotherapeutics: potential risks and considerations. *BioDrugs*, 2018, 32(1): 69-81.
- [21] Wang XT, Karki U, Abeygunaratne H, et al. Plant cell-secreted stem cell factor stimulates expansion and differentiation of hematopoietic stem cells. *Process Biochem*, 2021, 100: 39-48.
- [22] Buyel JF, Stöger E, Bortesi L. Targeted genome editing of plants and plant cells for biomanufacturing. *Transgenic Res*, 2021, 30(4): 401-426.
- [23] Mayr C. Regulation by 3'-untranslated regions. *Annu Rev Genet*, 2017, 51: 171-194.
- [24] Holásková E, Galuszka P, Mičúchová A, et al. Molecular farming in barley: development of a novel production platform to produce human antimicrobial peptide LL-37. *Biotechnol J*, 2018, 13(6): e1700628.
- [25] Rosenthal SH, Diamos AG, Mason HS. An intronless form of the tobacco extensin gene terminator strongly enhances transient gene expression in plant leaves. *Plant Mol Biol*, 2018, 96(4/5): 429-443.
- [26] Diamos AG, Rosenthal SH, Mason HS. 5' and 3' untranslated regions strongly enhance performance of geminiviral replicons in *Nicotiana benthamiana* leaves. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 200.
- [27] Diamos AG, Mason HS. Chimeric 3' flanking regions strongly enhance gene expression in plants. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16(12): 1971-1982.
- [28] Yamamoto T, Hoshikawa K, Ezura K, et al. Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4755.
- [29] Jiang MC, Hu CC, Hsu WL, et al. Fusion of a novel native signal peptide enhanced the secretion and solubility of bioactive human interferon gamma glycoproteins in *Nicotiana benthamiana* using the bamboo mosaic virus-based expression system. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 594758.
- [30] Strasser R. Protein quality control in the endoplasmic reticulum of plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2018, 69: 147-172.
- [31] Montero-Morales L, Steinkellner H. Advanced plant-based glycan engineering. *Front Bioeng Biotechnol*, 2018, 6: 81.
- [32] Margolin E, Crispin M, Meyers A, et al. A roadmap for the molecular farming of viral glycoprotein vaccines: engineering glycosylation and glycosylation-directed folding. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 609207.
- [33] Kallolimath S, Castilho A, Strasser R, et al. Engineering of complex protein sialylation in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(34): 9498-9503.
- [34] Strasser R. Plant protein glycosylation. *Glycobiology*, 2016, 26(9): 926-939.
- [35] Li J, Stoddard TJ, Demorest ZL, et al. Multiplexed, targeted gene editing in *Nicotiana benthamiana* for glyco-engineering and monoclonal antibody production. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(2): 533-542.
- [36] Jansing J, Sack M, Augustine SM, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking β -1,2-xylose and core α -1,3-fucose. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17(2): 350-361.
- [37] Jung JW, Shin JH, Lee WK, et al. Inactivation of the β (1,2)-xylosyltransferase and the α (1,3)-fucosyltransferase gene in rice (*Oryza sativa*) by multiplex CRISPR/Cas9 strategy. *Plant Cell Rep*, 2021, 40(6): 1025-1035.
- [38] Kriechbaum R, Ziaee E, Grünwald-Gruber C, et al. BGAL1 depletion boosts the level of β -galactosylation of N- and O-glycans in *N. benthamiana*. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18(7): 1537-1549.
- [39] Palaniswamy H, Syamaladevi DP, Mohan C, et al. Vacuolar targeting of r-proteins in sugarcane leads to higher levels of purifiable commercially equivalent recombinant proteins in cane juice. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(2): 791-807.
- [40] Zoschke R, Bock R. Chloroplast translation: structural and functional organization, operational control, and regulation. *Plant Cell*, 2018, 30(4): 745-770.
- [41] Daniell H, Jin SX, Zhu XG, et al. Green giant-a tiny chloroplast genome with mighty power to produce high-value proteins: history and phylogeny. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19(3): 430-447.
- [42] Morley SA, Nielsen BL. Chloroplast DNA copy number changes during plant development in organelle DNA polymerase mutants. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 57.
- [43] Sakamoto W, Takami T. Chloroplast DNA dynamics: copy number, quality control and degradation. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59(6): 1120-1127.
- [44] Zahin M, Joh J, Khanal S, et al. Scalable production of HPV16 L1 protein and VLPs from tobacco leaves. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160995.
- [45] Yanez RJR, Lamprecht R, Granadillo M, et al. LALF 32-51-E7, a HPV-16 therapeutic vaccine candidate, forms protein body-like structures when expressed in

- Nicotiana benthamiana* leaves. Plant Biotechnol J, 2018, 16(2): 628-637.
- [46] Daniell H, Lin CS, Yu M, et al. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. Genome Biol, 2016, 17(1): 134.
- [47] Daniell H, Kulis M, Herzog RW. Plant cell-made protein antigens for induction of oral tolerance. Biotechnol Adv, 2019, 37(7): 107413.
- [48] Ki MR, Pack SP. Fusion tags to enhance heterologous protein expression. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(6): 2411-2425.
- [49] Ghidry M, Islam S, Pruetz G, et al. Making plants into cost-effective bioreactors for highly active antimicrobial peptides. N Biotechnol, 2020, 56: 63-70.
- [50] Zhang NN, Wright T, Wang XT, et al. Engineering 'designer' glycomodules for boosting recombinant protein secretion in tobacco hairy root culture and studying hydroxyproline-O-glycosylation process in plants. Plant Biotechnol J, 2019, 17(6): 1130-1141.
- [51] Zhang NN, Dolan M, Wu D, et al. Dramatic secretion of recombinant protein expressed in tobacco cells with a designer glycopeptide tag is highly impacted by medium composition. Plant Cell Rep, 2016, 35(12): 2513-2522.
- [52] Kim MY, Copland A, Nayak K, et al. Plant-expressed Fc-fusion protein tetravalent dengue vaccine with inherent adjuvant properties. Plant Biotechnol J, 2018, 16(7): 1283-1294.
- [53] Lei CH, Qian KW, Li T, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus by recombinant ACE2-Ig. Nat Commun, 2020, 11(1): 2070.
- [54] Chan KK, Dorosky D, Sharma P, et al. Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2. Science, 2020, 369(6508): 1261-1265.
- [55] Monteil V, Kwon H, Prado P, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2. Cell, 2020, 181(4): 905-913.e7.
- [56] Wysocki J, Ye MH, Hassler L, et al. A novel soluble ACE2 variant with prolonged duration of action neutralizes SARS-CoV-2 infection in human kidney organoids. J Am Soc Nephrol, 2021, 32(4): 795-803.
- [57] Siri wattananon K, Manopwisedjaroen S, Kanjanasirirat P, et al. Development of plant-produced recombinant ACE2-fc fusion protein as a potential therapeutic agent against SARS-CoV-2. Front Plant Sci, 2021, 11: 604663.
- [58] Jutras PV, Dodds I, Van Der Hoorn RA. Proteases of *Nicotiana benthamiana*: an emerging battle for molecular farming. Curr Opin Biotechnol, 2020, 61: 60-65.
- [59] Mandal MK, Ahvari H, Schillberg S, et al. Tackling unwanted proteolysis in plant production hosts used for molecular farming. Front Plant Sci, 2016, 7: 267.
- [60] Grosse-Holz F, Madeira L, Zahid MA, et al. Three unrelated protease inhibitors enhance accumulation of pharmaceutical recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana*. Plant Biotechnol J, 2018, 16(10): 1797-1810.
- [61] Jutras PV, Goulet MC, Lavoie PO, et al. Recombinant protein susceptibility to proteolysis in the plant cell secretory pathway is pH-dependent. Plant Biotechnol J, 2018, 16(11): 1928-1938.
- [62] Armario Najera V, Twyman RM, Christou P, et al. Applications of multiplex genome editing in higher plants. Curr Opin Biotechnol, 2019, 59: 93-102.
- [63] Čermák T, Curtin SJ, Gil-Humanes J, et al. A multipurpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants. Plant Cell, 2017, 29(6): 1196-1217.
- [64] MacDonald J, Miletic S, Gaidry T, et al. Co-expression with the type 3 secretion chaperone CesT from enterohemorrhagic *E. coli* increases accumulation of recombinant tir in plant chloroplasts. Front Plant Sci, 2017, 8: 283.
- [65] Margolin E, Oh YJ, Verbeek M, et al. Co-expression of human calreticulin significantly improves the production of HIV gp140 and other viral glycoproteins in plants. Plant Biotechnol J, 2020, 18(10): 2109-2117.
- [66] El-Sappah AH, Yan K, Huang QL, et al. Comprehensive mechanism of gene silencing and its role in plant growth and development. Front Plant Sci, 2021, 12: 705249.
- [67] Jiang MC, Hu CC, Lin NS, et al. Production of human IFN γ protein in *Nicotiana benthamiana* plant through an enhanced expression system based on bamboo mosaic virus. Viruses, 2019, 11(6): 509.
- [68] Matsuo K, Matsumura T. Repression of the *DCL2* and *DCL4* genes in *Nicotiana benthamiana* plants for the transient expression of recombinant proteins. J Biosci Bioeng, 2017, 124(2): 215-220.
- [69] Matsuo K. CRISPR/Cas9-mediated knockout of the *DCL2* and *DCL4* genes in *Nicotiana benthamiana* and its productivity of recombinant proteins. Plant Cell Rep, 2022, 41(2): 307-317.
- [70] Matsuo K, Atsumi G. CRISPR/Cas9-mediated

- knockout of the *RDR6* gene in *Nicotiana benthamiana* for efficient transient expression of recombinant proteins. *Planta*, 2019, 250(2): 463-473.
- [71] Ludman M, Burgyán J, Fátýol K. Crispr/Cas9 mediated inactivation of argonaute 2 reveals its differential involvement in antiviral responses. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1010.
- [72] Curtin SJ, Xiong Y, Michno JM, et al. CRISPR/Cas9 and TALENs gene rate heritable mutations for genes involved in small RNA processing of *Glycine max* and *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16(6): 1125-1137.
- [73] Ward BJ, Makarkov A, Séguin A, et al. Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18–64 years) and older adults (≥ 65 years): two multicentre, randomised phase 3 trials. *Lancet*, 2020, 396(10261): 1491-1503.
- [74] Lico C, Santi LC, Baschieri S, et al. Plant molecular farming as a strategy against COVID-19—the Italian perspective. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 609910.
- [75] Pillet S, Arunachalam PS, Andreani G, et al. Safety, immunogenicity, and protection provided by unadjuvanted and adjuvanted formulations of a recombinant plant-derived virus-like particle vaccine candidate for COVID-19 in nonhuman primates. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(2): 222-233.
- [76] Ward BJ, Gobeil P, Séguin A, et al. Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19. *Nat Med*, 2021, 27(6): 1071-1078.
- [77] Santos RB, Abranches R, Fischer R, et al. Putting the spotlight back on plant suspension cultures. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 297.
- [78] Pham PV. *Medical Biotechnology: Techniques and Applications*//BARH D, AZEVEDO V. *Omics Technologies and Bio-Engineering*. Washington: Academic Press, 2018: 449-469.

(本文责编 郝丽芳)