



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160288

莱茵衣藻作为绿色细胞工厂生产高附加值 重组蛋白的研究进展

樊振川^{1,2}, 吕玉洁¹, 刘雁霞¹, 王晶¹, 董彬¹, 孟德梅¹

(1. 教育部食品营养与安全重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457;

2. 天津科技大学新农村发展研究院, 天津 300457)

摘要: 重组蛋白广泛用于医疗、养殖、食品等领域. 利用单细胞绿藻——莱茵衣藻为绿色细胞工厂生产重组蛋白的研究在很长时间以来便引起了广泛的关注. 相对于传统细胞工厂, 这种光合真核微生物在生产高附加值蛋白方面具有众多潜在优势, 包括具备准确折叠和组装复杂蛋白的能力、规模化培养时间短、生物安全性高和生产成本低廉等. 目前, 利用莱茵衣藻叶绿体基因组和核基因组已成功表达了多种重组蛋白, 如蛋白亚基疫苗、单链抗体、蛋白细胞因子、蛋白(肽)类激素和工业养殖业用酶等, 初步证实了莱茵衣藻作为绿色细胞工厂方面的实用性. 本文阐释了莱茵衣藻作为绿色细胞工厂生产高附加值重组蛋白的优势和目前已取得成就的典型实例, 并对今后需要克服的困难进行了讨论.

关键词: 莱茵衣藻; 绿色细胞工厂; 重组蛋白

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2017)01-0001-12

Recent Progress in Developing *Chlamydomonas reinhardtii* as a Green Cell Factory for Producing High-value Recombinant Proteins

FAN Zhenchuan^{1,2}, LÜ Yujie¹, LIU Yanxia¹, WANG Jing¹, DONG Bin¹, MENG Demei¹

(1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Science and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Institute for New Rural Development, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Recombinant proteins are widely used in fields like medical treatment, cultivation and food industry. The unicellular green algae *C. reinhardtii* has since long time ago attracted great attention for its use as a green cell factory to produce recombinant proteins. Compared with traditional cell factories, this photosynthetic eukaryotic microbe has many advantages in the production of high-value recombinant proteins, due to its abilities of accurately folding and assembling complex proteins, short incubation time, high bio-safety level, low production costs and so on. At present, *C. reinhardtii* chloroplast genome and nuclear genome have been successfully used to express a variety of recombinant proteins, such as subunit protein vaccines, single chain antibodies, cytokines, hormones and cultivated enzymes for industrial use, etc. These achievements have greatly verified the usefulness of *C. reinhardtii* as a green cell factory. In this article, the potentials of *C. reinhardtii* as a green cell factory to produce high-value recombinant proteins are summarized, successful cases for its usefulness as a green cell factory are presented and the shortcomings as an efficient green cell factory is discussed.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*; green cell factory; recombinant protein

莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)隶属于绿藻门(*Chlorophyta*)团藻目(*Volvocales*)衣藻属

(*Chlamydomonas*), 是单细胞单核光合藻类, 细胞呈椭圆形或圆形, 直径为 7~10 μm. 在其染色体中, 存

收稿日期: 2016-08-19; 修回日期: 2016-12-11

基金项目: 国际遗传工程与生物技术中心(ICGEB)研究项目(CRP/CHN15-01)

作者简介: 樊振川(1974—), 男, 山西人, 教授, fanzhen@tust.edu.cn

在两种配对型,即正配子和负配子,由 mt^+ 和 mt^- 基因位点控制性状^[1-2]. 除可进行有性繁殖外,莱茵衣藻还可进行无性繁殖,从而使得其发酵培养过程与酵母等微生物一样简单. 由于兼具生态系统中的生产者和消费者双重身份,莱茵衣藻在光照并以 CO_2 为唯一碳源时进行光合自养;光照且碳源种类多样时进行光合自养和异养兼性生长;在黑暗状态且碳源是醋酸及其盐类时,生长方式则完全转变为异养.

1 莱茵衣藻作为绿色细胞工厂的优势

重组蛋白即应用基因重组技术,构建表达载体转入宿主细胞,从而表达的特定重组蛋白分子. 相对于其他传统细胞工厂而言,莱茵衣藻具有许多潜在的优势. 第一,莱茵衣藻能够进行光合作用,其细胞分裂周期仅为 8~12 h^[3],因此莱茵衣藻素有“光合酵母”之称,其发酵培养经济成本较之于其他细胞工厂如动物培养细胞、酵母和细菌低廉. 第二,近年来发现莱茵衣藻具有外泌蛋白的能力^[4-5],使得其作为绿色细胞工厂得到了更大的开发前景,由于其可大大降低重组蛋白的后续分离纯化,经济效益越发明显^[3]. 第三,莱茵衣藻属于安全级 (generally recognized as safe, GRAS) 微生物,且培养过程中不存在类似于植物细胞工厂的基因漂流现象,相对于植物细胞工厂而言生物安全性能良好^[6],且莱茵衣藻发酵培养不需占用耕地,这又是较之于植物细胞工厂的一项优点. 第四,莱茵衣藻全基因组早在 2007 年就已开始逐渐被破译^[7],相对于其他单细胞藻类,其遗传背景清晰. 除此之外,自 1950 年以来莱茵衣藻就被作为系统研究光合作用、鞭毛运动、叶绿体起源等生命过程

的模式生物,因此其遗传操作工具较其他单细胞藻类开发更早更为成熟. 目前,莱茵衣藻核、叶绿体和线粒体基因组遗传操作工具均已建立^[8]. 第五,莱茵衣藻核基因组和叶绿体基因组转化方法的成功开发使得人们在相对较短的时间内(1周之内)就能完成从初代转化株的筛选到目的重组蛋白的表达检测^[9],因此,得到稳定生产株并不费时费力. 第六,莱茵衣藻核表达的重组蛋白能够进行翻译后加工和修饰如糖基化等,这就使得莱茵衣藻核表达的重组蛋白具有较高的生物活性. 第七,目前莱茵衣藻规模化培养能力已能扩大到 50 万升的规模^[10]. 工业化生产技术已经不足以成为制约莱茵衣藻作为绿色细胞工厂的瓶颈.

这些众多的潜在优势使得莱茵衣藻成为有别于其他微生物、植物和动物细胞等细胞工厂而进行重组蛋白表达的理想场所. 随着基因工程技术的持续发展,人们利用莱茵衣藻作为绿色细胞工厂在可控条件下通过发酵方式生产重组蛋白疫苗、单克隆抗体、蛋白药物和工业蛋白(酶)的愿望已逐步得以实现.

2 莱茵衣藻遗传表达体系

在过去 20 余年中,人们已实现了对莱茵衣藻的外源基因转化^[11-13]并初步实现了对其全基因组实施定点编辑技术的起始开发^[14]. 莱茵衣藻遗传转化常用的方法有基因枪法^[11]、玻璃珠法^[12]、电击法^[13]、显微注射法^[15]以及碳化硅丝法^[16]等. 同时,莱茵衣藻遗传转化中常用的选择性标记基因也已开发多种(见表 1),其报告基因的选择也是多种多样(见表 2). 目前,针对莱茵衣藻叶绿体基因组、核基因组和线粒体基因组的遗传转化方法均已建立.

表 1 莱茵衣藻中可使用的选择标记基因
Tab. 1 Available selection markers for *C. reinhardtii*

选择标记基因	基因组	来源	参考文献
<i>npt II</i>	细胞核	来自大肠杆菌转化工子 Tn5, 耐卡那霉素	[17]
<i>Arg7</i>	细胞核	精氨酸琥珀酸裂解酶, 精氨酸原养型, 只适用于 <i>arg7</i> -菌株	[18]
<i>Nia1 (Nit1)</i>	细胞核	硝酸还原酶, 其唯一氮源为硝酸, 只适用 <i>nit1</i> -菌株	[19]
<i>Nic7</i>	细胞核	喹啉酸合成酶 A, 无烟酰胺生长, 只适用 <i>nic7</i> -菌株	[20]
<i>Thi10</i>	细胞核	羟乙基噻唑激酶, 无硫胺素生长, 只适用于 <i>thi10</i> -菌株	[20]
<i>cry1-1</i>	细胞核	突变 <i>rps14</i> 基因 (L153P) 编码的核糖体 S14 蛋白, 耐小穗苈麻素和吐根碱	[21]
<i>ppx1</i>	细胞核	突变原卟啉原氧化酶 (V389M), 耐斑状除草剂, 例如 S-23142	[22]
<i>Als</i>	细胞核	突变的乙酰乳酸合成酶 (K257T), 耐噻磺隆	[23]
<i>Ble</i>	细胞核	来自印度斯坦链球菌的腐草霉素, 耐博来霉素	[24]
<i>aph7''</i>	细胞核	来自吸水链霉菌氨基糖苷类磷酸转移酶, 耐潮霉素 B	[25]
<i>AphV III</i>	细胞核	来自龟裂链霉菌氨基糖苷类磷酸转移酶, 耐巴龙霉素和卡那霉素	[26]
<i>aadA</i>	细胞核(叶绿体)	真菌氨基糖苷类腺嘌呤转移酶, 耐巴龙霉素和卡那霉素	[27]
<i>aphA-6</i>	叶绿体	来自鲍曼不动杆菌氨基糖苷类磷酸转移酶, 耐卡那霉素和丁胺卡那霉素	[28]

表 2 莱茵衣藻中可使用的报告基因

Tab. 2 Available reporter genes for *C. reinhardtii*

报告基因	基因组	来源	参考文献
<i>Ars</i>	细胞核	芳香基硫酸酯酶,不用硫磺处理,可直接进行比色测定	[29]
<i>Crgfp</i>	细胞核	细胞核密码子优化的维多利亚多管发光水母 (<i>Aequorea victoria</i>) 绿色荧光蛋白	[30]
<i>Crluc</i>	细胞核	细胞核密码子优化的动物海肾 (<i>Renilla reniformis</i>) 荧光素酶	[31]
<i>gfpCt</i>	叶绿体	叶绿体密码子优化的维多利亚多管发光水母绿色荧光蛋白	[32]
<i>Rluc</i>	叶绿体	肾线虫 (<i>Rena nematodes</i>) 荧光素酶	[30]
<i>luxCt</i>	叶绿体	叶绿体密码子优化的哈氏弧菌 (<i>vibrio harveyi</i>) 荧光素酶 <i>luxAB</i>	[33]
<i>lucCP</i>	叶绿体	叶绿体密码子优化的萤火虫荧光素酶	[34]

2.1 叶绿体表达体系

1988年, Boynton 等^[11]首次将外源 DNA 通过基因枪法成功转化进入莱茵衣藻的叶绿体中,并使外源 DNA 以同源重组的方式整合到其叶绿体基因组中。莱茵衣藻叶绿体虽然为原核表达机制,但其含有多种分子伴侣、蛋白质二硫键异构酶和协助折叠复杂光合作用蛋白的肽基异构酶 (PPIases) 等。这种独特的生理生化环境允许莱茵衣藻叶绿体表达在传统细胞工厂中无法表达的高附加值治疗性蛋白。然而,叶绿体基因组表达外源蛋白的一个显著缺点是无法对目的蛋白进行糖基化,相关的改进措施一直在探索中。

目前在莱茵衣藻叶绿体基因组中驱动表达的常用启动子均为莱茵衣藻内源启动子,如叶绿体 ATP 合成酶启动子 (*aptA*)^[35]、叶绿体光合系统 II 反应中心叶绿素结合蛋白启动子 (*psbD*)^[36]、叶绿体光合系

统 II 反应中心蛋白 D1 启动子 (*psbA*)^[37]和核酮糖二磷酸羧化酶启动子 (*rbcL*)^[38]等。终止启动的终止子也均为它们各自的终止子^[36,39]。值得一提的是,莱茵衣藻叶绿体基因组中的碱基 A 或 T 的含量高达 80%,尤其是在密码子第 3 位,出现频率最高^[40]。实验证明,经过密码子优化的外源基因其蛋白表达量提高显著。因此,密码子优化已经成为外源基因在莱茵衣藻叶绿体中进行表达时的通用方法。

目前在莱茵衣藻叶绿体中已经实现了重组蛋白的高效稳定表达。一般来说,外源重组蛋白积累量可达莱茵衣藻总蛋白的 1%~10%,最高记录甚至可高达 21%^[5]。早在 2005 年,莱茵衣藻叶绿体中重组蛋白的表达量已达到商业化生产所需的水平^[41]。迄今为止,已有多种外源蛋白在莱茵衣藻叶绿体中成功地得到了表达(见表 3)。

表 3 莱茵衣藻叶绿体表达的重组蛋白

Tab. 3 Recombinant proteins produced from *C. reinhardtii* chloroplast genome

重组蛋白	功能	活性产量	参考文献
Anti-HSV glycoprotein D lsc	单纯疱疹糖蛋白 D 大单链抗体	可溶,以二硫键聚为二聚体同 HSVD 蛋白结合	[10]
Anti-PA83 anthrax IgG1	抗炭疽杆菌 PA83 IgG1 抗体	全长 IgG1 正确组装以二硫键结合轻链和重链	[42]
Anti-CD22-ETA sc	抵抗 B 细胞淋巴瘤的抗毒素	可溶,结合并杀死 D22-positive Burkitt's 淋巴瘤细胞可阻止动物模型的肿瘤生长	[43]
Anti-CD22-gelonin sc	抵抗 B 细胞淋巴瘤的抗毒素	可溶,表达量 0.1%~0.3% TSP,结合并杀死 CD22 阳性 B 细胞淋巴瘤	[44]
Metallothionein-2	抗辐射	抵抗 UV 辐射	[45]
TRAIL	抗癌症	表达量 0.43~0.67 TSP	[46]
别藻蓝素	抗癌症	表达两套多顺反子载体蛋白积累量达 2~3% TSP	[47]
VEGF	促血管生成和再生	表达量 2% TSP,具生物活性	[37]
HMGB1	创伤修复	表达量 2.5% TSP,具生物活性	[37]
14FN3	抗体模型	表达量 3% TSP,活性未测	[37]
SAA-10FN3	抗体模型	融合蛋白,活性未测	[37]
MAA	肠道生物活性制剂,预防肠道细菌感染	表达量 5% TSP,具生物活性	[36]
VP1-CTB	口蹄疫病毒蛋白亚基疫苗	表达量 3% TSP,活性未测	[35]
E2	猪瘟疫苗	表达量 1.5%~2% TSP,皮下注射发小鼠免疫应答	[48]
V28	白斑综合症病毒疫苗	表达量 21% TSP,活性未测	[39]
GAD65	治疗预防 I 型糖尿病	表达量 0.3% TSP,刺激 NOD 小鼠脾脏淋巴细胞增殖	[49]
D2-CTB	金黄色葡萄球菌亚基蛋白疫苗	表达量 0.7% TSP,小鼠口服注射均能保护金黄色葡萄球菌致死剂量	[38]

续表

重组蛋白	功能	活性产量	参考文献
E7 of HPV-16	宫颈癌蛋白亚基疫苗, 抵抗 HPV-16	表达量 0.12% TSP, 皮下注射引发免疫球蛋白反应	[50]
Pfs25	疟疾疫苗	可溶, 能够正确折叠修饰, 活性未测	[51]
Pfs28	疟疾疫苗	可溶, 能够正确折叠修饰, 活性未测	[51]
Pfs48/45	疟疾疫苗	可溶, 能够正确折叠修饰, 活性未测	[52]
Pfs25-CTB	疟疾疫苗	小鼠口服引发黏膜 IgA 对 Pfs25 和 CTB 反应	[53]
植酸酶 (AppA)	增加肌醇六磷酸酯磷的利用率	喂养肉仔鸡植酸酶, 能降低粪便中肌醇六磷酸的含量	[54]
木聚糖酶, α -半乳糖苷酶, 植酸酶	饲料添加	具生物活性	[55]
候选疫苗 CTB:p210	口服候选疫苗, 抵抗动脉粥样硬化	每克鲜重生物量表达量可达 60 μ g, BALB/c 小鼠口服注射后增高反应能持续至少 80 d	[56]

2.2 细胞核表达体系

1990 年和 1991 年, Kindle 和 Brown 等分别使用玻璃珠法和电转化法对莱茵衣藻核成功实施了外源 DNA 转化^[12-13]. 被转化的外源基因通过随机插入的方式整合到莱茵衣藻核基因组中. 核基因组转化的外源基因能够驱动表达, 重组蛋白也可进行翻译后的正确修饰, 而且这些重组蛋白还可以被设计成分泌蛋

白而被分泌到胞外, 从而大大简化了重组蛋白的分离纯化过程^[57]. 然而, 莱茵衣藻核表达产生的重组蛋白表达量较低, 目前文献报道的最高重组蛋白产量仅为莱茵衣藻总可溶性蛋白 (total soluble protein, TSP) 的 0.25%^[5]. 而且, 莱茵衣藻核基因组表达重组蛋白数量较少, 处于一个正在开发的状态 (见表 4).

表 4 莱茵衣藻核基因组生产的重组蛋白

Tab. 4 Recombinant proteins produced from *C. reinhardtii* nuclear genome

重组蛋白	功能	活性产量	参考文献
HIV P24	艾滋病疫苗	表达量 0.25% TSP, 活性未测	[17]
红细胞生成素	治疗贫血症	外泌, 表达量 100 μ g/L	[58]
GBSS-AMA1	疟疾疫苗	活性未测	[59]
GBSS-MSP1	疟疾疫苗	活性未测	[59]
β -1,4-木聚糖酶	饲料添加、食品生产、造纸漂白	外泌, 具生物活性	[57]

为了获得较高的外源重组蛋白表达量, 必须优化基因表达系统中所有的基因元件. 高效转录最重要的是启动子和终止子的选择. 目前在莱茵衣藻核基因组表达中测试过的启动子共有 13 种. 其中既有内源启动子包括叶绿体光合系统 I 基体蛋白启动子 (PsaD)^[60]、核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶启动子 (Rbcs2)^[61]、热激蛋白 70A 启动子 (Hsp70A)^[62]、HSP70A-Rbcs2 融合启动子^[62]、I 型质体蓝素蛋白启动子 (Pcy1)^[63]、叶绿体 ATP 合成酶 γ -亚基蛋白启动子 (AtpC)^[63]、 β -肌动蛋白启动子 (β -tub)^[29]、细胞色素 C6 启动子 (CYC6)^[63] 和硝酸还原酶启动子 (NIT1)^[64], 又有异源启动子如来自农杆菌的胭脂碱合成酶启动子 (Nos)^[65]、来自花椰菜的花叶病毒 35S RNA 启动子 (CAMV35S)^[66]、来源于微藻类的不依赖 B12 的甲硫氨酸合成酶启动子 (METE)^[67] 以及来源于杜氏盐藻的高效异源启动子光诱导蛋白 (LIP)^[68]. 这其中内源 HSP70A 启动子是温度诱导型启动子, 而异源 LIP 启动子则是光敏感型启动子. 在诱导物的存在下, 二者均可提高其启动效率^[62,68]. 尽管如此, 迄今为止只有数种外源蛋白在莱茵衣藻核基因组

中表达 (见表 4), 原因是缺少能够高效启动外源蛋白表达的强启动子. 另外, 外源基因在莱茵衣藻中极易沉默也使得稳定的种子藻种难于筛选获得.

随着过去 10 多年的不断改进, 莱茵衣藻核表达载体渐渐被完善, 通过选用更高效 (诱导型) 启动子和终止子系统, 在外源基因 cDNA 中添加莱茵衣藻内源基因的内含子, 进行被表达蛋白的基因密码子优化等措施都极大地提高了莱茵衣藻核基因组中外源蛋白 mRNA 的稳定性和目的蛋白的表达量. 莱茵衣藻核基因组表达载体通常是标记筛选基因表达盒和目的蛋白基因表达盒是分离的, 所以必须是这两套表达盒同时插入莱茵衣藻核基因组才能获得转基因藻种, 这就大大降低了转基因抗性藻种的筛选成功率, 通常我们实验团队的成功率大概最高能维持在 20% 左右. Rasala 等^[57]对木聚糖酶基因酶 (xyn) 进行了密码子优化, 然后融合其到莱茵衣藻内源 α -硫酸酯酶 I 蛋白的一个信号肽序列后 (SP-xyn). 随后, 他们将编码 SP-xyn 的序列框内融合到选择标记 Ble 基因的表达盒内. 接着将 FMDV 自剪切蛋白 (2A) 序列插入到 Ble 和 SP-xyn 两者之间, 这样做的好处是将标记筛

选基因表达盒和目的蛋白基因表达盒合二为一,从而大大提高了抗性转基因藻种的筛选成功率^[57]。我们利用该载体系统对报告基因 CrGFP 进行了测试,其 GFP 阳性藻种筛选成功率有时竟然高达 100%。然而其缺点是外源基因的表达量没有根本性的提高。在该实验中, *xyn* 的外泌产量仅为 0.25% TSP^[57], 主要原因是驱动 *Ble* 基因表达的是目前发现启动效率最高的 HSP70A-Rbcs2 启动子, 而要继续提高外源基因的表达量最根本还是要找到更高效的启动子。

本实验室对莱茵衣藻核基因组中能启动外源基因表达的 7 套启动子即 HSP70A、HSP70A-Rbcs2、Rbcs2、Nos、NIT1、CAMV 35S1 和莱茵衣藻纤毛蛋白 IFT25 基因启动子对报告基因 CrGFP 的启动效率的比较发现, 驱动外源基因表达能力最强的依次是 *ift25* 启动子、HSP70A-Rbcs2 融合启动子和 HSP70A 启动子(未发表数据), 首次证明莱茵衣藻纤毛 IFT 蛋白基因启动子可以更高效地启动莱茵衣藻核表达载体中的外源基因表达。 *ift25* 启动子只能高效启动其自身基因的表达, 而对其他测试基因则无启动功能。基于此, 本实验室成功开发构建了一套高效的核表达载体, 即通过在 *ift25* 启动子下游加入包含内含子的 *ift25* 基因序列以增强启动效率, 并在其后连入口蹄疫病毒 2A 蛋白酶序列(FMDV 2A^{Pro}), 使表达产生的与 IFT25 进行融合的目的蛋白可以被 FMDV 2A^{Pro} 剪切释放(未发表数据)。目前这套莱茵衣藻和基因组表达系统已被成功应用于表达里氏木霉木聚糖酶, 表达产率高达 0.69% TSP, 远高于利用 HSP70A-Rbcs2 启动子启动表达的 *Ble* 融合表达系统所报告的 0.25% 的表达量^[57]。而其抗性转基因藻种的筛选成功率为 20% 左右, 依旧属于一个成功率较高的范畴。

2.3 线粒体表达体系

1993 年, Randolph-Anderson 等^[69]将外源基因通过基因枪法转入线粒体中, 该外源基因片段以同源重组的方式整合进入莱茵衣藻线粒体基因组并可进行稳定遗传。然而, 莱茵衣藻线粒体基因组相对很小, 只有 15 kbp^[70], 因此不利于大片段 DNA 的重组整合。2011 年, 我国学者胡章立等^[70-72]利用基因枪法将 *egfp* 和 *ble* 基因分别导入莱茵衣藻 *dum-1* 突变株 CC-2654 线粒体中获得有效表达绿色荧光蛋白和具有腐草霉素抗性的转基因藻, 因此对这一体系进行了一定程度的跟进。除此之外, 只有数篇关于莱茵衣藻线粒体遗传转化的报道^[69,73-74]。考虑到莱茵衣藻线粒体基因组大小的限制而导致其不能有效整合较大外

源基因的能力, 人们在表达外源重组蛋白时通常不会将莱茵衣藻线粒体基因组列入考虑范围当中。

3 莱茵衣藻作为绿色细胞工厂生产高附加值重组蛋白案例

3.1 蛋白亚基疫苗

莱茵衣藻作为细胞工厂用于生产蛋白亚基疫苗获得了相当大的关注^[75]。到目前为止, 数种针对细菌、病毒、疟原虫和其他疾病如 I 型糖尿病、癌症和心脑血管病等疾病的潜在候选蛋白亚基疫苗已经在莱茵衣藻中得到表达, 有些已完成初步的功能测试。

3.1.1 金黄色葡萄球菌疫苗

金黄色葡萄球菌是呼吸道和皮肤上常见的细菌, 能引起呼吸道疾病、皮肤感染等。把金黄色葡萄球菌 D2 纤连糖蛋白的结合结构域与霍乱毒素 B(CTB) 亚基进行融合, 在莱茵衣藻叶绿体中进行融合表达^[38]。结果表明, D2-CTB 融合蛋白可以累积到相当于莱茵衣藻 TSP 的 0.7%。对小鼠进行口服给药实验结果表明, D2-CTB 能够引起小鼠黏膜 IgA 和全身性 IgG 同 D2 发生免疫反应。在金黄色葡萄球菌致死剂量下, 小鼠口服接种莱茵衣藻表达的 D2-CTB 后能对其提供保护。这是第一个在莱茵衣藻中重组生产的有效、针对金黄色葡萄球菌的口服蛋白亚基疫苗。

3.1.2 口蹄疫病毒疫苗

口蹄疫病毒(FMDV)能够在易感偶蹄类动物如猪、牛和羊等家畜中迅速传播并引发家畜的高死亡率。FMDV 是小核糖核酸病毒科口蹄疫病毒属的典型成员。该病毒抗原高度可变, 已知由 7 个血清型(A、O、C、Asia1、SAT1、SAT2 和 SAT3)组成, 并且伴有多个亚型。将口蹄疫病毒主要抗原 VP1 蛋白与 CTB 进行融合, 在莱茵衣藻叶绿体中表达 VP1-CTB 融合蛋白已获得成功^[35]。该融合蛋白具有同神经节苷脂结合的能力, 产量可达莱茵衣藻 TSP 的 3%。

3.1.3 猪瘟病毒疫苗

猪瘟是一种急性、热性、高度接触性的烈性传染病, 对养猪业危害极大。来自猪瘟病毒的主要抗原蛋白 E2 蛋白, 在莱茵衣藻叶绿体中表达并且累积量为 TSP 的 1.5%~2%^[48]。对小鼠进行 E2-衣藻粗提取物的皮下注射实验表明其能够引发小鼠与病毒 E2 蛋白的免疫应答, 然而, 当通过口服途径摄入抗原时没有引起明显的反应。

3.1.4 白斑综合症病毒疫苗

白斑综合症病毒(WSSV)是在全球范围内对虾

养殖场造成不利影响的病原体. 病毒蛋白 28 (VP28) 是主要的病毒包膜蛋白, 是 WSSV 亚基疫苗的开发目标. VP28 已在莱茵衣藻的叶绿体中成功表达, 积累量达到总蛋白的 21%^[39].

3.1.5 艾滋病疫苗

自从获得性免疫缺失综合症 (AIDS) 出现以来, 世界上已有 7.8 亿人感染了人类免疫缺陷病毒 (HIV, 主要是突变体 HIV-1), 3.9 亿人死于该病. 历经 30 多年的不懈研究, 人们发现莱茵衣藻或许可以作为一种理想的生产平台, 大量生产稳定的艾滋病口服蛋白亚基疫苗. Barahimipour 等^[17]在莱茵衣藻核基因组中表达 HIV-1 蛋白 P24 被认为是艾滋病疫苗中最必不可少的成分, 表达量达到总蛋白的 0.25%.

3.1.6 疟疾疫苗

疟疾是由疟原虫属的寄生虫引起的感染, 靠蚊子吸取人类血液传播, 威胁到世界人口的一半之多, 根除措施集中在针对蚊子的杀虫剂以及针对致病原虫的疫苗上^[76]. Dauvillée 等^[59]成功地融合了两种临床相关疟疾抗原, 即 AMA1 和 MSP1, 并将其结合到宿主细胞中的淀粉基质蛋白-淀粉合酶颗粒 (GBSS) 上. GBSS-AMA 和 GBSS-MSP 转化进入莱茵衣藻核基因组中, 随后在叶绿体中进行淀粉颗粒转化. 小鼠通过口服和腹腔注射两种方法用转基因淀粉颗粒进行免疫, 按伯氏鼠疟的致死剂量对实验小鼠组进行腹腔注射. 两组均显示疟原虫显著减少, 小鼠寿命有所增加, 此外, 腹腔接种对疟疾具有完全的保护作用.

根除疟疾最有可能实现的策略是将阻断疟疾传播的疫苗 (TBVs) 同治疗感染个体的药物结合. 3 个潜在的能够阻止疟疾传播的蛋白亚基疫苗 Pfs48/45、Pfs28 和 Pfs25 已经在莱茵衣藻叶绿体基因组中获得表达^[51-52], 莱茵衣藻生产的 Pfs48/45、Pfs28 和 Pfs25 均能够折叠成为用于诱导阻断抗体产生所需的正确构象. Pfs25 和 Pfs28 免疫的小鼠产生了抗原特异性抗体. Pfs25 诱导产生的抗体完全阻断了疟原虫卵母细胞传递. 为了确定 Pfs25 是否可开发为针对疟疾的有效的口服蛋白亚基疫苗, 将 Pfs25 同 CTB 融合, 并在莱茵衣藻叶绿体基因组中表达^[53]. 将冻干的含 Pfs25-CTB 的莱茵衣藻饲喂小鼠, 可引起黏膜 IgA 对 Pfs25 的应答以及 IgA 和 IgG 对 CTB 的应答. 虽然黏膜 IgA 抗体不能抵御疟疾的传播, 但该研究证实莱茵衣藻是生产黏膜感染口服蛋白亚基疫苗的理想选择.

3.1.7 I 型糖尿病疫苗

I 型糖尿病是一种自身免疫性疾病, 病人自身免

疫系统攻击其胰腺 β 细胞, 最终造成其制造胰岛素能力的丧失, 从而引起血糖水平持续升高. 谷氨酸脱羧酶-65 (GAD 65) 是人类 I 型糖尿病主要的自身抗原之一. 莱茵衣藻重组产生的 hGAD 65 能与非肥胖糖尿病 (NOD) 小鼠血清发生反应, 并且刺激 NOD 小鼠的脾淋巴细胞的增殖能力. 因此, 用 GAD 65 可以预防或延迟人类 I 型糖尿病的动物模型免疫 NOD 小鼠的发病^[77]. 目前, 重组 hGAD 65 在莱茵衣藻叶绿体基因组的表达水平达到 TSP 的 0.25% ~ 0.3%^[49].

3.1.8 癌症疫苗

佳达修 (Gardasil) 和卉妍康 (Cervarix) 是美国 FDA 批准生产的癌症疫苗, 用于保护人类免受人类乳头状瘤病毒 (HPV) 16 和 18 型的侵害, 其中 70% 左右的病人是子宫颈癌患者^[78]. HPV-16 中参与恶性细胞转化的 E7 蛋白基因转化进入莱茵衣藻叶绿体基因组中, 其表达量达到 TSP 的 0.12%^[50]. 无论是转基因藻类裂解物, 还是纯化后的 E7 蛋白, 通过皮下注射进入 C57BL/6 小鼠体内, 均能诱导特异性抗 E7 的 IgG 和特异性 T 细胞的增殖. 引人注意的是, 肿瘤细胞系表达 E7 蛋白后, 对癌细胞形成高度防御, 这表明莱茵衣藻是生产癌症疫苗的一个可行的平台.

3.1.9 动脉粥样硬化疫苗

心血管疾病每年造成 1 730 万人死亡, 占慢性非传染性疾病 (NCD) 的 30% (WHO 2015)^[56]. 事实上, 动脉粥样硬化是心血管疾病的罪魁祸首.

Beltran-Lopez 等^[56]在莱茵衣藻叶绿体基因组中成功表达了口服嵌合蛋白 CTB:p210, CTB 为脂载蛋白, p210 抗原决定簇来自 ApoB100. CTB:p210 表现出免疫原性活性, 在最后一次给 BALB/c 小鼠加压后抗体应答至少持续 80 d. CTB:p210 蛋白在每克鲜重生物量中表达量达到 60 μg . 这种实验模型为动脉粥样硬化疫苗的开发提供了经济高效的便利工具, 为进一步研究确定藻类制造疫苗展现了治疗潜力.

3.2 单克隆抗体和抗毒素

蛋白质治疗市场正在以 990 亿美元的份额成为 6 千亿美元制药行业中增长最快速的组分^[79]. 作为各种人类疾病有效治疗剂的单克隆抗体以 380 亿美金占据生物制药市场的三分之一. 在莱茵衣藻中表达各种复杂的抗体的脚步从未停止过.

3.2.1 单纯疱疹病毒 D 大单链抗体

Mayfield 等^[10]使用莱茵衣藻叶绿体自身的启动子 *atpA* 和 *rbcL* 以及其 5'-UTR, 并通过密码子优化的方法, 在莱茵衣藻叶绿体基因组中表达了针对单纯疱疹病毒 (HSV) 糖蛋白 D 的大单链 (Isc) 抗体, 该抗

体能在体内通过二硫键正确折叠为可溶的二聚体,并结合到单纯疱疹病毒上。

3.2.2 炭疽杆菌 PA83 单克隆全长阻断抗体

莱茵衣藻叶绿体基因组还可以产生可溶性具有生物学功能的全长 IgG I 人类单克隆抗体。针对炭疽抗原 83 (PA83) 的编码阻断抗体的轻链和重链的基因能够独立地转化到莱茵衣藻叶绿体基因组中。两条重链和两条轻链均能以可溶性蛋白的形式积累,更为重要的是,两条重链和两条轻链蛋白能够正确组装成一个通过二硫键键合的功能性全长抗体^[42]。

3.2.3 免疫毒素

莱茵衣藻叶绿体具有生产和组装复杂的真核蛋白质的折叠机制,还具有生产新型蛋白质如免疫毒素的转录器官。免疫毒素是由化学或遗传^[80]耦合到真核毒素上的内吞抗体组成,并且可以作为抗癌疗法来定位并杀死癌细胞。Tran 等^[43]将 B 细胞表面蛋白 CD22 的单链抗体片段融合到假单胞菌外毒素 A 的酶促结构域,利用莱茵衣藻叶绿体基因组生产和组装了可溶性单基因单价和二价抗毒素。单价和二价的抗 CD22-外毒素 A 的抗毒素均可特异性识别并杀死 CD22 阳性伯基特淋巴瘤细胞系,二价融合蛋白的效率是单价融合蛋白的 20 倍。在动物实验中,这两个免疫毒素分子都能显著抑制肿瘤生长,提高小鼠存活率。当一价和二价抗 CD22 单链抗体分别融合到白树毒素中获得了类似的结果^[44]。没有其他的蛋白质生产体系能够表达这些嵌合分子,这更加突出了莱茵衣藻叶绿体基因组生产高附加值蛋白的重要性。

3.3 蛋白药物和激素

莱茵衣藻叶绿体基因组很早以来就被用来尝试生产治疗性高附加值蛋白药物。目前发现,尤其是其核基因组重组蛋白,当其通过内质网和高尔基体时能被糖基化修饰。由于大约 40% 被批准生产的蛋白质治疗剂经过糖基化修饰^[79],这对于蛋白质的折叠、功能和/或稳定性非常重要。所以利用莱茵衣藻核基因组生产蛋白类治疗药物已是一个热点。

3.3.1 抑癌蛋白药物

由 α 和 β 亚基组成的别藻蓝蛋白 (APC) 是一种蓝藻和红藻中的光合触角蛋白质,并已有报道其对于抑制小鼠的 S-180 癌有作用。来自蓝藻螺旋藻 APC 的 α 和 β 亚基在莱茵衣藻叶绿体中使用顺反子表达载体获得表达,积累量达到 TSP 的 2% ~ 3%^[47]。

3.3.2 血管内皮生长因子

Rasala 等^[37]分析比较了 7 种蛋白药物在莱茵衣藻叶绿体基因组中的表达,这些蛋白药物包括促红细

胞生成素、10 Fn3、14 FN3、干扰素- β 、胰岛素原、血管内皮生长因子 (VEGF) 和 HMGB1 等。实验表明, VEGF 和 HMGB1 已经达到可进行商业生产的水平。其蛋白表达量可达到 TSP 的 2% ~ 3%。相比使用传统的细胞工厂表达的蛋白而言,来自莱茵衣藻叶绿体基因组表达的蛋白多数都是可溶的并且具有生物学活性。无论是其成功率、表达水平还是生物活性均优于常规的蛋白表达平台,显示莱茵衣藻叶绿体基因组可作为一个人类治疗蛋白药物生产的平台^[81]。

3.3.3 人促红细胞生成素

人促红细胞生成素 (EPO) 是一种用来治疗肾衰竭引起的贫血或抗癌治疗的一种糖蛋白激素。EPO 零售价超过 20 亿美元/千克,迄今为止, EPO 可能是最昂贵的产品^[82]。目前 EPO 从哺乳动物细胞中重组表达获得。目前,来自人的 EPO 基因在莱茵衣藻的核基因组中已得到表达,并且可被成功分泌到培养基中,积累量达到 100 $\mu\text{g/L}$ 的水平^[58]。莱茵衣藻表达的 EPO 相对分子质量为 3.3×10^4 , 比未修饰的蛋白 (1.9×10^4) 更大,更类似于人类的 EPO (3.4×10^4)。这些数据表明,莱茵衣藻表达的 EPO 的确是经过糖基化修饰的,具有临床应用的潜能。

3.4 肠道活性蛋白生物制剂

绿藻已被广泛应用为食品原料,口服表达肠道活性蛋白如初乳蛋白质的转基因微藻就能够刺激小肠产生保护性黏蛋白分泌,从而阻断细菌在小肠的黏附,进而预防疾病的发生,目前在莱茵衣藻中表达最成功的是血清淀粉样蛋白 A (MAA)^[79, 83-84]。

根据美国疾病预防控制中心 (CDC) 报道,每年全球由于食物和水污染导致的肠道感染而死亡的人数达到 200 万^[5]。近年, CDC 发布的一份报告证实了畜禽常规应用抗生素和不断增长的细菌耐药之间的联系。每年 200 万以上的人患有抗生素耐药性感染疾病,大约 23 000 人因此死亡^[5]。因此,如能实现一种对肠道细菌感染能够起到预防作用的可食用藻类的廉价的生产将可以极大地促进动物和人类健康。Manuell 等^[36]在莱茵衣藻叶绿体基因组中表达了牛 MAA, 其蛋白质积累量达到 TSP 的 5%。纯化后的 MAA 能够在人肠上皮细胞系 HT29 中刺激黏蛋白 3 的分泌和聚集。利用藻类 MAA 口服活性蛋白生物制剂如果能工业化生产则会产生重大深远的影响。

3.5 饲料酶和工业酶

饲料酶和工业酶在许多行业中使用,包括畜牧、食品、洗涤剂、纺织、皮革、造纸以及生物诊断等。现在, 50% 的工业酶以重组蛋白的形式生产,并且以下

几类酶已经在莱茵衣藻中得到了成功表达。

3.5.1 饲料酶

不同生物来源的酶可以工业化规模生产用作动物饲料添加。其中植酸酶广泛用于单胃家畜饲料添加,从而增加谷物中植酸磷的利用率。目前,利用莱茵衣藻叶绿体基因组已成功生产了具有生物学活性的大肠杆菌植酸酶(APPA)^[54]。给幼年肉鸡饲料添加 APPA 藻类的饲料显著降低了粪便中植酸的含量,同时增加了其无机磷酸盐的含量。该实验同时证明使用生产 APPA 的莱茵衣藻能够直接干燥添加饲料而不需进行 APPA 蛋白的纯化^[54]。除此之外,Georgianna 等^[55]将 14 种异源编码的重要饲料酶基因,包括瑞氏木霉切木聚糖酶、2 种 β -甘露糖苷酶,4 种 D-半乳糖苷星系水解酶(α -半乳糖苷酶)、4 种植酸酶和 3 种半胱氨酸蛋白酶转化进入莱茵衣藻叶绿体基因组。研究表明,木聚糖酶、2 种半乳糖苷酶以及 2 种植酸酶在莱茵衣藻叶绿体中表达良好并且表达产物具有生物活性^[5]。

3.5.2 工业酶

β -1,4-木聚糖内切酶可以降解半纤维素,所以在制造烘焙食品、饮料、纺织品、纸浆和纸中均有很高的利用,并且将来可能在大规模纤维素生物燃料生产中大量利用^[85]。Rasala 等^[57]在莱茵衣藻核基因组中实现了来自里氏木霉的重组木聚糖酶的表达和分泌。其策略为:首先对木聚糖酶进行密码子优化,然后融合其到莱茵衣藻内源 α -硫酸酯酶 I 蛋白的一个信号肽(SP-xyn)。随后,为了克服核基因组基因异源表达的基因沉默现象,他们将编码 SP-xyn 的序列框内融合到选择标记 Ble 基因的 3'端。接着将 FMDV 自剪切蛋白(2A)序列插入到 Ble 和 SP-xyn 两者之间,这就能够使得 SP-xyn 从 Ble 上脱离,将具有生物活性的木聚糖酶分泌到培养基中。令人惊喜的是,Ble-2A 核表达载体比传统的(非融合)核转化载体表达的木聚糖酶的活力超过 100 倍。但其表达效率还是偏低,其产量仅为 TSP 的 0.25%。

3.6 其他

目前在莱茵衣藻中表达成功的外源功能蛋白还包括一些非治疗性功能蛋白,其中包括抗紫外蛋白、生物降解蛋白和蛋白细胞因子。

3.6.1 抗紫外蛋白

在特定类型的辐射照射后具有一些功能益处的人金属硫蛋白-2(MT2)基因产物在莱茵衣藻叶绿体基因组中得到表达,并且证明相比野生型细胞,转基因藻种细胞对于 UV-B 的抵抗力提高^[45]。这种方法

可以被用来在低成本生产高纯度和天然特性的人类 MT2 蛋白,可以在化妆品中将其作为添加剂防止氧化损伤和紫外线辐射。

3.6.2 生物降解蛋白

通过引入外源金属硫蛋白(MT-like)基因到莱茵衣藻核基因组中表达能增强莱茵衣藻细胞对重金属的结合能力,从而展示了莱茵衣藻在生物降解和环境治理领域的广阔前景^[86]。

3.6.3 蛋白细胞因子

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL)是诱导细胞凋亡的细胞因子^[87]。TRAIL 在莱茵衣藻叶绿体表达的累积量达到 TSP 的 0.43%~0.67%^[46]。

4 莱茵衣藻作为绿色细胞工厂的改进

虽然莱茵衣藻作为绿色细胞工厂已经得到了重视和一定的应用,但与其他类型的成熟细胞工厂相比,还有一些方面有待于进一步开发改进。其中主要有以下几点:第一,单纯光合作用自养的莱茵衣藻生物生成量较低,应开发自异混养发酵或高密度异养发酵技术以提高其生物生成量。第二,要从根本上进一步显著提高其重组蛋白生成量特别是和基因组表达重组蛋白的生成量,还需要继续寻找更高效率的超强启动子,以及开发新的底盘藻种以适应外源蛋白毒性(如人血白蛋白在莱茵衣藻中毒性很强)等问题。第三,衣藻叶绿体的同质化现象对外源蛋白会产生抑制作用,并且衣藻叶绿体不能分泌蛋白,只能通过采集和溶解的手段,这是衣藻生产重组蛋白的限制因素。第四,许多外源基因导入衣藻基因组后会出现基因沉默问题,外源基因的表达在基因水平或是在蛋白水平受到阻遏,这些现象的存在原因有多种,可能是异源元件的因素、甲基化修饰以及外界因素的干扰等。然而,这些突破都需要莱茵衣藻基础遗传学和生物学的逐渐清晰为支撑,所以对莱茵衣藻作为绿色细胞工厂的开发还需继续。

5 讨论

利用莱茵衣藻作为绿色细胞工厂已成功地应用于生产各种重组蛋白,包括抗体、免疫毒素、生长激素、蛋白药物以及疫苗、肠活性营养品、饲料添加剂和工业酶等。其中莱茵衣藻叶绿体支持重组蛋白的高效积累,其重组蛋白可正确折叠,生产的可溶性重组蛋白质具有生物活性。特别是作为一种药物载体,

莱茵衣藻可口服递送肠活性生物制剂、抗病毒和细菌的疫苗等,与传统的细胞工厂如哺乳动物细胞和大肠杆菌相比具有更多的优势。

用于莱茵衣藻遗传转化的选择性标记基因、报告基因多种多样,高效表达的启动子、表达盒也开发多种,针对莱茵衣藻叶绿体基因组、核基因组和线粒体基因组的遗传转化方法均已建立。除了上述优点,利用光合作用的进行生物生产是一个有趣的想法。莱茵衣藻将阳光和二氧化碳转化为有机碳,以及生产重组蛋白的效率极高。据推测,在经济方面利用太阳能进行生物生产比传统的表达平台更具优势。培养基中不添加碳源,减少了微生物污染,从而简化上游和下游的处理过程。此外,如果减少二氧化碳的排放作为应对气候变化的重要措施,则制造消耗二氧化碳的莱茵衣藻而非产生二氧化碳的传统的发酵将再次成为得天独厚平台的生产工厂。

然而,莱茵衣藻作为细胞工厂生产重组蛋白仍具有一定的局限性。其中包括其叶绿体对于一些复杂蛋白不具备修饰能力,核基因组表达的重组蛋白可以进行糖基化等修饰,但其表达量又相对较低等。随着培养时间的推移,可能出现基因表达沉默等现象。想要改变这些缺陷,需要继续深入研究。总之,莱茵衣藻这种新型绿色细胞工厂值得人们不懈地探索和发现。莱茵衣藻进行工业化开发的最佳时机就在眼下。

参考文献:

- [1] Tobin J L, Beales P L. Bardet-Biedl syndrome: Beyond the cilium[J]. *Pediatr Nephrol*, 2007, 22(7): 926–936.
- [2] 李修岭, 李夜光. 衣藻有性生殖的分子机制[J]. *西北植物学报*, 2009, 29(7): 1490–1495.
- [3] Specht E, Miyake-Stoner S, Mayfield S. Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(10): 1373–1383.
- [4] Allen M D, del Campo J A, Kropat J, et al. *FEA1*, *FEA2*, and *FRE1*, encoding two homologous secreted proteins and a candidate ferredoxin, are expressed coordinately with *FOX1* and *FTR1* in iron-deficient *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(10): 1841–1852.
- [5] Rasala B A, Mayfield S P. Photosynthetic biomanufacturing in green algae, production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses[J]. *Photosynthesis Research*, 2015, 123(3): 227–239.
- [6] Mayfield S P, Manuell A L, Chen S, et al. *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18(2): 126–133.
- [7] Merchant S S, Prochnik S E, Vallon O, et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions[J]. *Science*, 2007, 318(5848): 245–250.
- [8] Rochaix J D. The three genomes of *Chlamydomonas*[J]. *Photosynthesis Research*, 2002, 73(1/2/3): 285–293.
- [9] Fan Z C, Behal R H, Geimer S, et al. *Chlamydomonas* IFT70/CrDYF-1 is a core component of IFT particle complex B and is required for flagellar assembly[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, 21(15): 2696–2706.
- [10] Mayfield S P, Franklin S E, Lerner R A. Expression and assembly of a fully active antibody in algae[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(2): 438–442.
- [11] Boynton J E, Gillham N W, Harris E H, et al. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles[J]. *Science*, 1988, 240(4858): 1534–1538.
- [12] Kindle K L. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 87(3): 1228–1232.
- [13] Brown L E, Sprecher S L, Keller L R. Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11(4): 2328–2332.
- [14] Shin S E, Lim J M, Koh H G, et al. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27810.
- [15] el-Sheekh M M. Stable chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii* using microprojectile bombardment[J]. *Folia Microbiologica (Praha)*, 2000, 45(6): 496–504.
- [16] Dunahay T G. Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers[J]. *Biotechniques*, 1993, 15(3): 452–455, 457–458, 460.
- [17] Barahimipour R, Neupert J, Bock R. Efficient expression of nuclear transgenes in the green alga *Chlamydomonas*: Synthesis of an HIV antigen and development of a new selectable marker[J]. *Plant Molecular Biology*, 2016, 90(4/5): 403–418.
- [18] Debuchy R, Purton S, Rochaix J D. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: An important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7

- locus[J]. The EMBO Journal, 1989, 8(10):2803–2809.
- [19] Kindle K L, Schnell R A, Fermindez E, et al. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase[J]. The Journal of Cell Biology, 1989, 109(6):2589–2601.
- [20] Ferris P J. Localization of the *nic-7*, *ac-29* and *thi-10* genes within the mating-type locus of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Genetics, 1995, 141(2):543–549.
- [21] Nelson J A, Savereide P B, Lefebvre P A. The CRY1 gene in *Chlamydomonas reinhardtii*: Structure and use as a dominant selectable marker for nuclear transformation[J]. Molecular and Cellular Biology, 1994, 14(6):4011–4019.
- [22] Randolph-Anderson B L, Sato R, Johnson A M, et al. Isolation and characterization of a mutant protoporphyrinogen oxidase gene from *Chlamydomonas reinhardtii* conferring resistance to porphyric herbicides[J]. Plant Molecular Biology, 1998, 38(5):839–859.
- [23] Kovar J L, Zhang J, Funke R P, et al. Molecular analysis of the acetolactate synthase gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and development of a genetically engineered gene as a dominant selectable marker for genetic transformation[J]. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2002, 29(1):109–117.
- [24] Stevens D R, Rochaix J D, Purton S. The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*[J]. Molecular and General Genetics, 1996, 251(1):23–30.
- [25] Berthold P, Schmitt R, Mages W. An engineered *Streptomyces hygrosopicus aph 7"* gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Protist, 2002, 153(4):401–412.
- [26] Sizova I, Fuhrmann M, Hegemann P. A *Streptomyces rimosus aphVIII* gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Gene, 2001, 277(1/2):221–229.
- [27] Cerutti H, Johnson A M, Gillham N W, et al. A eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on *Chlamydomonas reinhardtii*: Integration into the nuclear genome and gene expression[J]. Genetics, 1997, 145(1):97–110.
- [28] Bateman J M, Purton S. Tools for chloroplast transformation in *Chlamydomonas*: Expression vectors and a new dominant selectable marker[J]. Molecular and General Genetics, 2000, 263(3):404–410.
- [29] Davies J P, Weeks D P, Grossman A R. Expression of the arylsulfatase gene from the beta 2-tubulin promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Nucleic Acids Research, 1992, 20(12):2959–2965.
- [30] Fuhrmann M, Oertel W, Hegemann P. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein(GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Plant Journal, 1999, 19(3):353–361.
- [31] Fuhrmann M, Hausherr A, Ferbitz L, et al. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 55(6):869–881.
- [32] Franklin S, Ngo B, Efuert E, et al. Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast[J]. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2002, 30(6):733–744.
- [33] Mayfield S P, Schultz J. Development of a luciferase reporter gene, *luxCt*, for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast[J]. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2004, 37(3):449–458.
- [34] Matsuo T, Onai K, Okamoto K, et al. Real-time monitoring of chloroplast gene expression by a luciferase reporter: Evidence for nuclear regulation of chloroplast circadian period[J]. Molecular and Cellular Biology, 2006, 26(3):863–870.
- [35] Sun M, Qian K, Su N, et al. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(13):1087–1092.
- [36] Manuell A L, Beligni M V, Elder J H, et al. Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas chloroplast*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2007, 5(3):402–412.
- [37] Rasala B A, Muto M, Lee P A, et al. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2010, 8(6):719–733.
- [38] Dreesen I A, Charpin-EI Hamri G, Fussenegger M. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 145(3):273–280.
- [39] Surzycki R, Greenham K, Kitayama K, et al. Factors effecting expression of vaccines in microalgae[J]. Biologicals, 2009, 37(3):133–138.
- [40] Mayfield S P, Franklin S E. Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae[J]. Vaccine, 2005, 23(15):1828–1832.
- [41] Franklin S E, Mayfield S P. Recent developments in the production of human therapeutic proteins in eukaryotic algae[J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2005, 5(2):225–235.

- [42] Tran M, Zhou B, Pettersson P L, et al. Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 104(4) : 663–673.
- [43] Tran M, Van C, Barrera D J, et al. Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(1) : E15–E22.
- [44] Tran M, Henry R E, Siefker D, et al. Production of anti-cancer immunotoxins in algae: Ribosome inactivating proteins as fusion partners[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110(11) : 2826–2835.
- [45] Zhang Y K, Shen G F, Ru B G. Survival of human metallothionein-2 transplastomic *Chlamydomonas reinhardtii* to ultraviolet B exposure[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*, 2006, 38(3) : 187–193.
- [46] Yang Z, Li Y, Chen F, et al. Expression of human soluble TRAIL in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2006, 51(14) : 1703–1709.
- [47] Su Z L, Qian K X, Tan C P, et al. Recombination and heterologous expression of allophycocyanin gene in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, 37(10) : 709–712.
- [48] He D M, Qian K X, Shen G F, et al. Recombination and expression of classical swine fever virus (CSFV) structural protein E2 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts[J]. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 2007, 55(1) : 26–30.
- [49] Wang X, Brandsma M, Tremblay R, et al. A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65) [J]. *BMC Biotechnology*, 2008, 8: 87.
- [50] Demurtas O C, Massa S, Ferrante P, et al. A *Chlamydomonas*-derived human papillomavirus 16 E7 vaccine induces specific tumor protection[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4) : e61473.
- [51] Gregory J A, Li F, Tomosada L M, et al. Algae-produced Pfs25 elicits antibodies that inhibit malaria transmission[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5) : e37179.
- [52] Jones C S, Luong T, Hannon M, et al. Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(5) : 1987–1995.
- [53] Gregory J A, Topol A B, Doerner D Z, et al. Alga-produced cholera toxin-pfs25 fusion proteins as oral vaccines[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(13) : 3917–3925.
- [54] Yoon S M, Kim S Y, Li K F, et al. Transgenic microalgae expressing *Escherichia coli* AppA phytase as feed additive to reduce phytate excretion in the manure of young broiler chicks[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(3) : 553–563.
- [55] Georgianna D R, Hannon M J, Marcuschi M, et al. Production of recombinant enzymes in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*[J]. *Algal Research*, 2013, 2(1) : 2–9.
- [56] Beltrán-López J I, Romero-Maldonado A, Monreal-Escalante E, et al. *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts express an orally immunogenic protein targeting the p210 epitope implicated in atherosclerosis immunotherapies[J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(5) : 1133–1141.
- [57] Rasala B A, Lee P A, Shen Z, et al. Robust expression and secretion of Xylanase I in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8) : e43349.
- [58] Eichler-Stahlberg A, Weisheit W, Ruecker O, et al. Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Planta*, 2009, 229(4) : 873–883.
- [59] Dauvillée D, Delhaye S, Gruyer S, et al. Engineering the chloroplast targeted malarial vaccine antigens in *Chlamydomonas* starch granules[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12) : e15424.
- [60] Fischer N, Rochaix J D. The flanking regions of Psad drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Molecular Genetics and Genomics*: MGG, 2001, 265(5) : 888–894.
- [61] Kozminski K G, Diener D R, Rosenbaum J L. High level expression of nonacetylatable α -tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 1993, 25(2) : 158–170.
- [62] Schroda M, Blocker D, Beck C F. The *HSP70A* promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*[J]. *Plant Journal*, 2000, 21(2) : 121–131.
- [63] Quinn J M, Merchant S. Two copper-responsive elements associated with the *Chlamydomonas* *Cyc6* gene function as targets for transcriptional activators[J]. *The Plant Cell*, 1995, 7(5) : 623–638.
- [64] Ohresser M, Matagne R F, Loppes R. Expression of the arylsulphatase reporter gene under the control of the nit1 promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Current Genetics*, 1997, 31(3) : 264–271.
- [65] Díaz-Santos E, de la Vega M, Vila M, et al. Efficiency of

- different heterologous promoters in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Biotechnology Progress, 2013, 29(2): 319–328.
- [66] Ruecker O, Zillner K, Groebner-Ferreira R, et al. Gaussia-luciferase as a sensitive reporter gene for monitoring promoter activity in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2008, 280(2): 153–162.
- [67] Helliwell K E, Scaife M A, Sasso S, et al. Unraveling vitamin B12-responsive gene regulation in algae[J]. Plant Physiology, 2014, 165(1): 388–397.
- [68] Baek K, Lee Y, Nam O, et al. Introducing *Dunaliella* LIP promoter containing light-inducible motifs improves transgenic expression in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Biotechnol Journal, 2016, 11(3): 384–392.
- [69] Randolph-Anderson B L, Boynton J E, Gillham N W, et al. Further characterization of the respiratory deficient dum-1 mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation[J]. Molecular and General Genetics, 1993, 236(2/3): 235–244.
- [70] 胡章立, 李建成, 程雪薇. 莱茵衣藻线粒体遗传系统及其外源基因表达[J]. 深圳大学学报: 理工版, 2013, 30(6): 603–610.
- [71] Hu Z, Zhao Z, Wu Z, et al. Successful expression of heterologous *egfp* gene in the mitochondria of a photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Mitochondrion, 2011, 11(5): 716–721.
- [72] Hu Z, Fan Z, Zhao Z, et al. Stable expression of antibiotic-resistant gene *ble* from *Streptoalloteichus hindustanus* in the mitochondria of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35542.
- [73] Yamasaki T, Kurokawa S, Watanabe K I, et al. Shared molecular characteristics of successfully transformed mitochondrial genomes in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Plant Molecular Biology, 2005, 58(4): 515–527.
- [74] Remacle C, Cardol P, Coosemans N, et al. High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in *complex I* genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(12): 4771–4776.
- [75] Specht E A, Mayfield S P. Algae-based oral recombinant vaccines[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 60.
- [76] Jones C S, Mayfield S P. Steps toward a globally available malaria vaccine: Harnessing the potential of algae for future low cost vaccines[J]. Bioengineered, 2013, 4(3): 164–167.
- [77] Tisch R, Yang X D, Singer S M, et al. Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice[J]. Nature, 1993, 366(6450): 72–75.
- [78] Keam S J, Harper D M. Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix] [J]. Drugs, 2008, 68(3): 359–372.
- [79] Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2010[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(9): 917–924.
- [80] Mansfield E, Amlot P, Pastan I, et al. Recombinant RFB4 immunotoxins exhibit potent cytotoxic activity for CD22-bearing cells and tumors[J]. Blood, 1997, 90(5): 2020–2026.
- [81] Rasala B A, Muto M, Sullivan J, et al. Improved heterologous protein expression in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* through promoter and 5' untranslated region optimization[J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(6): 674–683.
- [82] Corchero J L, Gasser B, Resina D, et al. Unconventional microbial systems for the cost-efficient production of high-quality protein therapeutics[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(2): 140–153.
- [83] Larson M A, Wei S H, Weber A, et al. Human serum amyloid A3 peptide enhances intestinal MUC3 expression and inhibits EPEC adherence[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 300(2): 531–540.
- [84] Mack D R, McDonald T L, Larson M A, et al. The conserved TFLK motif of mammary-associated serum amyloid A3 is responsible for up-regulation of intestinal MUC3 mucin expression in vitro[J]. Pediatric Research, 2003, 53(1): 137–142.
- [85] Polizeli M L, Rizzatti A C, Monti R, et al. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(5): 577–591.
- [86] Han S, Hu Z, Lei A. Expression and function analysis of the metallothionein-like (MT-like) gene from *Festuca rubra* in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast[J]. Science in China Series C-life Sciences, 2008, 51(12): 1076–1081.
- [87] Wiley S R, Schooley K, Smolak P J, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. Immunity, 1995, 3(6): 673–682.