

# 植物叶绿体基因工程研究进展

程琳<sup>1</sup> 瞿波<sup>1,2</sup> 李和平<sup>2,3</sup> 廖玉才<sup>1,2</sup>

1. 华中农业大学植物科技学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学麦类作物分子生物技术实验室, 武汉 430070;  
3. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

**摘要** 植物叶绿体基因工程与细胞核基因工程相比, 具有许多独特的优势, 如能够实现外源基因特异整合及高效表达、多基因共表达、外源基因不会随花粉扩散、没有位置效应和基因沉默等。目前已在 16 种植物中成功获得叶绿体转基因植株, 改良了植物的农艺性状, 特别是在烟草叶绿体中高效表达了 40 多种外源蛋白, 包括多种抗体和疫苗。尽管如此, 这项技术目前尚未用于主要粮食作物的性状改良。本文综述了植物叶绿体基因工程的原理、技术、应用、难点及进展。

**关键词** 质体转化; 叶绿体; 筛选标记基因; 植物生物反应器

**中图分类号** Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)02-0249-11

植物叶绿体由前质体分化而来, 在进化上源于内共生细菌<sup>[1]</sup>, 因而叶绿体保留了许多原核细胞的特性, 如多顺反子、基因转录及蛋白质翻译, 均与细菌相似。但经过千万年的进化, 叶绿体基因组中大部分基因已转移到核基因组中, 其自身的新陈代谢也受核基因调控; 叶绿体中主要保留了三类功能基因: 光合作用、表达调控和生物合成。叶绿体通过光合作用合成重要的氨基酸类物质, 是植物细胞首要的能量来源, 在植物生长发育和细胞新陈代谢过程中具有非常重要的作用<sup>[2]</sup>。

植物叶绿体转基因技术, 是经过同源重组将外源基因定点整合到叶绿体基因组中, 这与常规的细胞核转基因技术不同。高等植物细胞的叶绿体数目多, 每个细胞含 100 个左右, 而 1 个叶绿体中又存在约 100 个叶绿体基因组<sup>[3]</sup>, 所以 1 个植物细胞的叶绿体基因组拷贝数可高达 10 000。因此, 植物叶绿体转基因技术的发展及应用具有一些重要特点。本文扼要综述了叶绿体转基因技术原理、发展历程及一些最新研究进展。

## 1 叶绿体基因工程原理

将外源 DNA 转入叶绿体首先需要通过几层物理障碍: 细胞壁、原生质体膜及叶绿体双层膜。目

前, 最有效同时也是应用最广泛的转化方法是将外源基因包裹在金粉或者钨粉颗粒表面, 通过高压气体的驱动, 将其转入细胞内, 也就是我们通常所说的基因枪转化法。该方法最早被应用于洋葱表皮细胞的基因转化<sup>[5]</sup>, 随后, 经过改良的基因枪法被应用到更小的细胞类型和细胞器的基因转化中, 如单细胞生物衣藻<sup>[6]</sup>和烟草的叶绿体转化<sup>[7]</sup>。其他较为复杂的转化方法也逐渐发展起来, 如 PEG 介导的原生质体转化<sup>[8]</sup>和直接将 DNA 通过显微注射的方法注入细胞器中<sup>[9]</sup>。尽管 PEG 介导的质体转化技术在酶解细胞壁和原生质体的分化再生方面积累了一定的经验, 但是该项技术还仅限于在部分实验室进行研究。而显微注射技术对仪器有特殊的要求, 这也极大地限制了该项技术的应用, 所以截止到目前并没有应用该项技术成功获得叶绿体转基因植株的报道。目前, 基因枪法仍为应用最广泛的叶绿体转化的方法。迄今为止, 得到的叶绿体转基因植株汇总于表 1 和表 2, 大多数是通过基因枪法转化得到。

当外源基因进入叶绿体后, 通过同源重组双交换的模式外源基因定点插入到叶绿体基因组的特定位点中, 稳定整合的外源基因在细胞分裂时可以复制并进入到新分裂出的细胞中。每 1 个叶绿体约含有 100 个拷贝的叶绿体基因组, 每 7~10 个拷贝聚

收稿日期: 2011-01-27

基金项目: 国家“863”计划重点项目(2007AA100505)和国际合作项目(2009DFA32330)

程琳, 博士研究生。研究方向: 植物叶绿体基因工程。E-mail: chenglin403@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 廖玉才, 博士, 教授。研究方向: 植物分子生物技术。E-mail: yucailiao@mail.hzau.edu.cn

表 1 叶绿体转基因技术在作物改良方面的应用

Table 1 Chloroplast transgenic technology applications in crop improvement

物种 Species	同源整合位点 Homologous recombination site	整合的外源基因 Transgene	转化效率 Transformation efficiency
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> <sup>[10]</sup>	trnV-rps7/12	<i>aadA+uidAa</i>	1/1(100.0%)
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> <sup>[4]</sup>	accD-rbcL	<i>aadA</i>	2/201(0.9%)
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i> <sup>[11]</sup>	accD-rbcL-rrn16-rps7/3	<i>aadA+gfp</i>	3/104(2.8%)
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i> <sup>[12]</sup>	accD-rbcL	<i>aadA+gfp</i>	14/435(3.2%)
番茄 <i>S. lycopersicum</i> <sup>[13]</sup>	trnM-rps14	<i>aadA</i>	1~3/20(5.0%~15.0%)
<i>Lesquerella fendleri</i> <sup>[14]</sup>	trnV-rps12/7	<i>aadA+gfp</i>	2/51(3.9%)
矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i> <sup>[15]</sup>	accD-rbcL	<i>aadA+gusA</i>	3/31(9.6%)
大豆 <i>Glycine max</i> L. <sup>[16]</sup>	trnV-rps12/7	<i>aadA</i>	11/80(13.7%)
胡萝卜 <i>Daucus carota</i> L. <sup>[17]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+badh</i>	1/7(14.0%)
棉花 <i>Gossypium hirsutum</i> <sup>[18]</sup>	trnI-trnA	<i>aphA-6+nptII</i>	1/2.4(41.6%)
莴苣 <i>Lactuca sativa</i> L. <sup>[19]</sup>	accD-rbcL	<i>aadA+gfp</i>	5/85(5.8%)
杨树 <i>Populus alba</i> <sup>[20]</sup>	rbcL-accD	<i>aadA+gfp</i>	44/120(36.6%)
水稻 <i>Oryza sativa</i> <sup>[21]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+gfp</i>	2/100(2.0%)
花椰菜 <i>Brassica oleracea</i> <sup>[22]</sup>	accD-rbcL	<i>aadA</i>	1/5(PEG)
卷心菜 <i>Brassica oleracea</i> L. <sup>[23]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+uidA</i>	3~5/150(2.0%~3.0%)
卷心菜 <i>Brassica oleracea</i> L. <sup>[24]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+Cry1Ab</i>	8/100(8.0%)
甜菜 <i>Beta vulgaris</i> <sup>[25]</sup>	rrn16-rps12	<i>aadA+gfp</i>	3/40(7.5%)
油菜 <i>Brassica napus</i> <sup>[26]</sup>	rps7-ndhB	<i>aadA+Cry1Aa10</i>	4/1000(0.4%)
油菜 <i>Brassica napus</i> <sup>[27]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+has</i>	19/82(23.1%)

表 2 叶绿体转基因技术在生物反应器方面的应用

Table 2 Chloroplast transgenic technology in the application of bioreactor

改良植物 Species	同源重组位点 Homologous recombination site	外源基因 Transgene	性状或所表达的蛋白 Traits or proteins expressed
烟草 <sup>[28]</sup> 1)	rbcL-orf512	<i>aadA+EPSPS</i>	抗除草剂 Herbicide resistance
烟草 <sup>[29]</sup>	rbcL-accD	<i>aadA+Cry2Aa2</i>	抗虫 Insect resistance
烟草 <sup>[30]</sup>	rbcL-accD	<i>aadA+bar</i>	抗除草剂 Herbicide resistance
烟草 <sup>[31]</sup>	trnV-rps7/3	<i>aadA+hST</i>	人类生长素 Human therapeutic protein
烟草 <sup>[32]</sup>	trnV-rps7/3	<i>aadA+EPSPS</i>	抗除草剂 Herbicide resistance
烟草 <sup>[33]</sup>	trnV-orf131	<i>aadA+MSF-99</i>	抗病 Bacteria and fungi resistance
烟草 <sup>[34]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+Cry2Aa2</i>	抗虫 Insect resistance
烟草 <sup>[35]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+CTB</i>	霍乱毒素 Cholera toxin B subunit
烟草 <sup>[36]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+TPS1</i>	抗旱 Drought tolerance
烟草 <sup>[37]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+merB+merA</i>	环境修复 Phytoremediation
烟草 <sup>[38]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+hsa</i>	人血清白蛋白 Human serum albumin
烟草 <sup>[39]</sup>	trnI+trnA	<i>aadA+Guy's 13</i>	单克隆抗体 Monoclonal antibody
烟草 <sup>[40]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+pag</i>	炭疽热保护抗原 <i>Bacillus anthracis</i> protective
烟草 <sup>[41]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+IGF-1</i>	胰岛素类生长因子 Insulin-like growth factor
烟草 <sup>[42]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+phaA</i>	细胞质雄性不育 Cytoplasmic male sterility
烟草 <sup>[43]</sup>	trnI-trnA	<i>cry9Aa2+aadA</i>	抗虫 Insect resistance
烟草 <sup>[44]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+mon</i>	莫内林 Monellin
烟草 <sup>[45]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+IFN-α2b</i>	α-2b 干扰素 Interferon-α2b
烟草 <sup>[46]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+CTB-2L21</i>	动物疫苗 Vaccine
烟草 <sup>[47]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+LecA</i>	变形虫病疫苗 Amoebiasis vaccine
烟草 <sup>[48]</sup>	accD-rps12	<i>aadA+ASA2</i>	氨基苯甲酸合酶 Anthranilate synthase [α]-subunit
烟草 <sup>[49]</sup>	trnV-rps12/7	<i>aadA+A27L</i>	牛痘病毒外壳蛋白 Vaccinia virus envelope protein A27L
烟草 <sup>[50]</sup>	trnV-rps12/7	<i>gfp+TetC</i>	破伤风毒素 C 亚基 Tetanus toxin fragment C
烟草 <sup>[51]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+PDF1B</i>	放线酰胺素抗性 Actinonin resistance
烟草 <sup>[52]</sup>	rrn16-trnI	<i>aadA+VP-Bgus</i>	口蹄疫病毒抗原决定基 Foot and mouth disease virus epitope
烟草 <sup>[53]</sup>	trnI-trnA	<i>aadA+gfp+RC101/PG1</i>	抗菌肽 Antimicrobial peptides

1) *Nicotiana tabacum*

集在一起形成一种类核结构。每个细胞约含有 100 个叶绿体, 1 次同源重组过程只在 1 个叶绿体基因组拷贝中插入外源基因, 而细胞中含有上万个叶绿体基因组拷贝, 所以插入了外源基因的叶绿体基因组只占较少的数目, 这样就形成了叶绿体转化的异质体。异质体在遗传上是不稳定的, 因此, 必须想办法去除野生型的叶绿体基因组拷贝, 得到的同质体才具有遗传稳定性。在植物细胞分裂、生长和分化过程中, 质体 DNA 的分配是随机的。有研究表明, 在没有筛选压的情况下, 只有很小部分的转化质体能够传递到新分裂的细胞中<sup>[54]</sup>。为了提高转化效率, 有效地去除野生型叶绿体基因组, 必须通过有效的抗生素筛选和成功的再生体系, 才能实现转化植株的同质化。曾有报道表明, 在筛选压存在的情况下, 大约经过 20~30 个细胞分裂周期, 才有可能去除野生叶绿体基因组<sup>[55-56]</sup>。因此, 为了使外植体的筛选时间足够长, 一个成熟的再生体系也是成功实现叶绿体转化必不可少的。但是目前很多植物还无法实现从完全脱分化的组织通过组织培养再生出正常植株。烟草是进行叶绿体转化最为成功的植物, 因此目前很多探索性的工作都是围绕烟草展开。

## 2 叶绿体中外源基因的整合与调控

### 2.1 同源重组片段

农杆菌介导的遗传转化所用的载体通常为通用载体, 外源基因表达框架两端为短的骨架区域<sup>[57]</sup>, 称为左边界(LB)和右边界(RB), 这些序列能够保证外源基因随机插入到宿主基因组中的任何位置。与此完全不同的是, 叶绿体遗传转化是通过同源片段间发生同源重组双交换, 将外源基因定点插入到宿主叶绿体基因组的特定位点。因此, 只要将特定位点两端的序列作为同源重组片段构建在转化载体中, 就可以将外源基因插入到该位点中<sup>[58]</sup>, 这不仅可以将外源基因表达框架插入到特定位点, 还能利用这个特点进行质体基因组功能研究和基因敲除<sup>[55]</sup>。目前基因间的序列通常被作为插入位点, 这样不仅能够避免外源基因插入对细胞本身的负面影响, 同时还能避免对内源基因的表达造成干扰。截止到目前, 叶绿体中有 13 个位点已被作为外源基因的插入位点, 如 *rbcL/accD*、*trnI/trnA*、*trnV/rps7*、*psbA/trnK* 等, 证明外源基因在叶绿体环状基因组的很多位点上都是可以表达的。基因敲除是指在体

外将目的序列进行突变, 然后通过定点插入的方法将突变的序列替换掉基因组内的原始序列。以烟草为例, 许多研究围绕基因敲除技术展开, 对质体基因进行功能研究。

为了提高重组效率, 一般使用 1~2 kb 的内源 DNA 序列做为同源重组片段, 研究表明, 进行叶绿体转化时, 并不需要针对每个物种构建位点特异性转化载体, 这与叶绿体基因组的高度保守性是相关的<sup>[59]</sup>。事实上, 包含有烟草叶绿体序列的转化载体同样可以作为番茄<sup>[13]</sup>、马铃薯<sup>[11]</sup>和矮牵牛叶绿体转化的载体<sup>[15]</sup>。近期也有关于叶绿体通用转化载体的相关报道<sup>[60-61]</sup>。

### 2.2 启动子和非翻译区

为了保证外源基因在叶绿体中能够高效表达, 启动子和调控序列的选择是至关重要的。由于叶绿体起源于内共生细菌, 所以叶绿体内蛋白质的转录和翻译过程与原核细胞非常类似, 如基因以多顺反子形式存在, 密码子的偏爱性等。但是, 叶绿体经过长期的进化, 基因重组和表达调节在质体中是存在的, 而且还有内含子剪切和 RNA 编辑过程, 这些现象在细菌中是不存在的。调控序列能显著提高外源基因在叶绿体中的转录、翻译效率及 RNA 的稳定性。目前使用最多的是 16S rDNA 基因的启动子 *Prrn*<sup>[62-64]</sup>和光系统 II 作用中心的启动子 *PpsbA*<sup>[10]</sup>。常用的终止子是叶绿体 *psbA* 基因终止子 *TpsbA* 和 *rps16* 基因终止子 *Trps16*<sup>[65]</sup>。

在质体中, 基因表达和蛋白质翻译调控方面与原核生物又有显著的不同, 因此, 5'非翻译区和 5'调控序列对 RNA 的稳定性和蛋白的高效翻译是必不可少的。在细菌中, 所有的 mRNA 在翻译的初期都包含一段 Shine-Delgarno 序列, 以保证蛋白翻译的准确起始。而在叶绿体中, 只有 40% 的 mRNA 含有这段序列, 这说明叶绿体中还含有与之不同的调控序列<sup>[66]</sup>, 许多研究也证实了这一点。例如, Eibl 等<sup>[67]</sup>研究发现, 当对 5'-UTR 区进行适当改变后, 报告基因 *uidA* 的蛋白积累量是原来的 100 倍。不仅仅是非翻译区, 开放阅读框的第 1 个密码子对翻译效率的影响也非常显著<sup>[63-64]</sup>。当对上述区域进行适当调整后, 有可能实现蛋白的高水平表达。当使用 *Prrn* 启动子融合大肠杆菌 T7 噬菌体基因 10 的 5'-UTR 区域, 使目的蛋白积累量达到总可溶性蛋白(TSP)的 70%<sup>[68]</sup>。如此之高的重组蛋白表达量显示出叶绿体巨大的蛋白生物合成潜力, 但同时



也应看到超高的外源蛋白积累量会对植物的生长发育造成损害<sup>[69]</sup>。尽管如此,仍有许多报道显示在质体中实现了许多毒蛋白的高效表达。

### 2.3 外源基因的积累和基因表达调控

目前植物基因工程面临的一个首要任务是如何一次将 2 个甚至多个基因转入有机体。通常情况下,不同基因分别构建在不同的表达框架中,各自包含启动子和终止子。相反,质体基因组具有表达多顺反子的潜力,也就是将多个基因以多顺反子的形式构建在一个转化载体中,多个基因共用一个启动子和终止子。转录产物以多顺反子形式存在,翻译时从各自的起始位点开始<sup>[70]</sup>。但是,除了以多顺反子形式表达 *cry2Aa2* 基因获得成功<sup>[34,71]</sup>,目前这项技术并未用于同时表达 2 种或 2 种以上融合蛋白,这在很大程度上与多顺反子转录产物复杂的二级结构及不可预测的相互间的互作有关,而二级结构恰恰对翻译产物的稳定性和 mRNA 进一步加工有关,最终导致外源蛋白的积累量非常低。尽管质体的转录和翻译过程与细菌惊人相似,也不能轻易认为是完全相同。例如,在大肠杆菌中能够较好地表达血红素  $\alpha$  和  $\beta$  亚基,而当整合到质体中,未检测到该蛋白的表达<sup>[72]</sup>。近期有报道表明,有一种称为多顺反子区域表达因子的短序列,能够介导多顺反子的剪切以形成稳定的单顺反子转录产物<sup>[73]</sup>。这个因子的发现,将会成为新的研究热点以提高重组蛋白的表达量。

另外一个挑战是如何使外源蛋白在质体中既能够高效表达,又不会对植物本身的新陈代谢过程和生长发育造成不良影响。大多数启动子如 *Prrn* 都是组成型表达,受到一些调控因子的调节。在叶绿体的光合作用中,5'-UTR 区域的转录产物对蛋白质的翻译起到重要的调控作用。例如,有研究显示光能够调节 *psbA* 基因 mRNA 的转录<sup>[74]</sup>,同时还能使 RNA 水平维持恒定不变<sup>[75]</sup>。但当光线不能在合适的时间诱导外源基因的表达时,就需要通过化学或物理手段来诱导。一种较为复杂的方法是将外源基因放在噬菌体 T7 启动子的控制下,该启动子在质体中通常是没有活性的,外源基因只有受到相应的 T7 RNA 聚合酶的诱导时才会表达。而 T7 RNA 聚合酶通常只有通过与在细胞核基因中含有该酶基因的植物间进行杂交,并融合质体中的一段信号肽时,才具有诱导作用<sup>[76]</sup>。为了向该系统中增加调控因子,其他研究中用到的可诱导的核基因中

的启动子来调控核基因的表达,例如来源于烟草的水杨酸诱导型启动子 PR-1a<sup>[77]</sup> 或者乙醇诱导启动子<sup>[78]</sup>。这个方法的缺陷在于 2 个相对独立的转化系统或者 2 个不同的转化子在遗传杂交后必须得到完整的植株。现在大肠杆菌乳糖操纵子系统 lacI 抑制因子也被用于质体表达体系。因此,在质体中, lacI 抑制子必须与异源基因 (*gfp*) 同时受到 *rrn/T7g 10* 启动子的控制<sup>[79]</sup>,然后用 IPTG 对植物进行喷雾以诱导 *gfp* 基因的表达,但这个体系还需要在其他植物中验证其可行性。

## 3 叶绿体转基因材料的筛选

### 3.1 筛选标记基因

在目前的叶绿体筛选体系中,壮观霉素抗性基因已成为必不可少的筛选标记之一,壮观霉素是质体特异性靶向原核核糖体从而抑制蛋白质生物合成的一种抗生素。16S rRNA 是壮观霉素的靶位点,这个基因的突变也会使细胞对壮观霉素、链霉素和林可霉素产生抗性,在早期的质体转化中常使用突变的该基因作为筛选标记基因。但由于内源基因突变体对植物本身而言是隐性的,所以使用这个突变基因作为筛选标记基因时的转化效率非常低<sup>[7]</sup>。*aadA* 基因编码氨基糖苷-3-腺苷酸转移酶 (aminoglycoside-3-adenyltransferase),使转化植株具有抗壮观霉素和链霉素的能力,在筛选过程中能够将绿色的转化细胞和白化的非转化细胞区分开,是目前在质体转化中使用范围最广、筛选效率最高的筛选标记基因<sup>[62]</sup>。

随着研究的深入,发现经过高筛选压的长期筛选,因基因突变而产生抗性的情况时有发生,因而使用其他筛选标记基因作为质体转化的筛选基因也逐渐发展起来。例如卡那霉素,研究表明并未发现某种高等植物对其具有抗性,因而卡那霉素作为独特的筛选标记基因也在叶绿体转化中应用起来。第 1 例使用 *neo* 基因(编码新霉素磷酸转移酶)作为筛选标记,获得叶绿体转化植株的植物是烟草<sup>[80]</sup>,但转化率仍比 *aadA* 作为筛选标记时低很多。Huang 等<sup>[81]</sup>将来源于鲍氏不动杆菌的新霉素磷酸转移酶作为筛选标记基因应用于质体转化中,获得了较高的转化效率。虽然上述抗生素筛选标记在质体转化中得到应用,但是截止到目前,在质体转化中,仍未有其他基因可以取代 *aadA* 基因成为应用最广泛的抗生素类筛选标记基因<sup>[17-18]</sup>。

### 3.2 其他筛选标记

将对一些毒性因子有抗性的基因插入到基因组中,使转化细胞对毒性因子产生抗性,如抗除草剂基因,然后使用除草剂作为筛选剂,这种方法被广泛地应用于核基因转化中,同样这种方法也可以应用于质体转化筛选。草甘膦是一种广谱除草剂,它通过竞争芳香族氨基酸合成途径中的关键酶 EPSPS 从而抑制芳香族氨基酸的生物合成。在植物中,EPSPS 是一种核基因编码、叶绿体定位的酶,可以通过超量表达 EPSPS 或者超量表达酶的变体来降低与除草剂的亲和力,从而达到对除草剂产生抗性的目的。细菌提供了多种对草甘膦不敏感的 EPSPS 酶基因,并可以显著地降低该酶对草甘膦的亲和力,其突变等位基因同样能够应用于基因工程使作物获得除草剂抗性。在烟草叶绿体转化以期得到优化的草甘膦抗性植株的探索中,主要是围绕以下 3 个策略进行:检测不同来源的 EPSPS 基因的抗性、调整密码子偏爱性以及使用不同的表达信号(启动子,5'-UTR,N 端终止信号)来优化 EPSPS 的表达<sup>[32]</sup>。叶绿体基因组同样适合其他抗除草剂基因的表达,如草丁膦抗性基因。叶绿体表达的 *bar* 基因编码的、使除草剂失活的 PAT 酶,可以使其获得较高水平的积累(占植物总可溶性蛋白的 7% 以上),并使转化植株获得田区水准的抗除草剂能力<sup>[82]</sup>。有趣的是,尽管进行了很多努力,将除草剂基因作为筛选标记基因应用于叶绿体转化均以失败告终,原因尚不明确,其中的一个可能性是除草剂会导致早期致死效应。目前广泛采用的抗生素筛选是非致死效应,它只会抑制质体的翻译过程。

来源于菠菜的甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase,BADH)可以把有毒的甜菜醛(betaine aldehyde,BA)转化为无毒的甘氨酸甜菜碱(glycine betaine,GA)。Daniell 等<sup>[83]</sup>将 *BADH* 基因作为烟草叶绿体基因组转化的筛选标记基因转入烟草叶绿体中。与 *aadA* 基因作为筛选标记基因相比,转化效率明显提高,而且 GA 作为一种渗透保护剂,提高了植株的再生率。菠菜中本身就含有该基因,减轻了人们对转基因作物的忧虑。尽管如此,*BADH* 基因作为质体转化的筛选标记基因还缺乏在其他植物中获得成功的报道。为了在获得能够稳定遗传的叶绿体转化植株的同时又消除公众对抗生素筛选标记的忧虑,最稳妥的方法就是利用抗生素标记基因进行筛选,然后在转基因植株中去除抗生

素标记基因。

### 3.3 标记基因的去除

理论上来说,当转化细胞达到同质化状态后,标记基因就失去了存在的必要性,它的存在不但制约着同一筛选标记的再次利用,还加剧了公众对于食品安全和环境安全的担忧。Cre-lox 是噬菌体 P1 的一类位点特异重组系统,该系统由 38.5 ku Cre 重组酶和 34 bp *lox* 位点组成。野生型的 *lox* 位点被称为 *loxP*,包含 2 个 13 bp 的反向重复序列和 1 个 8 bp 的间隔区域<sup>[84-85]</sup>。当没有重组酶存在时,基因组内的这些位点是稳定的。叶绿体位点特异重组分 2 步,首先在筛选标记基因两侧添加重组酶识别位点并将载体转入叶绿体基因组,得到叶绿体转化植株。同时将含有重组酶基因的载体转化入植物核基因组中,使其编码的重组酶定向进入叶绿体基因组中完成筛选标记基因的切除。

需要强调的是,在叶绿体中同源重组会随机发生在有一定长度的重复序列之间,利用这个特点也可以去除筛选标记基因<sup>[30]</sup>,但这个方法会造成外源基因非预期的重排或丢失<sup>[63]</sup>。这个现象起初是在外源表达框架两侧含有重复序列如重复的启动子或终止子时观察到的。因此,为了避免这个现象的出现,应选用不同种间的调控序列,以避免非预期交换的发生。

## 4 叶绿体基因工程的应用

### 4.1 叶绿体生物反应器研究

将植物叶绿体作为生物反应器进行生物制药、表达药用蛋白和疫苗,具有许多独特的优势。它可以大大降低生产和运输成本、外源蛋白稳定性高、易于纯化等。这些独特的优势使叶绿体基因组成为生产食用蛋白和人类药用蛋白的理想平台。

Lentz 等<sup>[52]</sup>在烟草叶绿体中高效表达了含有口蹄疫病毒 VP1 蛋白 135~160 种免疫表位氨基酸残基的口蹄疫病毒蛋白。为了提高外源蛋白的积累水平,外源蛋白在表达时融合了 *uidA* 基因(一种报告基因)。重组后的蛋白在成熟叶片中占叶片总可溶性蛋白的 51%,这一表达量远远高于野生植物叶片中积累量最大的蛋白 Rubisco 大亚基。尽管外源基因在烟草叶绿体中具有如此高的表达量,转基因烟草在植株外型上与野生型植株无显著区别。植物表达的口蹄疫蛋白在对老鼠进行免疫后,老鼠表现出较强的免疫反应,证明了该蛋白具有较高的免疫

原性。

在治疗细菌和病毒感染过程中,RC101 和 PG1 是 2 种非常重要的抗菌肽,尤其是对 HIV-1 或通过性传播的多种细菌和病毒具有很强的抗性。但是由于这 2 种抗菌肽具有极其复杂的空间结构,目前还很难在微生物中表达,而通过化学方法合成则非常昂贵。Lee 等<sup>[53]</sup>构建了含有 RC101 和 PG1 序列的叶绿体转化载体,在基因的末端融合了 GFP、His-tag 标签和弗林蛋白酶或 Factor Xa 因子蛋白酶,以方便在外源基因表达后能够进行纯化和切割。经过 Southern 杂交分析,获得了同质化的含有 RC101 基因的烟草叶绿体转化植株。RC101 和 PG1 的蛋白积累量达到总可溶性蛋白的 32%~38% 和 17%~26%。RC101 和 PG1 蛋白在体外经过切割,从 GFP 上分离得到,而且在叶绿体内观察到 Xa 因子蛋白活性,在叶绿体内通过激光共聚焦观察到了荧光。RC101 叶绿体转化植株表现出对烟草花叶病毒等具有抗性。截至到目前,只有在高等植物的叶绿体中表达出 RC101 和 PG1 这 2 种蛋白,表明叶绿体表达系统具有微生物表达系统及化学合成所不具有的优势。

人类免疫缺陷病毒(AIDS)Gag 区域的多聚蛋白前体结构是开发 HIV-1 型病毒疫苗的主要候选区域之一,但是该蛋白在植物中的表达量却非常低。Scotti 等<sup>[86]</sup>研究了影响 Pr55gag 序列在植物细胞中表达和积累的因素。通过在各亚细胞结构中进行该序列的瞬时表达发现,原始的 Pr55gag 序列只能在叶绿体中获得表达。经过农杆菌介导的烟草核基因转化、蛋白的叶绿体定位以及通过基因枪法转化烟草叶绿体基因组均获得了稳定的转化植株。叶绿体转化与核基因转化相比,Pr55gag 序列在转化叶绿体后达到相当高的蛋白积累水平(7%~8% TSP)。将 Pr55gag 多聚蛋白融合在叶绿体光合作用蛋白 RbcL 的 N 末端,可以将蛋白积累量提高 25 倍。在叶绿体中表达的 Pr55gag 多聚蛋白具有与病毒蛋白非常类似的空间结构,且在植物的新老叶片中均可表达。由叶绿体表达的 Gag 蛋白可以在昆虫细胞和大肠杆菌系统中组装成杆状病毒样颗粒。这些结果表明,叶绿体转化对于利用植物细胞生产 HIV 抗体是一个非常有用的工具。

Soria-Guerra 等<sup>[87]</sup>在烟草叶绿体中成功表达了包含白喉棒状杆菌、百日咳和破伤风杆菌的具有免疫保护源性的外毒素抗原表位融合蛋白 DPT。

ELISA 结果证实 DPT 融合蛋白保留了这 3 个组成部分的抗原性,而且在植物叶绿体中获得了较高的蛋白表达量(0.8% TSP)。为了评估烟草叶绿体中表达的重组蛋白在动物实验中是否能诱导出特异性抗体,还进行了将蛋白喂养老鼠试验。将晒干的叶绿体转基因叶片对老鼠进行口服免疫,结果表明在老鼠的血清和粘膜组织中检测到每个毒素的特异性抗体。

炭疽是由炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)引起的一种急性传染病,传统生产炭疽热抗原(anthrax antigen,PA)通常使用过滤法,但这种方法常会使其含有一些具有副作用的有毒因子。Watson 等<sup>[40]</sup>将编码 PA 的 *pagA* 基因导入到烟草叶绿体基因组,PA 的表达水平达总可溶蛋白的 18.1%。通过巨噬细胞毒性分析、小鼠免疫试验和毒性中和分析等试验,证实了叶绿体基因工程 PA 抗原具有正常的功能。由于 PA 的高水平表达,叶绿体转基因烟草可被用于 PA 疫苗的大量生产。

人血清白蛋白(human serum albumin, hsa)在临床医疗中用于治疗烧伤、失血引起的休克,防治低蛋白血症及肝硬化或肾病引起的水肿或腹水。Milan 等<sup>[38]</sup>将 HSA 转化烟草叶绿体基因组获得了成功,HSA 表达水平达到了总可溶蛋白的 11.1%,是细胞核转基因植物表达量的 500 倍。叶绿体转化技术在生物反应器方面的应用及发展情况见表 2。

## 4.2 改良农艺性状

基于叶绿体基因组及调控机制的特点,叶绿体转基因技术在提高农作物抗性及其改良作物农艺性状方面也已取得较大进展,为提高植物的抗虫、抗除草剂、抗病以及对增强干旱、盐碱等逆境的耐受性开辟了一条更为有效的途径。

源于其巨大的多样性,来源于芽孢杆菌的晶体蛋白为昆虫防治提供了丰富的抗虫蛋白来源。目前,不同 *cry* 基因编码的不同毒性蛋白已经转化到植物中,用于提高对不同种类昆虫的抗性,并且有多种植物通过核基因转化得到的抗虫蛋白已经进入商业化生产阶段早期,原核来源的 *cry* 基因因为密码子偏爱性与真核细胞不同,带来了一系列复杂的问题而影响了在转入植物基因组后基因的表达效率<sup>[88]</sup>。相反,向叶绿体基因组中转入该基因就不存在这些问题,*cry* 基因可得到很好的表达,既不需要调整密码子,也无需任何调控序列,叶绿体转基因叶片表现出对食草昆虫幼虫较强的毒性。有报道显



示,当 *cry* 基因作为一个上游有 2 个小的开放性阅读框的操纵子的一部分来表达时,最高表达量可达到细胞总可溶性蛋白的 45%。这种超高表达量主要归功于上游的一个开放性阅读框,它能编码一种伴侣素以帮助毒蛋白的正确折叠并依次促进蛋白在叶绿体内的晶体化。Maliga 等<sup>[43]</sup>在烟草叶绿体中成功表达了 Bt 基因以提高植物对马铃薯块茎蛾的抗性。结果表明 Cry9Aa2 毒蛋白积累量达到 10% TSP。然而,在植物中超量表达 Cry9Aa2 基因(10% TSP)也严重影响了植物的生长发育,导致植物生长迟缓。

通过叶绿体转化得到的植物具有较高的 Bt 表达量、Bt 蛋白积累的多抗性、组织特定定位点表达的特点可使毒蛋白只在某一组织对昆虫产生毒害作用,同时降低了昆虫产生耐抗性的机率。早在 2001 年,Daniell 等<sup>[34]</sup>在烟草叶绿体中超量表达 Bt 蛋白,成熟叶片中外源蛋白积累量达到 45.3%,而且外源蛋白相当稳定,在衰老褪绿的叶片中积累量仍维持较高水平(46.1% TSP)。经功能验证,叶绿体转基因叶片对目标昆虫的毒杀率达 100%。叶绿体转化技术在改良植物农艺性状方面的研究进展见表 1。

#### 4.3 叶绿体转化技术在基础研究方面的应用

植物叶绿体中存在大量的代谢途径,因此,它通常被形象地称为“植物细胞生物合成中心”。光合作用的机理的研究一直是个热点,Whitney 等<sup>[89]</sup>将细菌的 Rubisco 大亚基利用叶绿体转化技术取代烟草叶绿体的 Rubisco 大亚基,转化植株仍为自养型,证实了来自不同进化程度的 Rubisco 可以整合进高等植物的叶绿体,并可进行光合作用而不存在抑制方面的问题。尽管距离通过改善 Rubisco 活性来提高植物光合作用效率的目标还有很长的一段路,但是该研究为了解结构与功能之间的关系提供了新的切入点,并加深了研究者对植物生物合成中关键酶的理解。此外,利用叶绿体基因组转化技术还可以进行叶绿体基因结构、基因组进化、基因转录、基因翻译、RNA 编辑等多方面的研究。

### 5 我国植物叶绿体基因工程研究现状

我国植物叶绿体基因组转化研究起步较晚,截止到目前已建立了烟草<sup>[90-91]</sup>、油菜<sup>[26-27]</sup>、水稻<sup>[92]</sup>等植物的叶绿体转化体系。中国科学院侯丙凯等<sup>[26]</sup>以油菜子叶柄为外植体,成功实现了油菜叶绿体基

因组的定点转化,将外源基因 *cry1Aa10* 转入油菜,用转基因植株的叶片饲喂二龄小菜蛾发现幼虫死亡率较高,存活幼虫的生长也受到了明显的抑制。该研究首次实现了油菜叶绿体基因组的遗传转化,但只有对 PCR 产物进行 Southern 杂交鉴定的证据。笔者所在的实验室成功建立了一套适合叶绿体转化的油菜子叶外植体分化再生体系,并得到栽培品种油菜叶绿体转化植株<sup>[27]</sup>;通过对转化植株叶片的 DNA 进行 Southern 杂交分析,证明外源基因已整合到叶绿体基因组的特定位点中;通过对叶片 RNA 进行 Northern 杂交分析,表明外源基因在叶绿体中实现多顺反子表达;对转基因植株的 T1 代进行鉴定后证明外源基因成功遗传到下一代中。目前转基因植株的同质化筛选正在进行中。

### 6 展望

经过近年来的不懈努力,叶绿体转基因技术获得了巨大的进步,并为叶绿体转化技术向其他植物扩展奠定了基础。叶绿体转化后的筛选过程是冗长和复杂的,但由于它独特的优点和在外源蛋白表达、积累方面的巨大优势,这项技术仍值得继续深入研究。而且外植体均使用的是叶片或子叶等绿色组织,尚未有非绿色组织如愈伤组织实现成功转化的报道。因此,建立高效、快速的叶绿体基因组转化体系,扩大该项技术的应用范围是我国研究中面临的巨大挑战。相信在不久的将来,叶绿体基因工程将会在植物性状改良、基础研究及生物反应器等多个方面发挥巨大的作用。

#### 参 考 文 献

- [1] GOULD S B, WALLER R F, MCFADDEN G I. Plastid evolution[J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, 59: 491-517.
- [2] AHLERT D, RUF S, BOCK R. Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 15730-15735.
- [3] THOMAS M R, ROSE R J. Plastid number and plastid structural changes associated with tobacco mesophyll protoplast culture and plant regeneration[J]. Planta, 1983, 158: 329-338.
- [4] SIKDAR S R, SERINO G, CHAUDHURI S, et al. Plastid transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell Rep, 1998, 18: 20-24.
- [5] KLEIN T M, WOLF E D, WU R, et al. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells[J]. Nature, 1987, 327: 70-73.

- [6] BOYNTON J E, GILLHAM N W, HARRIES E H, et al. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles[J]. *Science*, 1988, 240: 1534-1538.
- [7] SVAB Z, HAJDUKIEWICZ P, MALIGA P. Stable transformation of plastids in higher plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 8526-8530.
- [8] GOLDS T, MALIGA P, KOOP H U. Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum* [J]. *BioTechnology*, 1993, 11: 95-97.
- [9] KNOBLAUCH M, HIBBERD J M, GRAY J C, et al. A galinstan expansion femtosyringe for microinjection of eukaryotic organelles and prokaryotes[J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 906-909.
- [10] Zoubenko O V, Allison L A, SVAB Z et al. Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome[J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 3819-3824.
- [11] SIDOROV V A, KASTEN D, PANG S Z, et al. Technical advance: stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker[J]. *Plant J*, 1999, 19: 209-216.
- [12] NGUYEN T T, NUGENT G, CARDI T, et al. Generation of homoplasmic plastid transformants of a commercial cultivar of potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *Plant Science*, 2005, 168: 1495-1500.
- [13] RUF S, HERMANN M, BERGER I J, et al. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 870-875.
- [14] SKARJINSKAIA M, SVAB Z, MALIGA P. Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed *Brassicaceae* [J]. *Transgenic Research*, 2003, 12: 115-122.
- [15] ZUBKO M K, ZUBKO E I, ZUILEN K, et al. Stable transformation of petunia plastids[J]. *Transgenic Res*, 2004, 13: 523-530.
- [16] DUFOURMANTEL N, PELISSIER B, GARCON F, et al. Generation of fertile transplastomic soybean[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55: 479-489.
- [17] KUMAR S, DHINGRA A, DANIELL H. Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance [J]. *Plant Physiol*, 2004, 136: 2843-2854.
- [18] KUMAR S, DHINGRA A, DANIELL H. Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes[J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 56: 203-216.
- [19] KANAMOTO H, YAMASHITA A, ASAO H, et al. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. *Cisco* (lettuce) plastids[J]. *Transgenic Research*, 2006, 15: 205-217.
- [20] OKUMURA S, SAWADA M, PARK Y W, et al. Transformation of poplar (*Populus alba*) plastids and expression of foreign proteins in tree chloroplasts[J]. *Transgenic Res*, 2006, 15: 637-646.
- [21] LEE S M, KANG K, CHUNG H, et al. Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny[J]. *Mol Cells*, 2006, 21(3): 401-410.
- [22] NUGENT G D, COYNE S, NGUYEN T T, et al. Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cauliflower) using PEG-mediated uptake of DNA into protoplasts [J]. *Plant Science*, 2006, 170: 135-142.
- [23] LIU C W, LIN C C, CHEN J W, et al. Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) by particle bombardment[J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26: 1733-1744.
- [24] LIU C W, LIN C C, YIU J C, et al. Expression of a *Bacillus thuringiensis* toxin (*cry1Ab*) gene in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) chloroplasts confers high insecticidal efficacy against *Plutella xylostella* [J]. *Ther Appl Genet*, 2008, 117: 75-88.
- [25] MARCHIS F D, WANG Y X, STEVANATO P, et al. Genetic transformation of the sugar beet plastome[J]. *Transgenic Res*, 2009, 18: 17-30.
- [26] HOU B K, ZHOU Y H, WAN L H, et al. Chloroplast transformation in oilseed rape[J]. *Transgenic Res*, 2003, 12: 111-114.
- [27] CHENG L, LI H P, QU B, et al. Chloroplast transformation of rapeseed (*Brassica napus*) by particle bombardment of cotyledons[J]. *Plant Cell Rep*, 2010, 29: 371-381.
- [28] DANIELL H, DATTA R, VARMA S, et al. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome[J]. *Nature Bio*, 1998, 16: 345-348.
- [29] KOTA M, DANIELL H, VARMA S, et al. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) *Cry2Aa2* protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 1840-1845.
- [30] IAMTHAM S, DAY A. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 1172-1176.
- [31] STAUB J M, GARCIA B, GRAVES J, et al. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts [J]. *Nature Bio*, 2000, 18: 333-338.
- [32] YE G N, HAJDUKIEWICZ P T, BROYLES D, et al. Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco [J]. *Plant J*, 2001, 25: 261-270.
- [33] GRAY G D, RAJASEKARAN K, FRANZINE S, et al. Expression of an antimicrobial peptide *via* the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi[J]. *Plant Physiol*, 2001, 127: 852-862.
- [34] DE-COSA B, MOAR W, LEE S B, et al. Over expression of the Bt *cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 71-74.
- [35] DANIELL H, LEE S B, PANCHAL T, et al. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts[J]. *J Mol Biol*, 2001, 311: 1001-1009.



- [36] LEE S B, KWON H B, KWON S K, et al. Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance [J]. *Molecular Breeding*, 2003, 11: 1-13.
- [37] RUIZ O N, HUSSEIN H S, TERRY N, et al. Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132: 1344-1352.
- [38] MILLAN A F S, MINGO-CASTEL A, DANIELL H, et al. A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation [J]. *Plant Biotech J*, 2003, 1: 71-79.
- [39] DANIELL H, COHILL P R, KUMAR S, et al. Chloroplast genetic engineering [J]. *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*, 2004: 443-490.
- [40] WATSON J, KOYA V, DANIELL H, et al. Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a non-food/feed crop [J]. *Vaccine*, 2004, 22: 4374-4384.
- [41] DANIELL H, CHEBOLU S, KUMAR S, et al. Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins [J]. *Vaccine*, 2005, 23(15): 1779-1783.
- [42] RUIZ O N, DANIELL H. Engineering cytoplasmic male sterility via the chloroplast genome by expression of  $\beta$ -ketothiolase [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138: 1232-1246.
- [43] KUMMAR S, LUTZ K A, MALIGA P, et al. Expression of the cry9Aa2 B. t. gene in tobacco chloroplasts confers resistance to potato tuber moth [J]. *Transgenic Res*, 2006, 15: 481-488.
- [44] ROH K H, SHIN K S, LEE Y H, et al. Accumulation of sweet protein monellin is regulated by the psbA 5' UTR in tobacco chloroplast [J]. *J Plant Biol*, 2006, 49: 34-43.
- [45] ARLEN P A, FALCONER R, CHERUKUMILLI S, et al. Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon- $\alpha$ 2b [J]. *Plant Biotech J*, 2007, 5: 511-525.
- [46] RUHLMAN T, AHANGARI R, DEVINE A, et al. Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts-oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice [J]. *Plant Biotech J*, 2007, 5: 495-510.
- [47] CHEBOLU S, DANIELL H. Stable expression of Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* in transgenic chloroplasts and immunogenicity in mice towards vaccine development for amoebiasis [J]. *Plant Biotechnol*, 2007, 5(2): 230-239.
- [48] BARONEL P, ZHANG X H, JACK M, et al. Tobacco plastid transformation using the feedback in sensitive anthranilate synthase [a]-subunit of tobacco (ASA2) as a new selectable marker [J]. *J of Exp Botany*, 2009(1): 1-8.
- [49] RIGANO M M, MANNA C, GIULINI A, et al. Transgenic chloroplasts are efficient sites for high-yield production of the vaccinia virus envelope protein A27L in plant cells [J]. *Plant Biotech J*, 2009, 7: 577-591.
- [50] MOCHOUX F, AHMAD N, MCCARTH J, et al. Contained and high-level production of recombinant protein in plant chloroplasts using a temporary immersion bioreactor [J]. *Plant Biotech J*, 2010, 8: 1-12.
- [51] FEMANDEZ-SAN, PATRICIA OBREGON, JON VERAMENDI. Over-expression of peptide deformylase in chloroplasts confers actinonin resistance, but is not a suitable selective marker system for plastid transformation [J]. *Transgenic Res*, 2010, 19: 329-338.
- [52] LENTZ E M, SEGRETIN M E, MORGENFELD M M, et al. High expression level of a foot and mouth disease virus epitope in tobacco transplastomic plants [J]. *Planta*, 2010, 231: 387-395.
- [53] LEE S B, LI B C, JIN S X, et al. Expression and characterization of antimicrobial peptides Retrocyclin-101 and Protegrin-1 in chloroplasts to control viral and bacterial infections [J]. *Plant Biotech J*, 2011, 9: 100-115.
- [54] LUTZ K A, MALIGA P. Plastid genomes in a regenerating tobacco shoot derive from a small number of copies selected through a stochastic process [J]. *Plant J*, 2008, 56: 975-983.
- [55] MALIGA P. Plastid transformation in higher plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2004, 55: 289-313.
- [56] VERMA D, DANIELL H. Chloroplast vector systems for biotechnology applications [J]. *Plant Physiol*, 2007, 145: 1129-1143.
- [57] LEE L Y, GELVIN S B. T-DNA binary vectors and systems [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146: 325-332.
- [58] CERUTTI H, OSMAN M, GRANDONI P, et al. A homolog of *Escherichia coli* RecA protein in plastids of higher plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 8068-8072.
- [59] LUTA K A, AZHAGIRI A K, TUNGSUCHAT-HUANG T, et al. A guide to choosing vectors for transformation of the plastid genome of higher plants [J]. *Plant Physiol*, 2007, 145: 1201-1210.
- [60] LUTZ K A, AZHAGIRI A K, TUNGSUCHAT T, et al. A guide to choosing vectors for transformation of the plastid genome of higher plants [J]. *Plant Physiol*, 2007, 145: 1201-1210.
- [61] VERMA D, DANIELL H. Chloroplast vector systems for biotechnology applications [J]. *Plant Physiol*, 2007, 145: 1129-1143.
- [62] SVAB Z, MALIGA P. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 913-917.
- [63] KURODA H, MALIGA P. Complementarity of the 16S rRNA penultimate stem with sequences downstream of the AUG destabilizes the plastid mRNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: 970-975.
- [64] KURODA H, MALIGA P. Sequences downstream of the translation initiation codon are important determinants of translation efficiency in chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125: 430-436.
- [65] HOU B K, YU H M, XIA G M. Expression vectors used in chloroplast genetic transformation [J]. *Hereditas*, 2002, 24(1): 100-103.

- [66] HAGER M, BOCK R. Enslaved bacteria as new hope for plant biotechnologists[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 54: 302-310.
- [67] EIBL C, ZOU Z, BECK A, et al. In vivo analysis of plastid psbA, rbcL and rpl32 UTR elements by chloroplast transformation; tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency[J]. *Plant J*, 1999, 19: 333-345.
- [68] OEY M, LOHSE M, KREIKEMEYER B, et al. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic[J]. *The Plant Journal*, 2009, 57: 436-445.
- [69] HENNING A, BONFIG K, ROITSCH T, et al. Expression of the recombinant bacterial outer surface protein A in tobacco chloroplasts leads to thylakoid localization and loss of photosynthesis[J]. *FEBS J*, 2007, 274: 5749-5758.
- [70] STAUB J M, MALIGA P. Expression of a chimeric *uidA* gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids[J]. *Plant J*, 1995, 7: 845-848.
- [71] QUESADA-VARGAS T, RUIZ O N, DANIELL H. Characterization of heterologous multigene operons in transgenic chloroplasts: transcription, processing, and translation [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138: 1746-1762.
- [72] MAGEE A M, HORVATH E M, KAVANAGH T A. Pre-screening plastid transgene expression cassettes in *Escherichia coli* may be unreliable as a predictor of expression levels in chloroplast-transformed plants[J]. *Plant Sci*, 2004, 166: 1605-1611.
- [73] ZHOU F, KARCHER D, BOCK R. Identification of a plastid intercistronic expression element(IEE) facilitating the expression of stable translatable monocistronic mRNAs from operons [J]. *Plant J*, 2007, 52: 961-972.
- [74] KIM J, MULLET J E. Ribosome-binding sites on chloroplast rbcL and psbA mRNAs and light-induced initiation of D1 translation[J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 25: 437-448.
- [75] SHIINA T, ALLISON, MALIGA P. rbcL Transcript levels in tobacco plastids are independent of light; reduced dark transcription rate is compensated by increased mRNA stability[J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 1713-1722.
- [76] MCBRIDE K E, SCHAAF D J, DALEY M, et al. Controlled expression of plastid transgenes in plants based on a nuclear DNA-encoded and plastid-targeted T7 RNA polymerase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 7301-7305.
- [77] MAGEE A M, HORVATH E M, KAVANAGH T A. Pre-screening plastid transgene expression cassettes in *Escherichia coli* may be unreliable as a predictor of expression levels in chloroplast-transformed plants[J]. *Plant Sci*, 2004, 166: 1605-1611.
- [78] LOSSL A, BOHMERT K, HARLOFF H, et al. Inducible trans-activation of plastid transgenes: expression of the *R. eutropha* phb Operon in transplastomic tobacco[J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46: 1462-1471.
- [79] MUHLBAUER S K, KOOP H U. External control of transgene expression in tobacco plastids using the bacterial lac repressor[J]. *Plant J*, 2005, 43: 941-946.
- [80] CARRER H, HOCKENBERRY T N, SVAB Z, et al. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco[J]. *Mol Gen Genet*, 1993, 241: 49-56.
- [81] HUANG F C, KLAUS S M, HERZ S, et al. Efficient plastid transformation in tobacco using the *aphA-6* gene and kanamycin selection[J]. *Mol Genet Genomics*, 2002, 268: 19-27.
- [82] LUTZ K A, KNAPP J E, MALIGA P. Expression of bar in the plastid genome confers herbicide resistance[J]. *Plant Physiol*, 2001, 125: 1585-1590.
- [83] DANIELL H, MUTHKUMAR B, LEE S B. Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection[J]. *Curr Genet*, 2001, 39: 109-116.
- [84] CORNEILLE S, LUTZ K, SVAB Z, et al. Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the CRE-lox site-specific recombination system[J]. *Plant J*, 2001, 27: 171-178.
- [85] HAJDUKIEWICZ P T, GILBERTSON L, STAUB J M. Multiple pathways for Cre/lox-mediated recombination in plastids [J]. *Plant J*, 2001, 27: 161-170.
- [86] SCOTTI N, ALAGNA F, FERRAILOLO E, et al. High-level expression of the HIV-1 Pr55<sup>gag</sup> polyprotein in transgenic tobacco chloroplasts[J]. *Planta*, 2009, 229: 1109-1122.
- [87] SORIA-GUERRA R E, ALPUCHE-SOLIS A G, ROSALES-MENDOZA S, et al. Expression of a multi-epitope DPT fusion in transplastomic tobacco plants retains both antigenicity and immunogenicity of all three components of the functional oligomer[J]. *Planta*, 2009, 229: 1293-1302.
- [88] DANIELL H, RUIZL G, DENES B, et al. Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of human insulin like growth factor-1 in transgenic chloroplasts and evaluation of structural identity and function[J]. *BMC Biotechnology*, 2009, 9: 33.
- [89] WHITNEY S M, ANDREWS T J. Plastome-encoded bacterial ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) supports photosynthesis and growth in tobacco[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 14738-14743.
- [90] 邹竹荣, 张中林, 山松, 等. 烟草叶绿体转化载体的构建及转基因植株的获得[J]. *作物学报*, 1998, 24(4): 410-415.
- [91] 张中林, 山松, 晨曦, 等. 除草剂抗性基因 bar 导入烟草叶绿体[J]. *作物学报*, 1999, 25(5): 574-578.
- [92] 李轶女, 孙炳耀, 苏宁, 等. 水稻叶绿体表达体系的建立及抗 PPT 叶绿体转化植株的获得[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(9): 1849-1855.

## Progress in chloroplast transformation in plants

CHENG Lin<sup>1</sup> QU Bo<sup>1,2</sup> LI He-ping<sup>2,3</sup> LIAO Yu-cai<sup>1,2</sup>

1. *College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

2. *Molecular Biotechnology Laboratory of Triticeae Crops, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

3. *College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** Chloroplast transformation in plants has many advantages over nuclear transformation. Proteins in chloroplasts can be expressed at high levels with proper folding and disulfide bonds as the cells of higher plants contain a large number of chloroplast genomes. Multiple genes can be co-expressed in chloroplast genomes. Furthermore, chloroplast genes are inherited in a strictly maternal fashion in most angiosperm plant species, and this minimizes the possibility of out-crossing transgenes to related weeds or species. In addition, gene silencing, position effects and random integration have not been reported in chloroplast transformation. Although chloroplast transformation is very attractive, this technology is not as widely used as nuclear transformation. It has been mostly focused on 16 plants species, especially tobacco in which many proteins has been expressed including vaccines and antibodies. In this review we briefly summarize the rationales, methodologies, applications, bottlenecks and prospects of this promising genetic engineering technology for chloroplasts.

**Key words** plastid transformation; chloroplast; selective marker gene; plant bioreactor

(责任编辑:杨锦莲)