

叶绿体基因工程 : 一种植物生物技术的新方法

Chloroplast Genetic Engineering : A New Approach in Plant Biotechnology

苏 涛¹ 詹亚光^{1*} 韩 梅² 郝爱平¹

SU Tao¹ , ZHAN Ya-Guang^{1*} , HAN Mei² and HAO Ai-Ping¹

1. 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

2. 东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

1. Life Science College, NEFU, Harbin, 150040, China

2. Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northern Eastern Forestry University, Harbin, 150040, China

摘 要 以叶绿体转化为主的叶绿体基因工程, 与传统的基因工程技术细胞核转化相比, 在外源基因表达水平和转基因植物安全性等方面有明显的优势, 尤其是在控制转基因沉默和遗传稳定性方面, 可以互补核转化带来的局限性。因此, 叶绿体基因工程是一种很具有发展前景的植物转基因技术, 并在未来工农业生物技术领域发挥重要作用。本文着重在叶绿体转化技术主要特点, 应用领域及其未来的发展前景等方面进行了简单评述。

关键词 叶绿体基因工程, 核转化, 转基因植物

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0674-07

Abstract Chloroplast genetic engineering, offers several advantages over nuclear transformation, including high level of gene expression, increased biosafety, remedying some limitations associated with nuclear genetic transformation, such as gene silencing and the stability of transformed genes. It is now regarded as an attractive new transgenic technique and further development of biotechnology in agriculture. In this article we reviewed the characteristics, applications of chloroplast genetic engineering and its promising prospects were discussed.

Key words chloroplast genetic engineering, nuclear transformation, transgenic plant

自从 1984 年首例转基因植物烟草问世, 向细胞核中转化外源基因已经成为植物基因工程中一种常规的方法, 并在多种作物上获得了转基因产品。但是, 随着研究技术的不断深入, 一系列的难以解决的问题也随之出现: 目的基因表达效率低, 在后代中表达不稳定, 同时导入多个基因时操作步骤过于复杂, 以及容易出现基因失活、基因沉默、位置效应等现象。更为重要的是, 由于核基因随花粉扩散, 转基因作物引发的环境安全问题难以保障^[1]。为了克服外源基因导

入细胞核所带来的这些弊端, 人们试图寻求一种可以互补这些不足的方法, 而作为一门新兴的转基因技术——叶绿体基因工程的出现, 能够克服传统核基因工程带来的如环境污染等全球性问题^[2]。

早在 1987 年, Klein 等人建立了一种将包含外源 DNA 的微金属粒子, 通过高速枪打入受体细胞的基因枪转化法^[3]; 1988 年 Boynton 等人利用基因枪转化体系, 以单细胞生物莱茵衣藻为材料, 经同源重组, 使突变体转化为能进行光合作

用的正常莱茵衣藻,证实了叶绿体转化是可行的,同时也是首例成功的叶绿体转化报道^[4],标志着叶绿体基因工程的诞生;1989年 Pal Maliga 等人首次在高等植物中实现了叶绿体转化^[5];1990年 Daniell 等人用基因枪法将外源目的基因氯霉素转移酶基因(CAT)导入叶绿体,在组培烟草细胞叶绿体中得到瞬间表达,为高等植物叶绿体基因工程提供了依据^[6]。由此,叶绿体基因工程迅速发展起来,随着人们对叶绿体基因表达调控的了解,以及转化技术手段的不断进步,现在,叶绿体基因工程已经成为在基础研究和应用领域的一门独特的转基因新技术^[7]。

1 叶绿体基因工程概述

1.1 叶绿体基因组的特点和转化方法

质体基因组产生于 15 亿年前,现今植物的祖先,可能是吞进光合细菌,光合作用产生自身所需的能量,经过不断的进化之后,除了小部分只携带 100 多个基因的原初质体独立存在,许多大于 3000 个基因的原初质体融合于细胞核中。植物细胞含有相似的细胞器,却拥有多种不同数量的质体,每个质体都有一套基因组,其中质体家族中最为特别的就是叶绿体——植物光合作用的场所。整个质体基因组序列表明,在高等植物中,质体拥有相当保守的基因组,叶绿体中混杂的外源 DNA 很少^[8]。相比植物线粒体,质体基因组的编码容量有相对少的种间变异^[9]。质体基因组是双链环形 DNA,是由基因高度压缩包装而成,含有大约 130 个基因;质体基因组不含组蛋白,基因的排列方式、调控方式、GC 碱基对含量及翻译所偏爱的密码子与原核生物相近,同时又具有某些真核生物的特点,所以,有利于来自原核和真核生物外源基因的直接表达^[10]。质体基因组处理多顺反子的能力及其精确、安全、高效等特点更有利于实现多基因的共转,避免基因沉默现象的发生。其表达产物在叶绿体中可完成二硫键交联、正确折叠等后转录修饰,具备生物活性^[11-12]。

质体基因组可以分为两大类^[13]:①和光合作用相关的基因;②遗传系统的基因,例如 rRNA, tRNA,核糖体蛋白以及 RNA 聚合酶亚基。叶绿体基因拷贝数和细胞核相比差异甚大,因此,修饰叶绿体基因组面临两个关键性的问题:Ⅰ是外源 DNA 穿过叶绿体的双层膜比核膜要困难;Ⅱ是叶绿体的基因组是以大量高拷贝数量存在的,极易出现异质体。为了保证获得的性状稳定遗传下去,遗传修饰的目的基因必须出现在每个细胞的每个质体拷贝中,如果出现异质体将会很快造成基因克隆的分离和遗传的不稳定性,植物多轮回选择和组培体系中的继代培养能够消除最初转化时的野生基因型,同源重组之后目的基因整合到宿主基因组中形成转化的质体^[7](如图 1)。

当今最为常用并且能够获得稳定质体的转化方法有两种:基因枪法(biostics)和 PEG(polyethylene glycol)法。基因枪法耗时少,程序简单而且经同源重组整合到叶绿体的外源基因表达水平高,也是现在之所以应用广泛的主要原因。PEG 法可以扩大 DNA 缺刻,常用来将具有生物活性的 DNA 导入

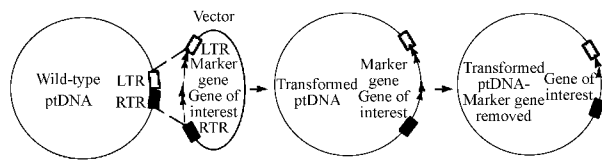


图 1 转化的质体基因组通过两次同源靶序列重组形成^[66]

Fig. 1 A transformed plastid genome is formed by two recombination events that are targeted by homologous sequences^[66]

植物核基因组^[14],也特别适合应用在叶绿体转化上,因为经过 PEG 处理的完整原生质体中的叶绿体双层膜也被 PEG 作用,虽然作用机理尚未明晰,但是,这种方法仍然是一种可靠而稳定的转质体基因技术^[15-17]。特别在烟草叶绿体转化中,将含有载体 DNA 的原生质体浸入 PEG 中都获得了稳定转化体系^[18-20]。其他方法如显微注射法^[21]注射外源基因到烟草光合叶细胞的叶绿体中,只产生了瞬时基因表达,并没有获得稳定的质体转化体系^[22];电融合法将 pH203-GUS 载体导入菠菜叶绿体中,实验证实获得了表达^[23-24]。此外,一些核转化常用的方法如农杆菌介导法,也应用到叶绿体转化上,但效果都很不理想,叶绿体的结构特点决定了最为常用的方法仍然是基因枪法和 PEG 法。

1.2 叶绿体转化的主要过程

叶绿体转化过程通常分四步:①转化载体携带外源目的基因通过基因枪法或其他转化体系导入叶绿体;②将外源表达框架整合到叶绿体的基因组里;③筛选具有转化的叶绿体细胞;④继代繁殖得到稳定的叶绿体转化植物^[7,25](如图 2)。用于转化的载体通过基因枪或其他的转化系统携带目的基因穿过质体双层膜,进入叶绿体,再将外源基因表达序列整合到叶绿体基因组中,并由在目的基因序列和叶绿体基因组中的相同序列中发生 RecA 型的同源重组^[16]。最初仅有少数的叶绿体基因含有外源 DNA,通过高筛选压,进行多代筛选后,转化的叶绿体基因代替了未转化的叶绿体基因,获得同质系^[26]。为了确保转化的效率,目的基因序列长度最好不要超过 4kb^[7],整合进质体基因组的外源基因序列应在与叶绿体基因组两翼同源区域相连^[27]。发生高效同源重组的片段最小长度虽然还不确定,但大多研究者认为旁侧序列的长度下限为 400bp,能够获得较好的重组频率。但是,到目前为止,目的基因旁侧序列的长度和转化效率之间是否具有明确的关系,还不甚清楚,转化依赖于供体和受体的同源水平多少也是未知。转基因植物的稳定性和目的基因两端的旁侧序列,以及整合位点的拷贝数有直接的关系^[7]。

最初,绝对同源的 DNA 序列被用作靶序列(target sequence)进行叶绿体转化。1999 年, Sidorov 等成功地将烟草质体 DNA 作为目的基因序列,转化到马铃薯的叶绿体基因组中^[28],说明在作物之间,不一定必须构建特定的载体进行转化,与此同时, Kawanagh 和其合作者发现,在靶地区(target region)供体和受体之间序列差异为 2.4% 时,并没有影响外源 DNA 的整合,这一现象存在,可能的原因是高等植物

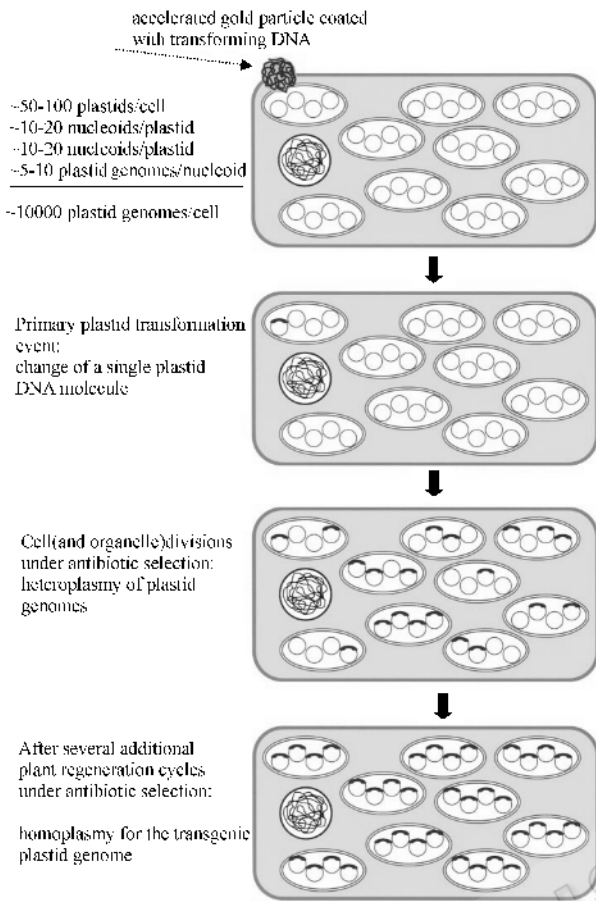


图2 基因枪转化法形成转化质的主要过程^[7]

Fig. 2 Sorting of plastid genomes and isolation of homoplasmic transplastomic cell line^[7]

的叶绿体有一个具有活性的 RecA 介导的重组系统,而且是一个能够抑制差异的系统^[16]。不管怎样,叶绿体是一个半自主性的器官,复杂的 DNA 整合分子机制还需要人们更透地去研究。

1.3 选择筛选标记基因

获得同质化系统最常用,最有效的方法是在一定的筛选压下进行多代筛选,因而叶绿体基因工程中,筛选标记基因的选择尤为重要。最初的叶绿体转化载体携带一种点突变的质体 16S rRNA 基因,这种基因产生壮观霉素和链霉素抗性^[29],隐性的 16S rRNA 标记基因远不及现今普遍使用的 *aadA* 基因^[27]; *aadA* 基因编码氨基糖苷腺苷转移酶,基因编码区域能够激活叶绿体内源的启动子和未翻译区,产生壮观霉素和链霉素抗性^[30],并且这个筛选系统和核转化系统的转化效率极为相似^[31],围绕 *aadA* 筛选标记的不同操纵区操作程序复杂这一问题,1996 年 Fisher^[32]等设计了一套很完美的循环标记技术减少标记基因在转化的过程中的丢失,这一方案可以重复利用 *aadA* 基因许多次,在子代缺失突变体中也是可行的^[33]。和 *aadA* 相似的编码氨基糖苷磷酸转移酶 *aphA-6* 基因,在基因转化体中表现卡那霉素和氨基糖苷抗性,适用于叶绿体转化中的显性标记基因^[34]。编码新霉素磷

酸转移酶 *npt II* 基因,表现卡那霉素抗性,已经成功应用于烟草叶绿体转化中^[35]; *neo* 基因比较适合质体转化筛选标记,产生卡那霉素抗性,第一代 *neo* 基因筛选效率很低,但是经过改造后的新一代 *neo* 将有所改进^[36],有人利用绿色荧光蛋白 (GFP) 作为筛选标记,因其独特的优点,很适用于叶绿体转化系统^[28],用含有此标记的载体转化到大肠杆菌,在激光扫描共聚焦显微镜下检测到了 *gfp* 基因成功表达的产物激发出强烈的绿色荧光^[37]; *psbH* 标记应用于叶绿体转化系统当中^[32],突变的 *psbH* 基因能够抑制光养生物的生长,选用 *psbH* 基因作为筛选标记可以避免 *psbH* 对光养生物造成的致死性突变,使外源目的基因 DNA 进入 *psbH* 下游中性区,高等植物叶绿体也常用此标记进行筛选^[38]。

新的抗性筛选标记出现将会提高叶绿体转化效率,但是,也会出现令人忧虑的问题,抗生素抗性标记基因可能因相容蛋白合成机制,从植物体经由动物肠道系统或通过泥土媒介扩散转移到病原体微生物中,使这些病原体产生耐药性。叶绿体基因工程作为一门新技术的出现,针对这一问题, Daniell 等人^[39]首次将菠菜中的 *BADH* 基因(甜菜碱脱氢酶)作为非抗生素筛选标记,应用到高等植物烟草叶绿体基因组中,在 BA 选择条件下转化的效率是在壮观霉素条件下的 25 倍, Southern blot 分析证明了外源基因已经稳定整合,在形态学上与非转基因的植物相比较没有差异,且后代遗传表现稳定^[40]。这种方法的使用不仅避免了导入易引起争议的抗性基因,还消除了抗生素等物质对植物组织生长的不利影响,使叶绿体基因工程产生的转基因作物更加“绿色”。

2 叶绿体基因工程的应用

2.1 提高植物光合效率

植物的光合作用非常有限,仅有吸收光能的 1% 左右转化为植物所需能量,如果光合作用提高一点点,农业生产的收效便可有较大幅度的提高^[41]。植物可以吸收少量的光能长得更高大,这是全世界科学家梦想的事业。植物光合效率取决于 Rubisco 酶的丰富度, Rubisco 酶在植物叶子上能够制造 30% ~ 50% 的可溶性蛋白,这一过程非常缓慢,每秒钟只能催化很少的分子反应,却需要大量的酶; Rubisco 酶的另一个功能是限制 CO₂ 的合成,使 O₂ 能结合在酶的活性部位上,当 Rubisco 用氧作为它的底物时,核酮糖二磷酸合成被破坏, CO₂ 释放出来,这一过程被称为植物的光呼吸^[9]。

人们可以通过两种直接的方法提高光合速率:①加速酶催化的循环过程;②提高酶的特性,减少光呼吸浪费的能量^[9]。Rubisco 序列经过上百万年的进化,要想改变其中的一个或几个氨基酸来加速催化循环过程根本不可能,因此,相比之下,后者比较可行。多种微生物和植物中 Rubisco 高分辨三维结构的获得,可以为人们试图成功修饰这个酶提供可靠的基础, Rubisco 基因也成为叶绿体基因工程中的热点^[42-43]。

具有高特性 Rubiscos 的植物是向日葵,可以用向日葵中的 *rbcL* 基因替代烟草质体基因组中的 *rbcL* 基因,但是,实验

结果是产生了杂合酶(hybrid enzymes),而没有产生人们期望的酶的高催化特性,分析原因可能是由于两种植物酶的相容性问题^[44]。值得提出的是又有人用光合细菌 *Rhodospirillum rubrum* 中 *rbcM* 基因代替烟草中的 *rbcL* 基因,转质体烟草植物表达了 *rbcM* 基因,合成了 Rubisco 的同型二聚体(homodimeric),即 II 型 Rubisco,因而具有细菌 *R. rubrum* 的酶特性,只能生长在高浓度 CO₂ 环境下^[45]。

现在全球有二十多个研究群体都在致力于研究提高光合效率,虽然还没有一个实验能够产生好的 Rubisco^[41]。但是,这些实验数据却为我们提供了 Rubisco 酶的重要机能和调控过程。拟楠芥^[46]和水稻^[47]的定点整合实验取得了重大突破,证明叶绿体基因工程是生产高光合效率作物植物的最有价值的方法,相信在不久的将来这一梦想会成为现实。

2.2 消除环境忧虑问题

当今最为普遍的问题就是外源基因从转基因作物到杂草的逃逸,这一逃逸主要是通过花粉的扩散,产生超级杂草或产生和其他作物之间的基因污染,对环境极为不利^[48]。美国和欧洲许多国家已经有法律明确规定,禁止有花粉逃逸的转基因作物的引进,以保护本国农民利益。

叶绿体基因工程产生的基因逃逸现象的风险远远低于核转化作物,因为大多数作物中的质体 DNA 都是母系遗传,这样就可以避免作物和作物,作物和杂草之间的杂交,消除公众对基因污染的忧虑,而且,外源基因在叶绿体上具有更高表达量的优势^[49]。虽然一些植物靠母系遗传的花粉仍然具有代谢活性,但是,质体 DNA 会随着花粉成熟而丢失,不会转移到下一代^[50]。质体染色体基因编码的蛋白也不会出现在花粉中出现,同时也不会对以花粉或花粉的植物组织为食的昆虫产生影响^[51]。因此,在转基因植物的安全问题上有着可靠的保证。

2.3 提高农作物的抗性

每年全世界都有大量的作物由于生物和非生物的原因大量死亡,叶绿体转化没有位置效应,转基因沉默和载体序列的影响,产生的转基因作物抵抗环境的胁迫能力远远高于传统的遗传转化产生的作物,母系遗传无环境污染又可以消除公众对转基因安全性的忧虑^[52]。

通过传统核转化的转基因作物产生 Bt(*Bacillus thuringiensis*)的杀虫性时,往往会使昆虫产生 Bt 抗性。通过叶绿体转化产生的植物具有高剂量的 Bt 表达量,Bt 蛋白积累可表现多抗性,组织特定位点表达可使蛋白只在某一组织对昆虫有毒害作用,以达到减少昆虫产生耐抗性的目的^[53]。例如,经过叶绿体表达的新 Bt 杀虫肽基因有几千个拷贝的表达量,对昆虫的毒杀力可达 100%,远远高于传统转化的 Bt 蛋白抗性^[54]。有报道说,经过转化的烟草叶绿体基因组携带上 *cry2A* 基因,结果 CRY 蛋白表达量达到 47%,而且,转基因植物的花粉对非害虫幼虫没有毒害作用^[55]。国内 Bt 基因的叶绿体转化研究主要集中在侯丙凯^[56]等构建了油菜叶绿体转化载体和苏宁^[57]等用基因枪法获得双价杀虫基因的叶绿体转基因烟草,转基因棉铃虫抗虫试验表明具有显

著杀虫性。这些数据说明 Bt 基因的叶绿体表达可以提高植物的抗虫性。

有机结合状态的重金属 Hg 能对植物器官产生高度毒害作用。在植物叶绿体中,Hg 最先对叶绿体产生损害,阻碍电子传递和光合作用。Ruiz 等人^[58]利用叶绿体转化可以提高植物自我修复的能力,通过整合一种天然活性的,含有 merA(编码汞离子还原酶)和 merK(编码有机汞裂解酶)未经任何编码修饰的基因操纵元件,转化到烟草叶绿体基因组中。PCR 和 Southern-blot 分析证实已经稳定整合,Northern-blot 分析则说明 merAB 基因大量转录,表达后获得高水平的抗性,而且能够防止植物花粉逃逸。叶绿体转化也可应用到对叶绿体功能有影响的其它重金属上。

叶绿体基因工程可应用于植物疾病防治中,MSI-99(一种抗微生物合成肽)导入叶绿体基因组产生高水平表达,并且对抗植物假单胞菌属类病毒始终保持生物活性,而且对植物的生长无明显影响,说明叶绿体基因工程优势明显^[59]。TPS1(海藻糖磷酸合成酶)基因导入烟草叶绿体中,其抗旱性高于核转化,TPS1 酶活性呈现高水平状态,重要的是在这一水平上没有转基因沉默现象的发生^[60];最近,又有人^[61]利用叶绿体转化,将 BADH 基因转入胡萝卜质体基因组中,经检测转质体胡萝卜组培的细胞,根和叶都表现出高耐盐性,说明叶绿体基因工程在提高植物的抗盐胁迫上潜力巨大。

2.4 农医产品的工业化

叶绿体基因工程转化植物具有基因高水平表达的特性,远远高于常规转化产生的植物,而且可以表达多基因,转化手段也简单容易,药用蛋白的纯度高,而不用昂贵色谱纯化手段,无花粉逃逸使转基因植物更安全,这些独特的优势使叶绿体基因组成为生产食用结晶蛋白和人类药用蛋白的理想平台^[62-64]。

近年来,植物生物技术取得了重大进步,也日益显示出转基因在微量营养强化应用上具有的巨大潜力。利用多基因工程(multigene engineering)生产出富含维生素 A 原(β -胡萝卜素)的水稻^[65]称为金水稻,水稻种子中含有丰富的维生素 A 原,将来可以治疗缺乏此类营养成分引起的疾病。维生素 A 原是在质体上合成的,因此通常采用将核转化基因表达的肽转运到质体中合成蛋白,叶绿体基因组表达体系很适合外源蛋白的超量表达,口服疫苗以及药用治疗蛋白,采用多样的生产工艺产生转基因植物的果实和叶片中蛋白含量相当可观^[66]。烟草叶绿体产生预计占可溶性蛋白总量 5%~25%的蛋白,即将成为重组蛋白表达的平台而广泛地投入到商业生产^[67]。

叶绿体光合作用能够合成糖和淀粉,同时也是糖代谢的场所,依靠叶绿体基因工程这一平台,可以大量合成人类食用的海藻糖^[9];质体编码的乙酰-CoA 羧酸酶亚基基因 *accD* 在烟草质体中超量表达,说明转质体基因植物也可以提高植物叶中脂肪酸的含量,减缓植物叶的衰老,增加种子产量^[68]。

© 中国生物工程研究所,联合编辑部,2010

白,用于治疗矮小症^[69],这一发现被认为是一个里程碑,因为它可以证实植物质体中像细菌一样的遗传机制可以正确地合成哺乳动物蛋白。质体基因工程植物在合成蛋白之后,并没有修饰它们,这在用传统的细胞核转化手段合成人类蛋白是一个巨大的障碍。

2001年,人类的血清蛋白(HSA)在转基因叶绿体中得到高效表达,说明在转基因叶绿体中表达药物蛋白已经成为可能^[70],霍乱 β 亚基(CTB)基因在转基因叶绿体中高度积累而对细胞没有毒害,证明了叶绿体转化在实用型疫苗的生产中的可行性^[71]。随着转基因技术的不断发展,相信在不久的将来叶绿体基因工程以其独有的优势投入商业化生产。

3 存在问题

叶绿体基因工程的出现,解决了常规转基因带来的一些不足,应用前景广阔,但是,人们应该看到,叶绿体转化手段还是一门年轻的转基因技术,必然也存在一些人们需要解决的问题。

叶绿体基因工程所应用到的植物不是很多,由于筛选效率和重组体系的束缚,以及叶绿体特殊的结构和功能,只能应用到有限的植物物种当中。从低等生物衣藻的叶绿体转化之后^[72],到2001年为止,叶绿体转化只获得了8种高等植物的叶绿体转化体系^[73],后来逐渐扩展到相关的油菜、大麦等农作物当中^[74],最近,这一技术又扩展到棉花^[75]和胡萝卜^[61]作物当中。其中,最具权威的实验是烟草的叶绿体转化,但是,烟草中含有有害成分,在提取蛋白时也很困难;在拟南芥中的质体转化可行,但转化效率很低^[76]。近些年,人们发现玉米有很多适合转化的优点,被认为是一种新的资源^[77]。很显然,在开展不同植物叶绿体基因组测序工作上,选择适合转化的物种方面还应继续扩大,生产工艺以及蛋白纯化手段方面应当有所改善。

到目前为止,叶绿体转化已经应用到多个领域,但是,很少有数据能证实或明确揭示叶绿体转化和表达体系的机制,核质基因的相互作用,叶绿体基因功能鉴定以及叶绿体进化等理论问题。也许是由于叶绿体是一个半自主性的器官,而细胞核基因组参与叶绿体基因的表达,尤其在前期翻译水平上^[78]。第一例烟草叶绿体转化成功后,科学家们大约用了10年的时间才将这一技术应用到其他的物种当中^[7]。这些都说明研究过程比预想的要艰巨复杂。由此可见,未来的任务是更深刻地洞悉质体代谢过程和基因组的调控原理。

转化植物的同质化过程比较困难。质体基因组的结构使人们很难用更好的方法修饰它们。虽然科学家们已经能够将转化的质体基因应用到少数物种当中,但是,加工修饰质体的技术发展很慢。改造质体基因组是很艰苦的事,主要由于细胞中质体有数以万计的多拷贝基因组。成功的基因转化意味着,新的基因必须出现在每个拷贝的质体基因组中。人们往往通过高筛选压、降低拷贝数和改进转化技术等方面消除异质化,这是个耗时长、操作复杂的过程,因此需要新的技术和手段来提高转化的同质化。

4 发展前景

植物蛋白的生产都是来自植物叶片、种子,及组培细胞中核基因和病毒载体的基因表达产物。而质体体系具有多重特性,可以不用重新合成、修饰编码细菌基因和人类cDNA而直接表达;多亚基聚合蛋白可以在mRNA多顺反子上表达;人类蛋白则可以在质体内正确合成二硫键,产生含量高的可溶性蛋白^[67,79]。所以在生物工程生产人类所需的药用蛋白上,叶绿体基因工程将来可以发挥特殊的作用^[80]。此外,在提高农作物光合作用效率,研究光合作用机制和提高作物抗性以及防止转基因植物花粉的逃逸上,都是叶绿体基因工程未来的应用方向。

总之,叶绿体基因工程成为生物技术的常规手段还需要一段时间,技术上的局限还应得到逐步完善,但是,叶绿体基因工程具有的优势特点,可以解决传统遗传转化带来的全球性问题,将为生物技术的发展开创一片新的领域,注入新的生机与活力,也将为工农业的发展带来一场新的绿色革命。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Zhang Jing-Yu, Zhang Yuan, Song Yan-Ru. Chloroplast genetic engineering in higher plants. *Acta Botanica Sinica*, 2003, **45**(5): 509-516
- [2] Bogard L. Engineering chloroplast: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions, and products. *Trends Biotechnol*, 2000, **18**(6): 257-263
- [3] Klein TM, Wolf ED, Wu R *et al.* High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 1987, **327**: 70-73
- [4] Boynton JE, Gillham NW, Harris EH *et al.* Chloroplast transformation in chlamydomonas with high velocity microprojectiles. *Science*, 1988, **240**: 1534-1538
- [5] Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 8526-8530
- [6] Daniell H, Vivekananda J, Nielsen BL *et al.* Transient foreign gene expression in chloroplast of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 88-92
- [7] Bock R. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Bio*, 2001, **312**: 425-438
- [8] Yi K(易平), Liu Y(刘义), Zhu YQ(朱英国). Horizontal transfer of genetic substances among mitochondria, nuclei and chloroplasts in higher plant. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展) 2003, **30**(4): 546-548
- [9] Bock R, Sarwar KM. Taming plastids for a green future. *Trends in Biotech*, 2004, **22**(6): 311-318
- [10] Wang CZ(王昌正), Hu ZM(胡赞民), Yan YM(晏月民). A new type of bioreactor-chloroplast. *Journal of Capital Normal University*(首都师范大学学报(自然科学版)) 2003, **24**(2): 68-71
- [11] Li HY(黎晏燕), Wang W(王玮). Progress in next generation of genetically modified plants. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志) 2003, **23**(6): 122

- [12] Li H(李宏韬), Zhao S(赵淑青), Zhao YX(赵彦修) *et al.*. The introduction of chloroplast gene engineering. *Hereditas(遗传)*, 2003, **25**(4): 495 – 498
- [13] Shimada H, Sugiura M. Fine structural features of the chloroplast genome: comparison of the sequenced chloroplast genomes. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**: 983 – 995
- [14] Potrykus I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol*, 1991, **42**: 205 – 225
- [15] Kofer W, Koop HU, Wanner G *et al.* Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J and K of the plastid NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase in tobacco by polyethylene glycol-mediated plastome transformation. *Mol Gen Genet*, 1998, **258**: 166 – 173
- [16] Kavanagh TA, Thanh ND, Lao NT *et al.* Homologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. *Genetics*, 1999, **152**: 1111 – 1122
- [17] 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. *Plant J*, 1999, **19**: 333 – 345
- [18] Golds T, Maliga P, Koop HU. Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Bio/Technology*, 1993, **11**: 95 – 97
- [19] O'Neil C, Horvath GV, Horvath E *et al.* Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. *Plant J*, 1993, **3**: 729 – 738
- [20] Koop HU, Steinmüller K, Wagner H *et al.* Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. *Planta*, 1996, **199**: 193 – 201
- [21] Schnorf M, Potrykus I, Neuhaus G. Microinjection technique routine system for characterization of microcapillaries by bubble pressure measurement. *Exp Cell Res*, 1994, **210**(2): 260 – 267
- [22] Knoblauch M, Hibberd JM, Gray JC *et al.* A galinstan expansion femtosyringe for microinjection of eukaryotic organelles and prokaryotes. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 906 – 909
- [23] To KY, Cheng MC, Chen LFO *et al.* Introduction and expression of foreign DNA in isolated spinach chloroplasts by electroporation. *Plant J*, 1996, **10**: 737 – 743
- [24] Daniell H, McFadden BA. Introduction and expression of foreign DNA in isolated spinach chloroplasts by electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 6349 – 6353
- [25] Ramesh VM, Bingham SE, Webber AN. A simple method for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Methods Mol Biol*, 2004, **274**: 301 – 307
- [26] Daniell H, Khan MS, Allison L. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci*, 2002, **7**: 84 – 91
- [27] Staub JM, Maliga P. Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. *Plant Cell*, 1992, **4**: 39 – 45
- [28] Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ *et al.* Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J*, 1999, **19**(2): 209 – 216
- [29] Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 8526 – 8530
- [30] Goldschmidt-Clermont M. Transgenic expression of amino glycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker for site directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**: 4083 – 4089
- [31] Svab Z, Maliga P. High frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 913 – 917
- [32] Fischer N, Stampacchia O, Redding K *et al.* Selectable marker recycling in the chloroplast. *Mol Gen Genet*, 1996, **251**: 373 – 380
- [33] Redding K, MacMillan F, Leibl W *et al.* A systematic survey of conserved histidines in the core subunits of Photosystem I by site-directed mutagenesis reveals the likely axial ligands of P700. *EMBO J*, 1998, **17**: 50 – 60
- [34] Bateman JM, Purton S. Tools for chloroplast transformation in *Chlamydomonas*: expression vectors and a new dominant selectable marker. *Mol Gen Genet* 2000, **263**: 404 – 410
- [35] Carrer H, Hoekenberry TN, Svab ZH *et al.* Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Mol Gen Genet*, 1993, **241**: 49 – 56
- [36] Kuroda H, Maliga P. Sequences downstream of the translation initiation codon are important determinants of translation efficiency in chloroplasts. *Plant Physiol*, 2001, **125**: 430 – 436
- [37] Gao L(高岭), Li S(李朔), Hou BK(侯丙凯) *et al.* The construction of site-specific integration and expression vector for chloroplast genome of wheat. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology(植物生理与分子生物学报)*, 2003, **29**(5): 469 – 473
- [38] Erickson JM. Chloroplast transformation: current results and future prospects. In: Ort DR, Yocum CF (eds) *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*. Kluwer Academic, Dordrecht, 1996, pp. 589 – 619
- [39] Daniell H, Muthukumar B, Lee SB. Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr Genet* 2001, **39**: 109 – 116
- [40] Daniell H, Wiebe PO, Millan AF. Antibiotic-free chloroplast genetic engineering—an environmentally friendly approach. *TRENDS in Plant Science* 2001, **6**(6): 237 – 239
- [41] Gewolb J. Plant Scientists see big potential in tiny plastids. *Science*, 2002, **295**: 258 – 259
- [42] Parry MAJ, Andralojc PJ, Mitchell RAC *et al.* Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. *J Exp Bot*, 2003, **54**: 1321 – 1333
- [43] Andrews JT, Whitney SM. Manipulating ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in the chloroplasts of higher plants. *Arch Biochem Biophys*, 2003, **414**: 159 – 169
- [44] Kanevski I, Maliga P, Rhoades DF *et al.* Plastome engineering of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in tobacco to form a sunflower large subunit and tobacco small subunit hybrid. *Plant*

- [45] Whitney SM , Andrews TJ . Photosynthesis and growth of tobacco with a substituted bacterial Rubisco mirror the properties of the introduced enzyme. *Plant Physiol* , 2003 , **133** : 287 – 294
- [46] Kempin SA , Liljegren SJ , Block LM *et al.* Targeted disruption in Arabidopsis. *Nature* , 1997 , **389** : 802 – 803
- [47] Terada R , Urawa H , Inagaki Y *et al.* Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nat Biotechnol* , 2002 , **20** : 1030 – 1034
- [48] Daniell H . Environmentally friendly approaches to genetic engineering. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* , 1999 , **35** : 361 – 368
- [49] Daniell H , Datta R , Varma S *et al.* Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nat Biotechnol* , 1998 , **16** : 345 – 348
- [50] Heifetz P . Genetic engineering of chloroplast. *Biochemic* , 2000 , **82** : 655 – 666
- [51] Lawrence B . Engineering chloroplasts : an alternative site for foreign genes , proteins , reactions and products. *Tibtech* , 2000 , **18** : 257 – 263
- [52] Daniell H , Ruiz ON , Dhingra A . Chloroplast genetic engineering to improve agronomic traits. *Methods Mol Biol* , 2004 , **286** : 111 – 138
- [53] Daniell H . New tools for chloroplast genetic engineering. *Nat Biotechnol* , 1999c , **17** : 855 – 856
- [54] Kota M , Daniell H , Varma S *et al.* Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* Cry2A protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1999 , **96** : 1840 – 1845
- [55] De Cosa B , Moar W , Lee SB *et al.* Hyper-expression of *Bt* Cry2Aa2 operon in chloroplast leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol* , 2001 , **19** : 71 – 74
- [56] Hou Bing-Kai , Zhou Yi-Hua , Wan Li-Hong *et al.* Chloroplast transformation in oilseed rape. *Transgenic Research* , 2003 , **12** : 111 – 114
- [57] Su N (苏宁) , Yang K (杨波) , Meng K (孟昆) *et al.* The research of *Bt* and *oc* cotransformation in tobacco chloroplast. *Scientia Agriculture Sinica* (中国农业科学) 2002 , **35** (4) : 394 – 398
- [58] Ruiz ON , Hussein HS , Terry N *et al.* Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. *Plant Physiology* , 2003 , **132** : 1344 – 1352
- [59] De Gray . Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Mol Gen Genet* , 2001 , **127** : 852 – 862
- [60] Lee SB , Kwon S , Park S *et al.* Accumulation of trehalose within transgenic chloroplast confers drought tolerance. *Mol Breed* , 2003 , **11** : 1 – 13
- [61] Kumar S , Dhingra A , Daniell H . Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells , roots , and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol* , 2004 , **136** (1) : 2843 – 2854
- [62] Daniell H , Dhingra A . Multigene engineering : dawn of an exciting new era in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* , 2002 , **13** (2) : 136 – 141
- [63] Daniell H , Chebolu S , Kumar S *et al.* Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. *Vaccine* , 2005 , **23** (15) : 1779 – 1783
- [64] Daniell H , Ruiz ON , Dhingra A . Chloroplast genetic engineering to improve agronomic traits. *Methods Mol Biol* , 2005 , **286** : 111 – 138
- [65] Ye X , Al-Babili S , Kloëti A *et al.* Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* , 2000 , **287** : 303 – 305
- [66] Kumar S , Daniell H . Engineering the chloroplast genome for hyperexpression of human therapeutic proteins and vaccine antigens. *Methods Mol Biol* , 2004 , **267** : 365 – 383
- [67] Maliga P . Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotechnol* , 2003 , **21** : 20 – 28
- [68] Madoka Y , Tomizawa K , Mizoi J *et al.* Chloroplast transformation with modified accD operon increases acetyl-CoA carboxylase and causes extension of leaf longevity and increase in seed yield in tobacco. *Plant Cell Physiol* , 2002 , **43** : 1518 – 1525
- [69] Staub J M , Garcia B , Graves J *et al.* High yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol* , 2000 , **18** : 333 – 338
- [70] Daniell H . Pharmaceutical proteins , human therapeutics , human serum albumin , insulin , native cholera toxin B subunit in transgenic plastids. World patent application , 2001 , WO 01/72959
- [71] Daniell H , Lee SB , Panchal T *et al.* Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic chloroplasts. *J Mol Biol* , 2001 , **311** : 1001 – 1009
- [72] Ramesh VM , Bingham SE , Webber AN . A simple method for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Methods Mol Biol* , 2004 , **274** : 301 – 307
- [73] Herfetz PB . Genetic engineering of the chloroplast. *Biosci Biotechnol Biochem* , 2001 , **65** : 1688 – 1691
- [74] Maliga P . Engineering the plastid genome of higher plants. *Curr Opin Plant Biol* , 2002 , **5** : 164 – 172
- [75] Kumar S , Dhingra A , Daniell H . Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Mol Biol* , 2004 , **56** (2) : 203 – 216
- [76] Sikdar SR , Serino G , Chaudhuri S *et al.* Plastid transformation in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Rep* 1998 , **18** : 20 – 24
- [77] Stern DB , Hanson MR , Barkan A . Genetics and genomics of chloroplast biogenesis : maize as a model system. *Trends Plant Sci* , 2004 , **9** (6) : 293 – 301
- [78] Jarvis P . Intracellular signaling : the chloroplast talks. *Curr Biol* , 2001 , **11** : 307 – 31
- [79] Kumar S , Daniell H . Engineering the chloroplast genome for hyperexpression of human therapeutic proteins and vaccine antigens. *Methods Mol Biol* 2004 , **267** : 365 – 383
- [80] Wang YF (王永飞) , Ma SM (马三梅) , Wang Y (王莹) . The application of chloroplast genome transformation in higher plant. *Hereditas* (遗传) 2004 , **26** (6) : 977 – 983