

高等植物叶绿体表达重组蛋白研究进展

林优红, 程霞英, 杨东风, 梁宗锁, 杨宗岐

浙江理工大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310018

林优红, 程霞英, 杨东风, 等. 高等植物叶绿体表达重组蛋白研究进展. 生物工程学报, 2018, 34(5): 631–643.

Lin YH, Cheng XY, Yang DF, et al. Advances in chloroplast expression of recombinant proteins in higher plants. Chin J Biotech, 2018, 34(5): 631–643.

摘要: 近年来, 基因工程技术发展迅速, 许多重组蛋白得以表达。其中利用植物生物反应器表达特异药物蛋白为人类一些重要疾病的预防和治疗提供了新途径。植物叶绿体遗传转化和表达系统成为目前植物生物反应器的研究热点。因结构和遗传上的特殊性, 高等植物叶绿体在重组蛋白表达方面具有独特优势, 外源基因表达量高、定点整合, 而且叶绿体母系遗传特性保证了生物安全性。很多重要药用蛋白质在植物叶绿体中表达成功。烟草作为高等植物叶绿体转化模式植物, 在疫苗抗原、抗体等药物蛋白和其他重要重组蛋白表达方面取得显著进展。高等植物叶绿体遗传转化也为叶绿体基因的表达和调控机制的研究提供新的技术和方法。文中从叶绿体遗传转化原理、载体构建、重组蛋白和重要药物蛋白在叶绿体中的表达以及重组蛋白表达对植物代谢和性状影响等多个角度, 对高等植物叶绿体遗传转化体系研究的新进展进行了综述, 以期对叶绿体表达平台的开发和重要药用蛋白质的表达提供新思路。

关键词: 高等植物, 叶绿体表达, 生物反应器, 重组蛋白

Advances in chloroplast expression of recombinant proteins in higher plants

Youhong Lin, Xiaying Cheng, Dongfeng Yang, Zongsuo Liang, and Zongqi Yang

College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

Abstract: In recent years, gene engineering is developing rapidly and many recombinant proteins have been expressed. The use of plant bioreactor to express specific pharmaceutical proteins provides a new way for the prevention and treatment of some important diseases in human beings. Nowadays, chloroplast genetic transformation and expression system has become a research hotspot in plant bioreactor. Higher plant chloroplasts have unique advantages in the expression of recombinant proteins due to their special structures and inherited characteristics: such as high expression, site-specific integration, and the maternal inheritance characteristics of exogenous genes. The maternal inheritance of chloroplast is helpful for biological safety of

Received: October 30, 2017; **Accepted:** January 9, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31570370), Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (No. LY15C020005).

Corresponding author: Zongqi Yang. Tel: +86-571-86843188; E-mail: yangzongqi@zstu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31570370), 浙江省自然科学基金 (No. LY15C020005) 资助。

transgene escaping by pollens. Many important pharmaceutical proteins have been successfully expressed in plant chloroplasts. As a chloroplast transformation model of higher plants, tobacco has made significant progress in the expression of pharmaceutical proteins, such as vaccine antigens, antibodies, and other important recombinant proteins. Chloroplast genetic transformation in higher plants also provides new techniques and methods for the study of chloroplast gene expression and regulation mechanisms. In order to provide a new idea for the development of chloroplast expression platform and the expression of important pharmaceutical proteins, this review outlined the progress of chloroplast genetic transformation system in higher plants, including the chloroplast transformation principle, vector construction, expression of recombinant proteins and important pharmaceutical proteins, and the effects of recombinant proteins expression on plant metabolism and traits.

Keywords: higher plants, chloroplast expression, bioreactor, recombinant proteins

近年来,随着转基因技术日渐成熟,利用转基因技术表达生产重要重组蛋白的研究愈发受到关注。传统的重组蛋白表达系统主要有大肠杆菌、酵母、哺乳动物细胞以及昆虫细胞等。每种表达系统都有各自的优点,如大肠杆菌和酵母的遗传背景清楚、培养操作简单;昆虫细胞可用于真核蛋白表达;哺乳动物细胞表达的重组蛋白最接近天然蛋白^[1]。但仍有一些限制因素阻碍着这些表达系统的开发和商业化应用,譬如生产重组蛋白及后期纯化成本高、效率低,重组蛋白的稳定性和安全性问题也难以保证^[2]。

植物叶绿体遗传转化和表达体系是近年发展起来的一种新的重组蛋白表达系统。与植物细胞核表达平台相比具有一些明显优势:1)叶绿体基因组拷贝数多,外源基因表达效率高;2)母系遗传,外源基因不会随花粉传播而逃逸,生物环境安全性高;3)叶绿体基因组含有多顺反子结构,多基因可共同表达;4)叶绿体由双层膜包裹且无蛋白外流,为重组蛋白表达提供了一个相对安全的生物环境^[3]。

目前为止,高等植物遗传转化和表达体系已取得丰硕的研究进展和成果。2012年,FDA(U.S. Food and Drug Administration)批准 Protalix 公司以胡萝卜细胞生产的、用于治疗戈谢病的 ELELYSO™ (Taliglucerase alfa) 药物正式上市。这是首个用植物细胞作为生物反应器生产并获得 FDA 认可的药物^[4]。植物叶绿体在生产疫苗抗原、

工业酶等重要重组蛋白和生物燃料方面也取得了显著成就,尤其是某些重组蛋白能提高植物对非生物压力的承受力,这对植物在逆境下生长具有重要意义^[5]。为使叶绿体遗传转化与表达体系更加适应商业化生产模式,基因组学、蛋白质组学、植物细胞冻干法、核糖体图谱和质谱技术等多种研究手段应用于叶绿体表达系统的开发研究。其中冻干植物细胞可在常温下贮存数月而不失重组蛋白活性,简化了发酵、提取、纯化、低温运输、制备等工艺,有效降低了生产成本^[6]。

烟草作为分子生物学研究的高等模式植物,1990年 Svab 等^[7]利用基因枪法首次在烟草叶绿体中成功转化 *rrn16* 基因,并获得稳定表达。随后,马铃薯^[8]、番茄^[9]、油菜^[10]、胡萝卜^[11]、大豆^[12]、生菜^[13]、棉花^[14]等重要高等植物也相继成功实现叶绿体转化表达外源基因^[15],但大多数叶绿体遗传转化相关研究仅限于实验室研究阶段。因此,研究高等模式植物——烟草叶绿体的遗传转化并将其作为重要医药重组蛋白表达平台具有广阔的商业应用和开发前景。烟草的生长周期短、生物量大、对生长环境要求低,组培系统成熟,转化后的再生和筛选比其他植物尤其是单子叶植物相对容易^[16-17]。在生物安全性方面,因烟草属于不可食作物,以烟草叶绿体为外源基因表达系统可以避免对人、畜食物链造成污染。这些特点非常有利于转基因烟草大规模种植和重组蛋白规模化生产^[2]。

1 叶绿体及其转化

叶绿体是一个半自主性遗传系统,有自己独特的 DNA 复制、转录和翻译体系。根据内共生学说,它是由一种异养原生生物吞噬蓝藻后进化形成,故其在基因转录、翻译等方面具有原核特性^[17]。高等植物叶绿体基因组由一个大的单拷贝序列 (Large single-copy region, LSC)、一个小的单拷贝序列 (Small single-copy region, SSC) 以及被它们分隔开的两个反向重复序列 (Inverted repeat sequence, IRs) 组成;共包含 120–135 个基因,其中 76 个基因编码不同的蛋白质,剩余的基因编码 RNAs^[3,18]。

叶绿体遗传转化是将叶绿体特异性启动子、终止子及 5'-UTR 和 3'-UTR 作为外源基因调控序列,和外源基因、选择标记基因表达盒及叶绿体来源的同源重组片段共同构建成表达载体,表达载体通过基因枪法或 PEG 法进入叶绿体后,利用同源重组和位点特异性整合将目的基因片段插入叶绿体基因组,最后通过选择压力和多轮筛选获得同质化植株,实现外源基因的整合和高效表达。转化过程主要分为 4 个步骤:1) 构建含有外源基因的表达载体;2) 表达载体导入叶绿体并整合至其基因组上;3) 筛选已达到同质化水平的转化植株;4) 外源基因在转化植株叶绿体中表达^[16]。

外源基因调控序列是实现外源基因高效表达的关键,使用最多的是叶绿体基因组内源性高表达的 *psbA* 基因启动子 *PpsbA* 和 16S rRNA 操纵子的启动子 *Prrn*。另有报道称, Oey 等在外源基因的 5'-UTR 加上噬菌体 T7g10 序列,重组蛋白表达量达到细胞可溶性总蛋白 (Total soluble protein, TSP) 的 70%^[16,19]。

同源重组片段是来源于受体植物叶绿体基因组和叶绿体基因组部分片段同源的 DNA 序列,具有物种特异性^[20]。目前,大多数研究中外源基因整合位点通常选择叶绿体基因组上的 *trnI/trnA*、

rbcL/accD、*trnf M/trnG* 及 *rps7/ndhB* 等位点,其中 *trnI/trnA* 位点因整合效率高而成为最常用的外源基因整合位点^[16,21]。整合位点的选择不能破坏叶绿体内源基因的结构和表达。

叶绿体遗传转化中最常选用的选择标记是来自大肠杆菌 *Escherichia coli* 的 *aadA* 基因。此基因编码的氨基糖苷-3'-腺苷酸转移酶能使壮观霉素失活。因壮观霉素对叶绿体的核糖体 70S 亚基具有高特异性,诱变率低,副作用少,故 *aadA* 是作为叶绿体遗传转化选择标记基因的最佳选择^[17]。近来也有研究报道指出细菌氨基糖苷乙酰转移酶/磷酸转移酶具有同样高效的筛选效率。其 N 端乙酰转移酶结构域和 C 端磷酸转移酶结构域能协同作用,具有对妥布霉素的抗性,且不自发产生抗性突变体^[22]。

2 药物蛋白的表达

由于烟草叶绿体表达重组蛋白具有转化效率高、表达量高、定点整合、生物环境安全等特点,很多具有重要医药价值的蛋白质,包括抗体、生长因子、酶、激素以及疫苗抗原等都在烟草叶绿体中成功表达 (表 1)。

人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 是获得性免疫缺陷综合征 (Acquired immunodeficiency syndrome, AIDs) 的主要病原菌。目前市场上仍缺乏针对 AIDs 的有效特异性疫苗。2012 年, Rubio-Infante 等^[23]以 HIV 病毒膜蛋白 gp120 上的 V3 环和 C4 结构域序列作为外源基因,在烟草叶绿体中成功表达 C4V3 抗原蛋白。ELISA 免疫试验显示每克新鲜烟草叶片中 C4V3 蛋白积累量达到 25 μg ; 以每周 4 次、每次 15 μg 的剂量口服喂养 BALB/c 小鼠后发现小鼠体内产生抗体反应, CD4^+ T 细胞发生增殖现象且有 IFN- γ 生成,证明烟草叶绿体中表达的 C4V3 蛋白具有免疫活性和抗原性。

表 1 近年高等植物叶绿体中表达的重组蛋白

Table 1 The expression of recombinant proteins in higher plant chloroplast

Year	Recombinant protein	Application	Expression host	References
2004	Betaine aldehyde enzyme	Enzyme	Carrot	[24]
2009	Multi-epitope HIV antigen protein	Antigen	Tobacco	[25]
2009	Lycopene- β -cyclase	Enzyme	Tomato	[26]
2011	Anthrax antigen protein PA (dIV)	Antigen	Tobacco	[27]
2011	The fusion protein of CTB to human proinsulin (A, B, C peptide)	Medicine	Lettuce, tobacco	[28]
2012	HIV virus antigen protein C4V3	Antigen	Tobacco	[23]
2012	Interferon α -5	Medicine	Tobacco	[29]
2013	The fusion protein of tuberculosis antigen ESAT-6, Mtb72F to CTB	Antigen	Tobacco	[30]
2013	Vitamin E related cyclase, transferase	Enzyme	Lettuce, tobacco	[31]
2013	The fusion protein of Ecotoxin-4 to CTB	Medicine	Tobacco	[32]
2013	Four epitope polyphenols of Dengue virus	Antigen	Lettuce	[33]
2014	Xylanase	Enzyme	Tobacco	[34]
2014	Human interleukin-2	Medicine	Tobacco	[35]
2014	Human papillomavirus E7 antigen fusion protein	Antigen	Tobacco	[36]
2015	The fusion protein of Human proinsulin to protein A	Medicine	Tobacco	[37]
2015	The fusion protein of Toxoplasma gondii SAG1 antigen to LiHsp83	Antigen	Tobacco	[38]
2015	Basic fibroblast growth factor (bFGF)	Medicine	Tobacco	[39]
2016	Active oxygen clusters scavenger enzyme	Enzyme	Tobacco	[40]
2016	The third domain of dengue virus membrane protein (EDIII) antigen protein	Antigen	Tobacco	[41]
2016	Tissue plasminogen activator rtPA protein	Medicine	Tobacco	[42]
2016	β -glucuronidase	Enzyme	Tobacco	[43]
2016	Polio viral capsid protein I	Antigen	Tobacco	[44]
2017	LALF ₃₂₋₅₁ -E7 protein	Antigen	Tobacco	[45]

为了进一步增强 AIDs 疫苗活性, 2015 年 Rubio-Infante 等^[46]又进一步构建和表达了嵌合式、含多个免疫表位的抗原蛋白 Multi-HIV。多个免疫表位分别来自几种 HIV 株系的 gp120 和 gp41 膜蛋白, 具有针对不同 B 细胞和 T 细胞的功能。研究者用从烟草叶绿体中提取的 Multi-HIV 蛋白饲喂 BALB/c 小鼠, 结果同样引发了包含 gp120 V3 环和 gp41 ELDKWA 表位的中和抗体和特异性干扰素 γ 生成; 脾细胞增殖试验也表明 gp120 的 C4、V3 结构域和 gp41 的 ELDKWA 结构域表位

积累能引起阳性细胞反应, 刺激脾细胞增殖。实验结果证明表达的重组 Multi-HIV 抗原蛋白具有免疫活性, 可作为 HIV 疫苗的替补疫苗, 同时也表明高等植物叶绿体表达系统是表达疫苗抗原等药物蛋白的有效途径。

2017 年, Yanez 等^[45]使用自我复制表达载体 (pRIC3.0)、亚细胞定位和基因沉默抑制剂 (NSs 和 P19 蛋白) 等手段, 首次在烟草叶绿体中融合表达 LALF₃₂₋₅₁-E7 治疗性疫苗, 以期改善其在大肠杆菌表达系统中表达量低下的问题。E7 蛋白是针

对人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV) 的关键抗原, LALF₃₂₋₅₁ (*Limulus polyphemus* anti-lipopolysaccharide factor) 是一种具有免疫调节功能的细菌细胞膜穿透肽。结果发现自我复制表达载体和叶绿体定位相结合, 疫苗蛋白在叶绿体中的积累量是细胞质中的 27 倍, 占 TSP 总量的 0.5%; 而基因沉默抑制剂对蛋白积累量的影响十分微弱。已有报道证实大肠杆菌中表达的 LALF₃₂₋₅₁-E7 疫苗蛋白能在小鼠体内成功引发免疫反应, 并可抑制肿瘤形成^[47]。通过进一步改良重组蛋白的提取和纯化工艺, 有望生产出治疗 HPV 的重组疫苗。

2016 年, Chan 等^[44]也以烟草叶绿体为平台, 融合表达了一种针对骨髓灰质炎病毒的加强型疫苗 CTB-VP1 (Viral protein 1)。VP1 属于骨髓灰质炎病毒衣壳蛋白, 与现有疫苗 IPV (Inactivated poliovirus vaccine) 不同。烟草叶绿体中表达的口服加强疫苗 VP1 生产成本低, 且无需低温保藏运输系统; 冻干植物细胞可直接在常温下保存数月, 其中包含的疫苗蛋白仍能进行正确加工折叠, 保持较好活性。通过对疫苗蛋白的抗原性和免疫活性进行检测, 结果显示单一的 IPV 疫苗注射虽然能有效引发大量中和抗体的生成, 但粘膜免疫的效果十分微弱; 而仅口服加强型疫苗 VP1 也不能诱导产生抗体抗原中和免疫反应。研究将 IPV 注射和 VP1 口服相结合, 并辅以植物性佐剂皂苷 (Saponins) 和角鲨烯 (Squalene), 结果发现对骨髓灰质炎 Sabin1、2、3 三种病毒株都展现出了高抗体中和滴度, 且血清阳性率达到 70%–90%。实验结果为预防骨髓灰质炎提供了新的途径, 同时低生产成本也为许多发展中国家和贫困地区带来了福音。

烟草具有生物量大的显著优势, 每株烟草平均能产生上百万颗种子。若能实现疫苗抗原在烟草叶绿体中高量表达, 再通过种子繁殖, 可以大

幅降低疫苗生产和运输成本^[2]。其他高等植物叶绿体中也有抗原蛋白成功表达。2013 年, Maldaner 等^[33]在生菜叶绿体中表达了一种针对登革病毒 (Dengue virus, DENV) 血清检测的四表位多聚肽抗原, 有望用于登革病毒 ELISA 检测试剂盒的商业开发。

除疫苗抗原外, 生长因子、干扰素等药物蛋白也一直是叶绿体表达研究的热点。譬如, 2011 年 Boyhan 等^[27]在生菜和烟草叶绿体中同时表达了霍乱毒素 B 亚基和人胰岛素原 (A、B、C 肽) 的融合蛋白。叶片中重组蛋白表达量均达到 TSP 的 40% 以上。口服或注射重组蛋白的免疫小鼠均出现血糖降低现象, 表明该重组蛋白具备降低血糖的功效。2012 年, Khan 等^[29]构建了干扰素 IFN α -5 的烟草叶绿体表达载体 (*LBS:PrbcL:RF5::Prnn:aadA:TpsbA:RBS*) 并导入叶绿体中表达。ELISA 检测发现重组蛋白含量在成熟叶片中最高可达到 4 372 pg/g。2015 年, Wang 等^[39]首次在烟草叶绿体中成功表达碱性成纤维细胞生长因子 (Basic fibroblast growth factor, bFGF)。Southern blotting 检测结果证实外源基因已整合进叶绿体基因组中; ELISA 免疫印迹检测显示转化植株叶片中重组蛋白含量约占 TSP 的 0.1%。

当前有关植物叶绿体表达药物蛋白的报道越来越多, 多数蛋白的表达量高且具备生物活性。因此, 高等植物叶绿体表达系统具有开发成商业化植物生物反应器的前景。

中国农业科学院生物技术研究所沈桂芳教授的叶绿体基因工程实验室在高等植物叶绿体遗传转化方面也取得了较好的研究成果, 先后在烟草叶绿体中成功表达了口蹄疫病毒主要抗原 VP1 基因^[48]、猪瘟病毒主要抗原 E2 基因^[49]等动物植物疫苗。此前, 我们实验室在衣藻叶绿体中分别表达了人可溶性 TRAIL 蛋白^[50]和来源于嗜热古细菌 *Pyrococcus furiosus* 的耐高温 α -淀粉酶^[51], 并

构建了含猪瘟病毒 E2 基因的豆科牧草百脉根的叶绿体转化载体^[52]。目前,实验室正在进行紫花苜蓿叶绿体转化载体的构建和转化工作。我们对外源基因及其调控序列进行了优化,采用混合型启动子 *PrrnPclpPrbcL*, 根据转化植物叶绿体基因组密码子的偏好性对外源基因进行了优化合成,以期提高外源基因的表达量。

叶绿体具有折叠、组装复杂蛋白的能力,且能在转录后对其进行二硫键、脂质等加工修饰,这些特点对重组蛋白的翻译后修饰,增强和发挥抗体、抗原的生物活性是十分必要的^[29]。同时,叶绿体表达系统不具备糖基化修饰功能,为一些不需要此修饰功能的药物蛋白如胰岛素、骆驼单链抗体的表达开辟了新途径^[3,53]。此外,某些真核重组蛋白对细胞内的蛋白水解较敏感,而高等植物叶绿体中含有的蛋白酶是原核特性,因此可为这类重组蛋白的表达提供一个相对稳定的内环境^[42]。

3 重组蛋白对植物性状和代谢的影响

叶绿体是植物光合作用的主要场所。由于起源和基因组结构的特殊性,使叶绿体在重组蛋白表达方面具有一定的优越性。但一些重组蛋白的表达又会对叶绿体或植株自身新陈代谢产生一定的影响。譬如, Dhingra 等^[24]在胡萝卜的体细胞胚叶绿体中表达甜菜碱醛酶基因,提高了转化植株的耐盐性能; Yabuta 等^[31]在生菜叶绿体中表达维生素 E 相关的环化酶、转移酶等基因,使生菜中维生素 E 含量和活性都得到了提高。因此,通过叶绿体基因工程研究重组蛋白的表达对植株性状和代谢的影响,为叶绿体生物反应器的开发和利用提供知识储备和理论依据。

2009 年, Apel 等^[26]为探究类胡萝卜素生物合成途径,在番茄叶绿体中分别表达了来源于草生欧文氏菌 *Erwinia herbicola* 和高等植物水仙花

Narcissus pseudonarcissus 的番茄红素- β -环化酶基因。结果发现真菌来源的环化酶的表达对番茄类胡萝卜素的生物合成不产生明显影响;而水仙花的环化酶在番茄叶绿体中的表达会促使番茄中的番茄红素转化成维生素原 A (β -胡萝卜素),含量在干重叶片中可达到 1 mg/g。表明番茄叶绿体中类胡萝卜素的生物合成可能受水仙花番茄红素- β -环化酶基因表达产物的调控。2015 年, Roding 等^[54]在烟草叶绿体中表达酮式类胡萝卜素,植物体光合效率发生变化。观察 T1 代转化植株发现,每克干重中光合成色素含量降低,但 Chla/Chlb 的比率不变;这些酮式类胡萝卜素主要集中在类囊体膜上,随着积累量增多而使类囊体脂质层发生变化,最终导致基粒合成减少,光合作用受到影响。

通过叶绿体基因工程研究了解类胡萝卜素生物合成相关途径及对植物功能的影响,进一步研究类胡萝卜素在植物体内的代谢合成机制,寻找能够提高外源基因表达量且不影响植物执行光合作用的因子,有望实现在可食植物细胞内表达并开发成对人类健康有益的生物产品。

2014 年, Pantaleoni 等^[34]以烟草叶绿体为平台表达耐热木聚糖酶。通过对酶活、植株形态等生理生化指标进行检测分析,结果表明在外界强光条件下生长的转基因烟草表达的木聚糖酶酶活相较于温室下生长的更高;但木聚糖酶的表达却使转化植株的叶绿体结构形态发生了变化,如类囊体减少、淀粉颗粒变大。纯化后的木聚糖酶在 4 °C 下可有效保存 12 个月,内源蛋白酶对其几乎不产生干扰作用。因此,可利用烟草叶绿体大规模生产重组蛋白木聚糖酶,为酿酒、饲料加工提供工业酶类。

强光照射会影响植物的生长发育。早先有研究发现在烟草叶绿体中表达超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 或谷胱甘肽还原酶

(Glutathione reductase, GR) 会增强某些活性氧簇 (Reactive oxygen species, ROS) 的清除活性, 并改变植株对非生物压力的反应, 降低 UV-B 照射对植物造成的伤害。为了探究选择性改变叶绿体内抗氧化途径是否会影响过氧化物酶的清除活性, Czégény 等^[40]在烟草叶绿体中共同表达了 GR 和脱氢抗坏血酸还原酶 (GR plus DHAR)、GR 和谷胱甘肽 S 转移酶 (GR plus GST) 融合基因。通过对 UV-B 照射后转化植株和野生株的各类酶活参数进行测定, 研究结果表明相对于野生株, 两种转化植株对过氧化物酶的依赖性均减少; GR plus DHAR 转化株中非酶类清除剂对羟基自由基清除的能力提高不明显。这突显了细胞内抗坏血酸-谷胱甘肽循环在适应 UV 照射时的重要性。虽然已有报道指出在强氧化条件下, 抗坏血酸能帮助植物对抗短时间、高剂量的 UV-B 照射^[55], 但作者发现酶催化清除过氧化氢是长时抵御 UV-B 的关键因素。但这些酶的表达如何影响植物代谢仍需要更深入的研究。

以上植物叶绿体中表达的重组蛋白种类、结构各异, 因此对转化植株性状和代谢产生的影响也呈现出多样性。在保持重组蛋白自身活性的基础上对其进行序列改造, 研究重组蛋白与植物次生代谢之间的相互作用, 从而得到作用机制明确、有应用价值的重组蛋白。此外, 为了建立更高效的叶绿体表达系统, 重组蛋白是否参与细胞信号调控等方面仍需要开展更多的研究, 使植株在生长过程中能自主选择沉默有害基因, 而保证重组蛋白的高量表达^[56]。

在研究叶绿体表达重组蛋白的同时, 植物叶绿体基因工程也可用于某些基因的功能研究。2017年, Li 等^[57]在烟草叶绿体中表达来自棉叶枯病菌完整的 *hpaXm* 基因和去除该基因 N 端一段类似信号肽序列 (1–45 bp) 的突变体。免疫印迹检测发现完整 *hpaXm* 蛋白在叶绿体中表达后会迁

移至细胞质、细胞膜、线粒体、细胞核甚至细胞壁上; 而突变体 *hpaXm* 却被限制在叶绿体内, 无法跨膜穿越。同时两种蛋白都表现出生物活性。由此证明 N 端一段类似信号肽的序列对发挥 *hpaXm* 基因正常功能并不是必要的, 但能帮助它重新迁移定位。

4 叶绿体中外源基因表达的优化

尽管许多重要重组蛋白质都已在高等植物 (烟草、番茄、油菜、胡萝卜等) 叶绿体中成功表达, 但表达量低下仍是限制叶绿体基因工程技术发展和应用的重要因素^[26]。目前, 相关研究主要致力于优化外源基因序列、设计高效的叶绿体表达载体等, 以期提高外源基因表达量。

4.1 优化 5'端调控序列, 提高重组蛋白表达量

启动子、终止子等调控元件的选择和组合方式、转录和翻译水平的差异、mRNA 和蛋白质的稳定性、核基因表达产物等都会对重组蛋白表达量产生影响。以 5'端调控序列元件为例, 2016年 Gerasymenko 等^[43]将 β -葡萄糖醛酸酶基因分别和菜豆 *Phaseolus vulgaris* L、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 *rbcL* 基因 5'调控序列、蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn 的 *rbcL* 和 *psbA* 基因的 5'调控序列组合, 研究 5'端调控序列对外源基因在叶绿体中表达的影响。检测结果显示蒺藜苜蓿的 *psbA* 基因启动子和 5'-UTRs 序列调控的 β -葡萄糖醛酸酶表达量最高, 是其余调控序列的 2–3 倍; 菜豆的 *rbcL* 基因启动子和 5'-UTRs 序列调控的表达量接近于烟草 *rbcL* 基因自身调控水平。进一步研究发现蒺藜苜蓿 *psbA* 基因和菜豆、烟草的 *rbcL* 基因在转录水平上的差异不大。因此, 推测转化植株中 β -葡萄糖醛酸酶的高表达主要是受 *psbA* 基因 5'-UTRs 序列的翻译水平的影响。

2013年 Kolotilin 等^[58]也设计了 4 种不同的表达载体 (CEC1–4), 以期提高半纤维素酶在烟草叶

绿体中的表达量。研究以细菌木聚糖酶 *XynA* 为外源基因,烟草 cv.81V9 植株为转化对象。结合转化后植株的生长状况、mRNA 和重组蛋白的积累情况发现,抗性表达盒由 IEE+SD:*aadA*:*TpsbC* 组成 (IEE 指顺反子间表达元件;SD 是来自细菌 T7g10 5'-UTR 的序列);并以 *psbA* 基因启动子及其 5'UTR 序列 (添加 T7g10 序列)、*rbcL* 基因终止子作为外源基因调控序列能显著提高重组蛋白积累量,一株转化植物 cv.81V9 中约能产生 18.3 mg 重组蛋白;且转化植株生长发育正常。反之,其他几种表达载体介导重组蛋白表达或是对植株表型产生影响,或是蛋白积累量低。

在 CEC4 表达载体模式的基础上,将目的基因换成黑曲霉 *Aspergillus niger* 的 *xyn10A* 和 *xyn11B* 基因,转化对象换成生物量更高的植株型 cv.I64。实验结果显示 *xyn11B* 的积累量达到 TSP 的 6.0%,远远高于 *xyn10A* 的表达量 0.2%。但当载体上 T7g10 序列移除后,*xyn10A* 的表达量明显提高,占 TSP 的 3.3%;反之,*xyn11B* 含量则下降,TSP 中仅有 2.5%。结果说明 T7g10 序列在表达外源基因时具有重要的调控作用。

重组蛋白表达量是衡量表达体系是否优良的重要指标。从上述研究结果不难发现,选择和利用高效的调控序列并进行适当组合可以有效实现重组蛋白的高表达^[58]。

4.2 优化外源基因密码子,提高表达量

不同植物种类中叶绿体基因组的碱基构成和密码子具有很强的偏好性。密码子偏好性也是影响外源基因在叶绿体中表达量的重要因素。叶绿体起源于原核生物,其基因组的碱基组成和密码子的偏好性都具有原核性。根据叶绿体基因组密码子的偏好性优化合成外源基因是提高外源基因表达量的途径。

2017 年, Kwon 等^[59]根据 133 种植物叶绿体中的 *psbA* 基因编码偏好性,对 Human clotting

factor VIII heavy chain (FVIIIHC) 和 Polio viral capsid protein1 (VP1) 蛋白基因序列进行优化并导入烟草叶绿体中表达。蛋白检测结果发现,以 *psbA* 基因密码子使用频率等级优化的方式优于仅以高度偏好密码子代替所有稀少密码子的优化方式,两者 VP1 蛋白的表达量相差 77–111 倍。Parallel reaction monitoring (PRM) 检测显示,优化的 VP1 序列结合 Cholera nontoxic B subunit (CNTB) 蛋白,含量提高了 22.5–28.1 倍。此外,核糖体图谱技术表明在 FVIIIHC 蛋白翻译过程中核糖体会在 CTC 亮氨酸密码子处暂停;VP1 基因优化序列上的丝氨酸密码子簇观察到有核糖体集聚区存在。实验结果为密码子偏好性影响重组蛋白的表达和表达量提供了有力证据。

4.3 融合表达,增加重组蛋白表达和积累

除了选择强启动子等调控元件提高重组蛋白表达量之外,近来研究发现目的基因融合表达能显著增加重组蛋白积累量。

2015 年, Albarrac 等^[38]在烟草叶绿体中融合表达来源于弓地刚形虫 *Toxoplasma gondii* 的 SAG1 抗原蛋白和来自婴儿利什曼虫 *Leishmania infantum* 的热激蛋白 LiHsp83。实验结果显示两者的融合表达显著提高了 SAG1 抗原蛋白的积累量 (相当于单一表达时的 500 倍),每克鲜重叶片中约含 0.1–0.2 μg SAG1 抗原蛋白。由于 HSP90s 蛋白在不同压力胁迫下都具有较强的稳定性,研究推测 LiHsp83 在融合表达时能提高重组蛋白 SAG1 的稳定性或是避免其被降解,从而提高了 SAG1 抗原蛋白表达量。此外,实验对融合蛋白的免疫性和抗原性也进行了检测,Western blotting 检测结果表明 chLiHsp83-SAG1 能被感染病原虫的人类血清样本中的 IgG 抗体识别,口服饲喂小鼠后也能引起免疫反应。

2014 年, Morgenfeld 等^[36]为提高人类乳头瘤病毒 E7 抗原在植物细胞中的表达量,将 E7 抗原

基因分别与 β -葡萄糖醛酸酶基因以及引导它至类囊体腔内的转移肽编码区融合在烟草叶绿体中表达。结果表明, GUS 能帮助 E7 提高自身稳定性并共同抵抗蛋白水解, C 端或 N 端融合了 GUS 的 E7 表达量比单一 E7 抗原蛋白表达高出 30–40 倍。同时, 实验还将 E7、土豆 X 病毒衣壳蛋白 (CP) 和转移肽 Str (来自光系统 II) 融合, 表达获得了 StrE7 和 StrE7CP 两种融合蛋白。检测发现 StrE7CP 的表达量同 E7-GUS 类似, 而 StrE7 融合蛋白的表达量高达 80 倍之多。实验结果在一定程度上说明了类囊体腔定位对特定蛋白表达的重要性。关于叶绿体内重组蛋白的高积累的确切原因还未可知, 研究推测可能是类囊体腔内环境简单, 蛋白酶水解机制不容易发挥作用, 起到保护重组蛋白的作用。

4.4 阻断负调控, 促进重组蛋白表达

目前, 对重组蛋白表达研究大都集中在对其实行正调控以提高表达量, 而关于如何阻断其负调控的研究则较少。2016 年, de Marchis 等^[60]在烟草叶绿体中表达菜豆 phaseolin 蛋白时发现外源异质蛋白在植物中表达时存在负调控机制。他们在叶绿体基因组中插入外源基因的同时在核基因组中也导入携带转移肽的外源基因, 核表达的重组蛋白在胞质核糖体中合成后再转移至叶绿体。结果发现核表达重组蛋白在叶绿体中的积累启动 mRNA 翻译下调机制, 抑制叶绿体中重组蛋白的表达。研究推测这可能起源于细菌的竞争性抑制机制。研究还发现当核表达的外源基因携带信号肽在基质中合成并切除转移肽、重新定位至类囊体后, 就无法抑制叶绿体内重组蛋白的表达。菜豆 phaseolin 蛋白不属于叶绿体内源异质复合体, 因此, 它的负调控机制可适当延伸至其他一些可溶性外源蛋白的表达, 这有助于进一步探究和了解植物叶绿体内源蛋白和重组蛋白的表达调控机制。

重组蛋白表达量低是限制叶绿体表达平台推广和应用的主要瓶颈。RNA 的积累、蛋白合成和降解水平的平衡、细胞中糖类、蛋白质、脂质、盐类等因素都会影响重组蛋白的稳定性和表达量^[26]。通过探究各种不同因素对蛋白表达的调控机理, 建立较为完善、高效的叶绿体表达体系, 为重组蛋白, 尤其是重要药用蛋白的商业化生产提供新的表达平台。

5 存在的问题

烟草在高等植物叶绿体遗传转化研究中应用最为广泛。叶绿体全基因组序列信息匮乏和组织培养体系不成熟是限制其他高等植物进入叶绿体转化行列的两大重要因素^[15]。

目前利用高等植物叶绿体转化平台表达人、动物疫苗抗原、药物蛋白等方面所取得了较为显著的研究成果, 但这些表达产物中能真正投入市场生产并应用于临床治疗的却十分有限; 且表达的重组疫苗的免疫原性虽然在实验小鼠身上得到初步验证, 但距离临床试验和应用还很远。大多数治疗蛋白均以抗生素作为筛选标记, 长期使用会使细菌产生耐药性, 不利于药物的可持续发展^[5,61]。此外, 植物体内包含的多种代谢产物是否会对抗体抗原等药物蛋白的疗效产生副作用也仍是一个未知数, 临床应用上缺乏更为完善的植物叶绿体表达系统生物安全性评估体系。

重组蛋白在植物体叶绿体中的高效表达是否会对植物表型造成影响也成为人们关注的焦点。目前为止, 大多数重组蛋白在叶绿体中表达都未发现植物表型发生明显变化; 但也有报道称部分重组蛋白在叶绿体中表达改变了植物表型, 包括叶片变黄、生长速度减慢以及雄性不育等^[62-63]。例如, Rigano 等^[64]在烟草叶绿体中表达牛痘病毒免疫蛋白 A27L, 转化植株相对于阳性对照核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶的大小亚基积累减少,

在土壤中的生长速度也减慢,叶片呈现褪绿现象。

6 小结与展望

烟草是高等植物叶绿体基因工程中应用最为广泛的模式植物之一,许多品种(尤其是 *N. benthamiana*)被认为是用以表达生产重组蛋白的最佳系统^[65]。80%–90%的重组蛋白都是在烟草叶绿体中表达成功,蛋白种类近百种,表达量最高可达70%^[2]。与传统大肠杆菌发酵系统相比,烟草叶绿体作为生物反应器的成本要低50倍之多^[66];且其生物量大,一株烟草能产生约上百万颗种子,每亩烟草平均每年能收获6 t多叶片^[29]。虽然在植物叶绿体中表达了一系列重要的药用重组蛋白,但重组蛋白表达量低仍是限制其商业开发的重要因素;此外从转基因植物中分离纯化重组蛋白也是限制植物生物反应器开发的主要技术瓶颈。因此,今后可以在可食性植物中进行多样尝试,扩大高等植物叶绿体转化受体范围,以期生产口服型疫苗抗原、抗体等重要药用蛋白,提高植物生物反应器生产的药用蛋白的市场竞争力。

随着高等植物叶绿体在表达重组蛋白,尤其是药物蛋白上的优越性日益彰显,叶绿体表达系统已成为分子生物技术领域的研究热点。通过不断设计改造表达载体、探究细胞内调控外源基因表达的影响因子,提高重组蛋白的表达量,简化下游提取、纯化工艺,降低生产成本,建立和优化有效、安全、经济的叶绿体表达系统。此外,基于叶绿体基因组和植物细胞核基因组的信息交流与互作,建立叶绿体基因组与核基因组之间的相互调节作用网络,探究核基因表达产物对叶绿体中新陈代谢途径的影响及叶绿体中次生代谢产物如何反向调控核基因表达。随着高等植物叶绿体转化技术和体系日益成熟,相信以此为基础的药用蛋白将进一步推动世界医药产业的发展,为人类带来福利。

REFERENCES

- [1] Fan CY, Feng LX, Fan JL, et al. Recent advances on the expression systems for recombinant protein production. *Biotechnologg*, 2012, 22(2): 76–80 (in Chinese).
范翠英, 冯利兴, 樊金玲, 等. 重组蛋白表达系统的研究进展. *生物技术*, 2012, 22(2): 76–80.
- [2] Waheed MT, Ismail H, Gottschamel J, et al. Plastids: the green frontiers for vaccine production. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 1005.
- [3] Ahmad N, Mukhtar Z. Green factories: plastids for the production of foreign proteins at high levels. *Gene Ther Mol Biol*, 2013, 15: 14–29.
- [4] Rybicki EP. Plant-based vaccines against viruses. *Virology*, 2014, 11(1): 205.
- [5] Adem M, Beyene D, Feyissa T. Recent achievements obtained by chloroplast transformation. *Plant Methods*, 2017, 13(1): 30.
- [6] Daniell H, Chan HT, Pasoreck EK. Vaccination via chloroplast genetics: affordable protein drugs for the prevention and treatment of inherited or infectious human diseases. *Annu Rev Genet*, 2016, 50(1): 595–618.
- [7] Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants. *PNAS*, 1990, 87(21): 8526–8530.
- [8] 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.
- [9] Ruf S, Hermann M, Berger IJ, et al. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(9): 870–875.
- [10] Hou BK, Zhou YH, Wan LH, et al. Chloroplast transformation in Oilseed Rape. *Transgenic Res*, 2003, 12(1): 111–114.
- [11] 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.
- [12] Dufourmantel N, Pelissier B, Garcon F, et al. Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol Bio*, 2004, 55(4): 479–489.

- [13] Kanamoto H, Yamashita A, Asao H, et al. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic Res*, 2006, 15(2): 205–217.
- [14] 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.
- [15] Rogalski M, Vieira LDN, Fraga HP, et al. Plastid genomics in horticultural species: importance and applications for plant population genetics, evolution, and biotechnology. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 586.
- [16] Zhang JF, Li Y, Jin JJ, et al. Recent advances in tobacco chloroplast genetic engineering. *Tobacco Sci Technol*, 2017, 50(6): 88–98 (in Chinese).
张剑锋, 李阳, 金静静, 等. 烟草叶绿体基因工程研究进展. *烟草科技*, 2017, 50(6): 88–98.
- [17] Bock R. Engineering plastid genomes: methods, tools, and applications in basic research and biotechnology. *Annu Rev Plant Biol*, 2015, 66(1): 211–241.
- [18] Rivas JDL, Lozano JJ, Ortiz AR. Comparative analysis of chloroplast genomes: functional annotation, genome-based phylogeny, and deduced evolutionary patterns. *Genome Res*, 2002, 12(12): 567–583.
- [19] Oey M, Lohse M, Kreikemeyer B, et al. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant J*, 2009, 57(3): 436–445.
- [20] Qian XY, Yang XD, Guo DQ, et al. Advances in the research of plant chloroplast genetic transformation. *Mol Plant Breed*, 2008, 6(5): 959–966 (in Chinese).
钱雪艳, 杨向东, 郭东全, 等. 植物叶绿体遗传转化及研究进展. *分子植物育种*, 2008, 6(5): 959–966.
- [21] Daniell H, Lin CS, Yu M, et al. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 134.
- [22] Tabatabaei I, Ruf S, Bock R. A bifunctional aminoglycoside acetyltransferase/phosphotransferase conferring tobramycin resistance provides an efficient selectable marker for plastid transformation. *Plant Mol Biol*, 2017, 93(3): 1–13.
- [23] Rubio-Infante N, Govea-Alonso DO, Alpuche-Solís ÁG, et al. A chloroplast-derived C4V3 polypeptide from the human immunodeficiency virus (HIV) is orally immunogenic in mice. *Plant Mol Biol*, 2012, 78(4/5): 337–349.
- [24] 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.
- [25] Soria-Guerra RE, Alpuche-Solís AG, Rosales-Mendoza S, et al. Expression of a multi-epitope DPT fusion protein in transplastomic tobacco plants retains both antigenicity and immunogenicity of all three components of the functional oligomer. *Planta*, 2009, 229(6): 1293–1302.
- [26] Apel W, Bock R. Enhancement of carotenoid biosynthesis in transplastomic tomatoes by induced lycopene-to-provitamin a conversion. *Plant Physiol*, 2009, 151(1): 59–66.
- [27] Gorantala J, Grover S, Goel D, et al. A plant based protective antigen [PA(dIV)] vaccine expressed in chloroplasts demonstrates protective immunity in mice against anthrax. *Vaccine*, 2011, 29(27): 4521–4533.
- [28] Boyhan D, Daniell H. Low-cost production of proinsulin in tobacco and lettuce chloroplasts for injectable or oral delivery of functional insulin and C-peptide. *Plant Biotechnol J*, 2011, 9(5): 585–598.
- [29] Khan MS, Nurjis F. Synthesis and expression of recombinant interferon alpha-5 gene in tobacco chloroplasts, a non-edible plant. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(4): 4391–4400.
- [30] Lakshmi PS, Verma D, Yang X, et al. Low cost tuberculosis vaccine antigens in capsules: expression in chloroplasts, bio-encapsulation, stability and functional evaluation *in vitro*. *PLoS ONE*, 2013, 8(1): e54708.
- [31] Yabuta Y, Tanaka H, Yoshimura S, et al. Improvement of vitamin E quality and quantity in tobacco and lettuce by chloroplast genetic engineering. *Transgenic Res*, 2013, 22(2): 391–402.
- [32] Kwon KC, Nityanandam R, New JS, et al. Oral delivery of bioencapsulated exendin-4 expressed in chloroplasts lowers blood glucose level in mice and stimulates insulin secretion in beta-TC6 cells. *Plant Biotechnol J*, 2013, 11(1): 77–86.

- [33] Maldaner FR, Aragão FJL, Santos FBD, et al. Dengue virus tetra-epitope peptide expressed in lettuce chloroplasts for potential use in dengue diagnosis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(13): 5721–5729.
- [34] Pantaleoni L, Longoni P, Ferroni L, et al. Chloroplast molecular farming: efficient production of a thermostable xylanase by *Nicotiana tabacum* plants and long-term conservation of the recombinant enzyme. *Protoplasma*, 2014, 251(3): 639–648.
- [35] Zhang XH, Keating P, Wang XW, et al. Production of functional native human interleukin-2 in tobacco chloroplasts. *Mol Biotechnol*, 2014, 56(4): 369–376.
- [36] Morgenfeld M, Lentz E, Segretin ME, et al. Translational fusion and redirection to thylakoid lumen as strategies to enhance accumulation of human papillomavirus E7 antigen in tobacco chloroplasts. *Mol Biotechnol*, 2014, 56(11): 1021–1031.
- [37] Yarbakht M, Jalali-Javaran M, Nikkiah M, et al. Dicistronic expression of human proinsulin-protein a fusion in tobacco chloroplast. *Biotechnol Appl Biochem*, 2015, 62(1): 55–63.
- [38] Albarrac RM, Becher ML, Farran I, et al. The fusion of toxoplasma gondii SAG1 vaccine candidate to leishmania infantum heat shock protein 83-kDa improves expression levels in tobacco chloroplasts. *Biotechnol J*, 2015, 10(5): 748–759.
- [39] Wang YP, Wei ZY, Zhong XF, et al. Stable expression of basic fibroblast growth factor in chloroplasts of tobacco. *Int Journal Mol Sci*, 2015, 17(1): 19.
- [40] Czégény G, Le MB, Pávkovics D, et al. Elevated ROS-scavenging enzymes contribute to acclimation to UV-B exposure in transplastomic tobacco plants, reducing the role of plastid peroxidases. *J Plant Physiol*, 2016, 201: 95–100.
- [41] Gottschamel J, Lössl A, Ruf S, et al. Production of dengue virus envelope protein domain III-based antigens in tobacco chloroplasts using inducible and constitutive expression systems. *Plant Mol Biol*, 2016, 91(4/5): 497–512.
- [42] Nasab MA, Javaran MJ, Cusido RM, et al. Purification of recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) protein from transplastomic tobacco plants. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 108: 139–144.
- [43] Gerasymenko IM, Sheludko YV, Klebanovych AA, et al. Comparison of effectiveness of 5'-regulatory sequences in transplastomic tobacco chloroplasts. *Transgenic Res*, 2016, 26(1): 65–75.
- [44] Chan HT, Xiao Y, Weldon WC, et al. Cold chain and virus-free chloroplast-made booster vaccine to confer immunity against different poliovirus serotypes. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(11): 2190–2200.
- [45] Yanez RJR, Lamprecht R, Granadillo M, et al. Expression optimization of a cell membrane-penetrating human papillomavirus type 16 therapeutic vaccine candidate in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE*, 2017, 12(8): e0183177.
- [46] Rubio-Infante N, Govea-Alonso DO, Romero-Maldonado A, et al. A plant-derived Multi-HIV antigen induces broad immune responses in orally immunized mice. *Mol Biotechnol*, 2015, 57(7): 662–674.
- [47] Granadillo M, Vallespi MG, Batte A, et al. A novel fusion protein-based vaccine comprising a cell penetrating and immunostimulatory peptide linked to human papillomavirus (HPV) type 16 E7 antigen generates potent immunologic and anti-tumor responses in mice. *Vaccine*, 2011, 29(5): 920–930.
- [48] Sun M. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) VP1 gene recombined and expressed in model plant chloroplasts[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2003 (in Chinese).
孙萌. 口蹄疫病毒 VP1 抗原基因在模式植物叶绿体中的重组和表达[D]. 杭州: 浙江大学, 2003.
- [49] He DM. Classical swine fever virus (CSFV) and Foot-and-mouth disease virus (FMDV) antigen gene recombined and expression in plant[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005 (in Chinese).
赫冬梅. 猪瘟和口蹄疫病毒抗原基因在植物内的重组与表达[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [50] Yang ZQ, Li YN, Chen F, et al. Expression of human soluble TRAIL protein in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Sci Bull*, 2006, 51(12): 1400–1405 (in Chinese).
杨宗岐, 李轶女, 陈凤, 等. 人可溶性 TRAIL 蛋白在衣藻叶绿体中的表达. 科学通报, 2006, 51(12): 1400–1405.
- [51] Yang ZQ, Li YN, Zhang ZF, et al. Expression of the gene coding for a thermostable α -amylase from

- Pyrococcus furiosus* in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. Chin J Biotech, 2006, 22(4): 545–549 (in Chinese).
- 杨宗岐,李轶女,张志芳,等. 来源于 *Pyrococcus furiosus* 的耐高温 α -淀粉酶基因在衣藻叶绿体中的表达. 生物工程学报, 2006, 22(4): 545–549.
- [52] Yang ZQ, Li YN, Zhang ZF, et al. Site-specific integration vector construction of E2 gene in hog cholera virus for chloroplast transformation of lotus corniculatus genome. Sci Agric Sin, 2007, 40(11): 2648–2654 (in Chinese).
- 杨宗岐,李轶女,张志芳,等. 猪瘟病毒 E2 基因在百脉根叶绿体基因组中定点整合载体的构建. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2648–2654.
- [53] Rigano MM, Scotti N, Cardi T. Unsolved problems in plastid transformation. Bioengineered, 2012, 3(6): 329–333.
- [54] Roding A, Dietzel L, Schlicke H, et al. Production of ketocarotenoids in tobacco alters the photosynthetic efficiency by reducing photosystem II supercomplex and LHCI trimer stability. Photosynth Res, 2015, 123(2): 157–165.
- [55] Gao QZ, Hang L. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate-deficient *vtc1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. J Plant Physiol, 2008, 165(2): 138–148.
- [56] Scotti N, Cardi T. Transgene-induced pleiotropic effects in transplastomic plants. Biotechnol Lett, 2013, 36(2): 229–239.
- [57] Li L, Miao W, Liu W, et al. The signal peptide-like segment of hpaXm is required for its association to the cell wall in transgenic tobacco plants. PLoS ONE, 2017, 12(1): e0170931.
- [58] Kolotilin I, Kaldis A, Pereira EO, et al. Optimization of transplastomic production of hemicellulases in tobacco: effects of expression cassette configuration and tobacco cultivar used as production platform on recombinant protein yields. Biotechnol Biofuels, 2013, 6(1): 65.
- [59] Kwon KC, Chan HT, León IR, et al. Codon optimization to enhance expression yields insights into chloroplast translation. Plant Physiol, 2016, 172(1): 62–77.
- [60] de Marchis F, Bellucci M, Pompa A. Phaseolin expression in tobacco chloroplast reveals an autoregulatory mechanism in heterologous protein translation. Plant Biotechnol J, 2016, 14(2): 603–614.
- [61] Olejniczak SA, Lojewska E, Kowalczyk T, et al. Chloroplasts: state of research and practical applications of plastome sequencing. Planta, 2016, 244(3): 517–527.
- [62] Lössl AG, Waheed MT. Chloroplast-derived vaccines against human diseases: achievements, challenges and scopes. Plant Biotechnol J, 2011, 9(5): 527–539.
- [63] Waheed MT, Thönes N, Müller M, et al. Plastid expression of a double-pentameric vaccine candidate containing human papillomavirus-16 L1 antigen fused with LTB as adjuvant: transplastomic plants show pleiotropic phenotypes. Plant Biotechnol J, 2011, 9(6): 651–660.
- [64] Rigano MM, 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. Plant Biotechnol J, 2010, 7(6): 577–591.
- [65] Budzianowski J. Tobacco—a producer of recombinant interferons. Przegl Lek, 2014, 71(11): 639–643.
- [66] Kusnadi AR, Nikolov ZL, Howard JA. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. Biotechnol Bioeng, 1997, 56(5): 473–484.

(本文责编 陈宏宇)