

叶绿体转化三角褐指藻表达外源蛋白

朱聪聪^a, 张乃升^a, 谢伟红^a, 牛莹芳^a, 杨维东^{a,b}, 刘洁生^{a,b}, 李宏业^{a,b*}

(暨南大学, a. 生物工程学系; b. 广东省高校水体富营养化与赤潮防治重点实验室, 广州 510632)

摘要: 为建立三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)叶绿体表达体系, 从其叶绿体基因组中克隆了 *rns-trnI*、*trnA-trnI* 序列作为遗传转化同源重组序列, 并以氯霉素抗性基因(*CAT*)表达盒作为筛选标记, 以及绿色荧光蛋白基因(*GFP*)表达盒作为报告基因。以 TA 克隆载体 pMD19-T 为基础, 将 *CAT* 表达盒以及 *GFP* 表达盒连接到 *rns-trnI* / *trnA-trnI* 两个同源重组片段之间, 构建得到含有报告基因 *GFP* 表达盒的三角褐指藻叶绿体表达载体, 利用电穿孔法将载体导入三角褐指藻叶绿体。对转化藻进行抗性筛选以及报告基因的检测, 结果表明, 外源基因 *CAT* 在转化藻中得到表达并提供抗性, 报告基因 *GFP* 成功地在叶绿体中表达。

关键词: 三角褐指藻; 叶绿体转化; 同源重组; 电穿孔法

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)03-0267-06

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.03.012

Foreign Protein Expression in Chloroplast Transformation of *Phaeodactylum tricornutum*

ZHU Cong-cong^a, ZHANG Nai-sheng^a, XIE Wei-hong^a, NIU Ying-fang^a,

YANG Wei-dong^{a,b}, LIU Jie-sheng^{a,b}, LI Hong-ye^{a,b*}

(a. Department of Biotechnology; b. Key Laboratory of Aquatic Eutrophication and Control of Harmful Algal Blooms of Guangdong Higher Education Institutes, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: To achieve foreign protein expression in the chloroplast of *Phaeodactylum tricornutum*, a chloroplast transformation vector was constructed. The sequences *rns-trnI* and *trnA-trnI* from *P. tricornutum* chloroplast genome were cloned and used as homologous recombination elements. Chloramphenicol acetyltransferase gene (*CAT*) expression cassette conferring chloramphenicol resistance was employed as selection marker, and green fluorescent protein gene (*GFP*) as reporter gene. Based on the TA cloning vector pMD19-T, *CAT* and *GFP* expression cassette were cloned in between the two homologous recombination elements. The resultant chloroplast transformation vector was transferred into the chloroplast of *P. tricornutum* by electroporation method. Transplastomic *P. tricornutum* cells were obtained upon chloramphenicol selection and reporter GFP could be detected in the chloroplasts, indicating that chloroplast expression system was successfully achieved.

Key words: *Phaeodactylum tricornutum*; Chloroplast transformation; Homologous recombination; Electroporation method

自从1984年首例转基因植物烟草(*Nicotiana tabacum*)问世以来, 向植物细胞核中转化外源基因一直是植物基因工程的主要研究方向^[1]。但是由于核转化的外源基因存在表达量低下、在后代中表

达不稳定、以及核基因易随花粉扩散所带来的生态安全性等问题, 近20年来人们相继开展了叶绿体遗传转化的研究^[2-3]。与传统的核基因转化相比, 叶绿体基因转化有着诸多优点: 植物细胞中存在大

收稿日期: 2011-02-21

接受日期: 2011-03-29

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B020301002, 2010B030600005, 2009B050600005); 中央高校基本科研业务费专项基金(21610103)资助

作者简介: 朱聪聪, 硕士研究生, 主要从事微藻基因工程研究, email: summerbird160@sina.com

* 通讯作者 Corresponding author, email: thyli@jnu.edu.cn

量的叶绿体拷贝,使得外源基因得到核基因转化很难实现的超量表达;外源基因通过同源重组定点整合在叶绿体基因组后不会产生位置效应和基因沉默现象;叶绿体遗传转化具有母性遗传的特点,有望解决核基因转化系统中因花粉扩散带来的生物安全性问题;大多数叶绿体基因以操纵子的形式存在,可实现多个外源基因在叶绿体基因组中同时转化和表达;在叶绿体中表达的蛋白质可以形成二硫键,人源蛋白表达后也可以被正确折叠,这一转化系统有望作为植物生物反应器应用于生产口服疫苗、植物抗体等高附加值产品^[4]。Boynton 等^[5]以莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)为材料用基因枪进行外源基因对叶绿体的转化,使突变体成功转化为能进行光合作用的正常莱茵衣藻,首次证实了叶绿体转化的可行性。

硅藻是大量存在于海洋生态系统中单细胞浮游植物,因为其占地球初级生产力总量的 25% 并且和 O₂ 的生成密切相关,从而被认为具有重要的作用^[6-8]。三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)属于硅藻门(Bacillariophyta)的褐指藻属,目前对三角褐指藻的研究主要集中在生态学、生理学、生物化学和分子生物学等方面^[9]。三角褐指藻不含内毒

素,培养简单且成本低廉,作为生物反应器具具有明显的优势,有关其基因工程的研究也仅限于核基因组的遗传转化,通过利用其叶绿体同源重组序列进行定点转化来实现外源基因的叶绿体高量表达至今未见报道。

本研究运用同源重组的方法,以三角褐指藻为受体,将 *CAT* 表达盒以及 *GFP* 表达盒定点整合到叶绿体基因组中。利用电穿孔技术将载体导入受体细胞的叶绿体,通过抗氯霉素筛选出转化藻,扩大培养后观察到 *GFP* 的荧光表达,为微藻叶绿体生物反应器的应用提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

菌株和藻株 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 由本实验室保存,pMD19-T Vector 购自大连 TAKARA 公司,三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)由暨南大学藻种库保存。

质粒和引物 质粒 pBI121-GFP(带有 CaMV 35S 启动子调控下的 GFP 基因)为本实验室保存,pLysS 购自 Invitrogen 公司。实验所用引物序列见表 1,由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 本实验中使用的引物
Table 1 PCR Primers used test

引物 Primers	序列 Sequence (5'~3')	限制性位点 Restriction sites
P1	CGAGCTCCGAGCTCACTGGGCGTAAAGCGTCTGT	<i>Sac</i> I
P2	GGGGTACCGGGGTACCTTGGGCCATTCTGGATTTG	<i>Kpn</i> I
P3	ACGCGTCGACAACCTGCAGCGGGGTATAGCTCAGTTGG	<i>Sal</i> I
P4	AACTGCAGACATGCATGCTTTCGTTACTCAAGCCGACATT	<i>Pst</i> I
P5	CGGGATCCCGGGATCCAGCATCACCCGACGCACT	<i>Bam</i> HI
P6	GCTCTAGAGCTCTAGATAACGACCCTGCCCTGAAC	<i>Xba</i> I
P7	GGACTAGTGCGGCCGCCTCGAGCAGGTCCCCAGATTAGCC	<i>Spe</i> I, <i>Not</i> I, <i>Xho</i> I
P8	ACGCGTCGACCAGGGTTTTCCAGTCA	<i>Sal</i> I

酶和试剂 各种限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶、LA *Taq* DNA 聚合酶和 dNTP 购自 TAKARA 公司,胶回收试剂盒购自 TAKARA 公司,质粒 DNA 回收纯化试剂盒购自东盛公司,其它常规试剂采用进口分装或国产分析纯。

主要仪器 Bio-Rad PCR 仪;稳压稳流电泳仪为北京六一仪器厂产品;低温高速离心机为广州华南医疗器械厂产品;凝胶图像分析仪为美国 Alpha 公司产品;恒温水浴箱为 PHARMARCIA 公

司产品;电子天平为上海天平仪器厂产品;Bio-Rad 电穿孔仪;ZEISS LSM 510 META 激光扫描共聚焦显微镜。

1.2 三角褐指藻的培养及基因组 DNA 的提取

三角褐指藻所用培养基为 *f2*(Guillard.1962)改良配方(Si),经 0.22 μ m 纤维滤膜除菌所得。藻置于温度为(21 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C、光照强度为 200 μ mol m⁻²s⁻¹、光暗比为 12 h:12 h 的 RXZ-430E 人工智能气候培养箱(宁波江南仪器厂)中培养至对数期后提取其基因

组 DNA, 基因组 DNA 的提取具体操作按照 Takara DNA 提取试剂盒进行。

1.3 叶绿体同源重组片段的克隆及整合位点的引入

以三角褐指藻叶绿体 DNA 为模板, 利用引物 P1、P2 扩增 *rns-trnI*, 引物 P3、P4 扩增 *trnA-rnl*, 作为定点整合外源基因的叶绿体同源重组序列, 其中引物是根据 NCBI 网站上三角褐指藻叶绿体基因组序列(EF067920.1)设计的, 为了方便克隆及载体构建, 引物 P1 和 P2 的 5' 端分别引入酶切位点 *SacI* 和 *KpnI*, 引物 P3 和 P4 的 5' 端分别引入酶切位点 *SalI* 和 *PstI*。反应程序为: 94℃ 4 min; 94℃ 50 s, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。扩增产物经电泳、回收, 分别连接到 pMD19-T 载体上, 转化大肠杆菌后筛选获得重组子, 依次命名为 pMD-I、pMD-A, 酶切鉴定正确后测定插入片段的核苷酸序列。

1.4 氯霉素乙酰转移酶基因表达盒的克隆及整合位点的引入

氯霉素抗性基因编码氯霉素乙酰转移酶 (CAT)。以质粒 pLysS 为模板, 利用引物 P5、P6 扩增 CAT 基因以及该基因来源于大肠杆菌的上游 260 bp 长度的启动子和后面 150 bp 长度的终止子, 将克隆得到的整个 CAT 基因表达盒构建到载体中的两段同源重组片段之间, 同样在引物 P5 和 P6 的 5' 端分别引入特定的酶切位点 *BamHI* 和 *XbaI*。反应条件同上, 其中退火改为 58℃。同样方法获得重组子, 命名为 pMD-CAT, 酶切鉴定正确后测定插入片段的核苷酸序列。

1.5 报告基因 GFP 表达盒的克隆及整合位点的引入

以质粒 pBII21-GFP 为模板, 利用引物 P7、P8 扩增 GFP 表达盒, 包括上游 830 bp 长度的花椰菜 (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) 花叶病毒 CaMV 35S 启动子和下游 250 bp 长度的 NOS 终止子, 将克隆得到的整个 GFP 表达盒构建到载体中的两段

同源重组片段之间, 在引物 P7 的 5' 端引入特定的酶切位点 *SpeI*、*NotI*、*XhoI*, 在引物 P8 的 5' 端引入特定的酶切位点 *SalI*。反应条件同上, 其中退火温度改为 60℃。同样方法获得重组子, 命名为 pMD-GFP, 酶切鉴定正确后测定插入片段的核苷酸序列。

1.6 三角褐指藻叶绿体表达载体的构建

利用同源重组片段 *rns-trnI* / *trnA-rnl* 与叶绿体基因组之间的同源重组将外源片段定点整合到受体细胞的叶绿体基因组中, CaMV 35S 启动子和 NOS 终止子调控外源基因的转录, 构建包含报告基因 GFP 和筛选标记基因 CAT 的三角褐指藻叶绿体基因组定点整合表达载体。利用 pMD19-T 载体上的多克隆位点, 将所需的各个元件依次连入载体中。构建流程如下: 先将同源重组片段 *rns-trnI* 从 pMD-I 上切下, 插入到 pMD19-T 上相应的位点之间, 获得质粒 ptnrI; 然后从 pMD-A 上切下同源重组片段 *trnA-rnl*, 插入到 ptnrI 上相应的位点之间, 获得了含有两个同源重组片段的中间载体 ptnrI-trnA; 酶切质粒 pMD-CAT, 回收 CAT 的表达盒, 将此表达盒插入 ptnrI-trnA 上两个同源重组片段之间, 得到中间载体 ptnrI-trnA-CAT; 从 pMD-GFP 上切下 CaMV 35S-GFP-NOS 表达盒, 插入到质粒 ptnrI-trnA-CAT 上, 最终构建包含报告基因 GFP 表达盒和筛选标记 CAT 表达盒, 用于三角褐指藻叶绿体基因组定点整合表达的载体 pPtc-GFP (图 1)。

1.7 三角褐指藻叶绿体转化与筛选

离心收集 $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ 个藻细胞, $1394 \times g$ 离心 10 min, 加 150 μ L 1.0 mol/L NaCl 悬浮藻细胞, 再加 150 μ L 0.1 mol/L 甘露醇, 混匀, 冰上放置 30 min, 将藻液转移到 0.4 cm 电激杯内, 电激杯内藻液以不超过 400 μ L 为宜, 同时加质粒 pPtc-GFP (0.4 μ g) 混匀, 将电激杯放置好, 调电穿孔仪电容至 25F, 电阻为 400 Ω , 电压为 1.5 kV, 进行电击, 将电击后的藻液转移到 50 mL 三角瓶中, 加新鲜的

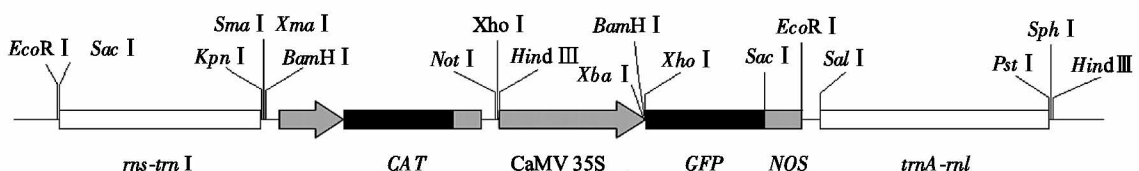


图1 三角褐指藻叶绿体基因组定点整合表达载体 pPtc-GFP

Fig. 1 Transformation and expression vector pPtc-GFP for site-specific integration into chloroplast genome of *P. tricornutum*.

f2 培养基 10 mL, 暗处理 2 h, 再正常培养 24 h (12L:12D)。收集培养 24 h 后的藻液, $155 \times g$ 离心 5 min, 用 f2(Si) 培养基悬浮藻细胞, 将藻细胞涂布于含有氯霉素 ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$) 的 f2(Si) 固体平板上进行筛选。挑取在抗性平板上长出的转化子藻落, 转接于含有相应浓度抗生素的液体 f2(Si) 培养基中扩大培养。

1.8 激光共聚焦扫描显微镜观察

取 20 μL 转化了 pPtc-GFP 并培养了 8 d 的藻液, 置于载玻片上, 移至激光共聚焦扫描显微镜下观察, 激发光波长为 488 nm 和 588 nm, 分别通过 BP505i-530 滤镜和 LP600 滤镜收集绿色荧光和红色荧光。

2 结果和分析

2.1 同源重组片段的克隆

分析三角褐指藻叶绿体基因组序列后我们选择相邻的两段基因 *rns-trnI* 及 *trnA-rnl* 作为同源重组片段。并且, 在三角褐指藻叶绿体基因组中, 这一对相邻的片段还有另外 1 份拷贝, 这样便会增加外源基因整合的效率及表达量。

用引物 P1 和 P2 扩增得到同源重组片段 *rns-trnI* 为 1.1 kb (图 2A), 将该片段克隆到 pMD19-T 载体上, 得到重组质粒 pMD-I, 通过测序验证及 NCBI BLAST 进行核苷酸同源性比较分析, 与 GenBank 中的三角褐指藻叶绿体基因组的相应区段的同源性达到 100%, 表明已获得了特异的 *rns-trnI* 同源重组片段。

用引物 P3 和 P4 扩增得到另一端同源重组片段 *trnA-rnl* 为 1.5 kb (图 2B), 与预期大小一致。用引物 P5 和 P6 扩增得到 CAT 表达盒片段为 1.1 kb, 与预期大小一致。用引物 P7 和 P8 扩增得到 GFP 原核表达盒片段为 1.8 kb, 与预期大小一致。经测序验证为正确序列。

2.2 GFP 基因叶绿体定点整合载体的构建

用 *SacI* 和 *KpnI* 双酶切质粒 pMD-I 和 pMD19-T 载体, 回收 1.1 kb 的三角褐指藻叶绿体同源重组片段 *rns-trnI* 和 2.7 kb 的载体, 将 *rns-trnI* 通过 T4 DNA 连接酶连到载体上, 重组质粒命名为 pSaI 和 *PstI* 双酶切质粒 pMD-A 和质粒 ptrnA-rnl 和 3.8 kb 的质粒 ptrnA-rnl 通过

T4 DNA 连接酶连到质粒 pBamHI 和 *XbaI* 双酶切 pMD-CAT 和质粒 pCAT) 片段和 5.3 kb 的质粒 pCAT 片段通过 T4 DNA 连接酶连到质粒 pSaI 和 *SpeI* 双酶切 pMD-GFP, 回收 1.8 kb 的 *GFP* 表达盒片段, 用 *SaI* 和 *XbaI* 双酶切质粒 pGFP 片段用过 T4 DNA 连接酶连到质粒 pSpeI 和 *XbaI* 属于同尾酶, 连接后切点均消失, 因此该重组质粒用 *SaI* 和 *XhoI* 双酶切验证, *GFP* 表达盒中的启动子 CaMV 35S 后有 1 个 *XhoI* 位点, 因此双酶切后会切除两个条带, 分别为 970 bp 和 830 bp, 酶切鉴定如图 2C。每连入一个外源片段获得重组质粒后, 都用该外源片段的特异性引物测序, 测序结果与片段克隆的测序结果是一致的, 证明所构建的叶绿体转化载体是正确的。

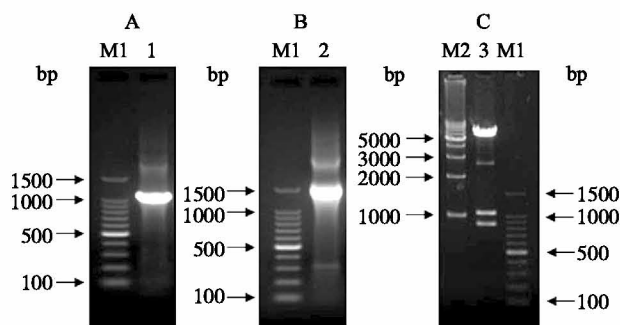


图 2 同源重组序列 *rns-trnI* 和 *trnA-rnl* 的克隆及载体 pPtc-GFP 酶切验证

Fig. 2 Cloning of *rns-trnI*, *trnA-rnl* and confirmation of vector construction by restriction digestion

A. *rns-trnI* 的 PCR 扩增 PCR of *rns-trnI*; B. *trnA-rnl* 的 PCR 扩增 PCR of *trnA-rnl*; C. pPtc-GFP 的双酶切 pPtc-GFP digested with *SaI* and *XhoI*; M1. 100 bp DNA ladder Marker; M2. 1 kb DNA ladder Marker.

2.3 转基因藻株的鉴定

电穿孔转化三角褐指藻细胞后, 经氯霉素抗性筛选, 获得的转化藻细胞扩大继代培养。采用激光扫描共聚焦显微镜对扩大培养的藻细胞进行观察。在绿色通道内, 转化藻细胞内发出较强的绿色荧光 (图 3A); 在相同层面上的红色通道内, 因叶绿体具有自发的红色荧光, 可观察到藻细胞内的椭圆形叶绿体为红色 (图 3B); 在叠加的照片里, 可观察到所

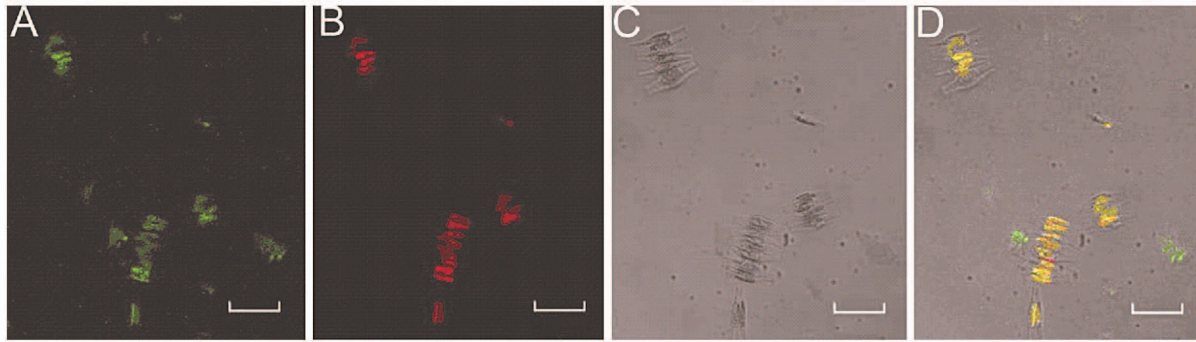


图3 激光扫描共聚焦显微镜检测三角褐指藻细胞的 GFP 表达

Fig. 3 Expression of GFP in the chloroplast of *P. tricornutum* under confocal microscopy

A. 绿色通道下的 GFP 荧光 GFP fluorescence in green channel; B. 红色通道下的叶绿体自发荧光 Chloroplast autofluorescence in red channel; C. 微分干涉相衬(DIC)通道图像 DIC (differential interference contrast) channel; D. A、B 和 C 的叠加图像 Merged image of A, B and C. Bars = 10 μ m

有发出在各自通道发出红色或绿色荧光的亚细胞部位均为黄色(图 3D),黄色部分表明叶绿体的红色荧光和 GFP 的绿色荧光具有很高的重合度。因此,表达结果表明,GFP 在三角褐指藻叶绿体中成功获得了表达。

3 讨论

三角褐指藻是一种重要的饵料硅藻。随着三角褐指藻基因组测序的完成,多种基因工程手段的成功运用,也使其成为极具潜力的生物反应器。近年来,叶绿体基因工程受到越来越多的研究者的关注,叶绿体转化技术及转化方法不断成熟与完善,越来越多的外源基因被直接导入了植物叶绿体基因组中。叶绿体源于蓝细菌,且在高等植物的进化过程中相当保守,因此,叶绿体成为高等植物细胞中一种具有原核特性的特殊的细胞器,这一特性使得叶绿体转化具有了原核性,许多来自微生物的原核基因无须经过修饰改造便可以在高等植物的叶绿体中进行高效表达^[11]。近年来叶绿体转化研究取得了一系列重大成果,许多种植物抗体、疫苗蛋白以及一些药用蛋白在植物叶绿体中成功表达,目前成功实现叶绿体转化的植物有烟草^[12]、马铃薯(*Solanum tuberosum*)^[13]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[10]、番茄(*Lycopersicon esculentum*)^[14]、棉花(*Gossypium* spp.)^[15]、胡萝卜(*Daucus carota*)^[16]、油菜(*Brassica chinensis*)^[17]、大豆(*Glycine max*)^[18]等。真核藻类的基因工程研究主要集中在核基因组转化,叶绿体转化则仅在模式藻莱茵衣藻中获得成功^[5],而有关海洋微藻的叶绿体转化尚未见成功报道。本研究首先实现了硅藻中的叶绿体表达。

叶绿体转化的实现要通过载体上外源基因表达盒两侧的同源重组片段与受体叶绿体基因组相应区段的 DNA 发生同源重组,这样随着受体叶绿体基因的复制,载体上两段同源重组片段之间的外源基因部分就会以双交换的方式定点整合到受体叶绿体基因组中。一般情况下叶绿体同源片段的大小以 1~2 kb 为宜,片段太小有可能导致转化率降低^[10],同源片段过大又不便于 DNA 分子的体外重组操作。外源基因整合到受体叶绿体基因组中的前提是既不引起叶绿体基因组原有序列的丢失,又不会影响到邻近基因的正常功能。本研究选用 *rns-trnI* 和 *trnA-trnI* 基因片段作为同源重组片段,一方面是这两个片段在进化上具有高度保守性;另一方面是这两个基因位于叶绿体基因组反向重复区,具有 2 个拷贝,可以增加外源基因的整合效率,提高外源基因的表达水平。载体中使用了氯霉素筛选标记,便于筛选转化体,可以在尽短时间内建立起三角褐指藻叶绿体转化的方法。*CAT* 基因的表达水平由 cAMP 受体蛋白(CAP)以及 cAMP 调控,*CAT* 基因前的富含 AT 区段的碱基在结合 CAP 方面也有作用^[19]。质粒 pLysS 中 *CAT* 前面的 260 bp 启动子区域中含有 CAP 结合位点,该区域中富含 AT 区段的碱基是正向重复序列,有助于 CAP 的结合,*CAT* 后面的 150 bp 终止子区域终止密码子 TAA 以及前面的富含 GC 区段和后边的 TA 区段可证明是 mRNA 终端位点。传统的叶绿体表达载体中的外源基因一般由叶绿体来源的启动子和终止子去调控,考虑到叶绿体表达具有原核性,因此在该叶绿体基因组定点整合表达载体中,首次采用来源于病毒的高效启动子 CaMV 35S 和

NOS 终止子来调控 GFP 的表达。在叶绿体基因工程中,由于每个细胞中的叶绿体基因组拷贝数较多,在可以使外源基因高效表达的同时,也增加了通过抗性筛选得到同质化转化子的难度,因为在嵌入了野生型和转基因型的叶绿体基因组的细胞中,由于转基因叶绿体抗性基因的表达遮蔽了野生型叶绿体,使其没有因为抗性筛选而被淘汰,必须经过多轮较长时间抗性筛选,并且通过 PCR 或 Southern Blot 验证,才能最后确定转基因植株是否达到同质化^[20]。

传统的叶绿体转化方法多采用基因枪法,但基因枪法所需耗材昂贵,操作复杂。本研究首次采用电穿孔法将外源基因导入藻细胞的叶绿体中,极大的降低了操作成本且易于操作。电穿孔过程中,电击的各项参数对转化效率有明显影响,经过多次探索,确定了电容为 25 F、电阻为 400 Ω 、电压为 1.5 kV 的参数下,电击后藻的转化效率较高,同时能保证有一定的存活率。本研究成功建立的三角褐指藻叶绿体表达体系为应用硅藻及其他海洋微藻叶绿体高效表达具有经济价值的蛋白等高附加值产品提供了技术支撑。

参考文献

- [1] Su T(苏涛), Zhan Y G(詹亚光), Han M(韩梅), et al. Chloroplast genetic engineering: A new approach in plant biotechnology [J]. Chin J Biotechn(生物工程学报), 2005, 21 (46): 74–680. (in Chinese)
- [2] Zhang J Y, Zhang Y, Song Y R. Chloroplast genetic engineering in higher plants [J]. Acta Bot Sin, 2003, 45(5): 509–516.
- [3] Sun M, Qian K X, Su N, et al. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast [J]. Biotechn Lett, 2003, 25: 1087–1092.
- [4] Daniell H, Khan M, Allison L. Milestones in chloroplast genetic engineering: An environmentally friendly era in biotechnology [J]. Trends Plant Sci, 2002, 7: 84–91.
- [5] 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.
- [6] Kroth P G, Chiovitti A, Gruber A, et al. A model for carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* deduced from comparative whole genome analysis [J]. PLoS ONE, 2008, 3(1): e1426.
- [7] Montsant A, Jabbari K, Maheswari U, et al. Comparative genomics of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. Plant Physiol, 2005, 137(2): 500–513.
- [8] Oudot-Le Secq M P, Grimwood J, Shapiro H, et al. Chloroplast genomes of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*. Comparison with other plastid genomes of the red lineage [J]. Mol Genet Genomics, 2007, 277 (4): 427–439.
- [9] Apt K E, Kroth-Pancic P G, Grossman A R. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* [J]. Mol Gen Genet, 1996, 252(5): 572–579.
- [10] Sikdar S R, Serino G, Chaudhuri S, et al. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell Rep, 1998, 18: 20–24.
- [11] McBride K E, Svab Z, Schaaf D J, et al. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco [J]. Biotechnology, 1995, 13(4): 362–365.
- [12] Li H Y, Ramalingam S, Chye M L. Accumulation of recombinant SARS-CoV spike protein in plant cytosol and chloroplasts indicate potential for development of plant-derived oral vaccines [J]. Exp Biol Med, 2006, 231(8): 1346–1352.
- [13] Sidorov V A, Kasten D, Pang S Z, et al. Stable chloroplast transformation in potato: Use of green fluorescent protein as a plastid marker [J]. Plant J, 1999, 19(2): 209–216.
- [14] 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 Biotechn, 2001, 19(9): 870–875.
- [15] Kumar S, Dhingra A, Daniell H. Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes [J]. Plant Mol Biol, 2004, 56(2): 203–216.
- [16] 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(1): 2843–2854.
- [17] Hou B K, Zhou Y H, Wan L H, et al. Chloroplast transformation in oilseed rape [J]. Transgen Res, 2003, 12(1): 111–114.
- [18] Dufourmantel N, Pelissier B, Garçon F, et al. Generation of fertile transplastomic soybean [J]. Plant Mol Biol, 2004, 55(4): 479–489.
- [19] Alton N K, Vapnek D. Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9 [J]. Nature, 1979, 282(5741): 864–869.
- [20] Khan M S, Maliga P L. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants [J]. Nat Biotechn, 1999, 17: 910–915.