基因组学与医学生物学(网络版), 2012 年, 第 1 卷, 第 7−17 页
Jiyinzuxue Yu Yixue Shengwuxue (Online), 2012, Vol.1, 7−17
http://gmb.5th.sophiapublisher.com

评述与展望

Review and Progress

叶绿体转化及其用于疫苗表达研究的最新进展

巩智刚, 徐芳, 周海鹏,王雯雯, 王玉华
西北大学生命科学学院, 陕西省生物技术重点实验室, 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西安, 710069
通讯作者: wangyh@nwu.edu.cn; 作者
基因组学与医学生物学, 2012 年, 第 1 卷, 第 2 篇 doi: 10.5376/gmb.cn.2012.01.0002
收稿日期：2012 年 04 月 02 日
接受日期：2012 年 05 月 18 日
发表日期：2012 年 06 月 28 日
本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2012 年第 31 卷第 3 期第 310-319 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议，采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权，再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。
建议最佳引用格式：
引用格式(中文)：
巩智刚等, 2012, 叶绿体转化及其用于疫苗表达研究的最新进展, 基因组学与医学生物学(online) Vol.1 No.2 pp.7-17 (doi: 10.5376/gmb.cn.2012.01.0002)
引用格式(英文)：
Gong et al., 2012, Chloroplast Transformation and the Latest Progress of its Application in Vaccine Expression, Jiyinzuxue Yu Yixue Shengwuxue (online) (Genomics and Medical Biology) Vol.1 No.2 pp.7-17 (doi: 10.5376/gmb.cn.2012.01.0002)

摘 要 随着植物转基因研究的不断深入，核基因组转化的转基因沉默现象严重影响了基因工程的应用效果。植物叶绿体遗传转化以叶绿体基因组为平台对植物进行遗传操作，外源基因定点整合及母性遗传特性能较好地解决“顺式失活”和“位置效应”等类的基因沉默问题和转基因逃逸等安全问题，成为植物基因工程发展的新方向，在工业、农业及医药生物领域发挥了重要作用，也为生产廉价、安全的植物疫苗提供了新思路。本文在简要介绍叶绿体转化的原理、转化方法与优势的基础上，重点综述了近年来通过该技术表达的一些重要的病毒抗原和细菌抗原。最后，对叶绿体转化技术在表达外源基因方面存在的问题进行分析。未来随着叶绿体基因表达、调控机制研究的逐渐深入及相关技术体系的日臻完善，叶绿体转化有望成为疫苗生产的生力军。
关键词 叶绿体转化; 基因工程; 疫苗生产

Chloroplast Transformation and the Latest Progress of its Application in Vaccine Expression

Gong Zhigang, Xu Fang, Zhou Haipeng, Wang Wenwen, Wang Yuhua
College of Life Sciences, Northwest University/Shanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology/Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Xi’an, 710069
Corresponding author: wangyh@nwu.edu.cn; Authors

Abstract With the deepening research into plant transgenosis, the application effect of genetic engineering has been seriously influenced by the transgenic silencing. By using chloroplast genome as a platform, chloroplast genetic transformation manipulates genes in plant. The advantages of exogenous gene site integration and maternal inheritance can effectively overcome the security issues of “gene silencing” and “transgene escape”, such as “cis-inactivation” and “position effect”. Therefore，chloroplast genetic transformation could lead a new perspective to the plant genetic engineering. It plays an important role in the industrial, agricultural and biomedical fields, and also provides new strategies to manufacture cheap and safe plant vaccine. In this paper, we briefly introduce the principles of chloroplast transformation, its methods and superiority. In addition, we review and highlight recent studies of chloroplast engineering related to some important vaccine antigens expression, including viral antigens and bacterial antigens. Finally, some problems about chloroplast transformation technology in expressing foreign genes were discussed. In the future, with continuous reinforcement of the research about chloroplast gene expression, and regulation mechanism, as well as the improvement of the related technical system, the chloroplast transformation is expected to become the vital force of the vaccine production.
Keywords Chloroplast transformation; Genetic engineering; Vaccines production

世界卫生组织 2008 年公布：在发展中国家，每年由传染性疾病引起的死亡人数高达 950 万(WHO, 2008, http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/index.html)。疫苗作为目前最有效的防范治疗传染性疾病的武器，在发展中国家远不能满足需求量。当前，疫苗主要是通过细菌、酵母和昆虫类细胞的发酵生产(Daniell et al., 2009)，不仅生产成本高、不易储存和运输，且具有潜在的安全性问题等，

其生产附带物内毒素与热原质的纯化过程也相当复杂(Anderson, 2010)，诸多因素限制了传统疫苗的广泛应用。

随着分子生物学的发展，植物转基因技术如日中天。植物作为可再生资源，能够通过基因改造来表达外源蛋白，并提供正确组装、折叠所需要的分子伴侣等。利用植物生物反应器表达疫苗的研究日臻成熟并展示出操作方便、成本经济、应用范围广等优势。然而传统的核基因组转化中外源基因的表达效率偏低，及转基因的逃逸现象成为现阶段限制植物疫苗发展的瓶颈环节，而叶绿体转化技术的兴起与发展，为将来生产廉价、安全的植物疫苗提供了新思路。它突破了核基因组转化外源基因表达低效、易随花粉逃逸两大障碍，具有高效表达、定点整合、母性遗传等优点(Maliga, 2002; Wang et al., 2009; Bock and Warzechr, 2010; Maliga and Bock, 2011; Cui et al., 2011)。本文在对叶绿体转化技术简要介绍的基础上，阐述了叶绿体转化在疫苗抗原的高效表达和物种扩展方面的研究进展，重点对近年来通过该技术表达的一些重要的病毒抗原和细菌抗原进行综述，对叶绿体转化技术在表达外源蛋白方面存在的问题进行分析，并探讨植物疫苗研究的未来发展方向。

1 叶绿体遗传转化技术概述

1988 年 Boynton 等(1988)用野生型叶绿体 DNA 转化衣藻突变体，使其光合能力完全被恢复，首次证明叶绿体基因组可以被转化。历经 20 多年的研究与发展，叶绿体基因工程在技术和应用上都取得了可喜的进步，以下仅对叶绿体遗传转化的原理、转化方法及其优点进行简要介绍。

1.1 叶绿体遗传转化的原理

叶绿体转化是对植物叶绿体基因组进行的遗传转化，基本原理是通过目的基因两端连接的叶绿体同源片段与叶绿体基因组发生同源重组双交换，将目的基因整合进入叶绿体基因组，并经转录、翻译、折叠、修饰等获得功能产物。成功的叶绿体遗传转化有 3 个技术关键：

第一，构建表达载体时使用叶绿体来源的调控序列实现外源基因在叶绿体的高效表达。叶绿体中外源基因的表达水平受启动子及 5’非翻译区(5’-untranslated regions, 5’-UTR)，包括核糖体结合位点(ribosomal binding site, RBS)等元件的调控(Gruissem and Tonkyn, 1993)，用来保证目的基因能转录成高水平的 mRNA。叶绿体 16S rDNA 基因的强启动子 Prrn (Kota et al., 1999)和光系统 II 作用中心的启动子 PpsbA (Staub et al., 2000)是最常使用的启动子；其次，目的基因阅读框两侧的 5’-UTR 和 3’非翻译区(3’-untranslated regions, 3’-UTR)的序列或结构因子可以与特异蛋白质结合而影响 RNA 的成熟和稳定性，并成为影响转基因翻译的关键。通常在构建叶绿体表达载体时选用叶绿体基因 psbA 的 5’-UTR 和 3’-UTR (Verma and Daniell, 2007)，保证转基因的高水平翻译。

第二，同源重组实现目的基因的定点整合。在构建叶绿体表达载体时，为避免位置效应，且不破坏叶绿体基因的原有功能，通常选用叶绿体基因组中相邻的两个基因作为同源重组片段(一般为 1~2 kb)，两基因间隔区作为外源基因整合位点。外源基因可以在叶绿体环状基因组的多个位点上表达，到目前为止，叶绿体转化使用过的位点有 16 个，如 rbcL/accD、trnV/rps7、psbA/trnK、atpB/rbcL 等(Cui et al., 2011; Maliga and Bock, 2011)。

第三，叶绿体转基因个体基因组的同质化是其稳定遗传的前提。叶绿体基因组的高拷贝是其优点，也是其缺点，高拷贝性决定了外源基因几乎不可能同时转化所有叶绿体基因组，极易出现转化的与未转化的叶绿体组成的异质体。为了保证转基因在后代中的稳定遗传，在转化过程中必须淘汰未被转化的叶绿体基因拷贝，通常在构建叶绿体表达载体时连入筛选标记基因，转化后在高浓度选择压力下进行多轮次抗性筛选，从而实现叶绿体基因组的同质化(Kittiwongwattana et al., 2007)。aadA 基因是目前叶绿体转化中应用最广泛、筛选效率最高的抗生素类筛选标记基因(Svab and Maliga, 1993)，其编码的氨基糖苷-3-腺苷酸转移酶能使转化植株具有壮观霉素和链霉素抗性，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。此外，nptII 基因(Carrer et al., 1993)、neo 基因(Kuroda and Maliga, 2001)、细菌 bar 基因(Lutz et al., 2001)等也相继用作叶绿体转化的筛选标记基因，但转化效率均较 aadA 基因要低很多，目前仍以 aadA 使用最为广泛。

1.2 叶绿体遗传转化的方法

用于叶绿体遗传转化的方法主要有：农杆菌介导法、基因枪轰击法、PEG 融合法、花粉管导入法、显微注射法和电激法。其中使用最多、最成熟、最高效的方法是基因枪法，即将外源 DNA 包被在微小的金

粒或钨粒表面，然后在高压作用下被高速射入受体细胞或组织。这一方法适合于不同植物，转化频率高。应用基因枪法已成功进行十多种植物的叶绿体转化(Wang et al., 2009), 如烟草(Nicotiana tabacum)、拟南芥(Arabidopsis thaliana)、番茄(Solanum lycopersicum)、胡萝卜(Daucus carota)、莴苣(Lactuca sativa)、油菜(Brassica campestris)等，其中转化效率最高的是模式植物烟草，这一定程度上取决于受体植物是否拥有高频率的离体再生体系。

1.3 叶绿体遗传转化的优势

植物叶绿体转化是将外源基因插入叶绿体基因组中进行表达，它具有核转化不具备的独特优势(Maliga, 2002; Wang et al., 2009; Bock and Warzechr, 2010; Maliga and Bock, 2011; Cui et al., 2011)：(1)叶绿体基因组的高拷贝性使外源基因的表达水平高；(2)外源基因的定点整合能较好地解决“顺式失活”、“位置效应”等类的基因沉默问题；(3)叶绿体基因组的原核特性使外源基因可以原核方式表达，这为多基因操作提供了方便，可以多顺反子形式向叶绿体基因组中同时引入多个外源基因；(4)大多数植物的叶绿体基因呈单亲母性遗传方式，使得外源基因不会随花粉飘逸。叶绿体遗传转化的独特优势使其成为植物基因工程发展的新方向和科研工作者研究的热点之一，并在应用研究领域也得到了迅速发展。

2 叶绿体遗传转化技术用于疫苗表达的研究进展

综合国内外文献，可将叶绿体转化应用研究划分为两大方向：一是利用叶绿体转化技术对农作物的重要农艺性状进行改良，二是通过叶绿体转化表达量高的优势作生物反应器表达疫苗和药用蛋白等生物制剂。本文主要就叶绿体遗传转化技术在疫苗表达研究方面的最新进展进行综述。

外源基因在叶绿体中的表达效率高，以植物叶绿体作为生物反应器生产疫苗和药用蛋白等生物制剂研究已逐渐成为叶绿体基因工程研究的新亮点。烟草既不是粮食也不是饲料，且因其生物量大，离体再生及转化效率高，而成为最常用也是最成功的受体植物材料，目前已知的大多数生物制剂和疫苗均采用烟草作为受体材料。

2.1 疫苗抗原的高效表达

叶绿体基因组的巨大拷贝数使得叶绿体转化相对于核转化具有更高的转化频率。在构建叶绿体表达载体时，使用叶绿体来源的强启动子和特定的 5’、3’调控序列使得目的基因高水平的转录和翻译。以上两点保证了目的基因在叶绿体中的高效表达，实现了蛋白质的高水平积累(Chebolu and Daniell, 2009)。2003 年，Tregoning 等(2003)首次在烟草叶绿体中成功表达破伤风病毒蛋白多肽 TetC，开启了叶绿体转化高效表达疫苗抗原的的大门，TetC 累积量占总可溶性蛋白(total soluble proteins, TSP)的 25%。此后，研究者们进行了一系列的尝试并获得一定成功。例如：变形虫病疫苗：7% TSP (Chebolu and Daniell, 2007)；人乳头瘤病毒：20%~26%TSP (Millan et al., 2008)；口蹄疫病毒：51% TSP (Lentz et al., 2010)；金黄色葡萄球菌疫苗：23% TSP (Dreesen et al., 2010)；炭疽病毒抗原：5.3% TSP (Gorantala et al., 2011)等。通常，1% TSP 的蛋白累积量被作为商业化生产的门槛(Fischer et al., 2004)。目前为止，在叶绿体转化中成功表达的疫苗抗原，已有许多达到商业化水平。所以，叶绿体转化中外源蛋白高效表达的突破使得疫苗抗原大规模生产成为可能(Chebolu and Daniell, 2009)。近来，Michous 等(2011)在叶绿体转化 TetC 的研究中突破传统的转基因疫苗仅在叶片才高效表达的观念，开发了一种新的平台：将转基因细胞的悬浮培养过程置于一种短时浸没生物反应器中，用以 MS0 为介质 的 0.1 μmol/L 噻苯隆对转基因细胞进行短时间隔处理，培养后 TetC 可达 8% TSP。

2.2 生产疫苗抗原的物种扩展

烟草作为植物界的“果蝇”，具有繁殖系数高，单株产量高，组培体系成熟，遗传背景清楚，基因易操作等优点，已被证明为叶绿体转化的最佳平台。但烟草不能食用，且含有生物碱和尼古丁等有害物质，固不适合可食用疫苗的开发。唯一例外的烟草“81V9”品系，但其中仍含有少量的生物碱等(Menassa et al., 2001)。在对模式植物烟草的研究获得丰富经验之后，研究者的目光转移到可食用植物上。当 Kumar 等(2004)成功建立稳定、高效的胡萝卜叶绿体转化体系时，胡萝卜以其独特的优势被认为是生产可食用疫苗的理想材料：两年生植物胡萝卜第一年不开花即可收获块状根的特性使其作为叶绿体转化受体不会造成污染；而单细胞起源的胡萝卜体细胞胚胎利用人造种子技术可冷藏保存数年时间。但实际中，胡萝卜较慢的再生速度成为其应用最大的障碍。在对番茄的叶绿体转化中，人类免疫缺陷病毒(HIV) p24 抗原在成熟

的番茄比未成熟番茄中的表达量(2.5% TSP)降低了 90% (Zhou et al., 2008)。2007 年，Wurbs 等(2007)在研究中也发现类似现象：叶绿体转基因番茄中类胡萝卜素在叶子的表达量要远远高于成熟果实。由此推测：在果实的发育过程中，质体基因表达呈下调趋势，而以果实作为可食部分的作物并不适合可食疫苗的开发。莴苣是当前转基因材料中的明星，能食用，再生速度快，叶绿体转化与烟草类似，经研究者的优化，已成功表达了许多药物蛋白和疫苗抗原(Davoodi-semiromi et al., 2009)，更成为目前叶绿体表达可食疫苗抗原研究的焦点。总之，现在叶绿体基因组遗传背景清楚的植物相对较少，而已知的像水稻，小麦等农作物的叶绿体转化还处于开发期，许多物种再生体系的研究也很滞后，这成为限制叶绿体转化技术推广应用的主要瓶颈。

2.3 叶绿体遗传转化表达的疫苗抗原

通过叶绿体转化成功表达的化合物和蛋白质已经很多，包括一些生物医药、疫苗抗原、酶、血浆蛋白和抗体等。区别于大肠杆菌表达体系，植物的叶绿体具备一定的蛋白质翻译后修饰和二硫键形成的条件，能够使蛋白质形成功能性的三、四级结构。近年来，利用叶绿体转化技术表达疫苗抗原已成为生物技术领域研究的热点之一，且取得了一定的进展。通过该技术成功表达的抗原主要有病毒疫苗和细菌疫苗两大类，表 1 显示了 2008 年以来通过该技术表达的各种病毒疫苗和细菌疫苗。

2.3.1 病毒抗原

(1)猪瘟病毒(CSFV)：CSFV 又称猪霍乱病毒，以高烧和复合出血为主要临床特征，是全世界普遍分布的疾病之一。叶绿体转化表达 CSFV 疫苗的研究已取得一定进展：2007 年，He 等(2007)将 CSFV 结构蛋白 E2 基因置于 P64E2 载体中获得衣藻转化子。ELISA 定量分析显示重组蛋白表达量可达 1.5%~2% TSP。小鼠皮下注射疫苗后可检测到免疫反应，但口服疫苗后并未检测到免疫反应。分析原因是低剂量疫苗口服后发生了降解，不足于引起免疫反应。此后，Shao 实验室又成功将 E2 基因导入烟草叶绿体基因组获得转化子(Shao et al., 2008)。也有研究者曾成功构建猪瘟病毒 E2 基因在百脉根叶绿体基因组中的定点转化载体 pAKE2，为百脉根叶绿体的转化及用叶绿体生产可食 CSFV 疫苗奠定基础(杨宗岐等, 2007)。近来，Li 等(2011)对传统 CSFV 疫苗的免疫性进行改善，将 VPIL6C 质粒(包含猪白细胞介素-6 基因和 CpG 基序)与壳聚糖纳米粒进行离子交叉连接(CNP)后，间隔注射出生 30 d 的小猪，并同时注射 CSFV 疫苗。发现猪体液免疫和细胞免疫效果极佳，而此法也有望成为一种成本效益型的辅助手段来提高猪对疾病的抵抗力。

(2)人乳头瘤病毒(HPV)：全球每年约有 20 万妇女死于宫颈癌，死亡率排名仅次于乳腺癌。HPV (人乳头瘤病毒)是宫颈癌的重要致病因子，其中大约 70%的恶性宫颈癌由 HPV-16 或 HPV-18 引起(Smith et al., 2007)。目前市场上的 HPV 疫苗主要有预防性和治疗性两种，在叶绿体中成功表达的多为预防性的亚单位疫苗。Millan 等(2008)在烟草叶绿体中成功表达 HPV-16 L1 抗原(HPV 衣壳蛋白)，并在小鼠腹腔内检测出高免疫性。衣壳粒促使疫苗抗原正确折叠并形成显示免疫原性必须的准确构象。近来，Waheed 等(2011)在上述基础上，将 L1 蛋白与衣壳粒组装基因一并导入烟草叶绿体获得转化子，提出了热稳定的衣壳粒有望成为预防宫颈癌的第二代疫苗。

(3)人类免疫缺陷病毒(HIV)：自 1981 年 HIV 被发现起，HIV 一直被视为人类的天敌，且至今没有有效的治疗方法。因此，开发有效疫苗预防 HIV 实属当务之急。目前，已经有不同的 HIV 疫苗抗原在叶绿体成功表达，但都没有检测到免疫性，原因可能是叶绿体缺乏 HIV 抗原蛋白翻译后修饰机制，如糖基化等。McCabe 等(2008)成功将两种不同 HIV-1 型病毒—p24 载体：pZSJH1p24 (rbcL 和 accD 基因间插入 p24cDNA)和 pZF5 (trnfM 和 trnG 基因间插入密码子优化的 p24 基因)导入马里兰烟草品系，并检测了 p24 的表达量。结果显示：pZSJH1p24 转化烟草叶片为正常绿色，p24 蛋白只在幼叶表达，可达 2.5% TSP；pZF5 转化烟草叶片为黄色表型，p24 蛋白在老叶或幼叶都表达，可达 4.5% TSP。N-末端排序和质谱分析显示：p24 没有发生糖基化、磷酸化修饰。近来，Gonzalze-Rabade 等(2011)在烟草叶绿体中获得 p24-Nef (p24 负调节因子)融合蛋白，并利用霍乱病毒 B 亚基为辅助，在对小鼠进行皮下注射 p24 蛋白和口服 p24-Nef 蛋白的测试中取得突破，检测到特异性血清 IgG 免疫反应，为防治 HIV 的研究提供进一步的帮助。但要做到有效预防 HIV，研究者还需克服许多困难，例如：HIV 基因的高变异性，缺乏相关的动物模型等。

(4)丙型肝炎病毒(HCV)：目前，我国 HCV 感染者出现了临床表现，在国家传染病报告中，对 HCV 传染病还没有一种有效的治疗手段(魏来和杨瑞峰, 2008)。

表 1 利用叶绿体转化表达的疫苗抗原(2008 年后)

Table 1 Summary of vaccine antigens expressed in the plastid genome by using chloroplast transformation (after year 2008)

类别 Items	疫苗抗原 Vaccine antigen	表达植物 The plant of expression	表达水平 The level of expression	参考文献 References
病毒疫苗 Virus vaccine	人乳头瘤病毒衣壳蛋白 HPV-16 L1 VLPs	烟草 *N. tabacum*	26% TSP	Millan et al., 2008
	人乳头瘤病毒衣壳蛋白 HPV-16 L1 VLPs	烟草 *N. tabacum*	1.5% TSP	Lenzi et al., 2008
	人乳头瘤病毒衣壳粒 HPV-16 L1 Capsomeres	烟草 *N. tabacum*	1.5% TSP	Waheed et al., 2011
	丙型肝炎病毒核心蛋白 HCVcore protein	烟草 *N. tabacum*	约 0.1% TLP	Madesis et al., 2010
	牛痘病毒信封蛋白 Vaccinia virus envelope protein	烟草 *N. tabacum*	8% TSP	Rigano et al., 2009
	猪瘟病毒结构蛋白 CSFV structural protein	烟草 *N. tabacum*	1%~2% TSP	Shao et al., 2008
	艾滋病毒(*p24*)蛋白 HIV (p24) protein	烟草 *N. tabacum*	4.5% TSP	McCabe et al., 2008
	艾滋病毒 *p24-Nef* 融合蛋白 HIV (p24-Nef) fusion protein	烟草 *N. tabacum*	约 40% TSP	Gonzalez-Rabade et al., 2011
	淀粉分裂酶 APP cleaving enzyme	烟草 *N. tabacum*	2% TSP	Youm et al., 2010
细菌抗原 Bacterial antigen	霍乱病毒 B 抗原 CTB antigen	烟草 *N. tabacum*	2.3% TSP	Rosales-Mendoza et al., 2009
	霍乱病毒 *CTB-AMA1* 和 *CTB-MSP1* 融合蛋白 CTB-AMA1 and CTB-MSP1 fusion protein	烟草 *N. tabacum* 莴苣 *L. sativa*	13.17% TSP 和 10.11% TSP 7.3% TSP 和 6.1% TSP	Davoodi-semiromi et al., 2010
	DPT 融合蛋白 diphtheria pertussis and tetanus fusion protein (DPT)	烟草 *N. tabacum*	0.8% TSP	Soria-Guerra et al., 2009
	炭疽病毒抗原 Bacillus anthraci antigen	烟草 *N. tabacum*	5.3% TSP	Gorantala et al., 2011
	炭疽病毒抗原 Bacillus anthraci antigen	烟草 *N. tabacum* 莴苣 *L. sativa*	29% TSP 22% TSP	Ruhlman et al., 2010
	纤连蛋白外结构域 A Fibronectin extra domain A	烟草 *N. tabacum*	2% TCP	Farran et al., 2010
	鼠疫杆菌 F1-V 抗原 *Yersinia pestis* F1-V antigen	烟草 *N. tabacum*	14.8% TSP	Arlen et al., 2008

通过叶绿体转化表达 HCV 疫苗的研究已经很多。张中林等(1999)将 HCV 基因组非结构 NS3 区和核心抗原 C 区的 cDNA 片段中间加入连接肽，构成融合基因导入衣藻叶绿体，获得转化子。而在对烟草叶绿体转化上述融合基因的研究中却没能实现同质化(山松等, 2000)。经密码子优化的丙型肝炎病毒核心序列被导入烟草叶绿体中，HCV 16 kD 核心多肽不仅高水平表达，且稳定地存在于不同年龄的叶片中，对这种多肽抗原在人体内诱导的抗体进行 Western 印迹分析成为了发展 HCV 治疗手段的第一步(Madesis et al., 2010)。

2.3.2 细菌抗原

(1)霍乱病毒 B 亚基(CTB)：首例在叶绿体成功表达的细菌抗原为 CTB 抗原，表达量可达 31.1% TSP，其能与肠膜 GM1 神经节苷脂受体末端结合，显示正常的生物学功能(Daniell et al., 2001)。此实验唤起了研

究者对转基因疫苗可商业化前景的关注。此后，与 CTB 同源的热易变毒素 B 亚基(LTB)与热稳定毒素(ST)的融合蛋白在烟草叶绿体中表达，对小鼠的口服免疫检测显示：血清和粘膜中的 LTB-ST 抗体不只对霍乱病毒有免疫效应，使小鼠肠液积累量减少，而且对由大肠杆菌引起的腹泻疾病有广谱抵抗作用(Rosales-Mendoza et al., 2009)。近来，又有 CTB-AMA1 (疟疾抗原顶端膜蛋白 1)和 CTB-MSP1 (疟疾裂殖子表面蛋白 1)两种 CTB 融合蛋白在烟草和莴苣叶绿体成功表达，二者均可诱导产生霍乱病毒和疟疾双重免疫，其中在口腔中对霍乱病毒显示完全免疫(Davoodi-semirmi et al., 2010)。此外，也有研究者将犬细小病毒(CPV)，口蹄疫病毒(FMDV)基因分别与 CTB 构建融合基因转化烟草、衣藻叶绿体获得转化子(吕海丹等, 2010)。

(2)破伤风，白喉和百日咳—DPT：DPT 是当今世界最流行的三种疾病。2003 年，DPT 的世界平均覆盖率达 78%，其中有 270 万孩子不能获得 DPT 疫苗，而南亚地区和撒哈拉以南非洲地区就达 195 万(WHO, 2008, http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/index.html)。目前 DPT 疫苗的生产程序繁杂，成本高价，使用时存在对一些抗毒素过敏等副作用。而叶绿体转化技术为生产廉价的 DPT 疫苗带来契机，一种包含破伤风、白喉、百日咳三种抗原决定簇的 DPT 杂合蛋白在烟草叶绿体高效表达，可达 0.8% TSP。在喂食小鼠干燥的叶片时发现：小鼠血清和粘膜组织中，具有功能性 IgG 和 IgA 抗体(Soria-Guerra et al., 2009)。

炭疽病作为一种由炭疽杆菌引起的人畜共患传染病，危害性极强。例如，2011 年 8 月， 我国辽宁鞍山市海城、岫岩地区发生严重炭疽病疫情。(http://bjrb.bjd.com.cn/html/2011-08/26/content_444250.htm?div=-1) 。目前，该病主要通过注射疫苗来预防。而目前市场上的炭疽疫苗具有一定的副作用，会引起受体局部疼痛和肿胀等甚至类似于感冒样的症状。叶绿体转化技术的发展有助于抑制这种生物恐怖，一种保护性抗原(PA)通过将 pagA 基因插入烟草叶绿体基因组而成功表达，并被证明可使小鼠获得高水平的 IgG，在免疫测试中，100%小鼠幸存。据评估：一英亩的这种转基因烟草大概可生产 3.6 亿剂炭疽疫苗(Watson et al., 2004; Koya et al., 2005)。最近，Gorantala 等(2011)将[PA(dIV)]基因导入烟草叶绿体也获得炭疽疫苗抗原，并首次进行了口服免疫测试。

在提到的所有疾病中，疫苗无论是口服还是皮下注射，免疫效果都难达到 100%。欲使叶绿体转化更好地应用于疫苗抗原的生产还需进一步的研究。

3 叶绿体遗传转化技术表达外源蛋白存在的问题与挑战

相对于核转化，叶绿体转化技术虽独辟蹊径，提供了新型环保疫苗的表达平台，但仍有许多不可忽视的问题制约着该技术在应用方面的扩展。

3.1 多效性

已有报道证实叶绿体转化中外源基因的表达会产生多效性(Tregoning et al., 2003; Hasunuma et al., 2008; Tissot et al., 2008)，包括雄性不育、黄叶、发育不良等，但其显然不是蛋白过量积累的结果。因为 Ruhlman 等(2010)实现了一种 CTB-Pins 融合蛋白的超表达，表达水平达 72% TLP，却没有任何负效果；而 Oey 等(2009)发现细胞溶解酶的超表达严重影响了植物的生长。Pelletier 和 Budar (2007)提出了多效性可能是一些因素干涉到机体胞质代谢相关基因的正常读码，或造成 ATP 的低效生产而造成的。为了克服这种负效果，未来的研究需在与叶绿体相关的代谢途径和发展叶绿体诱导表达系统来避免这种不利影响等方面作出努力。

3.2 诱导表达系统

叶绿体诱导表达系统的发展为避免转基因表达的多效性带来希望。Lössl 实验室为避免烟草叶绿体中使用 phb 操纵子造成的雄性不育现象，使用了乙醇诱导控制系统，主要通过向转基因植物喷洒 5%乙醇诱导核基因组表达 T7 RNAP，进而调控 phb 操纵子的转录(Lössl et al., 2005)。但这种诱导系统需要细胞核和叶绿体两部分转基因的表达，背离了叶绿体转化基因不随花粉漂移的优点。IPTG (ß-异丙基硫代半乳糖苷)诱导系统的出现很好的解决了上述问题。它基于 lacZ 阻遏物对转基因质体表达的调节，是一种完全的质体转基因表达，无基因扩散的安全忧虑(Mühlbauer and Koop, 2005)。也有研究者将不被叶绿体内源性转录因子识别的真核启动子置于叶绿体表达载体中，通过提供一种能够与叶绿体编码的质体 RNA 聚合酶相互作用的嵌合转录因子，特异性的启动转录实现诱导控制(Buhot et al., 2006)。近来，Verhounig 等(2010)尝试了一种较易调控的诱导系统：以茶碱为外源配体，诱导合成一种核糖开关作为质体表达必须的翻译调控因子，成功实现调控。叶绿体中外源基因高效表达

的优点本是生产成本效益型疫苗的基本支架，但使用诱导系统的转基因蛋白表达量要远逊于正常的叶绿体基因组转化，且仅在不可食的烟草中获得成功。

3.3 其它

目前，叶绿体转化在食用性农作物中的研究还仅限于物种特异的叶绿体转化体系的建立，未能进行转价值基因的操作，因此，此技术运用于新物种的研究仍是现在和今后一段时间亟待解决的关键问题。

生产疫苗的最终目标是用于预防治疗人类疾病，固在临床试验中，疫苗要求严格高效、安全、可靠。迄今为止，叶绿体中表达的疫苗还远没有达到临床水平。除了筛选标记删除技术仍处于最基础的技术尝试阶段和稀少的叶绿体转化物种外，主要原因是目前药物企业在这一领域的投入和支持不足，关注较少，加之叶绿体转化下游的疫苗抗原薄弱而昂贵的纯化技术，使得叶绿体转化的疫苗短期内还很难达到临床水平。

据报道，有三分之一被许可生产的药物蛋白为糖蛋白(Soria-Guerra et al., 2009)。叶绿体表达系统虽具有大肠杆菌、酵母等不可比拟的优势，但其合成的蛋白质因不会经过糖基化场所内质网，而不能生成为功能性糖蛋白，这一点也有待进一步的研究来解决。

4 小结

到目前为止，已有 27 种疫苗通过叶绿体表达系统实现表达，用于抵抗 17 种人类疾病(多数为细菌性疾病)，且将近一半的疫苗已在动物模型中被检测(Lössl and Waheed, 2011)。未来随着叶绿体基因表达、调控机制研究的逐渐深入及相关技术体系的日臻完善，叶绿体转化有望成为疫苗生产的生力军。相信在不久的将来，人类可以通过食用表达有特定疫苗的叶绿体转基因植物组织，就能够抵抗各种疾病。

作者贡献

巩智刚为第一作者，主要负责论文的撰写；徐芳为第二作者，周海鹏为第三作者，王雯雯为第四作者，共同负责文献资料的搜集、整理工作，以及论文修改，王玉华为通讯作者，主要对文章结构和编排等提供指导性建议，并对文稿进行最后的修改和审校。

致谢

本研究由国家自然科学基金(30900914)、陕西省教育厅重点实验室项目(11JS084)、陕西省教育厅专项(09JK777)和西北大学西部资源生物与现代生物技术重点实验室开放基金共同资助。感谢编辑老师及匿名的同行评审专家对本文的评审和建议。

参考文献

Anderson K., 2010, Economic impacts of policies affecting crop biotechnology and trade, N. Biotechnol., 27(5): 558-564 http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2010.05.012 PMid: 20478422

Arlen P.A., Singleton M., Adamovicz J.J., Ding Y., Davoodi-semiromi A., and Daniell H., 2008, Effective plague vaccination via oral delivery of plant cells expressing F1-V antigens in chloroplasts, Infect. Immun., 76(8): 3640-3650 http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00050-08 PMid:18505806 PMCid:2493203

Bock R., and Warzechr H., 2010, Solar-powered factories for new vaccines and antibiotics, Trends Biotechnol., 28(5): 246-252 http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.01.006 PMid:20207435

Boynton J.F., Gillham N.W., Harris E.H., Hosler J.P., Johnson A.M., Jones A.R., Randolph-anderson B.L., Robertson D., Klein T.M., Shark K.B., and Sanford J.C., 1988, Chloroplast transformation in Chlamyamonas with high velocity microprojection, Science, 240(4858): 1534-1538 http://dx.doi.org/10.1126/science.2897716 PMid:2897716

Buhot L., Horvath E., Medgyesy P., and Lerbs-mache S., 2006, Hybrid transcription system for controlled plastid transgene expression, Plant J., 46(4): 700-707 http://dx.doi.org /10.1111/j.1365-313X.2006.02718.x PMid:16640605

Carrer H., Hockenberry T.N., Svab Z., and Maliga P., 1993, Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco, Mol. Gen. Genet., 241(1-2): 49-56 http://dx.doi.org/10.1007/BF00280200

Chebolu S., and Daniell H., 2007, Stable expression of Gal/GalNAc lectin of Entamoeba histolytica in transgenic chloroplasts and immunoge-nicity in mice towards vaccine development for amoebiasis, Plant Biotechnol. J., 5(2): 230-239 http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.0023 4.x PMid:17309678

Chebolu S., and Daniell H., 2009, Chloroplast-derived vaccine antigens and biopharmaceuticals: Expression, folding, assembly and functionality, Curr. Top Microbiol. Immunol., 332: 33-54 http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-70868-1_3 PMid:19401820 PMCid:2764311

Cui C.J., Song F., Tan Y., Zhou X., Zhao W., Ma F.Y., Liu Y.Y., Hussain J., Wang Y.S., Yang G.X., and He G.Y., 2011, Stable chloroplast transformation of immature scutella and inflorescences in wheat (*Triticum aestivum* L.), Acta Biochim. Biophys. Sin., 43(4): 284-291 http://dx.doi.org/

10.1093 /abbs/gmr008 PMid:21343162

Daniell H., Lee S.B., Panchat T., and Wiebe P.O., 2001, Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts, J. Mol. Biol., 311(5): 1001-1009 http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2001.4921 PMid:11531335

Daniell H., Singh N.D., Mason H., and Streatfield S.J., 2009, Plant made vaccine antigens and biopharmaceuticals, Trends Plant Sci., 14(12): 669-679 http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2009.09.009 PMid:19836291 PMCid:2787751

Davoodi-semiromi A., Melissa S., Nalapalli S., Verma D., Singh N.D., Banks R.K., Chakrabarti D., Daniell H., 2010, Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery, Plant Biotechnol. J., 8(2): 223-242 http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00479.x PMid:20051036 PMCid:2807910

Davoodi-semiromi A., Samson N., and Daniell H., 2009, The green vaccine: A global strategy to combat infectious and autoimmune diseases, Hum. Vaccin., 5(7): 488-493 PMid:19430198 PMCid:2764717

Dreesen I.A., Hamri G.C., and Fussenegger M., 2010, Heat-stable oral algabased vaccine protects mice from Staphylococcus aureus infection, J. Biotechnol., 145(3): 273-280 http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.12.006 PMid:19995584

Farran I., Mccarthy-suáres I., Rio-manterola F., Mansilla C., Lasaite J.J., and Mingo-castel A.M., 2010, The vaccine adjuvant extra domain A from fibronectin retains its proinflammatory properties when expressed in tobacco chloroplasts, Planta, 231(4): 977-990 http://dx.doi.org/10.1007/s00425-010-1102-4 PMid:20108000

Fischer R., Stoger E., Schillberg S., Christou P., and Twyman R.M., 2004, Plant-based production of biopharmaceuticals, Curr. Opin. Plant Biol., 7: 152-158 http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2004.01.007 PMid:15003215

Gruissem W., and Tonkyn J.C., 1993, Control mechanisms of plastid gene expression, Crit Rev. Plant Sci., 12(1-2): 19-55 http://dx.doi.org/10.1080/713608040 http://dx.doi.org/10.1080/07352689309382355

Gorantala J., Grover S., Goel D., Rahi A., Magani S.K.J., Chandra S., and Bhatnagar R., 2011, A plant based protective antigen [PA(dIV)] vaccine expressed in chloroplast demonstrates protective immunity in mice against anthrax, Vaccine, 29(27): 4521-4533 http://dx.doi.org/10.1016/j. vaccine.2011.03.082 PMid:21504775

Gonzalze-Rabade N., Mcgowan E.G., Zhou F., Mccabe M.S., Bock R., Dix P.J., Gray J.C., and Ma J.K.C., 2011, Immunogenicity of chloroplast-derived HIV-1 p24 and a p24-Nef fusion protein following subcutaneous and oral administration in mice, Plant Biotechnol. J., 29(6): 629-638 http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00609.x PMid:21443546

Hasunuma T., Miyazawa S.I., Yoshimura S., Shinzaki Y., Tomizawa K.I., Shindo K., Choi S.K., Misawa N., and Miyake C., 2008, Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering, Plant J., 55(5): 857-868 http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03559.x PMid:18494855

He D.M., Qian K.X., Shen G.F., Zhang Z.F., Li Y.N., Su Z.L., and Shao H.B., 2007, Recombination and expression of classical swine fever virus (CSFV) structural protein E2 gene in Chlamydomonas reinhardtii chroloplasts, Colloids Surf. B Biointerfaces, 55(1): 26-30 http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.10.042 PMid:17188850

Kittiwongwattana C., Lutz K., Clark M., and Maliga P., 2007, Plastid marker gene excision by the phiC31 phage site-specific recombinase, Plant Mol. Biol., 64(1-2): 137-143 http://dx.doi.org/10.1007/s11103-007-9140-4 PMid:17294253

Kota M., Daniell H., Varma S., Garczynski S.F., Gould F., and Moar W.J., 1999, Over expression of the Bacillust huringiensis (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 1840-1845 http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.5.1840

Koya V., Moayeri M., Leppla S.H., and Daniell H., 2005, Plant-based vaccine: Mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge, Infect. Immun., 73(12): 8266-8274 http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.12.8266-8274.2005 PMid:16299323 PMCid:1307059

Kumar S., Dhingra A., and Daniell H., 2004, Plastid expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots and leaves confers enhanced salt tolerance, Plant Physiol., 136(1): 2843-2854 http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.045187 PMid:15347789 PMCid:523346

Kuroda H., and Maliga P., 2001, Sequences downstream of the translation initation codon are important determinants of

translation efficiency in chloroplasts, Plant Physiol., 125(1): 430-436 http://dx.doi.org/10.1104/pp.125.1.430 PMid:11154350 PMCid:61023

Lentz E.M., Segretin M.E., Morgenfeld M.M., Wirth S.A., Santos M.J.D., Mozgovoj M.V., Wigdorovitz A., and Bravo-almonacid F.F., 2010, High expression level of a foot and mouth disease virus epitope in tobacco transplastomic plants, Planta, 231(2): 387-395 http://dx.doi.org/10.1007/s00425-009-1058-4 PMid:20041332

Lenzi P., Scotti N., Alagna F., Tornesello M.L., Pompa A., Vitale A., Destradis A., Monti L., Grillo S., Buonaguro F.M., Maliga P., and Cardi T., 2008, Translational fusion of chloroplast-expressed human papillomavirus type 16 L1 capsid protein enhances antigen accumulation in transplastomic tobacco, Transgenic Res., 17(6): 1091-1102 http://dx.doi.org/10.1007/s11248-008-9186-3 PMid:18491213

Li D., Chen J.L., Zhang H., Yang X., Wan X.P., Cheng C., Li Y., Wang Z.Z., Lv X.B., Wang H.N., Wang H.Y., Li J.L., and Gao R., 2011, Improvement of the immunity of pig to Hog cholera vaccine by recombinant plasmid with porcine interleukin-6 gene and CpG motifs, Vaccine, 29(22): 3888-3894 http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.036 PMid:21443961

Lössl A., Bohmert K., Harloff H., Eibl C., Mühlbauer S., and Koop H.U., 2005, Inducible trans-activation of plastid transgenes: Expression of the R. eutropha phb operon in transplastomic tobacco, Plant Cell Physiol., 46(9): 1462-1471 http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pci157 PMid:15964903

Lössl A.G., and Waheed M.T., 2011, Chloroplast-derived vaccines against human diseases: Achievements, challenges and scopes, Plant Biotechnol. J., 9(5): 527-539 http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00615.x PMid:21447052

Lv H.D., Song L.X., and Xu Z.B., 2007, Chloroplasts-the new vaccine production factory, Xibao Shengwuxue Zazhi (Chinese Journal of Cell Biology), 29(3): 375-378 (吕海丹, 宋林霞, 徐振彪, 2007, 叶绿体-疫苗生产新工厂, 细胞生物学杂志, 29(3): 375-378)

Lutz K.A., Knapp J.E., and Maliga P., 2001, Expression of bar in the plastid genome confers herbicide resistance, Plant Physiol., 125(4): 1585-1590 http://dx.doi.org/10.1104/pp.125.4.1585 PMid:11299340 PMCid:88816

Madesis P., OsathanunkulL M., Georgopoulou U., Gisby M.F., Mudd E.A., Nianiou I., Tsitoura P., Mavromara P., Tsaftaris A., and Day A., 2010, A hepatitis C virus core polypeptide expressed in chloroplasts detects anti-core antibodies in infected human sera, J. Biotechnol., 145(4): 377-386 http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.12.001 PMid:19969031

Maliga P., 2002, Engineering the plastid genome of higher plants, Curr. Opin. Plant Biol., 5(2): 164-172 http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00248-0

Maliga P., and Bock R., 2011, Plastid biotechnology: Food, fuel, and medicine for the 21st century, Plant Physiol., 155(4): 1501-1510 http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.170969 PMid:21239622 PMCid:3091108

McCabe M.S., Klass M., Gonzalez-rabade N., Poage M., Badillo-corona J.A., Zhou F., Karcher D., Bock R., Gray J.C., and Dix P.J., 2008, Plastid transformation of high-biomass tobacco variety Maryland Mammoth for production of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) p24 antigen, Plant Biotechol. J., 6(9): 914-929

Menassa R., Nguyen V., Jevnikar A., and Brandle J., 2001, A self-contained system for the field production of plant recombinant interleukin-10, Mol. Breeding, 8(2): 177-185 http://dx.doi.org/10.1023/A:1013376407362

Michous F., Ahmad N., Mccarthy J., and Nixon P.J., 2011, Contained and high-level production of recombinant protein in plant chloroplasts using a temporary immersion bioreactor, Plant Biotechnol. J., 9(5): 575-584 http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00575.x PMid:21105992

Millan F.S.A., Ortigosa S.M., Hervas-stubbs S., Corral-martinez P., Segui'simarro J.M., Gaetan J., Coursagat P., and Veramendi J., 2008, Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic, Plant Biotechnol. J., 6(5): 427-441 http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00338.x PMid:18422886

Mühlbauer S.K., and Koop H.U., 2005, External control of transgene expression in tobacco plastid using the bacterial lac repressor, Plant J., 43(6): 941-946 http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02495.x PMid:16146531

Oey M., Lohse M., Kreikemeyer B., and Bock R., 2009, Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic, Plant J., 57(3): 436-445 http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03702.x PMid:18939966

Pelletier G., and Budar F., 2007, The molecular biology of cytoplasmically inherited male sterility and prospects for its engineering, Curr. Opin. Biotechnol., 18(2): 121-125 http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2006.12.002 PMid:17196813

Rigano M.M., Manna C., Giulini A., Pedrazzini E., Capobianchi M., Castilletti C., Di C.A., Ippolito G., Beggio P., De G.M.C., Monti L., Vitale A., and Cardi T., 2009, Transgenic chloroplasts are efficient sites for high-yield production of the vaccinia virus envelope protein A27L in plant cellsdagger, Plant Biotechnol. J., 7(6): 577-591 http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00425.x PMid:19508274

Rosales-Mendoza S., Alpuche-solis A.G., Soria-guerra R.E., Moreno-fierros L., Martinez-gonzalez L., Herrera-diaz A., and Korban S.S., 2009, Expression of an Escherichia coli antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants, Plant J., 57(1): 45-54 http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03666.x PMid:18764920

Ruhlman T., Verma D., Samson N., and Daniell H., 2010, The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression, Plant Physiol., 152(4): 2088-2104 http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.152017 PMid:20130101 PMCid:2850035

Shan S., Zhang Z.L., Wu X.F., and Shen G.F., 2000, A chimeric antigen gene of hepatitis C virus was introduced into chloroplast of tobacco & the study of transgenic plant homogenization, Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica), 26(2): 143-147 (山松, 张中林, 吴祥甫, 沈桂芳, 2000, 丙肝病毒融合抗原基因导入烟草叶绿体及转化株同质化的研究, 作物学报, 26(2): 143-147)

Shao H.B., He D.M., Qian K.X., Shen G.F., and Su Z.L., 2008, The expression of classical swine fever virus structural protein E2 gene in tobacco chloroplasts for applying chloroplasts as bioreactors, C R Biologies, 331(3): 179-184 http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2007.12.007 PMid:18280983

Smith J.S., Lindsay L., Hoots B., Keys J., Franceschi S., Winer R., and Clifford G.M., 2007, Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update, Int. J. Cancer, 121(3): 621-632 http://dx.doi.org/10.1002/ijc.22527 PMid:17405118

Soria-Guerra R.E., Alpuche-Solis A.G., Rosales-mendoza S., Moreno-fierros L., Bendik E.M., Martines-gonzalez L., and Korban S.S., 2009, 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, 229(6): 1293-1302 http://dx.doi.org/10.1007/s00425-009-0918-2 PMid:19306020

Staub J.M., Garcia B., Graves J., Hajdukiewicz P.T., Hunter P., Nehra N., Paradkar V., Schlittler M., Carroll J.A., Spatola L., Ward D., Ye G., and Russell D.A., 2000, High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts, Nat. Biotechnol., 18(3): 333-338 http://dx.doi.org/10.1038/73796 PMid:10700152

Svab Z., and Maliga P., 1993, High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(3): 913-917 http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.3.913

Tissot G., Canard H., Nadai M., Martone A., Botterman J., and Dubald M., 2008, Translocation of aprotinin, a therapeutic protease inhibitor, into the thylakoid lumen of genetically engineered tobacco chloroplasts, Plant Biotechnol. J., 6(3): 309-320 http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00321.x PMid:18266824

Tregoning J.S., Nixon P., Kuroda H., Svab Z., Clare S., Bowe F., Fairweather N., Ytterberg J., Van W.K.J., Dougan G., and Maliga P., 2003, Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts, Nucleic Acids Res., 31(4): 1174-1179 http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg221 PMid:125822 36 PMCid:150239

Verhounig A., Karcher D., and Bock R., 2010, Inducible gene expression from the plastid genome by a synthetic riboswitch, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107(14): 6204-6209 http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0914423107 PMid:20308585 PMCid:2852001

Verma D., and Daniell H., 2007, Chloroplast vector systems for biotechnology applications, Plant Physiol., 145(4): 1129-1143 http://dx.doi.org/10.1104/pp.107.106690 PMid:18056863 PMCid:2151729

Waheed M.T., Thones N., Müller M., Hassan S.W., Razavi N.M., Lössl E., Kaul H.P., and Lössl A.G., 2011, Transplastomic expression of a modified human papillomavirus L1 protein leading to the assembly of capsomeres in tobacco: A step towards cost-effective second-generation vaccines, Transgenic Res., 20(2):

271-282 http://dx.doi.org/10.1007/s11248-010-9415-4 PM id:20563641

Wang H.H., Yin W.B., and Hu Z.M., 2009, Adances in chloroplast engineering, J. Genet Genomics, 36(7): 387-398 http://dx.doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60128 -9

Watson J., Koya V., Leppla S.H., and Daniell H., 2004, Expression of Bacillus anthracis protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a non-food/feed crop, Vaccine, 22(31-32): 4374-4384 http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.01.069 PMid:15474731

Wei L., and Yang R.F., 2008, Progress and challenges in the laboratory diagnosis of hepatitis C virus, Chin. J. Lab. Med., 31(8): 845-848 (魏来和杨瑞锋, 2008, 丙型肝炎病毒实验室诊断的现状与存在的问题, 中华检验医学杂志, 31(8): 845-848)

Wurbs D., Ruf S., and Bock R., 2007, Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome, Plant J., 49(2): 276-288 http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02960.x PMid:17241450

Yang Z.Q., Li Y.N., Zhang Z.F., Wang Y., and Shen G.F., 2007, Site-specific integration vector construction of E2 gene in Hog cholera virus for chloroplast transformnation of Lotus coroiculatus genome, Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica), 40(11): 2648-2654 (杨宗岐, 李轶女, 张志芳, 王勇, 沈桂芳, 2007, 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, 40(11): 2648-2654)

Youm J.W., Jeon J.H., Kim H., Min S.R., Kim M.S., Joung H., Jeong W.J., and Kim H.S., 2010, High-level expression of a human b-site APP cleaving enzyme in transgenic tobacco chloroplasts and its immunogenicity in mice, Transgenic Res., 19(6): 1099-1108 http://dx.doi.org/10.1007/s11248-010-9383-8 PMid:20229285

Zhang Z.L., Shan S., Chen X., Su N., Wu X.F., Qian K.X., and Shen G.F., 1999, NS3-C chimeric antigen gene of hepatitis C virus was introduced site-specifically into chloroplast genome of chlamydomonas reinhardtii, Yichuan (Hereditas (Beijing)), 21(6): 1-6 (张中林, 山松, 陈曦, 苏宁, 吴祥甫, 钱凯先, 沈桂芳, 1999, 丙肝病毒融合抗原基因 NS3-C 定点整合入衣藻叶绿体基因组的研究, 遗传, 21(6): 1-6)

Zhou F., Badillo-corona J.A., Karcher D., Gonzalez-rabade N., Piepenburg K., Borchers A.M., Maloney A.P., Kavanagh T.A., Gray J.C., and Bock R., 2008, High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes, Plant Biotechnol. J., 6(9): 897-913 http://dx.doi.org/10.1111/j.1467- 7652.2008.00356.x PMid:19548344