

技术与方法

黄瓜离体叶绿体转化方法

王宏刚 白艳玲* 张文娟 刘盛海 王 勇 徐海津 张秀明 乔明强

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要 叶绿体是植物细胞内执行光合作用的半自主性细胞器, 叶绿体转基因是研究叶绿体基因表达调控机制的重要技术。通常在细胞和组织水平进行转化时需要叶绿体同质化, 因此实验周期较长。该文以无菌培养的黄瓜绿色子叶为材料, 通过差速离心分离叶绿体, 以0.33 mol/L山梨醇为叶绿体洗涤和悬液, 在13 kV/cm电击电压条件下进行转化。经PCR、RT-PCR鉴定和荧光显微镜观察, 证明外源基因能导入离体叶绿体并可进行表达。该方法有望为包括鉴定叶绿体表达载体功能等基础性研究工作提供快捷途径。

关键词 叶绿体; 分离; 转化

An In Vitro Cucumber Chloroplast Transformation Method

Wang Honggang, Bai Yanling*, Zhang Wenjuan, Liu Shenghai, Wang Yong, Xu Haijin,

Zhang Xiuming, Qiao Mingqiang

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Chloroplasts are semi-autonomous organelles in which photosynthesis takes place and chloroplast transformation is an important technique for investigating regulation mechanism of gene expression in the chloroplast. Transformation of chloroplasts by cells or tissues normally requires a long experimental period for achieving homoplasmic lines. In this paper, a chloroplast transformation method is reported, by which chloroplasts are isolated by differential centrifugation from green cotyledons of cucumber cultivated under sterile conditions, washed and suspended in 0.33 mol/L sorbitol, and then transformed by electroporation at 13 kV/cm voltage. The presence of exogenous gene and its expression in chloroplasts after transformation were confirmed by PCR, RT-PCR and observation of GFP fluorescence by fluorescence microscopy. It is hopeful that this method can provide a quick way for identification of efficient chloroplast expression vectors and other basic research.

Keywords chloroplast; isolation; transformation

植物细胞拥有细胞核、质体和线粒体三套基因组。质体(plastid)起源于内共生的蓝细菌, 在光合组织中的质体称为叶绿体(chloroplast)。叶绿体是植物

将太阳能转化成化学能的重要细胞器, 是生物维持生存的能量源头。因此, 叶绿体功能相关研究一直得到关注并成为当前生命科学研究的一个热门领域^[1-3]。

收稿日期: 2016-04-26 接受日期: 2016-09-14

天津市自然科学基金(批准号: 12JCYBJC20000)和南开大学基础学科拔尖人才培养试验研究课题(批准号: 201612)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23503340, Fax: 022-23503692, E-mail: baiyl@nankai.edu.cn

Received: April 26, 2016 Accepted: September 14, 2016

This work was supported by the Tianjin Natural Science Foundation (Grant No.12JCYBJC20000) and the Study of Top-notch Talents Cultivation on Basic Disciplines in Nankai University (Grant No.201612)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23503340, Fax: +86-22-23503692, E-mail: baiyl@nankai.edu.cn

网络出版时间: 2016-11-04 17:13:43 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161104.1713.004.html>

叶绿体基因组结构、基因表达方式及调控机制、叶绿体发生发育与进化、细胞器间遗传物质传递等相关研究对揭示植物各种生命代谢规律有重要的科学价值, 转基因工程是研究叶绿体相关基础理论问题和进行开发应用的有效途径^[4-7]。

叶绿体作为生物反应器有三个主要的优势: (1) 高等植物叶肉细胞含有50~200个叶绿体, 每个叶绿体中有多拷贝的基因组, 外源基因有望多拷贝和大量表达; (2) 叶绿体具有原核细胞的多基因共转录和缺乏基因沉默机制, 一次转化可同时表达多个相关基因; (3) 多数被子植物的叶绿体基因以严格的母性方式进行遗传, 叶绿体DNA在雄性生殖细胞发育过程中消失, 最大限度地减少转基因花粉的扩散^[8]。因此, 以叶绿体转化为核心技术进行叶绿体基因表达调控与其功能的关系、对植物生长发育的影响等基础理论和应用研究日益受到重视。通过基因枪转化、构建定点整合表达载体、组织或细胞培养等主要技术, 在烟草、马铃薯、甜菜等一些高等植物以及单细胞光合植物莱因衣藻中陆续开展并成功进行了叶绿体的遗传转化^[9-11]。

虽然叶绿体基因工程已经取得了重要进展, 但从转化的稳定性到实验技术和载体构建方略等还需要进一步研究、完善和提高。由于叶绿体具有的双层膜结构和多拷贝特点, 增加了在组织和细胞水平进行叶绿体转化的难度^[12]。即使细胞中部分叶绿体能成功接受到外源DNA, 还需要在筛选压力下使已经转化的叶绿体基因组不断同野生型基因组发生重组与分离, 最终使细胞中保留下全部重组后的叶绿体DNA。实现这样的转基因叶绿体基因组同质化的过程比较漫长, 极大地推迟了包括叶绿体载体构建中新元件组装效果等探索性研究的速度, 也成为影响叶绿体转化研究与应用进程的一个重要因素^[13-14]。

以离体方式进行细胞器转化操作比较方便, 能对转化效果进行瞬时观察和检测, 是对上述耗时长、难度大的组织和细胞水平叶绿体转基因技术的有效和快捷补充方法。Koulintchenko等^[15]将构建的带有玉米DNA类质粒和GFP基因的表达载体与离体马铃薯线粒体进行短暂共同培养, 通过外源基因摄取和表达等相关研究, 证明了植物线粒体通过渗透转运孔道复合物主动转运外源DNA。线粒体离体实验的结果表明, 以离体转化方式开展叶绿体基因表达和功能相关研究是可行的技术。

1 材料与方法

1.1 材料

“津研4号”黄瓜种子购自天津市绿丰园艺新技术开发有限公司。实验材料取自无菌培养的黄瓜绿色子叶。

1.2 转化质粒

叶绿体表达载体pDK53-pC3、pDK53-IL6-pC3均为本实验室构建和保存。

1.3 试剂

叶绿体分离缓冲液是由Buffer A、Buffer B和Buffer C组成的。Buffer A包括25 mmol/L柠檬酸、1.25 mol/L NaCl和0.25 mol/L抗坏血酸; Buffer B包括50 mmol/L Tris-Cl、25 mmol/L EDTA(pH8.0)和1.25 mol/L NaCl; Buffer C包括0.15 mol/L NaCl和0.1 mol/L EDTA(pH8.0)。

离体叶绿体培养液由2 mmol/L EDTA(pH8.0)、1 mmol/L MnCl₂、1 mmol/L MgSO₄、10 mmol/L NaCl、50 mmol/L MES和0.3 mol/L山梨醇组成。

叶绿体裂解液由0.1 mol/L Tris-HCl、5 mmol/L EDTA、0.1 mmol/L NaCl、1% SDS(pH8.0)和10 mmol/L巯基乙醇组成。

实验所用的RNase-free DNase I、PCR和RT-PCR相关试剂盒购自TaKaRa公司。

1.4 实验方法

1.4.1 黄瓜叶绿体的分离 将照光培养8~9 d的无菌黄瓜苗放置于4 °C遮光过夜, 摘取8~10 g黄瓜绿色子叶。用总量40 mL的叶绿体分离缓冲液Buffer A在冰浴下进行研磨。然后经6层纱布过滤至50 mL离心管中, 在4 °C下以2 600 r/min离心6 min。用25 mL叶绿体分离缓冲液Buffer B悬浮沉淀, 再在4 °C下以2 600 r/min离心8 min。用12 mL叶绿体分离缓冲液Buffer C再次悬浮沉淀, 在4 °C下以3 000 r/min离心8 min, 收集叶绿体。

1.4.2 离体叶绿体电转化 用0.33 mol/L山梨醇溶液重悬叶绿体沉淀后, 在4 °C下以6 000 r/min离心8 min, 重复这样的洗涤3~4次。最后, 用0.33 mol/L山梨醇溶液重悬叶绿体, 并用细胞计数板计数, 调整叶绿体悬液密度为(5~6)×10⁶/mL, 冰浴。取150 μL叶绿体溶液至1.5 mL离心管中, 加入约1 μg转化质粒(叶绿体表达载体), 混匀后转入预冷的电转化杯中, 以13 kV/cm电压电击, 电击时间5~6 ms为佳。电击后迅速向电转化杯中加入叶绿体孵育液, 轻轻混匀

后转移到1.5 mL离心管中, 在150 r/min和25 °C条件下避光孵育20 min, 之后可转4 °C避光过夜。

1.4.3 离体叶绿体转化后PCR和RT-PCR鉴定 在4 °C下以6 000 r/min离心8 min, 收集经电转化和孵育的叶绿体。用1 mL叶绿体孵育液重悬叶绿体, 然后再离心, 重复2次。取84 μ L孵育液重悬叶绿体, 加入6 μ L RNase-free DNase I和10 μ L Buffer, 25 °C消化2 h。加入4 μ L浓度为0.5 mol/L的EDTA, 至终浓度为20 mmol/L, 以终止DNase I反应。在4 °C条件下, 6 000 r/min离心8 min, 收集叶绿体, 用0.33 mol/L山梨醇洗叶绿体沉淀2~3次, 取部分上清作为模板进行PCR, 检测叶绿体外是否残留转化质粒。向叶绿体沉淀中加入400 μ L裂解液, 65 °C水浴20 min。

提取叶绿体DNA时向叶绿体裂解液中加入200 μ L浓度为5 mol/L的KAc(pH7.0), 冰浴25~30 min。4 °C下以12 000 r/min离心20 min, 取上清并加入200 μ L Tris-酚和200 μ L氯仿/异戊醇, 振荡后以12 000 r/min离心10 min, 取上清; 加入1/10倍体积的3 mol/L NaAc和2.5倍体积无水乙醇, -20 °C冰箱过夜沉淀核酸。次日以12 000 r/min离心15 min, 弃上清。用70%乙醇洗沉淀2次, 37 °C温箱烘干后用ddH₂O溶解叶绿体DNA沉淀。以提取的叶绿体DNA为模板, 依据叶绿体表达载体pDK53-pC3上的外源基因*GFP*序列设计如下PCR鉴定的引物, 上游引物: 5'-TGG AGT TGT CCC AAT TCT TG-3'; 下游引物: 5'-TGT GTA ATC CCA GCA GCT G-3'。反应体系为: ddH₂O 13 μ L, 10 $\times$ rTaq buffer 2 μ L, 上下游引物(20 μ mol/L)各1 μ L, dNTP(20 mmol/L)1.6 μ L, rTaq DNA聚合酶(5 U/ μ L)0.2 μ L, 模板(1~20 ng)1 μ L。总体积为20 μ L。PCR反应程序为: 94 °C预变性5 min, 94 °C变性50 s, 58 °C退火50 s, 72 °C延伸50 s, 30个循环; 72 °C延伸10 min, 4 °C保存。

提取叶绿体RNA时向叶绿体裂解液中加入40 μ L浓度为2 mol/L的KCl, 混匀后置于冰上10~20 min。4 °C下以12 000 r/min离心10 min, 取上清于新离心管中, 加入等体积苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)混匀, 冰浴30 min; 4 °C下以12 000 r/min离心10 min, 取上清于新离心管中, 加入等体积氯仿/异戊醇(24:1), 冰浴30 min; 4 °C下12 000 r/min离心10 min, 取上清于新离心管中, 加入1/3体积和浓度为8 mol/L的LiCl, 4 °C过夜。次日, 在4 °C下以12 000 r/min离心10 min, 弃上清, 室温下干燥15 min; 在冰上分别加入40 μ L的

DEPC-ddH₂O、4 μ L浓度为3 mol/L的NaAc(pH6.0)和110 μ L无水乙醇, 混匀后-20 °C过夜。次日, 仍在4 °C下以12 000 r/min离心10 min, 弃上清, 室温下干燥15 min。用DEPC-ddH₂O溶解RNA沉淀。取71 μ L RNA溶液, 分别加入0.5 μ L RNase-free DNase I、8 μ L DNase I Buffer和0.5 μ L RNase抑制剂, 在37 °C水浴中温育40 min。之后分别加入120 μ L ddH₂O、100 μ L氯仿/异戊醇和100 μ L水饱和酚, 混匀后, 在4 °C下12 000 r/min离心10 min。将离心后分层的液体中上层清液转至另一个离心管中, 加入1/10体积浓度为3 mol/L的NaAc和2.5倍体积的无水乙醇, 混匀后, 在-20 °C下静置超过4 h。在4 °C条件下12 000 r/min离心15 min, 弃上清, 加入1 mL 70%乙醇清洗沉淀, 然后在4 °C下以12 000 r/min离心10 min。弃上清, 风干后溶解于20 μ L ddH₂O中。以所提取的叶绿体RNA为模板进行RT-PCR, 所用引物是依据叶绿体表达载体pDK53-IL6-pC3上外源基因*IL6*序列设计的, 上下游引物分别为5'-ATG AAC TCC TTC TCC ACA AG-3'和5'-CTA CAT TTG CCG AAG AGC C-3'。cDNA第一链的合成按照使用TaKaRa公司PrimeScript TM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒说明书介绍的方法进行。后续PCR条件同前面介绍, 进行30个循环。为了检测经DNase I消化后RNA中是否残留了转化载体DNA, 以上述转化组叶绿体RNA为模板, 用Taq酶同时进行PCR作为负对照。

2 结果

2.1 离体叶绿体电转化效果分析

按本文方法将分离的黄瓜叶绿体进行电转化和25 °C短时避光孵育, 放置4 °C过夜后在显微镜下观察其形态。结果如图1所示, 与图1A转化前相比, 高压电击后的离体叶绿体经孵育复苏后形态没有明显差别(图1B), 其结构基本保持较好。

通过PCR检测叶绿体表达载体导入的结果如图2所示, 以转化组叶绿体DNA为模板扩增出与预期660 bp长度一致的外源基因*GFP*序列, 以经过RNase-free的DNase I消化后的黄瓜离体叶绿体沉淀上清为模板进行的扩增, 其结果没有预期的扩增产物, 说明叶绿体外未转入的载体DNA已被核酸酶彻底消化, 未造成假阳性干扰。以不加PCR模板的为空白对照。PCR检测结果证明, 经电转化已将外源叶绿体表达载体导入到离体叶绿体中。

2.2 转化后离体叶绿体中外源基因的表达鉴定

按照本方法提取叶绿体RNA, 并分别在叶绿体裂解前后用RNase-free的DNase I消化未转入的残留转化载体和叶绿体DNA, 再以转化载体上的外源基因设计的引物进行RT-PCR。

以转化载体pDK53-pC3上外源*GFP*基因设计的引物进行RT-PCR的分析。以转化载体pDK53-pC3为模板扩增的为阳性对照, 以叶绿体RNA为模板进行的实验组RT-PCR, 结果获得了与阳性对照相同长度(660 bp)的扩增产物, 以实验组对应的叶绿体沉淀上清为模板的RT-PCR, 结果没有扩增产物, 表明叶绿体外未转入的载体DNA消化彻底(图3)。

以表达载体pDK53-IL6-pC3上外源基因*IL6*设计的引物进行RT-PCR的鉴定结果见图4。以pDK53-

IL6-pC3为模板扩增的为阳性对照, 以转化的叶绿体RNA为模板进行的RT-PCR获得了与阳性对照组相同的预期长度为639 bp的扩增产物, 以转化的叶绿体RNA为模板进行的PCR, 其结果没有扩增产物, 说明叶绿体内DNA已被核酸酶消化彻底, 没有对RT-PCR造成假阳性影响。本实验以未转化组叶绿体RNA为模板进行的RT-PCR作为负对照。RT-PCR的鉴定结果证明, 转入离体叶绿体中的载体pDK53-IL6-pC3上外源基因*IL6*在转录水平进行了表达。

取经转化和孵育后的黄瓜离体叶绿体进行滴片, 在荧光显微镜下进行观察, 结果如图5和图6所示。图5是未经转化的离体黄瓜叶绿体在绿光和蓝光激发下的荧光对照; 图6为转入带*GFP*基因的叶绿体表达载体pDK53-pC3的黄瓜叶绿体实验组, 在相

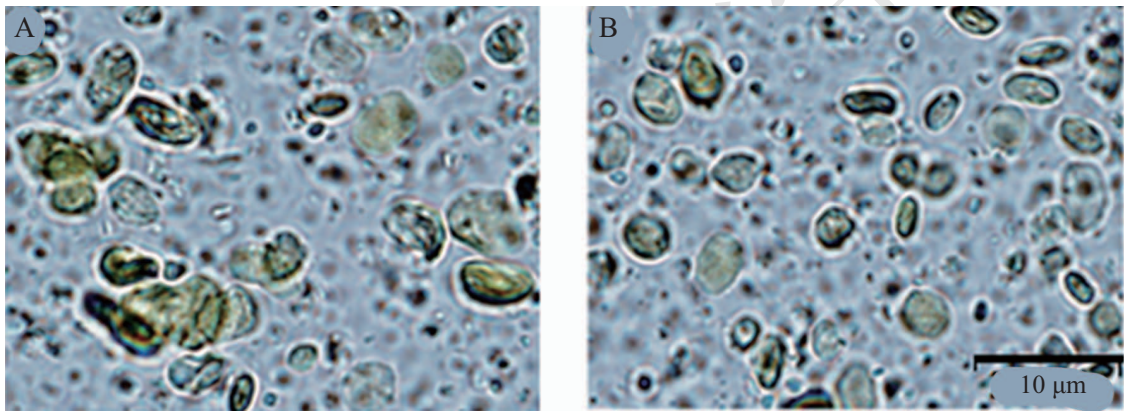
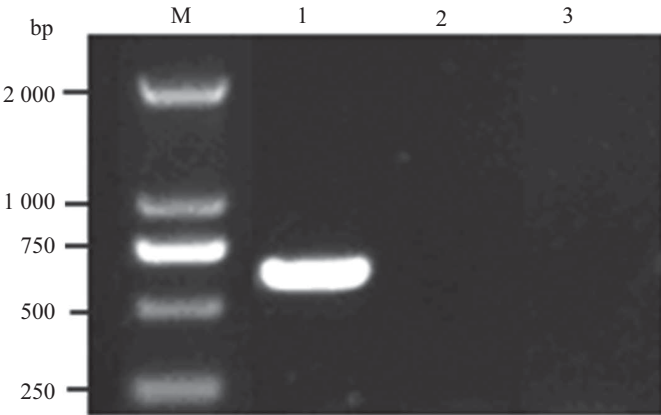


图1 离体黄瓜叶绿体电转化前(A)后(B)的形态

Fig.1 Morphology of isolated cucumber chloroplasts before (A) and after (B) electroporation

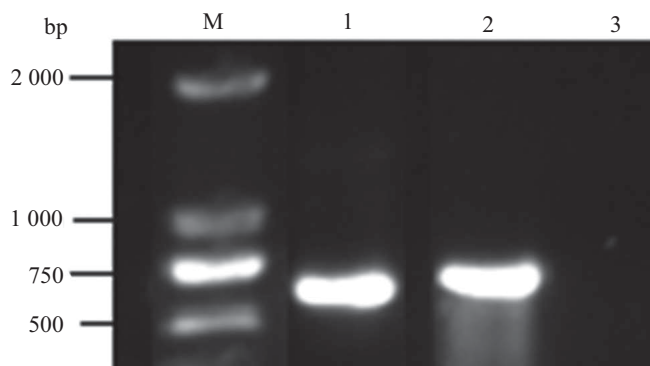


M: DNA分子标准DL2000; 1: 以转化叶绿体DNA为模板扩增外源*GFP*基因(660 bp); 2: 以转化叶绿体沉淀上清为模板扩增外源*GFP*基因; 3: 不加模板的空白对照。

M: DL2000 DNA Marker; 1: amplification *GFP* (660 bp) with transformed chloroplast DNA as template; 2: amplification *GFP* with supernatant of chloroplast precipitation as template; 3: amplification without template.

图2 黄瓜离体叶绿体转化pDK53-pC3的PCR鉴定

Fig.2 Identification of isolated chloroplast transformed with pDK53-pC3 by PCR

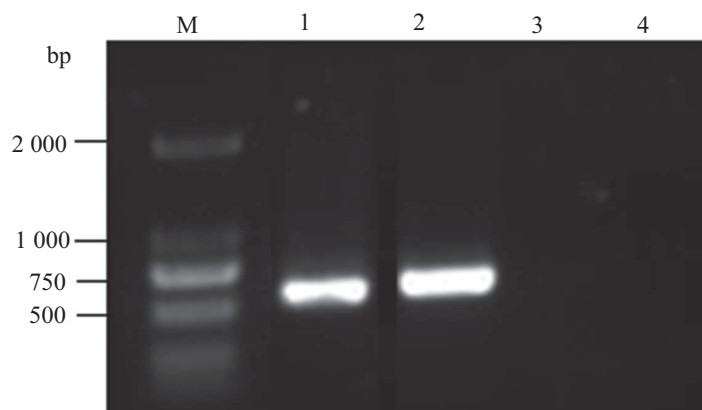


M: DNA分子量标准DL2000; 1: 阳性对照(扩增pDK53-pC3转化载体上660 bp的*GFP*基因); 2: 以转化的叶绿体RNA为模板RT-PCR结果; 3: 以实验组叶绿体沉淀上清为模板的RT-PCR结果。

M: DL2000 DNA Marker; 1: positive control (amplification 660 bp *GFP* gene with the transformed vector pDK53-pC3 as template); 2: the result of RT-PCR with transformed chloroplast RNA as template; 3: the result of RT-PCR with supernatant of chloroplast precipitation as template.

图3 离体黄瓜叶绿体转化pDK53-pC3的RT-PCR鉴定

Fig.3 Identification of isolated chloroplasts transformed with pDK53-pC3 by RT-PCR

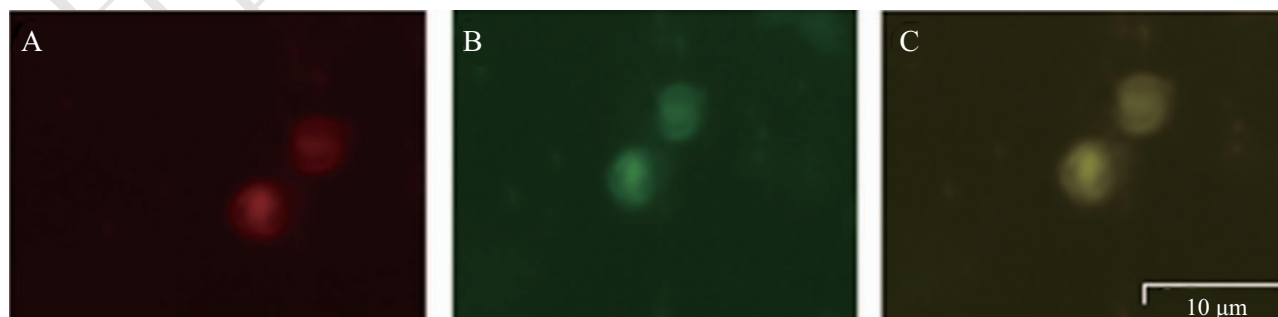


M: DNA分子量标准DL2000; 1: 阳性对照(以pDK53-IL6-pC3表达载体为模板扩增639 bp的*IL6*基因); 2: 以DNase I处理后的转化叶绿体RNA为模板RT-PCR结果; 3: 以DNase I处理后的转化叶绿体RNA为模板PCR结果; 4: 阴性对照(以未转化组叶绿体RNA为模板的RT-PCR结果)。

M: DL2000 DNA Marker; 1: positive control (amplification 639 bp *IL6* gene with the transformed vector pDK53-IL6-pC3 as template); 2: the result of RT-PCR with transformed chloroplast RNA as a template after DNase I treatment; 3: the result of RT-PCR with supernatant of chloroplast precipitation as a template after DNase I treatment; 4: negative control (RT-PCR with non transformed chloroplast RNA as a template).

图4 离体黄瓜叶绿体转化pDK53-IL6-pC3的RT-PCR鉴定

Fig.4 Identification of isolated chloroplasts transformed with pDK53-IL6-pC3 by RT-PCR

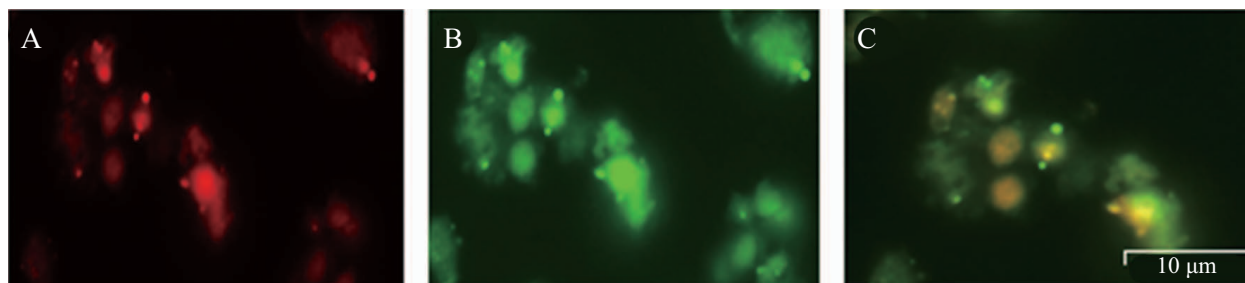


A: 绿色激发光; B: 蓝色激发光; C: 合成图。

A: green light excitation; B: blue light excitation; C: merge of A and B.

图5 未转化的黄瓜离体叶绿体荧光蛋白质观察

Fig.5 Observation of fluorescent protein in non transformed isolated cucumber chloroplasts



A: 绿色激发光; B: 蓝色激发光; C: 合成图。

A: green light excitation; B: blue light excitation; C: merge of A and B.

图6 转入带GFP基因的pDK53-pC3质粒的离体黄瓜叶绿体荧光蛋白质观察

Fig.6 Observation of fluorescent protein in isolated cucumber chloroplasts transformed with pDK53-pC3 containing GFP gene

同的绿色光和蓝光激发下的检测。结果显示, 实验组在蓝光下绿色荧光有所增亮, 表明一些离体叶绿体中导入的转化载体上的GFP基因在翻译水平可能进行了表达。

3 讨论

离体叶绿体电转化效果与叶绿体分离的质量密切相关, 本方法中将照光培养8~9 d的无菌黄瓜苗放置4 °C遮光过夜, 目的是消耗叶绿体内的淀粉粒, 减少由于研磨植物材料时淀粉粒的挤轧造成叶绿体膜的破裂。电转化是广泛应用于动植物和微生物细胞转化的常用技术, 其高强度电场对生物膜产生瞬时性通透作用, 电击体系和条件的选择直接影响电转化的效果, 不当操作可能会因生物膜破损严重造成大量的细胞死亡。在黄瓜离体叶绿体电转化中用0.33 mol/L山梨醇洗涤要充分, 这样才能保证在13 kV/cm高压电击下不发生短路, 电击时间才能控制在转化效果比较理想的5~6 ms范围, 而且经过25 °C短时避光孵育和4 °C过夜后黄瓜离体叶绿体的显微形态与结构仍然保持较好。

本文对转化的离体叶绿体进行PCR和RT-PCR的鉴定结果证明, 应用此项技术不仅能将载体DNA导入黄瓜离体叶绿体中, 而且GFP和IL6这2种不同的外源基因在转录水平都能进行表达。但荧光显微镜观察发现, 特异的绿色荧光蛋白质量并不显著, 推测这种结果可能与外源基因在翻译水平的表达有关。关于叶绿体翻译系统的最新研究表明, 起源于蓝藻的叶绿体与大肠杆菌相似, 存在3种非叶绿体核糖体蛋白^[16]。Bock等^[17]通过叶绿体转化和基因敲除技术研究烟草叶绿体翻译机制, S15和L33双敲除导致质体自养条件下的生物合成致死, 但这种致死效

应可通过升温生长被解除。Larray等^[18]在马铃薯质体转基因表达研究中也证实, 照光处理能大幅度提高重组蛋白的表达量。这些研究表明, 叶绿体基因表达在翻译水平受到生长条件的控制, 本文采用的是离体叶绿体转化系统, 与组织和细胞水平转化不同, 叶绿体受外部影响更直接, 推测外源基因在翻译水平出现表达波动可能与之有关。正因为如此, 利用叶绿体离体转化可能成为研究环境与叶绿体基因在翻译水平调控机制的新体系。

参考文献 (References)

- 1 Jiang Z, Sher K, Claudia H, Stephanie R, David H, Bock R. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science* 2015; 347(6225): 991-4.
- 2 Kowalewska L, Mazur R, Suski S, Garstka M, Mostowska A. Three-dimensional visualization of the tubular-lamellar transformation of the internal plastid membrane network during runner bean chloroplast biogenesis. *Plant Cell* 2016; 28(4): 875-91.
- 3 Daniell H, Lin S, Yu M, Chang J. Chloroplast genomes: Diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biol* 2016; 17(1): 134.
- 4 Oldenburg J, Bendich J. The linear plastid chromosomes of maize: Terminal sequences, structures, and implications for DNA replication. *Curr Genet* 2016; 62(2): 431-42.
- 5 Du Q, Bi G, Mao Y, Sui Z. The complete chloroplast genome of *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) gives new insight into the evolution of family Gracilariaceae. *J Phycol* 2016; 52(3): 441-50.
- 6 Zhang Z, Tan J, Shi Z, Xie Q, Xing Y, Liu C, *et al.* Albino leaf1 that encodes the sole octotricopeptide repeat protein is responsible for chloroplast development. *Plant Physiol* 2016; 171(2): 1182-91.
- 7 董色, 白艳玲, 徐海津, 张秀明, 乔明强. 植物细胞器间遗传信息转移. *细胞生物学杂志* (Dong Se, Bai Yanling, Xu Haijin, Zhang Xiuming, Qiao Mingqiang. Progress on the transfer of genetic information between organelles in plants. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2008; 30(3): 362-6.
- 8 Daniell H, Kumar S, Duformantel N. Breakthrough in chloroplast

- genetic engineering of agronomically important crops. *Trends Biotechnol* 2005; 23(5): 238-45.
- 9 Verma D, Daniell H. Chloroplast vector systems for biotechnology applications. *Plant Physiol* 2007; 145(4): 1129-43.
- 10 De Marchis F, Bellucci M. Plastid transformation in sugar beet: *Beta vulgaris*. *Methods Mol Biol* 2014; 1132: 367-73.
- 11 Niaz A, Franck M, Peter J. Nixon. Investigating the production of foreign membrane proteins in tobacco chloroplasts: Expression of an algal plastid terminal oxidase. *PLoS One* 2012; 7(7): e41722.
- 12 Scotti N, Cardi T. Plastid transformation as an expression tool for plant-derived biopharmaceuticals. *Methods Mol Biol* 2012; 847: 451-66.
- 13 Vafaei Y, Staniek A, Mancheno-Solano M, Warzecha H. A modular cloning toolbox for the generation of chloroplast transformation vectors. *PLoS One* 2014; 9(10): e110222.
- 14 周 菲, 路史展, 高 亮, 张娟娟, 林拥军. 植物质体基因工程: 新的优化策略及应用. *遗传*(Zhou Fei, Lu Shizhan, Gao Liang, Zhang Juanjuan, Lin Yongjun. Plastid genome engineering: Novel optimization strategies and applications. *Yi Chuan*) 2015; 37(8): 777-92.
- 15 Koulintchenko M, Konstantinov Y, Dietrich A. Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex. *EMBO J* 2003; 22(6): 1245-54.
- 16 Ehrnthal M, Scharff B, Fleischmann T, Hasse C, Ruf S, Bock R. Synthetic lethality in the tobacco plastid ribosome and its rescue at elevated growth temperatures. *Plant Cell* 2014; 26(2): 765-76.
- 17 Fleischmann T, Scharff B, Alkatib S, Hasdorf S, Schöttler M, Bock R. Nonessential plastid-encoded ribosomal proteins in tobacco: A developmental role for plastid translation and implications for reductive genome evolution. *Plant Cell* 2011; 23(9): 3137-55.
- 18 Larraya M, Fernández-San A, Ancín, Farran I, Veramendi J. Post-harvest light treatment increases expression levels of recombinant proteins in transformed plastids of potato tubers. *Biotechnol J* 2015; 10(11): 1803-13.