

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-044

## 微藻叶绿体细胞器工厂研究进展

朱振<sup>1,2</sup>, 田晶<sup>2</sup>, 江静<sup>1,3</sup>, 王旺银<sup>1</sup>, 曹旭鹏<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院大连化学物理研究所, 催化国家重点实验室, 洁净能源国家实验室(筹), 辽宁 大连 116023; <sup>2</sup> 大连工业大学, 生物工程学院, 辽宁 大连 116034; <sup>3</sup> 中国科学技术大学化学与材料科学学院, 安徽 合肥 230026)

**摘要:** 微藻是重要的太阳能驱动CO<sub>2</sub>生物转化的生物, 建立微藻叶绿体细胞器工厂是通过合成生物学手段实现“碳中和”的潜在途径之一。这是因为微藻叶绿体是碳同化以及后续碳水化合物、脂肪酸、天然色素、氨基酸等重要合成器官, 与高等植物细胞内具备多个相对较小的叶绿体不同, 大部分微藻仅拥有一个占细胞体积50%以上的大叶绿体, 更有利于获得纯净的株系, 有望在食品、水产、医药、化学品、生物燃料等领域占据重要地位。微藻改造及微藻叶绿体细胞器工厂研究尚处于起步阶段, 本文系统通过对现有转化、表达技术进展进行汇总和简要分析, 对比了叶绿体直接转化和基于叶绿体转运肽的核转化叶绿体表达不同策略的优缺点, 为后续发展提供借鉴。其中, 靶向叶绿体基因组的直接转化策略应用较广泛, 主要集中在莱茵衣藻中, 已成功表达了100多种不同的蛋白质, 但是叶绿体基因组可插入位点有限和调控手段相对缺乏; 通过利用叶绿体转运肽, 叶绿体中90%以上的蛋白都是核编码并被可控递送到叶绿体内, 因此近年来基于叶绿体转运肽的核转化叶绿体定位表达技术的关注度得到了提升, 并且已经在固碳、油脂生产调节方面展示出了一定优势。

**关键词:** 碳中和; 莱茵衣藻; 叶绿体转运肽; 叶绿体细胞器工厂; 合成生物学

中图分类号: Q812 文献标志码: A

## Progress in microalgae chloroplast organelle factory development

ZHU Zhen<sup>1,2</sup>, TIAN Jing<sup>2</sup>, JIANG Jing<sup>1,3</sup>, WANG Wangyin<sup>1</sup>, CAO Xupeng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>China State Key Laboratory of Catalysis, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian National Laboratory for Clean Energy, Dalian 116023, Liaoning, China; <sup>2</sup>School of Bioengineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China; <sup>3</sup>School of Chemical and Materials Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, Anhui, China)

**Abstract:** Microalgae are important solar-driven CO<sub>2</sub> biotransformation organisms. The chloroplasts of microalgae are important organelles for carbon assimilation and subsequent synthesis of carbohydrates, fatty acids, natural pigments, and amino acids. Unlike higher plant cells, which have multiple relatively small chloroplasts, most microalgae only have one large chloroplast that accounts for more than 50% of the cell volume. This makes it more

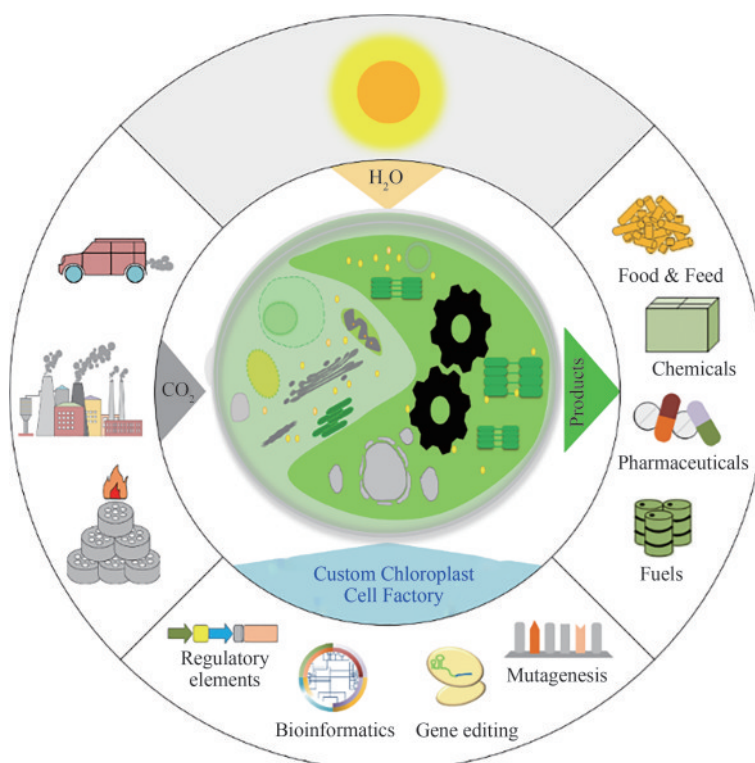
收稿日期: 2022-08-08 修回日期: 2022-09-28

基金项目: 国家自然科学基金(21878285); 国家自然科学基金委“人工光合成”基础科学中心项目(22088102)

引用本文: 朱振, 田晶, 江静, 王旺银, 曹旭鹏. 微藻叶绿体细胞器工厂研究进展[J]. 合成生物学, 2022, 3(6): 1218-1234

Citation: ZHU Zhen, TIAN Jing, JIANG Jing, WANG Wangyin, CAO Xupeng. Progress in microalgae chloroplast organelle factory development[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(6): 1218-1234

conducive for us to obtain pure strains and it is expected to be used in food, aquatic industry, medicine, chemical products, biofuels and other fields by the establishment of microalgal chloroplast organelle factories. The construction of microalgal chloroplast organelle factories is one of the potential ways to achieve “carbon neutrality” by means of synthetic biology. The researches on microalgae transformation and microalgal chloroplast organelle factory are still in their infancy. There are still a lot of scientific and technical questions to be answered before microalgal chloroplast organelle factory can be applied at a large scale. In this mini review, the current progress of chloroplast transformation and expression technology in microalgae has been systematically summarized and briefly analyzed, and different approaches are compared, especially regarding the transformation strategies, *i.e.*, direct chloroplast transformation and the transformation of nuclear-encoded chloroplast-targeted genes based on chimeric chloroplast transit peptides. The direct transformation strategy targeting the chloroplast genome is widely used. In *Chlamydomonas reinhardtii*, the most studied species, more than 100 different proteins have been successfully expressed. However, the chloroplast genome has limited insertion sites and the available regulation machineries on the exogenous genes' expression are rare. By using chloroplast signal peptides, more than 90% of native chloroplast proteins are nuclear-encoded and controllably delivered to the chloroplast. In recent years, the strategy of nuclear transformation and chloroplast-targeting expression based on chimeric chloroplast signal peptide has gained attention, having shown advantages in carbon fixation and oil production regulation. Some perspectives were also discussed. In the global effort for carbon neutralization, the microalgal chloroplast organelle factories will be good carriers to convert CO<sub>2</sub> to complex biomass by artificial and natural hybrid photosynthesis as a solution to food, energy, and environmental problems.



**Keywords:** carbon neutrality; *Chlamydomonas reinhardtii*; chloroplast transit peptide; chloroplast organelle factory; synthesis biology

随着全球经济的发展和人口的增加, 温室气体二氧化碳的排放使全球变暖, 这已成为急需解决的世界性问题。据估计, 相比于工业前时期, 人类活动导致全球气温升高约 $0.8\sim 1.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。微藻吸收大气和废气中的二氧化碳, 利用太阳能进行光合作用生产生物质, 这是一种可持续和经济地实现碳中和的策略之一, 对调节全球碳循环至关重要<sup>[1]</sup>。光合作用是一个有希望提高产量的靶标, 但光合作用在作物中是相对保守的, 其效率远低于理论最大值<sup>[2-4]</sup>, 具有进一步提高的潜力<sup>[5]</sup>。叶绿体是光合作用发生的主要场所, 也是多种生物合成的重要场所, 因此构建叶绿体细胞器工厂是实现微藻提高生物量的方式之一。微藻是一类多样化的光合生物, 可用于生产不同的化合物, 从粗生物质和生物燃料到高附加值的生化产品和合成蛋白质<sup>[6]</sup>。受限于相关生物工程技术的成熟, 例如基因工程操作技术手段远少于异养微生物和高等植物, 微藻的潜力远未开发出来, 需要进一步从代谢工程、基因组编辑和合成生物学角度提高<sup>[7]</sup>。微藻生物技术有望以可持续的方式生产有价值的生物产品, 并实现可持续经济的迫切需求<sup>[8]</sup>。

## 1 微藻是天然的“细胞工厂”

微藻是一种广泛分布于各种水域中的光合生物, 包括淡水、海水和盐碱水等, 具有远高于陆生植物的光合固碳效率与与微生物接近的生长速度。微藻能通过代谢合成多种生物活性物质, 如蛋白质、脂肪酸、维生素、色素、甾醇、多酚、黄酮、萜类、多糖等<sup>[9-11]</sup>。微藻作为营养补充剂和动物饲料的历史超过数百年<sup>[12]</sup>。伴随着生物质的发展与兴起, 微藻因其高光合固碳效率和易于工业化放大的优势, 被认为是最具潜力的下一代生物质提供者。微藻是面向高附加值化学品和大宗物质生产的天然“细胞工厂”<sup>[13]</sup>。此外, 工业和化石燃料的持续使用而产生的过量二氧化碳是微藻细胞工厂的原料, 可推动实现绿色生产<sup>[14]</sup>。

真核微藻与动物和真菌细胞相比, 其细胞内含有叶绿体, 即发生光合作用的场所, 是脂肪酸、碳水化合物、次级代谢产物等生物合成的主要

细胞器。真核微藻与高等植物相比, 更易于培养、生长迅速并且需要更少的空间, 扩大规模的过程更快。而原核微藻细胞没有叶绿体, 与真核微藻相比细胞转化操作相对容易。例如蓝藻(*cyanobacteria*)可以设计成微生物光合细胞工厂<sup>[15]</sup>, 已经成功实现了数十种产物<sup>[16]</sup>的光驱固碳合成, 例如乙醇<sup>[17]</sup>、乙烯<sup>[18]</sup>、海藻糖<sup>[19]</sup>、蔗糖<sup>[20]</sup>、聚乳酸<sup>[21]</sup>、萜类化合物<sup>[22]</sup>等。

莱茵衣藻(*C. reinhardtii*)作为微藻叶绿体转化的重要模型, 一般是利用莱茵衣藻表达外源蛋白<sup>[23]</sup>。莱茵衣藻的叶绿体编码了约100个左右的关键蛋白, 而在叶绿体中发挥功能所需要的大部分蛋白, 约2900个均来自核编码<sup>[24]</sup>并通过转运肽导入到叶绿体中发挥作用。叶绿体对外源蛋白含量积累具有很高的容忍度<sup>[25]</sup>, 因此以叶绿体作为生物反应器具有明显优势, 构建叶绿体细胞器工厂具有一定意义。

## 2 真核微藻叶绿体细胞器工厂

微藻生物技术平台的开发不断取得进展, 从基因工程的角度来看, 微藻有潜力像细胞工厂一样以经济的水平生产其他化合物和蛋白质<sup>[26-27]</sup>。迄今为止, 已成功对莱茵衣藻、杜氏盐藻、普通小球藻和雨生红球藻等40多种不同的微藻进行了基因改造<sup>[26]</sup>。此外, 一些微藻物种由于不存在内毒素、病毒或病原体已获得GRAS(generally recognized as safe, 通常被认为是安全的)状态<sup>[28]</sup>。

真核微藻具有复杂的代谢系统, 与同样具备光合能力但高度组织分化的高等植物不同, 微藻在单个细胞内完成包括光合固碳、生长、繁殖、能量储存的众多过程, 基因调控潜力巨大; 与同样为单细胞且生长快速的异养微生物不同, 叶绿体的存在极大增加了细胞内代谢调控的复杂度, 同时也使其同时拥有真核、原核两套表达系统。所以, 作为真核微藻最具代表性的莱茵衣藻, 一直是研究光合系统、系统生物学和合成生物学的重要平台。莱茵衣藻的系统性研究超过了50年历史, 拥有丰富的理化活性信息, 可直接获得的野生或人工株系超过3000株(chlamycoollection.org中心保藏), 其核基因组编码了超过15000个基因,

在 phytozome (phytozome.jgi.doe.gov) 的 V5.5 版本数据库中收录了超过 130 个典型培养条件下的转录组数据, 叶绿体和线粒体基因组也已完成测序。作为实验体系, 由于其兼养生长能力, 莱茵衣藻在叶绿体发育和功能识别、鞭毛组装和细胞运动、代谢、昼夜节律等众多基础生物过程研究中得到应用。与原核微藻不同, 作为具有光合能力的真核生物, 莱茵衣藻表达系统具有翻译后修饰能力和细胞器表达能力 (叶绿体和线粒体), 兼具植物和微生物表达系统的优势, 提供了丰富的基因工程操作选择性。这些特点造就了莱茵衣藻在系统生物学和合成生物学领域的优势地位。而莱茵衣藻细胞内拥有一个占其体积约 70% 的杯状叶绿体, 是很多重要物质合成过程的发生场所。

常见的真核微藻叶绿体表达系统大体可分为两类: 一种是利用细胞器的表达系统, 主要是利用叶绿体, 将外源基因重组到叶绿体 DNA 中进行表达<sup>[29-30]</sup>; 一种是利用核表达系统结合叶绿体转运肽作为靶向, 实现嵌合核转化表达系统构建叶绿体细胞器工厂的策略。

## 2.1 叶绿体表达系统

叶绿体通常被认为是在真核细胞进化过程中早期捕获的蓝藻祖先的衍生物。然而, 与自由生活的蓝细菌相比, 叶绿体基因组的基因序列显示出明显的相似性, 但是基因组大小大大缩减<sup>[31]</sup>。衣藻的叶绿体基因组存在 80 个拷贝, 每个拷贝都包含约 100 个基因, 它们可以归为三类<sup>[32]</sup>。第一类包括参与光合作用的基因, 这些基因编码光合作用的许多亚基配合物光系统 I (PS I)、光系统 II (PS II)、细胞色素  $b_6f$  复合物 (Cyt  $b_6f$ )、ATP 合酶和核酮糖二磷酸羧化酶。该组还包括编码 PS I 的两个组装因子的基因, 涉及不依赖光的叶绿素合成的三种蛋白质和 c 型细胞色素成熟所需的一种蛋白质。第二类包括叶绿体基因表达所需的基因, 例如质体 RNA 聚合酶的亚基、核糖体 RNA 和核糖体蛋白、tRNA 和翻译因子。第三类包含参与不同过程的蛋白质, 一种 ATP 依赖性蛋白酶的亚基, 以及几种功能未知的假定蛋白质。

获得衣藻叶绿体转化株是研究叶绿体基因功能的前提<sup>[33]</sup>。可以通过基因枪轰击将外源 DNA 引

入叶绿体隔室, 可以选择壮观霉素和链霉素抗性的 *aadA* 基因用于转化株的筛选, 因为衣藻细胞对这些抗生素高度敏感<sup>[34]</sup>。也可以利用质体同源重组系统将外源 DNA 插入叶绿体基因组的任何所需位点, 实现对任何目标质体基因进行特定的基因破坏和定点诱变<sup>[35]</sup>。

但是, 真核微藻叶绿体表达系统与其他宿主系统相比, 仍然缺乏遗传工具箱和应用程序, 受限作者们的见识, 其他真核微藻叶绿体转化并未见到系统性报道, 因为不同微藻的遗传背景是高度特异性的、多变的, 而且通常知之甚少, 所以本文聚焦在莱茵衣藻叶绿体表达系统的研究进展。然而, 在几乎所有报道的案例中, 所做的基因改造都比较简单, 通常只将单个目标基因连同选择一个选择标记基因引入叶绿体。从实验室规模到重组蛋白的工业化生产仍然存在差距。为了充分利用藻类基质的潜力, 需要建立多基因转入的基因工程方法, 并将全新的代谢途径引入叶绿体<sup>[36]</sup>, 此外, 基因编辑等技术的发展也为真核微藻叶绿体表达系统提供帮助<sup>[37-39]</sup>。

### 2.1.1 叶绿体基因表达调控

莱茵衣藻是叶绿体基因工程的模式系统, 在叶绿体基因表达调控中, 研究叶绿体基因功能的策略大体分为两种。其一是通过“弱化”来实现, 将 mRNA 的 AUG 起始密码子更改为 AUU, 可以将蛋白质的表达降低到野生型水平的 10%~50%<sup>[40]</sup>。例如, 在缺氮条件下, *ClpP* 基因通过“弱化”, 使 *ClpP* 蛋白酶在 Cyt  $b_6f$  复合物降解中发挥作用<sup>[41]</sup>。其二是建立一种可诱导/可抑制的叶绿体基因表达系统, 该系统可以根据培养基中微量营养素是否存在来打开或关闭叶绿体基因表达<sup>[42-44]</sup>。

诱导型叶绿体基因表达系统可用于阐明细胞生长和生存所必需的叶绿体基因的功能; 对表达对藻类细胞有毒的蛋白质非常有帮助, 因为一旦细胞达到适当的密度, 其蛋白毒性影响最小化, 就有可能诱导目标蛋白质的表达<sup>[45]</sup>; 允许光合作用复合物的可逆消耗, 以可控的方式研究它们的生物起源。在衣藻可诱导/可抑制的叶绿体基因表达系统中, 包括铜离子调节的 *Cyc6* 启动子, 维生素控制的 *MetE* 启动子和硫胺素焦磷酸 (TPP) 核糖开关驱动核基因 *Nac2* 表达蛋白质靶向到叶绿体



*psbD* 的 5'非翻译区 (5'UTR), 这是 *psbD* mRNA (编码光系统 II 的 D2 反应中心多肽) 和光系统 II 稳定积累所必需的。

衣藻中大量的细胞核编码因子参与特定的叶绿体转录后步骤, 如 RNA 加工、RNA 稳定性、剪接和翻译<sup>[46]</sup>。其中大多数因子都作用于特定的 mRNA, 并且在许多情况下, 靶点位于 mRNA 的 5'UTR 内。细胞核编码的 *Nac2* 蛋白是稳定叶绿体 *psbD* mRNA 所必需的, 其目标位点位于 *psbD* 5'UTR 内, 如果该区域与报告基因融合, 报告基因的表达将依赖于 *Nac2*<sup>[47]</sup>。因此, 当 *psbD* 5'UTR 被另一个叶绿体 5'UTR 取代时, *psbD* 表达不再依赖于 *Nac2*。由于在衣藻中没有已知的诱导型叶绿体启动子, 利用 *Nac2* 系统建立了叶绿体诱导型系统<sup>[42-44]</sup>, 通过将 *Nac2* 基因与可诱导核启动子基因融合来实现。首先可以选择细胞色素 *c6* 基因 (*Cyc6*) 的启动子, 因为当生长培养基中铜离子存在会抑制该基因, 而铜离子缺乏或镍离子存在下强烈表达<sup>[48-49]</sup>。通过将嵌合 *Cyc6-Nac2* 基因引入 *nac2* 缺陷突变株, 在铜离子存在的情况下叶绿体

*psbD* 表达受到抑制, 因为 *Nac2* 不再表达并且 *psbD* RNA 不稳定。反之, *Nac2* 被表达并且 *psbD* RNA 被稳定表达和翻译。其次, 可以利用 *MetE* 启动子和 TPP 核糖开关, 通过将 *MetE* 启动子-TPP 核糖开关与 *Nac2* 融合, 叶绿体靶基因可以被维生素调控<sup>[43-44]</sup>, 它们被培养基中依次添加的维生素 B<sub>12</sub> 和硫胺素所抑制<sup>[50-51]</sup>。维生素抑制系统已成功用于研究几种必需叶绿体基因的作用, 包括 *rpoA*、*rps12* 和 *clpP*<sup>[43-44]</sup>。这种诱导型叶绿体基因表达系统作为一种生物技术<sup>[45, 52-53]</sup>, 可以应用于任何叶绿体基因。目前, 衣藻叶绿体基因表达系统已成功用于表达具有商业价值的蛋白质。

### 2.1.2 叶绿体表达系统的应用

1988 年至今, 由首次通过基因枪法实现稳定的莱茵衣藻叶绿体转化<sup>[33]</sup> 发展到实现微藻叶绿体用于光驱动生产重组蛋白、疫苗、抗原、商业酶和代谢物等。莱茵衣藻是微藻叶绿体转化中发展最全面的。目前, 莱茵衣藻叶绿体基因组中导入和表达转基因的方法已经建立, 并已成功生产了 100 多种不同的蛋白质<sup>[54]</sup> (表 1)。

表 1 利用微藻叶绿体表达目标蛋白

Tab. 1 Target proteins produced in algal chloroplasts

藻株	表达系统	表达水平	描述	文献
<i>C. reinhardtii</i>	pACTBVP1 vector (atpX-CTBVP1), <i>atpA</i> promoter, <i>rbcL</i> terminator	3 % TSP	CTB-VP1 融合基因保留了其蛋白的神经节苷脂 [55] GM1 亲和力和抗原性, 并证明绿藻叶绿体作为生产 黏膜疫苗的潜力	
<i>C. reinhardtii</i>	<i>psbA</i> promoter and 5' UTR, <i>psbA</i> 3' UTR	ND	利用微藻生产具有可溶性和酶活性的抗毒素, 并 [56] 延长了植入人类 B 细胞肿瘤小鼠的生存时间	
<i>C. reinhardtii</i>	pSRSapI and pASapI vector, <i>psaA-1</i> promoter, <i>rbcL</i> 3' UTR	约 1.3 mg/g DB	利用莱茵衣藻叶绿体生产抗人类病原体肺炎链球 [57] 菌特有的内溶素 Cpl-1 和 Pal 并具有抗菌活性	
<i>C. reinhardtii</i>	<i>psbA</i> promoter and 5' UTR	>5 % TSP	利用莱茵衣藻叶绿体稳定表达具有生物活性且可 [58] 溶性的哺乳类蛋白 (MSAA)	
<i>C. reinhardtii</i>	<i>atpA</i> or <i>rbcL</i> promoters and 5' UTR	0.5 % TSP	首次实现利用莱茵衣藻叶绿体积累可溶性的, 正 [59] 确折叠的 Isc 抗体	
<i>C. reinhardtii</i>	pASapI vector, <i>psbH</i> , <i>aadA</i>	6.77 mg/L 22 mg/L DA	首次实现中试规模下的利用莱茵衣藻缺壁株的叶 [60] 绿体表达细胞色素 P450 和二萜合酶 TPS4	
<i>C. reinhardtii</i>	<i>psbA</i> , <i>atpA</i> <i>psbD</i> promoter	21% TCP	VP28 基因的密码子优化会影响蛋白质的积累 [45]	
<i>H. pluvialis</i>	16S- <i>trnI</i> / <i>trnA</i> -23S region, <i>psbA</i> and <i>rbcL</i> promoter, terminator	ND	首次实现利用雨生红球藻叶绿体成功表达抗菌肽 [61]	
<i>C. vulgaris</i>	16S- <i>trnI</i> / <i>trnA</i> -23S region, <i>rbcL</i> promoter, <i>psbA</i> terminator, <i>aadA</i>	ND	首次在小球藻叶绿体中成功实现 2 个密码子优化 [62] 后的抗菌肽共表达	

Note: TCP—total cell protein; TSP—total soluble protein; DB—dried biomass; DA—densitometric analysis; ND—not determined; CTB—cholera toxin B subunit; VP1—the foot and mouth disease virus (FMDV); M-SAA—mammary-associated serum amyloid; Isc—large single-chain.

对真核微藻叶绿体不断改造,可以生产多种重组蛋白。到目前为止,已经使用微藻作为宿主将人类疾病的相关抗原表达达到临床前试验中。例如,在寄生虫和传染病领域,在微藻细胞中表达针对恶性疟原虫(Pfs25/28)、人类乳头状瘤病毒(Pfs25/28)、乙型肝炎病毒和HIV(D2-CTB)的多种抗原;在非感染性疾病领域,微藻已被开发用于治疗I型糖尿病、动脉粥样硬化、高血压、过敏和肿瘤等疾病<sup>[63]</sup>。但长期以来,外源基因在叶绿体中的表达产量一直很低。考虑到这一点,研究者们广泛寻找可以解释低表达的限制因素,其中叶绿体中的基因表达在翻译水平受到严格调控,对转录调控不太敏感<sup>[64]</sup>。2007年,Manuell等<sup>[58]</sup>解决了叶绿体基因组转基因表达的关键问题,将来源于牛的乳腺相关血清淀粉样蛋白(M-SAA)的编码区,直接替代莱茵衣藻叶绿体*psbA*编码区,结果表明异源重组蛋白具有生物活性并且表达量可达总蛋白的5%以上。这也就是证明以前将表达盒靶向叶绿体基因组的反向重复序列是一个关键点,应该修改成将表达盒靶向到相对于总蛋白质的0.5%的低表达水平的序列。2011年,Rasala等<sup>[65]</sup>在莱茵衣藻叶绿体中,将16S rRNA强启动子与*psbA*和*atpA*基因的5'UTR融合,来考察对转基因表达的影响。研究表明,16S启动子与*atpA*基因的5'UTR融合显著提高了mRNA水平,并可以高水平地积累外源蛋白。该启动子组合将在需要具有光合作用的微藻藻株表达外源蛋白生产提供依据。2012年,Tran等<sup>[56]</sup>在莱茵衣藻叶绿体中实现免疫毒素单体和二聚体蛋白的表达和积累,所积累的免疫毒素蛋白是可溶的并具有活性,可显著延长小鼠的生存期。此外,叶绿体也特别适合内毒素的表达,叶绿体能给这些蛋白质提供类似原生细菌的表达环境。Stoffels等<sup>[57]</sup>于2017年在莱茵衣藻叶绿体中产生了人类致病菌肺炎链球菌的内毒素Cpl-1和Pall,其细胞裂解液和从中分离的内毒素对不同血清型肺炎链球菌具有抗菌活性,包括对临床分离的肺炎链球菌有活性,总重组蛋白产量能达到1.3 mg/g(相对细胞干重)。

随着转化方法的开发,总结并发现主要影响叶绿体中重组蛋白表达的因素主要有4个方面:密码子优化、转化相关的基因型的修饰、内源的增强子

和调控元件和蛋白酶的敏感性<sup>[45]</sup>。在2014年,Oey等<sup>[66]</sup>将基于Gateway系统引入到微藻叶绿体转化载体构建过程中,这极大简化了载体的构建,并允许简单、快速和灵活的载体设计,用于在微藻中高效生产蛋白质。这些方法的不断探索是对微藻叶绿体表达外源蛋白的强大支撑。

微藻叶绿体是各种代谢物等生产的重要平台,2014年Zedler等<sup>[67]</sup>在莱茵衣藻叶绿体中异源表达分子质量为91 kDa的双功能酶(二萜合酶),该蛋白质的产量可高达总可溶性蛋白的3.7%。因此,藻类生物系统可以作为相对较大的蛋白质更高且更稳定的表达平台。2016年,Zedler团队<sup>[60]</sup>首次报道了对莱茵衣藻细胞壁缺陷株表达细胞色素P450或双功能二萜合酶并进行中试规模培养,细胞干重在3~4天内达到了0.3 g/L,整个生长过程中重组蛋白表达水平稳定。

微藻叶绿体表达系统的应用领域中发展最多的是莱茵衣藻,随着转化技术、表达系统和基因编辑技术等的不断探索,越来越多种类的微藻叶绿体表达系统正在研究中。2020年,王康、崔玉琳等<sup>[61]</sup>探索雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)的叶绿体表达系统,并实现了抗菌肽的成功表达。同年,Nawarkar等<sup>[68]</sup>对凯氏拟小球藻(*Parachlorella kessleri-I*)的叶绿体基因组进行全面分析,优化了其叶绿体转化方法,为构建特异性叶绿体转化载体发挥了至关重要的作用,同时对制备商业化藻细胞提供了依据。2021年崔玉琳等<sup>[62]</sup>在小球藻(*Chlorella vulgaris*)中实现两种外源肽的共表达,建立了一种小球藻叶绿体表达系统。

### 2.1.3 叶绿体表达系统的优劣

微藻的叶绿体内含有广泛的分子伴侣、蛋白质二硫键异构酶和肽基脯氨酰异构酶,这些分子伴侣有助于复杂的蛋白质折叠。叶绿体转化与常规的核转化相比,具有几个明显的优势,例如稳定和均衡的基因表达、外源基因与叶绿体基因组的位点特异性整合,以及叶绿体内重组蛋白的区室化而不影响其余的细胞活动,因此,这种独特的生化环境允许表达高价值的生物药物。同时,植物来源的治疗蛋白不含人类病原体 and 哺乳动物病毒等,至今已经表达了疫苗抗原、抗体等药物

蛋白和其他重要的重组蛋白和代谢物等<sup>[69-71]</sup>。

细胞内叶绿体DNA有数千至上万个拷贝，同时细胞器对外源蛋白具有很大的容忍度<sup>[72]</sup>，使得外源蛋白的高水平积累成为可能，超过总可溶蛋白量的10%<sup>[73]</sup>。不过，叶绿体DNA对外源基因的插入位置和片段长度都有所限制，如烟草叶绿体DNA仅发现两个常用区间，最常用的一个重组区间是trnV-3'rps12和trnI-trnA基因之间一个25 kb的反向重复序列片段（如使用pPRV+psbA启动子系列载体）。

## 2.2 叶绿体转运肽嵌合核表达系统

真核微藻与高等植物相同，其叶绿体来源于进化过程中发生的第一次吞噬，属于原始内共生叶绿体<sup>[74-75]</sup>，具有双层膜（the inner envelope membrane, IEM; the outer envelope membrane, OEM）。微藻叶绿体基因组仅编码几十至一百多个基因，以莱茵衣藻为例，叶绿体基因组仅编码99个基因（GenBank: BK000554.2），包括用于转录和翻译的元件，而叶绿体中的大多数蛋白是核编码的，经过跨膜、去叶绿体转运肽（chloroplast transit peptide, cTP）<sup>[76]</sup>和折叠，在叶绿体内发挥其功能<sup>[77-80]</sup>。因此利用叶绿体转运肽嵌合核表达系统为构建微藻叶绿体细胞器工厂提供了一条途径。图1为莱茵衣藻中典型的外源基因表达模式。

2017年，北京大学杨博等<sup>[81]</sup>将*C. vulgaris* Rubisco小亚基（rbcS, Genbank Accession Number: AB058647）转运肽与增强型绿色荧光蛋白相融合，并在*C. vulgaris*叶绿体中得到表达。他们又将蓝藻果糖1,6-二磷酸醛缩酶结合叶绿体转运肽的靶向性，引入*C. vulgaris*叶绿体中，使其光合能力增强约1.2倍，并促进细胞生长。研究表明醛缩酶过表达可能在促进卡尔文循环中核酮糖-1,5-二磷酸的再生和光系统中的能量转移中发挥作用。Perozeni等<sup>[82]</sup>在2020年的一项研究中，将莱茵衣藻的核基因组中表达量极低的 $\beta$ -酮醇酶重新设计和优化该基因的密码子，从光系统I的亚基D中添加叶绿体转运肽序列，并且从宿主自身的Rubisco小亚基II中添加内含子区域，该酶被表达并定位于叶绿体，转化的细胞呈现红棕色，并以高达4.3 mg/(L·d)的速度产生类胡萝卜素，50%以上的类胡萝卜素转化成虾青素，虾青素产量可以与工业生产的再生红球藻大致相同。

在叶绿体中表达外源蛋白也可以通过将目的基因嵌合叶绿体转运肽序列并引入核基因组来实现，转基因产物带有引导产物进入叶绿体的靶向转运肽，像其他内源性叶绿体蛋白一样实现在叶绿体中表达。外源基因整合到核基因组中大多是随机的，导致不同克隆之间的差异很大，因此需要进行广泛的筛选才能分离出有效表达转基因的克隆<sup>[83]</sup>。尽管微藻的稳定转化最初是针对莱茵衣

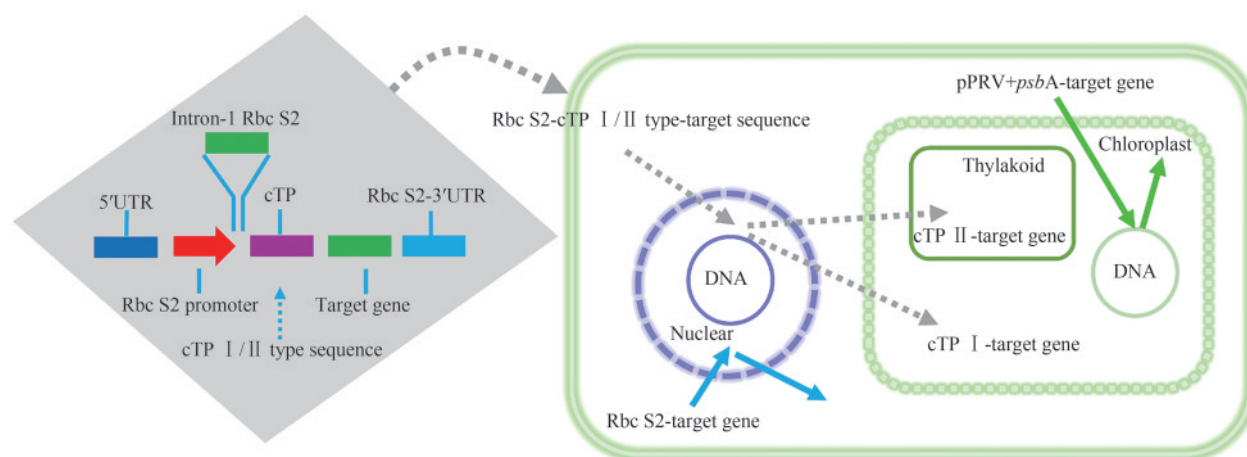


图1 莱茵衣藻中利用核与叶绿体的两种典型的表达策略

5' UTR—5'非翻译区；Rbc S2 promoter—Rbc S2启动子；intron-1 Rbc S2—Rbc S2第一内含子；cTP—叶绿体转运肽；cTP I/II type sequence—叶绿体I/II型转运肽序列；Rbc S2-3' UTR—Rbc S2基因的3'非翻译区

Fig. 1 Two typical expression strategies using nuclear and chloroplast in *C. reinhardtii*

5' UTR—5' untranslated region; cTP—chloroplast transit peptide



藻叶绿体开发的,但与微藻的核转化系统相比,叶绿体的转化系统仍然较少。叶绿体转化的一大优势是转基因可以很容易地通过同源重组进行整合,而微藻的核转化通常会导致随机整合事件,CRISPR-CAS9系统在微藻中的开发可能为转基因靶向到核基因组中的特定位点提供解决方案<sup>[7, 84]</sup>,叶绿体转化工具的改进也是一个动态领域。利用微藻核转化的优势,实现外源蛋白靶向在叶绿体中表达,叶绿体可以进行蛋白糖基化和/或额外的翻译后修饰以及分泌。这些优势对于微藻用于开发重组蛋白的工业生产是尤其重要的。鉴于已知难以在微藻中进行外源基因有效表达的情况,为了进一步提高莱茵衣藻叶绿体转基因的表达水平,可以通过优化密码子和抑制ATP依赖性蛋白酶的方式,总可溶性蛋白质含量可提高20%。此外,所使用的启动子类型和UTR也并不是影响表达水平的唯一因素。

### 2.2.1 核编码蛋白的叶绿体输送和定位机理

常规核编码叶绿体蛋白将被叶绿体外/内膜转运子(TOC/TIC, translocon of outer/inner envelope membrane of chloroplasts)识别、去掉转运肽,并折叠成为成熟蛋白。光合作用发生的主要部

位——类囊体膜,是叶绿体内的独立的膜系统。定位于类囊体的蛋白需要通过第1次转运肽酶切位点后,紧邻的第2步识别序列被识别出,一部分需要经过二次酶切成为成熟的蛋白形态(图2)。

早在1987年,Lubben等<sup>[85]</sup>发现跨叶绿体包膜的蛋白质转运机制与跨内质网膜的转运机制明显不同。在真核细胞中,叶绿体含有一个复杂的蛋白质组,其生物发生过程包括翻译后导入核编码蛋白。但是,尚不清楚何时以及如何在细胞质中分选新生叶绿体靶向蛋白的机制。Kim等<sup>[86]</sup>研究了包含叶绿体外膜蛋白的胞质靶向因子AKR2A(AKR2A, ankyrin repeat-containing protein 2)介导叶绿体外膜蛋白的胞质靶向作用与它们的翻译偶联,这对整个叶绿体蛋白质组的生物发展至关重要。研究表明叶绿体以具有可溶性、生物活性、二硫键的形式表达分泌蛋白,例如人类生长激素,这也说明叶绿体是在植物中潜在生产药物蛋白的高效载体<sup>[87]</sup>。叶绿体借助Toc和Tic的蛋白转位子,已导入成千上万个细胞质合成的前蛋白。但是,Tic的分子身份仍然存在争议。Kikuchi等<sup>[88]</sup>从拟南芥中纯化了叶绿体内膜复合物,该复合物包含Tic20和其他3个基本成分,发现这4个成分

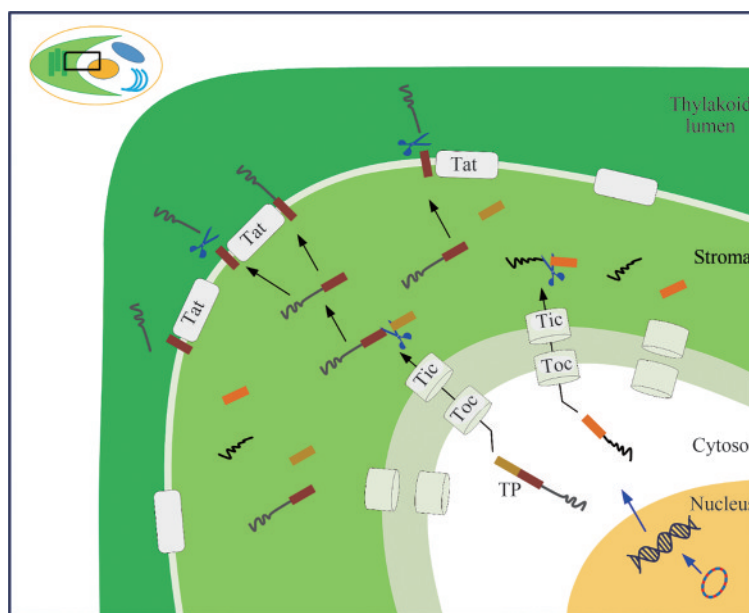


图2 cTP及叶绿体/类囊体蛋白定位过程示意图

TP—转运肽; Toc complex—Toc复合物; Tic complex—Tic复合物; Tat—双精氨酸转运

**Fig. 2** Schematic diagram of the localization cTP and chloroplast/thylakoid protein

TP—transit peptide; Toc complex—translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts;

Tic complex—translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts; Tat—twin arginine translocation



连同众所周知的Toc成分与不同的易位前蛋白有化学计量学上的关联。当重组为平面脂质双层时，纯化的复合物形成了前蛋白敏感通道。因此，该复合物构成一般的Tic转位子。地球上最丰富的膜蛋白是光捕获叶绿素a/b结合蛋白(LHCP, light harvesting chlorophyll protein), Depège等<sup>[89]</sup>研究了叶绿体蛋白激酶Stt7在衣藻的捕光复合体(LHC II, light harvesting complex II)磷酸化和状态转变中的作用。LHCP在细胞质中合成输入叶绿体中, 并通过叶绿体信号识别颗粒(cpSRP, the chloroplast signal recognition particle, 由cpSRP54和cpSRP43形成的异二聚体)途径, 翻译后靶向到类囊体膜。Stengel等<sup>[90]</sup>对cpSRP43的晶体结构进行解析, 进一步阐述cpSRP43特异性识别机制。Hirsch等<sup>[91]</sup>发现豌豆叶绿体外包膜蛋白OEP86在前体蛋白易位入叶绿体中充当受体。序列分析表明, OEP86的前体通过可裂解的, 带负电荷且异常长的氨基末端肽定向到叶绿体外壳。

### 2.2.2 叶绿体转运肽

在真核细胞中, 叶绿体作为内共生起源的细胞器, 具有类似于原核细胞胞浆的基因表达机制。由于内共生体的大多数基因已经迁移到细胞核, 大多数叶绿体蛋白是由核基因组编码, 通过叶绿体蛋白上的cTP被识别, 将蛋白转运到叶绿体中。在NCBI数据库中检索到各种来源的cTP序列, 视cTP跨膜次数的不同, 又可分为一次跨膜定位于叶绿体腔内的cTP1型, 和二次跨膜定位于类囊体膜上或类囊体内的cTP2型<sup>[92-93]</sup>。

叶绿体蛋白普遍使用N端序列特征用于蛋白质定位, 因为大多数细胞内靶向信号是在原蛋白的N-末端发现的(不考虑核和过氧化物酶体靶向), 包括分泌途径或内膜系统的蛋白质呈现N端转运肽, 转运肽将蛋白质引导至内质网的转运子, 转运肽的特征在于N端的带电性, 然后是疏水拉伸和AXA序列, 通过腔内转运肽酶引导裂解。如果蛋白质要被转运到叶绿体腔内, 叶绿体蛋白N端的转运肽被Toc复合物识别, 而Tic复合物最终将蛋白质递送到叶绿体基质中。在被转运的同时, TP被切割, 因此产生一个新的N端, 将是成熟蛋白质的末端。如果蛋白质被转运到叶绿体内膜系

统(类囊体), 它需要经历两步靶向, 第2个转运肽序列在第1个TP裂解位点后立即产生, 第2个序列将被类囊体膜识别并切割掉以产生蛋白质的最终成熟N末端, 除非它被用于将蛋白质锚定到膜上才会被保留。可是, 这些转运肽或识别序列长度差异大, 缺乏一级结构的保守性, 同时人们也未能基于二级结构寻找到可靠的辨识特征, 没有提供明确的预测规则, 只能通过实验验证或者基于实验基础上的数据挖掘加以预测。但是目前研究结果, 并没有针对叶绿体转运肽的系统性研究。

Behrens等<sup>[94]</sup>以拟南芥、番茄和烟草作为宿主, 利用叶绿体转运肽结合DMO基因(麦草畏单加氧酶)获得表达载体, 其目的是确定是否可以为宿主提供抗麦草畏通常致死作用的保护。CreMOC1编码一个85 kDa的蛋白质, 推测该蛋白质具有叶绿体转运肽。为了确定MOC1的亚细胞定位, Kobayashi等<sup>[95]</sup>在本氏烟草叶中瞬时表达了CreMOC1的N端区域与黄色荧光蛋白(CreMOC1 N100-YFP)的融合蛋白, 结果CreMOC1 N100-YFP定位在了叶绿体。2016年Robinson等<sup>[96]</sup>在莱茵衣藻中利用细菌转运肽实现了荧光报告蛋白(pHRed)和生物制药模型底物(scFv)有效靶向类囊体腔内表达, 首次提出在微藻类囊体腔内生产重组蛋白。这扩展了藻类叶绿体的遗传工具箱, 并提供了一种表达蛋白质的新方法。此外, Foth等<sup>[97]</sup>研究发现了叶绿体转运肽氨基酸特异性电荷的相关信息。不同核编码叶绿体蛋白功能差异巨大, 可以考虑将RbcS2与不同特征的cTP结合构建表达载体进行研究。

### 2.2.3 表达元件的选取

真核微藻的胞质表达是多样的, 可以依靠质粒或整合到基因组实现不同的目的, 其重组部位有丰富的选择空间<sup>[98]</sup>。常见的表达系统包括以核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO)小亚基(SSU)RbcS基因的5'-UTR为基础的(常用自起始密码子至上游182 bp片段, 包括CAAT box序列, 多用于莱茵衣藻)<sup>[99]</sup>、以紫黄质/叶绿素a结合蛋白(violaxanthin/chlorophyll a-binding protein, VCP)基因<sup>[100]</sup>的5'-UTR为基础的、以 $\beta$ -tubulin启

动子为基础的表达系统（多用于微拟球藻），以病毒35S、CaMV35S、SV40和CMV启动子为基础的异源启动表达系统（在莱茵衣藻、盐藻、小球藻、四片藻、微拟球藻、雨生红球藻和三角褐指藻中均被证明可用）。目前，微藻胞质的外源蛋白表达的最高水平不超过总可溶蛋白的0.25%。在莱茵衣藻核DNA中，共有两个编码RbcS的基因，分别是RbcS1（Cre02.g120100.t1.1）和RbcS2（Cre02.g120150.t1.1），二者相似度极高，但具有不同的转录水平：RbcS1低且不稳定，而RbcS2高且相对稳定<sup>[101]</sup>。作为生物圈中总量最高的单一蛋白，RuBisCO在高等植物叶片中的含量最高可达总可溶蛋白的20%以上，而在微藻中至少也可达细胞总可溶蛋白的5%以上。因其天然的高表达能力，利用RbcS2启动子及相关调控元件进行外源蛋白生产被人们寄予厚望<sup>[102]</sup>。

启动子是表达系统中的关键元件，上述不同表达系统最重要的差异在于启动子的不同选择。选择合适的启动子，需要考虑多方面因素，包括宿主的特点、基因表达水平的需求（组成型的，诱导表达或强表达）、表达操作的目的（获得蛋白、改造合成途径或基因/转录水平操作等）以及目标DNA在细胞内的分布（细胞器或核）。相比微生物丰富多样的选择，真核微藻的启动子类型少，相关启动调控认识匮乏。在以高值化学品为目标下，这会限制真核微藻作为宿主细胞的代谢工程和合成生物学应用的发展。为此，在现有表达系统基础上，优化和开发新型真核微藻表达系统亟需原理上和技术上的创新与突破。

目前使用最广泛的是RbcS2启动子，具有20多年的历史。杜克大学的Cerutti等于1997年首次报道了将抗壮观霉素的真细菌*aadA*基因插入到RbcS的阅读框中，成功获得了抗性藻株。但与基因组中RbcS的稳定转录和表达不同，受基因沉默和未知的RNA不稳定性因素影响，RbcS2驱动的外源基因总体上呈现组成型表达趋势，但同时约有50%的转化株不表达外源基因。2000年法国生物物理化学研究所的Schroda和德国弗莱堡大学的Beck等<sup>[103]</sup>发现，热休克蛋白HSP70A启动子能提

升外源基因的表达，并随后阐明这归功于HSP70A启动子顺序元件能缓解基因沉默<sup>[104]</sup>，并可能与特定的泛素化相关（如与E3连接酶中的Elongin C相关），于2002提出构建HSP70A-RbcS2嵌合启动子的思路，发现所驱动转录的目标RNA在常规条件下呈组成型稳定转录，在40℃热激后进一步增强。随后，人们尝试在HSP70A-RbcS2上引入更多的调控组件，包括RbcS2的第1个内含子和3'-UTR等，逐渐成为蛋白表达效果最好的系统。作为拓展，RbcS2启动子随后与RNAi等基因操作技术结合，成为研究莱茵衣藻基因功能的有力工具<sup>[105]</sup>。Invitrogen公司从2011年开始陆续推出了基于该系统的GeneArt® *Chlamydomonas* TOPO® Engineering Kits用于生产外源蛋白，目前最新的为4.0版。然而，人们对外源RbcS2表达系统在莱茵衣藻细胞内的调控规律知之甚少，限制了该系统应用的进一步发展。RuBisCO是典型的研究植物核基因与叶绿体基因组系统调控的体系，2017年Aigner等<sup>[106]</sup>通过引入5个伴侣分子实现了RuBisCO复合物在大肠杆菌中的表达和组装，也从侧面说明了这种系统调控的复杂程度。

莱茵衣藻中除了使用一些天然启动子，包括热休克蛋白70A（HSP70A）、Rubisco small subunit（RBCS2）或光系统I蛋白D（*psaD*）的启动子，诱导型启动子也是可以被选择的，还有一些广泛用于植物转化的异源启动子也已被用于微藻中，例如花椰菜花叶病毒（CaMV）35S启动子和p1'2'农杆菌启动子，这可能是微藻作为植物复合宿主的一个表现。目前，一些研究人员建议可以根据强启动子序列的特点构建藻类合成启动子（saps）<sup>[102]</sup>。

#### 2.2.4 核编码的叶绿体定位表达

实现核编码的叶绿体定位表达，将拓展莱茵衣藻在代谢工程与合成生物学方面的应用。主要体现在两个方面：其一，相比于以蛋白生产为目标的莱茵衣藻表达系统，新型表达系统将更关注于外源基因与已有代谢系统的匹配。RbcS2表达系统的诞生和衍化多以蛋白表达量为指标，如商品化的GeneArt系统，目标是以莱茵衣藻为宿主用于外源蛋白生产，其缺点在于，细胞内的外源蛋白

大量积累,严重影响细胞生长,限制了其在功能研究方面的可能性。叶绿体是微藻碳水化合物、脂肪酸和众多色素的直接合成部位,外源功能蛋白直接定位到叶绿体中,将有利于强化微藻储能物质和高值代谢物的生产。其二,将为能源微藻以及高值代谢物生物制备技术开发提供新的工具。目前多采用营养胁迫调控促进微藻油脂以及一些天然色素(如类胡萝卜素、虾青素等)的积累,其中缺氮调控是最为广泛使用的<sup>[107-108]</sup>,即在培养过程中,培养基中不添加氮元素(硝酸根、铵盐或尿素等)或者使其消耗殆尽并继续培养。尽管储能物质的含量增加了,但是由于缺氮调控限制细胞生长,导致整体储能物质生产效率难以实现质的突破,并增加了操作的复杂度和不稳定性。生长与储能物质的同步积累是能源微藻技术开发的目标。因此,开发核编码的叶绿体定位表达系统也将为这一目标的实现提供契机。

作者所在研究团队在莱茵衣藻内转入叶绿体型3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, GAP3, Cre01.g010900.t1.2)<sup>[109]</sup>,随后,进一步尝试转入融合莱茵衣藻叶绿体磷脂:二酰甘油酰基转移酶(phospholipid: diacylglycerol acyl transferase, CrPDAT, GenBank: AFB73928.1) cTP序列的*Saccharomyces cerevisiae* PDAT (ScPDAT)<sup>[110]</sup>,结果发现了相同的生长偶联表达趋势,这与正常培养过程中RbcS蛋白含量稳定以及常规RbcS2启动子驱动的组成型表达并不一致。结合已有关于RbcS2系统稳定性的报道,我们推测存在着两种可能机制,一种是外源的RbcS2系统,尤其当引入了cTP后,受到了与内源系统不一致的调控机制影响,或者是内/外源RbcS2启动子在调控过程存在着相互作用。如Yamasaki等<sup>[111]</sup>发现外源RbcS2启动子在整合到核DNA后,会受到组蛋白修饰变化的影响而丧失了内源性RbcS2启动子的稳定性,其活性可以通过组蛋白H3的乙酰化和H3K9的单甲基化水平高低进行表征。另一种可能是表达的蛋白进入叶绿体后,随着叶绿体受到的整体性的调节。对于后者的推测,利用本研究团队所建立的特征脂肪酸技术,发现转化后的ScPDAT影响的主要是叶绿体内的脂

肪酸代谢和脂质重组,证明了融合ScPDAT进入并在叶绿体中发挥作用,因此存在上述可能性。

实现核编码的叶绿体定位表达,可以通过已知的莱茵衣藻cTP信息数据库为出发点,借助高通量表达筛选技术与组学技术,构建、筛选生长偶联型嵌合RbcS2表达系统,并探索其内在的生物学调控机制。借助于高通量克隆表达筛选技术,以及已有cTP的实验信息和预测信息(PredAlgo)<sup>[112]</sup>,将获得和验证不同cTP在表达系统中的特性,丰富真核藻类表达调控的基础理论;获得大量新的生物信息和材料(嵌合表达载体及转化株),提供新型表达元件和策略,在工程微藻新性状理性设计、微藻合成生物学研究方面具有重要意义。通过研究,深化对跨越核和叶绿体间转录水平调节偶联机制的认识,为进一步开发适宜的微藻培养调控工艺、改良微藻藻株提供理论基础。

### 3 挑战与展望

在叶绿体细胞器工厂的研究中,建立叶绿体转运肽嵌合核表达系统,需要探究细胞核与叶绿体转录/表达协同机制,这一科学问题也是叶绿体表达工程、代谢工程与合成生物学发展所需要突破的核心科学问题。为此,可利用典型的RbcS2启动子表达系统,获取该嵌合RbcS2-cTP驱动系统的转录/表达信息,探索嵌合RbcS2-cTP表达系统在细胞内的调节与cTP相关机制,拓展该表达系统的应用,最终希望在基础理论研究和新元件开发上促进上述领域的发展。

RuBisCO蛋白的调控和组装是核-叶绿体协同的经典例子,大亚基在叶绿体内编码成熟,小亚基核编码跨膜进入叶绿体并与大亚基组装在一起,在转录和蛋白水平上均呈现出一致性,通过大亚基的量的调节实现RuBisCO总量的控制。因为这一过程涉及细胞内多个系统的协同作用,所以,植物和真核微藻细胞如何实现二者的调控一直吸引人们的关注。按照现有对转录调控的认识,大致包括编码蛋白上游(包括转录结合CAAT Box、启动子和远程上游)调控、密码子调控、可变剪



切、基因沉默、3'-UTR 调控等，上游调控又与转录因子调节、核酸修饰、组蛋白修饰等有关，而作为叶绿体蛋白还需要更多的核-叶绿体协同信息的传递，对这部分内容的深入认识需要开展大量细致的工作，也需要新体系、新技术的引入与应用。但是对于 cTP，除了作为识别元件，是否还参与转录、翻译或其他调控尚属未知。本研究团队在前期工作中发现 RbcS2-cTP 蛋白生长偶联现象的基础上，聚焦 RuBisCO 启动子对转录的驱动及蛋白表达的影响。本质上，RuBisCO SSU 就是一个天然的嵌合系统，通过对比内源性 RuBisCO SSU 与不同外源嵌合 RbcS2-cTP 在转录驱动方面的异同，揭示 RbcS2 启动子在细胞转录调节中可能的机制，尝试拓展 RbcS2 表达系统在真核微藻代谢工程与合成生物学中的应用。

基于上述分析，综合太阳能与 CO<sub>2</sub> 利用和代谢调控的多样性潜力，微藻叶绿体细胞器工厂技术有望随着合成生物学技术的发展，在绿色生物制造领域成为一个重要的方向。

#### (1) 多样和高产量蛋白表达

因为叶绿体自身蛋白表达调控能力较弱，允许单一蛋白在叶绿体内高含量存在而不会形成包涵体等不利后续应用的形态或者激活内源性的降解，所以微藻叶绿体非常适合作为宿主，构建蛋白表达的细胞器工厂，包括疫苗、多肽或者特殊功能性蛋白。例如，由于很多微藻可以作为饵料、饲料应用于畜牧业和水产养殖行业，所以可以通过叶绿体细胞器技术构建口服疫苗，直接应用。

#### (2) 植物源复杂天然产物生产

叶绿体是萜类（单萜、二萜和四萜）、糖类及衍生物和脂肪酸等植物源天然产物的直接生产者，

同时，微藻也是众多天然色素的主要生产者。因此通过构建叶绿体细胞器工厂，将微藻叶绿体作为植物源复杂天然产物的新的合成底盘，有望具有更高的适配性能，加速这一类天然产物的生产。

#### (3) 实现更高效的光合固碳生产大宗化学品

受限于高等植物的自身生物学结构，微藻更利于进行工业化生产并与上下游工艺流程相衔接。尽管微藻自身的太阳光能利用效率被认为高于高等植物的平均水平，但是受限于水生环境对 CO<sub>2</sub> 传质和太阳光能的阻碍，提升微藻的光能利用效率一直是一个挑战，整体上，距离理论光合效率极限还有很大距离。然而，近年来伴随合成生物学以及 CO<sub>2</sub> 太阳能驱动转化为 C<sub>1</sub> 或简单有机分子技术的人工光合成发展和成熟，通过构建人工-生物光合作用耦合的叶绿体细胞器工厂（图3），将有望提升太阳光能驱动 CO<sub>2</sub> 生产淀粉、油脂和蛋白质类综合生产效率，为粮食战略安全、碳中和发展贡献微藻的力量。

然而，上述工作的开展也存在着机理和技术两个方面明显的挑战。机理上的挑战是微藻叶绿体蛋白表达的宏观调控机制，涉及细胞核与叶绿体之间的系统调控，外源基因在微藻细胞内的转录、翻译、转运等的控制，以及外源基因表达产物在叶绿体内的转运、定位和进一步发挥作用。在技术上的挑战主要集中在高效/高通量微藻叶绿体细胞器工厂构建工具的开发，相比现有细菌、酵母和蓝藻的转化，真核微藻转化和构建技术尚处于起步阶段，极大限制了微藻叶绿体细胞器工厂技术的进一步发展。

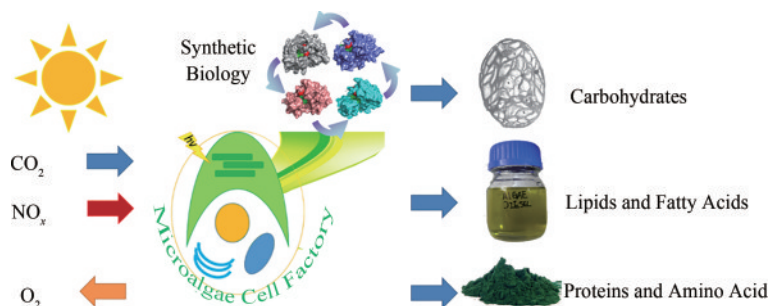


图3 构建人工-生物光合作用耦合的叶绿体细胞器工厂

Fig. 3 Construction of a chloroplast organelle factory coupled with artificial - biological photosynthesis

## 参 考 文 献

- [1] BEHRENFELD M J, RANDERSON J T, MCCLAIN C R, et al. Biospheric primary production during an ENSO transition[J]. *Science*, 2001, 291(5513): 2594-2597.
- [2] SIMKIN A J, LÓPEZ-CALCAGNO P E, RAINES C A. Feeding the world: improving photosynthetic efficiency for sustainable crop production[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(4): 1119-1140.
- [3] LONG S P, ZHU X G, NAIDU S L, et al. Can improvement in photosynthesis increase crop yields? [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2006, 29(3): 315-330.
- [4] PARRY M A J, REYNOLDS M, SALVUCCI M E, et al. Raising yield potential of wheat ( II ): Increasing photosynthetic capacity and efficiency[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 62(2): 453-467.
- [5] BLANKENSHIP R E, TIEDE D M, BARBER J, et al. Comparing photosynthetic and photovoltaic efficiencies and recognizing the potential for improvement[J]. *Science*, 2011, 332(6031): 805-809.
- [6] KSELÍKOVÁ V, SINGH A, BIALEVICH V, et al. Improving microalgae for biotechnology-From genetics to synthetic biology-Moving forward but not there yet[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 58: 107885.
- [7] LU Y D, ZHANG X, GU X P, et al. Engineering microalgae: transition from empirical design to programmable cells[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2021, 41(8): 1233-1256.
- [8] EINHAUS A, BAIER T, ROSENSTENGEL M, et al. Rational promoter engineering enables robust terpene production in microalgae[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(4): 847-856.
- [9] MUÑOZ C F, SÜDFELD C, NADUTHODI M I S, et al. Genetic engineering of microalgae for enhanced lipid production[J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 52: 107836.
- [10] WICHMANN J, BAIER T, WENTNAGEL E, et al. Tailored carbon partitioning for phototrophic production of (*E*)- $\alpha$ -bisabolene from the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 45: 211-222.
- [11] TRAN N T, KALDENHOFF R. Metabolic engineering of ketocarotenoids biosynthetic pathway in *Chlamydomonas reinhardtii* strain CC-4102[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 10688.
- [12] KUSMAYADI A, LEONG Y K, YEN H W, et al. Microalgae as sustainable food and feed sources for animals and humans - biotechnological and environmental aspects[J]. *Chemosphere*, 2021, 271: 129800.
- [13] GEROTTO C, NORICI A, GIORDANO M. Toward enhanced fixation of CO<sub>2</sub> in aquatic biomass: focus on microalgae[J]. *Frontiers in Energy Research*, 2020, 8: 213.
- [14] MUTALE-JOAN C, SBABOU L, HICHAM E A. Microalgae and cyanobacteria: How exploiting these microbial resources can address the underlying challenges related to food sources and sustainable agriculture: a review[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2022: 1-20.
- [15] AL-HAJ L, LUI Y T, ABED R M, et al. Cyanobacteria as chassis for industrial biotechnology: progress and prospects[J]. *Life*, 2016, 6(4): E42.
- [16] XUE Y, HE Q F. *Cyanobacteria* as cell factories to produce plant secondary metabolites[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2015, 3: 57.
- [17] CASE A E, ATSUMI S. *Cyanobacterial* chemical production[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 231: 106-114.
- [18] ZHU T, XIE X M, LI Z M, et al. Enhancing photosynthetic production of ethylene in genetically engineered *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Green Chemistry*, 2015, 17(1): 421-434.
- [19] QIAO Y, WANG W H, LU X F. Engineering *Cyanobacteria* as cell factories for direct trehalose production from CO<sub>2</sub>[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 161-171.
- [20] SONG K, TAN X M, LIANG Y J, et al. The potential of *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 for sugar feedstock production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(18): 7865-7875.
- [21] TAN C L, TAO F, XU P. Direct carbon capture for the production of high-performance biodegradable plastics by *Cyanobacterial* cell factories[J]. *Green Chemistry*, 2022, 24(11): 4470-4483.
- [22] GAO X, GAO F, LIU D, et al. Engineering the methylerythritol phosphate pathway in *Cyanobacteria* for photosynthetic isoprene production from CO<sub>2</sub>[J]. *Energy & Environmental Science*, 2016, 9(4): 1400-1411.
- [23] DREESEN I A J, HAMRI G C E, FUSSENEGGER M. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection[J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 145(3): 273-280.
- [24] XING J L, PAN J T, YI H, et al. The plastid-encoded protein Orf2971 is required for protein translocation and chloroplast quality control[J]. *The Plant Cell*, 2022, 34(9): 3383-3399.
- [25] 任聪, 王丹, 杨琳, 等. 叶绿体中表达外源蛋白的研究进展[J]. *科技通报*, 2012, 28(3): 38-42.  
REN C, WANG D, YANG L, et al. Research advance on foreign protein production in chloroplast[J]. *Bulletin of Science and Technology*, 2012, 28(3): 38-42.
- [26] SHI Q W, CHEN C, ZHANG W, et al. Transgenic eukaryotic microalgae as green factories: providing new ideas for the production of biologically active substances[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2021, 33(2): 705-728.

- [27] RUSSELL C, RODRIGUEZ C, YASEEN M. High-value biochemical products & applications of freshwater eukaryotic microalgae[J]. Science of the Total Environment, 2022, 809: 151111.
- [28] SPECHT E, MIYAKE-STONER S, MAYFIELD S. Microalgae come of age as a platform for recombinant protein production[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(10): 1373-1383.
- [29] NOORDALLY Z B, ISHII K, ATKINS K A, et al. Circadian control of chloroplast transcription by a nuclear-encoded timing signal[J]. Science, 2013, 339(6125): 1316-1319.
- [30] GUTENSOHN M, FAN E G, FRIELINGS DORF S, et al. Toc, Tic, Tatet al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts[J]. Journal of Plant Physiology, 2006, 163(3): 333-347.
- [31] SIDDIQUI A, WEI Z Y, BOEHM M, et al. Engineering microalgae through chloroplast transformation to produce high-value industrial products[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2020, 67(1): 30-40.
- [32] MAUL J E, LILLY J W, CUI L Y, et al. The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats[J]. The Plant Cell, 2002, 14(11): 2659-2679.
- [33] 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.
- [34] GOLDSCHMIDT-CLERMONT M. Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(15): 4083-4089.
- [35] ROCHAIX J D. Chloroplast reverse genetics: new insights into the function of plastid genes[J]. Trends in Plant Science, 1997, 2(11): 419-425.
- [36] LARREA-ALVAREZ M, PURTON S. Multigenic engineering of the chloroplast genome in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Microbiology, 2020, 166(6): 510-515.
- [37] KANG S, JEON S, KIM S, et al. Development of a pVEC peptide-based ribonucleoprotein (RNP) delivery system for genome editing using CRISPR/Cas9 in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 22158.
- KANG S, JEON S, KIM S, et al. Development of a pVEC peptide-based ribonucleoprotein (RNP) delivery system for genome editing using CRISPR/Cas9 in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 22158.
- [38] SHIN S E, LIM J M, KOH H G, et al. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27810.
- [39] NYMARK M, SHARMA A K, SPARSTAD T, et al. A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24951.
- [40] CHEN X, KINDLE K, STERN D. Initiation codon mutations in the *Chlamydomonas* chloroplast *petD* gene result in temperature-sensitive photosynthetic growth[J]. The EMBO Journal, 1993, 12(9): 3627-3635.
- [41] MAJERAN W, WOLLMAN F A, VALLON O. Evidence for a role of ClpP in the degradation of the chloroplast cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex[J]. The Plant Cell, 2000, 12(1): 137-149.
- [42] SURZYCKI R, COURNAC L, PELTIER G, et al. Potential for hydrogen production with inducible chloroplast gene expression in *Chlamydomonas*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(44): 17548-17553.
- [43] RAMUNDO S, RAHIRE M, SCHAAD O, et al. Repression of essential chloroplast genes reveals new signaling pathways and regulatory feedback loops in *Chlamydomonas*[J]. The Plant Cell, 2013, 25(1): 167-186.
- [44] RAMUNDO S, CASERO D, MÜHLHAUS T, et al. Conditional depletion of the *Chlamydomonas* chloroplast ClpP protease activates nuclear genes involved in autophagy and plastid protein quality control[J]. The Plant Cell, 2014, 26(5): 2201-2222.
- [45] SURZYCKI R, GREENHAM K, KITAYAMA K, et al. Factors effecting expression of vaccines in microalgae[J]. Biologicals, 2009, 37(3): 133-138.
- [46] BARKAN A, GOLDSCHMIDT-CLERMONT M. Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression[J]. Biochimie, 2000, 82(6/7): 559-572.
- [47] NICKELSEN J, VAN DILLEWIJN J, RAHIRE M, et al. Determinants for stability of the chloroplast *psbD* RNA are located within its short leader region in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. The EMBO Journal, 1994, 13(13): 3182-3191.
- [48] MERCHANT S, BOGORAD L. The Cu(II)-repressible plastidic cytochrome *c*. Cloning and sequence of a complementary DNA for the pre-apoprotein[J]. Journal of Biological Chemistry, 1987, 262(19): 9062-9067.
- [49] QUINN J M, ERIKSSON M, MOSELEY J L, et al. Oxygen deficiency responsive gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* through a copper-sensing signal transduction pathway[J]. Plant Physiology, 2002, 128(2): 463-471.
- [50] HELLIWELL K E, SCAIFE M A, SASSO S, et al. Unraveling vitamin B<sub>12</sub>-responsive gene regulation in algae[J]. Plant Physiology, 2014, 165(1): 388-397.
- [51] CROFT M T, MOULIN M, WEBB M E, et al. Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(52): 20770-20775.
- [52] MICHELET L, LEFEBVRE-LEGENDRE L, BURR S E, et al.



- Enhanced chloroplast transgene expression in a nuclear mutant of *Chlamydomonas*[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(5): 565-574.
- [53] RASALA B A, MUTO M, LEE P A, et al. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2010, 8(6): 719-733.
- [54] DYU Y M, PURTON S. The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins[J]. *Microbiology*, 2018, 164(2): 113-121.
- [55] SUN M, QIAN K X, SU N, et al. Foot-and-mouth disease virus VP<sub>1</sub> protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast[J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(13): 1087-1092.
- [56] TRAN M, VAN C, BARRERA D J, et al. Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(1): E15-E22.
- [57] STOFFELS L, TAUNT H N, CHARALAMBOUS B, et al. Synthesis of bacteriophage lytic proteins against *Streptococcus pneumoniae* in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(9): 1130-1140.
- [58] MANUELL A L, BELIGNI M V, ELDER J H, et al. Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas chloroplast*[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 5(3): 402-412.
- [59] MAYFIELD S P, FRANKLIN S E, LERNER R A. Expression and assembly of a fully active antibody in algae[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(2): 438-442.
- [60] ZEDLER J A Z, GANGL D, GUERRA T, et al. Pilot-scale cultivation of wall-deficient transgenic *Chlamydomonas reinhardtii* strains expressing recombinant proteins in the chloroplast[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(16): 7061-7070.
- [61] WANG K, CUI Y L, WANG Y C, et al. Chloroplast genetic engineering of a unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* with expression of an antimicrobial peptide[J]. *Marine Biotechnology*, 2020, 22(4): 572-580.
- [62] WANG K, GAO Z Q, WANG Y C, et al. The chloroplast genetic engineering of a unicellular green alga *Chlorella vulgaris* with two foreign peptides co-expression[J]. *Algal Research*, 2021, 54: 102214.
- [63] MA K, BAO Q, WU Y, et al. Evaluation of microalgae as immunostimulants and recombinant vaccines for diseases prevention and control in aquaculture[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 590431.
- [64] CORAGLIOTTI A T, BELIGNI M V, FRANKLIN S E, et al. Molecular factors affecting the accumulation of recombinant proteins in the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast[J]. *Molecular Biotechnology*, 2011, 48(1): 60-75.
- [65] RASALA B A, MUTO M, SULLIVAN J, et al. Improved heterologous protein expression in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* through promoter and 5' untranslated region optimization[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(6): 674-683.
- [66] OEY M, ROSS I L, HANKAMER B. Gateway-assisted vector construction to facilitate expression of foreign proteins in the chloroplast of single celled algae[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e86841.
- [67] ZEDLER J A Z, GANGL D, HAMBERGER B, et al. Stable expression of a bifunctional diterpene synthase in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(6): 2271-2277.
- [68] NAWKARKAR P, CHUGH S, SHARMA S, et al. Characterization of the chloroplast genome facilitated the transformation of *parachlorella kessleri*-I, a potential marine alga for biofuel production[J]. *Current Genomics*, 2020, 21(8): 610-623.
- [69] XIA D H, QIU W, WANG X X, et al. Recent advancements and future perspectives of microalgae-derived pharmaceuticals[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(12): 703.
- [70] ALMARAZ-DELGADO A L, FLORES-URIBE J, PÉREZ-ESPANA V H, et al. Production of therapeutic proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *AMB Express*, 2014, 4: 57.
- [71] SHAMRIZ S, OFOGHI H. Outlook in the application of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast as a platform for recombinant protein production[J]. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2016, 32(1/2): 92-106.
- [72] 李珺. 几种新型细胞器植物生物反应器的研究[J]. *生物技术通报*, 2008(3): 30-32.
- LI J. Research of several new plant cell bioreactor[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(3): 30-32.
- [73] RASALA B A, MAYFIELD S P. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses[J]. *Photosynthesis Research*, 2015, 123(3): 227-239.
- [74] GOULD S B, WALLER R F, MCFADDEN G I. Plastid evolution[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 491-517.
- [75] GINGER M L, MCFADDEN G I, MICHELS P A M. The evolution of organellar metabolism in unicellular eukaryotes[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2010, 365(1541): 693-698.
- [76] FRANZÉN L G, ROCHAIX J D, VON HEIJNE G. Chloroplast transit peptides from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* share features with both mitochondrial and higher plant

- chloroplast presequences[J]. FEBS Letters, 1990, 260(2): 165-168.
- [77] VILLAREJO A, BURÉN S, LARSSON S, et al. Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast[J]. Nature Cell Biology, 2005, 7(12): 1224-1231.
- [78] UNIACKE J, ZERGES W. Chloroplast protein targeting involves localized translation in *Chlamydomonas*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(5): 1439-1444.
- [79] SHI L X, THEG S M. The motors of protein import into chloroplasts[J]. Plant Signaling & Behavior, 2011, 6(9): 1397-1401.
- [80] VOJTA L, SOLL J, BÖLTER B. Protein transport in chloroplasts-targeting to the intermembrane space[J]. The FEBS Journal, 2007, 274(19): 5043-5054.
- [81] YANG B, LIU J, MA X, et al. Genetic engineering of the Calvin cycle toward enhanced photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation in microalgae[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10: 229.
- [82] PEROZENI F, CAZZANIGA S, BAIER T, et al. Turning a green alga red: Engineering astaxanthin biosynthesis by intragenic pseudogene revival in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(10): 2053-2067.
- [83] SPROLES A E, BERNDT A, FIELDS F J, et al. Improved high-throughput screening technique to rapidly isolate *Chlamydomonas* transformants expressing recombinant proteins[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(4): 1677-1689.
- [84] ZHANG Y T, JIANG J Y, SHI T Q, et al. Application of the CRISPR/Cas system for genome editing in microalgae[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(8): 3239-3248.
- [85] LUBBEN T H, BANSBERG J, KEEGSTRA K. Stop-transfer regions do not halt translocation of proteins into chloroplasts[J]. Science, 1987, 238(4830): 1112-1114.
- [86] KIM D H, LEE J E, XU Z Y, et al. Cytosolic targeting factor AKR2A captures chloroplast outer membrane-localized client proteins at the ribosome during translation[J]. Nature Communications, 2015, 6: 6843.
- [87] STAUB J M, GARCIA B, GRAVES J, et al. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(3): 333-338.
- [88] KIKUCHI S, BÉDARD J, HIRANO M, et al. Uncovering the protein translocon at the chloroplast inner envelope membrane[J]. Science, 2013, 339(6119): 571-574.
- [89] DEPÈGE N, BELLAFFIORE S, ROCHAIX J D. Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*[J]. Science, 2003, 299(5612): 1572-1575.
- [90] STENGEL K F, HOLDERMANN I, CAIN P, et al. Structural basis for specific substrate recognition by the chloroplast signal recognition particle protein cpSRP43[J]. Science, 2008, 321(5886): 253-256.
- [91] HIRSCH S, MUCKEL E, HEEMEYER F, et al. A receptor component of the chloroplast protein translocation machinery[J]. Science, 1994, 266(5193): 1989-1992.
- [92] LEE D W, HWANG I. Evolution and design principles of the diverse chloroplast transit peptides[J]. Molecules and Cells, 2018, 41(3): 161-167.
- [93] RADHAMONY R N, THEG S M. Evidence for an ER to Golgi to chloroplast protein transport pathway[J]. Trends in Cell Biology, 2006, 16(8): 385-387.
- [94] BEHRENS M R, MUTLU N, CHAKRABORTY S, et al. Dicamba resistance: enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies[J]. Science, 2007, 316(5828): 1185-1188.
- [95] KOBAYASHI Y, MISUMI O, ODAHARA M, et al. Holliday junction resolvases mediate chloroplast nucleoid segregation[J]. Science, 2017, 356(6338): 631-634.
- [96] ZEDLER J A Z, MULLINEAUX C W, ROBINSON C. Efficient targeting of recombinant proteins to the thylakoid lumen in *Chlamydomonas reinhardtii* using a bacterial Tat signal peptide[J]. Algal Research, 2016, 19: 57-62.
- [97] FOTH B J, RALPH S A, TONKIN C J, et al. Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*[J]. Science, 2003, 299(5607): 705-708.
- [98] KINDLE K L. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(3): 1228-1232.
- [99] RECUENCO-MUÑOZ L, OFFRE P, VALLEDOR L, et al. Targeted quantitative analysis of a diurnal RuBisCO subunit expression and translation profile in *Chlamydomonas reinhardtii* introducing a novel Mass Western approach[J]. Journal of Proteomics, 2015, 113: 143-153.
- [100] LLANSOLA-PORTOLES M J, LITVIN R, ILIOAIA C, et al. Pigment structure in the violaxanthin-chlorophyll-a-binding protein VCP[J]. Photosynthesis Research, 2017, 134(1): 51-58.
- [101] CERUTTI H, JOHNSON A M, GILLHAM N W, et al. A eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on *Chlamydomonas reinhardtii*: integration into the nuclear genome and gene expression[J]. Genetics, 1997, 145(1): 97-110.
- [102] SCRANTON M A, OSTRAND J T, GEORGIANNA D R, et al. Synthetic promoters capable of driving robust nuclear gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Algal Research, 2016, 15: 135-142.
- [103] SCHRODA M, BECK C F, VALLON O. Sequence elements

- within an *HSP70* promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2002, 31(4): 445-455.
- [104] STRENKERT D, SCHMOLLINGER S, SCHRODA M. Heat shock factor 1 counteracts epigenetic silencing of nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(10): 5273-5289.
- [105] DORON L, SEGAL N, SHAPIRA M. Transgene expression in microalgae-from tools to applications[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 505.
- [106] AIGNER H, WILSON R H, BRACHER A, et al. Plant RuBisCo assembly in *E. coli* with five chloroplast chaperones including BSD2[J]. *Science*, 2017, 358(6368): 1272-1278.
- [107] YAO C H, AI J N, CAO X P, et al. Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 118: 438-444.
- [108] HIRAI M Y, YANO M, GOODENOWE D B, et al. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(27): 10205-10210.
- [109] 朱振, 曹旭鹏, 苑广泽, 等. 莱茵衣藻叶绿体型磷酸甘油醛脱氢酶过表达对其储能物质生产的影响[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2019, 49(9): 50-58.
- ZHU Z, CAO X P, YUAN G Z, et al. Studies on the effect of overexpressed chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on carbohydrate and fatty acid contents of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2019, 49(9): 50-58.
- [110] ZHU Z, YUAN G, FAN X, et al. The synchronous TAG production with the growth by the expression of chloroplast transit peptide-fused ScPDAT in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 156.
- [111] YAMASAKI T, MIYASAKA H, OHAMA T. Unstable RNAi effects through epigenetic silencing of an inverted repeat transgene in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Genetics*, 2008, 180(4): 1927-1944.
- [112] TARDIF M, ATTEIA A, SPECHT M, et al. PredAlgo: a new subcellular localization prediction tool dedicated to green algae[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2012, 29(12): 3625-3639.



**通讯作者:** 曹旭鹏(1978—),男,研究员,博士生导师。致力于太阳能生物转化研究。

E-mail: c\_x\_p@dicp.ac.cn



**第一作者:** 朱振(1991—),女,博士研究生。研究方向为合成生物学和微藻可控培养研究。

E-mail: zhuzhen@dicp.ac.cn