

文章编号 :1003-8701(2003)04-0047-08

# 植物基因工程疫苗研究进展与前景展望

姜 健,杨宝灵,王洪刚

(山东农业大学农学院,山东 泰安 271000)

**摘 要**:可口服免疫(oral immunization)绿色疫苗(green vaccine)研究是植物基因工程与分子医学相结合而发展起来的新的研究方向。对当前植物基因工程疫苗的研究方法、疫苗的作用机理进行介绍,总结近10年来国内外植物基因工程疫苗研究进展,并对未来发展做出展望。

**关键词**:植物基因工程;疫苗;免疫

**中图分类号**:Q78

**文献标识码**:A

植物基因工程技术已成为当代生物技术领域的重要组成部分。自1983年首次报道植物基因遗传转化以来<sup>[1]</sup>,该技术在农业上已经得到广泛应用。通过转基因技术,人们创造众多新种质资源,并选育出许多植物新品种,所改良的性状主要以抗除草剂、抗病、抗虫、抗逆境及改良作物品质等为主,目的在于使栽培植物高产稳产。自20世纪90年代初,世界卫生组织(WHO)提出生产廉价、不需要冷藏的疫苗之后,Arntzen C J提出了利用植物基因工程技术进行食用疫苗生产的设想<sup>[2]</sup>,这一设想促成了转基因植物疫苗的兴起,使廉价疫苗的生产成为可能。在过去10年间,科学家们对这一设想进行了多方面研究,初步研究结果表明,利用植物基因工程生产绿色疫苗具有可行性。植物基因工程疫苗技术研究已经成为当前生物技术研究热门领域。

疫苗技术是人们从导致人畜疾病的病毒或者细菌中分离出蛋白,经过重组改造后,再转到其他生物中,使之产生抗原蛋白。传统疫苗生产一般采用酵母细胞,从酵母细胞中提取抗原,纯化后再输入到人畜体内使其产生抗体,从而达到免疫的目的。在疫苗生产的整个过程中,需要成本很高的发酵和蛋白质纯化技术,而且在分发运输过程中需要冷藏,大大增加了疫苗的成本。用植物基因工程技术生产疫苗方法与用微生物和动物生产疫苗方法相比,具有明显的优势<sup>[3-7]</sup>,具体表现为:①成本低及使用方便。植物是最经济的蛋白质表达系统,只需要消耗阳光、肥料和水,不需要专门的设施和昂贵的设备,而且部分转基因植物疫苗可以直接口服接种,既节省了提取、纯化和保存的成本,又能够使接种者免受皮肉之苦,使接种易于推广,特别适合于儿童接种。②生产速度快。不同于动物细胞的是植物的组织、细胞、原生质体均能够在离体的条件下诱导再生一株完整的植株。植物细胞培养、种植条件简单易成活,一旦获得高效表达载体,就可以在较短的时间内大量繁殖出具有相同遗传背景的无性繁殖系,只需增加耕种面积,就能够迅速形成

收稿日期:2003-03-07

**作者简介**:姜 健(1970-),男(蒙古族),内蒙古开鲁县人,博士后在站,副教授,主要从事植物分子生物学与基因工程研究。

产业化规模。③能进行有效的翻译后加工。植物细胞和动物细胞一样,均有着一套完善的真核表达系统,具有与动物细胞相似的翻译后加工过程,适合于动物病毒抗原的表达,表达产物具有与动物细胞相似的免疫原性。植物表达系统生产的蛋白质疫苗可以进行正确加工,包括糖基化、磷酸化和酰胺化等,可保持自然状态下的免疫原性。目前医药生产常用的微生物发酵系统不能够对真核蛋白质疫苗进行正确的翻译后加工,有时可以导致其免疫原性变弱。④安全性好。动物细胞生产基因工程疫苗,常常利用动物病毒作为载体导入抗原基因,在生产过程中可能污染动物病毒,这些病毒对人类具有潜在的危害性。转基因植物只表达亚单位疫苗,不含致病微生物或者潜在的致病微生物,对人畜安全。⑤启动粘膜免疫。粘膜免疫是病毒性腹泻的免疫保护机制,在启动粘膜免疫方面尚属难题。转基因植物细胞是可以启动粘膜免疫的有效途径,其机制可能是植物细胞壁给抗原提供了一种生物微囊,生物微囊可以保护抗原不被消化酶降解,并有缓释作用。⑥易于运输。植物基因工程生产的疫苗可以直接储存在种子或者果实中,无需冷冻系统设备进行储藏运输,易于进行长距离运输和普及推广。

## 1 植物基因工程疫苗的生产方法

外源基因转化植物细胞生产疫苗的方法随着分子生物学技术的发展而不断变化。目前,利用转基因植物生产疫苗的主要方法有两种<sup>[8-11]</sup>:稳定表达系统和暂态表达系统。

### 1.1 稳定表达系统

这一方法是将抗原基因构建在植物表达载体上,利用农杆菌或者基因枪介导方法,将抗原基因转化到植物细胞中并与植物基因组整合,获得稳定表达的转基因植株。农杆菌介导转化法:将编码某种病原体中能引起机体保护性反应的蛋白基因克隆到 Ti 质粒上,用重组质粒转化农杆菌,携带重组质粒的农杆菌感染植物细胞后,导入的外源基因整合到植物细胞的染色体上,含有整合外源基因染色体的植物细胞在一定条件下可以长成新的植株,此植株在生长过程中可以表达外源基因,并能够将这种性状传递给子代,进而培育出能够生产某种疫苗的品系或者品种。基因枪转化法:以火焰爆炸、高压放电或者高压气体为推动力,将载有外源 DNA 的钨(或者金)等金属颗粒加速射击真空室中的靶细胞或者组织,将外源目的基因导入靶细胞或者组织中。除上述两种方法外,还有聚乙二醇(PEG)介导转化法、电穿孔转化法、显微注射法、植物生殖细胞转化法、转座子介导法和脂质体介导转化法等等。

自从 20 世纪 90 年代初,人们就开始应用转基因植物作为表达哺乳动物病原抗原蛋白的异源表达载体,已经成功表达的抗原蛋白主要有乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)<sup>[12]</sup>、大肠杆菌热敏肠毒素(LT--B)<sup>[13]</sup>、狂犬病病毒表面糖蛋白<sup>[14]</sup>及诺沃克(Norwalk)病毒衣壳蛋白<sup>[15]</sup>。以上这些植物表达蛋白在小鼠动物模型中均能诱导抗原特异性血清 IgG 反应,给小鼠饲喂表达大肠杆菌热敏肠毒素或 Norwalk 病毒衣壳蛋白的马铃薯块茎,可以诱导抗原特异的粘模 IgA 和血清 IgG 反应。

利用转基因技术进行植物基因工程疫苗生产有以下优点:一是通过有性杂交方法,可以获得生产多价复合疫苗的转基因植物;二是通过有性或无性的繁殖方法,可以很容易获得大量的转基因植株;三是通过特异性表达启动因子使抗原基因在器官和组织中特异性表达。目前主要采用 CaMV35S 组成型表达启动子,表达水平较低。

### 1.2 暂态表达系统

这是一种以病毒为载体的瞬时表达系统,其方法是将目的基因插入病毒基因组中,形成重组病毒,然后将重组病毒接种到植物的叶片上,任其蔓延,外源基因随病毒的复制而高效表达。这一方法又分为两种方式:一种是将抗原基因置于病毒基因组启动子之下<sup>[16]</sup>,一种是将抗原基因与病毒外壳蛋白基因融合在一起<sup>[17]</sup>。值得指出的是,抗原基因融合于病毒外壳蛋白的表达方式更具有免疫原性。目前用做载体的主要是烟草花叶病毒(TMV)和豇豆花叶病毒(CPMV)。

1993年,Usha等首先报道了口蹄疫病毒(FMDV)在CPMV表面表达<sup>[18]</sup>,随后的一些报道证明植物病毒是一种可以表达人或者动物的病原物基因的有效载体<sup>[19,20]</sup>。Modelska等将狂犬病病毒糖蛋白克隆到苜蓿草花叶病毒(ALMV)外壳蛋白的开放阅读框中<sup>[21]</sup>,分别在烟草和菠菜中得到表达。直接用含有重组病毒的菠菜叶片定期饲喂小鼠,在小鼠的血清中检测到特异性抗体的存在,而且直接口服菠菜叶片所获得的有效抗体水平远比用胃插管方法效果好,这说明植物细胞的细胞壁和细胞膜成分是很好的生物胶囊,可以有效地保护疫苗不被唾液和胃液的消化。当植物细胞进入小肠之后,其细胞壁和膜成分开始慢慢降解,细胞内的有效成分免疫原恰好开始发挥作用。

植物病毒作为瞬时表达载体具有许多优点,首先,病毒增殖水平较高,可使伴随的外源基因有高水平表达,相对于基因遗传转化方法,其表达量可以高出100多倍;其次,病毒增殖速度快,外源基因在较短的时间内,通常在接种1~2周以内就可达到最大量的积累;第三,植物病毒的基因组很小,易于进行遗传操作,而大多数植物病毒可以通过机械接种感染植物,这样适于大规模的商业操作;第四,植物病毒可以感染单子叶等农杆菌的非寄主植物,扩大了基因工程的适用范围。现在已经发展了多种植物病毒载体构建策略,包括基因导入、基因取代、融合抗原和基因互补等。目前,暂态表达系统方法还有几个问题需要深入进行研究:一是抗原的纯化;二是弱病毒株系的选择,即病毒对植物的侵染不会使植物生长异常,同时还要验证抗原基因的整合不会使病毒失去侵染和复制的能力;三是现有植物病毒载体侵染的植物宿主范围有限,需要增加植物病毒载体的范围。

## 2 植物基因工程疫苗的作用机理

口服疫苗到达肠内粘膜诱导部位之前要经过胃肠内的不利环境,因此有效的口服疫苗经过这些不利环境时必须受到保护,否则会失去免疫性。口服疫苗到达消化道内的作用部位时首先遇到的是消化道相关淋巴样组织(GALT),它是一种免疫网络,保护宿主免受病原体的伤害,阻止宿主同食物蛋白质发生反应。GALT由绒毛、上皮内淋巴细胞和固有层淋巴细胞组成。其中绒毛含有对抗原呈递能力的上皮细胞。口服疫苗诱导GALT发生粘膜免疫反应,产生分泌性的免疫球蛋白IgA(sIgA),IgA(sIgA)是目前所知的体内最丰富的免疫球蛋白,能抵抗消化蛋白酶的作用。分泌性抗体和病原体反应,防止机体感染疾病。口服疫苗还可以刺激全身免疫反应,在远处消灭病原体。

口服疫苗需要改良的载体和运输系统,这些载体和运输系统必须满足多能性、稳定性、低廉和生产稳定性的要求。近年来,保护常规口服疫苗通过胃肠不利环境的运输系统已经发展起来,这些包括polylactide/polyglycolide微球体、脂质体、蛋白体、cochleates、类病毒颗粒和免疫刺激复合体。许多具有活性的口服病毒和细菌载体已经建立起来,并进行了动物和人的试验,以研究其安全性和免疫性。相比以上常规口服疫苗的载体和运

输系统,利用转基因植物生产的口服疫苗更能够满足口服疫苗的要求和标准,转基因植物生产口服疫苗更经济,特别是大范围给药时更明显。

植物抗原引起的保护机制还在研究中,但显然细胞壁正好是抗原的临时保护伞,使它们在胃分泌物中相对安全。细胞壁在肠中开始溶化时,抗原逐渐释放出来激活哺乳动物的免疫系统。消化疫苗时,植物抗原有粘膜系统如胃肠道及呼吸道衬里(Lining)的抗原取样细胞——M细胞(mast cells),其将抗原传递给巨噬细胞,巨噬细胞和其它抗原传递细胞再将抗原展示给记忆辅助性T细胞。当辅助性T细胞识别外援的蛋白质片段后,就会刺激记忆B细胞制造和释放能够中和抗原的抗体。当疾病因子出现时,记忆辅助性T细胞一方面刺激保卫T细胞攻击受感染细胞,一方面迅速刺激记忆B细胞分泌中和抗体,消除入侵的病原体,并对疾病因子发动更广泛的攻击。

由于注射疫苗通常难以触发粘膜免疫应答,因此,绿色疫苗可同时激活粘膜和全身应答的双重效应将会帮助哺乳动物增强对许多危险微生物的防御。目前,在植物中成功表达的动物和人类疫苗有几十种,包括犬细小病毒抗原(CPV-CP-VP2)<sup>[21]</sup>、水貂肠炎病毒抗原(MEV-VP2)<sup>[23]</sup>、口蹄疫病毒抗原(FMDV-VP1)<sup>[24]</sup>、大肠杆菌热不稳定肠毒素B亚基(LT-B)、乙肝病毒表面抗原(HBsAg)<sup>[25]</sup>和诺沃克(Norwalk)病毒外壳蛋白等。乙型肝炎表面抗原(HBsAg)在烟草、马铃薯和番茄中表达的rHBsAg十分相似,成功地保持了蛋白质的特性,可激发记忆B细胞和记忆T细胞免疫反应。诺沃克病毒外壳蛋白在转基因烟草和马铃薯中表达及其表达产物能产生免疫原性。猪传染性肠胃炎病毒(TGEV)S蛋白在转基因芥菜和马铃薯中表达<sup>[26]</sup>,完整S基因表达产物可诱导机体产生优良的免疫应答。

### 3 植物基因工程疫苗的研究现状

到目前为止,在植物中表达用于疫苗研究的病原基因主要有:乙型肝炎表面抗原(HBsAg)基因、大肠杆菌热敏肠毒素B亚单位(LT-B)基因、霍乱弧菌毒素B亚单位(CT-B)基因、诺沃克病毒外壳蛋白(NVCP)基因、猪传染性肠胃炎病毒S糖蛋白(TGEV-S)基因、口蹄疫病毒VP1蛋白(FMDV-VP1)基因、狂犬病病毒G蛋白基因、人巨细胞病毒(HCMV)基因、糖蛋白B(UL55)基因和兔出血热病毒(RHDV)VP60蛋白基因等<sup>[27-30]</sup>(表1)。所涉及的宿主植物主要有:烟草、马铃薯、番茄、芥菜、苜蓿、黑豆和水稻等。

表1 利用转基因植物生产疫苗

疫苗	受体植物	表达蛋白	表达系统
乙型肝炎疫苗	烟草	重组HBsAg	农杆菌介导
鼻病毒疫苗	黑豆	人鼻病毒抗原决定簇	豇豆花叶病毒
疟疾疫苗	烟草	疟疾B细胞抗原决定簇	烟草花叶病毒
狂犬病疫苗	烟草、菠菜	狂犬病病毒糖蛋白	农杆菌介导
霍乱口服疫苗	马铃薯	霍乱弧菌毒素	农杆菌介导
大肠杆菌腹泻疫苗	烟草、马铃薯	大肠杆菌不耐热肠毒素	农杆菌介导
艾滋病疫苗	烟草、黑豆	艾滋病毒抗原决定簇	农杆菌介导
口蹄疫疫苗	苜蓿草、芥菜	口蹄疫病毒抗原决定簇	豇豆花叶病毒
流感疫苗	烟草	血细胞凝集素	烟草花叶病毒
癌症疫苗	烟草	c-Myc	烟草花叶病毒
龋齿疫苗	烟草	变异链球菌表面蛋白	农杆菌介导
自体免疫糖尿病疫苗	马铃薯	霍乱弧菌毒素B亚单位—人胰岛素融合	农杆菌介导
诺沃克病毒腹泻疫苗	烟草、马铃薯	诺沃克病毒衣壳蛋白	农杆菌介导
犬细小病毒疫苗	烟草	犬细小病毒	李痘病毒表达
兔出血病疫苗	马铃薯	兔出血热病毒	农杆菌介导

### 3.1 乙型肝炎病毒

这是最常见的传染病之一,根据世界卫生组织的资料,世界上有 2 亿人感染乙型肝炎病毒,每年有 100 多万人死于与乙型肝炎有关的疾病。在乙型肝炎病毒的转基因植物食用疫苗研究方面已经有很大进展,编码乙型肝炎病毒表面抗原 HBsAg 的基因导入了羽扇豆、莴苣、马铃薯和烟草等植物中,HBsAg 在这些植物中获得表达,从转基因烟草中分离纯化的重组 HBsAg 在物理特性上与从人体分离出来的 HBsAg 是相似的,而现在的普通疫苗就是从人或酵母细胞中分离的 HBsAg 疫苗。用转基因羽扇豆饲喂小鼠之后,经测定,小鼠体内产生了 HBsAg 特异性抗体。人吃了转基因莴苣叶片后,体内产生了 IgG 反应。在这几种植物的遗传转化中所使用的农杆菌菌株为 LBA4404、C58,质粒为 pROK2S、pHB101 和 pHB102 等,HBsAg 克隆自 pHB614。

### 3.2 诺沃克病毒

诺沃克病毒 (Norwalk) 是造成病毒性肠胃炎的主要原因,感染源是污染的食物和水源。在转基因烟草和马铃薯中表达其病毒壳蛋白基因 (NVCP),在饲喂小鼠实验中,小鼠体内产生了抗体。所用大肠杆菌菌株 LBA4404,质粒为 pNV101、pNV102 和 pNV140。

### 3.3 麻疹

麻疹是发展中国家的严重问题,新麻疹疫苗的研制迫在眉睫。Huang 等人构建了植物源性的麻疹病毒红血球凝集素蛋白<sup>[31]</sup>,并且表达水平较高。将这种绿色抗原接种到小鼠腹腔,或将转基因植物叶片饲喂小鼠,都使小鼠产生了可以中和麻疹病毒的特异性抗血清。

### 3.4 狂犬病病毒

狂犬病是一种病毒引起的急性中枢神经系统传染病,由感染动物的唾液传染给人类。已有报道狂犬病病毒壳蛋白基因在番茄中表达<sup>[27]</sup>,在饲喂鼠实验中,鼠产生了抗性。

### 3.5 人呼吸合胞体病毒

人呼吸合胞体病毒 (RSV) 是世界上引起婴幼儿呼吸道传染病的主要诱因。动物模型显示,人 RSV G-蛋白 174-187aa 的抗原决定基肽段就足以产生保护性免疫反应。于是 Belanger 等人构建了包含 174-187aa 肽段与紫花苜蓿花叶病毒衣壳蛋白的融合基因<sup>[32]</sup>,并通过病毒感染实现了其在烟草里的表达,食用这种烟草的小鼠产生了高水平的抗 RSV G-蛋白的特异性血清,并能保护小鼠长时期抵抗 RSV 的感染。Sandhu 等人则通过果实特异性 E8 启动子的控制<sup>[33]</sup>,将 RSV 融合蛋白表达于番茄中,小鼠吃了成熟的番茄后,也产生了抗 RSV-F 的特异性抗体。

### 3.6 霍乱

全球每年约有 500 万人感染此病,其中 20 万人死亡。致病的毒素由几个亚基组成,无毒的 B 亚基 (CT-B) 用于免疫。在转基因马铃薯中表达的 CTB,在饲喂鼠实验中,诱导出 CT-B 特异性抗体,用霍乱毒素感染,鼠具有免疫能力。

### 3.7 大肠杆菌

肠毒素大肠杆菌 (ETEC) 是婴儿痢疾的主要致病原因。其肠毒素 B 亚基 (LT-B) 与 CTB 非常相似,LT-B 基因在烟草和马铃薯中表达,在用从烟草中纯化的 LT-B 或者直接用转基因马铃薯饲喂鼠试验中,鼠显示了相当的免疫反应。所用的质粒为 pTH110、大肠杆菌菌株为 LBA4404。

### 3.8 肝炎 C 病毒

肝炎 C 病毒 (HCV) 是引起急性和慢性肝炎的主要原因。目前没有有效的疫苗治疗。Nemchinov 等人制备了一种抗 HCV 的植物源性的亚单位疫苗<sup>[34]</sup>。小鼠对这种疫苗产生了免疫应答。Richter 研究小组给小鼠饲喂含有肝炎 B 表面抗原的转基因马铃薯<sup>[35]</sup>, 小鼠抗 HBsAg 的特异性血清含量增加。

### 3.9 兔出血病病毒

兔出血病病毒结构蛋白 VP60 是兔出血病病毒的主要结构蛋白, VP60 蛋白基因置于 CaMV35S 启动子控制之下, 或者将 VP60 基因置于改进的含双拷贝增强子的 CaMV35S 启动子控制之下, 转化马铃薯, 均可转化和翻译出 VP60 重组蛋白, 但改进的 35S 启动子表达量更高。

### 3.10 口蹄疫病毒

用口蹄疫病毒 VP1 蛋白基因转化芥菜, 获得了转基因植株, 用含有重组 VP1 的叶片浸提物饲喂免疫小鼠, 可诱导产生特异性抗体, 这种抗体不仅能够与 VP1 发生反应, 而且也能够与完整的口蹄疫病毒颗粒反应, 所有免疫小鼠都能够抵抗口蹄疫病毒强毒株的攻击。利用口蹄疫病毒 VP1 结构蛋白基因转化苜蓿, 也可获得转基因植株, 用转基因苜蓿草的叶片浸提物或者利用新鲜叶片直接饲喂免疫小鼠, 均可产生特异性免疫应答, 免疫小鼠能够抵抗口蹄疫病毒的攻击, 这一结果支持转基因牧草植物生产可饲用疫苗的观点。

## 4 问题与展望

目前, 真正实现产业化的转基因植物的例子还很少, 实现植物基因工程疫苗产业化生产的则更少, 同时, 由于植物基因工程疫苗刚刚起步, 相关内容还有待于深入进行研究。

### 4.1 植物受体材料选择

20 世纪末科学家们主要采用烟草作为转基因受体材料, 这是因为烟草易于遗传操作, 5~6 周内就能获得实验结果, 作为植物基因工程研究的首选材料, 但烟叶不可食用, 并含有毒性烟碱, 不能进行动物饲喂试验。接下来选用的是马铃薯, 目的是要进行动物饲喂试验, 其优点是生长周期相对较短, 遗传转化也较简单, 而且具有块茎特异启动子。同时, 马铃薯易于繁殖和储藏, 运输特别方便。但是马铃薯不宜生食, 而且加热容易使蛋白质变性, 并破坏其中 HBsAg 的免疫原性, 所以马铃薯也不是首选用做食用疫苗的植物材料。香蕉在全世界有大量种植, 价格低廉, 适合人类生食 (包括婴幼儿), 是被广泛看好的转基因植物食用疫苗生产材料。近年来, May 等已经报道了香蕉的成功转化<sup>[36]</sup>; 华南农业大学植物病毒研究室经过多年研究, 建立起了以胚性细胞悬浮系为基础的高效香蕉转化体系, 为香蕉基因工程研究奠定了基础; 此外, Clendennen 等得到了香蕉果实特异表达产物, 相关启动子也将找到<sup>[37]</sup>。但是, 香蕉的蛋白含量较低, 而且果实成熟后易于腐烂。花生、大豆、玉米和水稻等作物将是今后可以考虑的操作对象。此外, 胡萝卜可以生食, 易于存放, 也值得考虑。苜蓿草是动物基因工程疫苗的首选受体材料。

### 4.2 食用疫苗的作用机理研究

大多数抗原, 尤其是可溶性抗原很容易在消化道里消化, 所以在生产口服疫苗时, 一定要研究抗原的包装问题。重组抗原在植物细胞中的表达可以看作是一种生物包装蛋白质的方法, 咀嚼时, 食物变成碎块, 以便下咽。碎块中的细胞破碎与否取决于时间和

细胞类型,细胞壁是由纤维素、蛋白质和胶质组成的,细胞壁是组织抗原被降解的第一道屏障,植物细胞膜和细胞器膜可进一步保护抗原避免胃液、肠液的降解作用,植物细胞的次生壁可以使内含物释放的更慢,到达小肠后植物细胞壁才开始破裂,逐步释放抗原,实现免疫功能。需要对其中细节进行深入研究,做到使抗原有效激活免疫系统,而不是只经过身体而未被利用。

#### 4.3 外源基因表达的稳定性

转基因植物中外源基因表达的不稳定性主要原因有两个:一是外源基因 DNA 的甲基化;二是基因共抑制效应。虽然可以通过筛选后代和育种工程得到稳定表达外源基因的转基因植物,然而筛选过程繁杂、耗时,因此,必须采取更为有效的方法和措施来解决转基因植物中外源基因表达的不稳定性问题。

食用疫苗的安全性、有效剂量以及植物的食用部位抗原含量稳定性、服用时间等等问题都需要进行深入研究。这一领域需要分子生物学、细胞生物学、育种学、栽培学、人类免疫学和动物免疫学等学科共同协作。

植物系统生产的抗原疫苗可保持天然免疫原的形式,这使得大规模方式生产抗原疫苗成为可能。由于口服疫苗免疫反应具有抗原特异性,需要在分析单一疫苗的基础上,确定何类植物最适合于疫苗的生产,这也将涉及探索外源蛋白在相应植物组织和细胞中的表达方式。同时也要进行食用疫苗机理的研究,确定食用疫苗的安全性、有效剂量以及抗原含量的稳定性。总之,在可食用疫苗研究方面,动物疫苗比人类疫苗更有前景,发展速度会更快,该领域的研究将促进相关机制的认识,从而推动整个疫苗研制的发展,为人类社会做出更大的贡献。

#### 参考文献:

- [1] 侯文胜,郭三堆,路明. 利用转基因技术进行植物遗传改良[J]. 生物技术通报, 2002, (1): 9-12.
- [2] 丰震. 植物基因工程在疫苗上的应用[J]. 生物技术通报, 2001, (4): 26-28.
- [3] 李轶女,胡英考,沈桂芳. 转基因植物基因工程疫苗[J]. 生物技术通报, 2002, (3): 11-15.
- [4] 李枞,宋艳茹. 新的生物反应器——转基因植物[J]. 生物技术通报, 1998, (5): 52-57.
- [5] 孔桂美. 应用植物表达系统生产疫苗的研究概况[J]. 生物技术通报, 2002, 13 (3): 226-227.
- [6] 汪开治. 利用转基因植物生产生物药[J]. 生物技术通报, 2001, (5): 36-40.
- [7] Birch R G, Plant transformation: Problem and strategies for practical application. *Annu Rev Physiol Plant Mol. Biol.*, 1997, 48: 297.
- [8] Van Larebeke N, Engler G, Holsters M, et al. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing ability. *Nature*, 1974, 252: 169.
- [9] 刘涂. 转基因植物-生产药物的新型生物反应器[J]. 生物技术通报, 1999, (3): 23-27.
- [10] 朱国萍,徐冲. 植物生物反应器生产绿色疫苗研究进展[J]. 生物工程进展, 2002, 22 (2): 70-72.
- [11] Walden R, Wingender R. Gene-transfer and plant regeneration techniques. *TIBTECH*, 1995, 13(9): 324-331.
- [12] Songstad D D, Somers D A, Griesbach R J. Advances in alternative DNA delivery techniques. *Plant Cell Tis Qrg Cul*, 1995, 40(1): 1-5.
- [13] Kamaqai M H, Turpen T H, Weinzette N, et al. Rapid high-level expression of biologically active a trichosanthin in transfected plants by and RNA viral vector. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1993, 90(2): 427-430.
- [14] Zuo W N, Weissinger A K, Boston R S. Expression of a maize ribosomeinactivating protein gene in transgenic tomato plants. *Plant Physiol Suppl*, 1995, 108(2): 150.
- [15] Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 1989, 342(6245): 76-78.
- [16] Ma J K, Hiatt A, Hein M, et al. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science*, 1995, 286(5211): 716-719.

- [17] Mason H S, Kam D M K, Arntzen C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1992, 89(24): 11745-11749 .
- [18] Usha R, Rohll J B, Spall V, et al. Development of animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology*, 1996, 204(1): 366-374 .
- [19] Port C, Spall V, Loveland, et al. Development cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology*, 1994, 202(2): 949-955 .
- [20] 朱进,张云,唐家琪,等. 转基因植物在疫苗等药物生产上的应用[J]. *中国公共卫生*, 2000, 16(5): 474-475 .
- [21] Modelska, Yang Y E. Immunogenicity of transgenic derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1995, 92(8): 3358-3361 .
- [22] Hag T A, Mason H S. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*, 1995, 268(5211): 714-716 .
- [23] 沈志强. 前景诱人的新型疫苗——食品疫苗[J]. *山东畜牧兽医*, 1999, (4): 30-31 .
- [24] Hamamoto H, Sugiyama Y, Nakagama N, et al. A new tobacco mosaic virus vector and its use for the systemic production of angiotensin I: converting enzyme inhibitor in transgenic tobacco and tomato. *Biotechnol*, 1993, 11(8): 930-932 .
- [25] 蔡志强,徐步进. 转基因植物作为生物反应器生产口蹄疫苗的研究进展[J]. *生物工程进展*, 2001, 21(4): 8-10 .
- [26] 徐洪伟. 作为生物反应器的转基因植物[J]. *生物学教学*, 2001, 26(5): 17 .
- [27] 刘志伟,郭勇,张晨. 植物细胞培养生物反应器的研究进展[J]. *现代化工*, 1999, 19(8): 14-16 .
- [28] Bosch D, Smal J. A tout growth hormone is expressed, correctly fold, and partially glycosylated in the leaves but not the seeds of transgenic plants. *Transg Res*, 1994, 3(5): 304-310 .
- [29] Carol O, Tacket M. A review of oral vaccines in transgenic vegetables, *Microbes and Infection*, 1999, (1): 77-80 .
- [30] Sijmons P C, Dekker B M. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnol*, 1990, 8(3): 217-221 .
- [31] Huang, Penswick J. The expression, localization, and effect of a human interferon in plant. *Virology*, 1989, 172(1): 213-222 .
- [32] Rennel M B. Rotavirus vaccine comes of age, *Pediatr*, 1997, (131): 632-638 .
- [33] Sandhu G, Moloney M M. Plant seed oil-bodies as carriers as carriers for foreign protein. *Biotechnol*, 1995, 13(1): 72-77 .
- [34] Nemchinov L. Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory consideration. *TIBTECT*, 1997, 15(2): 45-50 .
- [35] Richter L, Ishi A. Expression of human erythropoietin in cultured tobacco cells. *Biosci Biotech Biochem*, 1993, 57(8): 1249-1252 .
- [36] May G D, Afza R, Mason H S, et al. Generation of transgenic banana plants via *Arobacterium*-mediated transformation. *Biotechnol*, 1995, 13(5): 486-492 .
- [37] Clendennen M, Ma S. Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance. *Nature Method*, 1997, (3): 793-796 .

## Research Progress and Future Prospect on Vaccines Produced in Transgenic Plants

JIANG Jian, YANG Bao-ling, WANG Hong-gang

(*Agricultural Department of Shandong Agricultural University, Taian 271000, China*)

**Abstract:** The oral green vaccine is a new research direction of biotechnology by combining plant genetic engineering with molecular medicine. The research methods of producing vaccines by transgenic plants and active mechanism of oral vaccines were introduced in this paper. At the same time, the research progress on oral vaccines produced in transgenic plants in the recent ten years was reviewed and the future research direction was also discussed.

**Key words:** Plant genetic engineering; Vaccines; Immunization