

谈谈植物疫苗问题

张巍^{1,2}, 阎秀峰^{1,*}, 赵凌侠^{2,*}

¹东北林业大学生命科学学院, 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040; ²上海交通大学农业与生物学院, 植物生物技术研究中心, 上海 200240

Talking about Plant-Derived Vaccines

ZHANG Wei^{1,2}, YAN Xiu-Feng^{1,*}, ZHAO Ling-Xia^{2,*}

¹Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Ministry of Education, College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²Plant Biotechnology Research Center, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

摘要: 本文对植物疫苗的研究现状和问题进行了介绍和讨论。

关键词: 植物疫苗; 转基因; 植物表达系统; 生物安全

疫苗(vaccine)是所有能够诱发机体产生保护性抗体或激发机体产生特异免疫应答的生物制剂总称。从1796年Jenner用牛痘(cowpox)预防天花(smallpox)以及1880年前后Pasteur研制预防霍乱、炭疽热和狂犬病的生物制剂(Barquet和Domingo 1997; Eylar 2003)至今,疫苗已成为人类控制传染病的有效策略之一。

目前临床使用的疫苗主要是来源于接种动物组织或细胞提取物的灭活或减毒疫苗,近年来基因疫苗和基因工程疫苗也相继研制成功并取得了长足的发展。传统的减毒或灭活疫苗由于灭菌不足或标准掌握的差异,时有病原微生物(细菌、病毒或立克次氏体)致病事件发生,基因疫苗和基因工程疫苗存在免疫原性差、易被污染以及生产设备复杂和成本高等缺陷(Donnelly等1997)。

用植物表达重组蛋白在生产成本、规模化和产品安全方面具有优势(Warzecha和Mason 2003; Lal等2007),用植物表达某些抗原基因从而产生特异的抗原蛋白即可获得植物疫苗,属于基因工程疫苗范畴,是植物生物反应器的一种。有关植物疫苗的研究已有大量报道,用烟草(*Nicotiana tabacum* L.)表达的变异链球菌表面蛋白(surface protein antigen A, SpaA)防治龋齿是第一例植物疫苗(Curtiss和Cardineau 1990),其后乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg) (Mason等1992)、大肠杆菌热敏肠毒素B亚基(LT-B) (Kang等2006)、霍乱弧

菌毒素B亚基(CT-B) (Jiang等2007)、口蹄疫病毒(Pan等2008)和狂犬病病毒(Perea Arango等2008)等疫苗也相继在植物中成功表达,有的已进入I期或II期临床(Streatfield 2006)。本文就植物疫苗的最新研究进展和存在问题加以介绍和评述。

1 植物疫苗表达系统

植物疫苗生产系统可分为稳定转基因表达系统和瞬时表达系统(Marillonnet等2005; Rybicki 2009)。

1.1 稳定表达系统(stable expression system) 将抗原或含抗原决定基的亚基、肽的编码序列通过转基因技术整合到受体植物的细胞核或叶绿体基因组,使之在植物中高效表达,是目前植物疫苗生产的主要表达系统之一。稳定转基因表达系统包括植物全株、根、茎(包括块茎)、叶、花、果实、种子和油体以及细胞和叶绿体等组织和细胞器。

1.1.1 全株或组织器官表达系统 烟草、莴苣(*Lactuca sativa* L.)和菠菜(*Spinacia oleracea* L.)是叶片表达系统的代表植物。烟草是表达重组蛋白的模式植物之一,但由于含有尼古丁等有害生物碱,无

收稿 2009-07-06 修定 2009-09-04

资助 国家“863”计划(2007AA100503)和国家自然科学基金(30871722)。

* 共同通讯作者(E-mail: xfyan@nefu.edu.cn, Tel: 0451-82190052; E-mail: lxzhao@sjtu.edu.cn, Tel: 021-34205775)。

法直接食用(Marusic等2007; Wang等2008)。菠菜和可生食的莴苣是叶菜, 营养丰富, 是植物疫苗(特别是口服疫苗)生产中应优先考虑的植物种类(Karasev等2005; Webster等2006), 缺点是叶片蛋白含量低且不便贮存和运输, 若靶蛋白需要纯化则会由于生物量大和表达量低而增加纯化成本。

相对于叶片表达系统而言, 块茎和块根在贮存和运输中具有一定的优势。在马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)块茎和胡萝卜(*Daucus carota* L.)块根中已成功表达了HBsAg糖蛋白和麻疹亚基疫苗(Bouche等2003; Youm等2007), 二者可以直接作为动物生食饲料, 用于开发动物可食疫苗具有较大优势。另外, 发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)所介导的转基因植物发根, 由于靶蛋白可以直接分泌到培养基中而简化下游加工程序并节约生产成本, 也是可供选择的植物疫苗表达系统之一(Komarnytsky等2004), Kumar等(2006)曾用转基因马铃薯发根成功地表达了HBsAg。

通过启动子选择实现靶蛋白组织特异表达(如富含蛋白的种子), 是植物系统提高靶蛋白表达水平和简化纯化程序常采用的策略之一。种子适于在常温下长距离运输和长期贮存, 也是常用的饲料添加剂, 因而是比较理想的植物疫苗表达器官(Streatfield 2006)。Yang等(2008)用种子特异表达启动子(glutelin B1 promoter, GluB1)在水稻中成功表达了粉尘螨(*Dermatophagoides farinae* H.)过敏原Derp1。用植物泛素启动子(plant ubiquitin promoter, Ubi)在玉米(*Zea mays* L.)种子中表达新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)疫苗, 在实验动物中可以诱导产生相应抗体(Guerrero-Andrade等2006)。但是, 农作物通常生长在较为开放的环境中, 常存在着生物安全(食用和环境)隐患问题。

在植物疫苗生产过程中, 下游加工纯化约占总成本的80%, 决定其产业化的前景(Schillberg等2003), 因此靶蛋白易于分离纯化的植物常是表达系统中优先考虑的。用植物油体系统表达重组蛋白, 在下游加工和纯化中具有优势。油体蛋白(oleosin)占植物种子总可溶性蛋白的2%~10%, 其两端(N端和C端)亲水和中间区域有疏水的特性, 因此仅需简单的纯化加工步骤就可以实现与其他种子蛋白的分离(Tzen和Huang 1992)。靶蛋白通过与油体蛋白融合, 也可以简化其下游加工程序和节约纯化成本

(Parmenter等1995; Schryvers等2006)。有人用植物油体系统已成功表达了水蛭素和胰岛素等药用蛋白(Parmenter等1995; Nykiforuk等2006)。但迄今为止, 除了美国已有人申请用油体系统表达疫苗专利以外(<http://www.thefreelibrary.com/SemBioSys+receives+United+States+patent+for+vaccine+production-a0125884776>), 尚未见有用油体系统表达疫苗的报道。不过, 用油菜(*Brassica napus* L.)、花生(*Arachis hypogaea* L.)、芝麻(*Sesamum indicum* L.)和向日葵(*Helianthus annuus* L.)等油料作物的油体系统表达疫苗可能具有一定的优势和应用前景。

基于节约纯化成本和患者(特别是儿童)能否接受角度考虑, 用可以鲜食的水果和蔬菜(如香蕉和番茄)表达疫苗也可能是一种很好的选择(Mason等1998; Lou等2007)。香蕉(*Musa paradisiaca* L.)是最早用于植物口服疫苗研究的水果之一(Kumar等2005; Mason等1998), 但存在遗传转化技术不够成熟、周期长(2~3年)、成熟果实易腐烂和重组蛋白表达量低等缺陷。与香蕉相比, 番茄(*Solanum lycopersicum* L.)是遗传工程操作中的模式植物之一, 有较成熟的转化系统, 而且番茄种植区域广、产量高、富含营养和可以鲜食, 是比较理想的植物疫苗表达系统(Lal等2007)。至今, HBsAg等多种植物疫苗已在番茄中成功表达(Lou等2007; Jiang等2007; Webster等2006)。

1.1.2 悬浮细胞表达系统 用植物全株或组织、器官表达疫苗与传统的细菌和转基因动物系统相比具有一定的优势, 但转基因植物的田间生长条件难以精确控制导致产品批次间差异和难以达到药品生产质量管理规范(good manufacturing practice, GMP)的要求, 再加上目前的技术瓶颈(表达量低、糖基修饰和下游纯化加工)和生物安全(生物和食用)的问题, 某些投资公司和研究者有放弃该系统而寻求新途径的趋势(Kaiser 2008)。植物细胞悬浮培养聚集了植物、动物和微生物表达系统的优点, 弥补了植物全株或组织、器官系统无法达到GMP要求的缺陷, 在可控的环境内生产(相对安全), 并且积累了利用该系统生产某些重要次生代谢物的成功经验, 是目前植物疫苗中的主要表达系统之一(Hellwig等2004; Rigano和Walmsley 2005)。HBsAg在烟草和大豆悬浮细胞中已获成功表达, 在大豆悬浮细胞中的表达量是鲜重的0.007%, 而烟草仅为大豆的

1/10 (Smith 等 2002; Sojikul 等 2003; Streatfield 2005a)。在培养基中添加一些物质可以提高植物悬浮细胞中靶蛋白的表达量, 聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、NaCl、布雷菲德菌素 A (brefeldin A)、明胶 (gelatin) 和聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 等可促进靶蛋白的表达水平, 提高 1.5~35 倍 (Hellwig 等 2004)。目前, 用于植物细胞悬浮培养的材料多为低尼古丁含量和生长同步性高的烟草细胞株系 NY-1 和 BY-2, 这两者可以提高靶蛋白的表达量和简化加工纯化的程序 (Kumagai-Sano 等 2006; Nocarova 和 Fischer 2009)。

单细胞的低等植物如藻类具有光合自养能力, 在适宜条件下可以快速和大量繁殖, 适于重组蛋白规模化生产和符合 GMP 标准, 近年来也被用于药用蛋白的表达系统 (Walker 等 2005)。有人已用盐藻 (*Dunallia salina*) 成功地表达了 HBsAg (Geng 等 2003)。不过, 藻类转基因后代稳定性差, 而且对蛋白加工 (修饰或折叠) 的能力有限, 易导致靶蛋白生物活性低或无活性 (Walker 等 2005)。同时, 植物悬浮细胞和藻类作为药用蛋白生产系统还需要必要的设备、可控的培养条件、价格高昂的培养基投入和有一定水平的技术人员, 都限制了其在生产中的应用。

1.1.3 叶绿体表达系统 重组蛋白 (包括疫苗) 表达量低是植物系统 (整株和细胞) 的主要瓶颈之一。虽然通过基因改造、启动子选择、与信号肽融合表达等手段使靶蛋白表达水平有所提高并实现了组织特异和定向表达 (Ni 等 1995; Sojikul 等 2003; Chen 等 2009), 但靶基因的平均表达水平仍然很低, 约占总可溶蛋白 (total soluble protein, TSP) 的 0.1%, 仅相当于叶绿体系统的 1% (Gray 等 2009)。

每个叶肉细胞约有 100 (20~200) 个叶绿体, 每个叶绿体含有约 100 个基因组, 外源基因在叶绿体系统中的表达不存在位置效应和沉默现象。由于叶绿体属于母系遗传, 不会由于花粉漂流带来环境或生态安全问题 (Daniell 等 2002; Gleba 等 2005), 近年来植物叶绿体表达系统倍受关注。迄今为止, 用叶绿体系统已成功表达了炭疽热 (anthrax) (Koya 等 2005)、非典型肺炎 (severe acute respiratory syndromes, SARS) (Li 等 2006)、肠毒素大肠杆菌

(enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC) (Garg 等 2007)、莱姆病 (lyme) (Hennig 等 2007)、人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) (Maclean 等 2007) 和阿米巴病 (amoebiasis) (Chebolu 和 Daniell 2007) 等疫苗。在此之前一直认为叶绿体与原核细胞类似, 不具有蛋白糖基修饰和正确折叠能力 (Kamarajugadda 和 Daniell 2006), 但最近的研究发现, 叶绿体也可以在转录水平上进行调控和蛋白修饰。因而认为, 叶绿体有可能成为今后很有前景的植物疫苗表达系统 (Daniell 等 2005, Vidi 等 2007)。

1.2 瞬时表达系统 (transient expression system) 迄今为止, 稳定表达系统是植物疫苗 (也包括药用蛋白) 中最常用、也是研究最深入的表达系统, 不过这些系统存在周期长、靶蛋白表达量低和生物安全等固有的缺陷 (Gleba 等 2005)。针对传染病或生物武器使用等突发事件, 为满足临床中大量疫苗或药用蛋白的需求, 仍需要开发高效和快速的表达系统。最近, 德国 Icon Genetics 公司采用 Deconstructed Virus 策略开发的集病毒 (繁殖速度快和高效表达)、农杆菌 (转化效率高) 和植物 (低成本和较高级蛋白修饰能力) 3 种生物优势于一体的 Magniflection (Marillonnet 等 2004, 2005; Gleba 等 2007; Kaiser 2008), 是一个快速 (生产毫克或克级重组蛋白只需 2 周)、高效 (外源蛋白表达量可提高 100 倍)、低成本 (未纯化重组蛋白每克 1 美元, 符合 GMP 重组蛋白每克 50 美元要求) 和相对安全 (外源蛋白表达量高, 可以在相对可控的环境内进行) 的表达系统 (Hiatt 和 Pauly 2006; Gleba 等 2007; Kaiser 2008)。Magniflection 克服了第一代完整植物病毒载体的靶蛋白小 (20~30 个氨基酸)、侵染能力差和宿主范围窄等缺点 (Gleba 等 2005, 2007), 也弥补了稳定转基因系统周期长和表达量低的缺陷。Brodzik 等 (2008) 用 Magniflection 在烟草和甜菜 (*Beta vulgaris* L.) 中高水平地表达了结肠癌抗原 (plant-derived gastrointestinal carcinoma-associated antigen, pGA733), 并成功诱导了 BALB/c 鼠免疫, 免疫鼠血清可以抑制移植结肠癌 SW948 裸鼠肿瘤细胞的生长。Golovkin 等 (2007) 用 Magniflection 在烟草和羽衣甘蓝 (*Brassica oleracea* cv. Morris Headin) 中所表达的天花重组 B5 亚基疫苗, 具有提高鼠和猪对 B5 的特异免疫功能。Magniflection 已成功用于 50 余

种药用蛋白的表达(Hiatt 和 Pauly 2006; Gleba 等 2007; Kaiser 2008), 被认为是一种很有发展前景的植物表达系统。

2 植物疫苗的研究和问题

据不完全统计, 针对近30种疾病, 迄今用植物系统已成功表达了约40种抗原。植物疫苗所涉及的植物有20余种, 包括番茄(Zhang等2006; Ramirez等2007)、莴苣(Webster等2006)、甘蓝(*Brassica oleracea* L.) (Golovkin等2007)、菠菜(Karasev等2005)、羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* cv. Morris Headin) (Golovkin等2007)、豇豆(*Vigna unguiculata* L.) (Mechtcheriakova等2006)、马铃薯(Youm等2007)、胡萝卜(Rosales-Mendoza等2008)、甜菜(Brodzik等2008)、花生(Khandelwal等2003)、烟草(Mishra等2006)、紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.) (Walker等2005)、香蕉(Kumar等2005)、番木瓜(*Carica papaya* L.) (Hernández等2007)、樱桃(*Cerasus pseudocerasus* L.) (Gao等2003)、苹果(*Malus pumila* M.) (Sandhu等1999)、大豆(*Glycine max* L.) (Moravec等2007)、水稻(*Oryza sativa* L.) (Yang等2008)、玉米(*Zea mays* L.) (Lamphear等2002; Guerrero-Andrade等2006)和藻类等低等植物(Geng等2003) (表1)。

迄今为止, 痢疾、腹泻、乙肝、狂犬病和猪肠胃炎等疾病至少已有11种植物疫苗, 如LTB (*Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit)、NVCP (norwalk virus capsid protein)抗原、HBsAg、狂犬病疫苗、猪肠胃疫苗等, 并已进入I期临床。用植物表达龋齿疫苗和家禽新城疫疫苗也分别在欧盟和美国获得批准(Streatfield 2006; Kaiser 2008; Tiwari等2009)。特别值得一提的是, 2006年世界上第一个植物源药用蛋白——乙肝抗体已在古巴研制成功并进入商业化生产(Kaiser 2008)。但是, 植物疫苗研究中的问题仍很多, 有以下几个方面。

(1)靶蛋白表达量低是植物疫苗研制中的主要技术瓶颈。优化基因(Lienard等2007; Chen等2009)、选择启动子(Nykiforuk等2006; Yang等2008)、靶向表达(Sojikul等2003; Doran 2006)、选用叶绿体表达系统和瞬时表达系统(Hennig等2007; Maclean等2007; Brodzik等2008)等技术均可提高靶蛋白的表达水平(可提高100倍) (Kaiser 2008)。不过, 此前的研究多仅从提高靶蛋白表达

量入手, 从“收支平衡”角度考虑较少(Michaud等2005; Rivard等2006)。

(2)蛋白纯化约占植物表达系统总生产成本的80% (Daniell等2005; Streatfield 2006), 靶蛋白纯化成本高是植物疫苗应用中的另一个技术问题。将靶蛋白与组氨酸标签(histidine tag)或植物油体蛋白融合表达, 可以大幅度降低纯化成本(高达90%) (Daniell等2002; Kamarajugadda和Daniell 2006), 但融合蛋白纯化后还需要考虑非靶蛋白剔除问题。口服植物疫苗可以绕开纯化环节, 因此口服植物疫苗的研制更具有吸引力(Lou等2007; Perea Arango等2008)。

(3)植物源重组蛋白的糖基修饰与动物的存在微小差异, 植物疫苗应用于人类或动物, 其免疫活性可能会受到影响(Chargelegue等2001), 还有可能导致免疫原性。因此, 植物疫苗去糖基化或糖基修饰人源化也可能成为今后一段时间内植物疫苗研究的热点之一(Larrick和Thomas 2001; Ma等2005)。

(4)植物系统表达疫苗比传统的细菌发酵或转基因动物系统(可能带有内毒素或癌原序列)要相对安全一些(Streatfield和Howard 2003), 不过基于转基因技术的植物表达系统也存在着靶基因或标记基因随着种子或花粉传播的安全隐患(Streatfield 2005b)。对此可采用雄性不育技术以抑制花粉传播和无选择标记(marker free)表达系统, 这可能是提高生物安全性的一种有效手段(Daniell等2001; Warzecha和Mason 2003)。

(5)转基因植物一般多种植在难以控制的开放环境中, 同时靶蛋白在不同种类植物、不同批次、不同个体乃至不同生育期植物中的表达量也会有差异, 因而难以达到GMP标准和通过FAD审批, 这给包括植物疫苗在内的植物药用蛋白研究增加了难度(Kaiser 2008)。因此符合GMP标准的植物悬浮细胞培养和藻类系统就成了一个很好的选择。

3 结语

植物疫苗虽然存在上述靶蛋白表达量低、纯化成本高和植物特异糖基修饰等技术问题, 但由于植物表达系统有其特有的优势, 所以植物疫苗仍然有其广阔的应用和开发前景。植物细胞壁作为天然的生物胶囊可促使细胞内疫苗能最大限度地抵抗消化道中的酸性环境和免受各种酶类对其降解

表1 植物系统表达的疫苗

疾病	病原菌	抗病蛋白	表达量或组织	植物 / 器官	免疫实验	参考文献
肠胃炎 (gastroenteritis)	newcastle disease virus (NDV)	NV-CP	64 mg rNV / 0.4 g (果实)	番茄 / 果实、马铃薯 / 块茎	喂食小鼠, 抗体反应>80%	Zhang 等 2006
	rotavirus(rv)	pBsVP6	0.28%/TSP*	紫花苜蓿 / 叶片	口服小鼠, 具有免疫性	Dong 等 2005
口蹄疫病 (FMD)	foot and mouth disease virus (FMDV)	P1-2A3C	-	番茄 / 果实	豚鼠肌肉免疫, 产生特异性抗体	Pan 等 2008
狂犬病 (Rabies)	Rabies virus	nucleoprotein	1%~5%/TSP (番茄) 45%/TSP (烟草)	番茄 / 果实 烟草 / 叶片	腹腔、口服小鼠, 腹腔产生抗体	Perea Arango 等 2008
麻疹病毒 (measles)	measles virus	MV-H	-	莴苣 / 叶片	腹腔注射, 鼻内接种小鼠, IgG 抗体滴度增加 10 倍	Webster 等 2006
天花 (smallpox)	vaccinia virus	Pb5	-	羽衣甘蓝、烟草	静脉注射小鼠、小猪	Golovkin 等 2007
囊虫病 (cysticercosis)	taenia solium	KETc	-	番木瓜 / 果实	免疫小鼠	Hernández 等 2007
肝炎 (hepatitis)	hepatitis B virus (HBV)	HBsAg	38 ng (抗原)/g (叶片干重)	香蕉 / 果实	-	Kumar 等 2005
		HBsAg	0.02%/TSP	番茄 / 果实	-	Lou 等 2007
		SS1	31.5 ng/g (种子)	水稻 / 种子	免疫小鼠	Qian 等 2008
新城疫病 (ND)	newcastle disease virus (NDV)	HBsAg	300 ng/g (叶)、10 ng/g (果实)	樱桃 / 叶和果实	口服小鼠, 具有免疫性	Gao 等 2003
		NDV-F	-	玉米 / 胚胎	口服喂食鸡, 产生抗体	Guerrero-Andrade 等 2006
艾滋病 (AIDS)	human immunodeficiency virus (HIV)	HIV-Tat	-	水稻 / 种子	腹腔免疫小鼠, 产生特异性抗体	Yang 等 2007
		HIV-NEF	0.7%/TSP	番茄 / 果实 烟草 / 叶片	黏膜免疫小鼠	Webster 等 2006 Marusic 等 2007
霍乱 (cholera)	<i>Vibrio cholerae</i>	CTB	0.081%/TSP	番茄 / 果实	罐胃免疫小鼠, 血清、黏膜产生抗体	Jiang 等 2007
腹泻 (diarrhea)	<i>Escherichia coli</i>	ETEC-LTB	0.9%/TSP (叶) 2.4%/TSP	烟草 / 叶片 大豆 / 种子	罐胃免疫小鼠, 产生黏膜抗体抗性	Mishra 等 2006 Moravec 等 2007
		CTB、LTB	-	胡萝卜 / 根	口服免疫小鼠, 血清、肠道产生抗体反应	Rosales-Mendoza 等 2008
		LTB	0.36%/TSP	西伯利亚人参 / 体细胞胚	罐胃免疫小鼠, 产生特异性抗体	Kang 等 2006
疟疾 (malaria)	<i>Plasmodium falciparum</i>	pymsp4/5	0.25%/TSP	烟草 / 叶片	口服小鼠, 产生特异性抗体	Wang 等 2008
慢性呼吸疾病 (respiratory disease)	ARV	ARV-C	0.008%/TSP	紫花苜蓿 / 叶片		Huang 等 2006
牙龈病 (periodontal diseases)	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	CTB-FimA	0.33%/TSP	马铃薯 / 块茎		Shin 等 2006

表1 植物系统表达的疫苗

续表

疾病	病原菌	抗病蛋白	表达量或组织	植物/器官	免疫实验	参考文献
炭疽病 (anthrax)	<i>Bacillus anthracis</i>	protective antigen (PA)	14.2%/TSP	烟草/叶绿体	免疫小鼠, 产生免疫反应	Koya 等 2005
兔病毒性出血症 (rabbit hemorrhagic syndrome)	rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV)	VP60	-	拟南芥/叶片	口服小鼠, 具有免疫性	Gil 等 2001
肠胃炎、心肌炎 (gastroenteritis, myocarditis)	canine parvovirus	CTB-2L21	-	烟草/叶绿体	口服小鼠, 具有免疫性	Molina 等 2004
肺结核 (tuberculosis)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Ag85B, ESAT-6	800 mg (抗原)/kg (鲜叶)	烟草/叶片	-	Dorokhov 等 2007
宫颈癌 (cervical cancer)	human papilloma virus type 16 (HPV)	HPV-16 L1	11%/TSP	烟草/叶绿体	免疫小鼠, 产生免疫反应	Maclean 等 2007
肺炎、鼠疫 (pneumonic/bubonic plague)	<i>Yersinia pestis</i>	F1-V	0.9%~4.6%/TSP	番茄/果实	口服小鼠, 具有免疫性	Alvarez 等 2006
呼吸道感染 (respiratory tract illness)	respiratory syncytial virus	RSV G RSV F	- -	烟草/叶片 苹果/叶片	- -	Yusibov 等 2005 Sandhu 等 1999
牛瘟 (rinderpest)	rinderpest virus (RPV)	RPV-H	-	花生/叶片	口服免疫牛, 产生免疫反应	Khandelwal 等 2003
破伤风 (tetanus)	<i>Clostridium tetani</i>	TetC	-	烟草/叶片	口服小鼠, 具有免疫性	Tregoning 等 2005
禽流感 (avian influenza)	avian influenza virus H5N1	influenza virus haemagglutinin antigen (HA)	-	烟草/叶片	免疫小鼠, 产生免疫反应	Shoji 等 2009
肺癌 (lung cancer)	growth factor receptor	scFv-HER2	-	烟草/叶片	-	Galeffi 等 2005
非典型肺炎 (SARS)	severe acute respiratory syndrome	S1 SARS-CoV S	0.06%/TSP -	烟草/叶片, 番茄/果实	免疫小鼠, 产生免疫反应 口服小鼠, 产生黏膜免疫反应	Pogrebnyak 等 2005 Li 等 2006
阿米巴病 (amoebiasis)	<i>Entamoeba histolytica</i>	LecA	6.3%/TSP	烟草/叶绿体	免疫小鼠, 免疫球蛋白G滴度变高	Chebolu 和 Daniell 2007
莱姆病 (lyme)	<i>Borrelia burgdorferi</i>	OspA	10%/TSP	烟草/叶绿体	-	Hennig 等 2007
结肠癌 (colorectal cancer)	human cytomegalovirus	Pga733	-	甜菜、烟草/叶片	免疫小鼠, 产生免疫反应	Brodzik 等 2008

*TSP: 总可溶蛋白(total soluble protein)。

(Streatfield 2006; Kamarajugadda和Daniell 2006), 用番茄或香蕉等植物系统表达疫苗毋需纯化, 可以直接食用而实现黏膜免疫, 这对口服植物疫苗的研发提供了方便。古巴成功研制的第一个植物源药用蛋白——乙肝抗体的商业化(Kaiser 2008), 已为植物疫苗研究带来了希望。可以预见, 口服植物疫苗有可能作为植物生物反应器的产品而进入商业化生产, 其在动物中的应用可能会早于人类中的应用。

转基因植物的安全性问题在欧、美争议最多, 但在全球经济最困难时期欧美政府仍然大量投资开展这一领域开发和基础研究。2008年, 欧盟拨款1 200万欧元资助在玉米和烟草中表达抗HIV抗原的研制工作, 预计2009年可以进入田间实验。美国政府也拨款1 400万美元用于炭疽热和温疫的植物疫苗研制(Kaiser 2008), 我国似乎也应对此给予关注, 并尽早进行研究。

参考文献

- Alvarez ML, Pinyerd HL, Crisantes JD, Rigano MM, Pinkhasov J, Walmsley AM, Mason HS, Cardineau GA (2006). Plant-made subunit vaccine against pneumonic and bubonic plague is orally immunogenic in mice. *Vaccine*, 24 (14): 2477~2490
- Barquet N, Domingo P (1997). Smallpox: the triumph over the most terrible of the ministers of death. *Ann Intern Med*, 127 (8): 635~642
- Bouche FB, Marquet-Blouin E, Yanagi Y, Steinmetz A, Muller CP (2003). Neutralising immunogenicity of a polyepitope antigen expressed in a transgenic food plant: a novel antigen to protect against measles. *Vaccine*, 21 (17-18): 2065~2072
- Brodzik R, Spitsin S, Golovkin M, Bandurska K, Portocarrero C, Okulicz M, Steplewski Z, Koprowski H (2008). Plant-derived EpCAM antigen induces protective anti-cancer response. *Cancer Immunol Immunother*, 57: 317~323
- Chargelegue D, Obregon P, Drake PMW (2001). Transgenic plants for vaccine production: expectations and limitations. *Trends Plant Sci*, 6 (11): 495~496
- Chebolu S, Daniell H (2007). Stable expression of Gal/GalNAc lectin of entamoeba histolytica in transgenic chloroplasts and immunogenicity in mice towards vaccine development for amoebiasis. *Plant Biotechnol J*, 5 (2): 230~239
- Chen Y, Wang A, Zhao L, Shen G, Cui L, Tang K (2009). Expression of thymosin α 1 concatemer in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits. *Biotechnol Appl Biochem*, 52: 303~312
- Curtiss RIII, Cardineau CA (1990). Oral immunization by transgenic plants. *World Patent App*, WO 1990/002484
- Daniell H, Chebolu S, Kumar S, Singleton M, Falconer R (2005). Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. *Vaccine*, 23 (15): 1779~1783
- Daniell H, Khan MS, Allison L (2002). Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci*, 7 (2): 84~91
- Daniell H, Muthukumar B, Lee SB (2001). Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr Genet*, 39 (2): 109~116
- Dong JL, Liang BG, Jin YS, Zhang WJ, Wang T (2005). Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology*, 339 (2): 153~163
- Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA (1997). DNA vaccine. *Annu Rev Immunol*, 15: 617~648
- Doran PM (2006). Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends Biotechnol*, 24 (9): 426~432
- Dorokhov YL, Sheveleva AA, Frolova OY, Komarova TV, Zvereva AS, Ivanov PA, Atabekov JG (2007). Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves. *Tuberculosis*, 87 (3): 218~224
- Eyler JM (2003). Smallpox in history: the birth, death, and impact of a dread disease. *J Lab Clin Med*, 142: 216~220
- Galeffi P, Lombardi A, Donato MD, Latini A, Sperandei M, Cantale C, Giacomini P (2005). Expression of single-chain antibodies in transgenic plants. *Vaccine*, 23 (15): 1823~1827
- Gao Y, Ma Y, Li M, Cheng T, Li SW, Zhang J, Xia NS (2003). Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing HBsAg. *World J Gastroenterol*, 9: 996~1002
- Garg R, Tolbert M, Oakes JL, Clemente TE, Bost KL, Piller KJ (2007). Chloroplast targeting of FanC, the major antigenic subunit of *Escherichia coli* K99 fimbriae, in transgenic soybean. *Plant Cell Rep*, 26 (7): 1011~1023
- Geng D, Wang Y, Wang P, Li W, Sun Y (2003). Stable expression of hepatitis B surface antigen in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J Appl Phycol*, 15: 451~456
- Gil F, Brun A, Wigdorovitz A, Catalá R, Martínez-Torrecuadrada JL, Casal I, Salinas J, Borca MV, Escribano JM (2001). High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants. *FEBS Lett*, 488: 13~17
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2005). Magniflection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*, 23: 2042~2048
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol*, 18: 134~141
- Golovkin M, Spitsin S, Andrianov V, Smirnov Y, Xiao Y, Pogrebnyak N, Markley K, Brodzik R, Gleba Y, Isaacs SN, Koprowski H (2007). Smallpox subunit vaccine produced in planta confers protection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (16): 6864~6869
- Gray BN, Ahner BA, Hanson MR (2009). High-level bacterial cellulase accumulation in chloroplast-transformed tobacco mediated by downstream box fusions. *Biotechnol Bioeng*, 102: 1045~1054
- Guerrero-Andrade O, Loza-Rubio E, Olivera-Flores T, Fehérvári-Bone T, Gómez-Lim MA (2006). Expression of the newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies. *Transgenic Res*, 15 (4): 455~463
- Hellwig S, Drossard J, Twyman RM, Fischer R (2004). Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat Biotechnol*, 22: 1415~1422
- Hennig A, Bonfig K, Roitsch T, Warzecha H (2007). Expression of the recombinant bacterial outer surface protein A in tobacco chloroplasts leads to thylakoid localization and loss of photosynthesis. *FEBS J*, 274 (21): 5749~5758
- Hernández M, Cabrera-Ponce JL, Fragoso G, López-Casillas F, Guevara-García A, Rosas G, León-Ramírez C, Juárez P, Sánchez-García G, Cervantes J et al (2007). A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine*, 25 (21): 4252~4260
- Hiatt A, Pauly M (2006). Monoclonal antibodies from plants: a

- new speed record. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 14645~14646
- Huang LK, Liao SC, Chang CC, Liu HJ (2006). Expression of avian reovirus sigmaC protein in transgenic plants. *J Virol Methods*, 134 (1-2): 217~222
- Jiang XL, He ZM, Peng ZQ, Qi Y, Chen Q, Yu SY (2007). Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice. *Transgenic Res*, 16 (2): 169~175
- Kaiser J (2008). Is the drought over for pharming? *Science*, 320: 473~475
- Kamarajugadda S, Daniell H (2006). Chloroplast-derived anthrax and other vaccine antigens: their immunogenic and immunoprotective properties. *Exp Rev Vaccines*, 5 (6): 839~849
- Kang TJ, Lee WS, Choi EG, Kim JW, Kim BG, Yang MS (2006). Mass production of somatic embryos expressing *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in Siberian ginseng. *J Biotechnol*, 121 (2): 124~133
- Karasev AV, Foulke S, Wellens C, Rich A, Shon KJ, Zwierzynski I, Hone D, Koprowski H, Reitz M (2005). Plant based HIV-1 vaccine candidate: tat protein produced in spinach. *Vaccine*, 23 (15): 1875~1880
- Khandelwal A, Sita GL, Shaila MS (2003). Oral immunization of cattle with hemagglutinin protein of rinderpest virus expressed in transgenic peanut induces specific immune responses. *Vaccine*, 21: 3282~3289
- Komarnytsky S, Gaume A, Garvey A, Borisjuk N, Raskin I (2004). A quick and efficient system for antibiotic-free expression of heterologous genes in tobacco roots. *Plant Cell Rep*, 22: 765~773
- Koya V, Moayeri M, Leppla SH, Daniell H (2005). Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. *Infect Immunol*, 73 (12): 8266~8274
- Kumagai-Sano F, Hayashi T, Sano T, Hasezawa S (2006). Cell cycle synchronization of tobacco BY-2 cell. *Nat Protoc*, 1: 2621~2627
- Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Srinivas L, Bapat VA (2005). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. *Planta*, 222 (3): 484~493
- Kumar GBS, Ganapathi TR, Srinivas L, Revathi CJ, Bapat VA (2006). Expression of hepatitis B surface antigen in potato hairy roots. *Plant Sci*, 170: 918~925
- Lal P, Ramachandran VG, Goyal R, Sharma R (2007). Edible vaccines: current status and future. *Indian J Med Microbiol*, 25 (2): 93~102
- Lamphear BJ, Streatfield SJ, Jilka JM, Brooks CA, Barker DK, Turner DD, Delaney DE, Garcia M (2002). Delivery of subunit vaccines in maize seed. *J Control Release*, 85 (1-3): 169~180
- Larrick JW, Thomas DW (2001). Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr Opin Biotechnol*, 12: 411~418
- Li HY, Ramalingam S, Chye ML (2006). Accumulation of recombinant SARS-CoV spike protein in plant cytosol and chloroplasts indicate potential for development of plant-derived oral vaccines. *Exp Biol Med*, 231: 1346~1352
- Liénard D, Sourrouille C, Gomord V, Faye L (2007). Pharming and transgenic plants. *Biotechnol Annu Rev*, 13: 115~147
- Lou XM, Yao QH, Zhang Z, Peng RH, Xiong AS, Wang HK (2007). Expression of the human hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants. *Clin Vaccine Immunol*, 14 (4): 464~469
- Ma JK, Drake PM, Chargelegue D, Obregon P, Prada A (2005). Antibody processing and engineering in plants, and new strategies for vaccine production. *Vaccine*, 23 (15): 1814~1818
- Maclean J, Koekemoer M, Olivier AJ, Stewart D, Hitzeroth II, Rademacher T, Fischer R, Williamson AL, Rybicki EP (2007). Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *J Gen Virol*, 88 (5): 1460~1469
- Marillonnet S, Giritich A, Gils M, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y (2004). In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (18): 6852~6857
- Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y (2005). Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol*, 23: 718~723
- Marusic C, Nuttall J, Buriani G, Lico C, Lombardi R, Baschieri S, Benvenuto E, Frigerio L (2007). Expression, intracellular targeting and purification of HIV Nef variants in tobacco cells. *BMC Biotechnol*, 7: 12
- Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89 (24): 11745~11749
- Mason HS, Tacket CO, Richter LJ, Arntzen CJ (1998). Subunit vaccines produced and delivered in transgenic plants as "edible vaccines". *Res Immunol*, 149 (1): 71~74
- Mechtcheriakova IA, Eldarov MA, Nicholson L, Shanks M, Skryabin KG, Lomonosoff GP (2006). The use of viral vectors to produce hepatitis B virus core particles in plants. *J Virol Methods*, 131 (1): 10~15
- Michaud D, Anguenot R, Brunelle F (2005). Method for increasing protein content in plant cells. *US Patent App*, 2005/0055746
- Mishra S, Yadav DK, Tuli R (2006). Ubiquitin fusion enhances cholera toxin B subunit expression in transgenic plants and the plant-expressed protein binds GM1 receptors more efficiently. *J Biotechnol*, 127 (1): 95~108

- Molina A, Hervás-Stubbs S, Daniell H, Mingo-Castel AM, Veramendi J (2004). High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnol J*, 2: 141~153
- Moravec T, Schmidt MA, Herman EM, Woodford-Thomas T (2007). Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine*, 25 (9): 1647~1657
- Ni M, Cui D, Einstein J, Narasimulu S, Vergara CE, Gelvin SB (1995). Strength and tissue specificity of chimeric promoters derived from the octopine and mannopine synthase genes. *Plant J*, 7: 661~676
- Nocarova E, Fischer L (2009). Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression. *BMC Plant Biol*, doi: 10.1186/1471-2229-9-44
- Nykiforuk CL, Boothe JG, Murray EW, Keon RG, Goren HJ, Markley NA, Moloney MM (2006). Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Biotechnol J*, 4 (1): 77~85
- Pan L, Zhang Y, Wang Y, Wang B, Wang W, Fang Y, Jiang S, Lv J, Wang W, Sun Y, Xie Q (2008). Foliar extracts from transgenic tomato plants expressing the structural polyprotein, P1-2A, and protease, 3C, from foot-and-mouth disease virus elicit a protective response in guinea pigs. *Vet Immunol Immunopathol*, 121 (1-2): 83~90
- Parmenter DL, Boothe JG, van Rooijen GJ, Yeung EC, Moloney MM (1995). Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. *Plant Mol Biol*, 29 (6): 1167~1180
- Perea Arango I, Loza Rubio E, Rojas Anaya E, Olivera Flores T, Gonzalez de la Vara L, Gómez Lim MA (2008). Expression of the rabies virus nucleoprotein in plants at high-levels and evaluation of immune responses in mice. *Plant Cell Rep*, 27 (4): 677~685
- Pogrebnyak N, Golovkin M, Andrianov V, Spitsin S, Smirnov Y, Egolf R, Koprowski H (2005). Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 9062~9067
- Qian B, Shen H, Liang W, Guo X, Zhang C, Wang Y, Li G, Wu A, Cao K, Zhang D (2008). Immunogenicity of recombinant hepatitis B virus surface antigen fused with preS1 epitopes expressed in rice seeds. *Transgenic Res*, 17 (4): 621~631
- Ramírez YJ, Tasciotti E, Gutierrez-Ortega A, Donayre Torres AJ, Olivera Flores MT, Giacca M, Gómez Lim MA (2007). Fruit-specific expression of the human immunodeficiency virus type 1 tat gene in tomato plants and its immunogenic potential in mice. *Clin Vaccine Immunol*, 14 (6): 685~692
- Rigano MM, Walmsley AM (2005). Expression systems and developments in plant-made vaccines. *Immunol Cell Biol*, 83 (3): 271~277
- Rivard D, Anguenot R, Brunelle F, Le VQ, Vezina LP, Trepanier S, Michaud D (2006). An in-built proteinase inhibitor system for the protection of recombinant proteins recovered from transgenic plants. *Plant Biotechnol J*, 4: 359~368
- Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, López-Revilla R, Moreno-Fierros L, Alpuche-Solis AG (2008). Ingestion of transgenic carrots expressing the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge. *Plant Cell Rep*, 27 (1): 79~84
- Rybicki EP (2009). Plant-produced vaccines: promise and reality. *Drug Discov Today*, 14: 16~24
- Sandhu JS, Osadjan MD, Krasnyanski SF, Domier LL, Korban SS, Buetow DE (1999). Enhanced expression of the human respiratory syncytial virus-F gene in apple leaf protoplasts. *Plant Cell Rep*, 18: 394~397
- Schillberg S, Fischer R, Emans N (2003). Molecular farming of antibodies in plants. *Cell Mol Life Sci*, 60 (3): 433~445
- Schryvers AB, Hutchins WA, Moloney MM, Alcantara J (2006). Use of plant oil-bodies in vaccine delivery systems. *US Patent App*, 2006/0233816
- Shin EA, Lee JY, Kim TG, Park YK, Langridge WH (2006). Synthesis and assembly of an adjuvanted *Porphyromonas gingivalis* fimbrial antigen fusion protein in plants. *Protein Exp Purif*, 47 (1): 99~109
- Shoji Y, Farrance CE, Bi H, Shamloul M, Green B, Manceva S, Rhee A, Ugulava N, Roy G, Musiychuk K et al (2009). Immunogenicity of hemagglutinin from A/Bar-headed Goose/Qinghai/1A/05 and A/Anhui/1/05 strains of H5N1 influenza viruses produced in *Nicotiana benthamiana* plants. *Vaccine*, 27 (25-26): 3467~3470
- Smith ML, Mason HS, Shuler ML (2002). Hepatitis B surface antigen (HBsAg) expression in plant cell culture: kinetics of antigen accumulation in batch culture and its intracellular form. *Biotechnol Bioeng*, 80 (7): 812~822
- Sojikul P, Buehner N, Mason HS (2003). A plant signal peptide-hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 2209~2214
- Streatfield SJ (2005a). Oral hepatitis B vaccine candidates produced and delivered in plant material. *Immunol Cell Biol*, 83 (3): 257~262
- Streatfield SJ (2005b). Regulatory issues for plant-made pharmaceuticals and vaccines. *Exp Rev Vaccines*, 4 (4): 591~601
- Streatfield SJ (2006). Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methods*, 38 (2): 150~157
- Streatfield SJ, Howard JA (2003). Plant production systems for vaccines. *Exp Rev Vaccines*, 2 (6): 763~775
- Tiwari S, Verma PC, Singh PK, Tuli R (2009). Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnol Adv*, 27:

- 449~467
- Tregoning JS, Clare S, Bowe F, Edwards L, Fairweather N, Qazi O, Nixon PJ, Maliga P, Dougan G, Hussell T (2005). Protection against tetanus toxin using a plant-based vaccine. *Eur J Immunol*, 35 (4): 1320~1326
- Tzen JT, Huang AH (1992). Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *J Cell Biol*, 117 (2): 327~335
- Vidi PA, Kessler F, Br  h  lin C (2007). Plastoglobules: a new address for targeting recombinant proteins in the chloroplast. *BMC Biotechnol*, 7: 4
- Walker TL, Purton S, Becker DK, Collet C (2005). Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Rep*, 24 (11): 629~641
- Wang L, Webster DE, Campbell AE, Dry IB, Wesselingh SL, Coppel RL (2008). Immunogenicity of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 4/5 produced in transgenic plants. *Int J Parasitol*, 38 (1): 103~110
- Warzecha H, Mason HS (2003). Benefits and risks of antibody and vaccine production in transgenic plants. *J Plant Physiol*, 160 (7): 755~764
- Webster DE, Smith SD, Pickering RJ, Strugnell RA, Dry IB, Wesselingh SL (2006). Measles virus hemagglutinin protein expressed in transgenic lettuce induces neutralising antibodies in mice following mucosal vaccination. *Vaccine*, 24 (17): 3538~3544
- Yang L, Kajiura H, Suzuki K, Hirose S, Fujiyama K, Takaiwa F (2008). Generation of a transgenic rice seed-based edible vaccine against house dust mite allergy. *Biochem Biophys Res Commun*, 365 (2): 334~339
- Yang ZQ, Liu QQ, Pan ZM, Yu HX, Jiao XA (2007). Expression of the fusion glycoprotein of newcastle disease virus in transgenic rice and its immunogenicity in mice. *Vaccine*, 25 (4): 591~598
- Youm JW, Won YS, Jeon JH, Ryu CJ, Choi YK, Kim HC, Kim BD, Joung H, Kim HS (2007). Oral immunogenicity of potato-derived HBsAg middle protein in BALB/c mice. *Vaccine*, 25 (3): 577~584
- Yusibov V, Mett V, Mett V, Davidson C, Musiychuk K, Gilliam S, Farese A, Macvittie T, Mann D (2005). Peptide-based candidate vaccine against respiratory syncytial virus. *Vaccine*, 23: 2261~2265
- Zhang X, Buehner NA, Hutson AM, Estes MK, Mason HS (2006). Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. *Plant Biotechnol J*, 4 (4): 419~432