

· 综 述 ·

# 植物中表达口蹄疫病毒抗原研究进展

蔡玉婷<sup>1</sup>, 茹毅<sup>2</sup>, 孙坤<sup>1</sup>, 张继<sup>1,3</sup>, 吴建平<sup>1,3</sup>, 李丹<sup>2</sup>, 冯汉青<sup>1,3\*</sup>

1 西北师范大学, 甘肃 兰州 730070

2 中国农业科学院兰州兽医研究所, 甘肃 兰州 730046

3 西北师范大学新农村发展研究院, 甘肃 兰州 730070

蔡玉婷, 茹毅, 孙坤, 张继, 吴建平, 李丹, 冯汉青. 植物中表达口蹄疫病毒抗原研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1548-1561.

CAI Yuting, RU Yi, SUN Kun, ZHANG Ji, WU Jianping, LI Dan, FENG Hanqing. Expression of antigens of foot-and-mouth disease virus in plants: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1548-1561.

**摘 要:** 口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的一种急性、烈性、高度接触性传染病, 严重危害畜牧养殖业健康发展。口蹄疫灭活疫苗是口蹄疫防控的主导产品, 为控制口蹄疫流行起到了重要作用; 但是也存在抗原不稳定、在生产制备过程中存在因病毒灭活不彻底而散毒的风险、生产成本较高等问题。与传统的微生物和动物生物反应器相比, 通过转基因技术以植物作为生物反应器生产抗原蛋白, 具有成本低廉、安全便捷、易于储运等一些优势, 且无需蛋白提取纯化过程, 可直接食用免疫; 但也存在着表达量低、控制性差等问题。因此, 通过植物生物反应器表达口蹄疫病毒抗原蛋白, 可能是一种具有一定优势但仍需不断优化的疫苗生产手段。本文综述了在植物中表达活性蛋白的主要策略, 以及通过植物生物反应器表达口蹄疫病毒抗原蛋白的研究进展, 并讨论了目前面临的问题与挑战, 以为相关工作提供一定的借鉴和参考。

**关键词:** 植物生物反应器; 口蹄疫; 表达系统; 可饲疫苗

资助项目: 甘肃省重点研发计划(22YF7NA119); 甘肃省高等学校产业支撑计划项目; 甘肃省科技重大专项(22ZD1NA001); 甘肃省引导科技创新发展专项资金(2019ZX-05); 西北师范大学新农村发展研究院开放基金

This work was supported by the Key Research and Development Project of Gansu Province (22YF7NA119), the Industrial Support Project of Colleges and Universities of Gansu Province, the Major Project of Science and Technology Plan of Gansu Province (22ZD1NA001), the Special Fund for Guiding Scientific and Technological Innovation Development of Gansu Province (2019ZX-05), and the Open Fund of New Rural Development Institute of Northwest Normal University and the Key Research.

\*Corresponding author. E-mail: fenghanq@nwnu.edu.cn

Received: 2022-09-01; Accepted: 2022-12-21; Published online: 2023-01-03

# Expression of antigens of foot-and-mouth disease virus in plants: a review

CAI Yuting<sup>1</sup>, RU Yi<sup>2</sup>, SUN Kun<sup>1</sup>, ZHANG Ji<sup>1,3</sup>, WU Jianping<sup>1,3</sup>, LI Dan<sup>2</sup>, FENG Hanqing<sup>1,3\*</sup>

1 Northwest Normal University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Lanzhou 730046, Gansu, China

3 New Rural Development Research Institute, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, Gansu, China

**Abstract:** Foot-and-mouth disease (FMD) is an acute, severe, and highly contagious infectious disease caused by foot-and-mouth disease virus (FMDV), which seriously endangers the development of animal husbandry. The inactivated FMD vaccine is the main product for the prevention and control of FMD, which has been successfully applied to control the pandemic and outbreak of FMD. However, the inactivated FMD vaccine also has problems, such as the instability of antigen, the risk of spread of the virus due to incomplete inactivation during vaccine production, and the high cost of production. Compared with traditional microbial and animal bioreactors, production of antigens in plants through transgenic technology has some advantages including low cost, safety, convenience, and easy storage and transportation. Moreover, since antigens produced from plants can be directly used as edible vaccines, no complex processes of protein extraction and purification are required. But, there are some problems for the production of antigens in plants, which include low expression level and poor controllability. Thus, expressing the antigens of FMDV in plants may be an alternative mean for production of FMD vaccine, which has certain advantages but still need to be continuously optimized. Here we review the main strategies for expressing active proteins in plants, as well as the research progress on the expression of FMDV antigens in plants. We also discuss the current problems and challenges encountered, with the aim to facilitate related research.

**Keywords:** plant bioreactor; foot-and-mouth disease; expression system; edible vaccines

传统上, 活性蛋白的体外生产通常采用细菌、酵母和哺乳动物细胞等体外表达系统。目前, 通过转基因在植物中表达活性蛋白的技术获得了广泛关注。口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的一种急性、烈性、高度接触性传染病<sup>[1]</sup>, 主要感染猪、牛、羊等偶蹄类动物, 其暴发和流行给全世界带来严重的经济损失。疫苗免疫是防治 FMD 的有效方法, 但传统的灭活疫苗存在因病毒灭活不彻底带来病原传播的生物安全隐患。通过体外表达系统表达病原的抗原

蛋白是目前较为安全的疫苗抗原生产手段。较之其他种类的细胞, 植物细胞兼具能使所表达抗原蛋白正确折叠修饰、安全性高、生产成本低、易于存储运输等多种优势; 且具有直接作为可饲(或口服)疫苗的可能性。近年来, 植物中表达 FMDV 抗原已经取得了一系列重要的进展, 本文对该方向的研究进行了介绍和综述, 以期相关工作提供一定的借鉴和参考。

## 1 口蹄疫研究背景

FMD 由于其对家畜养殖产业带来严重的

威胁被世界动物卫生组织列为“A 类动物传染病名单”之首。FMDV 属于小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属,分为 O 型、A 型、C 型、SAT1 型、SAT2 型、SAT3 型和亚洲 I 型 7 个血清型,每个血清型又可进一步划分为多个亚型。全球大部分地区均暴发过 FMD, 流行最广泛的为 O 型,我国主要以 O 型和 A 型较为常见<sup>[2]</sup>。不同血清型病毒所引起的症状基本相同,但不同血清型之间无交叉免疫。

FMDV 的 RNA 基因组全长约为 8.5 kb,由 5'非翻译区(5' untranslated regions, 5'UTR)、开放阅读框架(open reading framework, ORF)和 3'非翻译区(3'UTR)组成,尾部有 PolyA 区(图 1)。ORF 长约 7.0 kb,由 L<sup>pro</sup>、P1、P2 和 P3 四个编码区段组成。其中, P1 编码的蛋白在后期的翻译和修饰过程中被 3C<sup>pro</sup> 蛋白裂解为 1A (VP4)、1B (VP2)、1C (VP3)、1D (VP1),并由此组成病毒衣壳<sup>[4]</sup>。

电子显微镜观察显示, FMDV 颗粒呈圆形,直径约 27–30 nm (图 2A)。病毒粒子无囊膜,呈二十面体对称,由蛋白衣壳包裹基因组 RNA 组成。VP1、VP2、VP3 和 VP4 各一个分子组成一个原粒(图 2B、2C), 5 个原粒组成一个五聚体(图 2D、2E), 12 个五聚体构成完整病毒衣

壳。其中 VP1–3 位于病毒粒子表面, VP4 位于内部。表面结构蛋白 VP1、VP2 和 VP3 的立体结构相似,由 8 个链状  $\beta$  折叠桶组成(图 2F),  $\beta$  折叠桶之间由表面环(surface loops)结构所连接,表面环含有 FMDV 重要的抗原表位(epitope)。VP1 是最保守的 FMDV 蛋白,可诱导免疫反应产生 FMDV 的中和抗体<sup>[1]</sup>。VP1 的  $\beta$ G 和  $\beta$ H 之间的 GH 环(G-H loop)含有 FMDV 最重要的抗原中和表位并含有识别整合素(integrin)受体的基序(图 2G、2H)。

## 2 利用植物作为生物反应器生产活性蛋白的主要策略

### 2.1 稳定表达

#### 2.1.1 稳定核表达

该策略是将编码活性蛋白的基因稳定整合到植物的核基因组中,从而通过目的基因的转录和翻译实现活性蛋白质的表达,并可获得可稳定遗传的转基因植株<sup>[6]</sup>。目前应用最广泛的植物稳定核表达方法是农杆菌介导转化法:即将目的基因整合到农杆菌 Ti 质粒的 T-DNA 中,将携带该 Ti 质粒的农杆菌对植物的生殖细胞(或体细胞)进行侵染;将被侵染的生殖细胞产生

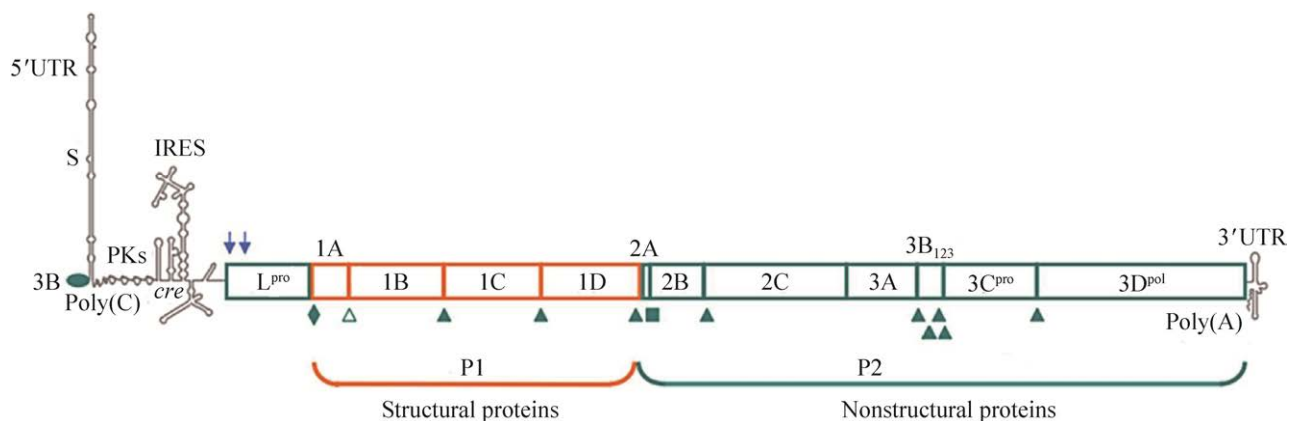


图 1 FMDV 基因组结构示意图<sup>[3]</sup>

Figure 1 Schematic diagram of FMDV genome structure<sup>[3]</sup>.

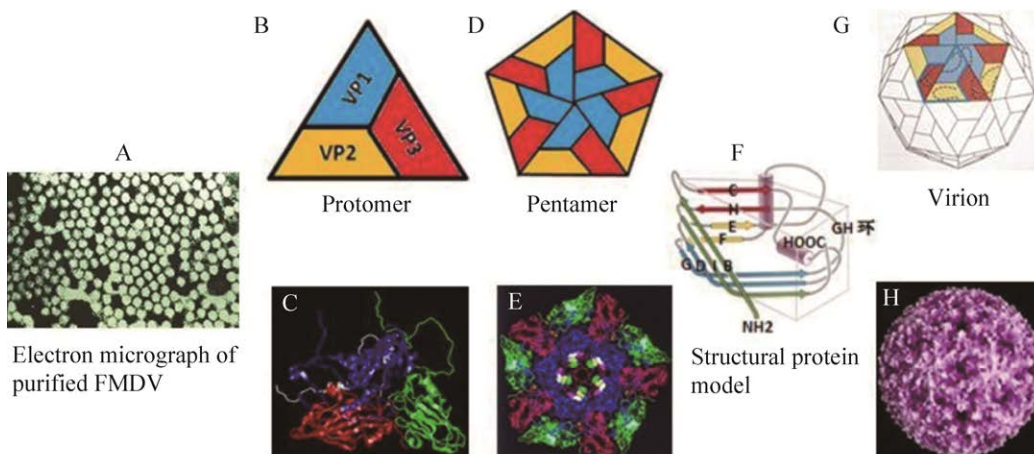


图 2 FMDV 结构示意图<sup>[5]</sup> A: 纯化的 FMD 病毒粒子的电子显微照片. B–C: 由 VP1、VP2、VP3 和 VP4 组成的原粒, 其中 VP4 位于内部. D–E: 5 个原粒组成五聚体. F: 病毒表面结构蛋白结构示意图. G–H: 12 个五聚体组成的病毒粒子衣壳

Figure 2 Schematic diagram of FMDV structure<sup>[5]</sup>. A: Electron micrograph of purified FMD virions. B–C: Protomers composed of VP1, VP2, VP3 and VP4 molecules, in which VP4 is located inside. D–E: Polymer composed of five protomers. F: Schematic diagram of the structural proteins on viral surface. G–H: Twelve pentamers make up the virion capsid.

的种子培育为后代植株(或将被侵染的体细胞培育成外植体), 从而获得稳定转化并可遗传的转基因植株(图 3)<sup>[7]</sup>。然而, 该方法也具有一些明显的缺点, 包括遗传过程中的基因沉默、容易导致转基因污染、遗传操作过程耗时等<sup>[8]</sup>。

### 2.1.2 稳定的叶绿体表达

该策略是通过基因枪或者显微注射等技术将目的基因转入到叶绿体基因组中, 并通过外植体再生和筛选形成可遗传的转基因植株(图 3)。与核转化相比, 叶绿体转化具有许多优势: 因为借助同源重组将目的基因插入叶绿体基因组的特定位点中, 提高了整合效率; 特异性靶向插入也防止了基因转入到转录活性较低的区域, 确保了高水平的表达<sup>[9]</sup>; 因为叶绿体拷贝数量高, 通过叶绿体表达可极大提高活性蛋白的产量<sup>[9]</sup>; 叶绿体基因属母系遗传, 叶绿体中表达的基因降低了基因逃逸的风险<sup>[10]</sup>。

## 2.2 瞬时表达

瞬时基因表达是在外源基因没有整合在基

因组的情况下, 即可实现目的蛋白表达的方法。目前, 常用瞬时基因表达的方法是将目的基因整合到农杆菌 Ti 质粒的 T-DNA 中, 将携带该 Ti 质粒的农杆菌对植物体细胞进行侵染或真空渗透, 使 T-DNA 转移到植物的细胞核中; 尽管大部分转移到核中的 T-DNA 并没有整合到植物的基因组中, 但是可以在短期内借助植物细胞的转录和翻译系统将目的基因表达为蛋白质, 因此可以在很短的时间内实现蛋白质的表达<sup>[11]</sup>。另一种植物瞬时表达的方法是利用植物的病毒载体, 即将外源基因整合到植物病毒载体中, 在接种和侵染植物后, 这些病毒载体可以在细胞质中或者在细胞核中自我复制并进行基因的表达, 从而实现外源基因的拷贝数的增加和快速表达<sup>[12]</sup>。此外, 病毒载体还能在植株中系统性传播, 进一步增加了外源基因在植株中拷贝数量(图 3)<sup>[13]</sup>。笔者课题组近期的研究表明, 基于菜豆黄矮病毒的复制型载体可以显著提高外源基因在植物中的瞬时表达水平<sup>[14-15]</sup>。

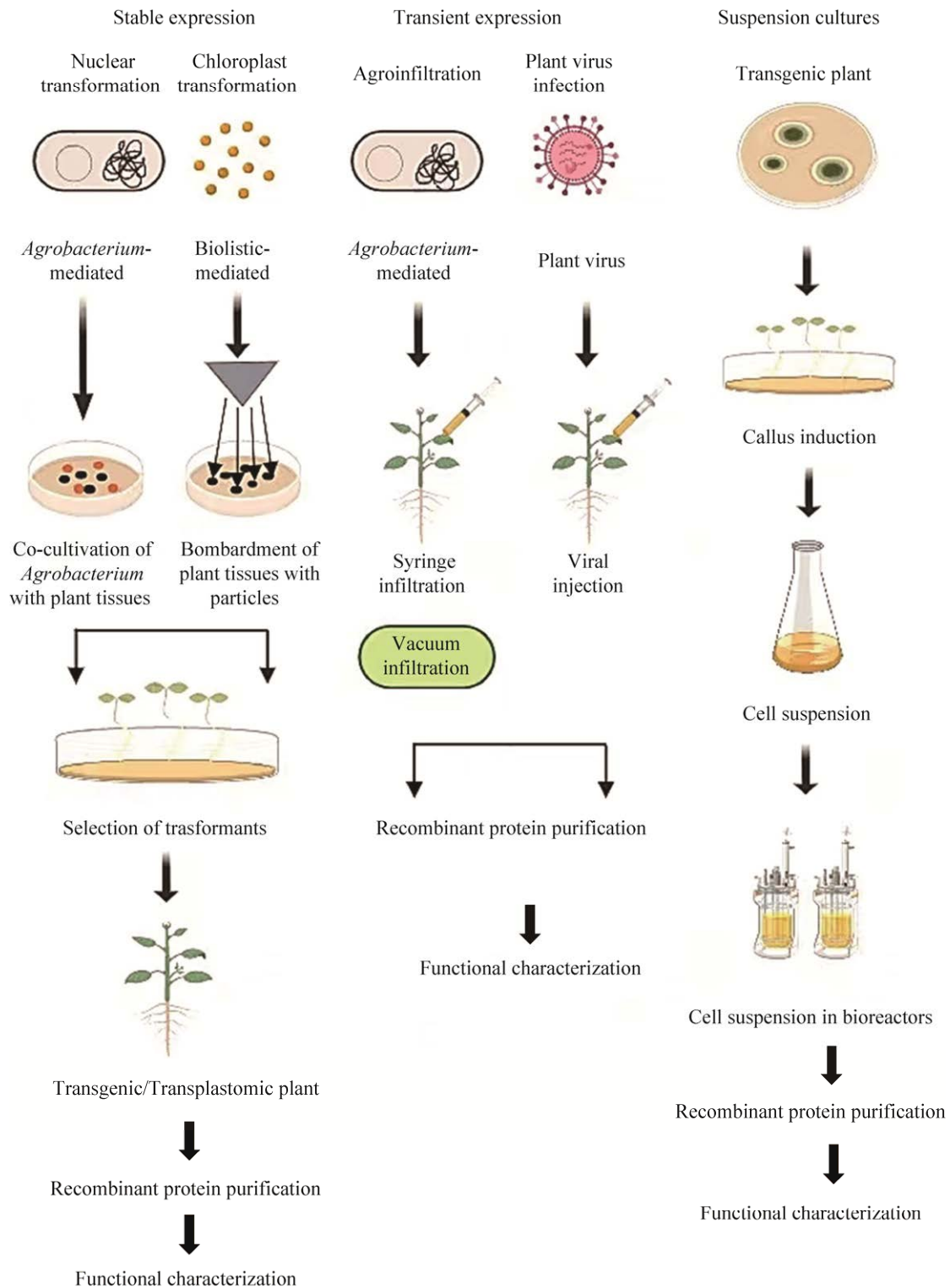


图3 基于植物生产活性蛋白的主要策略示意图<sup>[20]</sup>

Figure 3 Schematic representation of main technologies for the production of functional proteins in plants<sup>[20]</sup>.

但是,植物病毒载体也具有稳定性差、生物安全性低等问题<sup>[16]</sup>。

### 2.3 悬浮细胞表达

基因枪和农杆菌介导的转化方法也可适用于植物的悬浮细胞。而且,较之使用植株,利用悬浮植物细胞作为生物反应器生产活性蛋白具有一些独特的优势:植物悬浮细胞在完全可控的无菌条件下生长,易于扩大规模,符合药品生产质量管理规范(good manufacturing practice of medical products, GMP)和生物制剂的生产规范(图 3)<sup>[17]</sup>。此外,与植株培养相比,植物悬浮细胞的培养只需要简单的培养基,脱离了对土壤、阳光等环境因素的依赖性,因此其生产成本更低<sup>[18]</sup>。同时,较之植物植株,悬浮细胞没有复杂的组织结构,因此其生产的活性蛋白的下游纯化和加工也更加简单。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的第一个植物源治疗戈谢病药物 taliglucerase- $\alpha$  就是在胡萝卜悬浮细胞培养中生产的,其将传统治疗成本降低了 75%<sup>[19]</sup>。

## 3 植物中表达 FMDV 抗原的研究进展

目前,FMD 灭活疫苗是预防 FMD 最为有效的工具,但其也存在着病毒灭活不彻底从而传播 FMD 的潜在危险。

通过体外表达系统表达抗原蛋白,是目前生产疫苗最为安全的手段。包括笔者课题组在内的多个研究团队在大肠杆菌、酵母、昆虫细胞、哺乳动物等不同的细胞类型中进行了 FMDV 抗原蛋白的表达,极大提高了 FMD 疫苗的安全性<sup>[21-23]</sup>:其中,最为早期的工作是 Kleid 等<sup>[24]</sup>首次应用重组 DNA 技术在大肠杆菌中表达了 VP1 蛋白,由此成功制备了 FMD 亚

单位疫苗;Jung 等<sup>[25]</sup>继而通过对菌种和温度的优化,实现了 FMDV 的 VP1 蛋白在大肠杆菌中的高水平表达,并在家兔中诱导产生了免疫反应;Li 等<sup>[26]</sup>在大肠杆菌中表达了同时携带 FMDV 和 II 型猪圆环病毒(porcine circovirus II, PCV2)表位的重组蛋白,从而研制出一种能同时有效保护猪免受 PCV2 和 FMDV 感染的疫苗。金华利等<sup>[27]</sup>利用毕赤酵母表达了 O 型 FMDV 的 VP1 蛋白,并用其免疫小鼠,证明表达产物可刺激小鼠产生特异性体液和细胞免疫应答。许多学者也通过昆虫细胞/杆状病毒表达系统成功表达了 VP1 蛋白并检测其免疫原性<sup>[28-30]</sup>。此外,有学者在 Vero 细胞、树突状细胞等真核表达系统中通过稳定或瞬时表达产生了 VP1 蛋白<sup>[31-32]</sup>,进一步推动了 FMD 亚单位疫苗的研发。

较之上述种类的细胞,植物细胞作为生物反应器表达抗原蛋白主要具有以下优势。

(1) 植物具有完整的真核细胞表达系统,其基因表达产物可通过糖基化、酰胺化、磷酸化完成对蛋白的正确装配等翻译后加工过程,使表达产物具有较高的免疫原性和生物活性<sup>[4]</sup>。因此,较之大肠杆菌等原核细胞和酵母等较为低等的真核细胞,植物细胞能够对抗原蛋白进行更加准确地折叠和修饰,这对于抗原蛋白的免疫性可能具有重要意义。举例而言,FMDV 结构蛋白 VP4 的氨基末端存在肉豆蔻酰化修饰,这种修饰被认为有助于 FMDV 结构蛋白的组装、衣壳稳定和免疫原性<sup>[33]</sup>。但是,大肠杆菌缺乏对蛋白进行肉豆蔻酰化的能力。因此,较之大肠杆菌,在植物中表达的 FMDV 抗原蛋白在理论上更加利于衣壳的稳定和装配,从而免疫原性更好。

(2) 植物表达系统具有更好的安全性。大肠杆菌、酵母、昆虫细胞/杆状病毒、动物细胞等体外表达系统有可能具有内毒素或致病颗粒等,存在安全隐患或增加了纯化的成本,而使

用植物表达系统则可避免这类问题<sup>[34]</sup>。

(3) 植物表达系统低成本是其独特优势。植物种植的基础设施所需投入较少,并易于扩大规模。据粗略估计,同一种重组蛋白在植物中的生产成本是微生物发酵体系中的2%–10%,是哺乳动物细胞生产中的0.1%<sup>[35]</sup>。此外,植物生产抗原蛋白还可减少下游低温运输和存储成本<sup>[36]</sup>。同时,利用植物生产的抗原蛋白进行免疫动物时可以用粗提取物注射,节约了抗原蛋白加工和纯化的成本和难度。

(4) 植物表达系统还可以生产可食用疫苗。可食用疫苗已被证明可以诱导黏膜和全身免疫<sup>[37]</sup>。研究表明,植物细胞壁可以在一定程度上保护其表达的抗原,使得植物细胞中的抗原在通过胃液消化之后依然保持疫抗原蛋白的结构完整性;在到达小肠后,植物细胞壁被肠道寄居的微生物分解并使得抗原大量释放,从而诱导机体产生免疫反应<sup>[36]</sup>。显然,这种方式通过口服去除了抗原蛋白的纯化等加工过程;也减少了疫苗注射的繁杂过程和动物的痛苦。因此,有学者认为通过高等植物生产 FMD 重组疫苗具有良好的应用前景<sup>[38]</sup>。

基于以上在植物中生产抗原蛋白的优势,国内外在不同的植物中利用不同方法表达了 FMDV 的抗原蛋白(表 1),其中主要研究总结如下。

Dus Santos 和 Wigdorovitz 利用葡糖醛酸酶(*glucuronidase*)编码基因 *gus A* 作为报告基因,将其和 VP1 的部分编码序列进行融合(编码 VP1 第 135–160 氨基酸的序列);从而筛选出表达 FMDV 结构蛋白的转基因苜蓿植株;用该转基因植株免疫小鼠产生了强烈的 FMDV 保护性抗体反应<sup>[33]</sup>。此外,有工作将乙型肝炎病毒核心抗原基因(*hepatitis B virus core antigen gene*, HBcAg)和 VP1 中的部分序列进行了融合,并将该融合基因转化至烟草叶片中,通过外植体再

生出转基因植株。观察表明,这种融合基因的表达能够产生病毒样颗粒,而且将转基因植株的叶片提取物对小鼠进行腹腔免疫能够产生针对 HBcAg 和 VP1 的 2 种抗体,而且增加了小鼠对 FMDV 的免疫能力<sup>[39]</sup>。

另外有一些工作利用植物病毒类载体表达 FMDV 的抗原。Usha 首次利用豇豆花叶病毒(*cowpea mosaic virus*, CPMV)载体表达了 VP1 抗原表位肽,且发现其能与 FMDV 特异性病毒血清发生反应<sup>[40]</sup>。随后的研究发现,通过烟草花叶病毒(*tobacco mosaic virus*, TMV)载体表达的 VP1 全蛋白或 VP1 抗原表位肽能够在小鼠和猪中诱导对 FMDV 的保护性免疫应答。Yang 等在竹花叶病毒(*bamboo mosaic virus*, BaMV)载体中,将编码 BaMV 衣壳蛋白的部分氨基酸序列转化为 VP1 的氨基酸序列表位肽段。该载体侵染植物后产生的病毒颗粒携带有 VP1 抗原表位肽段,接种动物后可产生 FMDV 的中和抗体并诱导了保护性免疫应答<sup>[41]</sup>。Lentz 等<sup>[42]</sup>利用基因枪法将 VP1 抗原表位肽编码序列(编码 VP1 的第 135–160 氨基酸)转化到烟草叶绿体后,该 VP1 抗原表位肽能够达到可溶性蛋白的 51%,且产生的转基因烟草中的蛋白提取物腹腔注射小鼠能够产生 FMDV 特异性免疫应答。

尽管上述方法有效地在植物中表达了 FMDV 的部分结构蛋白并在动物中引起了免疫反应,但完整的 FMDV 病毒样颗粒(包含所有的 FMDV 衣壳蛋白)被认为能够最大程度地激活机体的免疫反应。因此,有学者试图通过在植物中表达 FMDV 的所有(或大部分)衣壳蛋白从而形成完整 FMDV 病毒样颗粒。Wang 等<sup>[43]</sup>通过农杆菌介导转化,构建了表达 FMDV 衣壳多肽 P1 的转基因水稻;在该转基因水稻的总可溶性蛋白质中,P1 蛋白含量能够达到 0.6–1.3  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。用其蛋白提取物腹腔注射小鼠能够产生 FMDV

表 1 开发抗 FMDV 亚单位疫苗的研究实例  
Table 1 Development of subunit anti-FMDV vaccines

Protein expressed	Viral vector	Recipient plants	Expression system	Recombinant protein yield	Immune mode	Immune effect		References
						Immune-reaction	Protective effect	
VP1 (141-160 aa)	Viral vector	<i>Vigna unguiculata</i>	Transient expression	ND	ND	Reaction with FMDV-specific antiserum	ND	[40]
VP1 (135-160 aa)	-	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Stable expression	ND	Intraperitoneal injection	Specific immunity against FMDV in mice	+	[50]
VP1 (135-160 aa)	-	Medicago Sativa Linn	Stable expression	Maximum level of expression at 0.60 µg/g fresh leaf	Oral immunization	Specific immunity against FMDV in mice	+	[33]
P1, 2A, 2B N-terminal first 61 aa, 3B1, 3B2, 3B3, 3C, 3D N-terminal first 16 aa	-	Medicago Sativa Linn	Stable expression	ND	Intraperitoneal injection	Strong antibody responses and protective immunity against FMD in mice	+	[44]
VP1 (140-160 aa) and HBcAg	-	<i>Nicotianatabacum</i>	Stable expression	Approximately 0.05% of the total soluble protein	Intraperitoneal injection	Specific antibody responses to both HBcAg and FMDV in mice	+	[39]
VP1 (128-164 aa)	Viral vector	<i>Chenopodium quinoa</i>	Transient expression	14.30% of the total soluble protein	Intramuscular injection	Production of neutralizing antibodies against FMDV in pig	+	[41]
P1-2A and 3C	-	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Stable expression	ND	Intramuscular injection	Protective immunity against FMDV in guinea pig	+	[45]
VP1 (135-160 aa)	-	<i>Nicotianatabacum</i>	Transient expression	Approximately 51% of the total soluble protein	Intraperitoneal injection	Specific immunity in mice	ND	[41]
VP4 (21-40 aa), VP1 (135-160 aa, 200-213 aa), 2C (68-76 aa), 3D (1-115, 421-460 aa)	Viral vector	<i>Nicotianatabacum</i>	Transient expression	Approximately 0.70%-1.00% of the total protein	Intramuscular injection	Immune response to FMDV in guinea pig	ND	[46]
VP1	-	<i>Solanum tuberosum</i>	Stable expression	ND	ND	ND	ND	[51]
P1	-	<i>Oryza sativa</i>	Stable expression	0.60-1.30 µg/mg of total soluble protein	Intraperitoneal injection	Specific immunity against FMDV in mice	+	[43]
VP1 (128-164 aa)	Viral vector	<i>Nicotianatabacum</i>	Cell-suspension culture from the plants with stable expression	1.50-2.10 mg chimeric virus particles (CVPs)/20.00 g fresh weight of suspended biomass	Intramuscular injection	Guinea pigs vaccinated with purified CVPs produced humoral antibodies	ND	[49]
P1-2A	-	<i>Nicotianatabacum</i>	Transient expression	0.03 µg/g fresh leaf	Intraperitoneal injection	Significant humoral immune response in mice	ND	[52]

ND: Not being described; aa: Amino acid; +: Having protective effect; -: Non-viral vector.



特异性中和抗体,而且,该转基因水稻蛋白提取物给小鼠口服也激活了免疫反应,并使得被攻毒小鼠血清中也能够具有一定的清除病毒的能力。Dus Santos 等<sup>[44]</sup>在苜蓿中表达了 FMDV 的 P1、2A、2B 的 N 端 61 个氨基酸序列、3B1、3B2、3B3、3C 的完整序列、3D 的 N 端 16 个氨基酸序列和 3C 蛋白序列,并形成了稳定转化的转基因苜蓿。该转基因植株叶片提取物腹腔注射小鼠能够产生针对 FMDV 的特异性抗体反应和保护性免疫。Pan 等<sup>[45]</sup>将 FMDV 的 P1-2A 和 3C 序列转化到番茄中,利用外植体产生转基因植株。该转基因番茄叶提取物肌肉注射豚鼠能够产生针对 FMDV 的特异性抗体反应并使动物产生对 FMDV 的保护性免疫。Andrianova 等在烟草中瞬时表达了 VP4 (第 21-40 氨基酸序列)、VP1 (第 135-160、200-213 氨基酸序列)、2C (第 68-76 氨基酸序列)、3D (第 1-115、421-460 氨基酸序列)的抗原表位肽,并进行了序列的优化(包括排除了已知的 mRNA 剪接位点,植物细胞限制性酶切位点和 DNA 甲基化位点),并在不同的肽段间加入了铰链序列以避免可能出现的折叠问题,同时加入了蚜传辅助因子(helper component-proteinase, HC-Pro)的 RNA 沉默抑制子(RNA silencing suppressor, RSS)。将该蛋白纯化后通过肌肉注射引起了猪对 FMDV 的免疫反应以及对 FMDV 的免疫保护。然而,上述工作均没有检测植物中是否形成了真正的 FMDV 病毒样颗粒<sup>[46]</sup>。也有学者将 P1 (包括 VP0、VP3 和 VP1 衣壳蛋白)和 CPMV 24 K 蛋白酶编码序列进行共同表达,并在 P1 不同区段之间加入了 CPMV 24 K 蛋白酶的切割位点,以期望 P1 被毒性更小的 CPMV 24 K 蛋白酶(FMDV 的 3C 蛋白被认为对植物可能是具有毒性的)所识别并进行切割。将该融合基因通过农杆菌瞬时转化到本氏烟叶片中,结

果显示,携带 24 K 蛋白酶识别位点的 P1 蛋白表达,并且被 24 K 蛋白酶切割,但是未观察到 FMDV 病毒样颗粒<sup>[47]</sup>。

2018 年, Veerapen 等<sup>[52]</sup>将 P1-2A 序列对烟草叶片进行了瞬时转化。出人意料的是,在没有 3C 蛋白的情况下,烟草叶片中表达的 P1-2A 能够装配成为 FMDV 病毒样颗粒,每克鲜叶中病毒样颗粒产量为 0.030  $\mu\text{g}$ 。将部分纯化的 FMDV 病毒样颗粒皮下免疫小鼠后发现能够刺激机体产生 FMDV 特异性抗体。这说明植物能够不依赖 3C 蛋白对 P1-2A 进行正确地切割。这进一步增加了植物作为生物反应器表达 FMDV 抗原的优势。进一步地, Veerapen 等将 P1-2A 和 3C 序列克隆在同一个开放性阅读框中以瞬时转化的方式对烟草叶片进行了转化;也在植物中形成了 P1-2A 的正确切割和 FMDV 病毒样颗粒的装配,并较之他们以前的方案进一步提高了重组蛋白的产量(每千克鲜叶组织产生重组蛋白 3-4 mg)。用纯化的 FMDV 病毒样颗粒和叶片粗提物免疫小鼠均能够激活特异性的体液反应并具有相似的抗体滴度。Veerapen 等<sup>[48]</sup>在 FMDV 的 P1-2A 序列中引入可增加酸和热稳定性的突变。结果表明,这些突变并没有增加重组蛋白的稳定性,也没有改变重组蛋白的热和酸不稳定性,这表明热和酸的不稳定性不是影响植物表达 FMDV 抗原的主要因素。

除了上述使用植株表达 FMDV 的抗原外, Muthamilselvan 等<sup>[49]</sup>也在植物悬浮细胞中进行了 VP1 的表达。Muthamilselvan 等<sup>[49]</sup>在竹花叶病毒(BaMV)表达载体中融合了 VP1 的部分氨基酸编码序列和转录沉默抑制子的编码序列;该载体稳定转化本氏烟草,并将稳定转化的植株制备成悬浮细胞。从该悬浮细胞中纯化的病毒样颗粒接种豚鼠后能够诱导体液免疫并产生针对 FMDV 的抗体。

## 4 植物中表达 FMDV 抗原的问题和展望

尽管在植物中表达 FMDV 抗原已经获得了一定的进展,但目前仍然停留在理论研究阶段。在近十年来,关于 FMD 植物疫苗的研究进度缓慢,并未取得明显的成果。和传统疫苗以及利用其他类型细胞产生的亚单位疫苗相比,利用植物制备 FMD 疫苗在生产和应用层面并没有展现出优势,也并没有产生可实际应用的产品。因此,植物 FMD 疫苗的研发仍然存在着诸多的问题和挑战需要进一步解决和探索,诸多的细节也需要进一步研究。

(1) 和大肠杆菌、酵母、昆虫细胞、哺乳动物等不同细胞类型相比,在植物细胞中 FMDV 抗原表达量较低,这是植物 FMD 疫苗研发最主要的挑战。现有的研究主要通过启动子和增强子等非编码序列的优化、密码子偏好改造、或者加入一些提高 FMDV 抗原积累或是防止其降解的原件等分子生物学手段来提高植物中 FMDV 的抗原表达量,但效果较为有限。尽管可以通过纯化后的冻干浓缩等方式提高 FMDV 抗原在植物体外的浓度<sup>[53]</sup>,但是这会导致生产成本大幅上升,也使植物失去了有可能作为 FMDV 可饲疫苗的天然优势。因此,亟待一些新的技术来提高植物中 FMDV 抗原的表达量。Shohei 等<sup>[54]</sup>发现了外源抗坏血酸喷施可以提高外源基因在烟草中的瞬时表达水平;笔者课题组最近工作表明,施加  $\alpha$ -萘乙酸和赤霉素等促生长调剂也能提高外源基因在烟草中的瞬时表达量<sup>[55]</sup>。但这些手段是否能够使得植物中 FMDV 抗原的表达量达到与其他种类细胞中相同或相似的水平尚无尝试。因此,植物细胞中 FMDV 抗原表达量较低的问题仍然缺乏有效的解决方法。

(2) 在自然环境中,植株的生长和基因的表达受到多种外界环境因素(包括水分、营养条件、温度、光照、湿度等)的影响,这些外部环境因素的不断的波动会降低植株中 FMDV 抗原表达的稳定性,使得 FMD 植物疫苗的生产工艺难以控制。尽管利用植物温室可在一定程度上降低外界环境因素的波动,但温室的建设和管理成本均较为昂贵。解决这一问题的另一策略是利用植物的悬浮细胞的培养来替代植株的生长。但较之体外培养的大肠杆菌、酵母、昆虫细胞、哺乳动物等细胞,植物悬浮细胞在生长速度上并没有优势。而且,植物悬浮细胞的大规模培养和发酵工艺和设备也不够成熟,限制了植物悬浮细胞在 FMD 植物疫苗生产中的利用。

(3) 糖基化是决定蛋白质活性的重要因素。FMDV 抗原蛋白在动物寄主中的糖基化修饰尚不清楚,同时植物中表达 FMDV 抗原的糖基化情况及其对动物免疫原性的影响也无研究。但从现有的理论上讲,植物和动物蛋白的糖基化具有明显的差异。因此,较之动物细胞,在植物细胞中表达的 FMDV 抗原可能由于糖基化差异而降低 FMDV 抗原在动物中的免疫原性。目前,这方面的探索和研究均未见明确报道。

(4) FMD 可饲疫苗的研究仍然需要解决植物种类的选择等问题。目前,植物外源基因的转化在拟南芥和烟草中最为成熟。但拟南芥生物量低,不可能作为生产疫苗的生物反应器;而烟草中含有的尼古丁等烟碱等成瘾性物质限制了烟草在 FMD 可饲疫苗中的应用。目前来看,饲草类植物(例如苜蓿)或是中草药类植物(其活性成分能提高动物的免疫能力)应是生产 FMD 可饲疫苗的较佳载体。笔者课题组近期工作发现,农杆菌 LBA4404 菌株与基于菜豆黄矮病毒的复制型载体的组合可在苜蓿叶片

中有效地实现较高水平的外源蛋白的瞬时表达,但仍低于在烟草叶片中的表达量(未发表的数据);此外,笔者课题组在甘草、黄芩、黄芪植物等叶片中也进行了外源基因瞬时表达的探索,发现在这些植物中外源基因的表达量也低于烟草<sup>[15,56]</sup>。这提示了以其他植物作为 FMD 可饲疫苗的载体依然存在着表达量较低的问题。

(5) 能够直接可饲(或口服)是植物 FMD 疫苗最明显的优势。但是,含有 FMDV 抗原的植物细胞通过饲喂或口服进入动物体内后,其在动物体内的滞留时间、细胞壁分解效率、抗原的释放量和释放位点等情况极为复杂,并和动物自身的生理代谢、肠道微生物群落等密切相关。同时,也应该注意到,口服免疫的方式无法刺激足够的致敏反应,可能会降低免疫效果或引发免疫耐受<sup>[57]</sup>。从现有的研究来看,口服抗原的频率和剂量与免疫效果、免疫耐受的关系并不明确,使植物 FMD 可饲疫苗的应用效果具有高度的不确定性。

(6) 为了应对 FMDV 的变异和加快植物中表达 FMDV 抗原的速度,植物瞬时表达应是首选技术。笔者课题组前期发现,在外源基因瞬时转化烟草过程中,农杆菌菌株类型、浓度和侵染时间等转化条件均是影响外源基因在植物中表达效率的重要因素<sup>[14-15,56]</sup>;这均提示了利用植物瞬时表达技术生产 FMDV 抗原过程中的诸多技术参数需要进行优化。而更为重要的是,目前缺少大规模植物瞬时表达的工艺和设备,这使得植物 FMD 疫苗的研发仍然徘徊在实验室阶段。

尽管仍然存在着诸多问题和挑战,但植物作为一种活性蛋白的表达平台,为人类和动物疾病的防治提供了新的选择并具有一些独特优势。在植物表达的 FMDV 抗原的功能性也得到了证明。随着免疫学、分子生物学和植物学的

进一步发展,安全性高、生产成本低、抗原谱广的植物源 FMDV 注射乃至可饲疫苗有可能逐步从理论研究走向实际应用,为家畜产业的安全生产提供重要的保障。

## REFERENCES

- [1] LING HY, PELOSI A, WALMSLEY AM. Current status of plant-made vaccines for veterinary purposes[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2010, 9(8): 971-982.
- [2] 蒋晓玲, 郭玺, 黄涛. 口蹄疫: 一种人兽共患的急性传染病[J]. *中国海关*, 2022(1): 60.  
JIANG XL, GUO X, HUANG T. Foot-and-mouth disease: an acute infectious disease of human beings and animals[J]. *China Customs*, 2022(1): 60 (in Chinese).
- [3] GRUBMAN MJ, MORAES MP, DIAZ-SAN SEGUNDO F, PENA L, de los SANTOS T. Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2008, 53(1): 8-17.
- [4] 张克山, 刘永杰, 卢国栋, 刘湘涛. 口蹄疫病毒基因组结构及功能最新研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(9): 836-838.  
ZHANG KS, LIU YJ, LU GD, LIU XT. Latest research progress on genome structure and function of foot-and-mouth disease virus[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2011, 27(9): 836-838 (in Chinese).
- [5] FLINT SJ, ENQUIST LW, RACANIELLO VR, SKALKA AM. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses*[M]. 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2004.
- [6] SHAHID N, DANIELL H. Plant-based oral vaccines against zoonotic and non-zoonotic diseases[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(11): 2079-2099.
- [7] LEE LY, GELVIN SB. T-DNA binary vectors and systems[J]. *Plant Physiology*, 2008, 146(2): 325-332.
- [8] GORANTALA J, GROVER S, GOEL D, RAHI A, JAYADEV MAGANI SK, CHANDRA S, BHATNAGAR R. A plant based protective antigen (PA (dIV)) vaccine expressed in chloroplasts demonstrates protective immunity in mice against anthrax[J]. *Vaccine*, 2011, 29(27): 4521-4533.
- [9] DANIELL H, LIN CS, YU M, CHANG WJ.

- Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering[J]. *Genome Biology*, 2016, 17(1): 134.
- [10] MUTHAMILSELVAN T, KIM JS, CHEONG G, HWANG I. Production of recombinant proteins through sequestration in chloroplasts: a strategy based on nuclear transformation and post-translational protein import[J]. *Plant Cell Rep*, 2019, 38(7): 825-833.
- [11] VERMA D, DANIELL H. Chloroplast vector systems for biotechnology applications[J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(4): 1129-1143.
- [12] CODY WB, SCHOLTHOF HB. Plant virus vectors 3.0: transitioning into synthetic genomics[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2019, 57: 211-230.
- [13] DUBERY KK, LUKR GA, KNOX C, KUMAR P, PLETSCHKE BI, SINGH PK, SHUKLA P. Vaccine and antibody production in plants: developments and computational tools[J]. *Brief Funct Genomics*, 2018, 17(5): 295-307.
- [14] 李颖, 张悦婧, 王馨, 庞海龙, 贾凌云, 冯汉青. 农杆菌菌株及其侵染浓度和时间对基于菜豆黄矮病毒表达载体瞬时表达外源基因的影响[J]. *植物科学学报*, 2021, 39(3): 297-305.
- LI Y, ZHANG YJ, WANG X, PANG HL, JIA LY, FENG HQ. Effects of *Agrobacterium tumefaciens* strain and its infection time and concentration on transient expression of foreign genes based on expression vector of bean yellow dwarf virus[J]. *Plant Science Journal*, 2021, 39(3): 297-305 (in Chinese).
- [15] 孙敏, 达晓伟, 张悦婧, 李颖, 庞海龙, 冯汉青. 农杆菌介导 5 种中草药叶片瞬时表达的研究[J]. *西北植物学报*, 2021, 41(7): 1240-1247.
- SUN M, DA XW, ZHANG YJ, LI Y, PANG HL, FENG HQ. Study on transient expression in leaves of five Chinese medicinal herbs mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, 41(7): 1240-1247 (in Chinese).
- [16] SHIH SM-H, DORAN PM. Foreign protein production using plant cell and organ cultures: advantages and limitations[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(6): 1036-1042.
- [17] YAO J, WENG YQ, DICKEY A, WANG KY. Plants as factories for human pharmaceuticals: applications and challenges[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(12): 28549-28565.
- [18] RAVEN N, RASCHE S, KUEHN C, ANDERLEI T, KLÖCKNER W, SCHUSTER F, HENQUET M, BOSCH D, BÜCHS J, FISCHER R, SCHILLBERG S. Scaled-up manufacturing of recombinant antibodies produced by plant cells in a 200 L orbitally-shaken disposable bioreactor[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(2): 308-321.
- [19] FOX JL. First plant-made biologic approved[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(6): 472.
- [20] SHANMUGARAJ B, BULAON CJI, MALLA A, PHOOLCHAROEN W. Biotechnological insights on the expression and production of antimicrobial peptides in plants[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2021, 26(13): 4032.
- [21] 茹毅, 刘华南, 张贵财, 杨帆, 李丹, 郭建宏, 何继军, 张娇燕, 李亚军, 马坤, 伍春平, 郝荣增, 卢炳州, 田宏, 朱紫祥, 张克山, 曹伟军, 刘永杰, 靳野, 马旭升, 等. 一种 A 型口蹄疫亚单位疫苗及其制备方法和应用, CN112076314B[P], 2021-11-23.
- RU Y, LIU HN, ZHANG GC, YANG F, LI D, GUO JH, HE JJ, ZHANG JY, LI YJ, MA K, WU CP, HAO RZ, LU BZ, TIAN H, ZHU ZX, ZHANG KS, CAO WJ, LIU YJ, JIN Y, MA XS, et al. A type A foot-and-mouth disease subunit vaccine and its preparation method and application, CN112076314B[P], 2021-11-23 (in Chinese).
- [22] COX MMJ. Innovations in the insect cell expression system for industrial recombinant vaccine antigen production[J]. *Vaccines*, 2021, 9(12): 1504.
- [23] DU YJ, JIANG P, LI YF, HE HR, JIANG WM, WANG XL, HONG WB. Immune responses of two recombinant adenoviruses expressing VP1 antigens of FMDV fused with porcine granulocyte macrophage colony-stimulating factor[J]. *Vaccine*, 2007, 25(49): 8209-8219.
- [24] KLEID DG, YANSURA D, SMALL B, DOWBENKO D, MOORE DM, GRUBMAN MJ, McKERCHER PD, MORGAN DO, ROBERTSON BH, BACHRACH HL. Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine[J]. *Science*, 1981, 214(4525): 1125-1129.
- [25] JUNG JG, LEE YJ, VELMURUGAN N, KO YJ, LEE HS, JEONG KJ. High-yield production of the VP1 structural protein epitope from serotype O foot-and-mouth disease virus in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2013, 40(7): 705-713.
- [26] LI X, MENG XP, WANG SN, LI ZQ, YANG L, TU LQ, DIAO WZ, YU C, YU YL, YAN CY, WANG LY. Virus-like particles of recombinant PCV2b carrying

- FMDV-VP1 epitopes induce both anti-PCV and anti-FMDV antibody responses[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(24): 10541-10550.
- [27] 金华利, 张富春, 单文娟, 张爱莲, 李轶杰, 王宾. 口蹄疫病毒 VP1 蛋白在酵母中的表达及免疫原性分析[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, 20(5): 513-516. JIN HL, ZHANG FC, SHAN WJ, ZHANG AL, LI YJ, WANG B. Expression of FMDV VP1 protein in *Pichia pastoris* and its immunological activity in mice[J]. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2004, 20(5): 513-516 (in Chinese).
- [28] VISWANATHAN S, RATISH G, REDDY GR, SURYANARAYANA VV. Comparative studies on immunoreactivity of truncated recombinant proteins of foot and mouth disease virus (FMDV) produced in *E. coli* and insect cells[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1999, 37(6): 536-540.
- [29] CAO YM, SUN P, FU YF, BAI XW, TIAN FP, LIU XT, LU ZJ, LIU ZX. Formation of virus-like particles from O-type foot-and-mouth disease virus in insect cells using codon-optimized synthetic genes[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(9): 1223-1229.
- [30] LIU XS, LV JL, FANG YZ, ZHOU P, LU YZ, PAN L, ZHANG ZW, MA JW, ZHANG YG, WANG YL. Expression and immunogenicity of two recombinant fusion proteins comprising foot-and-mouth disease virus structural protein VP1 and DC-SIGN-binding glycoproteins[J]. *BioMed Research International*, 2017, 2017: 7658970.
- [31] 李杰, 王若, 石玮, 边海霞, 张丽, 张雷, 王家鑫. 口蹄疫病毒 VP1 基因真核表达载体的构建及其在树突状细胞的表达[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(9): 802-804. LI J, WANG R, SHI W, BIAN HX, ZHANG L, ZHANG L, WANG JX. Construction of eukaryotic expression vector containing foot-and-mouth disease virus VP1 gene and its expression in dendritic cells[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2009, 25(9): 802-804 (in Chinese).
- [32] 黄桂菊, 罗满林, 刘镇明, 贺东生, 耿忠海. 口蹄疫病毒 VP1 基因和免疫串联片段 F 的克隆及其在 Vero 细胞中的表达[J]. *动物医学进展*, 2005, 26(5): 62-66. HUANG GJ, LUO ML, LIU ZM, HE DS, GENG ZH. Cloning and expression in vero cell of FMDV VP1 gene and immunizing tandem fragment F[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2005, 26(5): 62-66 (in Chinese).
- [33] DUS SANTOS MJ, WIGDOROVITZ A. Transgenic plants for the production of veterinary vaccines[J]. *Immunology and Cell Biology*, 2005, 83(3): 229-238.
- [34] TIWARI S, VERMA PC, PRADHYUMAN K. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(4): 449-467.
- [35] GIDDINGS G. Transgenic plants as protein factories[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12(5): 450-454.
- [36] 张俊霞, 王利. 植物口服疫苗的研究进展[J]. *广西植物*, 2021, 41(2): 318-326. ZHANG JX, WANG L. Advances in research on oral plant vaccines[J]. *Guihaia*, 2021, 41(2): 318-326 (in Chinese).
- [37] SOHRAB SS, SUHAIL M, KAMAL MA, HUSEN A, AZHAR EI. Recent development and future prospects of plant-based vaccines[J]. *Current Drug Metabolism*, 2017, 18(9): 831-841.
- [38] SHAHRIARI A, HABIBI-PIRKOHI M. Developing vaccines against foot-and-mouth disease: a biotechnological approach[J]. *Archives of Razi Institute*, 2018, 73(1): 1-10.
- [39] HUANG YH, LIANG WQ, WANG YJ, ZHOU ZA, PAN AH, YANG XH, HUANG C, CHEN JX, ZHANG DB. Immunogenicity of the epitope of the foot-and-mouth disease virus fused with a hepatitis B core protein as expressed in transgenic tobacco[J]. *Viral Immunology*, 2005, 18(4): 668-677.
- [40] USHA R. Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle[J]. *Virology*, 1993, 197(1): 366-374.
- [41] YANG CD, LIAO JT, LAI CY, JONG MH, LIANG CM, LIN YL, LIN NS, HSU YH, LIANG SM. Induction of protective immunity in swine by recombinant bamboo mosaic virus expressing foot-and-mouth disease virus epitopes[J]. *BMC Biotechnology*, 2007, 7: 62.
- [42] LENTZ EM, SEGRETIN ME, MORGENFELD MM, WIRTH SA, SANTOS MJD, MOZGOVOJ MV, WIGDOROVITZ A, BRAVO-ALMONACID FF. High expression level of a foot and mouth disease virus epitope in tobacco transplastomic plants[J]. *Planta*, 2010, 231(2): 387.
- [43] WANG YY, SHEN Q, JIANG YB, SONG YF, FANG LR, XIAO SB, CHEN HC. Immunogenicity of foot-and-mouth disease virus structural polyprotein P1 expressed in transgenic rice[J]. *Journal of Virological Methods*, 2012, 181(1): 12-17.
- [44] DUS SANTOS MJ, CARRILLO C, ARDILA F, RIOS

- RD, FRANZONE P, PICCONE ME, WIGDOROVITZ A, BORCA MV. Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein gene *P1* and its utilization as an experimental immunogen[J]. *Vaccine*, 2005, 23(15): 1838-1843.
- [45] PAN L, ZHANG YG, WANG YL, WANG BQ, WANG WX, FANG YZ, JIANG ST, LV JL, WANG W, SUN Y, XIE QG. 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[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 121(1/2): 83-90.
- [46] ANDRIANOVA EP, KREMENTSUGSKAIA SR, LUGOVSKAIA NN, MAYOROVA TK, BORISOV VV, EL DAROV MA, RAVIN NV, FOLIMONOV AS, SKRYABIN KG. Foot and mouth disease virus polyepitope protein produced in bacteria and plants induces protective immunity in Guinea pigs[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2011, 76(3): 339-346.
- [47] THUENEMANN E, LENZI P, LOVE A, TALIANSKY M, BECARES M, ZUNIGA S, ENJUANES L, ZAHMANOVA G, MINKOV I, MATIC S, NORIS E, MEYERS A, HATTINGH A, RYBICKI E, KISELEV O, RAVIN N, EL DAROV M, SKRYABIN K, LOMONOSSOFF G. The use of transient expression systems for the rapid production of virus-like particles in plants[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2013, 19(31): 5564-5573.
- [48] VEERAPEN VP, ALBERTHA R, RYBICKI EP, MEYERS AE. Transient expression of heat- and acid-resistant foot-and-mouth disease virus P1-2A mutants in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Virus Research*, 2018, 256: 45-49.
- [49] MUTHAMILSELVAN T, LEE CW, CHO YH, WU FC, HU CC, LIANG YC, LIN NS, HSU YH. A transgenic plant cell-suspension system for expression of epitopes on chimeric bamboo mosaic virus particles[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(1): 231-239.
- [50] CARRILLO C, WIGDOROVITZ A, OLIVEROS JC, ZAMORANO PI, SADIR AM, GÓMEZ N, SALINAS J, ESCRIBANO JM, BORCA MV. Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants[J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(2): 1688-1690.
- [51] 宋东光, 张辉松, 聂呈荣, 黄林旋, 王惠珍, 张英慧, 何丽烂, 邓日烈. 口蹄疫病毒 VP1 基因转化马铃薯及其块茎专一性表达[J]. *生物技术通报*, 2011(2): 107-109, 173.
- SONG DG, ZHANG HS, NIE CR, HUANG LX, WANG HZ, ZHANG YH, HE LL, DENG RL. Specific expression of *VP1* gene from foot-and-mouth disease virus in potato *Tuber*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2011(2): 107-109, 173 (in Chinese).
- [52] VEERAPEN VP, ALBERTHA R, WIGDOROVITZ A, RYBICKI EP, MEYERS AE. Novel expression of immunogenic foot-and-mouth disease virus-like particles in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Virus Research*, 2018, 244: 213-217.
- [53] 刘蓉蓉. 转基因植物生产疫苗和药物的研发进展[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(9): 17-22.
- LIU RR. Research and development progress on plant-made pharmaceuticals[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(9): 17-22 (in Chinese).
- [54] SHOHEI N, MIKA KK, FUMINORI T, HIDEKI Y, YUKINARI K, KENJI M. Prevention of necrosis caused by transient expression in *Nicotiana benthamiana* by application of ascorbic acid[J]. *Plant Physiology*, 2021, 186(2): 832-835.
- [55] LI Y, SUN M, WANG X, ZHANG YJ, DA XW, JIA LY, PANG HL, FENG HQ. Effects of plant growth regulators on transient expression of foreign gene in *Nicotiana benthamiana* L. leaves[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2021, 8(1): 1-8.
- [56] 张悦婧, 李颖, 王娟娟, 庞海龙, 贾凌云, 冯汉青. 不同转化条件对 3 种农杆菌 GFP 基因在本氏烟草中瞬时表达的影响[J]. *植物研究*, 2022, 42(1): 121-129.
- ZHANG YJ, LI Y, WANG JJ, PANG HL, JIA LY, FENG HQ. Effects of three kinds of *Agrobacterium* and different transformation conditions on the transient expression of GFP in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2022, 42(1): 121-129 (in Chinese).
- [57] SU J, SHERMAN A, DOERFLER PA, BYRNE BJ, HERZOG RW, DANIELL H. Oral delivery of acid alpha glucosidase epitopes expressed in plant chloroplasts suppresses antibody formation in treatment of Pompe mice[J]. *Plant Biotechnol*, 2015, 13(8): 1023-1032.

(本文责编 陈宏宇)