

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-029

## 植物源疫苗研究进展

宋心雨<sup>1</sup>, 潘炜松<sup>1</sup>, 吴泰茹<sup>2</sup>, 潘家豪<sup>2</sup>, 吴川<sup>3</sup>, 李伟展<sup>4</sup>

(1 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410125; 2 湖南诺合新生物科技有限公司, 湖南 长沙 410001;

3 中南大学冶金与环境学院, 湖南 长沙 410083; 4 香港教育大学科学及环境学系, 香港 999077)

**摘要:** 在当今全球公共卫生领域, 疫苗作为预防和控制传染病的关键手段, 其研发和生产技术的创新备受瞩目。植物源疫苗作为一种新兴的疫苗生产技术, 凭借其独特的优势逐渐崭露头角。与传统疫苗生产方式相比, 植物源疫苗具有显著优势, 在分子生物学技术的加持下, 能够在较短时间内实现大规模生产, 有效应对传染病的大规模爆发。本文首先介绍了植物源疫苗的基本概念, 阐述了植物源疫苗的发展历程, 同时对植物源疫苗的不同分类方法进行了系统梳理, 此外还探讨了植物源疫苗的表达平台和表达体系, 比较了不同平台和体系如稳定表达和瞬时表达体系的优缺点, 总结了提高疫苗效力和安全性的策略和优化方法, 系统探讨了国内外植物源疫苗的开发进展。植物源疫苗作为一种具有巨大潜力的新兴疫苗技术, 有望在未来的公共卫生事业中发挥更加重要的作用。

**关键词:** 植物源疫苗; 病毒样颗粒; 分子生物学; 免疫原性; 瞬时表达系统

**中图分类号:** Q812 **文献标志码:** A

## Research progress in plant-derived vaccines

SONG Xinyu<sup>1</sup>, PAN Weisong<sup>1</sup>, WU Tairu<sup>2</sup>, PAN Jiahao<sup>2</sup>, WU Chuan<sup>3</sup>, LI Waichin<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>School of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410125, Hunan, China; <sup>2</sup>Hunan Novomore Biotechnology Corporation, Changsha 410001, Hunan, China; <sup>3</sup>School of Metallurgical and Environmental Engineering, Central South University, Changsha 410083, Hunan, China; <sup>4</sup>Department of Science and Environmental Studies, The Education University of Hong Kong, Hongkong 999077, China)

**Abstract:** Plant-derived vaccines represent an innovative vaccine production technology that employs plants as bioreactors to express specific antigenic proteins within the plant system. This technology has demonstrated tremendous potential and application prospects in the field of vaccines in recent years. Compared to traditional vaccine production methods, plant-derived vaccines offer distinct advantages in cost control, scalability, and safety. Firstly, the production cost of plant-derived vaccines is relatively low. This is due to the short growth cycle of plants, their strong reproductive capacity, and the lack of need for complex bioreactors or expensive culture media. This makes the large-scale production of vaccines more economical and efficient. Secondly, plant-derived vaccines are easy to scale up. Due to the renewable nature and rapid growth characteristics of plants, they can quickly respond to large-scale vaccine

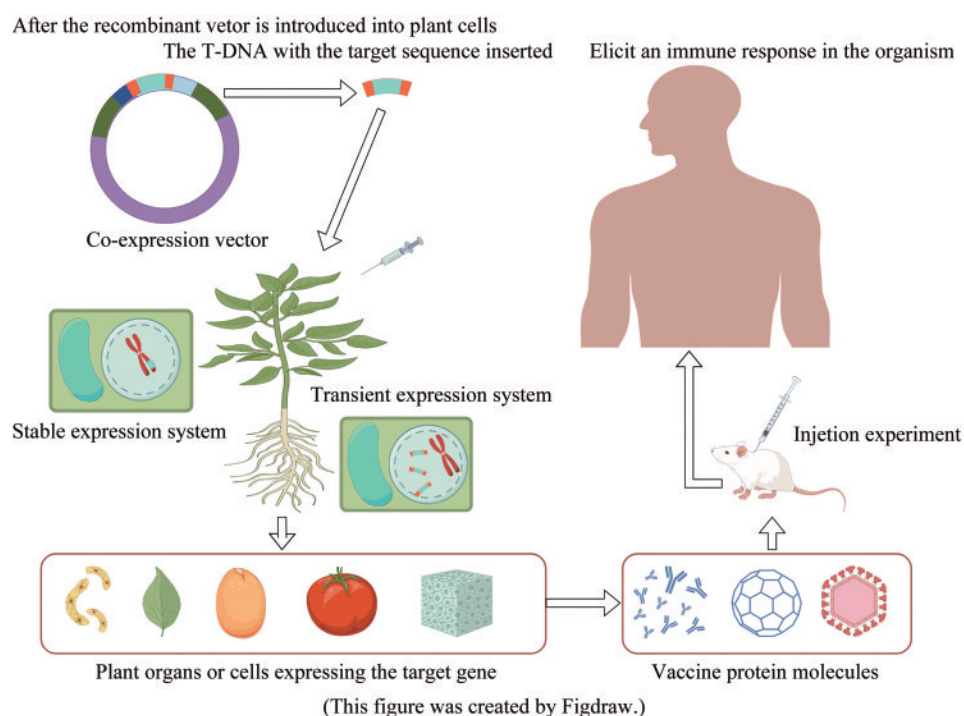
收稿日期: 2025-03-26 修回日期: 2025-06-09

基金项目: 国家自然科学基金 (31670955)

引用本文: 宋心雨, 潘炜松, 吴泰茹, 潘家豪, 吴川, 李伟展. 植物源疫苗研究进展[J]. 合成生物学, 2025, 6(4): 846-872

Citation: SONG Xinyu, PAN Weisong, WU Tairu, PAN Jiahao, WU Chuan, LI Waichin. Research progress in plant-derived vaccines[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(4): 846-872

demands, which is particularly important in dealing with public health emergencies. In addition, there is no risk of contamination in the production process of plant-derived vaccines that is typically associated with traditional vaccine production. Plant cells possess inherent biosafety, which can effectively avoid contamination from animal-derived pathogens and endotoxins, thus ensuring the safety of the vaccine. Plants can perform post-translational modifications on foreign proteins, a characteristic that is conducive to the formation of virus-like particles (VLPs). VLPs are non-infectious particles that structurally resemble viruses; they can mimic the immunogenicity of viruses, stimulating the body to produce an immune response. However, they lack the ability to replicate, which makes them safer. This article first introduces the basic concept of plant-derived vaccines by using plants as vectors to express antigenic proteins. Then, the article emphasizes the important role of plant-derived vaccines in the field of global public health and epidemic prevention, especially in providing rapid, economical, and safe vaccines. The article then details the development history of plant-derived vaccines, from early exploration to modern commercial applications. At the same time, the article provides a comprehensive description of the different classifications, expression platforms, and expression systems of plant-derived vaccines, covering various technological pathways from genetically engineered plants to plant viral expression vectors. The analysis focused on how vaccine optimization and application enhance the expression and immunogenicity of antigenic proteins through gene editing and protein engineering, as well as how to improve the efficacy and stability of vaccines by optimizing their formulation and adjuvants. Furthermore, current cases of developed plant-derived vaccines were analyzed, especially their application advantages in addressing human and animal diseases. These cases demonstrate the potential of plant-derived vaccines in rapidly responding to epidemics, reducing costs, and improving accessibility. Finally, the article discusses and summarizes the development progress of plant-derived vaccines domestically and internationally, providing references and insights for the research and application of plant-derived vaccines in our country. Through these analyses, the article aims to promote the development of plant-derived vaccine technology and contribute to global public health security.



**Keywords:** plant-derived vaccines; virus-like particles; molecular biology; immunogenicity; transient expression system

每个植物个体都具备作为反应器宿主的潜力，在整株植物中生产外源重组蛋白是一种可扩展且具有成本效益的工艺<sup>[1]</sup>。以植物为宿主生产的生物制剂通常分为四个主要类别：单克隆抗体(mAb)，受体调节剂，酶调节剂和疫苗<sup>[2]</sup>。人胰岛素类似物(优泌林)是1983年引入市场的第一种生物制剂，由利用基因工程技术改造的大肠杆菌产生<sup>[3]</sup>，自此以后，生物制剂越来越多地用作药物制剂，市场规模超过了小分子药物市场<sup>[4]</sup>。而植物源疫苗属于生物制剂的一种。尽管生物技术不断迭代，疾病防治手段也日益增多，但疫苗仍是临床中重要的防护措施。而植物源疫苗的研究起源于转基因技术和现代农业的兴起，依赖于植物生物反应器的发展<sup>[5]</sup>，利用植物体或植物细胞及器官作为反应器，将目的基因整合到植物反应器中生产对应目标蛋白，是一种迅速崛起的可替代传统微生物生产疫苗的方法<sup>[3]</sup>。植物源疫苗技术目前大多数被用于生产季节性流感疫苗<sup>[6]</sup>，这表明其在疫苗生产中的重要性。尽管植物分子农业可能无法取代工业表达系统，但它在资源匮乏地区的疫苗生产以及用于疫苗应用的病毒纳米颗粒(VNP)生产方面具有独特的作用<sup>[7]</sup>。植物个体为外源蛋白的生产提供了一种可靠、有效、低成本和安全的环境<sup>[8]</sup>。在医疗方面，可以利用植物组织或细胞作为宿主，通过基因重组技术生产药用蛋白。这一过程融合了农业、医药和生物技术等多学科，区别于传统的发酵生产模式，该技术成本仅为利用大肠杆菌发酵生产成本的2%~10%，并且可以避免致病微生物的威胁，从而提高表达产物对人畜的安全性<sup>[9]</sup>。

利用基因工程技术研发的疫苗具有更好的稳定性和安全性，且具备大规模生产的潜力，是未来疾病防治的主流趋势<sup>[10]</sup>。自20世纪90年代以来，我国开始以植物作为宿主生产外源物质，并开发了相关主题项目。在“十四五”期间，建立了用植物种子胚乳、油体等反应器生产产品的宿主平台，推动了分子农业的产业化进展。目前，利用植物作为宿主生产胰岛素、单克隆抗体和乙肝疫苗等产品的技术已经趋于成熟<sup>[5]</sup>。2022年，世界首款植物源人体疫苗Covifenz投入市场，激发了国内外对植物源疫苗研究的兴趣<sup>[11]</sup>，证明了植

物源疫苗在疫苗领域的巨大潜力。

本文通过对植物源疫苗的发展历程、外源重组蛋白的生产类型、表达平台以及表达体系、疫苗优化及应用的研究总结揭示了植物源疫苗的基本原理，并对关于植物源疫苗的发展前景进行了展望。

## 1 植物源疫苗的发展

### 1.1 植物源疫苗的早期研究阶段

疫苗基因首次导入植物细胞并在植物中表达，1992年，Mason等<sup>[12-13]</sup>成功在转基因烟草和番茄中表达了乙型肝炎病毒表面抗原，实现了疫苗基因首次导入植物细胞并在植物中表达；1994年，刘玉乐等<sup>[14]</sup>利用根癌农杆菌转化烟草，在烟草及其后代中成功表达了人单克隆抗体2G12肝炎病毒表面抗原(HBsAg)蛋白，他们使用了农杆菌介导的叶盘转化法(一种常用的植物遗传转化技术)，通过这种方法，外源基因可以被导入植物细胞并整合到宿主基因组中。这两个事件是植物源疫苗领域的重大突破，它们证明了植物可以被用来生产具有免疫原性的药用蛋白，为开发新型疫苗提供了一种成本效益高、易于规模化生产的新途径。这些研究为后续的植物源疫苗开发奠定了坚实的基础，并展示了植物在生物制药领域的巨大潜力。

### 1.2 植物源疫苗的功能验证和动物试验阶段

科学家对植物源疫苗的功能进行了深入研究，验证了其免疫原性并在动物模型中进行了试验。例如，2016年，Matic等<sup>[15]</sup>在烟草中成功表达了ErbB2酪氨酸激酶受体，且在小鼠中获得了针对ErbB2+乳腺癌的保护性免疫原性，研究表明，中等剂量的疫苗与ErbB2特异性1型T细胞的生成相关，能够随时间产生持续的免疫反应。在2020年，Naupu等<sup>[16]</sup>对植物源人乳头状瘤病毒(HPV)疫苗进行了动物试验，在动物模型中表现出免疫原性。2021年，Maharjan等<sup>[17]</sup>在本氏烟草中表达了SARS-CoV-2刺突蛋白的受体结合结构域，并成功

引发小鼠体液免疫反应，产生了高滴度的中和抗体。2023年，张改平院士团队<sup>[18]</sup>通过水稻胚乳表达猪瘟疫病的植物疫苗ht-rE2二聚体，并在小鼠，兔子和猪的动物实验中验证疫苗的免疫应答水平和疫苗效力，低剂量284 ng ht-rE2二聚体疫苗免疫诱导产生的中和抗体滴度是减毒活疫苗的32倍，且E2特异性抗体的免疫持续期长达180天以上。

### 1.3 植物源疫苗的临床试验和商业化批准阶段

一些植物源疫苗进入临床试验阶段，评估其在人体的安全性和免疫原性。例如2011年，Yusibov等<sup>[19]</sup>概述了植物生产重组药物疫苗与抗体的临床开发情况，表明许多产品已在早期临床试验中进行了测试，并显示出良好的安全性和有效性。一种针对H5N1禽流感病毒的植物源疫苗在2013年进入了临床试验<sup>[20]</sup>；2006年，美国疾病控制与预防中心（CDC）研究人员利用烟草生产了H1N1甲型流感病毒的候选疫苗，该植物源疫苗在2014年的人体注射试验中表现出良好的免疫原性和安全性，临床试验结果显示，接种一针后，疫苗可以产生良好的免疫反应。保护性抗体阳性率、抗体阳转率等指标均达到疫苗评价标准<sup>[21]</sup>。Khantasup等<sup>[22]</sup>于2015年在小麦中成功表达癌胚抗原的单链Fv抗体并进行了临床测验。2015年，Pharma-Planta项目中HIV中和人单克隆抗体2G12在转基因烟草中表达，并在临床试验中取得成功<sup>[23]</sup>。

此外，一些植物源疫苗已经获得了监管机构的批准，并开始商业化生产和分发。例如一种通过烟草植株生产的埃博拉病毒疫苗在2019年获得了欧洲药品管理局的批准<sup>[24]</sup>。除此之外还有许多用烟草生产的针对Covid-19的疫苗项目，例如2021年就投入临床的SARS-CoV-2 VLP Vaccine（IBIO-200）以及SARS-CoV-2 Subunit Vaccine（IBIO-201）项目<sup>[25]</sup>，与之同时的还有投入Ⅲ期临床试验的SARS-CoV-2 Spike protein项目等<sup>[26-27]</sup>（表1）。

## 2 植物源疫苗的分类

植物源疫苗的分类主要基于表达的不同重组蛋白类型以及生产和给药方式。这些疫苗可以表

达特定病原体的抗原或病毒样颗粒（VLP），也可以根据给药途径设计为注射疫苗或口服疫苗，植物源疫苗具有生产成本低、易于大规模生产、便于储存和分发的优势，同时能够有效诱导黏膜免疫，此外，疫苗也可以根据不同宿主植物（如烟草、小麦、马铃薯、水稻等）进行分类，以优化其生产和应用效果。

### 2.1 植物源疫苗的蛋白种类

#### 2.1.1 非自组装类抗原

抗原是指能够刺激机体免疫系统产生免疫应答，并能与免疫应答产物（抗体或致敏淋巴细胞）在体内外发生特异性反应的物质。植物能够高效表达病原体表面蛋白等抗原，为疫苗开发提供了新的平台。研究表明，通过植物表达系统，能够生产具有良好免疫原性的抗原。任兆钧等利用烟草TMV-30B外源蛋白高效表达载体，将口蹄疫病毒株的免疫抗原克隆并表达于烟草叶片，该研究中提到的免疫抗原是猪O型口蹄疫病毒（FMDV）抗原表位融合结构蛋白VP1，是口蹄疫病毒的主要免疫原性蛋白，它包含了病毒的抗原表位，能够刺激机体产生免疫应答<sup>[46]</sup>。Buetow等<sup>[47]</sup>在烟草中开发了针对呼吸道合胞病毒（RSV）的植物源疫苗。RSV F蛋白由一个50 kDa的羧基末端F1片段和一个20 kDa的氨基末端F2片段组成，该二聚体的109和136氨基酸残基后存在两个furin蛋白酶切位点，酶切后将暴露F1氨基末端的疏水融合肽，使该抗原更容易被免疫细胞识别并结合。Langridge等<sup>[48]</sup>将编码霍乱毒素B亚基（CTB）的基因插入植物表达载体，成功诱导小鼠产生与天然CTB相同的免疫反应。Sohrab等<sup>[49]</sup>在2020年开发的可食用疫苗能够有效表达中东呼吸综合征冠状病毒刺突蛋白S1亚基的抗原，S1亚基包括N端结构域（NTD）和C端结构域（CTD），其中CTD也被称为受体结合结构域（RBD），负责与宿主细胞的受体结合（表2）。

#### 2.1.2 自组装类抗原

病毒样颗粒（virus-like particle, VLP）是一种由病毒结构蛋白自行装配而成的蛋白质颗粒。它们在形态结构上与天然的病毒颗粒相似，具有

表1 一些已投入临床或动物实验的植物外源物质及其表达方式

疫苗种类	目标抗原	受体植物	表达体系	参考文献	
病毒疫苗	人乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)蛋白	番茄	稳定表达体系	[14]	
	HIV中和人单克隆抗体2G12	烟草	瞬时表达体系	[23]	
	SARS-CoV-2刺突蛋白的受体结合结构域	烟草	瞬时表达体系	[19]	
	人乳头状瘤病毒(HPV)疫苗	本氏烟草	瞬时表达体系	[28]	
	埃博拉病毒疫苗	烟草	瞬时表达系统	[29]	
	猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)的亚单位疫苗	烟草	瞬时表达系统	[30]	
	禽流感病毒血凝素	马铃薯	瞬时表达系统	[31]	
	非洲猪瘟P30重组蛋白	本氏烟草	瞬时表达系统	[32]	
	诺瓦病毒VLP	生菜	瞬时表达系统	[29]	
	埃博拉病毒和西尼罗河病毒的治疗性单克隆抗体mAb	生菜	瞬时表达系统	[29]	
	HPV疫苗	生菜	瞬时表达系统	[33]	
	牛瘤病毒(BPV)病毒样颗粒	烟草	瞬时表达系统	[34]	
	人源轮状病毒VP7蛋白	花生	稳定表达系统	[35]	
	狂犬病病毒G蛋白	水稻	稳定表达系统	[36]	
	猪瘟E2融合蛋白	烟草	瞬时表达系统	[37]	
	癌胚抗原的单链Fv抗体	小麦	稳定表达系统	[17]	
	日本脑炎病毒(JEV)包膜蛋白(E)	水稻胚乳	稳定表达系统	[38]	
	ErbB2酪氨酸激酶受体	烟草	瞬时表达系统	[21]	
	高尔基病疫苗	$\alpha$ -L-艾杜糖苷酶	玉米种子胚乳	稳定表达系统	[39]
	细菌疫苗	LTB-ST	烟草	瞬时表达系统	[40]
幽门螺旋杆菌ureB抗原		水稻胚乳	稳定表达系统	[41]	
寄生虫疫苗	抗轮虫保护性抗原As16	水稻胚乳	稳定表达系统	[42]	
	房尘螨(HDM)过敏原Der p 1	水稻胚乳	稳定表达系统	[43]	
	利什曼虫的前鞭毛体表面抗原(PSA)	本氏烟草	瞬时表达系统	[44]	
阿尔茨海默病疫苗	淀粉样 $\beta$ 肽A $\beta$ 42	水稻胚乳	稳定表达系统	[45]	

表2 植物来源的一些抗原实例

Table 2 Plant-derived antigen examples

抗原	表达系统	宿主	参考文献
猪O型口蹄疫病毒(FMDV)抗原表位融合结构蛋白VP1	瞬时表达	本氏烟草	[46]
呼吸道合胞病毒(RSV)F蛋白	瞬时表达	本氏烟草	[47]
霍乱毒素B亚基(CTB)	瞬时表达	本氏烟草	[48]
中东呼吸综合征冠状病毒刺突蛋白S1亚基抗原	瞬时表达	本氏烟草	[49]

很强的免疫原性和生物学活性, 且不含病毒核酸, 没有复制能力, 也不具有感染性, 因此病毒样颗粒疫苗安全性较高。王跃驹等<sup>[50]</sup>于2019年利用生菜作为表达平台, 成功生产病毒样颗粒的乙肝VLP疫苗, 接种后新西兰白兔产生免疫, 并通过ELISA和假病毒颗粒中和试验验证了其生物活性, 发现乙型肝炎病毒核心蛋白HBcAg会在体外自组装形成二十面体对称结构, 这种结构与天然乙肝病毒微粒的构象近似, 直径约为30 nm, 呈现较为均一的球形, 外源序列重复且高密度地展示在

VLP的表面, 这使得VLP进入机体后能够快速诱导机体产生针对外源性抗原的特异性体液免疫及细胞免疫应答, 具有极强的免疫原性与生物活性<sup>[51]</sup>; 在2020年, 他们又利用相同技术成功表达了具有生物活性的HPV疫苗, 该研究中产生的VLP具有二十面体对称结构, 这是类似于野生型VLP的形态<sup>[28]</sup>。与之结构类似的还有Rybicki在植物细胞中利用农杆菌转化法成功稳定表达的HPV假病毒粒子, 而该VLP疫苗已经进行了中和测定试验<sup>[33]</sup>。同样的技术还于2021年用于植物源牛瘤

病毒 (BPV) 病毒样颗粒和假病毒粒子的生产, BPV VLP 能够诱导产生针对 BPV 的特异性抗体, 包括 IgG 和中和 (VN) 抗体, 以及促进 Th1 和 Th2 细胞因子的分泌, 如 IL-2、IL-4 和 IFN- $\gamma$  [34]。猪细小病毒 (PPV) 导致母猪繁殖失败, Cho 等 [52] 在 2023 年用本氏烟草成功表达可以让猪抵御 PPV 的 PPV 1-82 VP 2 蛋白, 这些蛋白自组装成的 VLP 的直径范围在 22.3~25.7 nm, 在对怀孕母猪的抗病实验中, 接种了 PPV1-82 VP2 的母猪在感染 PPV 株后, 成功诱导了免疫反应并产下正常胎儿, 而未接种疫苗的母猪则流产, 这些结果表明, PPV1-82 VP2 VLP 疫苗在结构和功能上都显示出了作为有效疫苗候选物的潜力 (表 3)。

## 2.2 植物源疫苗的接种方式分类

### 2.2.1 注射疫苗

一些植物源疫苗通过肌肉注射的方式进行接种。肌肉组织中含有重要的免疫细胞, 这些细胞能够识别抗原并刺激免疫系统产生免疫应答, 可以使免疫细胞向其他免疫细胞发出警报并投入工作 [11]。当疫苗中含有佐剂或其他能增强免疫应答的成分时, 肌肉注射可以将疫苗反应限制在局部, 减少刺激和炎症 [66]。2019 年, 一种植物源性四价病毒样颗粒流感疫苗完成了 3 期临床注射试验, 并取得了令人鼓舞的结果, 2021 年 3 月, 针对 SARS-CoV-2 的佐剂植物疫苗 (CoVLP) 开启了 3 期注射试验 [9]。Medicago 公司开发的 CoVLP+AS03 疫苗 (Covifenz, Medicago) 在各国、随机、安慰剂对照试验中表现出可有效预防由一系列变异引起的

COVID-19, 其注射功效范围从针对症状感染的 69.5% 到中重度疾病的 78.8% [67]。该疫苗是世界首个获批的植物源人体疫苗, 于 2022 年 2 月 24 日获得加拿大卫生部的批准 [67]。

### 2.2.2 口服疫苗

通过将抗原表达在植物中, 然后将植物材料制成口服疫苗, 可以实现更方便、更广泛的疫苗接种。虽然口服疫苗的研发仍面临一些挑战, 但其潜力巨大。张玉满等 [68] 发明了一种利用枸杞作为 TMV 瞬时表达外源蛋白的生物反应器并成功表达了 GFP 外源报告基因, 可将该体系用于口服疫苗的研发与生产。幽门螺旋杆菌 ureB 抗原基因被 Gu 等 [41] 克隆到 pCAMBIA1301 质粒中, 位于 CaMV35S 启动子和八氨酸合酶 (OCS) 终止子之间的 gus ( $\beta$ -葡萄糖苷酶) 报告基因的 5' 端, 通过农杆菌介导的转化将其导入水稻基因组。水稻可用于口服疫苗的研发, RT-PCR 和 Western blot 分析也验证了水稻植物中 ureB 基因的表达。这些结果为进一步研究可食用转基因水稻在幽门螺旋杆菌疫苗的研发奠定了基础。Lei [69] 还报道了一种有助于治疗乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的转基因生菜。该研究设计了两种针对 HBV 表面抗原 (HBsAg) 的人工 miRNA (amiR471 和 amiR519), 并在稳定的转基因生菜品种中单独表达, 将这些生菜喂食小鼠, 使小鼠产生积极免疫反应。Wang 等 [38] 利用农杆菌介导的转化方法生成了表达日本脑炎病毒 (JEV) 包膜蛋白 (E) 的转基因水稻, 该基因在双花椰菜花斑病毒 (CaMV 35S) 启动子的调控下进行表达, 在叶片中的表达水平为 1.1~1.9  $\mu\text{g}/\text{mg}$  总可

表3 植物来源的一些包膜 VLP 的实例

Table 3 Examples of some plant-derived enveloped VLPs

抗原	表达系统	植物宿主	参考文献
Influenza A H5N1 HA	用质体蓝素表达载体瞬时表达	本氏烟草 <i>N. benthamiana</i>	[53-55]
HBsAg L protein	稳定的转基因植物	烟草 Tobacco	[56-57]
Dengue-3 capsid, prM/M and E	稳定的转质体叶绿体表达	莴苣 Lettuce	[58]
HBsAg VLP displaying HIV-1 ENV and GAG epitopes	稳定的转基因植物	番茄 Tomato	[59]
HBsAg VLP displaying HIV-1 polyepitope	稳定的转基因植物	烟草 Tobacco	[60-62]
		拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	
HBsAg VLP displaying HBV preS1 epitope	稳定的转基因植物	水稻 Rice	[63]
HBsAg VLP displaying full-length GFP	用非病毒载体瞬时表达	本氏烟草 <i>N. benthamiana</i>	[64]
HIV-1Gag VLP displaying gp41	MagnICON“解构”病毒载体的瞬时表达	本氏烟草 <i>N. benthamiana</i>	[65]

溶性蛋白。对小鼠进行转基因水稻植物蛋白提取物的口服免疫后，能够检测到针对E蛋白的黏膜免疫反应。

### 2.2.3 鼻腔滴注接种

一种基于腺病毒载体的疫苗，通过鼻腔滴注接种给小鼠和非人灵长类动物，结果显示单剂量鼻腔接种可完全保护上下呼吸道，Kehagia等<sup>[70]</sup>开发的疫苗通过鼻腔滴注给恒河猴接种，结果显示鼻腔接种比肌肉注射诱导的中和抗体水平更高，由此可知鼻腔滴注接种可直接刺激鼻腔黏膜免疫系统，产生局部免疫反应，同时也能诱导全身免疫反应。目前尚未有用于鼻腔滴注接种的植物源疫苗获批上市，但相关研究正在进行，如Chen等<sup>[71]</sup>将甘草酸二铵(DG)研制成植物体(DG-P)以诱导鼻腔免疫反应并增强吸收。

## 2.3 制备植物源疫苗的宿主分类

植物源疫苗的宿主类型有很多，根据使用的宿主不同，如烟草、小麦、马铃薯等模式宿主物种，可以对植物源疫苗进行基本归类。宿主植物的选择取决于所生产的蛋白质的类型和生产规模、产物大小以及翻译后修饰等因素<sup>[72]</sup>。

### 2.3.1 非食用植物

本氏烟草是植物源疫苗研发中使用最广泛的实验宿主，因为它对许多病毒都易感。其减弱的免疫系统使得遗传物质可以成功地被植物宿主接受而不被排斥。本氏烟草也被用于商业用途，如激素、抗体、酶、治疗剂和疫苗等的生物制造，具有在DNA转入后几天内制造外源蛋白的潜力<sup>[9]</sup>。它能够快速生产重组蛋白，适合于快速响应大流行疫苗的需求<sup>[9]</sup>。如Vanderburgt等<sup>[30]</sup>表达猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)的亚单位疫苗，用到了本氏烟草，既为动物使用的疫苗也为人用植物源疫苗的研发提高了可行性。Medicago公司利用本氏烟草通过瞬时表达系统生产了四价、重组病毒样颗粒(VLP)流感疫苗，且这种疫苗在临床试验中显示出良好的安全性和免疫原性<sup>[67]</sup>。Buetow等<sup>[47]</sup>利用本氏烟草通过瞬时表达系统表达了传染性法氏囊病病毒的VP2蛋白。Kumar等<sup>[73]</sup>归纳了一些在烟草中表达的疫苗，如Claire等<sup>[74]</sup>用烟草表达

了肺炎链球菌的Ⅲ型荚膜多糖，并在小鼠中诱导产生了抗肺炎链球菌多糖的血清抗体，他们还利用烟草表达炭疽保护性抗原(PA)，通过肌肉注射免疫小鼠，诱导产生针对炭疽的免疫保护反应<sup>[75]</sup>。烟草还可以用于表达结核分枝杆菌的多种抗原，如Ag85B、ESAT-6、MPT64、MPT83等，这些抗原已投入疫苗开发<sup>[73]</sup>。除此之外，还有其他非食用植物宿主被用于生产植物源疫苗，1999年Andrés等<sup>[76]</sup>首次将编码口蹄疫(FMDV)病毒结构蛋白的基因VPI转入紫花苜蓿中，在饲喂小鼠后，小鼠对口蹄疫病毒产生抗性。这项研究展示了紫花苜蓿作为植物源疫苗生产的潜力。Venkataraman等<sup>[77]</sup>在生产SARS-CoV-2刺突蛋白的受体结合域(RBD)的研究中用到了蕨藜苜蓿A17细胞和烟草细胞(BY-2)，这项工作展示了苜蓿和烟草细胞悬浮培养作为疫苗生产宿主的潜力，通过体内外分析已成功表达并验证了多种疫苗抗原的功能性。AgroSciences在2006年获得了美国农业部(USDA)批准的首个基于HN的NDV疫苗，该疫苗是在烟草衍生的悬浮细胞系中生产的<sup>[78]</sup>。首个由植物生产的重组蛋白Taliglucerase alfa获得了FDA的批准，它是在胡萝卜悬浮培养中表达的<sup>[77]</sup>。

这些疫苗的成功表达和免疫原性验证表明了利用植物作为宿主的潜力和应用前景，除此之外，已经成熟应用于植物生物反应器的宿主类型如拟南芥和棉花也拥有用于植物源疫苗生产的巨大潜力<sup>[60-62]</sup>。

### 2.3.2 可食用植物

玉米、土豆、生菜和水稻等可食用植物可以用于口服递送植物源治疗性蛋白质。它们的优势在于低成本、易于储存，接种只需要口服即可，并且服用无需注射的疫苗接种方式易于对不同年龄的患者进行管理，能够在疫苗分发期间实现快速和有效的大规模部署。在陈亚波<sup>[79]</sup>的研究中，新城疫病毒(NDV)的血凝素-神经氨酸酶(HN)和融合(F)蛋白可以在转基因玉米中表达，且小鸡口服转基因玉米的种子和叶片时，成功产生了针对两种NDV抗原的免疫反应。2012年，He等<sup>[39]</sup>成功表达了用于治疗人黏多糖贮积症的 $\alpha$ -L-艾杜糖苷酶，宿主是玉米种子胚乳，宋长征等<sup>[31]</sup>

以马铃薯为宿主成功表达了禽流感病毒血凝素疫苗。中国科学院华南植物园联合阿根廷研究人员通过农杆菌介导的遗传转化方法获得了能稳定遗传并能高表达肠出血性大肠杆菌 O157:H7 抗原的转基因生菜，这些抗原能有效激活免疫反应。这些转基因生菜具有制成动物口服疫苗的潜力，能够诱导小鼠产生黏膜免疫反应<sup>[80]</sup>。张改平院士团队<sup>[18]</sup>在 2023 年成功用水稻生产经典猪瘟病毒 (CSFV) E2 蛋白疫苗和新城疫病毒 HN 蛋白疫苗。Imani 等<sup>[81]</sup>进行了在胡萝卜中表达幽门螺杆菌和大肠杆菌的可食用疫苗的研究。一些在叶绿体中表达的抗原蛋白，可随着植物组织的食用而被摄入，刺激人体免疫系统产生免疫反应，如在生菜叶绿体中表达的针对登革病毒的四表位多聚肽抗原，有望用于登革病毒 ELISA 检测试剂盒的商业开发，也可探索作为可食用疫苗的潜力<sup>[82]</sup>。这些例子展示了可食用作为植物源疫苗宿主的潜力，特别是在生产动物疫苗和人类治疗性蛋白方面。

### 3 植物源疫苗的生产流程

植物源疫苗的生产是一个多阶段的工程，涉及基因工程、植物培养、蛋白质提取与纯化。现有的植物表达平台具有许多超越传统生产方式的优势，如高可扩展性、低成本、真核蛋白质修饰和安全性的提高，以及不可模仿的瞬时表达系统，以使治疗剂和疫苗能够以前所未有的速度表达，从而对抗可能的流行病等<sup>[72]</sup> (图1)。

#### 3.1 基因工程

首先，需要将编码疫苗抗原的基因通过基因工程技术 (农杆菌介导的转化、基因枪) 转入植物中，而根据外源基因转入植物体的方式以及表达的时效可以将转化过程分为瞬时表达系统和稳定表达系统。瞬时表达是指宿主染色体 DNA 并不与外源基因发生整合，外源基因进入细胞的 12 h 便可表达，且表达产物能在 4 d 内检测到的一种表

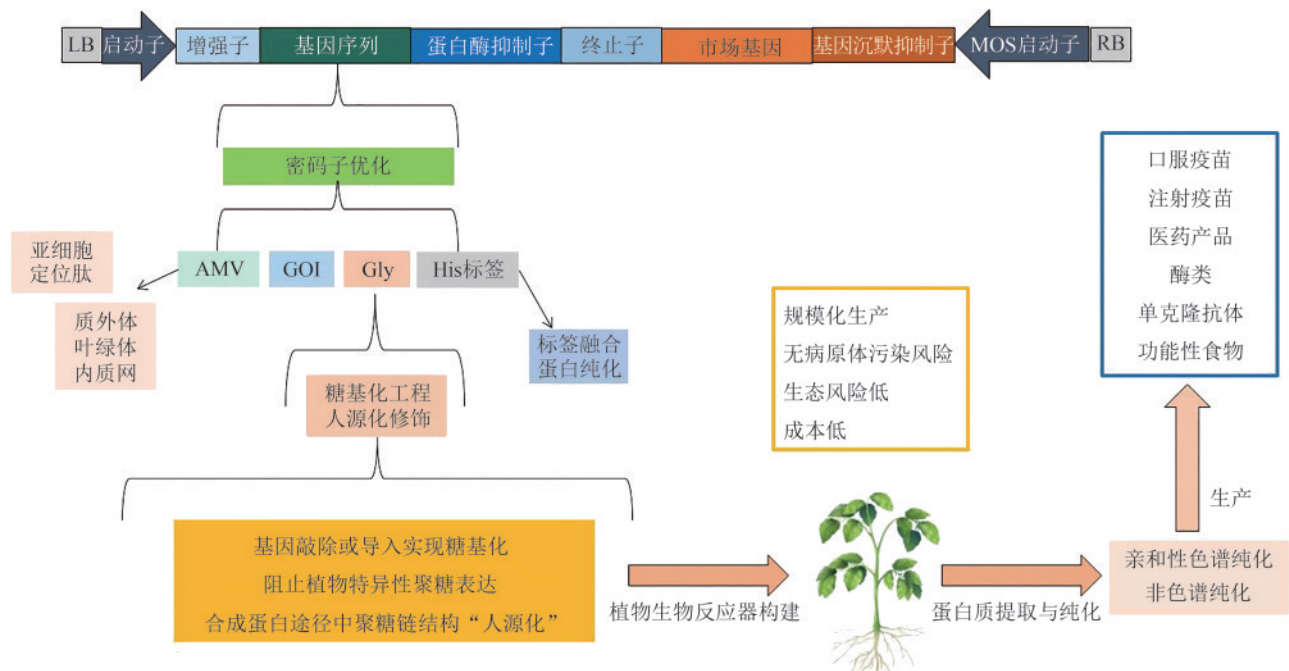


图1 植物源疫苗的生产流程<sup>[5]</sup>

(基因设计构建质粒载体，将载体通过适当的方法导入宿主植物，让目的基因在宿主植物体内表达，收集表达目标蛋白的植物组织，研磨后提取蛋白，纯化后得到产品)

Fig. 1 The production process of plant-derived vaccines<sup>[5]</sup>

(Design and construct the plasmid vector for the gene. Introduce the vector into the host plant using appropriate methods. Allow the target gene to be expressed within the host plant. Collect the plant tissues that express the target protein. Grind the tissues to extract the protein. Purify the protein to obtain the final product.)

达体系。植物中建立瞬时表达系统的方式为病毒感染法以及农杆菌介导法<sup>[74]</sup>。俞瑶等<sup>[83]</sup>利用农杆菌真空渗透法,在较短实验周期之内做到了有效的瞬时表达。郎遥玲等<sup>[84]</sup>利用农杆菌介导注射法建立了番茄子叶瞬时表达系统。刘悦等利用马铃薯Y病毒介导的植物瞬时表达系统成功表达了非洲猪瘟P30重组蛋白疫苗<sup>[32]</sup>。烟草花叶病毒目前是植物瞬时表达应用最广泛的病毒,应用其生产的疫苗等医药蛋白已进入了临床试验<sup>[85]</sup>。

稳定表达系统是指将目标抗原基因稳定地导入植物基因组中,使其在世代间持续表达<sup>[86]</sup>。目前应用最广泛的是稳定核表达和稳定叶绿体表达,而稳定核表达主要是农杆菌介导转化法,稳定叶绿体表达主要使用基因枪和显微注射法<sup>[87]</sup>。Daniell等<sup>[88]</sup>于2007年提供了哺乳动物对感染性病原体免疫力疫苗的方案,其用到了叶绿体这种质体转化以产生保护性抗原的载体,并成功表达药物蛋白。叶绿体表达系统会丧失真核表达系统部分翻译后修饰方面的优势,比如糖基化、泛素化和磷酸化等,这些修饰可能影响蛋白的功能、定位、稳定性及与其他分子的相互作用,但叶绿体表达系统也具有自身的修饰能力,可进行一些基本的翻译后修饰过程,如二硫键形成、酯化和磷酸化等,能够满足部分蛋白的正确折叠和功能需求<sup>[89]</sup>。叶绿体表达系统适合生产亚单位疫苗如针对脊髓灰质炎病毒的加强型疫苗CTB-VP1,VP1属于病毒衣壳蛋白,其在烟草叶绿体中的表达具有免疫效果好、生产成本低等优势。还有霍乱毒素B亚基、人胰岛素原的融合蛋白等,其表达量高,且通过注射能展现出相应的功效<sup>[90]</sup>。某些病毒样颗粒的组装也不依赖糖基化修饰,因此可以使用叶绿体表达系统进行研发,如在烟草叶绿体中成功表达的口蹄疫病毒主要抗原VP1基因、猪瘟病毒主要抗原E2基因等用于动物免疫的植物疫苗抗原<sup>[90]</sup>。而对于一些需要复杂糖基化修饰才能具有正确抗原性和免疫原性的疫苗抗原,叶绿体表达系统无法满足其修饰需求,导致表达的抗原活性低或无活性,如某些流感病毒疫苗抗原等,核表达系统更适合此类疫苗的生产<sup>[82]</sup>,此外,叶绿体中的蛋白可能面临不同的降解风险,对于一些对稳定性要求极高、在叶绿体中易被降解的疫

苗蛋白,核表达系统可通过内质网等细胞器为蛋白提供更稳定的折叠和保护环境,减少蛋白降解,更具优势<sup>[89]</sup>。常见的表达载体有Gateway、p1303、P33cym11、pBI 121、pBI 221等<sup>[91]</sup>,常用的植物宿主表达器官一般为作物种子胚乳,如Matsumoto等<sup>[42]</sup>用水稻胚乳稳定表达抗轮虫*Ascaris suum*的保护性抗原As16。该抗原作为与霍乱毒素B亚单位(CTB)融合的嵌合蛋白,其在胚乳中的表达水平达到了50 μg/g种子。将转基因(Tg)水稻种子结合霍乱毒素(CT)作为黏膜佐剂喂给小鼠后成功诱导了特异性抗原As16的血清抗体反应。这表明,水稻稳定遗传转化递送的抗原作为一种预防性可食用疫苗,可以控制动物的寄生虫感染。Yoshida等<sup>[45]</sup>将针对阿尔茨海默病(AD)的Aβ 42基因与绿色荧光蛋白基因融合后,采用农杆菌法转入水稻中。当转基因的水稻被口服给小鼠时,血清中的抗Aβ抗体滴度明显上升。当小鼠被喂食煮熟的转基因水稻时,观察到了相同的结果。这些结果表明,使用水稻稳定表达的可食用疫苗对治疗阿尔茨海默病是可行的。Nochi等<sup>[92]</sup>开发了一种基于水稻稳定表达的口服疫苗,该疫苗表达霍乱毒素B亚单位(CTB),其表达受特定于胚乳的表达启动子2.3 kb谷蛋白GluB-1控制,并经过密码子优化以便在大米种子中表达,且每颗种子的胚乳中平均存储了30 μg的CTB,当以黏膜方式喂食时,表达CTB的种子被M细胞吸收,成功诱导产生具有中和活性的CTB特异性血清IgG和黏膜IgA抗体。这些基于水稻稳定遗传转化的疫苗为大规模口服接种人群提供了一种高度实用和具有成本效益的策略以应对感染<sup>[93]</sup>。Suzuki等<sup>[94]</sup>测试了新开发的亚单位疫苗对支气管哮喘进行口服免疫治疗的可行性,该疫苗中包含了螨虫过敏原(Der p 1)的一个片段(p45-145),这个片段被包裹在转基因(Tg)水稻种子的内质网源性蛋白体中,且接种后明显降低了过敏原特异性IgE和IgG的血清水平,因此这种疫苗不会引起非特异性抑制,这在许多口服耐受方案中是一个突破。结果表明,基于水稻稳定表达的新疫苗策略是针对包括支气管哮喘在内的过敏疾病的过敏原特异性口服免疫治疗的一个有前途的方法。而Yang等<sup>[43]</sup>表达一种房尘螨(HDM)过敏原Der p 1,C端带

KDEL 标签的 Der p 1 过敏原在胚乳特异性的 GluB1 启动子的控制下, 特定积累在种子胚乳组织中, Der p 1 的最大浓度达到了 58  $\mu\text{g}$ /粒种子, 存在于内质网 (ER) 来源的蛋白体 I (PB-I) 中。结果表明, 稳定转基因 Der p 1 水稻种子是治疗 HDM 过敏的安全潜在口服疫苗。基因枪转化法又叫粒子轰击法, 将 DNA 吸附在直径几微米的金粉或者钨粉上, 然后将微粒高速打入外植体, 高速微粒可以穿透植物细胞的细胞壁, 微粒进入细胞后, 吸附的 DNA 也从微粒中解离出来并在植物细胞中表达<sup>[95]</sup>, 如唐琳等<sup>[96]</sup>用高压氦气式基因枪成功将外源基因导入番红花愈伤组织, 张馨悦<sup>[97]</sup>使用基因枪转化了萱草的花粉。由于农杆菌转化法拥有更稳定高效的特性, 所以在植物源疫苗研发生产的过程中, 基因枪的使用概率并不高<sup>[95]</sup>。

### 3.2 植物培养

在遗传转化后的植物培养过程中, 需要对基因工程转入的抗性基因用相应的抗生素进行筛选培养以及分化培养, 转化成功的植物可以在温室或田间培育, 还需要根据不同植物以及不同生长情况给予激素或肥料以促进其生长, 从而增加生长过程中目标抗原蛋白的产量。在用水稻愈伤组织进行遗传转化后, 共培养时考虑农杆菌和水稻细胞的活性, 因此需要在 25  $^{\circ}\text{C}$  暗箱培养 2~3 d, 而筛选阶段则需要将温度控制在 28~32  $^{\circ}\text{C}$ , 不同的筛选和分化条件也决定了后续光周期的供给时间<sup>[98]</sup>。烟草的幼嫩叶片、茎段和带有叶片的茎段作为稳定转化的最常用的外植体, 在 MS+0.1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 的培养基中能诱导形成不定芽和根, 在 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 的培养基和 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 的培养基中能脱分化形成愈伤组织<sup>[99]</sup>。瞬时表达系统对于培养条件的要求更简洁, 不需要频繁更换, 如烟草对光照强度的需求仅需考虑两个不同的生长阶段, 烤烟苗期的光饱和点在 1 万~2 万 lx [178.6~357.1  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ], 大田期在 3 万~5 万 lx [535.7~892.9  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ], 光照周期 16 h/d, 以及日夜温度控制在 28/21  $^{\circ}\text{C}$  时最有利于烟草植株的生长以及蛋白的表达<sup>[100-101]</sup>。

### 3.3 蛋白提取与纯化

成熟植物的叶片或其他组织被收获, 并通过破碎细胞、分离蛋白质、色谱技术等一系列生物化学方法提取和纯化抗原蛋白。纯化后的蛋白质或病毒样颗粒 (VLP) 与适当的佐剂混合, 形成疫苗制剂, 增强免疫反应。不同的重组蛋白需要不同的提取和纯化工艺, 蛋白质的回收和纯化方面也需要广泛的研究<sup>[72]</sup>。在植物生产的候选疫苗的下加工过程中, 已成功使用了重组蛋白提取和纯化策略, 如热烫、蔗糖密度梯度离心和  $\text{Ni}^{2+}$  亲和色谱, Yang 等<sup>[102]</sup>开发了基于 ZIKV 包膜 (E) 蛋白的烟草亚单位疫苗, 并研究了其在小鼠中的免疫原性, PzE 可以通过一步  $\text{Ni}^{2+}$  亲和色谱过程纯化至均一性 >90%。Pyrski 等<sup>[103]</sup>使用蔗糖密度梯度离心法将 HBcAg 抗原纯化至 43% 且保持了其抗原性, 通过 ELISA 和蛋白免疫印迹法得到了证实, 同时在透射电子显微镜下保持了其 CLP 结构。在小鼠中, 肌肉注射 2 $\times$ 10  $\mu\text{g}$  的 HBcAg 也引发了显著的反应。植物提取物包含复杂的宿主细胞蛋白 (HCP), 热汤焯水可以去除约 80% 的 HCP, 从而简化进一步的纯化步骤, 但这只有在目标蛋白具有热稳定性时才能实现, Menzel 等<sup>[104]</sup>开发了一种焯水和色谱法相结合的方法, 以纯化在烟草叶片中瞬时表达的热稳定性疟疾疫苗候选物 FQS。将焯水温度从 80  $^{\circ}\text{C}$  降低到 70  $^{\circ}\text{C}$  可以恢复抗体结合, 同时仍然沉淀大部分 HCP, 可能是由于蛋白酶的热失活, 焯水抑制了 FQS 在植物提取物中的降解, 通过阶段洗脱最终达到了约 72% 的纯度和 60% 的回收率, 纯化后得到的产率为 9 mg/kg, 这种热烫焯水的方式为粗分离添加了候补方案。

在整个纯化过程中, 会出现纯化失败或纯化效率低下的现象, 比如许多植物组织中富含的酚类化合物会干扰纯化, 这些物质在提取过程中会氧化并可能与 RNA 或蛋白质结合, 导致纯化失败。可以通过在提取缓冲液中加入还原剂如  $\beta$ -巯基乙醇、二硫苏糖醇 (DTT) 或半胱氨酸, 以及使用螯合剂如聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和聚乙烯聚吡咯烷酮 (PVPP) 来解决, 这些物质可以与酚类化合物结合从而防止其氧化。此外, 植物组织中的多糖可能会与 RNA 或蛋白质结合沉淀形成难溶的胶状

物,影响纯度,使用低浓度乙醇沉淀多糖,或使用醋酸钾沉淀多糖法可以弱化多糖的影响<sup>[105]</sup>,而面对DNA污染,可以使用DNA酶进行消化处理,然后再用磁珠或吸附柱纯化。

植物会表达泛素化的多聚体蛋白,而泛素化的降解标记作用会促进蛋白水解,影响目标蛋白的亚细胞定位以及蛋白质互作,因此泛素化目标蛋白的鉴定与纯化技术有一定挑战性, Lee等<sup>[106]</sup>提供了一种用于纯化泛素化目标蛋白的方式,用基于泛素相关结构域——串联泛素结合体TUBE来保护目标蛋白免受去泛素化和酶解。

在纯化植物外源蛋白的过程中,如何精确去除掉内源蛋白一直是有挑战性的,如一种光合植物酶——核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RuBisCO),这种酶占可溶性叶蛋白的50%,因此,去除RuBisCO等内源蛋白对于从植物材料中纯化重组蛋白至关重要。Matsushima等<sup>[107]</sup>开发了一种冻融处理法,用于从表达重组绿色荧光蛋白(GFP)的本氏烟草中去除RuBisCO,将粗提物或上清液冷冻于-30℃后解冻,大部分RuBisCO将通过离心沉淀出来,而GFP没有明显失活或产量降低。使用该方法,无需特定试剂或设备就可以让RuBisCO大小亚基的含量明显降低,许多核糖体蛋白也从提取物中被去除。该方法改进了从植物材料中纯化重组蛋白的工艺,但长时间冷冻会损坏重组 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶(GUS),因此,需要考虑这种处理方式在不同重组蛋白生产过程中的适用性。

### 3.4 疫苗配制

为增强疫苗免疫原性,需向纯化后的抗原蛋白溶液中加入合适佐剂,如铝佐剂、油乳佐剂等。铝佐剂可吸附抗原蛋白,延长其在体内存留时间,刺激更持久免疫应答;油乳佐剂能使抗原在体内缓慢释放,放大免疫反应。要精确调节疫苗溶液的pH值至人体适宜范围(通常接近中性),并构建稳定的缓冲体系,维持疫苗稳定性与活性,防止蛋白变性失活,确保疫苗在储存及运输中质量稳定,注射后也减少对人体正常生理环境的干扰。根据疫苗特性,添加糖类、蛋白质保护剂等保护

抗原蛋白活性,增强疫苗稳定性。如在冻干疫苗中添加蔗糖、海藻糖等糖类作为保护剂,防止蛋白因冷冻干燥过程中的低温与脱水而失活;添加明胶、山梨醇等作为稳定剂,防止蛋白聚集和降解,延长疫苗保质期。配制过程中还需深度去除残留杂质,如植物来源的色素、酚类、核酸等,以保证疫苗纯净度与安全性。常用方法有过滤除菌、活性炭吸附、超滤等,确保疫苗符合临床应用的严格标准。

## 4 植物源疫苗的优化

转基因植物疫苗的制备主要是通过确定目标抗原、选择受体植物、构建植物表达载体、转化、表达及检测等步骤组成<sup>[91]</sup>,可以从这几个方面对研发过程进行优化。

### 4.1 载体的优化

在植物源疫苗的开发中,选择合适的表达载体是至关重要的,如质粒、病毒或其他表达系统,并且需要考虑不同载体的复制能力、稳定性、毒性、毒性基因的缺失等因素。关于表达载体选择的考虑因素有复制能力,即选择能够在植物细胞中高效复制的载体,以确保高水平的基因表达,在研发过程中,也可以使用植物生长调节剂调节复制和表达效率<sup>[108]</sup>。例如,2012年Rosenthal<sup>[109]</sup>构建了经修饰的基于菜豆黄矮病毒(BeYDV)的载体,该载体被设计为允许多个重组基因的共表达,从而提供了快速且成本效益高的大规模生产重组蛋白用于医药和工业的载体工具。Lai等<sup>[29]</sup>使用菜豆黄矮病毒的双生病毒复制子系统构建了新型载体,成功在莴苣中高水平表达诺瓦病毒VLP和针对埃博拉病毒、西尼罗河病毒的治疗性单克隆抗体mAb。喻文聪等<sup>[110]</sup>使用PCR对BjuA03.TTG2基因上游启动子序列片段进行特异性扩增并构建到pCAMBIA1304植物表达载体中,促进了下游目的片段的表达。不同载体的选择会直接影响到疫苗基因的表达效率和稳定性,选择能够在植物体内稳定存在的载体,避免基因丢失或突变,还要确保所选载体对宿主植物无毒性,

不会影响植物的生长和发育，此外还需要考虑避免毒性基因的缺失造成的影响，譬如从载体中去除任何可能对人类或动物有害的毒性基因，确保疫苗的安全性。Takita等<sup>[111]</sup>开发了一种新的二元质粒（pTACAtg 1），在克隆位点的两侧携带长的基因组DNA片段。将花椰菜花叶病毒35S启动子： $\beta$ -葡萄糖醛酸酶（35S:GUS）基因克隆到pTACAtg 1中，并将其与pTACAtg 1上的长侧翼序列一起导入植物中。在分离的转基因植株中，拷贝数减少，检测到的GUS表达比那些携带插入没有侧翼区的对照植株更稳定。在他们的研究结果中，转基因拷贝数的减少抑制了其基因表达的变异和沉默，因此pTACAtg 1载体适用于稳定转化体的产生和转基因的表达分析。

启动子是控制基因表达的关键元件，选择和优化合适的启动子可以显著提高目标基因的表达水平。使用强启动子，如CaMV 35S启动子，可以增强基因的表达<sup>[112]</sup>，也可以根据疫苗的应用需求，选择特定组织或细胞类型特异性表达的启动子，在需要控制基因表达时间的情况下，可以使用诱导性启动子，如受热或光诱导的启动子<sup>[113]</sup>。而启动子的优化方法使用较多的为口服疫苗，例如水稻和玉米的胚乳启动子。熊雨飞等<sup>[114]</sup>公开了一种水稻种子胚乳优势表达启动子pNFYA2的制备方法及应用，该启动子可以用于驱动外源性基因在水稻种子胚乳中优势表达。魏祥进等<sup>[115]</sup>公开了一种水稻胚乳特异性表达启动子pEnd2，该启动子可以启动外源基因在植物的胚乳中特异性表达，适用于种子含胚乳的单子叶植物或胚乳型双子叶植物。宋任涛等<sup>[116]</sup>首次分离到一个可在玉米胚乳中特异性表达的启动子PMAP，从实验水平验证了该启动子适用于启动目标基因在玉米胚乳中特异性表达，而在其他组织中低表达或不表达，为植物基因工程表达载体构建提供了合适的调控元件。

优化转录终止子是确保目标基因准确终止转录的关键步骤。根据目标基因的需求，选择适当的终止子。常用的终止子包括NOS（nopaline synthase terminator）、OCS（octopine synthase terminator）等<sup>[117]</sup>。而很多研究发现拟南芥热休克蛋白（heat shock protein, HSP）终止子、大豆vspB终止子、烟草无内含子伸展蛋白（extensin）终止子（EU）

和本氏烟草肌动蛋白3（NbACT3）终止子在靶蛋白表达方面比NOS终止子更有效<sup>[117]</sup>。而去除了天然内含子的伸展蛋白终止子与NOS终止子相对比，绿色荧光蛋白（green fluorescent protein, GFP）表达量增加了13.5倍<sup>[118]</sup>。

为了提高目标基因在植物中的表达水平，也可以采用多种启动子和增强子的组合。由重组刺突（S）糖蛋白表达为病毒样颗粒（VLP），并结合了佐剂（Adjuvant System 03, AS03），这种疫苗利用了植物的生物合成能力，通过优化的启动子和增强子组合提高抗原蛋白的表达<sup>[119]</sup>。李文博研究组和Rosenfeld研究组合作提出了增强子释放与定位（enhancer release and retargeting, ERR）模型，解释了增强子如何选择启动子以及在疾病中可能的作用<sup>[120]</sup>，虽然这并非直接关于植物源疫苗的研究，但它提供了增强子和启动子互作的理论基础，对设计植物中的基因表达调控具有启发作用。

尽管优化的病毒载体可以提高表达效率，但其应用可能面临诸多挑战。首先，载体稳定性是一个重要问题，不稳定的载体可能导致基因丢失或表达水平下降，影响疫苗生产的连续性和效率。其次，病毒载体通常对插入片段的大小有限制，这可能妨碍较大基因片段的插入，从而限制了所表达蛋白的复杂性或功能完整性。此外，病毒载体的宿主范围相对较窄，这意味着它们可能只能在特定的宿主细胞中有效表达，这会限制疫苗在不同植物系统中的灵活性和广泛应用。这些问题都可能对疫苗的开发和应用产生制约，需要通过进一步的研究和技术创新来解决。

## 4.2 目标抗原的选择优化

一般情况下，植物源疫苗产品都是亚单位疫苗，仅含有具有免疫原性的抗原结构基因，通常是病原体表面糖蛋白的基因，如果是易于变异的病原体，则选取各亚型共有的核心序列作为主要保护性抗原基因序列，且不含其他遗传信息<sup>[91]</sup>。此外，植物源疫苗的研制需根据疾病或症状来选择合适的目标抗原，如每年秋冬季广为流行的由轮状病毒引起的腹泻，贾宇臣等<sup>[35]</sup>使用了植物油

体作为表达载体,在花生中表达了轮状病毒抗原蛋白G3VP7。目标蛋白还需具有足够的免疫原性以激发机体产生免疫应答,如冠状病毒样颗粒COVID-19候选疫苗(CoVLP)就是由表达为病毒样颗粒(VLP)的重组刺突(S)糖蛋白组成,这种S蛋白是大多数COVID-19疫苗中的抗原,能引发高效的机体免疫应答<sup>[120]</sup>。张改平院士团队<sup>[121]</sup>提出了一种通用的“头对尾”二聚体疫苗抗原模型,这种模型通过重新构建抗原来暴露多对具有合适距离的表位,从而有效地激活B细胞。该模型在水稻胚乳表达系统中成功制备了高效的重组抗原Osr2HN,且该抗原在水稻胚乳中的表达量高达3.7 mg/g,显示出与传统疫苗相比更高的免疫效价。

所选的抗原还应具有安全性和稳定性,且需要在植物中能做到高效表达,这样既不会引起过度的免疫病理反应或不良反应,也能在收获、加工和储存过程中保持其功能,降低成本并提高产量。赵连三等<sup>[122]</sup>研发了一种可高效安全表达的新型核酸疫苗,该疫苗注入机体后,在CMV启动子作用下可高拷贝转录目标基因,且在转录与表达水平到达一定丰度后,可诱导转染的细胞进入凋亡过程,形成一种“自毁机制”以保证安全性。杨柳等<sup>[123]</sup>则是利用血清筛选试验和模拟胃肠液消化稳定性试验,得出结论:植物源人重组血清白蛋白OsrHSA有潜在致敏性,对牛奶过敏的人群需要慎重使用,为药物的安全性提出了建议。

许多植物源疫苗正在开发用于口服递送,例如,可食用植物如谷类作物、西红柿、玉米和水稻正在开发用于口服递送植物性治疗性蛋白质<sup>[124]</sup>,选择的目标抗原应具有配合口服递送的潜力。区永祥等<sup>[125]</sup>公开了一种利用表达O157:H7抗原的转基因生菜研制的口服疫苗。赖强等<sup>[126]</sup>提供一种猪圆环病毒Ⅱ型重组植物乳杆菌的制备方法,获得猪圆环病毒重组植物乳杆菌的培养物,可直接作为口服疫苗使用,能够有效地刺激机体产生抗体,显著降低猪圆环病毒Ⅱ型的感染率。

对于一些病原体,尤其是新出现或变异快速的病原体,获取其全面且准确的抗原信息存在困难。这使得难以确定具有最佳免疫原性和保护效

果的抗原序列,从而限制了目标抗原的选择范围。尽管通过各种优化手段可以提高抗原在植物中的表达量,但一些抗原可能由于自身的结构特点或与植物表达系统的兼容性问题,难以达到理想的表达水平,影响了疫苗的生产效率和成本效益。一种抗原可能在某种植物表达系统中能够高效表达,但在其他系统中则表达不佳,这增加了选择合适的表达系统和优化表达条件的难度,限制了目标抗原的多样性和灵活性,且病原体在进化过程中可能产生免疫逃逸机制,使得原本选定的目标抗原无法有效激发免疫系统对变异后的病原体产生免疫保护,对于一些高变异性病原体,这一风险更为突出,导致疫苗的时效性和有效性降低。

### 4.3 蛋白质修饰优化

植物被用作多种疫苗的表达系统。然而,植物中疫苗的表达有时会导致糖基化,比如N端封闭和糖链连接。糖基化是蛋白质修饰中最常见的类型之一,一般情况下对于疫苗的稳定性和免疫原性有着重要影响<sup>[127]</sup>,在植物源疫苗中,糖基化修饰的优化包括糖型结构人类化、特异性糖基化位点的选择、糖链分析和监控等<sup>[128-130]</sup>。通过基因工程技术,可以调整植物细胞内的糖基化途径,使其产生与人类细胞相似的糖型结构,从而减少免疫原性和增强疫苗的安全性<sup>[128]</sup>。Peele等<sup>[131]</sup>于2006年开发了改变高等植物蛋白质N-糖基化模式的内源和异源蛋白质,而不会影响植物的生长发育,还提供了基本上均质的糖基化谱。2017年,Hanania等<sup>[132]</sup>利用CRISPR/Cas9基因组编辑技术,敲除烟草BY2细胞悬液中的 $\beta(1,2)$ -木糖基转移酶(XylT)和 $\alpha(1,3)$ -岩藻糖基转移酶(FucT)基因,从而在一定程度上削弱了糖基化对免疫原性的影响,为生产强效生物制药产品提供了宝贵的平台。选择特定的糖基化位点,可以控制糖链的长度和分支,从而影响蛋白质的折叠和功能<sup>[133]</sup>。Yang等<sup>[43]</sup>研究中的植物来源的Der p 1经历了高甘露糖型糖基化结构的后转录修饰,与未糖基化的对应物相比,糖基化的Der p 1在体外表现出降低的IgE

结合能力，这将降低由IgE介导的过敏反应的风险，同时保持其触发适当的Th细胞反应的能力。

在优化糖基化修饰相关基因时，可能会出现编辑效率不高、脱靶效应等问题，影响糖基化修饰优化的效果和稳定性。植物细胞内的糖基化修饰途径非常复杂，涉及众多酶和代谢途径的相互作用，要精确调控这些途径以实现理想的修饰效果，难度较大，即使经过优化，某些疫苗抗原的糖基化修饰可能对免疫原性和稳定性的影响仍旧有限，无法显著提高疫苗的效果。

#### 4.4 与蛋白酶抑制剂的共表达

在植物源疫苗的生产过程中，下游过程中的蛋白质降解是影响产量和质量的一个重要因素。为了防止重组蛋白在植物体内被降解，可以采用抗蛋白酶的共表达策略<sup>[134]</sup>，即通过在植物中共表达特定的抗蛋白酶，如丝氨酸蛋白酶抑制剂或半胱氨酸蛋白酶抑制剂<sup>[134-135]</sup>，可以保护重组蛋白不被降解，但这种底物-蛋白酶相互作用仅在蛋白酶激活后发生<sup>[134]</sup>。根据所抑制的蛋白酶种类，植物蛋白酶抑制剂可以分为四大类：丝氨酸蛋白酶抑制剂、天冬氨酸蛋白酶抑制剂、半胱氨酸蛋白酶抑制剂和金属羧肽酶抑制剂<sup>[136]</sup>（表4）。

#### 4.5 抑制基因沉默

基因沉默抑制是植物源疫苗研究中的关键环节，它可以帮助调控目标基因的表达，从而优化疫苗的产量和质量<sup>[117, 152]</sup>。马婷等<sup>[153]</sup>在2016年体外合成了拟南芥U6-1 RNA基因和黄瓜花叶病毒（CMV）编码的沉默抑制蛋白2b基因，并通过农杆菌浸润法接种烟草，推测出GFP基因表达增强是由于核外输出的竞争导致输出到细胞质的保护性抗病毒mRNA减少，从而为改进植物源重组蛋白表达提供了新的思路。在植物源疫苗中，还存在一种高效的基因沉默抑制机制，即番茄丛矮病毒编码的P19蛋白，通过与siRNA结合从而抑制RISC复合体的形成，致使其无法特异性切割与该siRNA同源的靶mRNA<sup>[154]</sup>，如图2所示。Ma等<sup>[155]</sup>的研究中采用过P19蛋白共表达目的基因。此外，马铃薯卷叶病毒属编码的一种沉默抑制蛋白P0可以通过SKP1-CULLIN1复合体将一种RISC复合体——AGO1蛋白泛素化，从而介导AGO1的降解，AGO1的与核酸的结合活性也会受到其他沉默蛋白的影响，如AGO1的PAZ区与CMV编码的2b蛋白的结合会抑制AGO1与核酸链的结合<sup>[156]</sup>。而AGO1的降解或结合活性的减弱会导致基因沉默的过程受到抑制。其具体抑制机制还有待深入研究。小麦黄花叶病毒（WYMV）编码的P1蛋白和

表4 一些常用植物蛋白酶抑制剂

Table 4 Some commonly used plant protease inhibitors

植物蛋白酶抑制剂PI	参考文献
半胱氨酸蛋白酶抑制剂PhyCys家族	[137]
丝氨酸蛋白酶抑制剂家族	[138-139]
$\alpha$ -淀粉酶/胰蛋白酶抑制剂家族	[140]
南瓜胰蛋白酶抑制剂家族	[141]
芥菜胰蛋白酶抑制剂家族	[136]
天冬氨酸蛋白酶抑制剂家族	[142]
金属羧肽酶抑制剂家族	[143]
Bowman-Birk Ser蛋白酶抑制剂	[144]
烟草丝氨酸蛋白酶抑制剂II基因的胰蛋白酶(C1)和胰凝乳蛋白酶(T1)抑制域	[134]
水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂oryzacystatin-I	[145]
番茄组织蛋白酶D抑制剂(SICDI)	[146]
番茄半胱氨酸蛋白酶抑制剂SICYS 8	[147]
CaPR 4c	[148]
NbPotI	[149]
HsTIMP靶向基质金属蛋白酶	[150-151]

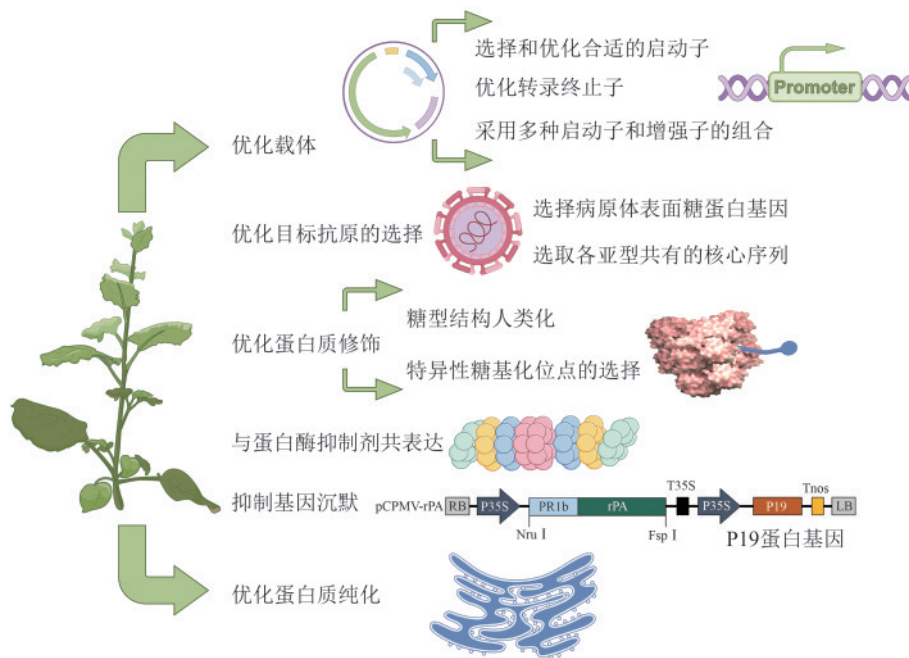


图2 植物源疫苗的优化

(植物源疫苗的优化可以通过优化载体, 优化目标抗原的选择, 优化蛋白质修饰, 让目的基因与蛋白酶抑制剂基因和沉默抑制基因共表达, 优化纯化过程来达成。图中P19蛋白基因共表达参考Ma等<sup>[155]</sup>的研究。本图由Figdraw绘制)

Fig. 2 Optimization of plant-derived vaccines

(The optimization of plant-derived vaccines can be achieved through the optimization of vectors, the selection of target antigens, the modification of proteins, co-expression of the target gene with protease inhibitor genes and silencing suppressor genes, and the optimization of the purification process. The co-expression of the P19 protein gene in the figure refers to the study by Ma et al<sup>[155]</sup>. This figure was created by Figdraw.)

P38蛋白机制类似, 通过与AGO1互作来行使沉默抑制功能。在陈道等<sup>[157]</sup>的实验中, P1蛋白通过干扰钙调蛋白相关的抗病毒RNAi防御来充当VSR, 进而促进病毒侵染。

沉默抑制技术主要针对植物细胞内的基因沉默机制, 但其对疫苗抗原表达的直接影响尚不完全明确。在某些情况下, 沉默抑制可能会对疫苗抗原的表达产生负面影响, 如改变抗原的糖基化修饰模式、影响抗原的折叠和组装等, 从而影响疫苗的免疫原性和保护效果(图3)。

#### 4.6 蛋白纯化优化

外源蛋白在植物细胞内还可能引起内质网胁迫, 影响蛋白的正确折叠和积累, 该情况可以通过优化内质网蛋白折叠与质量监控系统 and 增强内质网相关降解ERAD途径来处理 and 清除内质网中错误折叠的有缺陷的蛋白质, 可以提高外源蛋白的表达效率<sup>[158]</sup>, 维持内质网稳态<sup>[159]</sup>, 还可以解析内质网中错误折叠蛋白的积累以及细胞在生理

和病理状态下的应激反应, 调节内质网中的氧化还原状态, 调节二硫键的形成, 可以优化UPR以提高外源蛋白的表达效率<sup>[160]</sup>, 促进蛋白质的正确折叠<sup>[161]</sup>, 便于后续纯化。但这些手段在实际应用中可能存在调控不够精确、效果不显著等问题。例如, 通过过表达某些分子伴侣来促进蛋白折叠, 但过量表达可能会对细胞生理产生负面影响, 甚至干扰其他正常蛋白的折叠过程。不同外源蛋白在植物细胞内的折叠和积累情况差异较大, 对于一些结构复杂或难以正确折叠的蛋白, 优化内质网环境可能无法取得理想的表达效率和质量提升效果。此外, 植物细胞的生理状态、环境因素等也会对外源蛋白的表达和折叠产生影响, 导致优化效果不稳定。

在物理方面, 康跻耀等<sup>[162]</sup>发明了一种植物蛋白纯化用研磨装置, 通过第一研磨槽和第二研磨槽可以对植物蛋白原料进行双层研磨, 保证研磨质量, 从而保证纯化质量, 同时该装置为一体式设计, 使用方便, 效率高。唐静秋等<sup>[163]</sup>公开了一

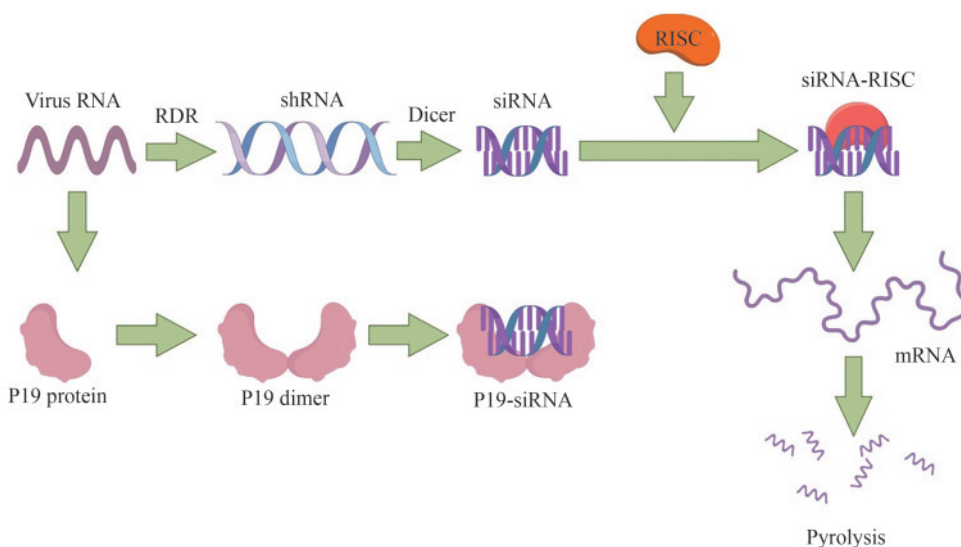


图3 P19蛋白作用原理

(侵入植物的病毒RNA会组装成双链shRNA，被Dicer酶切成21~23 bp的siRNA，与RISC组成siRNA-RISC复合体，并结合至同源的mRNA上使其裂解。而当P19蛋白被表达后，它会组装成二聚体结合siRNA，使siRNA无法结合RISC，从而使沉默过程无法进行。本图由Figdraw绘制)

Fig. 3 The mechanism of action of P19 protein

(The viral RNA that invades the plant body is assembled into double-stranded shRNA, which is cut into 21–23 base pair siRNAs by the Dicer enzyme. These siRNAs form a siRNA-RISC complex and bind to the homologous mRNA, causing it to be cleaved. However, when the P19 protein is expressed, it assembles into a dimer that binds to the siRNA, preventing the siRNA from binding to RISC, and thus the silencing process cannot proceed. This figure was created by Figdraw.)

种植物蛋白纯化用固液分离装置，通过液压缸带动压板对植物原料进行挤压，使得水分从浸提箱上的网孔排出滴落在浸提腔中，从而实现固液分离。以上方法给植物外源物质的分离与纯化提供了一定的新思路。

## 5 植物源疫苗的优势

### 5.1 植物源疫苗允许快速生成产品

相比于传统的细胞表达系统，植物有几个潜在的好处。它们的栽培很简单，因为不需要无菌环境，且相对便宜，只需使用常规肥料即可快速生长，而动物细胞培养系统则需要昂贵的培养基，通常还需要高等级的生物安全设施。植物的生产平台具有无限的可扩展性，扩展所需的成本远低于更传统的大肠杆菌与酵母菌发酵表达平台的扩展成本，植物表达系统的生产成本可以低至每千克10~20美元，而酵母表达系统每千克疫苗的生产成本约为200~300美元<sup>[164]</sup>，细菌表达系统的疫

苗生产成本约为每千克100~200美元，哺乳动物细胞表达系统每千克疫苗的生产成本约为260美元<sup>[165]</sup>。植物可以在温室或垂直农场中轻松扩大生产，这样可以实现多吨级的产量。快速和准确地生产疫苗和治疗性抗体在应对即将成为全球大流行病之前的威胁方面至关重要。瞬时表达允许快速生成产品，获得基因序列后大约8周即可完成，而且由于所用植物并未经过基因改造，因此商业生产的监管要求可能较少。这样的快速生产方式操作简便，能够快速应对大型流行病。此外，植物可以进行翻译后修饰（PTM），产生类似于哺乳动物相应物的糖基化产品。通过瞬时共同表达伴侣蛋白或其他酶，可以实现蛋白质的正确折叠和处理<sup>[166]</sup>。由于表达载体开发的现代化，特别是能够瞬时表达的载体，新的植物表达系统还提供了源自哺乳动物细胞培养物的表达技术无法匹配的速度和易处理性<sup>[3]</sup>。“解构的”病毒载体系统如pEAQ、magnICON和双生病毒表达平台的进展已经成功地解决了植物中生物制药生产的蛋白质表达水平、速度和一致性不足等问题<sup>[167-169]</sup>。

## 5.2 植物源疫苗触发免疫反应更安全高效

植物源疫苗有一个宝贵的优势是植物本身是安全的，因为人类病原体不会在植物中复制，从而消除了病毒、朊病毒或细菌内毒素污染的风险<sup>[166]</sup>。虽然植物源疫苗在储存和供应链方面存在一些限制，且其注射给药方式引发的黏膜免疫反应有限，但细胞外囊泡（EV）被认为是细胞之间信号传导的一种机制，这种机制在所有生物中都很好地保留，它们的膜能保护被封装的核酸免受酶降解，从而有利于细胞间转移。Pomatto等<sup>[170]</sup>的研究中使用了一种来源于可食用植物（橙子果汁）的EV（oEV），并以其作为口服疫苗的载体研发了一种SARS-CoV-2的S1蛋白亚单位疫苗。该疫苗装载在oEV中的mRNA在冻干和封装后，于室温下能保持稳定长达一年，在他们的研究中，通过灌胃接种的老鼠出现了体液免疫反应，产生了特异性的IgM、IgG和IgA，成功通过了适应性免疫反应中的首道黏膜屏障，并拥有比其他表达平台更高效的黏膜吸收性和触发免疫反应的能力。在Ramjee等<sup>[171]</sup>的研究中，植物来源的QVLP疫苗在预防和治疗流感方面表现优于鸡蛋来源的疫苗，因为其有效性更高。

## 5.3 植物源疫苗面临的挑战

植物源疫苗的表达水平可能受到多种因素的影响，如植物品种、生长环境、基因插入位点、基因表达调控元件等，导致不同批次或不同植株间抗原蛋白的表达量存在差异，影响疫苗的质量和效果。植物细胞中的糖基化修饰途径与哺乳动物细胞存在差异，可能导致所表达的抗原蛋白糖基化模式不同于天然蛋白，影响其免疫原性和生物活性。尽管通过基因工程手段可以对植物糖基化途径进行改造，但要实现完全的人源化糖基化修饰仍然具有挑战性，需要深入了解植物糖基化机制并进行复杂的基因调控。

植物源疫苗大多基于转基因技术，因此需要经过严格的转基因生物安全评估，以确保其对环境和人类健康的潜在风险可控。评估过程复杂且耗时，涉及多个阶段和多种试验，如实验室研究、温室试验、田间试验等，需要大量的数据支持和

多学科专家的参与。疫苗的商业化需要获得相关监管部门的批准，包括临床前研究、临床试验、生产工艺验证、质量控制等环节。整个流程严格且漫长，可能需要数年甚至十几年的时间，这不仅增加了研发成本，也延缓了疫苗的上市时间。

公众对转基因技术的认知程度有限，存在对该技术安全性的担忧和疑虑，在转基因技术和植物源疫苗的科普宣传方面也存在不足，可能导致对植物源疫苗的不信任和抵触情绪，即使其经过严格的科学评估和监管批准，但缺乏有效的方式和渠道向公众传达准确、科学的信息，导致公众难以了解其安全性和有效性，进一步加剧了公众的担忧和不接受程度，这种负面态度可能影响植物源疫苗的市场推广和应用。

此外，表达水平的不稳定性、对环境的敏感性及易糖基化所导致的过敏原效应，仍然是植物源疫苗面临的挑战<sup>[172]</sup>。植物本身可能含有某些抗原成分，这也引发了生物安全性问题。公众对转基因植物疫苗的认知和接受程度较低，可能会对植物疫苗的市场推广和应用产生负面影响，不同国家和地区的监管机构对植物疫苗的监管标准和要求存在差异，这给植物疫苗的跨国研发、生产和销售带来了困难，也增加了企业的合规成本。公众和监管机构对转基因植物作为疫苗生产宿主存在担忧，担心转基因成分可能整合到指定区域之外的其他位置，导致突变，或者转移到杂草或其他植物中，引发严重的环境问题。若使用食品作物生产疫苗，需确保其基因与食品供应隔离，防止意外污染。这要求在生产过程中采取严格的隔离措施，如地理隔离、设施隔离等，增加了生产成本和管理难度。此外，植物中含有一些天然的杂质，如酚类化合物、色素、植物蛋白酶等，可能会影响疫苗的纯度和质量。植物疫苗的生产过程较为复杂，从植物中提取和纯化疫苗抗原需要严格的质量控制，以确保产品的安全性和有效性。与此同时，植物作为生物反应器，其生产成本较低，生产规模易扩展。疫苗可以从特别培育的植物中产生，但由于授粉过程中交叉污染的可能性，必须对其进行密切监测，以防药物渗透食物链并影响野生动物<sup>[173]</sup>。可以采用非食品/饲料作物生产疫苗，或利用生物反应器中的生产细胞悬

浮培养, 以此减少转基因与食品和饲料链的共存和污染风险。同时, 可通过基因工程手段, 如叶绿体转化、细胞质雄性不育等技术, 提高转基因植物的生物安全性, 利用先进的基因编辑技术和表达系统, 提高疫苗抗原在植物中的表达水平, 降低生产成本。同时, 开发更高效的提取和纯化工艺, 去除植物中的杂质, 提高疫苗产品的纯度和质量。各国监管机构应加强合作与交流, 建立统一的监管标准和指南, 简化审批程序, 提高监管效率。对于在不同国家进行的临床试验和生产活动, 应建立互认机制, 避免重复审批, 加快植物疫苗的上市速度。加强公众教育和宣传, 提高公众对植物疫苗安全性和有效性的认识, 消除公众对转基因植物疫苗的误解和疑虑, 增强公众对植物疫苗的接受度, 鼓励大型制药公司与植物生物技术公司合作, 共同开展植物疫苗的研发和生产项目, 实现优势互补。通过合作, 可以共享技术和资源, 降低研发成本, 提高研发效率, 推动植物疫苗产业的发展。综上所述, 从早期的基础研究到临床试验和商业化生产, 仍然需要进一步的研究和验证, 以确保植物源疫苗的安全性、有效性和可持续性。

## 6 植物源疫苗的研究展望

植物源疫苗作为一种新兴的疫苗生产技术, 正在逐步展现出其在疫苗领域的巨大潜力, 一旦病原体的基因序列被分离出来, 蛋白质的生产通常可以在几周内开始, 与传统的生物反应器不同, 基于植物的系统的容量具有显著的可扩展性, 生产一株植物的生长条件与生产大量植株相同, 并且可以快速经济地扩大温室规模, 以满足对药用蛋白不断增长的需求<sup>[77]</sup>。

早期植物源疫苗仍面临多重局限, 例如作为理想的加强疫苗, 它虽然能用作消除减毒细菌或病毒的多种加强剂, 但仍需使用佐剂注射来引发其效用<sup>[86]</sup>, 且大部分疫苗缺乏稳健的免疫力。随着技术的进步, 许多有利于黏膜递送的分子佐剂加入, 如霍乱毒素无毒B亚基(CT-B)被加入, 能够有效缓解黏膜递送的局限性<sup>[174]</sup>。

随着技术的不断进步, 植物源疫苗的应用领

域将不断扩大。除了目前已有的抗体、抗原和亚基疫苗, 植物源疫苗还有望应用于更多疾病的预防和治疗。该技术可以合成微生物学技术不能产生的复杂多聚体蛋白, 其潜力巨大。随着技术的改进, 我们有望看到更多基于植物的疫苗的问世, 进入疾病管理的新时代<sup>[173]</sup>。

合理利用合成生物学可以使疫苗开发模块化, 不同病原微生物的保护性抗原与可变模块相对应, 根据中和性抗体来设计并合成保护性抗原, 从而达到快速制造适应新疫情的病毒疫苗的目的, 在突发疫情时, 合成生物技术能够依据病原基因组序列迅速分析并合成保护性抗原基因, 大大缩短疫苗研发的周期, 提升疫苗的研制效率。合成生物技术结合基因测序技术和生物信息学分析, 可以利用植物源疫苗生产平台的灵活性和可扩展性, 根据个体的基因特征和免疫状态快速、高效地设计和合成个性化疫苗, 实现精准免疫, 提高疫苗对不同个体的保护效果。

植物源疫苗可以在缩小疫苗巨大供应缺口方面发挥关键作用, 与哺乳动物细胞培养相比, 蛋白质的潜在产量低是一个有待解决的大问题, 虽然不断开发出标准化的35S启动子、水稻 $\alpha$ 淀粉酶(RAmy 3D)启动子和不同的化学诱导启动子以解决这一产量问题。动物与人类对不同植物衍生产品的过敏反应虽然是罕见的, 但并非完全没有, 因此有关植物源疫苗的安全性也有待更进一步的加强<sup>[175]</sup>。与此同时, 有关流行性RNA病毒的变异速度较快, 而口服植物源疫苗在作物种子中的稳定表达的生产周期相对较长, 应当考虑到更合适的表达系统, 如瞬时表达以及过表达。此外, 任何产品的盈利能力和市场可接受性都受到制造成本的极大影响, 并且由于缺乏以工业规模生产植物基药物的实际成本的现成可用性, 因此一直是一个有争议的话题<sup>[72]</sup>。随着技术的成熟, 植物源疫苗的大规模生产将成为可能, 且植物源疫苗具有的灵活性, 即根据不同人群的需求进行特异性设计, 可以为特定过敏人群提供更有效且最能保证安全性的疫苗。然而, 尽管生产技术不断进步, 且已有多项研究表明植物源疫苗具有较大应用潜力, 但针对这些疫苗在不同宿主和环境下的免疫效果的系统评估仍较为缺乏, 疫苗在临床应用中

的长效性与安全性尚需进一步验证,表明未来开发更多疫苗植物宿主的必要性。

### 参 考 文 献

- [1] HUEBBERS J W, BUYEL J F. On the verge of the market-plant factories for the automated and standardized production of biopharmaceuticals[J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 46: 107681.
- [2] CHAN J C N, CHAN A T C. Biologics and biosimilars what, why and how[J]. *ESMO Open*, 2017, 2(1): e000180.
- [3] CHUNG Y H, CHURCH D, KOELLHOFFER E C, et al. Integrating plant molecular farming and materials research for next-generation vaccines[J]. *Nature Reviews Materials*, 2021, 7(5): 372-388.
- [4] GUREVICH E V, GUREVICH V V. Beyond traditional pharmacology: new tools and approaches[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2015, 172(13): 3229-3241.
- [5] 邹奇, 潘炜松, 邱健, 等. 植物生物反应器优化策略与最新应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2023, 43(1): 71-86.  
ZOU Q, PAN W S, QIU J, et al. Recent advances in optimization strategies and applications of plant bioreactors[J]. *China Biotechnology*, 2023, 43(1): 71-86.
- [6] WARD B J, MAKARKOV A, SÉGUIN A, et al. Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18–64 years) and older adults ( $\geq 65$  years): two multicentre, randomised phase 3 trials[J]. *The Lancet*, 2020, 396(10261): 1491-1503.
- [7] RYBICKI E P. Plant molecular farming of virus-like nanoparticles as vaccines and reagents[J]. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2020, 12(2): e1587.
- [8] 蔡静波. 成纤维细胞生长因子9在红花中的表达、活性及药效学初步研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.  
CAI J B. Expression, biological activity and pharmacodynamics preliminary study of fibroblast growth factor 9 in safflower[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2018.
- [9] 李校堃, 马吉胜. 植物反应器: 生产FGF的“植物工厂”[J]. *生命世界*, 2019(11): 16-17.  
LI X K, MA J S. Plant bioreactors: the “Plant Factories” for FGF production[J]. *Life World*, 2019(11): 16-17.
- [10] 杨香芳, 刘召明, 申茂欣, 等. 基因工程疫苗在动物疾病防治中的前景[J]. *中国动物保健*, 2024, 26(2): 5-6.  
YANG X F, LIU Z M, SHEN M X, et al. Prospects of genetically engineered vaccines in the prevention and control of animal diseases[J]. *China Animal Health*, 2024, 26(2): 5-6.
- [11] FAUSTHER-BOVENDO H, KOBINGER G. Plant-made vaccines and therapeutics[J]. *Science*, 2021, 373(6556): 740-741.
- [12] 吴建祥, 周继勇, 于翠. 转基因植物生产基因工程疫苗技术[J]. *中国预防兽医学报*, 2001, 23(2): 157-159.  
WU J X, ZHOU J Y, YU C. The technology of develop gene engineering vaccine by transgenic plants[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2001, 23(2): 157-159.
- [13] MASON H S, LAM D M, ARNTZEN C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(24): 11745-11749.
- [14] LIU Y L, WANG J F, QIU B S, et al. Expression of human hepatitis B virus surface antigen gene in transgenic tobacco[J]. *Science in China Series B, Chemistry, Life Sciences & Earth Sciences*, 1994, 37(1): 37-41.
- [15] MATIĆ S, QUAGLINO E, ARATA L, et al. The rat ErbB2 tyrosine kinase receptor produced in plants is immunogenic in mice and confers protective immunity against ErbB2<sup>+</sup> mammary cancer[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(1): 153-159.
- [16] NAUPU P N, VAN ZYL A R, RYBICKI E P, et al. Immunogenicity of plant-produced human papillomavirus (HPV) virus-like particles (VLPs)[J]. *Vaccines*, 2020, 8(4): 740.
- [17] MAHARJAN P M, CHEON J, JUNG J, et al. Plant-expressed receptor binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein elicits humoral immunity in mice[J]. *Vaccines*, 2021, 9(9): 978.
- [18] XU Q R, MA F S, YANG D C, et al. Rice-produced classical swine fever virus glycoprotein E2 with herringbone-dimer design to enhance immune responses[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(12): 2546-2559.
- [19] YUSIBOV V, STREATFIELD S J, KUSHNIR N. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals: vaccines, antibodies and beyond[J]. *Human Vaccines*, 2011, 7(3): 313-321.
- [20] ALEXANDER J, WARD S, MENDY J, et al. Pre-clinical evaluation of a replication-competent recombinant adenovirus serotype 4 vaccine expressing influenza H5 hemagglutinin[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31177.
- [21] CUMMINGS J F, GUERRERO M L, MOON J E, et al. Safety and immunogenicity of a plant-produced recombinant monomer hemagglutinin-based influenza vaccine derived from influenza A (H1N1) pdm09 virus: a Phase 1 dose-escalation study in healthy adults[J]. *Vaccine*, 2014, 32(19): 2251-2259.
- [22] KHANTASUP K, CHANTIMA W, SANGMA C, et al. Design and generation of humanized single-chain Fv derived from mouse hybridoma for potential targeting application[J]. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*,

- 2015, 34(6): 404-417.
- [23] MA J K, DROSSARD J, LEWIS D, et al. Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(8): 1106-1120.
- [24] Merck's ERVEBO® [ebola zaire vaccine (rVSVΔG-ZEBOV-GP) live] granted conditional approval in the European Union [EB/OL]. (2019-11-11) [2025-06-01]. <https://www.merck.com/news/mercks-ervebo-ebola-zaire-vaccine-rvsv%ce%b4g-zebov-gp-live-granted-conditional-approval-in-the-european-union/>.
- [25] MAHARJAN P M, CHOE S. Plant-based COVID-19 vaccines: current status, design, and development strategies of candidate vaccines[J]. *Vaccines*, 2021, 9(9): 992.
- [26] WARD B J, GOBEL P, SÉGUIN A, et al. Phase I randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19[J]. *Nature Medicine*, 2021, 27(6): 1071-1078.
- [27] SU H, VAN EERDE A, RIMSTAD E, et al. Plant-made vaccines against viral diseases in humans and farm animals[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1170815.
- [28] 王跃驹, 王海军, 庞小静. 生菜作为宿主在表达人乳头瘤病毒蛋白或制备人宫颈癌疫苗中的应用: CN111393511A [P]. 2020-07-10.
- WANG Y J, WANG H J, PANG X J. Application of lettuce as a host in expressing human papillomavirus proteins or preparing human cervical cancer vaccines: CN111393511A [P]. 2020-07-10.
- [29] LAI H F, HE J Y, ENGLE M, et al. Robust production of virus-like particles and monoclonal antibodies with geminiviral replicon vectors in lettuce[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2012, 10(1): 95-104.
- [30] VANDERBURGT J T, HARPER O, GARNHAM C P, et al. Plant production of a virus-like particle-based vaccine candidate against porcine reproductive and respiratory syndrome[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1044675.
- [31] 宋长征, SMASON Hugh. 禽流感病毒血凝素疫苗在转基因马铃薯中的表达[J]. *生物技术*, 2001, 11(5): 3-4.
- SONG C Z, SMASON H. Expression hemagglutinin vaccine of avian influenza virus in transgenic potato[J]. *Biotechnology*, 2001, 11(5): 3-4.
- [32] 刘悦. 马铃薯Y病毒介导的非洲猪瘟病毒p30蛋白在本氏烟草中的表达[D]. 长春: 吉林农业大学, 2023.
- LIU Y. Expression of p30 protein of African swine fever virus mediated by potato virus Y in *Nicotiana benthamiana* [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2023.
- [33] PINEO C B, HITZEROTH I I, RYBICKI E P. Immunogenic assessment of plant-produced human papillomavirus type 16 L1/L2 chimeras[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2013, 11(8): 964-975.
- [34] RYBICKI E P. Plant molecular farming of virus-like nanoparticles as vaccines and reagents[J]. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2020, 12(2): e1587.
- [35] 贾宇臣, 赵凯, 薛昕, 等. 轮状病毒抗原蛋白G3VP7基因在花生中遗传转化的研究[J]. *生物医学工程学杂志*, 2012, 29(2): 328-331.
- JIA Y C, ZHAO K, XUE X, et al. Study on genetic transformation of antigen G3VP7 gene of human rotavirus in peanut[J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2012, 29(2): 328-331.
- [36] 申雪静, 张二芹, 许倩茹, 等. 狂犬病病毒G蛋白在水稻中的表达及遗传稳定性鉴定[J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27(2): 204-211.
- SHEN X J, ZHANG E Q, XU Q R, et al. Expression of rabies virus G protein in rice (*Oryza sativa*) and identification of its genetic stability[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27(2): 204-211.
- [37] KIM S Y, JUNG B K, PARK G N, et al. Histopathological evaluation of the efficacy for plant-produced E2 protein vaccine against classical swine fever virus (CSFV) in piglets [J]. *Journal of Bacteriology and Virology*, 2019, 49(3): 133.
- [38] WANG Y Y, DENG H Q, ZHANG X B, et al. Generation and immunogenicity of Japanese encephalitis virus envelope protein expressed in transgenic rice[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 380(2): 292-297.
- [39] HE X, HASELHORST T, VON ITZSTEIN M, et al. Production of  $\alpha$ -L-iduronidase in maize for the potential treatment of a human lysosomal storage disease[J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 1062.
- [40] ROSALES-MENDOZA S, ALPUCHE-SOLÍS Á G, SORIANO-GUERRA R E, et al. Expression of an *Escherichia coli* antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants[J]. *The Plant Journal*, 2009, 57(1): 45-54.
- [41] GU Q, HAN N, LIU J Y, et al. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in transgenic rice[J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(20): 1661-1666.
- [42] MATSUMOTO Y, SUZUKI S, NOZOYE T, et al. Oral immunogenicity and protective efficacy in mice of transgenic rice plants producing a vaccine candidate antigen (As16) of *Ascaris suum* fused with cholera toxin B subunit[J]. *Transgenic Research*, 2009, 18(2): 185-192.
- [43] YANG L J, KAJIURA H, SUZUKI K, et al. Generation of a transgenic rice seed-based edible vaccine against house dust mite allergy[J]. *Biochemical and Biophysical Research*

- Communications, 2008, 365(2): 334-339.
- [44] LACOMBE S, BANGRATZ M, BRIZARD J P, et al. Optimized transitory ectopic expression of promastigote surface antigen protein in *Nicotiana benthamiana*, a potential anti-leishmaniasis vaccine candidate[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 125(1): 116-123.
- [45] YOSHIDA T, KIMURA E, KOIKE S, et al. Transgenic rice expressing amyloid  $\beta$ -peptide for oral immunization[J]. International Journal of Biological Sciences, 2011, 7(3): 301-307.
- [46] 任兆钧, 刘勇, 郭云生, 等. 烟草表达口蹄疫植物基因工程疫苗及其制备方法: CN1820784[P]. 2006-08-23.
- REN Z J, LIU Y, GUO Y S, et al. Tobacco-expressed FMD plant genetic engineering vaccine and its preparation method: CN1820784[P]. 2006-08-23.
- [47] BUETOW D E, KORBAN S S, SANDHU J, et al. Plant-derived vaccines against respiratory syncytial virus: WO0068392[P]. 2020-05-10.
- [48] LANGRIDGE W H R, ARAKAWA T, CHONG D, et al. Expression of cholera toxin B subunit in transgenic plants and efficacy thereof in oral vaccines: WO9918225 [P]. 1998-10-07.
- [49] SOHRAB S S, ASHAR E I A, ELKAFRAWY, SHERIF A A, et al. Development of an edible vaccine: WO2021161028A1 [P]. 2021-08-21.
- [50] 王跃驹, 马磊, 王海军. 生菜作为宿主在表达乙肝疫苗中的应用: CN110229847A[P]. 2019-09-13.
- WANG Y J, MA L, WANG H J. Application of lettuce as a host in expressing hepatitis B vaccine: CN110229847A[P]. 2019-09-13.
- [51] 刘地, 李博, 毕成, 等. 具备定点偶联功能的HBc-VLPs的制备与性质鉴定[J]. 生物工程学报, 2020, 36(7): 1440-1449.
- LIU D, LI B, BI C, et al. Preparation and characterization of HBc virus like particles with site-directed coupling function[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(7): 1440-1449.
- [52] CHO K N, OUH I O, PARK Y M, et al. A plant-produced porcine parvovirus 1-82 VP2 subunit vaccine protects pregnant sows against challenge with a genetically heterologous PPV1 strain[J]. Vaccines, 2023, 11(1): 54.
- [53] D'AOUST M A, LAVOIE P O, COUTURE M M J, et al. Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice[J]. Plant Biotechnology Journal, 2008, 6(9): 930-940.
- [54] D'AOUST M A, COUTURE M M J, CHARLAND N, et al. The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza[J]. Plant Biotechnology Journal, 2010, 8(5): 607-619.
- [55] POTERA C. Vaccine manufacturing gets boost from tobacco plants: canada-based medicago opens U.S. facility to exploit its influenza vaccine production method[J]. Genetic Engineering & Biotechnology News, 2012, 13(6): 8-10.
- [56] LOU X M, YAO Q H, ZHANG Z, et al. Expression of the human hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2007, 14(4): 464-469.
- [57] PNIEWSKI T, KAPUSTA J, BOCIĄG P, et al. Plant expression, lyophilisation and storage of HBV medium and large surface antigens for a prototype oral vaccine formulation [J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(3): 585-595.
- [58] KANAGARAJ A P, VERMA D, DANIELL H. Expression of dengue-3 pre-membrane and envelope polyprotein in lettuce chloroplasts[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 76(3): 323-333.
- [59] SHCHELKUNOV S N, SALYAEV R K, POZDNYAKOV S G, et al. Immunogenicity of a novel, bivalent, plant-based oral vaccine against hepatitis B and human immunodeficiency viruses[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(13): 959-967.
- [60] GRECO R, MICHEL M, GUETARD D, et al. Production of recombinant HIV-1/HBV virus-like particles in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants for a bivalent plant-based vaccine[J]. Vaccine, 2007, 25(49): 8228-8240.
- [61] GUETARD D, GRECO R, CERVANTES GONZALEZ M, et al. Immunogenicity and tolerance following HIV-1/HBV plant-based oral vaccine administration[J]. Vaccine, 2008, 26(35): 4477-4485.
- [62] 马燕斌, 李换丽, 文晋, 等. 转基因抗草甘膦棉花 R1-3 株系的分子特征鉴定[J]. 中国农业科学, 2023, 56(17): 3277-3284.
- MA Y B, LI H L, WEN J, et al. Identification of molecular characterizations for transgenic cotton R1-3 line of glyphosate tolerance[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2023, 56(17): 3277-3284.
- [63] QIAN B J, SHEN H F, LIANG W Q, et al. Immunogenicity of recombinant hepatitis B virus surface antigen fused with preS1 epitopes expressed in rice seeds[J]. Transgenic Research, 2008, 17(4): 621-631.
- [64] HUANG Z, MASON H S. Conformational analysis of hepatitis B surface antigen fusions in an *Agrobacterium*-mediated transient expression system[J]. Plant Biotechnology Journal, 2004, 2(3): 241-249.
- [65] KESSANS S A, FRATER J, MATOBA N, et al. P02-10. Plant expression of chimeric Gag/gp41 virus-like particles as a mucosally-targeted subunit vaccine against HIV-1[J]. Retrovirology, 2009, 6(3): P15.
- [66] 河北大学科学与技术创新研究院. 为什么接种疫苗时总是选择上臂,而不是其他部位[EB/OL]. (2021-06-11)[2025-06-

- 01]. <https://sat.hbu.edu.cn/info/1009/1673.htm>. Hebei University Institute of Science and Technology Innovation. Why is the upper arm always chosen for vaccination instead of other sites[EB/OL]. (2021-06-11)[2025-06-01]. <https://sat.hbu.edu.cn/info/1009/1673.htm>.
- [67] Medicago Inc. Quebec-based Medicago is transforming the use of plant-based technologies to rapidly develop and produce novel vaccines and therapeutic proteins[EB/OL]. [2025-06-01]. <https://www.nature.com/articles/d43747-020-00537-y>.
- [68] 张玉满, 谢传淼, 方荣祥, 等. 利用枸杞作为烟草花叶病毒瞬时表达外源蛋白的生物反应器:CN114634948A[P]. 2022-06-17.  
ZHANG Y M, XIE C M, FANG R X, et al. Utilization of wolfberry as a bioreactor for transient expression of foreign proteins via tobacco mosaic virus CN114634948A[P]. 2022-06-17.
- [69] LEI L. Lettuce-manufactured pharmaceuticals[J]. Nature Plants, 2019, 5(7): 646.
- [70] KEHAGIA E, PAPAKYRIAKOPOULOU P, VALSAMI G. Advances in intranasal vaccine delivery: a promising non-invasive route of immunization[J]. Vaccine, 2023, 41(24): 3589-3603.
- [71] CHEN X J, FAN X D, LI F Z. Development and evaluation of a novel diammonium glycyrrhizinate phytosome for nasal vaccination[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(10): 2000.
- [72] GAOBOTSE G, VENKATARAMAN S, MMEREKE K M, et al. Recent progress on vaccines produced in transgenic plants [J]. Vaccines, 2022, 10(11): 1861.
- [73] KUMAR M, KUMARI N, THAKUR N, et al. A comprehensive overview on the production of vaccines in plant-based expression systems and the scope of plant biotechnology to combat against SARS-CoV-2 virus pandemics [J]. Plants, 2021, 10(6): 1213.
- [74] SMITH C M, FRY S C, GOUGH K C, et al. Recombinant plants provide a new approach to the production of bacterial polysaccharide for vaccines[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88144.
- [75] 周丹丹, 俞嘉宁. 植物细胞中瞬时表达系统的建立及研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(24): 151-156.  
ZHOU D D, YU J N. The progress of establishing transient expression system in plant cell[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(24): 151-156.
- [76] WIGDOROVITZ A, CARRILLO C, DUS SANTOS M J, et al. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1[J]. Virology, 1999, 255(2): 347-353.
- [77] VENKATARAMAN S, KHAN I, HABIBI P, et al. Recent advances in expression and purification strategies for plant made vaccines[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1273958.
- [78] NURZIJAH I, ELBOHY O A, KANYUKA K, et al. Development of plant-based vaccines for prevention of avian influenza and Newcastle disease in poultry[J]. Vaccines, 2022, 10(3): 478.
- [79] 陈亚波. 新城疫病毒HN蛋白与F蛋白结构域共表达对细胞融合的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.  
CHEN Y B. Cell fusion as affected by co-expression of structural domains of hemagglutinin-neuraminidase and fusion protein of Newcastle disease virus[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006.
- [80] SU Y L, LARZÁBAL M, SONG H, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 antigens produced in transgenic lettuce effective as an oral vaccine in mice[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2023, 136(10): 214.
- [81] IMANI J, LORENZ H, KOGEL K H, et al. Transgenic carrots: potential source of edible vaccines[J]. Journal Für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2007, 2(Suppl\_1): 105.
- [82] 张丹凤, 余自青, 吴锁伟, 等. 植物生物反应器在分子医药农业中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(1): 86-94.  
ZHANG D F, YU Z Q, WU S W, et al. Progress of plant as bioreactor in molecular pharming[J]. China Biotechnology, 2016, 36(1): 86-94.
- [83] 俞瑶, 程华, 陈素梅, 等. 基于农杆菌真空渗透法的菊花瞬时表达系统的优化[J]. 农业生物技术学报, 2023, 31(12): 2654-2664.  
YU Y, CHENG H, CHEN S M, et al. Optimization of transient expression system in *Chrysanthemum morifolium* based on *Agrobacterium* vacuum infiltration method[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2023, 31(12): 2654-2664.
- [84] 郎遥玲, 王倩, 陈彬, 等. 农杆菌介导注射法建立番茄子叶瞬时表达系统[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(34): 5462-5468.  
LANG Y L, WANG Q, CHEN B, et al. Establishment of transient expression system of eggplant *Cotyledon* by *Agrobacterium*-mediated injection[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2023, 27(34): 5462-5468.
- [85] 黄爽, 范杰英, 韦正乙, 等. 烟草花叶病毒瞬时表达系统在医药蛋白生产中的应用[J]. 分子植物育种, 2019, 17(21): 7078-7086.  
HUANG S, FAN J Y, WEI Z Y, et al. Application of tobacco mosaic virus-based transient expression system in pharmaceutical protein production[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(21): 7078-7086.
- [86] SHAHID N, DANIELL H. Plant-based oral vaccines against

- zoonotic and non-zoonotic diseases[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(11): 2079-2099.
- [87] 蔡玉婷, 茹毅, 孙坤, 等. 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 Y T, RU Y, SUN K, et al. Expression of antigens of foot-and-mouth disease virus in plants: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(4): 1548-1561.
- [88] DANIELL H. Chloroplasts engineered to express pharmaceutical proteins in edible plants: US 20090022705[P]. 2009-01-22.
- [89] SETHI L, KUMARI K, DEY N. Engineering of plants for efficient production of therapeutics[J]. *Molecular Biotechnology*, 2021, 63(12): 1125-1137.
- [90] 林优红, 程霞英, 杨东风, 等. 高等植物叶绿体表达重组蛋白研究进展[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(5): 631-643.
- LIN Y H, CHENG X Y, YANG D F, et al. Advances in chloroplast expression of recombinant proteins in higher plants [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(5): 631-643.
- [91] 郝宇娉, 陆琳, 杨志红. 转基因植物疫苗的研究进展[J]. *核农学报*, 2020, 34(12): 2708-2724.
- HAO Y P, LU L, YANG Z H. Progress on transgenic plants vaccines[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2020, 34(12): 2708-2724.
- [92] NOCHI T, TAKAGI H, YUKI Y, et al. Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(26): 10986-10991.
- [93] YUKI Y, MEJIMA M, KUROKAWA S, et al. Induction of toxin-specific neutralizing immunity by molecularly uniform rice-based oral cholera toxin B subunit vaccine without plant-associated sugar modification[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2013, 11(7): 799-808.
- [94] SUZUKI K, KAMINUMA O, YANG L J, et al. Prevention of allergic asthma by vaccination with transgenic rice seed expressing mite allergen: induction of allergen-specific oral tolerance without bystander suppression[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(9): 982-990.
- [95] 鲜彬, 徐翔铭, 吴清华, 等. 农杆菌和基因枪介导的瞬时表达方法研究综述[J]. *中药与临床*, 2022, 13(5): 110-117.
- XIAN B, XU X M, WU Q H, et al. A review of the methods of transient expression mediated by *Agrobacterium* and particle bombardment[J]. *Pharmacy and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2022, 13(5): 110-117.
- [96] 唐琳, 徐莺, 赵婷婷, 等. 番红花组织基因枪转化瞬时表达检测[J]. *北京林业大学学报*, 2004, 26(4): 35-38.
- TANG L, XU Y, ZHAO T T, et al. Transient expression of gus gene via particle bombardment in *Crocus sativus* L[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2004, 26(4): 35-38.
- [97] 张馨悦. 萱草花粉的离体萌发、贮存及遗传转化研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.
- ZHANG X Y. *In vitro* germination, storage, and genetic transformation of *Hemerocallis* pollen[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020.
- [98] 高璐, 薛永来. 农杆菌介导的水稻快速高效基因转化系统[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(4): 39-42.
- GAO L, XUE Y L. *Agrobacterium*-mediated rapid and efficient gene transformation system in rice[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(4): 39-42.
- [99] 肖军, 张云霄, 刘伯峰. 烟草的组织培养技术研究[J]. *泰山学院学报*, 2009, 31(6): 94-98.
- XIAO J, ZHANG Y X, LIU B F. Study on tissue culture technique of *Nicotiana tabacum*[J]. *Journal of Taishan University*, 2009, 31(6): 94-98.
- [100] 莫倩珍, 麦荣嘉, 杨志晓, 等. 快速高效植物瞬时表达的实验室烟草无土栽培体系的构建[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(6): 772-777.
- MO Q Z, MAI R J, YANG Z X, et al. A hydroponic cultivation system for rapid high-yield transient protein expression in *Nicotiana* plants under laboratory conditions[J]. *Journal of Southern Medical University*, 2012, 32(6): 772-777.
- [101] 刘晓丽, 向欢, 杨兴有, 等. 光照强度对烟草生长发育及产量和质量的影响研究进展[J]. *现代农业科技*, 2022(5): 14-17, 27.
- LIU X L, XIANG H, YANG X Y, et al. Research progress on the influence of light intensity on tobacco growth, yield and quality[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2022(5): 14-17, 27.
- [102] YANG M, SUN H Y, LAI H F, et al. Plant-produced Zika virus envelope protein elicits neutralizing immune responses that correlate with protective immunity against Zika virus in mice [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(2): 572-580.
- [103] PYRSKI M, RUGOWSKA A, WIERZBIŃSKI K R, et al. HBcAg produced in transgenic tobacco triggers Th1 and Th2 response when intramuscularly delivered[J]. *Vaccine*, 2017, 35(42): 5714-5721.
- [104] MENZEL S, HOLLAND T, BOES A, et al. Downstream processing of a plant-derived malaria transmission-blocking vaccine candidate[J]. *Protein Expression and Purification*, 2018, 152: 122-130.
- [105] 李宏. 植物组织RNA提取的难点及对策[J]. *生物技术通报*, 1999, 15(1): 36-39.
- LI H. The difficulties in the isolation of RNA from plant tissues and their resolving strategies[J]. *Biotechnology Bulletin*, 1999, 15(1): 36-39.

- [106] LEE D, COAKER G. Purification and detection of ubiquitinated plant proteins using tandem ubiquitin binding entities[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2023, 2581: 245-254.
- [107] MATSUSHIMA A, MATSUO K. Removal of plant endogenous proteins from tobacco leaf extract by freeze - thaw treatment for purification of recombinant proteins[J]. *Plant Science*, 2024, 339: 111953.
- [108] 李颖, 张悦婧, 王馨, 等. 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 Y J, WANG X, et al. 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.
- [109] ROSENTHAL S H. Improving expression vectors for recombinant protein production in plants [D]. Tempe: Arizona State University, 2012.
- [110] 喻文聪, 袁玉辉, 李湘, 等. 芥菜型油菜 BjuA03.TTG2 基因启动子克隆及表达载体构建[J]. *作物研究*, 2023, 37(1): 55-61.
- YU W C, YUAN Y H, LI X, et al. Cloning of BjuA03.TTG2 gene promoter from *Brassica juncea* and construction of its plant expression vectors[J]. *Crop Research*, 2023, 37(1): 55-61.
- [111] TAKITA E, YOSHIDA K, HANANO S, et al. Development of the binary vector pTACatg1 for stable gene expression in plant: reduction of gene silencing in transgenic plants carrying the target gene with long flanking sequences[J]. *Plant Biotechnology*, 2021, 38(4): 391-400.
- [112] 郭金洁, 张丹, 张伟, 等. CaMV 35S 增强子调节玉米基因表达的机制研究[J]. *农业生物技术学报*, 2023, 31(5): 914-926.
- GUO J J, ZHANG D, ZHANG W, et al. Study on the mechanism of CaMV 35S enhancer regulating gene expression in maize (*Zea mays*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2023, 31(5): 914-926.
- [113] 贾小明, 张焕玲, 樊军锋. 热激启动子控制的 FT 基因诱导杨树早期开花体系的优化[J]. *林业科学*, 2011, 47(11): 37-43.
- JIA X M, ZHANG H L, FAN J F. System optimization of precociously flowering of poplar induced by FT gene controlled by a heat shock promoter[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2011, 47(11): 37-43.
- [114] 熊雨飞, 徐娅, 成焱, 等. 一种水稻种子胚乳优势表达启动子 pNFYA2、制备方法及应用: CN118345074A[P]. 2024-07-16.
- XIONG Y F, XU Y, CHENG Y, et al. Rice seed endosperm dominant expression promoter pNFYA2, preparation method and application: CN118345074A[P]. 2024-07-16.
- [115] 魏祥进, 胡培松, 李港, 等. 一种水稻胚乳特异性表达启动子 pEnd2 及其应用: CN114854749A[P]. 2022-08-05.
- WEI X J, HU P S, LI G, et al. Rice endosperm specific expression promoter pEnd2 and application thereof: CN114854749A[P]. 2022-08-05.
- [116] 宋任涛, 张伟, 田忠瑞, 等. 玉米胚乳特异表达启动子 PMAP 启动子、其克隆方法及其应用: CN105316338A[P]. 2016-02-10.
- SONG R T, ZHANG W, TIAN Z R, et al. Corn endosperm specific expression promoter PMAP promoter and cloning method and application thereof: CN105316338A[P]. 2016-02-10.
- [117] 武兆云, 张倩, 郭玉鸽, 等. 基于植物重组蛋白产量提高的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(8): 2784-2797.
- WU Z Y, ZHANG Q, GUO Y G, et al. Improving the production of plant-based recombinant protein: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(8): 2784-2797.
- [118] ROSENTHAL S H, DIAMOS A G, MASON H S. An intronless form of the tobacco extensin gene terminator strongly enhances transient gene expression in plant leaves[J]. *Plant Molecular Biology*, 2018, 96(4): 429-443.
- [119] HAGER K J, PÉREZ MARC G, GOBEIL P, et al. Efficacy and safety of a recombinant plant-based adjuvanted COVID-19 vaccine[J]. *New England Journal of Medicine*, 2022, 386(22): 2084-2096.
- [120] OH S W, SHAO J F, MITRA J, et al. Enhancer release and retargeting activates disease-susceptibility genes[J]. *Nature*, 2021, 595(7869): 735-740.
- [121] MA F S, XU Q R, WANG A P, et al. A universal design of restructured dimer antigens: development of a superior vaccine against the paramyxovirus in transgenic rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2024, 121(4): e2305745121.
- [122] 赵连三, 秦山. 可高效安全表达的新型核酸疫苗: CN1367020 [P]. 2002-09-04.
- ZHAO L S, QIN S. A new type of nucleic acid vaccine for efficient and safe expression: CN1367020[P]. 2002-09-04
- [123] 杨柳, 秦文, 王丽媛, 等. 利用血清筛选和模拟胃肠液消化稳定性试验评价植物源重组人血清白蛋白潜在致敏性[J]. *中国食品卫生杂志*, 2022, 34(1): 34-38.
- YANG L, QIN W, WANG L Y, et al. Evaluation of the potential allergenicity of *Oryza sativa* recombinant human serum albumin by serum screening and simulated gastrointestinal fluid digestion stability test[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2022, 34(1): 34-38.
- [124] FAUSTHER-BOVENDO H, KOBINGER G. Plant-made vaccines and therapeutics[J]. *Science*, 2021, 373(6556): 740-741.

- [125] 区永祥, 苏韵琳. 一种利用表达O157: H7抗原的转基因生菜研制的口服疫苗: CN117003886A[P]. 2023-11-07.  
OU Y X, SU Y L. Oral vaccine developed by using transgenic lettuce expressing O157: H7 antigen: CN117003886A[P]. 2023-11-07.
- [126] 赖强, 倪能能, 钟泽民, 等. 一种猪圆环病毒2型重组植物乳杆菌口服疫苗的制备方法及应用: CN106520817A[P]. 2017-03-22.  
LAI Q, NI N N, ZHONG Z M, et al. Preparation method and applications of porcine circovirus type II recombinant *Lactobacillus plantarum* oral vaccine: CN106520817A[P]. 2017-03-22.
- [127] NEWBY M L, ALLEN J D, CRISPIN M. Influence of glycosylation on the immunogenicity and antigenicity of viral immunogens[J]. *Biotechnology Advances*, 2024, 70: 108283.
- [128] STRASSER R. Plant glycoengineering for designing next-generation vaccines and therapeutic proteins[J]. *Biotechnology Advances*, 2023, 67: 108197.
- [129] OLSZEWSKI N E, WEST C M, SASSI S O, et al. *O*-GlcNAc protein modification in plants: evolution and function[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, 1800(2): 49-56.
- [130] WU J, ZHU W T, SHAN X T, et al. Glycoside-specific metabolomics combined with precursor isotopic labeling for characterizing plant glycosyltransferases[J]. *Molecular Plant*, 2022, 15(10): 1517-1532.
- [131] DICKEY LYNN F, COX KEVIN M, PEELE CHARLES G, et al. Compositions and methods for humanization and optimization of *N*-glycans in plants: WO2007084926[P]. 2007-01-17.
- [132] HANANIA U, ARIEL T, TEKOAH Y, et al. Establishment of a tobacco BY2 cell line devoid of plant-specific xylose and fucose as a platform for the production of biotherapeutic proteins[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(9): 1120-1129.
- [133] 尹恒, 赵小明, 王文霞, 等. 植物糖生物学与糖链植物疫苗[J]. *生命科学*, 2011, 23(6): 598-604.  
YIN H, ZHAO X M, WANG W X, et al. Plant glycobiology and carbohydrate-based plant disease vaccines[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(6): 598-604.
- [134] KIM T G, LEE H J, JANG Y S, et al. Co-expression of proteinase inhibitor enhances recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor production in transgenic rice cell suspension culture[J]. *Protein Expression and Purification*, 2008, 61(2): 117-121.
- [135] GROSSE-HOLZ F, MADEIRA L, ZAHID M A, et al. Three unrelated protease inhibitors enhance accumulation of pharmaceutical recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(10): 1797-1810.
- [136] 冯玮. 植物蛋白酶抑制剂研究进展概述[J]. *生物学教学*, 2020, 45(12): 61-63.  
FENG W. Overview of research progress on plant protease inhibitors[J]. *Biology Teaching*, 2020, 45(12): 61-63.
- [137] VOLPICELLA M, LEONI C, COSTANZA A, et al. Cystatins, serpins and other families of protease inhibitors in plants[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2011, 12(5): 386-398.
- [138] PATSTON P A, GETTINS P G. Significance of secondary structure predictions on the reactive center loop region of serpins: a model for the folding of serpins into a metastable state[J]. *FEBS Letters*, 1996, 383(1-2): 87-92.
- [139] AHN J W, ATWELL B J, ROBERTS T H. Serpin genes AtSRP2 and AtSRP3 are required for normal growth sensitivity to a DNA alkylating agent in *Arabidopsis*[J]. *BMC Plant Biology*, 2009, 9: 52.
- [140] SALES P M, SOUZA P M, SIMEONI L A, et al.  $\alpha$ -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source[J]. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2012, 15(1): 141-183.
- [141] HATAKEYAMA T, HIRAOKA M, FUNATSU G. Amino acid sequences of the two smallest trypsin inhibitors from sponge gourd seeds[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1991, 55(10): 2641-2642.
- [142] RAWLINGS N D, BARRETT A J, THOMAS P D, et al. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(D1): D624-D632.
- [143] DÍEZ-DÍAZ M, CONEJERO V, RODRIGO I, et al. Isolation and characterization of wound-inducible carboxypeptidase inhibitor from tomato leaves[J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(13): 1919-1924.
- [144] KOMARNYTSKY S, BORISJUK N, YAKOBY N, et al. Cosecretion of protease inhibitor stabilizes antibodies produced by plant roots[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(4): 1185-1193.
- [145] PILLAY P, KIBIDO T, DU PLESSIS M, et al. Use of transgenic oryzacystatin- I -expressing plants enhances recombinant protein production[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 168(6): 1608-1620.
- [146] GOULET C, BENCHABANE M, ANGUENOT R, et al. A companion protease inhibitor for the protection of cytosol-targeted recombinant proteins in plants[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2010, 8(2): 142-154.
- [147] JUTRAS P V, MARUSIC C, LONOCE C, et al. An accessory protease inhibitor to increase the yield and quality of a tumour-targeting mAb in *Nicotiana benthamiana* leaves[J]. *PLoS One*,

- 2016, 11(11): e0167086.
- [148] KIM N H, HWANG B K. Pepper pathogenesis-related protein 4c is a plasma membrane-localized cysteine protease inhibitor that is required for plant cell death and defense signaling[J]. *The Plant Journal*, 2015, 81(1): 81-94.
- [149] GROSSE-HOLZ F, KELLY S, BLASKOWSKI S, et al. The transcriptome, extracellular proteome and active secretome of agroinfiltrated *Nicotiana benthamiana* uncover a large, diverse protease repertoire[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(5): 1068-1084.
- [150] ARKADASH V, YOSEF G, SHIRIAN J, et al. Development of high affinity and high specificity inhibitors of matrix metalloproteinase 14 through computational design and directed evolution[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(8): 3481-3495.
- [151] WINGFIELD P T, SAX J K, STAHL S J, et al. Biophysical and functional characterization of full-length, recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) produced in *Escherichia coli*. Comparison of wild type and amino-terminal alanine appended variant with implications for the mechanism of TIMP functions[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(30): 21362-21368.
- [152] HONG Q N, LIU J, WEI Y Q, et al. Application of baculovirus expression vector system (BEVS) in vaccine development[J]. *Vaccines*, 2023, 11(7): 1218.
- [153] 马婷, 张西倩, 丁向真, 等. 聚合酶 II 转录的 sRNA 与 RNA 沉默抑制子对 TMV 病毒载体表达系统作用的比较[J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(1): 1-9.
- MA T, ZHANG X Q, DING X Z, et al. Comparison of effects of pol II -derived short RNA and RNA silencing suppressor on TMV-based expression vector system[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(1): 1-9.
- [154] SCHOLTHOF H B. The tombusvirus-encoded P19: from irrelevance to elegance[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(5): 405-411.
- [155] MA J X, DING X Z, LI Z Y, et al. Co-expression with replicating vector overcoming competitive effects derived by a companion protease inhibitor in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 699442.
- [156] 李源源. 芸薹黄化病毒 P0 蛋白抑制 RNA 沉默的分子机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- LI Y Y. Molecular mechanisms underlying suppression of RNA silencing by *Brassica yellows virus* P0 protein[D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.
- [157] 陈道, 张慧颖, 胡书明, 等. 小麦黄花叶病毒 P1 蛋白具有 RNA 沉默抑制活性促进病毒侵染小麦[C]//中国植物病理学会 2023 年学术年会论文集. 2023: 399.
- CHEN D, ZHANG H Y, HU S M, et al. The P1 protein of wheat yellow mosaic virus exerts RNA silencing suppression activity to facilitate virus infection in wheat[C]//Proceedings of the 2023 Annual Conference of the Chinese Society of Plant Pathology. 2023: 399.
- [158] 蒋铭轩, 李康, 罗亮, 等. 植物表达外源蛋白研究进展及展望[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(11): 110-122.
- JIANG M X, LI K, LUO L, et al. Advances on the expressions of foreign proteins in plants[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(11): 110-122.
- [159] CHEN G F, WEI T Y, JU F R, et al. Protein quality control and aggregation in the endoplasmic reticulum: from basic to bedside[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2023, 11: 1156152.
- [160] XU F F, WANG L K. Deciphering ER stress-unfolded protein response relationship by visualizing unfolded proteins in the ER[J]. *Cell Reports*, 2024, 43(6): 114358.
- [161] WANG L, WANG C C. Oxidative protein folding fidelity and redox status in the endoplasmic reticulum[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2023, 48(1): 40-52.
- [162] 康跻耀, 翟松, 张志林. 一种植物蛋白纯化用研磨装置: CN216879518U[P]. 2022-07-05.
- KANG J Y, ZHAI S, ZHANG Z L. Grinding device for purifying vegetable protein: CN216879518U[P]. 2022-07-05.
- [163] 唐静秋, 丁惠, 王晗玉, 等. 一种植物蛋白纯化用固液分离装置: CN217258606U[P]. 2022-08-23.
- TANG J Q, DING H, WANG H Y, et al. Solid-liquid separation device for purifying vegetable protein: CN217258606U[P]. 2022-08-23.
- [164] DIAMOS A G, HUNTER J G L, PARDHE M D, et al. High level production of monoclonal antibodies using an optimized plant expression system[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 17(7): 472.
- [165] SHANMUGARAJ B M, RAMALINGAM S. Plant expression platform for the production of recombinant pharmaceutical proteins[J]. *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*, 2014; 1(6): 4.
- [166] STANDER J, MBEWANA S, MEYERS A E. Plant-derived human vaccines: recent developments[J]. *BioDrugs*, 2022, 36(5): 573-589.
- [167] CHEN Q, HE J Y, PHOOLCHAROEN W, et al. Geminiviral vectors based on bean yellow dwarf virus for production of vaccine antigens and monoclonal antibodies in plants[J]. *Human Vaccines*, 2011, 7(3): 331-338.
- [168] PEYRET H, LOMONOSSOFF G P. When plant virology met *Agrobacterium*: the rise of the deconstructed clones[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(8): 1121-1135.

- [169] KLIMYUK V, POGUE G, HERZ S, et al. Production of recombinant antigens and antibodies in *Nicotiana benthamiana* using 'magnification' technology: GMP-compliant facilities for small- and large-scale manufacturing[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2014, 375: 127-154.
- [170] POMATTO M A C, GAI C, NEGRO F, et al. Oral delivery of mRNA vaccine by plant-derived extracellular vesicle carriers [J]. *Cells*, 2023, 12(14): 1826.
- [171] RAMJEE L, LEMAY W, VURGUN N, et al. Projected impact of a plant-derived vaccine on the burden of seasonal influenza in Canada[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2021, 17(10): 3643-3651.
- [172] UEDA H, OGAWA H. 植物糖タンパク質エピトープの糖鎖生物学: 植物糖鎖エピトープの構造、免疫原性とアレルギー性[J]. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 1999, 11(62): 413-428.
- UEDA H, OGAWA H. Glycobiology of the plant glycoprotein epitope: structure, immunogenicity and allergenicity of plant glycotopes[J]. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 1999, 11(62): 413-428.
- [173] SINGH S, SINGH P K, SACHAN K, et al. Recent progress and challenges in the development of edible vaccines produced by genetically modified plants[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2023, 24(9): 711-720.
- [174] KIM M Y, VERGARA E, TRAN A, et al. Marked

enhancement of the immunogenicity of plant-expressed IgG-Fc fusion proteins by inclusion of cholera toxin non-toxic B subunit within the single polypeptide[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(5): 1402-1416.

- [175] BHAR A. Is it possible to ensure COVID19 vaccine supply by using plants?[J]. *The Nucleus*, 2021, 64(2): 137-141.



**通讯作者:** 潘炜松(1981—),男,副教授,硕士生导师。研究方向主要集中于分子农业领域,包括创制具有人源化翻译后修饰系统的植物反应器,开发合成生物学相关的生物技术工具,利用遗传工程与合成生物学手段开发创新型植物产品,在环境-生物学交叉学科领域,综合运用分子生物学、反向遗传学、细胞力学等技术手段研究水稻重金属砷的吸收、转运与调控机理。

E-mail: 497609872@qq.com

**第一作者:** 宋心雨(2001—),女,硕士研究生。研究方向为水稻生物反应器遗传转化。

E-mail: 2171613731@qq.com

