

口蹄疫病毒 VP1 基因在胡萝卜中的表达^{*}

张 娅¹, 曾君祉², 陈耀锋¹, 黄华樑^{2,3}

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国科学院 遗传与发育学研究所, 北京 100101;

3 安波特基因信息技术有限公司, 北京 102206)

[摘 要] 为了生产一种可以直接口服的口蹄疫疫苗, 以胡萝卜 (*Daucus carota* L. var *sativa*) 无菌幼苗下胚轴诱导的愈伤组织为受体材料, 通过农杆菌 LBA 4404 介导的遗传转化, 在 CaMV 双 35S 启动子的驱动下, 将口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 结构蛋白 VP1 基因的活性肽片段 (包括 2 个 141~160 位肽和 1 个 200~213 位肽的基因片段) 导入胡萝卜愈伤组织细胞。经 PCR 和 PCR-Southern 杂交等方法鉴定转化苗, 确认口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 基因已整合到胡萝卜染色体中, 转化效率达到 52%。SDS-PAGE 试验结果初步证明, 在转化苗总蛋白中有目的基因表达, 胡萝卜种子中可溶性蛋白含量最高, 达 3.57 g/L, 而根中可溶性蛋白含量最低, 仅有 0.17 g/L; 靠近心叶的叶片可溶性蛋白含量可达到 1.475 g/L, 而最外部叶片可溶性蛋白含量仅有 0.37 g/L, 相差近 5 倍。Dot-ELISA 和 ELISA 检测结果表明, 转化苗中表达的口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 可以与 FMDV 灭活疫苗免疫动物制备的抗体特异结合。以上试验结果证明, 口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 基因在转基因胡萝卜中表达成功。

[关键词] 转基因胡萝卜; 口服疫苗; 口蹄疫病毒 VP1 基因

[中图分类号] Q 786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)03-0075-06

Expression of foot-and-mouth disease virus VP1 gene in carrots

ZHANG Ya¹, ZENG Jun-zhi², CHEN Yao-feng¹, HUANG Hua-liang^{2,3}

(1 College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Institute of Genetics and Developmental Biology,

Chinese Academy of Science, Beijing 100101; 3 ABT Gene Engineering Technology Co. Ltd., Beijing 102206, China)

Abstract: In order to produce a kind of oral FMDV vaccine, plant expression vector pBFMDV containing VP1 gene fragments (containing two 141-160 peptides and one 200-213 peptide) of foot-and-mouth disease virus (FMDV) under the control of cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S double promoters was constructed. By infected with *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, the gene fragments were transferred into carrot calli. PCR and PCR-Southern analyses of transgenic carrot DNA confirmed that the fragments of FMDV VP1 gene were introduced into the plant genomic DNA successfully, the rate of transformation was up to 52%. The result of SDS-PAGE showed that the gene fragments of interest were expressed in some of the transgenic plants. The soluble protein from carrot's seed is the highest, and the quantity is up to 3.57 g/L. However, the protein from carrot's root is the lowest, and the quantity is only 0.17 g/L. What's more, the soluble protein from apical leaf is up to 1.475 g/L, but the protein from outward leaf is only 0.37 g/L. The difference between the two was more than 5-fold. The binding activity of the expressed proteins to anti-FMDV antibodies was confirmed by using Dot-ELISA and ELISA. These results demonstrated that the fragments of FMDV VP1 gene had been expressed in transgenic carrots successfully.

Key words: transgenic carrots; oral vaccine; FMDV VP1 gene

口蹄疫 (foot-and-mouth disease, FMD) 是偶蹄动物的一种急性、发热性、高度接触性传染病, 被国

* [收稿日期] 2006-08-25

[作者简介] 张 娅 (1977-), 女, 辽宁抚顺人, 在读博士, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: yaya19770719@yahoo.com.cn

际兽医局列为头号 A 类传染病。该病传播途径多、传播速度快,曾多次在世界范围内发生大流行。虽然该病的死亡率不高(除幼畜外),但需要花费大量的人力、物力和财力来防治,且一旦爆发会造成巨大的经济损失。因此,世界各国非常重视 FMD 的研究。

口蹄疫由口蹄疫病毒引起。口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)属于小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属。VP1 基因是 FMDV 主要的免疫原性基因,它含有 B 细胞抗原表位(141~160 位肽)和 T 细胞抗原表位(200~213 位肽),能诱导机体产生中和抗体^[1]。

自 20 世纪 80 年代初开始,利用转基因植物生产口蹄疫疫苗取得了很大进展。Carrillo 等^[2-3]将 FMDV VP1 基因转化到拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和马铃薯中,首次利用转基因植物表达抗原引起动物产生抗病毒的免疫反应。随后 Wigdorovitz 等^[4-5]将 FMDV VP1 基因转化烟草和苜蓿,免疫小鼠后均可产生抗病毒特异免疫反应。以上试验结果极大地促进了口蹄疫疫苗的研究,但由于转化受体主要集中在一些模式植物上,而烟草的毒性、马铃薯块茎难以生食等均限制了生产的转基因植物疫苗直接用于口服。胡萝卜种植广泛,易于组织培养和转化,可以生食,对人类特别是婴幼儿较为理想,是生产口服疫苗理想的“生物反应器”。本试验以胡萝卜为转化受体,研究了 FMDV 结构蛋白 VP1 基因在转基因胡萝卜中的表达情况,为进一步研究利用转基因植物生产口服疫苗提供了一条新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 胡萝卜 胡萝卜(*Daucus carota* L. var. *sativa*)栽培品种 Carol(法国品种),由北京市农林科学院蔬菜研究中心孙盛湘老师惠赠。

1.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 Top10,根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 LBA 4404,均由安波特基因工程技术有限公司提供。质粒 pBCh,植物表达载体,带有花椰菜花叶病毒(CaMV)双 35S 启动子,选择性标记基因 NPT II 和几丁质酶基因;质粒 pUC19/FMDV,在 pUC19 多克隆位点 *Sma* I 处插入 FMDV VP1 基因片段(包括 2 个 141~160 位肽和 1 个 200~213 位肽的基因片段),均由安波特基因工程技术有限公司提供。

1.1.3 主要试剂 DNA 分子质量标准 Marker DL 2000,购自大连宝生物基因工程有限公司;蛋白

质量标准 Marker,购自华美生物工程公司。质粒 DNA 提取试剂盒为 Promega 公司 Wizard Miniprep DNA Purification System,回收 DNA 试剂盒为鼎国公司的 DNA 片段快速纯化/回收试剂盒, DIG-DNA 标记检测试剂盒为 Roche 公司产品。各种限制性内切酶和修饰酶分别购自 Promega 公司、大连宝生物基因工程有限公司。免疫检测用一抗为 FMDV 灭活疫苗免疫动物制备的兔抗血清,购自兰州兽医所;二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG,为 Pierce 公司产品。

1.1.4 引物与测序 FMDV VP1 基因片段特异扩增引物 FF (5'-CGG GAT CCG CTG CCA TGG TTC CAA-3') 和 FR (5'-GGG GTA CCT CCC TAT TAA TTT GCC ATA GA-3'), CaMV 35S Primer (5'-AGA TTA GCC TTT TCA ATT TCA GAA-3') 和 Nos terminator Primer (5'-CGC AAG ACC GGC AAC AGG-3'),均由上海生工生物技术公司完成。测序由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.1.5 胡萝卜用培养基 种子萌发培养基 1/2 MS: 1/2 MS^[6] + 15 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂, pH 5.8; 诱导培养基 B₅D: B₅^[7] + 1 mg/L 2,4-D + 30 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂, pH 5.8; 选择培养基 B₅DS: B₅D + 500 mg/L 羧苄青霉素(Cb) + 100 mg/L 氨苄青霉素(Km), pH 5.8; 生根培养基 M S₀: MS + 100 mg/L Km + 50 g/L 蔗糖 + 8 g/L 琼脂, pH 5.8。

1.2 植物表达载体 pBFMDV 的构建

经 *Bam* H I、*Kpn* I 双酶切从质粒 pUC19/FMDV 切下 540 bp 左右的 FMDV VP1 基因片段,回收。将植物表达载体 pBCh 用 *Bam* H I、*Kpn* I 双酶切,回收大片段,与前面回收的 FMDV VP1 基因连接,组成植物表达载体 pBFMDV,通过电激法转化到根癌农杆菌菌株 LBA 4404 中^[8]。

1.3 农杆菌介导的遗传转化

胡萝卜种子经无菌消毒后接种于 1/2 MS 培养基上,于 24 ℃、暗培养条件下萌发,待种子萌发 7~10 d 后,将无菌苗放于 4 ℃冰箱中低温培养 10 d 后,切下下胚轴,切成 0.5 cm 的截段,接种于 B₅D 培养基上,于 24 ℃、12 h/d 散射光下光照培养,诱导愈伤组织,大约 6 周后愈伤组织形成,作为遗传转化的材料。

取根癌农杆菌菌液(*OD*₆₀₀ 值为 0.3~0.5) 20 mL, 4 000 r/min 离心 10 min,收集菌体后用 5 mL 1/2 MS 液体培养基重悬。将愈伤组织放入菌液中,静置 10 min,取出,吸去多余的菌液,接种于覆盖一

层无菌滤纸的无任何抗生素的MS₀₁培养基上, 26℃、黑暗条件下共培养2 d后, 转接到B₅DS培养基上, 于24 h、12 h/d 散射光下光照培养, 每10 d 转接1次, 待抗性愈伤组织分化出绿色抗性芽后, 转接于MS₀₁培养基上诱导根的形成。待抗性苗形成后, 转接于1/2MS培养基上。

1.4 转化苗的分子鉴定

1.4.1 转化苗的PCR 检测 用CTAB 法提取转化苗基因组DNA^[9], 利用引物FF 和FR 进行PCR 初步鉴定。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 10~15 min; 95℃ 变性 30 s, 50℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 25 次循环; 最后再 72℃ 延伸 10 min。

1.4.2 转化苗的PCR-Southern 检测 使用Roche 公司生产的DIG-DNA 标记检测系统, 利用引物CaMV 35S Primer 和Nos terminator Primer 从胡萝卜叶片基因组DNA 中扩增出1 条约700 bp 的片段, 采用高盐转移法转移至尼龙膜上, 以引物FF 为杂交探针, 采用末端标记法进行DIG 标记, 对转化苗进行PCR-Southern 杂交检测。

1.5 转化苗的蛋白水平鉴定

1.5.1 胡萝卜总蛋白的提取 取胡萝卜新鲜组织0.2 g, 加液氮研磨至粉末, 加入400 μL 蛋白提取缓冲液(0.1 mol/L Tris, pH 7.2, 20 mmol/L β-巯基乙醇), 4℃、10 000 r/min 离心10 min, 吸取上清^[10], 取10 μL 用考马斯亮蓝G250 测定蛋白浓度后, -20℃ 冻存。

1.5.2 转化苗总蛋白的SDS-PAGE 银染检测 各取60 μL PCR-Southern 杂交阳性苗与非转化苗的叶片和根部蛋白进行15% SDS-PAGE 银染检测, 银染方法见文献^[11]。

1.5.3 免疫酶斑点(Dot-ELISA) 检测 Dot-

ELISA 检测中以IPTG 诱导下FMDV VP1 基因在大肠杆菌中的表达产物为阳性对照, 以非转基因植株总蛋白为阴性对照。将胡萝卜转基因植株、阴性对照和阳性对照总蛋白直接点在用PBS 平衡好的硝酸纤维素膜上进行免疫反应: 首先用含30 g/L BSA 的PBS 封闭膜过夜, 免疫反应的一抗用含15 g/L BSA 的PBS 1:500 稀释, 室温结合3 h后, PBST 洗膜4次, 每次3 min; 二抗用含15 g/L BSA 的PBS 1:5 000 稀释, 室温结合1 h后, PBST 洗膜5次, 每次3 min; 最后用OPD 显色液显色。

1.5.4 ELISA 检测 ELISA 检测中阳性对照与阴性对照的设定同Dot-ELISA 检测。在96 孔酶标板中每孔包被约100 μL 总蛋白, 4℃ 包被过夜后, PBST 洗1次; 用含30 g/L BSA 的PBS 37℃ 封闭2 h后, PBST 洗1次; 免疫反应的一抗用含15 g/L BSA 的PBS 1:250 稀释, 室温结合2 h后, PBST 洗3次, 每次5 min; 二抗用含15 g/L BSA 的PBS 1:750 稀释, 室温结合1 h后, PBST 洗5次, 每次5 min; 最后用OPD 显色液显色。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体pBFMDV 的构建与鉴定

pUC19/FMDV 经BamH I、Kpn I 双酶切后回收大小约为540 bp 的片段, 与植物表达载体pBCh 用BamH I、Kpn I 双酶切后回收的大片段连接, 构成植物表达载体pBFMDV, 载体图见图1(a), DNA 序列测序结果无误。用BamH I、Kpn I 对植物表达载体pBFMDV 进行双酶切鉴定, 结果(图1(b))证明从质粒上可以切下1 条540 bp 的片段。最后将构建的植物表达载体pBFMDV 通过电激法转化到农杆菌LBA 4404 中。

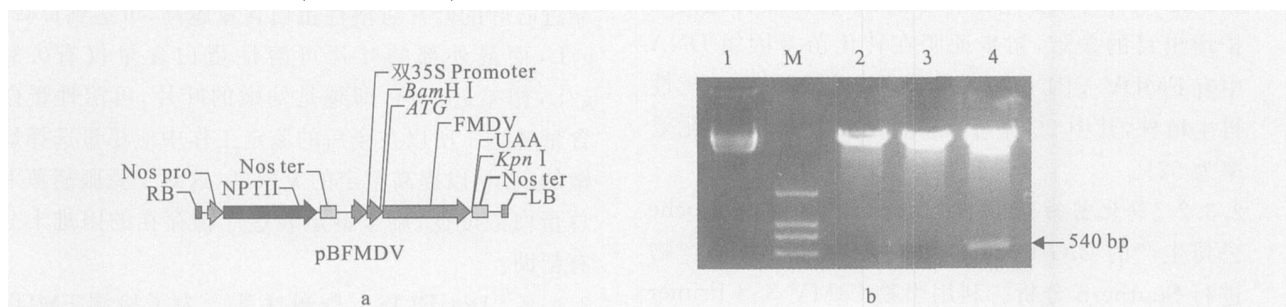


图1 植物表达载体pBFMDV 质粒图及其酶切鉴定

a 植物表达载体pBFMDV 质粒图; b 质粒载体pBFMDV 的酶切鉴定; M. Marker DL 2000; 1 质粒载体pBFMDV; 2 质粒载体pBFMDV 经BamH I 单酶切; 3 质粒载体pBFMDV 经Kpn I 单酶切; 4 质粒载体pBFMDV 经BamH I/Kpn I 双酶切;

Fig 1 Diagram of plant expression vector pBFMDV and electrophoresis for restriction map

a Diagram of plant expression vector pBFMDV; b Electrophoresis for restriction map of pBFMDV; M. Marker DL 2000;

1 pBFMDV; 2 pBFMDV (BamH I); 3 pBFMDV (Kpn I); 4 pBFMDV (BamH I/Kpn I)

2.2 胡萝卜的转化和转化苗的筛选

卡那霉素抗性试验结果表明,在附加 100 mg/L Km 的培养基上接种未经转化的胡萝卜愈伤组织不能分化出抗性芽。将农杆菌侵染转化的胡萝卜愈伤组织接种于附加 500 mg/L Cb 和 100 mg/L Km 的 B₅DS 上,每 10 d 转接 1 次,4 周后开始分化出绿色的抗性芽,并继续分化出根,长成抗性植株。

2.3 转化苗的分子鉴定

2.3.1 转化苗的 PCR 鉴定 利用引物 FF 和 FR PCR 检测再生植株中是否已经成功转化了 FMDV VP1 基因,其 PCR 产物电泳结果如图 2 所示。

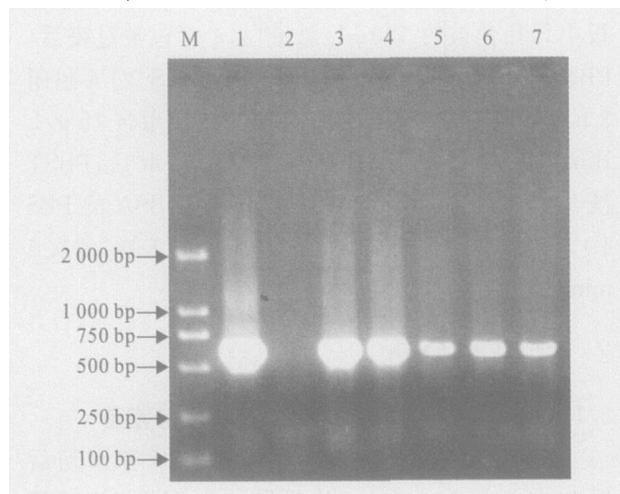


图 2 转化苗中 FMDV VP1 基因的 PCR 检测

M. Marker DL 2000; 1. 阳性对照质粒 pBFMDV;
2. 非转化苗; 3~7. 转化苗

Fig 2 PCR assay of FMDV VP1 gene in transgenic plants

M. Marker DL 2000; 1. Positive control plasmid pBFMDV;
2. Non-transformed plant; 3-7. Transgenic plants

图 2 中阳性对照质粒 pBFMDV 和转化苗在 540 bp 左右可以扩增出特异的条带,而非转化苗未扩增出目的条带,初步证明在转化苗基因组 DNA 中有 FMDV VP1 基因片段存在。共检测 50 株抗性再生植株,其中 26 株可以扩增出特异条带,转化效率为 52%。

2.3.2 转化苗的 PCR-Southern 杂交 使用 Roche 公司生产的 DIG-DNA 标记检测系统对 PCR 产物进行 Southern 分析。利用引物 CaMV 35S Primer 和 Nos terminator Primer 从胡萝卜叶片基因组 DNA 中扩增出 1 条约 700 bp 的片段,经 1.0% 琼脂糖电泳,采用高盐转移法转移至尼龙膜上,按产品说明进行杂交。结果表明,从抗性植株 DNA 扩增出 700 bp 左右的片段能与探针发生特异性结合(图 3),初步

确定该目的基因已整合到抗性再生植株的染色体中。

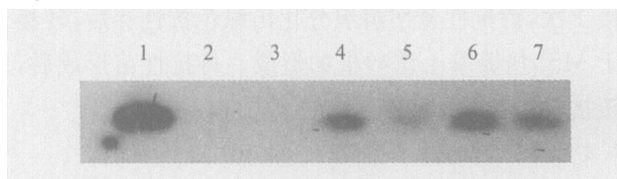


图 3 转化苗中 FMDV VP1 基因的

PCR-Southern 杂交检测

1. 阳性对照质粒 pBFMDV; 2. 非转化苗;
3. 空白对照; 4~7. 转化苗

Fig 3 PCR-Southern hybridization assay of FMDV VP1 gene transgenic plants

1. Positive control plasmid pBFMDV; 2. Non-transformed plant; 3. Blank control; 4-7. Transgenic plants

2.4 转化苗的蛋白水平鉴定

2.4.1 SDS-PAGE 检测结果 各取 60 μL PCR-Southern 杂交阳性苗与非转化苗的叶片和根部蛋白进行 15% SDS-PAGE 银染检测,银染结果见图 4。从图 4 可以看出,在分子量 20 ku 左右可以看到目的蛋白的表达,而这条蛋白条带在非转基因植株中是不存在的,同时在转基因植株的根部蛋白中未见到目的蛋白的表达,这可能是由于表达量过低造成的。这对于疫苗的生产十分不利。

在试验中分别选取胡萝卜植株最靠近心叶和最外面的叶片各 2 片,种子、根各 0.2 g,提取总蛋白,按照 Bradford^[12] 的方法测定胡萝卜各器官的总蛋白浓度,比较它们之间的差异。结果表明,胡萝卜种子中可溶性蛋白含量最高,达 3.57 g/L,而根中可溶性蛋白含量最低,仅有 0.17 g/L;植株叶片中可溶性蛋白含量多少不一,与选取叶片的部位有关:越靠近心叶的叶片可溶性蛋白含量越高,可达到 1.475 g/L,而最外部的叶片可溶性蛋白含量仅有 0.37 g/L,相差近 5 倍,即越是幼嫩的叶片,可溶性蛋白含量越高。所以在今后的鉴定工作中应尽量选择幼嫩的组织,以提高鉴定的灵敏度,这对于克服胡萝卜总蛋白浓度低,难于鉴定表达产物存在的困难十分有帮助。

2.4.2 Dot-ELISA 检测结果 为了检测 FMDV VP1 活性肽基因在转基因植株中的表达情况,应用免疫酶斑点技术对 10 株转基因胡萝卜表达的目的蛋白进行检测,结果见图 5。

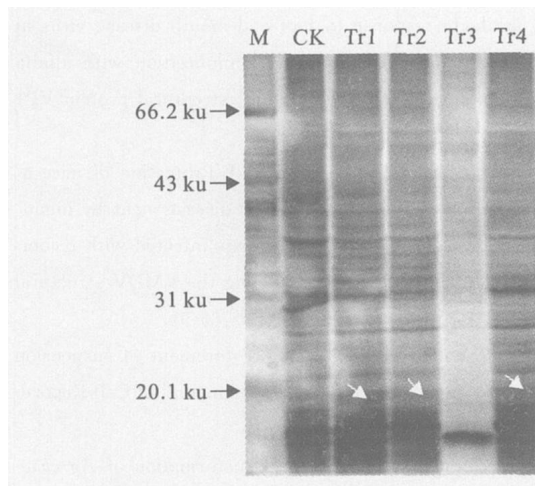


图4 pBFMDV 转基因植株总蛋白的 SDS-PAGE 银染检测

M. 蛋白分子质量标准M marker; CK. 非转基因植株总蛋白;
Tr1, Tr2, Tr4 转基因植株叶部总蛋白; Tr3 转基因植株
根部总蛋白; 箭头所指为表达的目的蛋白

Fig 4 Detection of the expression of FMDV VP1
in transgenic plants by SDS-PAGE silver-dyed
M. Marker; CK. Protein from non-transformed plant;
Tr1, Tr2, Tr4 Protein from leaves of transgenic plants;
Tr3 Protein from root of transgenic plant; A row s
indicate the position of the expression of FMDV VP1

从图5可以看出, 阳性对照和10株转基因植株的总蛋白中都可以检测到VP1活性肽基因的表达, 从斑点的强弱上可以看出, 各转基因植株间表达量间存在很大差异, 而非转基因植株中未检测到该基因的表达, 表明转基因植株表达了目的蛋白。

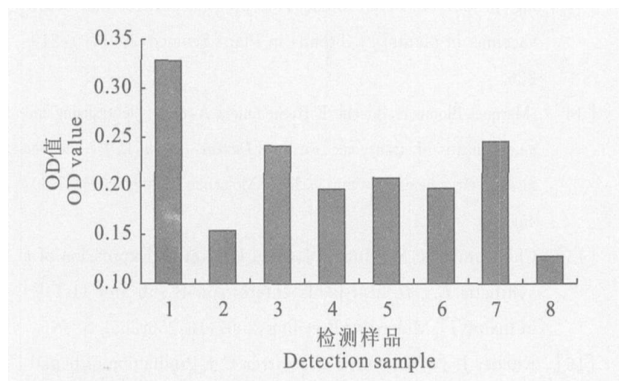


图6 转基因植株总蛋白的 ELISA 检测结果

1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3~7. 转基因植株总蛋白;
8. 转基因植株根部蛋白

Fig 6 Results of ELISA of protein from transgenic plants
1. Positive control; 2. Negative control;
3- 7. Total protein from transgenic plants;
8. Protein from root of transgenic plant

2.4.3 ELISA 检测结果 将胡萝卜转基因植株
阴性对照和阳性对照总蛋白各 100 μ L/孔加入 96

图5 转基因植株的 dot-ELISA 检测

1A-1D, 2A-2C, 3A-3C. 转基因植株总蛋白; 2D. 阳性对照;
3D. 非转基因植株总蛋白

Fig 5 Detection of the expression of FMDV VP1
in transgenic plants by dot-ELISA

1A-1D, 2A-2C, 3A-3C. Protein from transgenic plants;
2D. Positive control; 3D. Protein from non-transformed plant

孔酶标板中, 通过 ELISA 进行抗原活性检测, 结果见图6。图6结果表明, 与阴性对照相比, 在转基因植株中表达的目的蛋白具有活性。但是转基因植株根部总蛋白检测的OD值低于阴性对照的本底水平, 说明没有活性目的蛋白的存在, 这可能是由于表达的蛋白浓度过低造成的。

3 讨论

利用转基因植物生产可以口服的疫苗, 是近年来生物领域研究的热点。1992年Mason利用转基因烟草表达了LT-B抗原, 并提出了植物性口服疫苗的概念。所谓植物性口服疫苗就是运用转基因技术, 通过农杆菌将抗原基因(如口蹄疫病毒抗原基因、乙肝病毒表面抗原基因等)导入植物细胞, 从而得到带有抗原基因的植物, 人类或动物生吃这些植物就可以达到免疫。经过十几年的发展, 转基因植物疫苗已取得了很大进展^[13]。胡萝卜作为口服疫苗的受体, 具有很多的优越性: 第一, 它可以生食, 尤其是适合于婴幼儿; 第二, 其组织培养和遗传转化体系成熟, 有利于作为“生物反应器”。因此, 已有一些研究以胡萝卜为受体表达抗原片段, 如王凌健等^[10]利用转基因胡萝卜表达了肺结核疫苗, Marquet-Blouin等^[14]利用转基因胡萝卜表达了麻疹病毒疫苗, 这些

研究成果都极大地促进了转基因胡萝卜用于植物性口服疫苗的研究。

在本试验中,选择的抗原基因是 FMDV VP1 的活性肽基因。以胡萝卜愈伤组织为转化材料,2 个月后可以得到卡那霉素抗性苗,大大缩短了试验周期。试验中选择的愈伤组织是经低温处理的下胚轴诱导形成的,与未经低温处理得到的愈伤组织相比,转化率可以提高 1 倍,达到 52%。这与王凌健等^[10]的试验结果相似。PCR 和 PCR-Southern 的结果证明,目的基因已经插入到胡萝卜基因组 DNA 中。随机挑取几株转基因植株,提取根部和叶部总蛋白,考马斯亮蓝染色结果表明,目的蛋白条带很弱,在总的可溶性蛋白中所占比例低于 0.1% (结果未列出);进一步进行银染,可以清楚地看到目的蛋白条带,但是在根部总蛋白中始终看不到目的蛋白的表达,这对于口服疫苗是十分不利的。由于表达量过低,Western 检测未见明显的杂交带形成(结果未列出)。Dot-ELISA 和 ELISA 检测结果表明,表达的抗原具有活性,可以和相应的抗体发生特异性结合。

目的蛋白表达量偏低的问题,一直制约着植物性口服疫苗的发展,在本试验中也同样遇到了这个问题。目前,有许多研究希望解决这一问题,主要的方法有应用不同的组织特异性或诱导型的启动子,如块茎特异性启动子、胚乳特异性启动子等,不同的增强子序列或信号肽序列,如 TEV 的增强子序列、内质网滞留序列、液泡定位的信号肽等,而且都取得了一定的进展^[15-17]。在本试验中,使用双 35S 启动子,希望提高目的蛋白的表达量,但效果并不是十分明显。在进一步的试验中,可通过优化目的基因的序列和使用特殊的信号肽序列来提高目的蛋白的表达量。

[参考文献]

- [1] Forss S, Strebel K, Beck E. Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus [J]. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12: 6587-6601.
- [2] Carrillo C, Wigdorovitz A, Oliveros J C, et al. Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants[J]. *Journal of Virology*, 1998, 72 (2): 1688-1690.
- [3] Carrillo C, Wigdorovitz A, Trono K. Induction of a virus-specific antibody response to foot and mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants[J]. *Virology Immunology*, 2001, 14(1): 49-57.

- [4] Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus S 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, 264(2): 347-353.
- [5] Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus S M J. Protection of mice against challenge with foot-and-mouth disease virus by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1 [J]. *Virology*, 1999, 264(1): 85-91.
- [6] Gamborg L, Miller R A. Nutrient requirement of suspension culture of soybean root cells[J]. *Experimental Cell Research*, 1968, 9: 195-198.
- [7] Wen-Jun S, Forde B G. Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17: 8385.
- [8] Murashige T, Skoog F A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture[J]. *Plant Physiology*, 1962, 15: 473-497.
- [9] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8: 4241-4245.
- [10] 王凌健,倪迪安,陈永宁,等.利用转基因胡萝卜表达肺结核疫苗[J]. *植物学报*, 2001, 43(2): 132-137.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等.分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [13] Daniell H, Streadfield S J, Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2001(6): 219-226.
- [14] Marquet-Bouin E, Bouche F B, Steinmetz A, et al. Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.) - derived measles virus hemagglutinin[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 51(4): 459-469.
- [15] Chikwamba R, Murray J, Shou H X, et al. Expression of a synthetic *E. coli* heat-labile enterotoxin B sub-unit (LT-B) in maize[J]. *Molecular Breeding*, 2002, 10: 253-265.
- [16] Ritcher L J, Thanawala Y, Antzen C J. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 1167-1171.
- [17] Sojikul P, Buehner N, Mason H S A. A plant signal peptide-hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2003, 100(5): 2209-2214.