

植物生物反應器之應用 潛力-以基因轉殖萵苣 為例

撰文/劉程煒·尤進欽

前言

萵苣 (Lettuce) 為一種常見的菊科蔬菜，根據聯合國糧農組織 (Food And Agricultural Organization of United Nations, FAO) 統計，2008 年全球萵苣類蔬菜的總產量約為 23,531,963 公噸，普遍使用在生菜沙拉、三明治、漢堡等，為西式料理中常見的一項食材。由於栽培品種的差異與飲食習慣的不同，亞洲國家大部分還是經烹調後食用為主，藉以消除萵苣特殊之苦味。而近年來由於國人飲食習慣逐漸西化，生機飲食日益受到消費者的重視，具特殊風味的結球萵苣或稱之為美生菜 (Iceberg lettuce) 深獲國人的青睞，使我國萵苣產業發展十分迅速，年消費量約 2 萬公噸。

傳統的生物反應器，例如發酵工業，主要是以人工設施來提供一個體外的穩定細胞培養環境，但隨著生物科技發展迅速，開發以哺乳動物、昆蟲或是植物細胞為高效率的生物反應器平台，亦具有有相當優勢與發展潛力。

植物生物反應器之發展與優勢

自從 Mason 等人 (Mason *et al.*, 1992) 首次以菸草為生物反應器平台，用以生產 B 型肝炎表面抗

原蛋白成功之後，在人類疫苗的發展史上立下了一個新的里程碑，亦將轉基因植物帶入了一個新的應用領域，尤其是疫苗的開發更是傳統生物反應器所無法取代的。隨著新基因工程技術不斷的發展與研究，利用各種宿主表達系統來生產大量具有醫藥價值的酵素、蛋白質或藥品的目標已逐漸實現。利用植物做為生物反應器與以微生物和動物平台等系統相比，植物載體最大的優點是可以大規模並廉價的生產異源蛋白。這些醫用蛋白保持了重組蛋白的理化特性與生物活性，有的經純化後可做為藥劑、診斷試劑或親合劑等，有的甚至不需純化就能作為食用口服疫苗。這些重組蛋白甚至可長期儲藏於植物組織如葉片、果實或種子中，便於運輸和推廣。

利用轉基因植物為生物反應器平台，尤以植物生產的次單位疫苗具有獨特優勢，植物生產疫苗具有下列優點：(1) 疫苗主要以口服遞送抗原，而植物細胞壁主要是由纖維素與醣類所組成，在胃中可提供保護抗原，在腸道中達到逐步釋放抗原的目的。(2) 植物平台所生產之蛋白疫苗可直接食用或乾燥磨成粉末，植物組織尚可選擇將蛋白部分或全部萃取得成膠囊服用。(3) 植物生產的疫苗儲運可不需低溫保存 (Cold Chain)，疫苗植物全株或部分萃取物

能在室溫下儲藏和運輸。(4) 在誘導黏膜和血清免疫反應上，由於植物生產的疫苗主要用來誘導黏膜免疫系統 (IgA)，這樣可預防病原體進入黏膜表面；它們也可能誘導血清和細胞毒素反應。(5) 相較於傳統疫苗生產平台，植物生產疫苗成本可降低 100-1000 倍。(6) 植物可經由控制使抗原在適合的胞器內累積 (內質網或葉綠體)，這讓植物平台成為最佳表達系統。(7) 異源基因操控容易，植物基因轉殖與再生技術目前皆已成熟，基因操縱更加容易。(8) 植物大規模生產容易，基因改造植物能方便儲藏，例如：種子，便於發展中國家在有限時間內能生產大量疫苗。(9) 植物疫苗較傳統疫苗安全，不會有哺乳動物病原體交互污染發生。(10) 植物生產疫苗非常適合用來防治生化武器，面對生物性恐怖攻擊日益高漲，種植植物取得疫苗是最適合、安全並且可降低成本。(11) 植物適合開發禽畜與動物用疫苗，因其成本低，大規模使用可使飼主降低飼養成本。(12) 傳統注射式疫苗容易引起兒童的排斥心理，植物生產的疫苗可添加於食物中，使用更加具有彈性。(13) 可利用轉基因植物快速製造複合式多價疫苗。(14) 口服植物生產的疫苗可減少因注射所增加的成本以及注射針器、針頭等醫療廢棄物之污染源等 (Streatfield and Howard, 2003; Sala *et al.*, 2003)。萵苣與其他植物平台如番茄、玉米等相較，萵苣主要食用部位為地上部葉片，生長週期短，作物栽培更加容易，單位面積複作與周轉指數高，且農藥施用與殘留機率大幅降低，為一具有潛力與安全之植物生物反應器平台。

基因轉殖萵苣之研究現況

萵苣基因轉殖的目的，從早期藉以大量表現特殊蛋白質如草酸脫羧酶 (Oxalate decarboxylase, *oxdc*) (Dias *et al.*, 2006)、LEA (Late embryogenesis abundant) (Park *et al.*, 2005)、儲鐵蛋白 (Ferritin) (Goto *et al.*, 2000)、抗旱基因 ABF3 (Vanjildorj *et al.*, 2005)、異戊烯轉移酶 (isopentenyl transferase, IPT)

(McCabe *et al.*, 2001) 等增加抗病性、對抗環境逆境能力或生長快速以增加產量為目標，轉而以萵苣為生物反應平台，利用其優勢，快速並大量生產高經濟價值產物，如人類疫苗、動物用疫苗等外源抗原蛋白、干擾素或特殊營養成分等，詳細介紹如下。

(一) 人類疫苗生產平台

開發轉基因萵苣作為疫苗生物反應器平台，在控制人類流行病傳播以及公共衛生的貢獻上，目前已有初步的研究成果，轉殖萵苣表現抗原蛋白作為疫苗的報告包括有麻疹 (Webster *et al.*, 2006)、霍亂毒素 B (Kim *et al.*, 2006)、鼠疫 (Rosales-Mendoza *et al.*, 2010)、以及人類 β 干擾素 (Li *et al.*, 2007)。

麻疹是由麻疹病毒 (Measles virus) 感染引起的人類傳染病，為兒童常見的傳染病，大約 5-10% 的患者因細菌或病毒重覆感染而併發症中耳炎，嚴重會導致肺炎與腦炎。麻疹病毒表面具有紅血球凝集素 (hemagglutinin) 和溶血素 (hemolysin) 等表面蛋白，透過辨識並附著到細胞表面的受體後，在細胞表面開孔來幫助病毒進入並感染人類宿主細胞，為主要引起免疫反應的抗原。Webster 等人 (2006) 將麻疹紅血球凝集素蛋白基因轉殖到萵苣中，並成功的於萵苣葉片中偵測到麻疹血球凝集素蛋白表現。實驗結果初步顯示不論是注射自萵苣葉片萃取出紅血球凝集素蛋白、餵食冷凍乾燥的萵苣葉片粉末或是鼻腔投藥輔以佐劑 saponin，皆能在小鼠體內產生抗體。

霍亂 (Cholera) 是由霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*) 造成急性腹瀉的疾病，患者將面臨到大量的腹瀉，並導致快速失去水分和鹽類，造成脫水、緊張和體內鹽類不平衡。Kim 等人 (2006) 利用霍亂毒素 B 次單位的基因 (synthetic cholera toxin B, sCTB)，並將此基因以農桿菌法轉殖至萵苣中，於轉殖再生萵苣葉組織中可獲得 CTB 蛋白，約占總可溶性蛋白 (TSP) 的 0.24%。神經節糖苷免疫分析 (GM₁-ganglioside-ELISA) 結果亦證實植物產生的 sCTB

蛋白形成有五聚體結構。大腸桿菌熱性腸毒素 (Heat-labile enterotoxin B, LTB) 亦是以人體細胞膜上的神經節糖苷 (GM₁-ganglioside) 作為受體，預估全世界每年約有十億人因大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 腸毒素而導致腹瀉，並造成將近一百萬人的死亡。Kim 等人 (2007) 將大腸桿菌熱性腸毒素 B 次單位基因 (synthetic LTB, sLTB) 轉殖至萵苣中，於葉組織中獲得重組 sLTB 蛋白，占總可溶性蛋白的 1.0-2.0%，較轉殖馬鈴薯蛋白的表現量高出百倍，可充分的引起全身性免疫反應及黏膜免疫反應。

鼠疫桿菌 (*Yersinia pestis*) 是造成淋巴腺鼠疫、肺鼠疫以及原發性敗血性鼠疫的致病原，為一種人畜共通的傳染病，鼠疫在歷史上多次造成大流行，特別是在十四世紀爆發的黑死病，估計約有四分之一的歐洲人口死於此病，而目前並無有效的疫苗可以用來預防鼠疫的傳播。人類鼠疫多來自於疫鼠的跳蚤叮咬而感染，有 90% 的致死率，鼠疫桿菌有兩種表面蛋白，為莢膜蛋白 F1 (fraction I) 和 V 抗原，F1 抗原具有抗吞噬作用，是此菌重要的毒力成分。Rosales-Mendoza 等人 (2010) 將 *f1* 抗原基因與 *v* 抗原基因融合表現在萵苣葉片中，於葉片獲得 *f1-v* 蛋白，占總可溶性蛋白的 0.08%。將 10 μ g 轉殖萵苣葉片萃取物輔以氫氧化鋁佐劑進行小鼠皮下注射，實驗結果顯示來自於萵苣的重組蛋白可誘導小鼠產生自體免疫反應。

人類 β 干擾素 (Human Interferon-beta, HuIFN-beta) 為第一型的干擾素。干擾素 (IFN) 屬於醣蛋白，人類身上共發現 α 、 β 、 γ 三種類型。 β 型干擾素是由成纖維細胞產生的，是有效的病毒抑制劑，並具有一定的抗癌作用。Li 等人 (2007) 將人類 β 干擾素基因 (HuIFN-beta) 以農桿菌真空滲透法短暫表現在萵苣中，其表現的人類 β 干擾素經由西方墨點檢測證實有抗病毒的作用，並且有高的生物活性 3.1 \times 10⁴ IU/ml。

其他的研究成果還包括了利用萵苣生產 B 型肝炎疫苗 (HBsAg) (Kapusta *et al.*, 1999)，於動物與人

體試驗上皆能引起免疫反應。生產人類小腸三葉因子 (hITF) (Zuo *et al.*, 2001) 蛋白，用以修復消化道黏膜，預防與治療胃潰瘍用等。以萵苣作為生物反應平台將能生產更為穩定，且具有完全相同功能的重組蛋白。

(二) 動物疫苗生產平台

禽鳥類病毒性疾病很多，若沒有好好處理，在相互傳染之下，常常會造成雞隻大量死亡而導致嚴重的經濟損失。例如雞傳染性華氏囊炎是由傳染性華氏囊病毒 (Infectious Bursal Disease Virus, IBDV) 引起的疾病，主要侵襲雞隻華氏囊之淋巴組織，引起嚴重的免疫抑制能力，其雞隻體內抗體數量下降或無抗體，爾後感染其他疾病 (二次感染) 導致死亡；禽流感 (Avian Influenza Virus, AIV) 會引起禽類呼吸系統到嚴重全身性敗血症等多種症狀的傳染病，禽類在感染後的死亡率很高；新城病是由新城疫病毒 (Newcastle Disease Virus, NDV) 所引起的一種高度傳染力及高度致病力的病毒性疾病，所有禽類都會受到感染，尤其小雞的感染率高，且致死率高。雞的 α 干擾素 (Chicken alpha interferon, ChIFN- α) 是一種蛋白質，在雞的防禦上扮演一個重要的角色，可以對抗病毒感染。Song 等人 (2007) 將雞的 α 干擾素基因 (*ChIFN- α*)，以農桿菌真空滲透法導入萵苣中，可在每公斤葉組織中獲得 0.393 μ g 的重組蛋白，占總可溶性蛋白的 0.0004%，其基因轉殖萵苣產生的重組蛋白顯示抗病毒活性，可以抑制在雞胚胎纖維母細胞上水泡性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus) 的複製。

豬瘟 (Classical Swine Fever, CSF) 是由豬瘟病毒 (Classical Swine Fever Virus, CSFV) 感染造成豬隻高傳染性與高致死性之疾病，且目前尚無藥物可以治療，必須著重預防的工作。豬瘟病毒為單股正向的 RNA 病毒，可轉譯出四個結構蛋白 (C、Erns、E1 和 E2)，其中位於病毒表面之 E2 醣蛋白為主要誘發感染豬隻產生中和抗體的結構蛋白。Legocki 等人

(2005) 利用萵苣為蛋白質生產平台，將豬瘟病毒表面 E2 醣蛋白基因轉殖入萵苣，轉殖萵苣葉片每公克乾重可純化出 160 μ g 的 E2 醣蛋白。將純化自轉殖萵苣葉片中之 E2 醣蛋白進行動物免疫試驗，結果顯示餵食小鼠 0.5 μ g 的 E2 醣蛋白，即可在小鼠體內偵測到抗 E2 醣蛋白的 IgG 與 IgA 皆有提升現象。

豬流行性下痢是由豬流行性下痢病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的高度傳染性疾病，罹病豬隻會引起嘔吐、下痢和食慾不振。Huy 等人 (2009) 將 PEDV 表現抗原蛋白基因 COE 與志熱性腸毒素 B 基因 LTB 重組，成功於萵苣葉片中表現該融合蛋白，在葉中獲得 LTB-COE 重組蛋白的量占總可溶性蛋白 0.026-0.048%。

(三) 特殊營養成分生產平台

對於食品製造工業上的應用，利用轉殖萵苣表現特殊蛋白或增加營養成分等皆有報導，包括有表現味覺修飾蛋白基因神秘果素 (Sun *et al.*, 2006) 以及增加葉片中維生素 C (Lim *et al.*, 2008)、維生素 E (Cho *et al.*, 2005) 或葉酸 (Nunes *et al.*, 2009) 等。

神秘果 (*Richadella dulcifica*) 果實中含有一種醣蛋白，稱為「神秘果素」(Miraculin)，具有轉換味覺的功能。然而將神秘果素商業化的可行性非常低，因為神秘果很難栽培在西非原生地以外的地區。於是許多研究學者嘗試利用大腸桿菌、酵母菌、轉殖菸草等平台生產重組神秘果素，但是這些重組蛋白都缺乏甜味誘導活性。Sun 等人 (2006) 將神秘果素基因以農桿菌法轉殖至萵苣中，於 1 g 新鮮萵苣葉片中可純化出 43.5 μ g 的重組味覺修飾蛋白。此重組蛋白經味覺修飾活性檢測證明，具有甜味誘導活性，讓檸檬吃起來像柳丁一樣甜，未來可望大量生產這種蛋白質，作為食品添加劑。

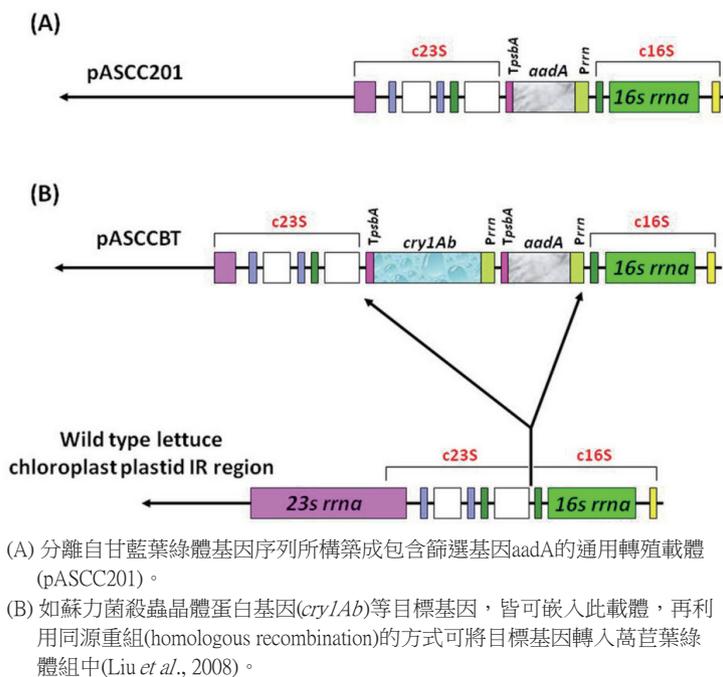
葉酸是屬於維生素 B 群中之水溶性維生素，為必需營養素，須每天由飲食或是其他營養品補充。葉酸在人體內扮演輔酶的角色，參與細胞在分裂時 DNA 的合成。人體若缺乏葉酸，易形成巨母紅血

球貧血 (惡性貧血)、神經管缺陷及嗜中性白血球斷裂。此外，葉酸亦參與胺基酸代謝，體內缺乏葉酸會產生高半胱氨酸血症 (homocysteine)。植物中葉酸累積量可藉由增加鳥嘌呤核苷三磷酸環化水解酵素 (GTP cyclohydrolase I, GCHI) 的濃度而提升，GTP cyclohydrolase I 是植物合成葉酸過程中的速率決定步驟所必須的關鍵酵素。Nunes 等人 (2009) 將禽類動物原雞 (*Gallus gallus*) 的 GTP-cyclohydrolase I 基因 (*gchl*) 重組並轉殖至萵苣中，於 1 g 的新鮮葉片可獲得 1.885 μ g 的葉酸，與未轉殖萵苣相比可增加八倍的葉酸含量。目前利用萵苣生物反應器平台，確實可以達到強化基因轉殖萵苣營養成分的目的。

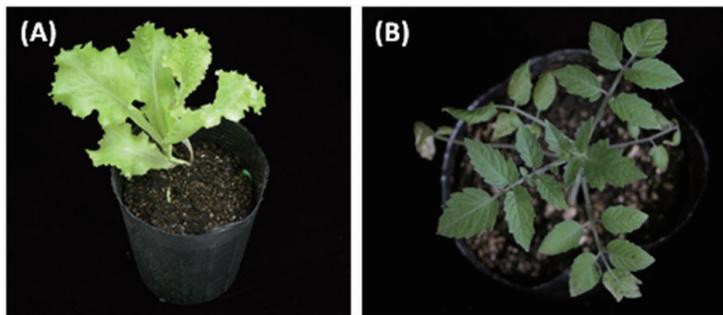
未來之展望

目前利用轉基因植物作為蛋白質生產平台，提供安全、便宜且方便的食用疫苗，用來對抗五花八門的傳染性疾病或自體免疫疾病是可行的。植物生產疫苗或重組蛋白具備了儲藏方便、降低交叉感染風險、生產成本低等特性，尤其是疫苗的開發，口服疫苗較傳統肌肉注射法安全、衛生，因此利用鮮食作物如萵苣生產重組疫苗是十分有潛力的。然而，目標基因表現量低以及無法引起免疫反應是目前無法廣泛應用到植物生產疫苗的障礙，某些研究的抗原蛋白表現量僅占轉基因作物的總可溶性蛋白質含量 0.001-0.3%。目前這個瓶頸已有辦法克服，利用專一性強的啟動子、農桿菌放大法 (viral replicons)、編碼序列最佳化 (codon optimization)、葉綠體基因轉殖 (chloroplast transformation) 等皆是有效的策略，其中又以葉綠體基因轉殖法最具潛力。

葉綠體基因轉移技術的開發是植物生物技術上的重大突破，尤其是對於克服一些來自於細胞核基因轉移技術所造成環境生態影響的考量，具有潛力 (Liu *et al.*, 2007)。葉綠體 (chloroplast) 為植物光合作用的樞紐，具有雙層膜的結構，與細胞核相同，有自己的基因組與遺傳密碼。高等植物的葉綠體 DNA 的量大約占總體細胞質 DNA 的 10-20% 之高，



圖一 葉綠體基因轉殖系統通用載體



(A)轉殖人類A型流感病毒表面抗原基因神經氨酸酶(Neuraminidase, NA)之再生萵苣植株。

(B)轉殖豬瘟病毒構造蛋白基因CSFV E2之再生番茄植株。

圖二 基因轉殖再生萵苣與番茄

這是因為雙子葉植物的細胞核基因組僅有二套, 但是質體基因組卻有高達數千套, 一個葉片細胞包含有十數個甚至上百個葉綠體。在每一個豌豆葉片細胞中可以發現 10,000 套相同的葉綠體 DNA, 而在小麥葉片細胞中, 葉綠體 DNA 更可以高達 50,000 套。目前已有入類生長調節基因 -*hST* (Staub *et al.*, 2000)、B 型肝炎疫苗 (Daniell *et al.*, 2001)、炭疽病疫苗 (Koya *et al.*, 2005)、霍亂疫苗 (Ruhlman *et al.*, 2007)、破傷風疫苗 (Tregoning *et al.*, 2003)、阿米巴痢疾疫苗 (Chebolu and Daniell, 2001)、甚至是犬瘟熱疫苗 (Molina *et al.*, 2004) 等醫用蛋白, 皆是以葉綠體基因轉移法所完成的。以葉綠體基因轉移技術成功的將目標基因導入葉綠體內大量表現, 其結果都較以細胞核基因轉移高出數百倍。本研究團隊目前已建立以萵苣為蛋白質生產平台的葉綠體基因轉殖技術 (圖一), 成功的將淋病雙球菌表面抗原蛋白基因、人類 A 型流感病毒表面抗原基因、豬瘟病毒構造蛋白基因等, 分別利用農桿菌與葉綠體基因轉殖法將目標基因轉移至萵苣、番茄與甘藍中 (圖二), 初步結果顯示植物生物反應器皆能純化出重組抗原蛋白, 此成果將有益於利用萵苣與番茄做為口服疫苗對抗以及預防人類或動物傳染性疾病之可行性。

AgBIO

劉程煒 明道大學 精緻農業學系 助理教授
尤進欽 國立宜蘭大學 園藝學系 副教授

參考文獻

1. Chang, S. H., Bae, J. L., Kang, T. J., Kim, J., Chung, G. H., Lim, C. W., Laude, H., Yang, M. S., and Jang, Y. S. (2002) *Identification of the region capable of induction neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus*. Mol. Cells 14: 295 - 299.
2. Chebolu, S. and Daniell, H. (2007) *Stable expression of Gal/GalNAc lectin of Entamoeba histolytica in transgenic chloroplasts and immunogenicity in mice towards vaccine development for amoebiasis*. Plant Biotechnol J. 5: 230 - 239.
3. Cho, E. A., Lee, C. A., Kim, Y. S., Baek, S. H., Reyes, B. G. de los, and Yun, S. J. (2005) *Expression of γ -Tocopherol Methyltransferase Transgene Improves Tocopherol Composition in Lettuce (*Lactuca sativa L.*)*. Mol. and Cells 19: 16 - 22.

參考文獻

4. Daniell, H., Lee, S. B., Panchal, T., and Wiebe, P. O. (2001) *Expression of cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts*. J. Mol. Biol. 311: 1001 - 1009.
5. Dias, B. B. A., Cunha, W. G., Morais, L. S., Vianna, G. R., Rech, E. L., de Capdeville, G., and Aragão, F. J. L. (2006) *Expression of an oxalate decarboxylase gene from Flammulina sp. in transgenic lettuce (Lactuca sativa) plants and resistance to Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathol. 55: 187 - 193.
6. Goto, F., Yoshihara, T., and Saiki, H. (2000) *Iron accumulation and enhanced growth in transgenic lettuce plants expressing the iron-binding protein ferritin*. Theor. Appl. Genet. 100: 658 - 664.
7. Haq, T. A., Mason, H. S., Clements, J. D., and Arntzen, C. J. (1995) *Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants*. Science. 268: 714 - 716.
8. Huy, N. X., Kim, Y. S., Jun, S. C., Jin, Z., Park, S. M., Yang, M. S., and Kim, T. G. (2009) *Production of a Heat-labile Enterotoxin B Subunit-porcine Epidemic Diarrhea Virus-neutralizing Epitope Fusion Protein in Transgenic Lettuce (Lactuca sativa)*. Biotechnol. Bioprocess Eng. 14: 731 - 737.
9. Kapusta, J., Modelska, A., Figlerowicz, M., Pniewski, T., Letellier, M., Lisowa, O., Yusibov, V., Koprowski, H., Plucienniczak, A., and Legocki, A. B. (1999) *A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus*. FASEB J. 13: 1796 - 1799.
10. Kim, T. G., Kim, M. Y., Kim, B. G., Kang, T. J., Kim, Y. S., Jang, Y. S., Arntzen, C. J., and Yang, M. S. (2007) *Synthesis and assembly of Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (Lactuca sativa)*. Protein Expr. Purif. 51: 22 - 27.
11. Kim, Y. S., Kim, B. G., Kim, T. G., Kang, T. J., and Yang, M. S. (2006) *Expression of a cholera toxin B subunit in transgenic lettuce (Lactuca sativa L.) using Agrobacterium-mediated transformation system*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 87: 203 - 210.
12. Koya, V., Moayeri, M., Leppla, S. H., and Daniell, H. (2005) *Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge*. Infect Immun. 73: 8266 - 8274.
13. Legocki, A. B., Miedzinska, K., Czaplińska, M., Plucieniczak, A., and Wedrychowicz, H. (2005) *Immunoprotective properties of transgenic plants expressing E2 glycoprotein from CSFV and cysteine protease from Fasciola hepatica*. Vaccine. 23: 1844 - 1846.
14. Li, J., Chen, M., Liu, X. W., Zhang, H. C., Shen, F. F., and Wang, G. P. (2007) *Transient expression of an active human interferon-beta in lettuce*. Sci. Hortic. 112: 258 - 265.
15. Lim, M. Y., Cho, Y. N., Chae, W. K., Park, Y. S., Min, B. W., and Harn, C. H. (2008) *Transgenic lettuce (Lactuca sativa L.) with increased vitamin C levels using GalUR gene*. Plant Genetics and Breed. 35: 115 - 120.
16. Liu, C. W., Lin, C. C., Chen, J. W., and Tseng, M. J. (2007) *Stable chloroplast transformation in cabbage (Brassica oleracea L. var. capitata L.) by particle bombardment*. Plant Cell Rep. 26: 1733 - 1744.
17. Liu, C. W., Lin, C. C., Yiu, J. C., Chen, J. W., and Tseng, M. J. (2008) *Overexpression Bacillus thuringiensis delta-endotoxin (cry1A(b)) gene in chloroplast of Brassica spp.* Theor. Appl. Genet. 7: 75 - 88.
18. McCabe, M. S., Garratt, L. C., Schepers, F., Jordi, W. J. R. M., Stoop, G. M., Davelaar, E., van Rhijn, J. H. A., Power, J. B., and Davey, M. R. (2001) *Effects of PSAG12-IPT Gene Expression on Development and Senescence in Transgenic Lettuce*. Plant Physiol. 127: 505 - 516.
19. Molina, A., Hervás-Stubb, S., Daniell, H., Mingo-Castel, A., and Veramendi, J. (2004) *High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts*. Plant Biotechnol. J. 2: 141 - 153.
20. Nunes, A. C. S., Kalkmann, D. C., and Aragão, F. J. L. (2009) *Folate biofortification of lettuce by expression of a codon optimized chicken GTP cyclohydrolase I gene*. Transgenic Res. 18: 661 - 667.
21. Park, B. J., Liu, Z., Kanno, A., and Kameya, T. (2005) *Increased tolerance to salt- and water-deficit stress in transgenic lettuce (Lactuca sativa L.) by constitutive expression of LEA*. Plant Growth Regul. 45: 165 - 171.
22. Rosales-Mendoza, S., Soria-Guerra, R. E., Moreno-Fierros, L., Alpuche-Solís, Á. G., Martínez-González, L., and Korban, S. S. (2010) *Expression of an immunogenic F1-V fusion protein in lettuce as a plant-based vaccine against plague*. Planta. 232: 409 - 416.

參考文獻

23. Ruhlman, T., Ahangari, R., Devine, A., Samsam, M., and Daniell, H. (2007) *Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts—oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice*. Plant Biotechnol. J. 5: 495 - 510.
24. Song, L., Zhao, D. G., Wu, Y. J., and Li, Y. (2008) *Transient expression of chicken alpha interferon gene in lettuce (letter)*. J Zhejiang Univ Sci B. 9: 351 - 355.
25. Staub, J., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P. T. J., Hunter, P., Nehra, N., Paradkar, V., Schlittler, M., Carroll, J. A., Spatola, L., Ward, D., Ye, G., and Russwll, D. A. (2000) *High yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts*. Nat Biotechnol. 18: 333 - 338.
26. Sun, H. J., Cui, M. L., Ma, B., and Ezura, H. (2006) *Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce*. FEBS Letters. 580: 620 - 626.
27. Tregoning, J. S., Nixon, P., Kuroda, H., Svab, Z., Clare, S., Bowe, F., Fairweather, N., Ytterberg, J., van Wijk, K. J., Dougan, G., and Maliga, P. (2003) *Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts*. Nucleic Acids Res. 31: 1174 - 1179.
28. Vanjildorj, E., Bae, T. W., Riu, K. Z., Kim, S. Y., and Lee, H. Y. (2005) *Overexpression of Arabidopsis ABF3 gene enhances tolerance to drought and cold in transgenic lettuce (Lactuca sativa)*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 83: 41 - 50.
29. Webster, D. E., Smith, S. D., Pickering, R. J., Strugnell, R. A., Dry, I. B., and Wesselingh, S. L. (2006) *Measles virus hemagglutinin protein expressed in transgenic lettuce induces neutralising antibodies in mice following mucosal vaccination*. Vaccine. 24: 3538 - 3544.
30. Zuo, X. F., Zhang, X. Y., Shan, L., Xiao, C. Y., He, D. X., and Ru, B. G. (2001) *Expression of human intestinal trefoil factor (hITF) gene in lettuce*. Acta Botanica Sin. 43: 1047 - 1051.