

돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 유전자 발현 형질전환 고구마

양경실¹, 임순¹, 권석윤², 광상수², 김현수³, 이형순^{1*}

¹한국생명공학연구원 식물세포공학연구소, ²환경생명공학연구소, ³충남대학교 수의과대학

Transgenic Sweetpotato (*Ipomoea batatas*) Expressing Spike Gene of Porcine Epidemic Diarrhea Virus

Kyoung-Sil Yang¹, Soon Lim¹, Suk-Yoon Kwon², Sang-Soo Kwak², Hyun-Soo Kim³, Haeng-Soon Lee^{1*}

¹Laboratory of Plant Cell Biotechnology, ²Laboratory of Environmental Biotechnology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea;

³College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

ABSTRACT Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) causes acute enteritis in pigs of all ages and is often fatal for neonates. In order to develop sweetpotato plants expressing PEDV antigen, we constructed the vector expressing spike gene of PEDV under the control of sweetpotato sporamin promoter or constitutive CaMV 35S promoter. The spike protein region of PEDV was synthesized by PCR and linked to each promoter. Transgenic sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Yulmi] plants were developed from embryogenic calli following *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. The co-cultured embryogenic calli transferred to selective MS medium containing 1 mg/L 2,4-D, 100 mg/L kanamycin, and 400 mg/L claforan. These embryogenic calli were subcultured to the same selection medium at 3 weeks interval. Kanamycin-resistant calli transferred to hormone-free MS medium with kanamycin gave rise to somatic embryos and then converted into plantlets in the same medium. Southern blot analysis confirmed that the spike gene of PEDV was inserted into the genome of the sweetpotato plants. RT-PCR revealed that the spike gene of PEDV was highly expressed in transgenic sweetpotato plants.

Key words: *Ipomoea batatas*, plant-based vaccine, somatic embryogenesis, sporamin promoter, transformation

서 론

최근 양돈산업에 가장 큰 경제적 피해를 준 질병중의 하나는 돼지 유행성 설사병 (porcine epidemic diarrhea; PED)이다. 돼지 유행성 설사의 원인체는 코로나비리다계에 속하는 PED virus (PEDV)이다 (Pensaert and de Bouck 1978). PEDV는 전염성 위장염 바이러스 (transmissible gastroenteritis virus; TGEV)와 같은 코로나비리다계에 속하며, 임상증상 또한 매우 유사하지만 항원적으로 뚜렷이 구별된다. PEDV는 돼지 소장의 용모 상피세포에서 증식하며, 감염 돼지에서는 설사, 식욕부진, 구토를 일으키고,

1주령 이내의 신생자돈에서는 탈수가 심하며, 감염 후 3-4일 이내에 폐사한다 (de Bouck and Pensaert 1980).

PEDV는 직경이 120~160 nm로 외피 (envelope)를 가진 다양한 형태를 가지고 있으며 S (spike protein, 스파이크 단백질), M (membrane glycoprotein), E (small envelope protein), HE (hemagglutinin-esterase protein), N (nucleocapsid phosphoprotein), ICS (internal core-shell composed of M glycoprotein), NC (nucleocapsid) 등으로 구성되어 있다. PEDV의 항원성은 외피 단백질과 스파이크 단백질에 의해서 결정되며, 특히 스파이크 당단백질은 중화항체 (neutralizing antibody) 형성에 관여하며 또한 세포수용체 (cellular receptor)에 결합하여 세포간에 융합을 유발한다 (Spaan et al. 1988).

*Corresponding author Tel 042-860-4439 Fax 042-860-4608

E-mail: hslee@kribb.re.kr

돼지 유행성 설사병의 예방법에는 돼지 구입시 비감염 농장에서 구입하고 농장 간에 전파를 예방하는 것 이외에 순화 생독바이러스백신 (live attenuated virus vaccine) 접종 등이 있으나 완벽한 효과를 보이지 못하고 있다. 그 이유는 현재 사용되고 있는 백신이 근육 주사용이기 때문에 혈중 IgG의 형성은 잘 되나 PED 예방에 정작으로 중요한 점막 면역 (mucosal immunity, sIgA)의 형성이 잘되지 않기 때문에 양호한 예방효과를 얻지 못하고 있다.

식물체로부터 항원단백질을 발현시켜 경구용 백신으로 이용하는 것은 비용이 절감되고 경제가 용이하며 사용지역에서 식물을 재배할 수 있어 이동과 보관이 쉬울 뿐만 아니라 대량생산이 가능한 장점이 있다. 1992년 Mason 등에 의해 담배에 HBV (B형 간염 바이러스)의 표면 항원유전자 (HBdAg)를 발현시켜 면역원성을 가진 항원단백질이 생산된 것을 시작으로 식물체로부터 백신 개발이 가능하였다 (Mason et al. 1992). 그 이후 다양한 식물체가 개발되어 왔으나 항원단백질의 특성을 고려하여 고구마처럼 생식이 가능한 식물을 이용하는 것이 중요하다. 돼지 설사병 방지용으로 대장균 K88ac의 pilin 유전자를 발현시킨 당근 (Lee and Hwang 2002)과 transmissible gastroenteritis virus (TGEV)의 스파이크 단백질을 발현시킨 담배 식물체가 보고되었다 (Tuboly et al. 2000). 형질전환 식물체에서 PEDV에 대한 항원 단백질 생산에 관한 보고로는 PEDV 중화항체 에피토프를 생산하는 형질전환 담배가 보고된 바 있다 (Bae et al. 2003; Kang et al. 2004; Kang et al. 2005).

고구마는 국내 재배조건에서 꽃이 피지 않으며 영양번식으로 유지되기 때문에 LMO (living modified organism)의 환경위해성이 없으며, 괴근, 엽병 및 잎 등 식물체의 모든 부위를 이용할 수 있는 식물체로서, 특히 저장뿌리는 생식이 가능하여 경구용 백신으로 사용하는 경우 항원단백질의 변성을 최소화할 수 있다. 또한, 영양번식 작물로 품종화가 용이하며 실용화까지의 소요기간이 짧고, 척박한 토양에서도 잘 자랄 수 있어 재배가 용이할 뿐만 아니라 단위 면적당 생산성이 가장 높은 작물이다. 이와 같이 고구마가 많은 장점을 가짐에도 불구하고, 형질전환이 비교적 용이하지 않아 산업적으로 유용한 형질전환 고구마가 개발되지 못하였으나, 본 연구팀은 고구마 재분화 및 형질전환 체계를 확립하였으며 (Kwon et al. 2002; Lim et al. 2004b), 재해 내성 형질전환 고구마 식물체를 개발한 바 있다 (Lim et al. 2004a). 또한 고구마 저장뿌리에서 경구용 백신을 생산한 예는 아직까지 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 고구마 저장뿌리에서 고발현하는 sporamin 프로모터 (Hattori and Nakamura 1988) 등을 이용하여 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질을 코딩하는 유전자를 고구마에 발현시켜 항원단백질을 생산하는 형질전환 고구마를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

배발생 캘러스

고구마 식물체 정단분열조직으로부터 유도된 배발생 캘러스를 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지 무기염에 100 mg/L myo-inositol, 0.4 mg/L thiamine · HCl, 30 g/L sucrose, 1 mg/L 2,4-D 및 4 g/L Gelrite (MS1D)가 첨가된 배지에서 4주 간격으로 계대배양하여 유지하였다 (Kwon et al. 2002). 이러한 배발생 캘러스를 형질전환 재료로 사용하였다.

벡터 제작

PEDV의 식물발현벡터 제작을 위하여 먼저 CaMV 35S 프로모터 앞뒤에 *HindIII*와 *XbaI*를 각각 붙여 pCAMBIA-2300 벡터의 동일 제한효소 자리에 삽입하였다 (35Sp/pCAMBIA2300). PEDV spike 단백질 염기서열 중에서 항원성이 알려진 450 bp 단편 (Chang et al. 2002)을 *BamHI*를 앞뒤에 붙여 PCR로 합성한 후 TOPO 벡터에 삽입하였다. 사용한 primer는 5'-GGA TCC ATG GAA CAG CCA ATT TCT TTT GTT-3'과 5'-GGA TCC AAA AGA AAC GTC TGT GAT ACC-3'이다. PCR로 합성된 DNA 단편을 *EcoRV*와 *SacI*으로 절단한 후 35Sp/pCAMBIA2300를 *SmaI*과 *SacI*으로 절단한 자리에 삽입하여 35Sp::PEDV-sp1/pCAMBIA2300 벡터를 완성하였다. 또한 CaMV 35S 프로모터 이외에 고구마 저장뿌리 고발현 sporamin 프로모터 (Hattori and Nakamura 1988)를 사용한 벡터를 제작하기 위하여 sporamin promoter를 *HindIII*와 *XbaI*으로 절단한 다음 앞서 제작된 35Sp::PEDV-sp1 벡터를 같은 효소를 처리하여 CaMV 35S 프로모터를 제거하고 그 자리에 sporamin 프로모터를 삽입하여 Spop::PEDV-sp1/pCAMBIA2300 벡터를 제작하였다 (Figure 1). 위 두 벡터를 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 각각 도입하여 고구마 형질전환에 이용하였다.

Agrobacterium 매개에 의한 형질전환 및 식물체 재분화

MS1D 고체배지에 계대배양한지 1주일 된 배발생 캘러스를 형질전환 재료로 이용하였다. 1일 동안 배양한 *Agrobacteria*를 원심분리하여 모은 후 10 mL의 MS1D 액체배지에 현탁하여 배발생 캘러스와 혼합하여 30분 동안 방치한 후 멸균된 filter paper를 이용하여 캘러스에 묻은 아그로박테리아와 배지를 제거하고 2일 동안 MS1D 배지에 공동배양하였다 (Lim et al. 2004b). 400 mg/L claforan이 함유된 멸균수로 공동배양한 캘러스를 3회 세척하여 아그로박

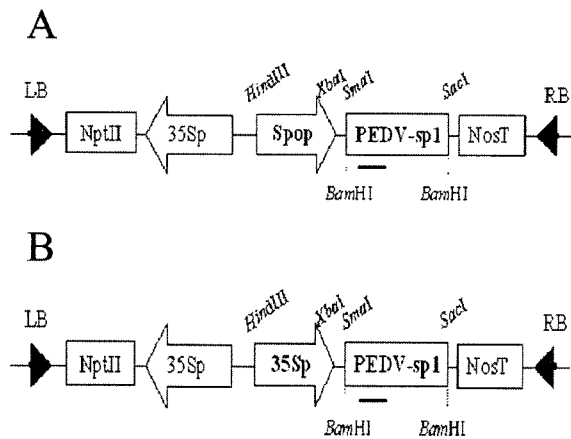


Figure 1. Plant transformation vectors. A, Spop::PEDV-sp1/pCAMBIA2300; B, 35Sp::PEDV-sp1/pCAMBIA2300. Spop, sweetpotato sporamin promoter; 35Sp, CaMV 35S promoter; PEDV-sp1, spike gene of PEDV; NosT, nopaline synthase terminator; NptII, neomycin phosphotransferase II; LB, left border; RB, right border. The bars indicate the probe for Southern blot analysis.

테리아를 제거한 후 100 mg/L kanamycin과 400 mg/L claforan이 함유된 선발배지 (MS1DCK)에서 약 4개월 동안 3주 간격으로 계대배양하면서 kanamycin 저항성 캘러스를 선발하였다. 선발된 배발생 캘러스로부터 체세포배 및 식물체를 유도하기 위하여 2,4-D를 제거한 MS 기본배지 (100 mg/L kanamycin, 400 mg/L claforan 함유; BMCK)에 옮겨 25°C, 약 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ 의 cool-white 형광, 광주기 16시간 조건에서 배양하였다.

형질전환 식물체 분석

Kanamycin 함유배지에 일차적으로 선발된 재분화 식물체를 PCR로 확인하였다. PCR에 사용된 primer는 PEDV spike 유전자 특이 염기서열 부분을 사용하였다. PCR로 PEDV 유전자의 도입이 확인된 고구마 식물체를 대상으로 Southern 분석을 실시하였다. 배양기에서 생육중인 고구마 식물체의 잎으로부터의 DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 DNA (30 μg)를 XbaI로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동한 후, Zeta Probe membrane (Bio-Rad 제품)으로 전이시켰다. Probe는 PEDV 유전자 특이부분에서 제작된 primer를 이용하여 PCR로 합성하여 이용하였다 (450 bp). 이 DNA를 동위원소 [α - ^{32}P] dCTP로 labelling시켜 prehybridization용액 (Zeta Probe membrane 용)에 첨가하여 60°C에서 24시간 동안 혼성화시켰다. 반응을 마친 membrane을 세척하고 X-ray 필름에 노출시켜 밴드를 확인하였다.

형질전환 고구마에서 도입된 PEDV 유전자가 정상적으로 발현되는지를 알아보기 위하여 RNA를 추출해 RT-PCR을 수행하였다. RNA를 추출하기 위하여 재분화된 고구마

잎 1 g을 액체질소를 이용하여 막자사발에서 곱게 분쇄하였다. 여기에 5 mL의 TRI 시약 (Molecular Research Center, MRC)를 이용하여 일상의 방법에 의해 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA 1 μg 을 oligo dT와 섞어 70°C에서 5분 동안 반응시킨 후, 1차 cDNA 합성키트 (ImProm- Π TM Reverse Transcription System, Promega)의 반응액과 혼합하여 25°C로 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분 동안 반응하여 1st cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 1-2 μL 취하여 상기의 프라이머들을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 처음 94°C에서 5분 동안 DNA를 변형시킨 다음 94°C에서 1분, 56°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 30회 수행하고 이어서 72°C로 7분 동안 수행하였다.

결과 및 고찰

Agrobacterium 매개에 의한 형질전환 및 식물체 재분화

35Sp::PEDV-sp1/pCAMBIA2300 및 Spop::PEDV-sp1/pCAMBIA2300을 각각 함유한 아그로박테리움을 매개로 고구마 배발생 캘러스를 형질전환하였다. 배발생 캘러스를 2일 동안 항생제가 함유되지 않은 MS1D 배지에서 공동배양한 후 100 mg/L kanamycin과 400 mg/L claforan이 첨가된 MS1DCK 선발배지에서 3주 간격으로 계대배양하면서 선발하였다. 선발배지에서 계대배양이 진행되면서 대부분의 캘러스는 죽었지만 일부 캘러스가 배발생능을 그대로 유지하면서 증식되었다. 선발배지에서 4개월 동안 배양된 캘러스를 2,4-D를 제거한 BMCK배지로 옮겨 명 조건에서 배양한 결과 체세포배가 유도되었으며 1-2개월 배양 결과 shoot과 뿌리가 유도되어 소식물체로 재분화되었다 (Figure 2). 카나마이신에 저항성을 지닌 캘러스의 형성은 1% 미만으로 낮은 빈도를 나타내었으나 캘러스의 대부분이 체세포배로 발달하였으며 이어서 식물체로 재분화되었다. 지금까지 보고된 고구마 형질전환 효율은 1% 정도인 다른 보고와 비슷한 수준이었다 (Lim et al. 2004b; Otani and Shimada. 2005).

형질전환체의 분석

카나마이신 함유배지에 재분화된 식물체로부터 게놈 DNA를 분리한 후 PEDV 스파이크 유전자의 특이 염기서열의 프라이머를 이용하여 PCR로 분석하였다. 분석결과 재분화 식물체의 50% 이상에서 450 bp의 밴드가 각각 관찰되었다. 하지만 형질전환시키지 않은 식물체에서는 밴드가 합성되지 않았다 (Figure 3).

PCR로 PEDV 유전자의 도입이 확인된 고구마 식물체로부터 게놈 DNA를 분리한 후 Southern blot 분석을 실시하

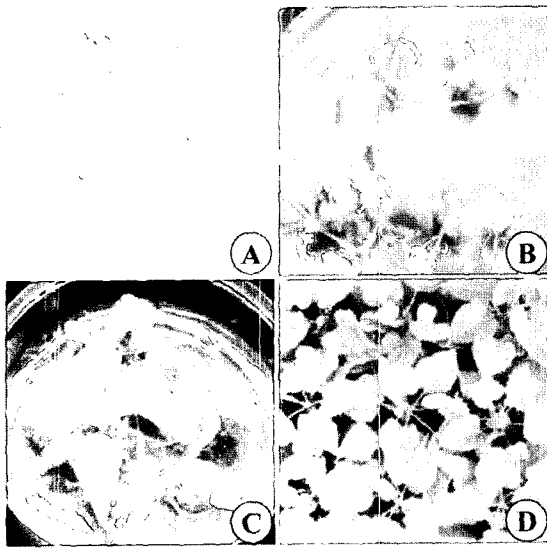


Figure 2. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic calli after *Agrobacterium* co-cultivation of sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam. cv. Yulmi]. A, Kanamycin-resistant embryogenic calli and somatic embryos on selection medium with 100 mg/L kanamycin; B and C, Plantlets developed from somatic embryos; D, Transgenic plants growing in potting soil.

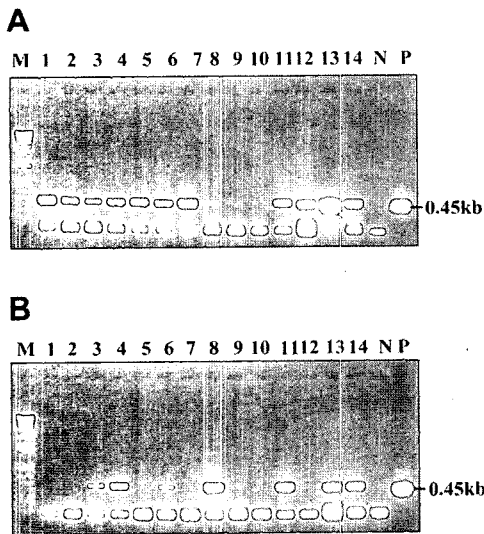


Figure 3. PCR analysis of kanamycin-resistant sweetpotato plantlets. All DNAs have been amplified with primers of spike gene. A, Spop::PEDV-sp1/pCAMBIA2300 vector-transformed plantlets; B, 35Sp::PEDV-sp1/pCAMBIA2300 vector-transformed plantlets. M, Size marker; 1-14, Kanamycin-resistant plantlets; N, Non-transformed sweetpotato plant; P, Transformation vector DNA as a positive control.

였다. 그 결과 형질전환된 고구마 식물체에 PEDV 스파이크 유전자가 1-3 copy 도입된 것으로 나타났다 (Figure 4). 이러한 결과는 주로 particle bombardment 방법에 의해서만 가능하였던 고구마의 형질전환이 (Min et al. 1998) *Agrobacterium*에 의해서 가능함을 보여주는 것이고 또한 많은 copy가 도입되는 단점을 극복할 수 있는 결과임을 확인할

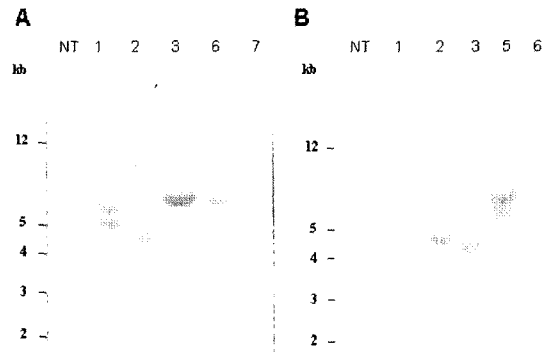


Figure 4. Southern analysis of genomic DNA prepared from transgenic and non-transgenic sweetpotato plants. A, PCR-positive plants transformed Spop::PEDV-sp1/pCAMBIA2300; B, PCR-positive plants transformed 35Sp::PEDV-sp1/pCAMBIA2300. Equal amounts (30 µg) of genomic DNA were digested with the *XbaI*, electrophoresed in 0.8% agarose gel, and blotted onto a membrane. The blot was hybridized with the 450 bp fragment of spike gene as a probe. NT, Non-transgenic plants. 1-7, PCR-positive plants. The positions of size markers are shown on the left.

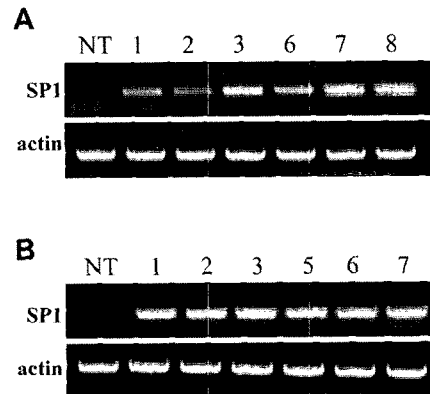


Figure 5. RT-PCR analysis of the expression of the spike gene of PEDV in transgenic sweetpotato plants. A, Transgenic plants transformed Spop::PEDV-sp1/pCAMBIA2300; B, Transgenic plants transformed 35Sp::PEDV-sp1/pCAMBIA2300. Total RNA was extracted from leaves of non-transgenic sweetpotato and transgenic sweetpotato plants. First-strand cDNA synthesis and PCR were performed as described by the kit manufacturer. NT, Non-transgenic plants. 1-8, Transgenic plants. SP1, spike gene of PEDV. Actin was used to control for equal loading. Reaction products (10 µL) were analysed by gel electrophoresis.

수 있었다 (Lim et al. 2004b).

형질전환 고구마에서 도입된 PEDV 스파이크 유전자가 정상적으로 발현되는지를 알아보기 위하여 PCR로 PEDV 스파이크 유전자의 도입이 확인된 고구마 식물체 잎으로부터 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 형질전환 고구마에서 모두에서 450 bp의 DNA 단편이 합성되었다. CaMV 35S 프로모터를 이용한 형질전환 고구마에서는 도입한 유전자가 비슷한 수준으로 발현되었으나 *spora-min* 프로모터를 이용한 형질전환체에서는 도입 유전자가 식물체마다 다른 수준으로 발현되었다. (Figure 5). 이러한

결과는 sporamin 프로모터가 저장뿌리에서 고발현하며 다른 조직에서는 약하게 발현하는 특징이 있으며 본 연구에서는 고구마 식물체 앞에서 확인하였기 때문인 것으로 사료된다 (Hattori and Nakamura 1988; Ohta et al. 1991). 이는 RT-PCR에 의해서 얻어진 산물들이 도입된 PEDV의 스파이크 단백질을 코딩하는 유전자가 발현된 mRNA에서 유래된 것임을 입증하는 결과이며, 고구마에서 도입된 PEDV 스파이크 단백질을 코딩하는 유전자가 정상적으로 발현됨을 의미한다. 현재 형질전환 고구마 식물체가 pot에서 생육 중에 있어 향후 저장뿌리를 비롯한 식물체 전 부위에서 발현되는 PEDV 항원단백질을 함량 및 면역원성을 확인해야 할 것이다. 본 연구에서 발현시킨 PEDV 스파이크 유전자는 이미 담배에서 중화항체 형성이 가능하다고 알려져 있기 때문에 형질전환 고구마에서 같은 연구결과를 기대할 수 있다 (Bae et al. 2003). 따라서 저장뿌리에서 PEDV 항원단백질이 높은 수준으로 생산되는 고구마 뿐만 아니라 CaMV35S 프로모터에 의해 고구마 식물체 전체 부위에서도 PEDV 항원단백질을 생산하는 고구마 식물체도 얻을 수 있을 것이다.

이상의 결과에서와 같이 PEDV 항원 단백질을 발현하는 형질전환 고구마는 농가에서 재배가 용이하고 생산성이 높은 작물이면서 이미 사료로 이용되고 있어 자돈 농가에서 쉽게 PEDV 항원 단백질을 생산하는 형질전환 고구마를 대량생산할 수 있는 장점이 있다. 따라서 이 형질전환 고구마를 사료 백신으로 이용할 경우 기존의 불활화 바이러스 백신과 같이 주기적으로 백신을 투여할 필요가 없을 뿐만 아니라 비용절감 등 돼지사육 농가의 소득증대를 가져올 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)는 돼지의 급성 장염을 유발하여 설사 증상을 일으키는 바이러스이다. 본 연구에서는 고구마 저장뿌리 고발현 sporamin 프로모터 및 CaMV 35S promoter를 이용하여 PEDV 항원단백질을 생산하는 고구마 식물체를 개발하고자 하였다. 형질전환 벡터를 제작하기 위하여 PEDV에서 항원성이 알려진 스파이크 단백질의 일부분을 암호화하는 유전자를 PCR로 합성하였다. 고구마 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] 울미 품종의 배발생 캘러스를 재료로 하여 *Agrobacterium tumefaciens*을 매개로 형질전환하였다. 선발배지 (MS medium, 1 mg/L 2,4-D, 100 mg/L kanamycin, and 400 mg/L claforan)에서 배발생 캘러스를 3주 간격으로 4개월 동안 계대배양하여 카나마이신 저항성 캘러스를 선발하였다. 선발된 배발생 캘러스를 호르몬을 제거한 배지로 옮겨 체세포배를 유도하였으며 이후 shoot과 뿌리가 형성되었다. 재분화된 소식물체

를 대상으로 PCR 분석으로 카나마이신 저항성 재분화 개체의 50% 이상이 도입 유전자를 가지고 있었으며 이들 식물체를 대상으로 Southern blot 분석하여 PEDV 유전자가 고구마 식물체의 게놈으로 안정적으로 도입되었음을 확인하였다. 형질전환 식물체에서 도입유전자의 발현을 RT-PCR로 분석한 결과 PEDV의 spike 유전자가 높은 수준으로 발현하였다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 연구결과이다. 고구마 sporamin 프로모터를 제공하여 준 (주)농우바이오 한지학 박사님과 고구마 식물체 재료를 제공하여 준 농촌진흥청 작물과학원 목포시험장 구근작물연구실에 감사를 드립니다.

인용문헌

- Bae JL, Lee JG, Kang TJ, Jang HS, Lang YS, Yang MS (2003) Induction of antigen-specific systemic and mucosal immune responses by feeding animals transgenic plants expressing the antigen. *Vaccine* 21: 4052-4058
- Chang SH, Bae JL, Kan TJ, Kim J, Chung GH, Lim CW, Laude H, Yang MS, Jang YS (2002) Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. *Mol Cells* 14: 295-299
- de Bouck P, Pensaert M (1980) Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777. *Am J Vet Res* 41: 219-223
- Hattori T, Nakamura (1988) Genes coding for the major tuberous root protein of sweetpotato; identification of putative regulatory sequence in the 5' upstream region. *Plant Mol Biol* 11: 417-426
- Kang TJ, Kang KH, Kin JA, Kwon TH, Jang YS, Yang MS (2004) High-level expression of the neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus by a tobacco mosaic virus-based vector. *Protein Expr Purif* 38: 129-135
- Kang TJ, Kim YS, Jang YS, Yang MS (2005) Expression of the synthetic neutralizing epitope gene of porcine epidemic diarrhea virus in tobacco plants without nicotine. *Vaccine* 23: 2294-22975
- Kwon EJ, Kwon SY, Kim MZ, Lee JS, Ahn YS, Jeong BC, Kwak SS, Lee HS (2002) Plant regeneration of major cultivars of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) in Korea via somatic embryogenesis. *Korean J Plant Biotechnol* 29: 189-192
- Lim S, Lee HS, Kwon SY, Kwak SS (2004a) Development of transgenic sweetpotato plants with enhanced tolerance to environmental stress. *Proceeding of the International*

- Workshop on Production, Utilization and Development of Sweetpotato. pp31-39
- Lim S, Yang KS, Kwon SY, Paek KY, Kwak SS, Lee HS (2004b) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and plant regeneration of sweetpotato (*Ipomoea batatas*). Korean J Plant Biotechnol 31: 267-271
- Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. Proc Natl Acad Sci USA 89: 11745-11749
- Min SR, Jeong WJ, Lee YB, Liu JR (1998) Genetic transformation of sweetpotato by particle bombardment. Korean J Plant Tiss Cult 25: 329-333
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Ohta S, Hattori T, Morikami A, Nakamura (1991) High-level expression of a sweetpotato sporamin gene promoter: β -glucuronidase (GUS) fusion gene in the stems of transgenic tobacco plants is conferred by multiple cell type-specific regulatory elements. Mol Gen Genet 225: 369-378
- Otani M, Shimada T (2005) Transgenic sweetpotato with agronomically important genes. In: Khachatourians G et al. (eds), Transgenic Plants and Crops, Marcel Dekker, Inc. New York · Basel, pp 699-716
- Pensaert MB, de Bouck P (1978) A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. Arch Virol 58: 243-247
- Spaan W, Cavanagh D, Horzinek MC (1988) Coronavirus: structure and genome expression. J Gen Virol 69: 2939-2952
- Tuboly T, Yu W, Bailey A, Degrandis S, Du S, Erickson L, Nagy E (2000) Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. Vaccine 18: 2023-2028

(접수일자 2005년 11월 11일, 수리일자 2005년 11월 21일)