J Plant Biotechnol (2009) 36:224-229

Research Article

# 인체 락토페린 생산 형질전환 고구마 개발

민성란 · 김재화 · 정원중 · 이영복 · 유장렬

# Development of transgenic sweet potato producing human lactoferrin

Sung Ran Min · Jae Wha Kim · Won Joong Jeong · Young Bok Lee · Jang R. Liu

Received: 1 September 2009 / Accepted: 10 September 2009
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Human lactoferrin is an iron-binding glycoprotein with many biological activities, including the protection against microbial and virus infection and stimulation of the immune system. We introduced a human lactoferrin (hLf) cDNA under the control of 35S promoter into sweet potato by particle bombardment. Transgenic plants were regenerated via somatic embryogenesis. Transgenic plants were produced typical tuberous roots in soil. PCR, Southern and northern analyses confirmed that the hLf cDNA was incorporated into the plant genome and was properly expressed in plants. Western blot analysis showed that the 80 kDa full length hLf protein was produced in transgenic tuberous roots. Overall results indicated that sweet potato would be an excellent host to produce human therapeutic proteins.

## 서 론

Molecular farming을 위해 관심이 증가되고 있는 단백질중의 하나인 락토페린 (lactoferrin, Lf)은 포유동물의 젖에 고농도로 존재하며 철이 결합된 당단백질로서 80 kDa 분자량을 가지며 여러 가지 생리적인 기능을 가진 단백질이다 (Stefanova et al. 2008). 락토페린은 면역계 조절, 세포증식 조절, 철 흡수 조절작용과 과산화지질 생성 억제, 감염부위 염증발생 제어작용 및 항바이러스 작용 등의 다양한 생체방어 작용에 관여하고 유익한 생리활성을 갖고 있다 (Yu 1997). 재조합 인체 락토페린을 대량생산하고자 형질전환 효모 (Liang and Richardson 1993), 곰팡이 (Ward et al. 1992, 1995), 및 소 (Van Berkel et al. 2002) 등에서 시도되었으나 낮은 발현량, 고가의 정제비용, 미생물, prion, 동물매개의 바이러스 등의 감염 문제로 상업화되지 못하였다 (Arakawa et al. 1999). 이러한 문제점을 개선하고자 "bio-factories"로써 식물체를 이용하게 되었다 (Horn et al. 2004). 식물의 경우 Mitra와 Zhang (1994)이 35S 프로모터를 이용하여 인체 락토페린을 담배 배양세포에서 처음으로 발현시킨 이래 인체 락토페린을 생산하는 형질전환 담배 (Zhang et al. 1998), 벼 (Humphrey et al. 2002) 및 토마토 (Lee et al. 2002) 등에서 특정 pathogen에 대해 antibacterial activity를 가진 식물체를 개발하였다. 또한, CMV-Y 바이러스 대해 antiviral activity를 가지는 형질전환 담배 (Liu et al. 1999)가 개발되기도 하였으며 현재까지 감자 (Chong and Langridge 2000), 고구마 배양세포 (Min et al. 2006), 옥수수 (Samyn-Petit et al. 2003), 보리 (Kamenarova et al. 2007), 인삼 (Kwon et al. 2003), 가시오갈피(Jo et al. 2005) 등과 같은 다양한 작물에서 인체 락토페린이 도입되기도 하였다.

고구마는 탄수화물과 단백질의 중요한 공급원으로 높은 영양적 가치를 지니고 있으며, 식용 및 사료작물로의 이용과 더불어 메탄이나 에탄올 등과 같은 연료생산의 대체에너지원으로도 이용되고 있다. 대부분 열대 및 온대지역에서 재배되고 있는 고구마는 6배체의 영양번식 작물이기 때문에 종자형성이 극히 불량하여 재래적인 육종방법으로는 품종 개량을 기대하기 어렵다. 이를 극복

S. R. Min · W. J. Jeong · J. R. Liu (✉)
한국생명공학연구원 식물시스템공학연구센터
(Plant Systems Engineering Research Center)
e-mail: jrliu@kribb.re.kr

J. W. Kim
유전체의학연구센터
(Medical Genomics Research Center Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea)

Y. B. Lee
충남대 농업생명과학대학 원예학과
(Dept. of Horticulture, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)

하기 위해서는 효율적인 식물체 재분화 시스템과 형질전환 기술이 확립이 필요하다. 고구마의 조직배양은 주로 체세포 배발생을 통한 식물체 재분화 시스템이 가장 널리 이용되는데 특히, 정단 분열조직으로부터 배발생 캘러스를 유도하여 이로부터 식물체가 재분화된다 (Liu and Cantliffe 1984; Chee and Cantliffe 1989; Liu et al. 1989; Min et al. 1994; Otani and Shimada 1996; Kwon et al. 2002; Shin et al. 2004). 고구마의 형질전환은 particle bombardment (Prakash and Varadarajan 1992; Min et al. 1998, 2006, 2007)와 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 방법 (Newell et al. 1995; Gama et al. 1996; Otani and Shimada 1996; Otani et al. 1998, 2003; Lim et al. 2004; Kim et al. 2009)으로 주로 수행되었다. 본 연구에서는 particle bombardment를 이용하여 인체 모유 유래 락토페린 유전자를 고구마에 도입하여 락토페린 생산 형질전환 식물체를 개발하고 그 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 Particle bombardment

국내 품종 고구마 (*Ipomoea batatas* L. cv. Yulmi)의 정단분열조직 유래 배발생 캘러스 (Liu et al. 1989; Min et al. 1994)에 인체 모유 유래 락토페린 cDNA가 들어있는 pLSM1 벡터 (Liu et al. 1999; Min et al. 2006, Fig. 1)를 이용하여 Min 등 (1998, 2006, 2007)의 방법에 따라 텅스텐 입자에 코팅 (Sanford et al. 1993)한 후 BioRad사의 PDS-1000/He particle delivery system을 이용하여 6 cm 거리, 1100 psi에서 particle bombardment를 수행하였다.

### 형질전환체 생산

Particle bombardment 후 1 mg/L 2,4-D, 100 mg/L kanamycin이 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 선발배지 (MS1DK)에서 선발 증식된 배발생 캘러스를 MS 기본배지 (MSBMK)로 옮겨 체세포배를 유도한 후 식물체로 분화시켰다. 재분화 식물체는 순화과정을 거쳐 생육상에서 재배하여 정상적인 괴근을 수확하였다.

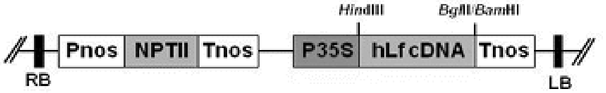


**Fig. 1** A partial map of the pLSM1 harboring the human lactoferrin gene. Pnos: nopaline synthase promoter; NPTII: neomycin phosphotransferase II, Tnos: nopaline synthase terminator; P35S: CaMV 35S promoter; RB and LB: t-DNA right and left borders, respectively

### 형질전환체 분석

선발배지에서 형성된 배발생 캘러스로부터 체세포배발생 과정을 거쳐 재분화된 기내 유식물체의 잎으로부터 Edwards등 (1991)의 방법으로 genomic DNA를 분리하여 PCR을 수행하였다. 락토페린 특이 염기서열 부분 (Lacto F: 5'-GGC TCC TGC AAA TTT GAT GA-3', Lacto R: 5'-TTA CTT CCT GAG GAA TTC AC-3')을 사용하여 94℃에서 1분, 55℃에서 1분 및 72℃에서 1분으로 30회 PCR 수행하였다. 또, PCR로 유전자 도입이 확인된 고구마 식물체의 잎에서 식물 DNA 추출 kit인 PHYTOpure™ (Amersham Co.)을 이용하여 genomic DNA를 분리한 후, 약 50 μg의 DNA를 제한효소 *Hin*dIII로 절단한 후 0.8% agarose 젤에서 전기영동 하였다. 전기영동을 마친 후 젤을 0.2 N HCl 용액에서 depurination 후 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH 용액에 담가 30분 동안 변성시키고 이어서 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris·HCl (pH 8.0) 용액에서 30분간 중화시킨 후 10X SSC 용액에서 Zeta-Probe membrane (Bio-Rad)에 전이하였다. 1.0 kb 크기의 *Eco*RI-*Bgl*II lactoferrin DNA fragment를 random primed DNA labeling kit (Boehringer Mannheim, Germany)을 사용하여 동위원소[α-$^{32}$P]dCTP로 표지한 후 probe로 사용하여 Southern 분석을 수행하였다. Membrane을 prehybridization (1 M $Na_2HPO_4$, 1 M $NaH_2PO_4$, 7% SDS, 1 mM $Na_2$·EDTA)용액에 넣고 60℃에서 2시간 정도 pre-hybridization한 후 약 16시간 동안 hybridization 시켰다. 반응을 마친 membrane을 세척용액 (1 M $Na_2HPO_4$, 1 M $NaH_2PO_4$, 1% SDS, 1 mM $Na_2$·EDTA)으로 세척한 후 X-ray 필름에 노출시켰다. 또한, 도입된 외래 유전자의 발현을 보기 위하여 식물체의 잎으로부터 TRIzol™ (GIBCO/BRL, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 분리된 약 20 μg의 total RNA를 5.1% (v/v) formaldehyde가 포함된 agarose gel에 전기영동한 후 Zeta-Probe membrane (Bio-Rad)에 blotting한 후 Southern과 동일한 방법으로 northern blot을 수행하였다. 한편, 수확한 형질전환 고구마 괴근 절편체 (200 mg)로부터 10 mM DTT를 포함한 80 mM Hepes buffer (pH 7.4)를 이용하여 얼음위에서 마쇄한 뒤 4℃, 10,000 rpm에서 10분간 2회 원심분리 후 상등액을 취하여 총 단백질을 Bradford (1976) 방법으로 정량하였다. 추출한 20 μg의 단백질을 끓는 물에 denature 시킨 후 10% polyacrylamide gel에서 전기영동 (Laemmli, 1970) 시킨 후 nitrocellulose membrane에 전이하였다 (Towbin et al. 1979). Membrane을 1% BSA와 TBS[10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 M NaCl]가 첨가된 blocking solution에 4℃에서 2시간 동안 처리한 후 1:10,000으로 희석된 락토페린 항체와 함께 1시간 동안 incubation 하였다. Membrane을 TBS buffer로 세척한 후 1 시간 동안 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad)에 담근 후 membrane을 alkaline phosphatase 발색용액[0.015%

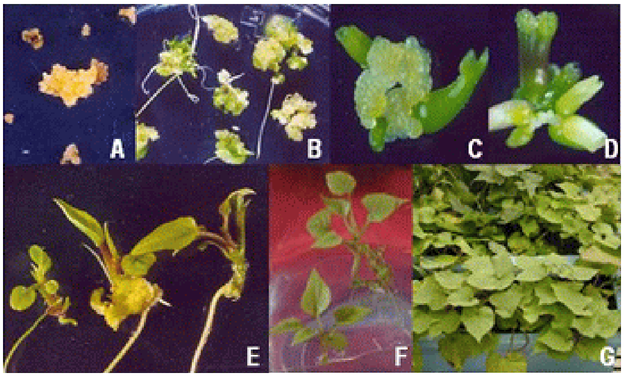


**Fig. 2** Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic calluses of sweet potato after particle bombardment with pLSM1 vector. A: embryogenic calluses on selection medium; B-D: heart and torpedo stage somatic embryos developed from embryogenic calluses; E-F: plantlets developed from somatic embryos; G: transgenic plants growing in potting soil

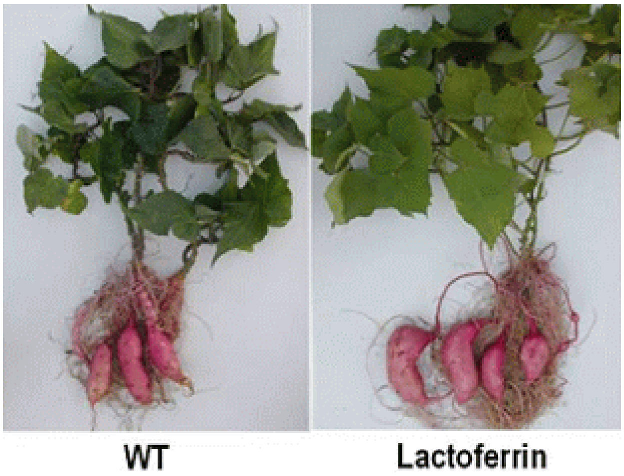


**Fig. 3** Production of tuberous roots in wild type (left) and transgenic sweet potato plants

BCIP, 0.03% NBT, carbonate buffer (0.1 M $NaHCO_3$, 1 mM $MgCl_2$, pH 9.8)]을 이용하여 락토페린 생산을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### Particle bombardment에 의한 형질전환 및 식물체 재분화

pLSM1 벡터가 도입된 배발생 캘러스는 일주일간 MS1D 배지에서 배양한 후 100 mg/L kanamycin이 첨가된 MS1DK 선발배지에서 4주 간격으로 계대배양하였다. 계대배양이 진행되면서 대부분의 캘러스는 점액질화 되거나 비배발생캘러스로 전환되었으나 극히 일부 캘러스만 배발생능을 유지하면서 증식되었다 (Fig. 2A). 증식된 배발생 캘러스를 2,4-D가 제거된 MSBMK 배지로 옮겼을 때 여러 발달 단계를 보이는 체세포배 (Fig. 2B-D)가 유도되었으며 정상적인 식물체로 발달하였다 (Fig. 2E-F). 이들 식물체는 순화과정을 거쳐 생육상에서 재배하였고 (Fig. 2G) 정상적으로 괴근 형성이 이루어졌음을 알 수 있었다 (Fig. 3). 또한, 형질전환 되지 않은 대조구 고구마보다 형질전환 락토페린 고구마의 표피가 약간 진한 색을 띠었는데 (Fig. 4) 이는 고구마 표피 세포내의 락토페린 단백질이 대조구보다 더 많은 철을 흡수해서 나타나는 현상인지 좀 더 연구해 볼 필요가 있다. 또한, 형질전환된 락토페린 고구마가 형질전환되지 않은 대조구에 비해 훨씬 건전한 괴근을 생산하였는데 (Fig. 4) 이는 락토페린 유전자가 도입된 고구마 괴근에서 특정 pathogen에 대해 저항성을 가지고 있음을 추측할 수 있으므로 보다 구체적인 실험이 요구된다.

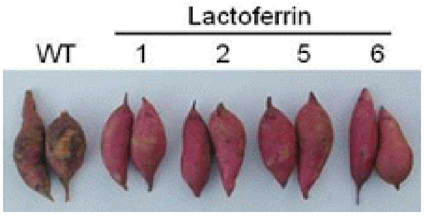


**Fig. 4** Comparison of skin color of wild type (WT) and transgenic sweet potato tuberous roots (Lactoferrin 1, 2, 5, and 6)

### 형질전환체의 특성 분석

선발배지에서 재분화된 고구마 기내 식물체의 잎으로부터 genomic DNA 분리하여 락토페린 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 형질전환 되지 않은 개체와는 달리 형질전환된 모든 개체에서 약 700 bp 크기의 락토페린 밴드가 합성됨을 확인 할 수 있었다 (데이터 미제시). PCR 분석으로 외래 유전자 도입이 확인된 식물체에서 락토페린 probe를 이용하여 Southern 분석을 실시한 결과 형질전환 식물체에서는 약 8 kb 크기의 인체 락토페린 유전자가 고구마 염색체 안에 1 copy로 삽입되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). Particle bombardment를 이용하여 본 연구자들이 개발한 락토페린 함유 고구마 배양세포 (Min et al. 2006)에서는 1개 혹은 다수의 밴드를 가지는 형질전환 배양세포를 생산하였는데 본 연구에서 분석된 형질전환 식물체에서는 단일 밴드를 보여줌으로써 이는 동일한 배발생 캘러스에서 유래된 식물체임을 짐작할 수 있었다. 락토페린 유전자의 발현을 확인하기 위해 total RNA를 분리하여 northern 분석을 수행한 결과 모든 형질전환체에서 2.3 kb 크기의 락토페린 transcripts가 발현됨을 확인하였다 (Fig. 6). 한편, 형질전환 고구마 괴근 절편체로부터 총 soluble 단백질을 분리하여 western blot 분석을 수행한 결과 형질전환되지 않은 고구마 괴근에서는 전혀 anti-lactoferrin 항체와 반응하지 않았으나 형질전

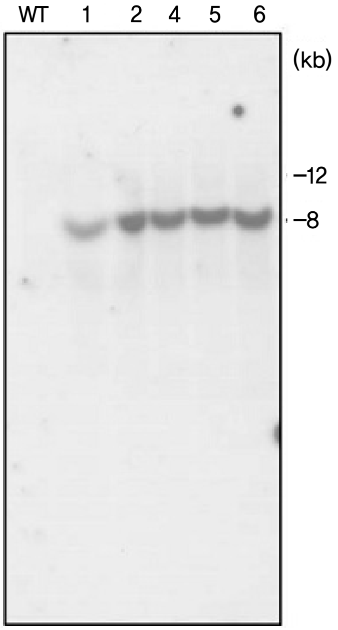


**Fig. 5** Southern blot analysis of genomic DNA prepared from non-transgenic and transgenic sweet potato plants. Total genomic DNA (50 μg) was digested with *Hin*dIII, transferred to a membrane, and hybridized with a $^{32}$P-labeled human lactoferrin cDNA probe. WT: non-transgenic plant; 1-6: transgenic plants

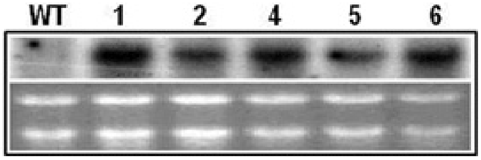


**Fig. 6** Northern blot analysis of total RNA isolated from transgenic sweet potato plants. Twenty μg of total RNA was loaded in each lane. The blot was hybridized with 1.0 kb *Eco*RI-*Bgl*II DNA fragment of hLf cDNA as a probe. WT: non-transgenic plant; 1-6: transgenic plants. Ethidium bromide staining of the gel is shown as a loading control

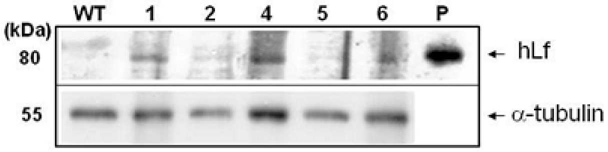


**Fig. 7** Immunodetection of the human lactoferrin protein in transgenic sweet potato tuberous roots by western blot analysis. Each 20 μg total soluble protein was loaded in 10% SDS acrylamide gel. The transferred protein into a nitrocellulose was reacted with anti-hLf and visualized with addition of secondary antibody. Loaded proteins were normalized with the α-tubulin levels. Lane WT: protein extracted from non-transformed control; Lanes 1-6: protein extracted from transgenic tuberous roots; Lane P: a commercially available lactoferrin (100 ng)

환 괴근에서 약 80 kDa 크기의 락토페린 단백질이 생산됨을 확인하였다 (Fig. 7). 이와 같은 결과는 락토페린 유전자가 도입된 감자 (Chong and Langridge 2000)나 약용식물인 가시오갈피 (Jo et al. 2005)에서와 같은 결과로 80 kDa full-size 크기의 인체 락토페린 단백질이 생성되었으나 담배 (Mitra and Zhang 1994; Liu et al. 1999)나 인삼 배양세포 (Kwon et al. 2003)에 도입된 락토페린 단백질에서는 80 kDa 이외에 약 40 kDa에 해당하는 truncated된 락토페린이 생산되었다고 보고하였다. Northern 분석 결과에서처럼 락토페린 transcripts의 발현량이 높았던 #1, #4, #6 식물체는 이들로부터 형성된 괴근의 immunoblot 분석 결과에서도 마찬가지로 락토페린 단백질이 다른 라인에 비해 더 많이 생산됨을 보여주었다 (Fig. 6, 7).

본 연구에서는 인체 락토페린 유전자를 고구마의 배발생 캘러스에 particle bombardment 방법으로 도입하여 락토페린 생산 형질전환 고구마를 개발하였다. “Bio-factories”로써 식물에서 유용 단백질을 생산하기 위해 많은 연구가 진행되고 있는 시점에서 antimicrobial 락토페린 발현되는 형질전환 식물체는 경제적으로 중요한 특정 질병에 저항성을 증대시킴으로써 작물의 질적 향상을 꾀할 수 있으므로 신품종으로 개발될 수 있을 것이다.

## 적 요

면역강화와 같은 생리활성 기능을 가지는 인체 락토페린 cDNA가 들어있는 pLSM1 벡터를 이용하여 고구마 배발생 캘러스에 particle bombardment 방법으로 형질전환을 수행하여 인체 락토페린 생산 고구마를 개발하였다. 선발배지에서 형성된 배발생 캘러스로부터 체세포배발생 과정을 거쳐 식물체로 재분화되었고 토양에서 정상적으로 생장하여 괴근을 형성하였다. 재분화된 식물체를 대상으로 PCR과 Southern 분석을 실시한 결과 고구마의 염색체 게놈에 인체 락토페린 유전자가 도입되었음을 확인하였다. 또한, northern blot 분석을 통해 락토페린 유전자의 발현을 확인하였으며 immunoblot 분석을 통해 고구마 괴근에서도 80 kDa 크기의 락토페린 단백질이 생산됨을 확인할 수 있었다. 본 연구결과 고구마는 치료용 인체 단백질을 생산하는 숙주로서 매우 우수하다는 것을 입증하였다.

## 사 사

본 연구는 국토해양부 해양극한생물분자유전체연구단 사업, 교육과학기술부 프론티어 작물유전체기능연구사업, 농촌진흥청 바이오그린21사업 및 한국생명공학연구원 기관고유사업의 지원으로 수행되었다.

## 인용문헌


Arakawa T, Chong DKX, Slattery CW, Langridge WHR (1999) Improvements in human health through production of human milk proteins in transgenic food plants. In: Shahidi eds. Chemicals via Higher Plant Bioengineering. New York: Kluwer Academic Publishers, Plenum Publishers, pp 149-159

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254

Chee RP, Cantliffe DJ (1989) Composition of embryogenic suspension cultures of *Ipomoea batatas* Poir. and production of individualized embryos. Plant Cell Tiss Org Cult 17:39-52

Chong DK, Langridge WH (2000) Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. Transgenic Res 9:71-78

Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genome DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res 19:1349

Gama MICS, Leite Jr RP, Cordeiro AR, Cantliffe DJ (1996) Transgenic sweet potato plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Plant Cell Tiss Organ Cult 46:237-244

Horn ME, Woodard SL, Howard JA (2004) Plant molecular farming: systems and products. Plant Cell Rep 22:711-720

Humphrey BD, Huang N, Klasing KC (2002) Rice expressing lactoferrin and lysozyme has antibiotic-like properties when fed to chicks. J Nutr 132:1214-1218

Jo SH, Kwon SY, Kim JW, Lee KT, Kwak SS, Lee HS (2005) Transgenic Siberian ginseng cultured cells that produce high levels of human lactoferrin. Korean J Plant Biotechnol 32:209-215

Kamenarova K, Gecheff K, Stoyanova M, Muhovski Y, Anzai H, Atanassov A (2007) Production of recombinant human lactoferrin in transgenic barley. Biotechnol Biotechnol Eq 21: 18-27

Kim MD, Yang KS, Kwon SY, Lee SY, Kwak SS, Lee HS (2009) Selection of transgenic sweet potato plants expression 2-Cys peroxiredoxin with enhanced tolerance to oxidative stress. J Plant Biotechnol 36:75-80

Kwon EJ, Kwon SY, Kim MZ, Lee JS, Ahn YS, Jeong BC, Kwak SS, Lee HS (2002) Plant regeneration of major cultivars of sweet potato (*Ipomoea batatas*) in Korea via somatic embryogenesis. Korean J Plant Biotechnol 29:189-192

Kwon SY, Jo SH, Lee OK, Choi SM, Kwak SS, Lee HS (2003) Transgenic ginseng cell lines that produce high levels of a human lactoferrin. Planta Med 69:1005-1008

Laemmli V (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. Nature 227:680-685

Lee YE, Oh SE, Nishiguchi S, Riu KZ, Song IJ, Park SY, Lee JH, Kim IG, Suh SC, Rhim SL, Lim PO, Lee HY (2007) Expression of human lacteferrin gene in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). J Plant Biotechnol 34:145-152

Liang Q, Richardson T (1993) Expression and characterization of human lactoferrin in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Agr Food Chem 41:1800-1807

Lim S, Yang KS, Kwon SY, Paek KY, Kwak SS, Lee HS (2004) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas*). Korean J Plant Biotechnol 31:267-271

Liu JR, Cantliffe DJ (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.). Plant Cell Rep 3:112-115

Liu JR, Cantliffe DJ, Simonds SC, Yuan JF (1989) High frequency somatic embryogenesis from cultured shoot apical meristem dome of sweet potato (*Ipomoea batatas*). SABRAO J 21: 93-101

Liu JR, Lee KK, Yu DY, Lee MH (1999) Process for the preparation of antiviral plant transformed with lactoferrin gene. US patent 5914448

Min SR, Bae JM, Harn CH, Jeong WJ, Lee YB, Liu JR (2007) Inhibition of starch biosynthesis by antisense expression of cDNAs encoding ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit in sweet potato. J Plant Biotechnol 34:277-283

Min SR, Jeong WJ, Lee YB, Liu JR (1998) Genetic transformation of sweet potato by particle bombardment. Korean J Plant Tiss Cult 25:329-333

Min SR, Liu JR, Rho TH, Kim CH, Ju JI (1994) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue culture of Korean cultivar sweet potato. Korean J Plant Tiss Cult 21:157-160

Min SR, Woo JW, Jeong WJ, Han SK, Lee YB, Liu JR (2006) Production of human lactoferrin in transgenic cell suspension cultures of sweet potato. Biologia Plantarum 50:131-134

Mitra A, Zhang Z (1994) Expression of human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein(s). Plant Physiol 106:977-981

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497

Newell CA, Lowe JM, Merryweather A, Rooke LM, Hamilton WDO (1995) Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) with *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of plants expressing cowpea trypsin inhibitor and snowdrop lectin. Plant Sci 107:215-227

Otani M, Shimada T (1996) Efficient embryogenic callus formation in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Breed Sci 46:257-260

Otani M, Shimada T, Kimura T, Saito A (1998) Transgenic plant production from embryogenic callus of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Biotechnol 15:11-16

Otani M, Wakita Y, Shimada T (2003) Production of herbicide-resistant sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Breed Sci 53:145-148

Prakash CS, Varadarajan U (1992) Genetic transformation of sweet potato by particle bombardment. Plant Cell Rep 11:53-57

Samyn-Petit B, Dubos JPW, Chirat F, Coddewille B, Desmaizieres G, Farrer S, Slomianny MC, Theisen M, Delannoy P (2003)

Comparative analysis of the site-specific N-glycosylation of human lactoferrin produced in maize and tobacco plants. Eur J Biochem 270:3235-3242

Sanford JC, Smith FD, Russel JA (1992) Optimizing the biolistic process for different biological applications. Methods in Enzymology 217:485-509

Shin KS, Roh KH, Lee YH, Park YW, Suh SC (2004) Effect of casein on somatic embryogenesis and plant regeneration in shoot apical meristem explants of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) Korean J Plant Biotechnol 31:67-72

Stefanova G, Vlahova M, Atanassov A (2008) Production of recombinant human lactoferrin from transgenic plants. Biologia Plantarum 52:423-428

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacryamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76:4350-4354

Van Berkel PHC, Welling MM, Geerts M, Van Veen HA, Ravensbergen B, Salaheddine M, Pquwels EKJ, Nuijens J, Nibbering PH (2002) Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. Nat Biotechnol 20:484-487

Ward PP, May GS, Headon DS, Conneely OM (1992) An inducible expression system for the production of human lactoferrin in *Aspergillus nidulans*. Gene 122:219-223

Ward PP, Piddington CS, Cunningham GA, Zhou X, Wyatt RD, Conneely OM (1995) A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic. Biotechnol 13:498-503

Yu DY (1997) Studies on the structure, function and production of lactoferrin. Korean Dairy Technol 15:83-89

Zhang Z, Coyne DP, Vidaver AK, Mitra A (1998) Expression of human lactoferrin cDNA confers resistance to *Ralstonia solanacearum* in transgenic tobacco plants. Phytopathology 88: 730-734