

Rotavirus VP6 유전자의 감자식물체내로의 도입과 형질전환체의 발현분석

염정원¹ · 전재홍¹ · 정재열¹ · 이병찬¹ · 강원진¹ · 김미선¹ · 김철중² · 정 혁¹ · 김현순^{1*}
¹한국생명공학연구원 식물세포공학실, ²충남대학교 수의과대학

Introduction of VP6 Gene into Potato Plant by *Agrobacterium*-mediated Transformation and Analysis of VP6 Expression in Transgenic Potatoes

YOUM, Jung-Won¹ · JEON, Jae-Heung¹ · JUNG, Jae-Yeol¹ · LEE, Byoung-Chan¹ · KANG, Won-Jin¹ · KIM, Mi-Sun¹ ·
KIM, Chul-Joong² · JOUNG, Hyouk¹ · KIM, Hyun-Soon^{1*}

¹ Plant Cell Biotechnology Lab., KRIBB, P. O. Box 115, 300-600, Daejeon, Korea

² Lab. of Infectious Disease, Chungnam National University

ABSTRACT A VP6 fragments was subcloned with *Bam*HI in the binary pMBP-1 vector under Califlower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter and neomycin phosphotransferase II (*npt* II) gene. The recombinant binary vector was mobilized into *Agrobacterium-tumefaciens* LBA4404 by the freeze-thaw method and potato (*Solanum tuberosum* L. cv Desiree) was transformed by modified leaf-disc cocultivation. Shoots were induced on MS medium with 0.01 mg/L NAA, 0.1 mg/L GA₃, 2.0 mg/L Zeatin, 100.0 mg/L kanamycin, 500.0 mg/L carbenicillin. In order to identify the copy number of VP6 into potato plant, total genomic DNA was isolated from transgenic potato and analysed by Southern blotting. Genomic DNA and total mRNA analysis demonstrated the incorporation of the foreign gene into the potato genome, as well as their transcription.

Key words: *Solanum tuberosum* L. cv Desiree, VP6 gene, CaMV 35S promoter, NPT II

서 론

유용유전자를 식물체로 도입하는 형질전환 기술이 개발된 이후 매우 많은 분야에서 이 기술이 이용되고 있다. 이 기술을 기초로 한 지금까지의 식물생명공학분야의 연구는 주로 농업생산성의 증가에 초점을 두어 병해충 저항성, 제초제 저항성 및 작물의 품질을 개량시킨 유전자조작 작물의 상업화로 이어져 경제적 성과까지 가져왔다. 최근에는 유용 이차대사산물을 생산하는 고부가가치 신 기능성 작물의 창출로 대체약물 또는 식품의약 분야, 더 나아가 백신 개발에도 도입되고 있다. 식용경구백신은 1990년대 초 Arntzen과 그의 동료들

에 의해 그 가능성이 보고되면서(1992) 이미 많은 질병 유전자를 식물체로 도입하여 생산하고자 하는 연구들이 이루어져 오고 있다. Cholera toxin B subunit 유전자를 감자에 형질전환시켜 생산된 감자로 쥐에 실험한 결과 면역효과를 확인할 수 있었으며 (Arakawa et al, 1997), Human milk protein β -casein (Chong et al, 1997), Hepatitis B surface antigen (HBsAg) (Mason et al, 1992; Thanavala et al, 1995; Richter et al, 2000; Kong et al, 2001), respiratory syncytial virus (RSV)의 F-protein 부분을 식물체 발현 벡터에 접합시켜 토마토에 형질전환시켰고 (Sandhu et al, 2000), transmissible gastroenteritis virus (TGEV)의 spike protein (Tuboly et al, 2000) 등이 이미 식물에서 발현되어 항체형성반응이 확인된 바 있다. 다만 지금까지의 연구결과로 보건 데, 매우 낮은 외부 단백질의 발현율로 인하여 주사 백신과 같이 단 한 번으

*Corresponding author Tel 042-860-4493 Fax 042-860-4599

E-mail hyuns@kribb.re.kr

로 항체형성반응을 유도하는데 어려움이 있는 것이 사실이다. 이를 해결하기 위해 식물체내 항원단백질의 발현율을 향상시키기 위한 promoter 개발, 전사효율을 높이기 위한 여러 인자의 도입, 특정소기관으로의 이동 등과 같은 연구들이 진행되고 있다.

바이러스성 설사병의 원인 바이러스는 rotavirus와 Norwalk virus로 알려져 있는데, Norwalk virus는 Mason 등 (1996)에 의해 담배와 감자에서 발현된 바 있다. 이질바이러스는 장티푸스와 콜레라 등과 더불어 경구백신의 이용가치가 매우 높은 것으로 알려져 있다. Rotavirus는 11분절의 double-strand RNA genome과 세층의 단백질 capsid로 구성되어 있으며 중간층에 위치한 VP6 rotavirus particle은 특수한 strain의 일종이다 (Cunliffe et al. 2001). 본 실험에서는 이러한 VP6의 epitope 부분인 약 1350 kb의 유전자를 CaMV35S promoter에 의해 발현이 조절되도록 만들어진 pMBP발현벡터로 도입시킨 뒤 감자식물체에서 발현시키고자 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 형질전환을 시도하였다. 우리는 형질전환 식물체에서 VP6 유전자의 발현양상을 분석하여 이 질병에 대한 감자백신 개발 가능성 여부를 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 균주

본 실험에 사용한 식물 재료는 기내에서 2주 내지 3주간 생육시킨 감자 (*Solanum tuberosum* L, cv Desiree)의 잎절편으로서 배양 조건은 Murashige & Skoog (1962)의 3% sucrose 기본배지에 vitamin과 100 mg/L의 myo-inositol을 첨가한 배지를 사용하였다. 기내줄기의 증식을 위해 광도 4000 lux, 16시간 광주기 및 23°C 항온실에서 배양하였다.

VP6 항원유전자는 충남대학교 수의과대학 전염병학실에서 분양받았으며 (pSFV-1), VP6 유전자의 클로닝을 위해 one shot competent cell인 Top10 (chemically competent, Invitrogen co, USA)을 이용하였다. 감자로의 유전자 도입을 위해서 binary vector system을 가지고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404를 사용하였다.

벡터제작

로타바이러스의 중간층에 해당하는 VP6 strain을 정방향 primer (5'-ATGGATGTCCTGTACTCCTTG -3'), 역방향 primer (5'-TCATTGACAAGCATGCTTCTAAT-3')와 균주를 template로 하여 약 1356 bp의 PCR (DNA thermal cycler 480, Perkin Elmer co.) 산물을 얻었다. 이 때 PCR은 95°C에서 2분간 pre-denaturation, 95°C에서 1분간 denaturation, 50°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 30초에서 증폭시키는 조

건으로 35회, 72°C에서 10분간 post-extension하였다. 이것을 정제한 후 Topo TA Cloning^R vector에 ligation하였다. *EcoRI* 제한효소로 절단하여 그 크기를 확인한 클론들의 염기서열을 확인하기 위하여 sequencing (한국생명공학연구원 유전체연구센터에 의뢰)을 실시하여 VP6의 염기서열과 동일한 클론을 확보하였다. TopoVP6을 *BamHI*으로 절단하여 정제한 다음, *BamHI*으로 절단한 뒤 dephosphorylation 처리한 pMBP-I vector에 ligation시켰다. pMBP식물발현벡터는 pBI121에서 유래되었으며, 상시발현 promoter인 CaMV35S promoter에 의해 운용되며 kanamycin 항생제에 내성을 가지는 선발마커인 NPTII 유전자를 가지는 식물체 발현벡터이다. 만들어진 pMBPVP6벡터는 freeze-thaw 방법에 의하여 *A. tumefaciens* LBA4404에 도입시켰다.

감자로의 형질전환

왕성하게 자란 감자의 기내줄기에서 잎을 채취하여 약 1cm의 넓이로 잎절편을 준비한 뒤, YEP(km³) 배지에서 적정 밀도로 자란(OD₆₀₀에서 0.6) pMBPVP6을 포함하고 있는 *A. tumefaciens* LBA4404와 약 10분간 공동배양 하였다. 공동배양 후 멸균종이에서 건조시킨 후 2,4-D가 2.0 mg/L 첨가된 배지에서 2일간 배양하였다. 이들 절편에서 재분화된 식물체를 얻기 위하여 0.01 mg/L NAA, 0.1 mg/L GA₃, 2.0 mg/L Zeatin, 100.0 mg/L kanamycin, 500.0 mg/L carbenicillin이 첨가된 MS 기본배지에서 배양하였다.

형질전환체의 선발

항생제가 첨가된 배지에서 녹색을 띠면서 유기되는 어린 싹을 캘러스로부터 분리함으로써 형질전환체를 1차 선별하였다. 이들 식물체의 DNA를 Hong 등 (1993)의 방법으로 분리한 다음 NPTII primer를 사용한 PCR 반응을 실시하였다.

Southern blot hybridization

감자의 genomic DNA는 잎과 싹부분에서 1 g을 채취해 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) buffer를 이용한 식물의 genomic DNA 분리방법 (Doyle & Doyle, 1990)을 변용하여 추출하였다. 약 30 µg의 DNA를 *EcoRI*으로 처리하여 정제한 후 1% agarose gel에 19V로 20시간 전기영동한 다음 denaturation 과정을 거친 후 nylon membrane (Schleicher & Schuell co.)으로 전이하였다. 전이된 DNA 단편들을 고정시키기 위하여 UV crosslink (1200×µJ/cm²)를 2회 실시하였다. 이 membrane을 DIG easy hybridization solution (Roche co, Germany)으로 68°C에서 1시간 정도 pre-hybridization 한 다음, PCR Dig Labeling Mix (Roche co, Germany)와 제공된 제작 방법에 따라 만든 probe로 50°C에서

6시간 이상 hybridization하였다. Probe를 만들 때 양 방향의 VP6 specific primer를 이용하였으며 PCR 조건은 언급한 것과 동일하게 하였다. Membrane을 2×SSC, 0.1% SDS의 washing buffer에서 세척한 다음, Dig detection kit (Roche co, Germany)와 제공된 방법으로 NBT/BCIP에 의한 발색 정도를 관찰하였다.

RNA의 추출과 Northern blot hybridization

감자의 잎과 신초부분을 포함하여 1 g 정도를 채취한 다음 RNAgents^R Total RNA Isolation System (Promega co.)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 정제된 RNA를 정량한 뒤 30 µg을 19.8% formaldehyde가 함유된 1% agarose gel에 전기영동하였다. 특별한 전처리 없이 agarose gel에서 membrane으로 전이시켰다 (Turbo blotter system, Schleicher & Schuell co.), Hybridization과 color detection은 Southern에서 실시한 것과 동일하게 하였다.

결과 및 고찰

벡터제작 및 감자 내 형질전환

Topo TA cloning 벡터에 subcloning된 VP6유전자의 전체 염기서열 분석으로 PCR증폭에 의하여 일어날 수 있는 염기서열 변화가 없음을 확인한 TOPOTAVP6를 확보하였다. 이를 BamHI으로 자른 뒤 pMBP-1 식물체 발현벡터에 클로닝하여 pMBPVP6를 만들었다 (Figure 1). *A. tumefaciens* LBA4404에 freeze-thaw 방법을 이용하여 transformation 시

킨 뒤, kanamycin을 첨가한 YEP배지에서 자란 클론 중 하나를 선택 배양하여, specific primer set와 BamHI으로 처리해 1356 bp의 단편을 확인하여 감자로의 형질전환에 사용하였다. 적정밀도로 (OD₆₀₀=0.6) 자란 *Agrobacterium*균과 기내배양된 감자의 줄기에서 잎 절편을 채취하여 10분간 공동배양 하였는데, 이때 10분 이상 공동배양 할 경우 조직이 무르고, 캘러스의 유기 또한 용이하지 않았다.

공동배양된 잎절편을 0.01 mg/L NAA, 0.1 mg/L GA₃, 2.0 mg/L Zeatin, 100.0 mg/L kanamycin, 500.0 mg/L carbenicillin이 첨가된 선발배지에서 계대배양한 결과 약 10일 후부터 상처 부위에서 캘러스가 왕성하게 유기되기 시작하였으며 4주 후부터 신초가 생성되기 시작하였다. 그러나 약 8주후에는 대부분의 캘러스에서 재분화 개체가 생성되었으며 20개 이상의 분리 가능한 독립된 shoot들을 얻을 수 있었다. 이들의 왕성한 생육을 위해 MS 기본배지로 옮겨준 결과 뿌리와 줄기가 잘 발달된 식물체로 성장하였다 (Figure 5). 즉, 완전히 성장된 새로운 재분화 개체는 호르몬을 제외한 항생제 배지에 옮겨 내성을 확인하였는 바, 100 mg/L의 kanamycin이 포함된 배지에서 다시 배양하였을 때 생장에 아무런 저해를 받지 않음으로써 (Figure 5) 항생제 내성 유전자 (NPTII)의 도입에 따른 형질전환체의 1차 선별 효과가 있었다. 항생제 배지에서 1차 선별한 개체들에서 Hong 등(1993)에 의한 방법으로 간편하게 DNA를 추출하여 NPT II 유전자의 PCR 검정을 수행하였다. 그 결과 대부분의 형질전환 개체들에서 약 700 bp의 NPT II 유전자의 증폭을 확인할 수 있었으며(자료 미제시), 그로 인해 VP6 유전자를 포함하는 T-DNA의 도입이 잘 이루어졌음을 추론 가능하였다.

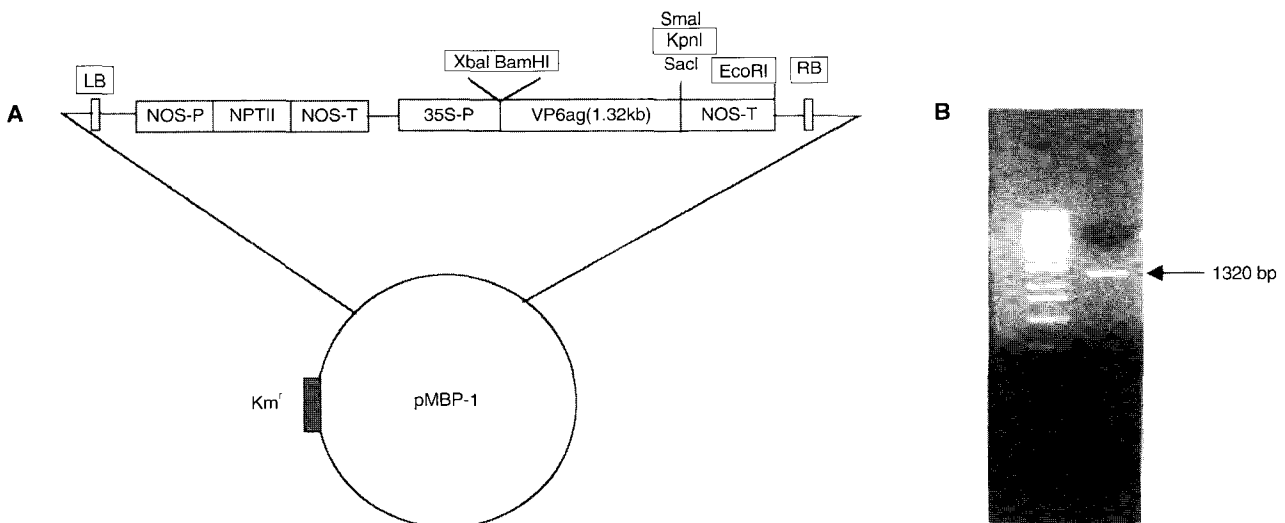


Figure 1. A, Structure of the T-DNA region of binary vector pMBPVP6 for expression of VP6 antigen; B, An excised band with BamHI containing VP6ag coding sequence (1320 bp).

형질전환체의 PCR에 의한 분석

재분화된 형질전환 식물체의 앞에서 Doyle and Doyle (1990) 방법을 이용해 DNA를 추출하고 VP6 유전자 특이적인 primer쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR조건과 primer는 VP6 유전자의 PCR산물을 얻을 때와 동일하게 수행하였으며, 증폭된 PCR산물은 1% agarose gel에서 전기영동으로 분석하였다. 분석결과 (Figure 2) lane NC는 형질전환하지 않은 식물체이며, lane PC는 VP6유전자가 재조합된 binary vector pMBPVP6에서 증폭된 단편이며, lane 1-9는 형질전환된 감자 식물체로부터 증폭된 DNA 단편이다. 형질전환된 식물체에서는 예상된 크기인 1356 bp의 단편이 확인된 반면, 형질전환 하지 않은 식물체 lane NC에서는 DNA 단편이 증폭되지 않아 로타바이러스 VP6 유전자가 형질전환된 감자 게놈상에 삽입된 것으로 추정되었다.

형질전환된 식물체에서의 VP6 유전자의 발현

PCR 분석을 통해 유전자의 삽입이 확인된 4개의 식물체와 형질전환 하지 않은 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 Southern 분석을 수행하였다. DIG표지된 probe를 이용하여, T-DNA의 right border의 끝 쪽에 있는 제한효소 *EcoRI*으로 genomic DNA를 24시간 처리한 후, 30 µg의 DNA를 1% agarose gel에서 분석한 결과(Figure 3), DIG표지된 VP6 probe에 특이적으로 반응하는 단편들을 확인할 수 있었다. 개체 1번과 3번에서는 단일 copy로 삽입이 되었으며, 개체 4에서는 2개, 개체 2번은 3개의 copy수를 보임으로써 *Agrobacterium*의 경우 1~3개의 다양한 copy수를 보인다는 여타의 연구결과와 유사한 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 선발된 감자 형질전환 식물체에 외래 유전자인 VP6 유전자가 안정적으로 도입되었음을 의미한다. 또한 유전자 copy수의 차이는 RNA 및 단백질의 발현에 영향을 미치는데, 일반적으로 copy수가 많을수록 그 발현양이 높은 것으로 알려져 있지만 정비례하는 것은 아니라는 연구결과들도 있다.

이들 형질전환 식물체에서 total RNA를 분리하여 DIG으로 표지된 probe를 이용하여 Northern 분석을 실시한 결과 (Figure 4), VP6 유전자의 transcript가 합성되었음을 확인할

수 있었는데 그 발현양은 개체 간에 차이를 보였다. 그 이유는 핵내로의 외부유전자를 도입한 형질전환 식물체는 RNA 분해가 쉬워 불안정하며, double-stranded RNA가 gene silencing이 일어나 그 정도에 따라서 발현양이 차이가 난 것으로 여겨진다 (Marjori et al. 2001). 결국, VP6 유전자를 감자에 형질전환시킨 경우를 볼 때 PCR 분석, Southern, Northern분석을 실시한 결과 95% 이상의 높은 안정성을 보이는 것으로 확인되었다. 외부유전자 VP6의 도입에 의한 형질전환체의 외형적인 변화는 없었으며, shoot의 기내배양 양상 역시 다른 차이는 찾을 수 없었다. 감자소괴경형성도 형질전환 식물체에서의 차이는 없었으며 단지 개체 간의 차이만 관찰되었다 (Figure 5). 이러한 결과는 본 실험실에서 많은 외부유전자를 도입한 형질전환체들에서 보아왔던 것과 동일한 결과라고 할 수 있겠다. 단지 배양환경이 불량할 경우, 가령 배양용기 내의 환기가 잘 안되거나, 온도나 빛이 불균일할 때 받는 식물체의 stress반응은 민감한 것을 알 수 있었다 (Figure 6). 그림에서 T 식물체는 VP6 유전자가 도입된 형질전환체가 배양용기 내의 과도한 수분 때문에 잎들이 투명화 초기증세를 보이는 반면, NT 식물체는 정상식물체로서 동일한 환경하에서도 투명화 현상이 나타나지 않음을 알 수 있었다. 물론 이러한 결과는 개체 간의 차이에 의한 확률이 매우



Figure 2. PCR detection of VP6 DNA in transgenic plants. Lane M is the 1kb DNA ladder, lane NC is the negative control, lane PC is the positive control; lane 1-9, independent transformants harboring the construct in pMBPVP6.

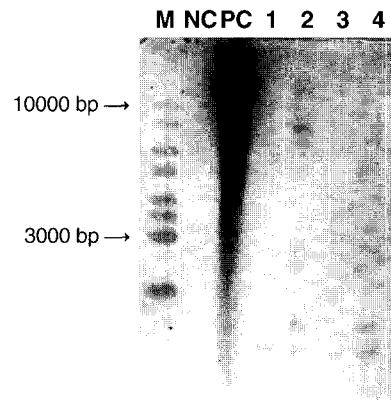


Figure 3. Genomic Southern blot analysis for the VP6 gene from potato. DNA (30 µg aliquots) was digested *EcoRI* and the VP6 gene was used as the probe. Lane 1-4 transgenic plant, line NC non-transgenic plant as the negative control, DNA from a VP6 gene as the positive control.

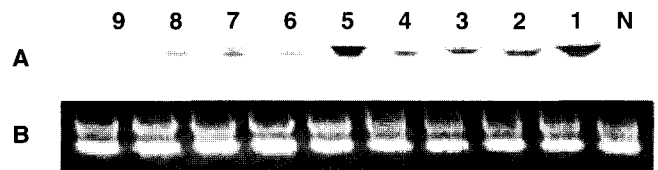


Figure 4. RNA from leaves of transgenic potatoes for pMBPVP6 analyzed by northern blot hybridization. A, Lane C, non-transgenic control plant; lane 1-9, independent transformants harboring the construct in pMBPVP6; B, EtBr staining of total RNA (30 µg) was used as a control for equal RNA loading.

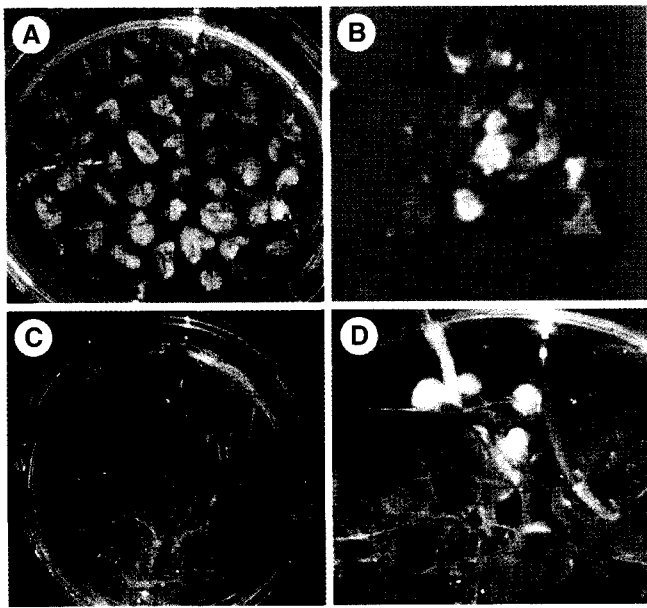


Figure 5. Formation of transgenic plants and microtuber *in vitro*. A, Culture of leaf discs after cocultivation; B, Calli and shoot induced on regeneration media; C, Induction of transformants; D, Microtuber formation from independent transgenic plant.

높기 때문에 여러 가지의 처리와 반복을 통해 검증되어야 할 점으로서 후에 본격적인 실험을 통해 이러한 현상의 일관성 여부와 원인을 밝히고자 한다.

외부유전자가 도입된 식물체는 그 단백질의 발현이 불안정하고 발현양이 아주 작다는 단점이 있음에도 불구하고 다른 매체를 통한 생산보다는 생산원가가 저렴하다는 경제적인 이유와 외부병원균에 의한 오염 문제가 없다는 큰 장점 때문에 최근에는 molecular farming이라는 개념으로 유용물질의 대량 생산 연구가 활발히 진행되고 있는 추세이다. 식물경구백신 역시 그 대표적인 예로서 많은 질병 유전자들이 도입된 식물체가 이미 개발된 상태이다. 본 연구 역시 이러한 궁극적인 목표를 가지고 수행되었으며, 그 첫 단계로서 대상 질병 유전자를 식물체 발현벡터를 이용하여 감자로 도입시켜 발현시키는 데 성공하였다.

적 요

바이러스 설사병의 원인인 VP6유전자를 감자에 형질전환시키기 위하여 CaMV 35S promoter와 kanamycin 항생제 내성을 갖는 식물발현벡터 pMBP-1에 subcloning하고, 이 재조합 벡터를 *A. tumefaciens* LBA4404에 도입시킨 후, freeze thaw방법을 이용하여 감자에 형질전환 시켰다. 공동배양된 감자의 잎절편은 2.4-D가 2.0 mg/L 첨가된 배지에서 2일간 배양 후, 0.01 mg/L NAA, 0.1 mg/L GA₃, 2.0 mg/L Zeatin, 100.0 mg/L kanamycin, 500.0 mg/L carbenicillin이 첨가된 선발배지에서 재분화시켰다. 이 때 유도된 싹초는 100.0 mg/L의

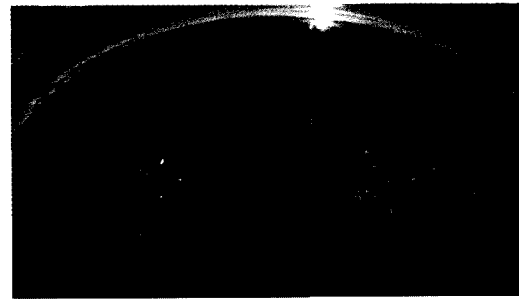


Figure 6. Shoot growth of non-transgenic (NT) and transgenic potato (T) plants under the high humidity condition. Transgenic shoot shows weak vitrification on the leaves compare to the non-transgenic plant.

kanamycin이 포함된 배지에 옮겨준 후, 왕성한 생육을 위해 MS 기본배지에서 다시 배양하였다. 기내배양시 외부유전자의 도입에 의한 외형적인 변화는 찾을 수 없었으며, 형질전환체는 NPT primer를 사용한 PCR방법으로 1차선별 하였다. DIG 표지된 probe를 이용하여 total RNA를 분석한 결과 개체별로 발현양의 차이는 있었으나, 95% 이상의 안정성을 보였고, genomic DNA를 추출해 Southern blot hybridization했을 경우 1~3개의 copy수를 보임으로써 형질전환 식물체에 외래 유전자인 VP6유전자가 안정적으로 도입되었음이 확인되었다.

사사 - 본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물 이용기술개발사업단의 연구비지원(과제번호 PDC 0140112)에 의해 수행되었습니다.

인용 문헌

- Arakawa T, Chong DKX, Merritt JL and Langridge WHR (1997) Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Research* 6: 403-413.
- Choi KH, Jeon JH, Kim HS, Joung YH, Cho SJ, Lim YP, Joung H (1996a) Development of herbicide-resistant transgenic potato. *Korean J. Plant Tissue Culture* 23:161-165
- Choi KH, Yang DC, Jeon JH, Kim HS, Joung YH, Joung H (1996b) Expression of cold-regulated gene in transgenic *Solanum tuberosum* L. *Korean J. Plant Tissue Culture* 23:311-315
- Chong DKX, Roberts W, Arakawa T, Illes K, Bagi G, Slattery CW, Langridge WHR (1997) Expression of the human milk protein β -casein in transgenic potato plants. *Transgenic Research* 6: 289-296.
- Cunliffe NA, Dove W, Jiang B, Thinwda Cert BD, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA (2001) Related Articles Detection of group C rotavirus in children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *Pediatr Infect Dis J* 20(11):1088-90.
- Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in

- transgenic plants. *Science* **268**:714-719
- Hong W, Qi M, Cutler AJ** (1993) A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Research* **21**:4153-4154
- Hugh S. Mason, Judith M. Ball, Jian-Jian Shi, Xi Jiang, Mary K. Estes, and Charles J. Arntzen** (1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:5335-5340.
- Hussey G, Stacey NJ** (1981) In vitro propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann Bot* **48**:787-796
- Kong Q, Richter L, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS, Thanavala Y** (2001) Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:11539-11544
- Marjori Matzke, Antonius JM. Matzke, Jan M. Kooter** (2001). RNA: Guiding Gene Silencing. *Science* **293**:1080-1083
- Mason HS, Lam DM, and Arntzen CJ** (1992) Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Transgenic Plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:11745-11749.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* **15**:473-497
- Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ and Mason HS** (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nature Biotechnology* **18**:1167-1171.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sandhu JS, Krasnyanski SF, Domier LL, Korban SS, Osadjian MD, Buetow DE** (2000) Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Res* **9**(2):127-35.
- Thanavala Y, Yang YF, Lyons P, Mason HS, Arntzen C** (1995) Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8):3358-61.
- 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
- Vazquez Rovere C, Asurmendi S, Hopp HE** (2001) Transgenic resistance in potato plants expressing potato leaf roll virus (PLRV) replicase gene sequences is RNA-mediated and suggests the involvement of post-transcriptional gene silencing. *Archives of Virology* **146**:1337-1353
- Xie DY, Hong Y** (2002) *Agrobacterium-mediated* genetic transformation of *Acacia mangium*. *Plant Cell Reports* **20**:917-922

(접수일자 2002년 5월 6일)