

數種 나비目 核多角體病 바이러스의 多角體 蛋白質 特性과 그에 대한 Alkaline Protease의 影響

Influence of Alkaline Protease on Polyhedral Proteins of Nuclear Polyhedrosis Viruses Isolated from Three Lepidopterous Insects

朴範錫¹·金賢郁²·陳炳來²·任大準¹·姜錫權²

Beom Seok Park¹, Hyun Uk Kim², Byung Rae Jin², Dae Joon Im¹ and Seok Kwon Kang²

ABSTRACT Polyhedral proteins and the endogenous alkaline protease associated with larval-derived polyhedra of nuclear polyhedrosis viruses isolated from *Spodoptera litura*, *Bombyx mori*, and *Hyphantria cunea* were investigated. Polyhedral proteins prepared under alkaline protease heat-inactivated condition were separated as one band with 31Kd in *S. litura* and *H. cunea* NPV and 30Kd in *B. mori* NPV by the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Whereas polyhedral proteins without heat-inactivation were degraded into smaller polypeptides with a certain pattern in alkaline solution. The results of double-immunodiffusion and western blot analysis with antisera against polyhedral proteins indicated that those three polyhedral proteins had common antigenic determinants and the degradation of polyhedral proteins by alkaline protease could be confirmed.

KEY WORDS nuclear polyhedrosis virus, *Spodoptera litura*, *Bombyx mori*, *Hyphantria cunea*, polyhedral protein, alkaline protease

抄 錄 담배거세미나방(*Spodoptera litura*: Sl), 누에(*Bombyx mori*: Bm) 및 흰불나방(*Hyphantria cunea*: Hc)으로부터 분리된 核多角體病 바이러스(nuclear polyhedrosis virus: NPV)의 多角體 蛋白質의 특성과 그에 대한 alkaline protease의 영향을 SDS-PAGE 및 血清學的 方法으로 분석했다. Alkaline protease를 不活化시킨 후 多角體 蛋白質을 SDS-PAGE한 결과, BmNPV의 경우 30kD, SlNPV와 HcNPV는 31kD의 單一 major band 및 이것들의 重合體(polymer)인 57kD와 66kD의 minor band들이 관찰되었다. Alkaline protease의 不活化를 省略한 Sl NPV 多角體를 알칼리溶液으로 時間 差異를 두고 처리한 후 SDS-PAGE한 결과, 알칼리 처리시간이 경과함에 따라서 alkaline protease 活性에 의해 多角體 蛋白質이 一定한 pattern으로 低分子化됨이 뚜렷하였다. SlNPV와 BmNPV 多角體 蛋白質의 抗體를 제조하여 SlNPV, BmNPV 및 HcNPV 多角體 蛋白質間の 血清學的 相同성을 二重免疫擴散法과 Western blot으로 비교한 결과는 3種 모두에서 공통 antigenic determinants의 존재가 認定되었으며 major 多角體 蛋白質의 重合體 形成과 alkaline protease에 의한 분해를 확인했다.

檢 索 語 담배거세미나방, 누에, 흰불나방, 核多角體病 바이러스, 多角體 蛋白質, alkaline protease

Baculoviridae의 Subgroup A에 속하는 核多角體病 바이러스(nuclear polyhedrosis virus: NPV)는 농작물 및 山林害虫에 病原성이 強하고 肺有動物 細胞系에는 증식되지 않아(Ignoffo 등 1973, Tjia 등 1983, Gröner 등 1984), 人畜에

無害하여 微生物殺虫劑로 개발, 使用되고 있다 (Summers 등 1975, Tinsley 1978, Miller 등 1983). 최근에는 核多角體病 바이러스를 이용하여 分子遺傳學的 연구를 기초로 外來遺傳子 發現을 위한 vector 개발에 상당한 연구가 集中되고 있다(Smith 등 1983, Pennock 등 1984, Maeda 1985).

NPV는 다수의 바이러스 粒子가 蛋白質結晶 構造인 多角體 속에 埋入되어(Matthews 1982)

1 農業技術研究所 昆蟲科(Entomology Division, Agricultural Sciences Institute, RDA, Suwon. Korea.)

2 서울대학교 農科大學(College of Agriculture, Seoul National University, Suwon. Korea.)

바이러스 粒子들을 환경으로부터 보호하여 不活化를 지연시키는 역할을 하기에 이들 NPV를 微生物殺虫劑로 개발함에 있어서 매우 유리한 점이라 하겠다.

이러한 多角體 蛋白質은 SDS-polyacrylamide gel 電氣泳動으로 분석하던 分子量 28—33kd의 major band와 多數의 minor band들이 관찰되는데, 이에 대하여 Eppstein 등(1975)과 Summers 등(1978)은 多角體는 28—33kd의 單一蛋白質인 polyhedrin으로 구성되어 있으며, 그외의 minor band들은 單一蛋白質의 重合體(polymer)이거나, alkaline protease에 의해 低分子화된 것이라고 해석하고 있다. 반면 Naser 등(1983)은 Western blot-ELISA 방법, Reinganam(1984)는 銀染色(Silver stain) 방법에 의해 多角體 蛋白質은 여러 개의 minor band들을 포함하고 있으며 이들의 pattern을 비교함으로써 바이러스를 분류·동정할 수 있다고 주장하고 있다.

여기서 중요한 것은 alkaline protease의 活性 문제로서, 이 酵素는 培養細胞(*in vitro*)로 증식된 多角體에서는 발견되지 않아(Maruniak 등 1979, McCarthy 1979), 이 alkaline protease의 由來는 多角體 精製 過程中에 宿主昆蟲의 消化液으로부터 多角體에 汚染되는 것으로 알려져 있다(Nagata & Tanada 1983). 또한 정제된 多角體를 70—80°C에서 20—60分 이상 가열하면 alkaline protease가 不活化된다고 보고되었다(Wood 1980).

따라서 本 實驗에서는 담배거세미나방, 흰불나방 및 누에 NPV 多角體 蛋白質의 특성과 이와 관련된 alkaline protease의 영향을 SDS-PAGE 및 각 多角體 蛋白質의 抗體를 이용한 血清學的 방법으로 분석했다.

材料 및 方法

供試 바이러스

담배거세미나방 核多角體病 바이러스(*Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus: Sl NPV), 누에 核多角體病 바이러스(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus: BmNPV) 및 흰불나방 核多角體病 바이러스(*Hyphantria cunea*

nuclear polyhedrosis virus: HcNPV)를 각 宿主昆蟲에 經口接種시킨 후 罹病虫을 수집하여, -20°C에 凍結保管하면서 실험에 사용하였다.

多角體 分離

罹病虫을 磨碎하여 3,000rpm에서 5分間 원심분리를 3—4회 반복하여 부분정제된 多角體 沈澱物을 40—65% Sucrose linear density gradient로 24,000rpm (Hitachi, SRP-28SA)에서 30分間 원심분리하여 多角體 밴드를 얻었다.

이 밴드를 取하여 증류수로 희석하고 3,000rpm에서 원심분리하여 sucrose를 제거한 후 沈澱된 多角體를 -20°C에 保管하면서 실험에 사용하였다.

多角體 蛋白質의 電氣泳動

宿主昆蟲의 中腸으로부터 汚染되는 것으로 알려져 있는 alkaline protease를 不活化시키기 위하여(Wood 1980), 정제된 多角體를 0.05 M Tris-EDTA(pH 7.2), 1% SDS, 0.5% β -mercaptoethanol 용액에 10⁹ PIB/ml 되도록 浮遊시키고 70°C에서 2時間 가열한 후(Summers & Smith 1978), 15,000rpm에서 5分間 원심분리하여 alkaline protease가 不活化되고 多角體 표면이 洗滌된 多角體 沈澱을 얻었다.

이 沈澱物을 알칼리용액(0.1M Na₂CO₃, 0.17M NaCl, 0.01M EDTA, pH 10.9)에 浮遊시켜 37°C에서 15分間 溶解시킨 후(Summers & Smith 1975), 15,000rpm에서 5分間 원심분리하여 용해되지 않은 多角體를 제거하고 다시 그 上清液을 24,000rpm에 1時間 원심분리하여 비리온을 沈澱 제거하고, 多角體 蛋白質 용액을 얻었다.

이 용액에 2배 농도의 Laemmli 溶液(0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue)을 同量 混合하고 100°C에서 15分間 가열하여 電氣泳動 試料로 준비하였다.

또한 alkaline protease의 活性를 확인하기 위하여 일부 多角體는 不活化 과정을 생략하고 上記와 同一한 방법으로 多角體 蛋白質 電氣泳動 試料를 준비하였으며 또한 alkaline protease에 의한 시간경과에 따른 多角體 蛋白質 分解樣

相을 알아보기 위해 알칼리용액 처리시간에 차이를 두었다.

電氣泳動은 Laemmli(1970)의 방법에準하여濃縮 gel은 polyacrylamide 2.5%로 分離 gel은 12.5%로 gel을 作成하였고, 濃縮 gel에는 20mA, 分離 gel에는 30mA의 電流를 공급하면서 5時間 電氣泳動하고, Coomassie brilliant blue로 染色하였다.

多角體 蛋白質의 抗原 準備 및 抗體製造

上記의 多角體 蛋白質 電氣泳動에서와 동일한 方法으로 電氣泳動한 gel로부터 多角體 蛋白質로 확인된 BmNPV의 경우 30kd, SINPV. 31kd의 major band를 滅균된 면도칼로 절단해 electroeluter (IBI Model)를 이용하여 泳動 buffer (0.1% SDS, 0.025M Tris-HCl, 0.192M glycine)에서 125 Volt로 35分間 2回 elution한 후 7.5M NH₄OAc로 salt cushion에 沈澱된 多角體 蛋白質 용액을 채취하였다.

이것을 2% sodium bicarbonate, 1mM EDTA에 처리한 透析 튜브에 넣어 멸균한 증류수로 40時間 以上 透析한 것을 다시 SDS-PAGE하여 확인한 후 抗原으로 사용하였다(그림 1).

이와 같이 純粹分離한 多角體 蛋白質 抗原을 5mg/ml되게 하여 同量의 Freund's complete adjuvant(Sigma)와 주사기로 완전히 혼합하여 토끼(Newzealand white, 2.5kg)의 뒷다리에 筋肉 주사하고, 1週後 同量의 抗原과 Freund's incomplete adjuvant(Sigma)를 혼합 booster 주사하였다. 다시 1週後 adjuvant없이 抗原만 토끼귀에 靜脈 주사하여, 10日 경과 후 血液을 채취하여 3,000rpm에서 30分間 원심한 다음 上層液을 수거후 0.001% sodium azide를 첨가하고, 小量으로 나누어 -20°C에서 보관하면서 抗原·體抗실험에 사용하였다.

二重免疫擴散法에 의한 多角體 蛋白質의 血清學的 比較

二重免疫擴散法은 Ouchterloney(1968) 方法으로 수행하였다. 直徑 5cm의 petri-dish에 0.02M phosphate buffer, 0.15M NaCl, pH7.4에 녹여

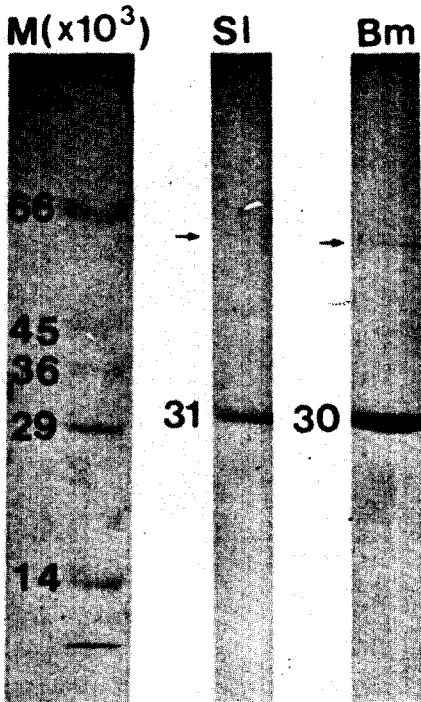


Fig. 1. Major polyhedral protein electroeluted by SDS-PAGE as antigen(Bm: polyhedral protein of BmNPV, SI: polyhedral protein of SINPV, M: molecular weight standard).

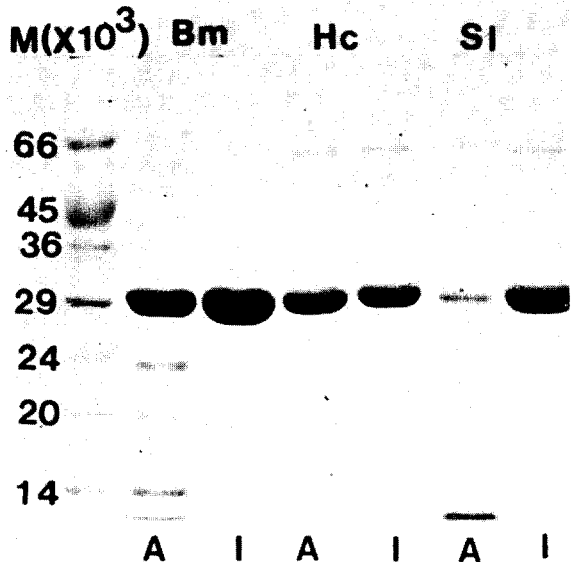


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of polyhedral proteins(Bm: BmNPV, Hc: HcNPV, SI: SINPV, M: M.W. standard, A: polyhedral proteins without inactivation of the alkaline protease, I: polyhedral proteins for 2hr at 70°C).

만든 1% agarose를 부어 3mm의 두께로 굳힌 다음 직경 3mm 항원 well을 만들고 그것으로부터 간격을 5mm로 하여 항체 well을 만들어 시험용기로 사용하였으며 well당 30 μ l의 항원 및 항체를 넣은 다음 20°C로 고정된 恒溫·恒濕器에서 24時間 定置하여 沈降線을 形成시켰다.

多角體 蛋白質의 Western blot分析

多角體 蛋白質의 Western blot 분석(Towbin 1979)은 精製된 多角體 蛋白質을 上記와 같은 방법으로 SDS-PAGE한 gel로부터 多角體 蛋白質을 nitrocellulose filter로 Western blotting buffer (24mM Tris, 192mM glycine, 20% methanol)에서 electrophoretic blotting한 후, nitrocellulose filter를 1% bovine serum albumin으로 blocking시켜 順수하게 調製한 多角體 蛋白質 抗體를 TBST buffer(10mM Tris-HCl, pH8.0, 100mM NaCl, 0.05% Tween 20)로 100배 희석하여 primary antibody로 anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate를 secondary antibody로 결합시켰으며, 染色溶液으로 alkaline phosphate 용액(100mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂) 15ml NBT (nitro blue tetrazolium, 50 μ g/ml in 70% dimethylformamide) 99 μ l와 BCIP(5-bromo-4-Chloro-3-indolylphosphate, 50 μ g/ml in 70% dimethylformamide) 50 μ l를 잘 섞어 發色시켰으며, 反應停止는 증류수로 했다.

結果 및 考察

多角體 蛋白質 電氣泳動

宿主昆虫 由來의 alkaline protease를 70°C에서 不活化與否에 따른 SDS-PAGE한 결과(그림 2)는 3種間분자량이 거의 유사하여 BmNPV의 경우 30kd, SINPV와 HcNPV는 31kd. 單一 major 多角體 蛋白質 밴드와 多角體 蛋白質의 重合體(polymer)로 생각되는 kd, 66kd 밴드들을 관찰할 수 있었다. 특히 alkaline pratease를 不活化시키지 않은 경우 多角體 蛋白質이 분해된 것으로 보이는 多數의 低分子量 밴드들을 관찰할 수 있었다.

지금까지의 보고에 의하면 major 多角體 蛋

白質은 분자량이 28—33kd인 것으로 밝혀져 있다. 이에 Summers 등(1978)은 6種 NPV의 多角體 蛋白質을 SDS-PAGE 분석한 결과 분자량 27—31kd의 單一 subunit이며 분자량이 이것보다 큰 것은 單一 subunit가 鋳화력에 의해 결합된 重合體(polymer)이며, 低分子量의 밴드들은 單一 subunit가 분해되어 나타나는 것이라고 하여 本實驗의 SDS-PAGE 결과와 일치한다.

또한 不活化 과정을 생략한 SINPV 多角體를 알칼리 溶液 처리시간에 차이를 두고 上記와 같은 방법으로 SDS-PAGE한 결과(그림 3), 알칼리 처리시간이 경과함에 따라서 alkaline protease 活性에 의해 多角體 蛋白質이 低分子化됨이 뚜렷하였으며, 일정한 pattern이 관찰되었다.

Alkaline protease는 多角體 蛋白質뿐만 아니라 버리온蛋白質도 분해한다고 하였으며(Yamafuji 등 1960, Payne & Kalmakoff 1978, Wood

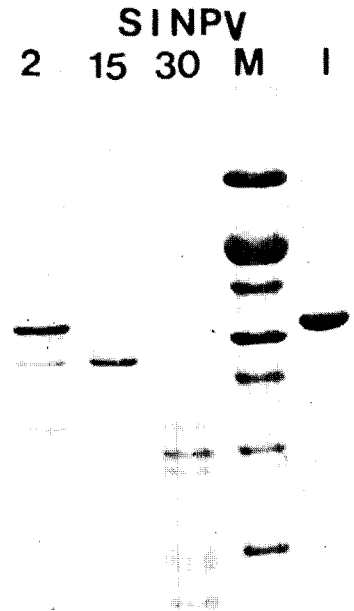


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of SINPV polyhedral proteins which were prepared from solubilized polyhedra in alkaline solution (pH 10.9) with various treating times(SI : SINPV polyhedral proteins, numbers: treating times(min.), M : M.W. standard, I : SINPV polyhedral proteins from alkaline protease inactivated condition).

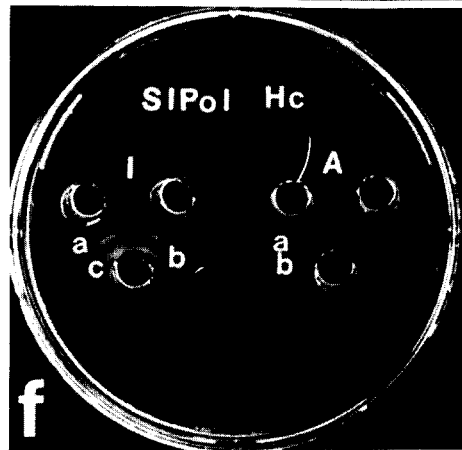
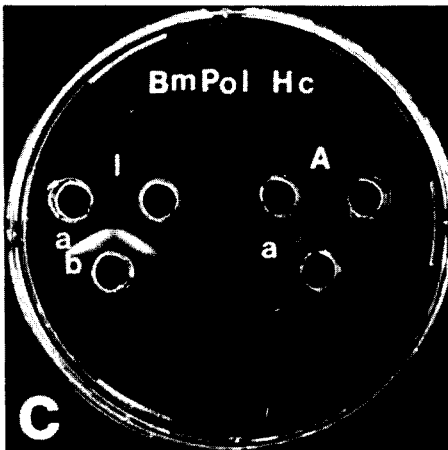
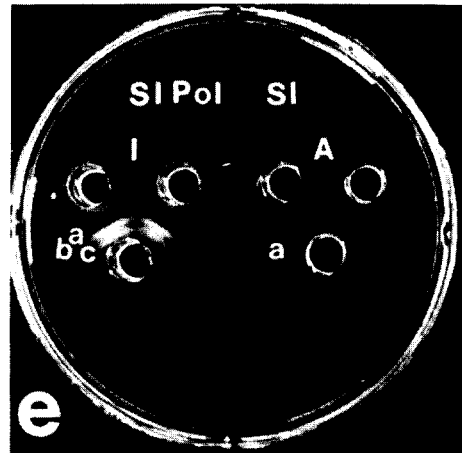
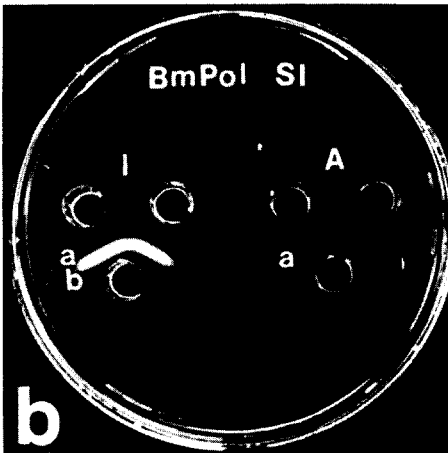
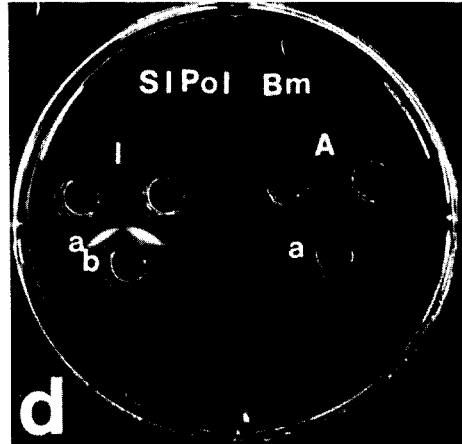
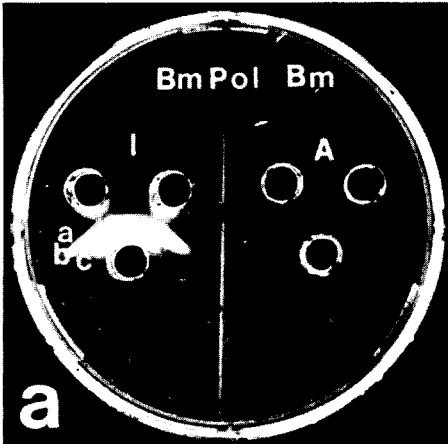


Fig. 4. Immunodiffusion of polyhedral protein. Bm NPV polyhedral protein antiserum(BmPol) was reacted with equivalent concentrations of undegraded (protease inactive: I) and degraded(protease active: A) polyhedral proteins. Precipitation lines were made by incubation for 24hr at room temperature. (Bm : BmNPV polyhedral proteins, SI : SINPV polyhedral proteins, Hc : HcNPV polyhedral proteins).

Fig. 5. Immunodiffusion of polyhedral protein. SINPV polyhedral protein antiserum (SIPol) was reacted with equivalent concentrations of undegraded (protease inactive: I) and degraded(protease active: A) polyhedral proteins.

1980), Nagata와 Tanada(1983)는 alkaline protease, 多角體 分離過程中 幼虫의 消化液으로부터 汚染되는 것으로 感染虫의 消化管을 제거함으로써 protease가 汚染되지 않은 多角體를 분리할 수 있다고 보고했고, 이 alkaline protease는 Hg^{2+} 와 Cu^{2+} ion으로 不活化가 가능하며, (Eppstein & Thoma 1975), Summers(1975)는 diisopropyl fluorophosphate로 不活化할 수 있어 serine-prateose type이라고 했다.

多角體 蛋白質의 血清學的 比較

순수하게 조제한 BmNPV와 SINPV 多角體 蛋白質 抗體를 사용하여 3種의 多角體 蛋白質에 대하여 二重免疫擴散法을 행한 결과, BmNPV 多角體 蛋白質 抗體를 사용한 경우 alkaline pratease를 不活化한 多角體 蛋白質은 같은

種의 抗原인 BmNPV에는 3개의 沈降線, SINPV와 HcNPV에서는 2개의 沈降線이 形成되었으며, alkaline protease를 不活化하지 않은 3種의 多角體 蛋白質 역시 모두 沈降線은 형성하였으나 反應정도가 미약하였다(그림 4의 a-c).

SINPV 多角體 蛋白質 抗體를 사용한 결과는 alkaline protease를 不活化한 多角體 蛋白質의 경우 같은 抗原인 SINPV와는 3개의 沈降線, BmNPV와는 2개의 沈降線, HcNPV와는 3개의 沈降線이 형성되었고, alkaline protease를 不活化하지 않은 3種의 多角體 蛋白質과도 모두 沈降線은 형성하였으나 역시 alkaline protease를 不活化시킨 경우보다는 反應 정도가 弱하게 나타났다(그림 5의 d-f).

多角體 蛋白質이 單一 폴리펩티드로 구성되었음을 고려할 때 위의 결과에서 2-3개의 沈降線

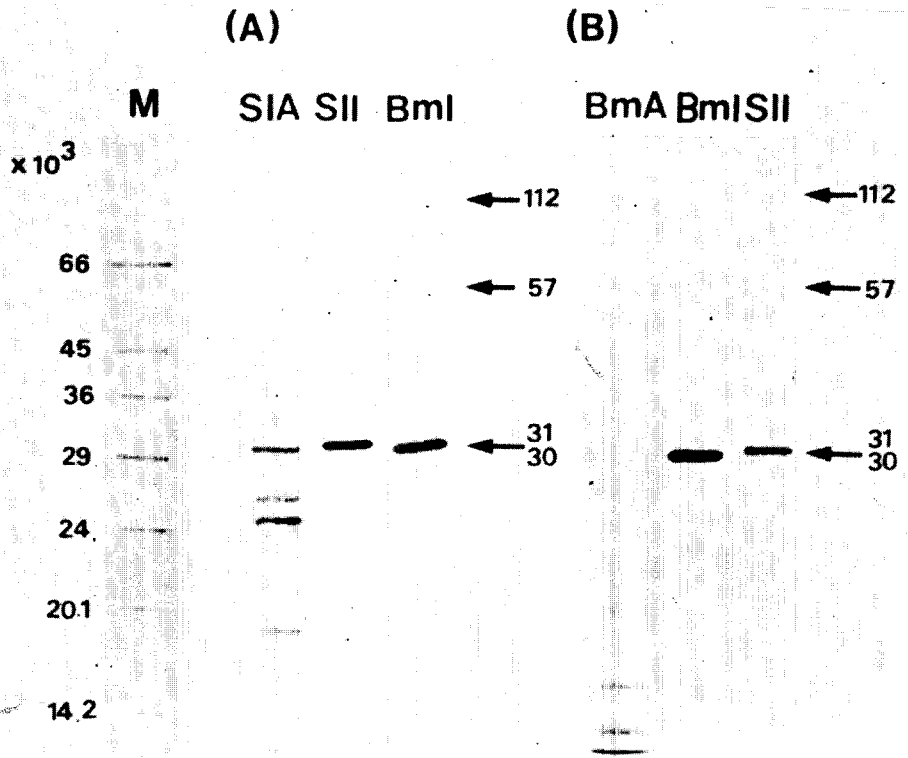


Fig. 6. Western blot analysis of polyhedral proteins. BmNPV and SINPV polyhedral proteins, under protease inactivated(I) and activated(A) condition, were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose filter. SINPV(panel A) and BmNPV(panel B) polyhedral protein antisera were used for primary antibody, anti-rabbit IgG alkaline phosphate conjugate for secondary antibody.

이 형성된 것은 多角體蛋白質間의 親和力에 의해 생긴 重合體(polymer)와 반응했기 때문일 것으로 생각되며, alkaline protease를 不活化하지 않은 多角體蛋白質과의 반응이 미약한 것은 多角體 蛋白質이 alkaline protease에 의해 분해되면서 antigenic determinants가 소멸된 것으로 생각된다.

多角體 蛋白質의 Western blot 分析

SDS-PAGE한 gel로부터 BmNPV와 SINPV 多角體 蛋白質을 nitrocellulose filter로 electrophoretic blotting시킨 후 多角體 蛋白質抗體 및 secondary 抗體로 반응시킨 Western blot 分析 결과는 BmNPV 多角體 蛋白質 抗體를 사용했을 때 BmNPV와 SINPV 多角體 蛋白質 30—31kd major band에서 반응이 뚜렷하였으며, SINPV 多角體 蛋白質 抗體를 사용했을 때에도 Bm과 SINPV 多角體 蛋白質 30—31kd major band에 뚜렷한 반응을 보였다(그림 6).

이는 Knell 등(1983)과 Smith 등(1981)이 보고한 血清學的으로 관계있는 Baculovirus group의 공통 antigenic determinants의 존재에 기인되는 것으로 생각된다.

Alkaline protease를 不活化시킨 BmNPV와 SINPV 多角體 蛋白質에서 單一 폴리펩티드로 구성되었음에도 분자량 57kd와 coomassie blue 染色으로는 잘 나타나지 않던 112kd의 밴드에도 반응이 나타남을 볼때 多角體 蛋白質間의 親和力에 의해 생긴 重合體(polymer)임을 알 수 있고, 이는 그림 4, 5의 二重免疫 擴散法에서 나타난 2—3개의 沈降線 형성과 관계있는 것으로 생각된다. 또한 alkaline protease를 不活化시키지 않은 경우에는 그림 2, 3의 결과와 일치하는 低分子량의 밴드들과도 반응하여(Hormann & Faulkner 1983) alkaline protease의 活性에 의해 30, 31kd major 多角體 蛋白質이 분해됨을 인정할 수 있었다.

또 이상의 alkaline protease 不活化 여부에 따른 실험들로 볼때 alkaline protease가 多角體 蛋白質의 분해 뿐만 아니라 重合體 形成阻害에도 관계가 있는 것으로 추측된다.

아울러 앞으로 계속 宿主昆蟲에서 生産된 多

角體에 있어서 alkaline protease의 生物學的 機能, 酵素學的인 특성 및 宿主昆蟲에 따른 alkaline protease의 活性關係 등이 연구되어야 하겠다.

引用 文 獻

- Eppstein, D.A. & J.A. Thoma. 1975. Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infecting the cabbage looper. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62 : 478—484.
- Gröner, A., R.R. Granados & J.P. Burand. 1984. Interaction of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with two nonpermissive cell lines. *Intervirology.* 21 : 203—209.
- Hormann, A.W. & P. Faulkner. 1983. Monoclonal antibodies to baculovirus structural proteins: determination of specificities by western blot analysis. *Virology.* 125 : 432.
- Ignoffo, C.M. 1973. Effects of entomopathogens on vertebrates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 217 : 141—172.
- Knell, J.D., M.D. Summers & G.E. Smith. 1983. Serological analysis of 17 baculoviruses from subgroups A and B using protein blot immunosay. *Virology.* 125 : 381.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature(London).* 227 : 680—685.
- Maeda, S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Soto & M. Furusawa. 1985. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature.* 315 : 592—594.
- Maruniak, J.E., M.D. Summers, L.A. Falcon & G.E. Smith. 1979. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural proteins compared from *in vivo* and *in vitro* sources. *Intervirology.* 11 : 82—88.
- Matthews, R.E.F. 1982. Classification of nomenclature of viruses. *Intervirology.* 17 : 1—200.
- McCarthy, W.J. & R.A. DiCapua. 1979. Characterization of solubilized proteins from tissue culture and host-derived nuclear polyhedra of *Lymantria dispar* and *Autographa californica*. *Intervirology.* 11 : 174—181.
- Miller, L.K., A.J. Ling & L.A. Bulla. 1983. Bacterial, viral, fungal insecticides. *Science.* 219 : 715—721.
- Nagata, M. & Y. Tanada. 1983. Origine of alkaline protease associated with the capsule of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*(Haworth). *Arch. Virol.* 76 : 245.
- Naser, W.L. & H.G. Miltenburger. 1983. Rapid baculovirus detection identification, and serological

- classification by Western blotting-ELISA using a monoclonal antibody. *J. Gen. Virol* 64 : 639—647.
- Ouchterloney, O. 1968. Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann. Arbor Science Publications. Michigan.
- Payne, C.C. & J. Kalmakoff. 1978. Alkaline protease associated with virus particles of a nuclear polyhedrosis virus: assay, purification, and properties. *J. Virol.* 26 : 84—92.
- Pennock, G.D., C. Shoemaker & L.K. Miller. 1984. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Mol. Cell. Biol.* 4 : 399—406.
- Reingaum, C. 1984. PAGE of baculovirus protein: A simplified and sensitive modification for differentiating between isolates. *J. Invertebr. Pathol.* 44 : 134—139.
- Smith, G.E. & M.D. Summers. 1981. Application of a novel radiomunoassay to identify baculovirus structural protein that share interspecies antigenic determinants. *J. Virol.* 39 : 125.
- Smith, G.E., M.D. Summers & M.J. Fraser. 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* 3 : 2156—2165.
- Summers, M.D., R. Engler, L.A. Falcon & P.V. Vail. 1975. Baculoviruses for insect pest control: Safety considerations. American society for microbiology. Washington. D.C.
- Summers, M.D. & G.E. Smith. 1975. *Trichoplusia ni* granulosis virus granulin: a phenol-soluble, phosphorylated protein. *J. Virol.* 16 : 1108.
- Summers, M.D. & G.E. Smith. 1978. Baculovirus structural polypeptides. *Virology.* 84 : 390—402.
- Tinsley, T.W. 1978. Use of insect pathogenic viruses as pesticidal agents. p.199—210. Perspectives in virology Vol. 10. Raven Press. New York.
- Tjia, S.T., G.M. Schildesche & W. Doerfler. 1983. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA does not persist in mass cultures of mammalian cells. *Virology.* 125 : 107—117.
- Towbin, H.R., R. Stachelin & J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 : 4350—4354.
- Wood, H.A. 1980. Protease degradation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus protein. *Virology.* 103 : 392—399.
- Yamafuji, K., J. Mukai & F. Yoshihara. 1960. Deoxyribonuclease and protease in polyhedral viral particles. *Enzymologia.* 22 : 1.

(1988년 11월 30일 접수)