

## 재조합 백신시아 바이러스를 이용한 단백질 생산을 위한 숙주 동물세포의 배양 조건 최적화

이 두 훈 · †박 정 극  
동국대학교 공과대학 화학공학과

### Optimization of Host Animal Cell Culture Conditions to Produce Protein Using Recombinant Vaccinia Virus

Doo Hoon Lee and Jung Keug Park<sup>†</sup>

Dept. of Chemical Engineering, College of Engineering, Dongguk Univ., Seoul 100-715, Korea

#### ABSTRACT

Using recombinant Vaccinia virus (vSC8) that express  $\beta$ -galactosidase, a model heterologous protein, conditions for virus and protein production were investigated in tissue culture flask. As host animal cells HeLa and HeLa S3 were used. It was demonstrated that cells infected during the exponential growth phase gave higher protein yield than those infected during the stationary growth phase and calf serum concentration after virus infection did not significantly alter protein yield. Pretreatment of cell layer with hypotonic solution enhanced the virus infectivity. Optimum cell growth and recombinant protein production was achieved at 37°C. But, during 2 hours of virus infection period incubation temperature must be lowered to 20~30°C for maximum recombinant protein yield. To enhance virus replication, the effects of adrenal glucocorticoid hormone (Dexamethasone) and silkworm hemolymph were evaluated. Only dexamethasone increased about 20% of  $\beta$ -galactosidase yield in HeLa S3 cells when added with  $10^{-7}$ ~ $10^{-9}$ M concentration 24 hours before infection.

#### 서 론

Vaccinia virus는 orthopox virus genus의 double strand DNA virus로서 1980년까지 같은 genus의 Variola virus에 의한 질병인 천연두의 예방백신으로 쓰여왔다. 1980년대 초부터 Vaccinia virus가 이상적인 발현 vector로 쓰이게 되었는데 그 이유는 25,000 base pair 이상의 외부 DNA를 안정하게 삽입이 가능하고 (1) 세포질에서 복제가 이루어지기

때문에 숙주 genome의 간섭없이 유전자 발현이 가능하고 비교적 높은 단백질 합성 수준을 보유하고 있으며 또한, 완전한 post-translational modification이 일어나기 때문이다 (2-4). 이러한 유용성으로 인하여 재조합 백신으로의 연구가 매우 활발하다 (5). Chillakuru (6) 등은 부유성 세포주인 HeLa-S3 세포를 숙주세포로 사용하여 Rinderpest virus F gene을 발현하는 재조합 Vaccinia virus를 4 L 회분식 생물반응기에서 생산한 바 있고, 또 Barrett (7) 등은 부착성 동물세포주인 Vero를 미립담체를 이용한 40 L 생물반응기에서 대량배양한 후 재조합

<sup>†</sup> Corresponding Author

Vaccinia virus를 감염시켜 human immunodeficiency virus type-1의 full-length glycoprotein 160을 대량으로 생산하여 면역특성을 조사한 바 있다. 이와 같이 재조합 Vaccinia virus를 이용한 재조합 단백질 및 백신의 개발 등의 연구가 진행되고 있고, 또 동물세포를 숙주세포로 하여 다른 여러 가지 백신을 상업적으로 생산하고 있음에도 불구하고 분자생물학적인 측면의 재조합 Vaccinia virus 개발 (up-stream) 연구에 비하여 Vaccinia virus 대량 생산을 위한 배양 조건에 관한 연구는 매우 부족한 실정이다.

바이러스의 증식을 증대하기 위해서는 온도, pH, 혈청, 배지 등의 배양 조건이 먼저 최적화되어야 한다. 이러한 배양조건이 결정되어진 후에도 바이러스의 흡착이나 침투, 복제를 돕는 물질의 첨가나 처리 및 특수한 배양조건 등을 이용하여 바이러스의 생산을 늘리려는 연구가 계속되고 있다. 바이러스의 상업적 생산을 위한 것이기 보다는 주로 *in vitro*에서 증식이 어려운 Cytomegalovirus와 Murine mammary tumor virus 등의 용이한 감지와 연구를 위한 바이러스 stock을 얻기 위한 방향으로 바이러스 증식 증대 연구가 행해지고 있다. 그러나, 이러한 연구는 곧바로 상업적 바이러스 생산 증대에도 적용될 수 있기 때문에 많은 연구가 필요하리라 생각된다. 바이러스 증식을 증대하기 위한 노력은 대략 세가지로 분류될 수 있다. 첫째는 바이러스 흡착, 침투 단계의 효율을 높이려는 노력이고, 두번째는 배지 첨가물이나 hormone을 첨가하여 바이러스의 세포내 증식을 증대시키는 방법이고, 마지막으로 산소가 부족하거나 없는 배양 조건을 이용하여 바이러스의 증식을 증대하는 방법이다.

본 논문에서는 Vaccinia virus 및 재조합 단백질 생산을 위한 온도, 혈청 농도 등의 기본적인 세포 배양 조건을 최적화하였고 감염능 및 복제 증대를 위하여 세포 세척용액, 감염시 온도, pH 등의 영향과 DEAE-dextran, DMSO, EDTA, dexamethasone, 누에체액 등을 첨가하여 그 영향을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 세포주 및 바이러스주

숙주세포로는 HeLa (ATCC No. CCL 2, Epitheloid carcinoma, cervix, Human), HeLa S3 (ATCC No. CCL 2.2, Epitheloid carcinoma, cervix, Human), Vero (ATCC No. CCL 81, African green

monkey kidney cells)를 생명공학연구소 김익환 박사님으로부터 분양받아 사용하였으며 Vero는 virus plaque assay에 사용하였다. Virus주로는 *Escherichia coli*의  $\beta$ -galactosidase 유전자가 삽입된 재조합 Vaccinia virus(vSC8)를 고려대 안병윤 교수님으로부터 분양받아서 사용하였다.

### 배지, 혈청 및 누에체액

세포배양 배지는 powder 상태인 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, 4.5 g/L glucose; Gibco Co., U.S.A.), F-12(Gibco Co.)배지에 sodium bicarbonate(2.0g/L), HEPES(2.38g/L), 항생제(penicillin+streptomycin, 1000 Unit/L)를 첨가하여 사용하였다. 혈청(serum)은 calf serum (CS, Gibco Co.)을 사용하였는데 55 °C에서 30분 처리하여 성장억제물질을 inactivation시킨 후 10 (v/v) % 농도로 배지에 첨가하여 사용하였다. Virus 감염후에는 2.5 (v/v) %로 사용하였다. Virus 복제 증대를 위하여 사용된 누에체액은 성균관대학교 유전공학과 박태현 교수님으로부터 분주받아서 사용하였다.

### 세포배양 및 바이러스 감염

세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 배양기에서 25cm<sup>2</sup> tissue culture flask(25T-flask, Nunc), 6 또는 12 well plate(Nunc Co.)에서 배양하였으며 25T-flask에는 5mL, 6 well plate에는 well당 2mL, 12 well plate에는 well당 1mL의 배지를 사용하였다. 초기 접종 농도를 1×10<sup>5</sup> cells/mL로 하였으며 세포가 대수증식기이고 성장표면에 거의 다 자라는 시기인 배양시작 4일 경에 배지를 제거하고 PBS(phosphate buffered saline)로 한번 세척한 후 감염비(MOI, Multiplicity of infection) 5로 virus 용액을 첨가하였다. Virus 용액 첨가 후 30분마다 흔들어 주면서 2시간 동안 정처시켰다. HeLa는 감염후 60시간 경과후에, HeLa S3는 감염후 40시간 경과후 회수하였다. 각각의 시간은 최대 재조합 단백질 수율을 나타내는 시간으로서 실험에 의해서 결정된 것이다. Dexamethasone, DEAE-dextran, DMSO, Polybrene은 Sigma사로부터, EDTA는 Gibco사로부터 구입하여 virus 감염이나 복제 증대를 위해 사용되었다.

Virus 정량(Plaque assay) 및  $\beta$ -galactosidase activity 측정

Plaque assay용 숙주세포로는 Vero를 이용하였으며 12 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well 정도로 접종하고 표면을 완전히 덮는 시기인 배양 3일경 virus stock을 freezing-thawing을 이용하여 파쇄한 후 동량의 Trypsin-EDTA 용액을 첨가하여 virus를 분산시켰으며 혈청이 없는 배지로  $10^5 \sim 10^7$  배 희석하여 well 당  $200 \mu\text{L}$ 의 virus 용액을 넣고 30분마다 흔들어 주면서 두시간 동안 정치시킨 후 혈청이 2.5% 포함된 DMEM배지를  $800 \mu\text{L}$ 씩 넣어 주었다. 2일 경과후 상등배지를 제거하고 0.1% crystal violet 용액으로 세포를 염색하여 육안으로 plaque을 세어서 virus titre를 결정하였다.

재조합 Vaccinia virus에 의하여 발현되는  $\beta$ -galactosidase의 활성은 합성기질인 ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside(ONPG)를 분해하여 생성되는 o-nitrophenol을 420nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

## 결과 및 고찰

### T-flask에서의 세포 성장

Vaccinia virus 대량 생산을 위한 숙주세포로 부착성 세포주인 HeLa 와 비부착성 세포주인 HeLa S3를 선정하여 25T-flask에서 세포성장을 관찰하였다. HeLa는 배지로 DMEM을 사용하였고, HeLa

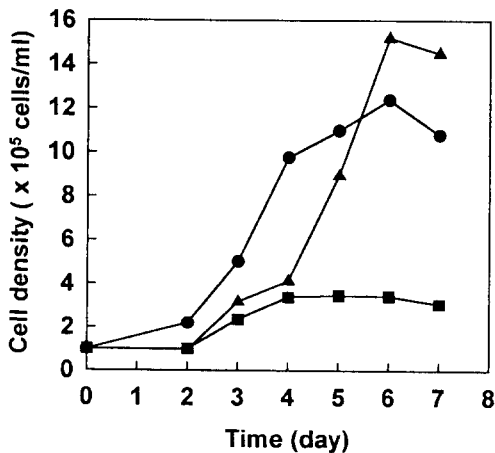


Fig. 1. Growth curve of host cells in 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flask.

●: HeLa-DMEM, ▲: HeLa S3-DMEM, ■: HeLa S3-F-12

S3는 비부착성 세포이지만 T-flask에서 정치배양하면 표면에 부착하여 성장한다. Fig. 1에서 보듯이 F-12에서의 성장이 매우 저조하여 이후의 실험은 DMEM배지를 사용하여 진행하였다. 배지는 모두 calf serum이 10% 포함된 것을 사용하였으며 T-flask당 5 ml의 배지를 넣어 배양하였다. 초기 세포 접종농도를  $1.0 \times 10^5$  cells/ml로 하여 배양한 결과 Fig. 1에서 보듯이 HeLa는 배양 6일 만에 최고세포농도인  $1.2 \times 10^6$  cells/mL에 도달하였고, HeLa S3는 배양 6일 만에  $1.5 \times 10^6$  cells/mL에 도달하였다. Vaccinia virus는 세포가 대수 증식기에 있을 때 감염하는 것이 높은 virus 수율을 얻을 수 있다는 많은 보고가 있다(6, 8). 따라서, 배양 4일경 virus를 감염하여 실험을 수행하였다.

Virus 증식 조건 최적화(감염비, 혈청농도, 온도, 감염시기)

일반적으로 virus의 대량생산에서는 숙주세포와 virus의 접종비에 따라 virus의 증식경향이 크게 달라지기 때문에 virus 감염비(MOI, multiplicity of infection)가 중요한 변수로 알려져 있다. Virus 감염비가 높은 경우 단시간내에 많은 virus가 숙주세포에 침입하므로 virus 증식으로 인한 숙주세포의 독성으로 세포농도가 급격히 감소하여 숙주세포내의 virus 증식 보다는 숙주세포 자체의 유지가 어려워 지므로 적당한 virus 감염비가 요구된다. Vaccinia virus의 경우 문헌마다 1(6), 2(7), 10(8) 등의 다른 감염비가 사용되고 있으며 배양 시스템의 종류 및 감염조건에 따라 영향을 받을 것으로 생각된다. T-flask에서의 적당한 감염비 선정을 위하여 감염비와 감염후 시간에 따른 재조합 단백질의 수율을 관찰하였다. Fig. 2에서 나타나듯이 감염비와 감염 후(PI, post infection) 시간에 따라 virus와 재조합 단백질인  $\beta$ -galactosidase의 수율에 많은 차이가 있다. HeLa S3를 이용한 부유배양(6)의 경우는 0.01~1000 범위의 감염비에서 최종수율에는 큰 변화가 없었으나 감염비 1을 최적 조건으로 보았으며, 본 배양 시스템(T-flask)의 경우 감염비가 높을수록  $\beta$ -galactosidase의 최종 수율 또한 증가하였다. 그러나 그 증가 폭은 줄어드는 경향을 보이므로 이후의 실험에서는 감염비 5로 실험하였다. HeLa S3의 경우 감염 후 40시간 이후 부터는 오히려  $\beta$ -galactosidase의 양이 감소하는 경향이 나타난다. 따라서, 숙주세포의 배양 방법이나 조건에 따라 최적 회수 시간을 결정해야 한다는 것을 알 수 있다. HeLa는

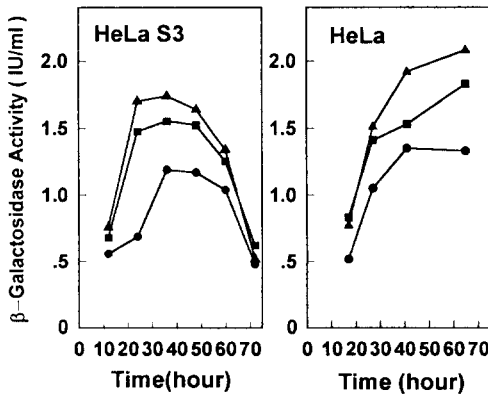


Fig. 2. Effect of virus infection ratio on  $\beta$ galactosidase yield in HeLa S3 and HeLa cells.

● : MOI 1, ■ : MOI 5, ▲ : MOI 10.

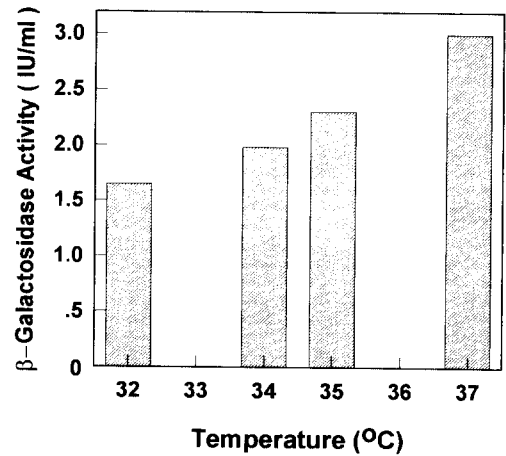


Fig. 4. Effect of incubation temperature of post infection on  $\beta$ galactosidase yield in HeLa cells.

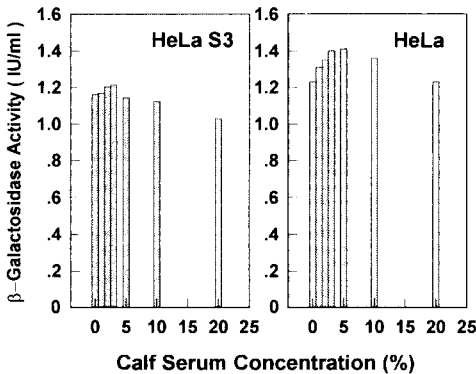


Fig. 3. Effect of serum concentration on  $\beta$ galactosidase yield in HeLa S3 and HeLa cells.

감염후 60시간 경과후에, HeLa S3는 감염후 40시간 경과후 회수하였다.

세포배양시 혈청의 사용농도가 높을수록 세포성장 증가하는 반면 세포에 virus가 감염된 후 숙주 세포의 유지, 성장 및 virus의 증식 정도가 사용혈청의 농도에 따라 달라질 것으로 생각된다. HeLa, HeLa S3의 감염 후 혈청농도의 영향을 Fig. 3에 나타내었다. 감염 후의 혈청농도는  $\beta$ galactosidase 수율에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 오히려 5% 이상의 농도에서는  $\beta$ galactosidase 수율이 약간 떨어지는 경향을 보였다. 혈청의 비용이 전체 virus 생산비용의 많은 부분을 차지하는 것을 감안하면 이러한 현상은 상당히 유리한 조건으로

생각된다.

세포 성장은 37°C에서 가장 좋은 반면 virus는 배양온도의 변화에 따라 virus 고유의 성질, 증식관련 효소 활성 등이 영향을 받게 되리라 생각된다. Virus에 의한 세포내 봉입체 형성을 증대하기 위하여 배양온도를 낮추거나(9), Varicella-Zoster virus에서 32°C로 배양온도를 낮추어 cell free virus의 수율이나 plaque assay 효율을 높이기도 하였다(10). HeLa cell에서의 virus감염후 온도 영향을 Fig. 4에 나타내었다. 온도에 상관없이 virus 감염후 60시간 경과 후 부터는 단백질 수율에 거의 변화가 없었다. 낮은 온도에서 배양하는 것은 본 vaccinia-HeLa system에서는 효과가 없으며 세포 성장에 적당한 온도인 37°C를 유지시키는 것이 재조합 단백질 생산에도 적합한 것으로 나타났다. 37°C에서의  $\beta$ galactosidase의 수율이 앞의 Fig. 2, 3에서의 최대수율과 차이가 나는 것은 세포농도나 감염시기, 효소활성도 측정 등의 실험 set마다의 조건차이에 의한 오차로 생각되며 절대적인 양보다는 비교군과의 상대적 차이를 중요시하였다.

Vaccinia virus는 세포가 대수 증식기에 있을 때 감염하는 것이 높은 virus 수율을 얻을 수 있다는 많은 보고가 있다(6, 8). Fig. 5는 virus 감염시기에 따른 재조합 단백질 수율의 변화이다. 배지 부피당  $\beta$ galactosidase의 양은 세포 배양 3~5일 정도에서 모두 비슷하였지만  $10^6$  세포당의  $\beta$ galactosidase의 양은 초기 대수 증식기인 배양 3일째가 가장 높았다. 이 결과는 전체적인 virus 생산공정에서 보

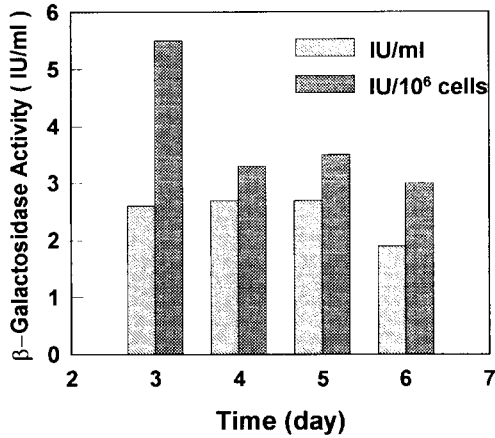


Fig. 5. Effect of virus infection time on  $\beta$ -galactosidase yield in HeLa cells.

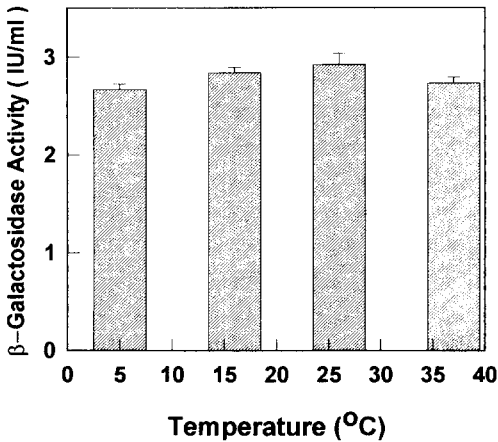


Fig. 6. Effect of incubation temperature during virus infection on  $\beta$ -galactosidase yield in HeLa cells.

면 virus 감염 시기의 결정과 배양 기간 단축을 위한 중요한 자료라 생각된다. 즉, 배지를 매일 교체해야 하는 고농도 배양 공정의 경우 배양기간의 연장은 배양 배지의 추가적 소비를 의미하므로 배양기간의 단축으로 생산비용을 절감할 수 있을 것이다.

Virus 감염능 증대 실험

세포배양 온도와는 무관하게 virus 감염시의 온도는 하나의 중요한 인자가 될 수 있다. virus의 감염 초기 단계인 흡착 및 침투는 매우 민감한 단계이므

로 비록 짧은 기간이지만 이 기간 동안의 감염 조건이 virus의 최종 생산에 큰 영향을 미칠 수 있다. 감염시 영향을 미치는 환경 조건은 여러가지가 있을 수 있지만 그중 온도와 pH는 바이러스의 안정성에 관여하는 중요한 조건이다. Virus 감염시에만 온도를 4°C까지 낮추어 감염을 증대시킨 보고가 있다(11). Vaccia virus의 경우 약 2시간의 감염 시간을 필요로 하며 최적 온도와 pH의 결정이 필요할 것으로 생각된다. Fig. 6에 감염시 온도에 따른 재조합 단백질의 수율을 나타내었다. 약 26°C 정도에서 최대의 수율을 나타내었다. 이 결과가 온도의 영향일 수도 있으나 37°C 공기중에서 pH가 7.2인 DMEM배지가 4°C로 온도가 내려가면 pH가 7.6까지 올라가므로 pH의 변화로 나타난 영향일 수도 있을 것으로 생각되어 virus 용액의 pH를 HCl 0.05N DMEM과 NaOH 0.05N DMEM으로 조절하여, pH에 따른 재조합 단백질의 수율 변화를 조사해 보았지만 pH 6.7~8.8 범위에서는 영향을 받지 않았다. 따라서 Fig. 6의 결과는 순수하게 온도에 의한 영향일 것으로 생각된다.

일반적으로 Virus를 감염하기 전 혈청성분을 제거하기 위하여 세포층을 등장용액(Balanced salt solution)으로 세척을 한다. 등장용액의 종류에 따라 사용된 염의 종류가 다르기 때문에 그에 따라 virus의 감염 정도도 변하게 된다. 또한, 이온 농도에 따라서도 감염 속도가 다르다는 보고가 있다(6). Fig. 7은 PBS를 사용한 경우의 세포층 세척 여부 및 세척시 이온농도의 변화에 따른 결과이다. 높은 이온농도는 PBS에 추가로 NaCl을 첨가하여 조절하였으

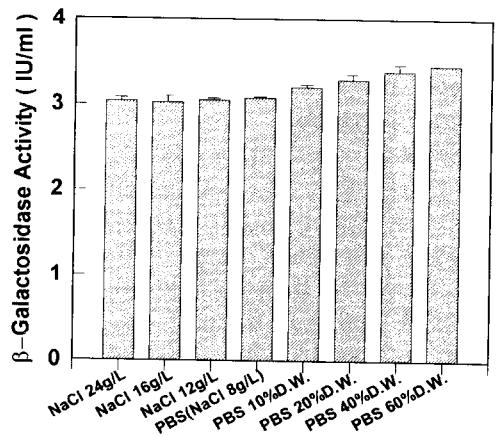


Fig. 7. Effect of ionic strength of washing buffer on  $\beta$ -galactosidase yield in HeLa cells.

낮은 경우는 PBS를 deionized water로 희석하여 각각 20분간 처리한 결과이다. 이온 농도가 낮을수록 감염능이 증가하는 경향을 나타냈다. 이것은 세포막이 낮은 이온 농도에 의해 팽창하는 등의 변화를 일으켜 virus 흡착 및 침투를 촉진한 것으로 생각된다.

세포와 바이러스의 전기적 상호작용을 돕는 물질로 DEAE-dextran과 같은 폴리양이온을 바이러스 감염시 처리하거나(12, 13) DMSO 같은 용매로 세포막을 변화시켜 바이러스 침투를 촉진하기도 한다(14). Vaccinia-HeLa system에서는 chloroquine(6), polybrene(7) 등을 사용하기도 하였으나 큰 영향은 나타내지 못하였다. Vaccinia virus의 감염 및 세포막 침투 기작이 명확히 밝혀지지 않았지만 세포막의 특정 receptor와의 상호작용이라고 알려져 있다(15). 본 시스템에서는 virus의 흡착 및 침투를 돕기 위하여 DEAE-dextran(감염후, 1~20 $\mu$ g/mL), DMSO(감염후, 0.5~4%로 4시간), EDTA(감염후, 0.05~1.0mM), Polybrene(감염시와 감염후, 1~40 $\mu$ g/mL) 등을 virus 감염시 또는 감염후에 처리하였으나 영향을 미치지 못하거나 오히려  $\beta$ -galactosidase 수율이 떨어지는 영향을 나타내었다. 이 결과로 보아 전기적 상호작용 등으로 인하여 virus 감염이 저해되지는 않으며 DMSO에 의한 세포막의 변화는 virus 감염에 영향을 없는 것으로 생각된다.

#### Virus 복제의 증대 실험

바이러스 복제를 조절하는 물질로는 dexamethasone이나 cortisol같은 glucocorticoid hormone류가 주로 사용되고 있다. Dexamethasone은 항 염증성의 부신피질 steroid로서 0.01 $\mu$ g/mL의 낮은 농도에서도 mouse fibroblast cell의 성장을 억제하기도 하며(16) murine mammary tumor virus(17), herpes simplex virus(18), cytomegalovirus(19) 등의 증식이나 plaque 생성능력을 증가시키는 역할을 한다고 한다. 이러한 hormone의 역할은 virus strain, cell line에 따라 모두 다르게 작용하는 것으로 알려져 있기 때문에(20) 바이러스와 숙주세포 각각의 종류에 따른 영향을 조사할 필요가 있다. Virus 감염 하루 전 ethanol에 녹인 dexamethasone(Sigma Co.)을  $10^{-5}$ ~ $10^{-7}$ M로 희석하여 배지를 교체하였다. 이때, 같이 포함되는 ethanol의 영향을 보기 위하여 동량의 ethanol을 포함하는 배지도 제조하여 하루전에 같이 처리하였다. Dexametha-

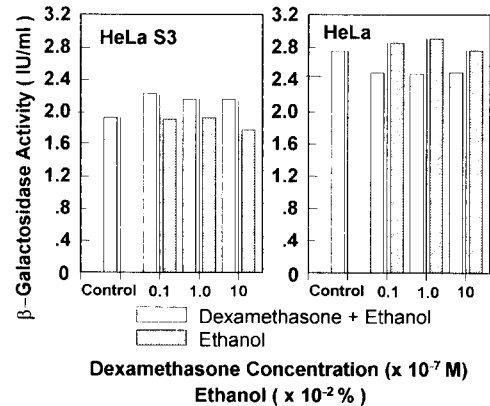


Fig. 8. Effect of dexamethasone concentration on  $\beta$ -galactosidase yield in HeLa and HeLa S3 cells.

sone에 의한 세포성장의 저해나 증가는 실험결과 나타나지 않았다. 재조합 단백질 수율에 대한 효과를 Fig. 8에 나타내었다. HeLa S3의 경우 ethanol 0.1%에서는  $\beta$ -galactosidase의 수율이 조금 떨어진 것을 볼 수 있으나 그 보다 낮은 농도에서는 그 영향이 없는 것으로 보이며 dexamethasone이 포함된 경우에 약 20%의  $\beta$ -galactosidase 수율 증가를 보였다. 반면에 HeLa의 경우는 오히려 수율이 떨어지는 현상을 나타내었다.

누에체액은 곤충세포에서의 단백질 생산에 큰 효과를 나타낸 것으로 저렴한 혈청 대체 물질로 연구되고 있다(21). 누에체액을 바이러스 감염후 첨가하였을 때의 영향을 Fig. 9에 나타내었다. Calf serum의 영향과 거의 비슷한 경향을 보였으며 이것은 누에체액이 동물세포 배양시에도 경우에 따라 사용될 수 있다는 가능성을 보여준 것으로 생각된다. 약 3% 정도에서 최대 수율을 나타내었다.

그밖에, vaccinia virus 감염시 glucose 섭취 속도가 급격히 증가한다는 보고(6)가 있어 glucose의 고갈이 일어나는 지를 확인해 보았으나 DMEM 배지의 glucose 농도 보다 낮은 농도인 3.15g/L에서도 고갈은 일어나지 않는 것으로 나타났으며, 세포 내 과산화물을 환원시켜 세포 독성을 제거함으로써 virus의 복제를 증대시키려는 목적으로 ascorbic acid를 첨가하였으나 영향이 없었다.

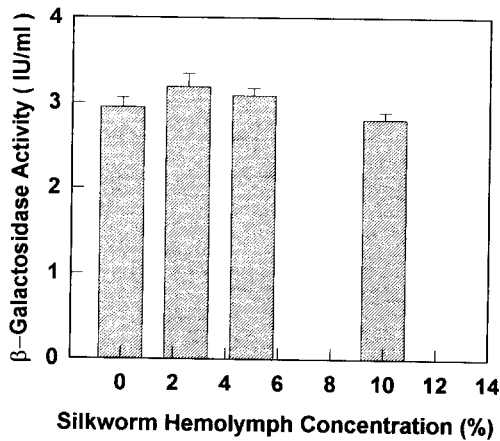


Fig. 9. Effect of silkworm hemolymph concentration on  $\beta$ -galactosidase yield in HeLa cells.

### 요 약

모델 재조합 단백질인  $\beta$ -galactosidase를 발현하는 Vaccinia virus를 생산하기 위하여 숙주 동물세포의 배양조건을 관찰한 결과 감염비 5일 경우 HeLa는 감염후 60시간 후, HeLa S3는 감염후 40시간 후에 회수할 때 최대의  $\beta$ -galactosidase 수율을 얻을 수 있으며, 세포가 대수증식기 일 때 감염하고 배양온도는 37°C로 하는 것이 최적 배양조건으로 나타났다. 감염후 혈청의 농도는 단백질 수율에 크게 영향을 미치지 않는 3~5%에서 가장 높은 단백질 수율을 보였으며, 낮은 이온 농도의 용액으로 세포층을 세척하는 것과 virus 감염시 온도를 20~30°C로 낮추는 것은 Vaccinia-HeLa system에서 감염능 증대 효과를 나타내었다. Dexamethasone 전처리하는 HeLa S3에서 virus 복제 증대를 HeLa에서는 virus 복제 감소를 가져왔다.

### 감 사

본 연구는 생물공정연구센터의 연구비 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

- G. L. Smith and B. Moss(1983), *Gene*, **25**, 21.
- G. L. Smith, M. Mackett, and B. Moss(1983),

- Nature*, **302**, 490.
- E. Paoletti, B. R. Lipinskas, C. Samsonoff, S. Mercer, and D. Panicali(1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 193.
- D. Panicali, S. W. Davis, R. L. Weinberg, and E. Paoletti(1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5364.
- B. Moss(1991), *Science*, **252**, 1662.
- R. A. Chillakuru, D. D. Y. Ryu, and T. Yilma (1991), *Biotechnol. Prog.*, **7**, 85.
- N. Barrett, A. Mitterer, W. Mundt, J. Eibl, M. Eibl, R. C. Gallo, B. Moss, and F. Dorner (1989), *AIDS Res. & Hum. Retroviruses*, **5**, 159.
- A. Mukhopadhyay, S. N. Mukhopadhyay, and G. P. Talwar(1994), *J. Biotech.*, **36**, 177.
- W. F. Scherer and J. T. Syverton(1954), *Am. J. Path.*, **30**, 1057.
- C. Grose and P. A. Brunell(1978), *Infect. Immun.*, **Jan**, 199.
- C. E. Smull and E. H. Ludwig(1961), *J. Bacteriol.*, **84**, 1035.
- R. H. Schloemer and R. R. Wagner(1975), *J. Virol.*, **15**(4), 882.
- K. Toyosima and P. K. Vogt(1969), *Virology*, **38**, 414.
- P. G. West and W. W. Baker(1990), *J. Clin. Microbiol.*, **28**(8), 1708.
- L. G. Payne and E. Norrby(1978), *J. Virol.*, **97**, 19.
- A. G. Ruhmann and D. L. Berliner(1965), *Endocrinology*, **76**, 916.
- W. P. Parks and E. M. Scolnick(1973), *Science*, **184**, 158.
- P. G. West and B. Aldrich(1989), *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 770.
- J. Tanaka, T. Ogura, S. Kamiya, T. Yoshie, Y. Tabuki, and M. Hatano(1984), *Virology*, **136**, 448.
- J. Costa, C Yee, T. Troost, and A. S. Rabson (1974), *Nature*, **252**, 745.
- 하성호, 이성환, 박태현(1995), *한국생물공학회지*, **10**(3), 317.