韓蠶學誌 38(1), 53~56(1996)
Korean J. Seric. Sci.
<短 報>

*Bombyx mori*세포주와 *Spodoptera frugiperda*세포주의 분자생물학적 표식자

진병래 · 제연호 · 강석권
서울대학교 농업생명과학대학 농생물학과

The Molecular Biological Marker in *Bombyx mori* and *Spodoptera frugiperda* Cells

Byung-Rae Jin, Yeon-Ho Je and Seok-Kwon Kang
Department of Agricultural Biology, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National Univeristy, Suwon 441-744, Korea

Abstract

To investigate the molecular biological marker in insect cells, BmN-4 and Sf-9 cells were analysed by SDS-PAGE and random amplification of polymorphic DNA. The results showed that the patterns of total cell protein and random amplification of polymorphic DNA were distinguished between BmN-4 and Sf-9 cells, suggesting that the unique major bands were useful as molecular biological marker in BmN-4 and Sf-9 cells.

Key words : *Bombyx mori, Spodoptera frugiperda,* molecular biological marker

서 론

곤충세포주는 baculovirus 발현벡터 시스템에서 뿐만아니라 곤충생리 · 생화학, 독성학, 분자생물학, 세포생물학 및 병리학 등에 중요한 연구수단으로서 이용되고 있으나, 세포주 확보면에서 상당히 제한되어 있다. Baculovirus 발현벡터 시스템에 있어서 곤충세포주는 중요한 요소로, 발현코자 하는 외래유전자가 도입된 재조합 바이러스 작성에 필수적이며, 발현기구로도 중요하다. 현재 발현 수준뿐만아니라 안정성, 용이성, 생물학적 활성 및 면역학적 특성이 원래의 단백질과 매우 유사한 것으로 보고됨으로서 진핵 및 원핵생물의 다양한 유전자를 발현하고 있는 baculovirus 발현벡터 시스템은 *Autographa californica* (Ac) 핵다각체병 바이러스 (Nuclear Polyhedrosis Virus; NPV)와 그 바이러스가 감염되는 *Spodoptera frugiperda* (Sf)세포주의 조합으로 의약산업 등에 있어서 백신에서 뿐만아니라 치료제까지 박테리아, 바이러스, 동식물 등의 다양한 외래유전자 발현의 중요한 수단으로서 이용되고 있다. 또 *Bombyx mori* (Bm) NPV와 Bm세포주 및 누에 유충 생체를 조합한 발현벡터 시스템이 개발되어 있다 (Smith 등 1983, O'Reilly 등 1992, Maeda 등 1985).

이들 두 발현 시스템에서 AcNPV와 BmNPV는 바이러스의 숙주 특이성으로 인하여 교차감염이 되지 않는다. 따라서 각각의 숙주세포에 맞는 baculovirus 전이벡터를 제작하여야 하고, 또 누에 세포주의 경우는 Sf세포주에 비해 세포의 증식속도가 느리고, 부유배양시 세포증식의 어려움 때문에 발현시스템에서 문제점으로 제기되고 있다 (O'Reilly 등 1992).

따라서, 현재 곤충세포주로서 많은 연구와 더불어 외래유전자 발현에 널리 이용되고 있는 Sf세포주와 Bm세포주를 융합하여 AcNPV와 BmNPV가 동시에 감염할 수 있으며, Sf세포주의 장점을 지닌 다중 융합 세포주를 개발함으로서 baculovirus 발현벡터 시스템의 효율성 제고를 위한 일련의 기초 연구로서, 우선 본 논문에서는 Sf세포주와 Bm세포주에서 총 세포 단백질의 SDS-PAGE와 genomic DNA의

RADP(Random Amplification of Polymorphic DNA) 분석에 의해 분자생물학적 표식자를 탐색하였다.

재료 및 방법

1. 곤충세포주

실험에 사용된 곤충세포주는 *Spodoptera frugiperda*의 난소에서 유래된 Sf-9과 누에의 난소에서 유래된 BmN-4이며, 계대배양은 Summers와 Smith (1987)의 방법에 따라 10% fetal bovine serum (Gibco)이 함유된 TC-100 media (Gibco)로 27℃ 항온기에서 배양하였다. Genomic DNA 분리와 총 세포 단백질 분석을 위한 곤충세포주는 세포배양용 플라스크 당 2 X 10^5세포로 분주하고, 3일후 log phase의 세포를 수거하여 이용하였다.

2. SDS-polyacrylamide gel 전기영동

단백질 전기영동은 Laemmli (1970)의 방법에 의하여, 수거된 각각의 세포주를 PBS 완충용액으로 세척한 다음, 5 X sample buffer [60 mM Tris · Cl (pH6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM β-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue]를 가하여 5분간 끓인 후, 원심분리하여 상등액을 3% 농축 젤과 12.5% 분리 젤을 사용하여 전기영동을 수행하고 Coomassie brilliant blue로 염색하였다.

3. Genomic DNA의 분리

곤충세포주의 genomic DNA의 분리는 Sambrook 등 (1989)의 방법을 변형하여 수행하였다. 각각의 곤충세포주를 차가운 Tris-buffered saline [TBS; 0.8% sodium chloride, 0.02% potassium chloride, 0.3% Tris base, 0.0015% phenol red (pH7.4)]으로 두번 세척한후, 1,500 g에서 10분간 원심분리하여 TE [10 mM Tris · Cl (pH7.4), 1 mM EDTA (pH8.0)]용액에서 최종농도 5X10^7 cells/m*l*로 현탁하였다. 현탁액 1 m*l*에 extraction buffer [10 mM Tris · Cl (pH8.0), 0.1 M EDTA (pH8.0), 20 μg/m*l* pancreatic RNase, 0.5% SDS]를 10 m*l* 넣고 37℃에서 1시간 처리한 후, 100 μg의 proteinase K를 넣어 다시 50℃에서 3시간 처리하였다. 현탁액의 단백질을 제거하기 위하여 동량의 phenol을 혼합한 후, 5,000 g에서 15분간 원심분리하여 상청액을 채취하고, 여기에 phenol : chloroform/isoamylalcohol (24:1)이 1:1로 혼합된 용액을 동량으로 혼합한 후, 같은 방법으로 원심분리하여 DNA가 함유된 상청액을 채취하였다. 채취된 상청액에 0.3 M sodium acetate와 0.54 부피의 isopropanol을 첨가한 후, 잘 섞은 다음 10,000 g에서 15분간 원심분리하고, DNA 침전물을 70% 에탄올로 2번 세척하여 건조하였다. 건조한 DNA는 250 μ*l*의 3차증류수로 현탁하여 RNase (Sigma)를 처리한 다음, 1% agarose gel 전기영동으로 확인하고, -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

4. PCR 증폭

Oligonucleotide primer는 Operon Technol. 회사 (USA)의 5'-AGATGCAGCC-3', 5'-TCACCACGGT-3' 및 5'-ACGGGCGCTC-3'의 3가지를 사용하였다. PCR반응은 DNA Thermal cycler (Perkin-Elmer)를 사용하였고, 증폭반응을 위한 혼합물은 (주)한국생공에서 시판하고 있는 Pre-Mix TOP에 약 30 ng의 template DNA와 100 pM의 primer를 섞어 20 μ*l* 부피로 수행하였다. 반응조건은 94℃에서 8분동안 반응후, 94℃/1분, 50℃/1분, 72℃/2분을 40번 반복하고, 마지막으로 72℃에서 7분간 반응하였다. PCR 산물은 1.3% agarose gel에서 전기영동하고, ethidium bromide로 염색하였다.

결과 및 고찰

Bm 세포주와 Sf 세포주에서의 총 세포 단백질 패턴을 분석하기 위하여, log phase 세포주의 총 세포 단백질을 SDS-PAGE하였다 (그림 1). 그 결과, 전반적인 단백질 패턴은 유사하나 Bm 세포주의 경우 Sf 세포주와 뚜렷하게 구별되는 58 kDa과 30 kDa의 주밴드를 관찰할 수 있었고, Sf 세포주의 경우는 Bm 세포주와 뚜렷하게 구별되는 60, 53, 44 및 32 kDa의 4가지 주밴드를 관찰할 수 있었다. 그러나, Sf 세포주에서 53 kDa과 44 kDa의 밴드는 Bm 세포주에서도 존재하나, 양적인 차이를 분명히 나타내었으며, 이는 낮은 농도의 단백질 분석에서도 마찬가지의 경향이었다. 그 외 나머지 저분자량 및 고분자량의 밴드들은 유사한 패턴을 보여, 이상의 두 세포간에 차이를 나타내는 주밴드들은 Bm 세포주와 Sf 세포주를 구별할 수 있는 단백질의 표식자로 이용될 수 있을 것이다.

한편 Bm 세포주와 Sf 세포주에서 genomic DNA를 분리하고, 몇종의 PCR primer를 이용하여 RAPD 방법으로 genomic DNA의 PCR패턴을 분석하였다 (그림 2). PCR primer 5'-AGATGCAGCC-3'로 genomic DNA를 RAPD방법으로 분석하였을 때, Sf

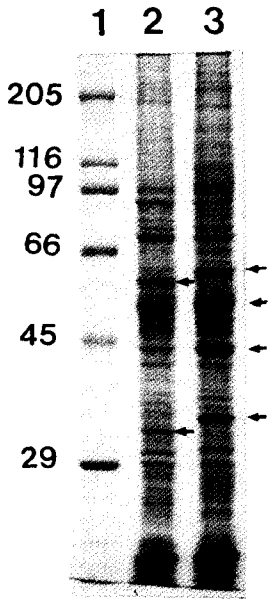

Fig. 1. *SDS-PAGE analysis of total cell proteins of Spodoptera frugiperda and Bombyx mori cells. Lane 1; protein size marker, Lane 2; Sf-9 cells, Lane 3; BmN-4 cells. The unique major bands are indicated by arrows.*

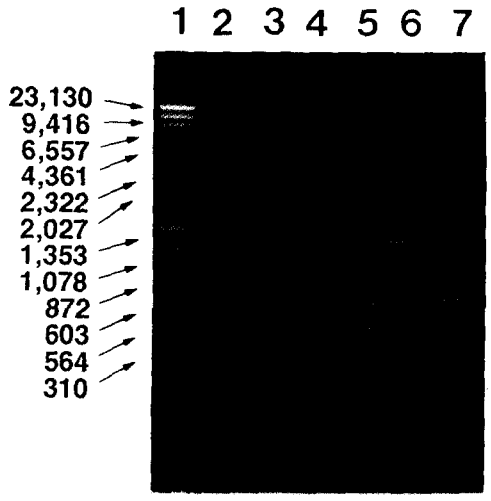

Fig. 2. *The patterns of random amplification of polymorphic DNA of Spodoptera frugiperda and Bombyx mori cells. The genomic DNAs were extracted from Sf-9 (Lane 2, 4 and 6) and BmN-4 cells (Lane 3, 5 and 7). The oligonucleotides used as polymerase chain reaction primer were 5'-AGATGCAGCC-3' (Lane 2 and 3), 5'-TCACCACGGT-3' (Lane 4 and 5) and 5'-ACGGGCGCTC-3' (lane 6 and 7). Lambda DNA-HindIII/ϕX174 DNA-HaeIII marker was used for size marker (Lane 1).*

세포주의 경우 단일밴드로 나타났으나, Bm 세포주에서는 약 1.2 kb와 0.95 kb의 주밴드를 나타내었다. PCR primer 5'-TCACCACGGT-3'의 PCR 산물은 Sf 세포주의 경우, 약 2.0 kb, 1.22 kb 및 0.56 kb의 세가지 밴드를, Bm 세포주는 0.6 kb 및 0.58 kb의 저분자 밴드를 보였다. 또한 PCR primer 5'-ACCTGGCGCTC-3'의 PCR 산물은 여러 가지 저분자량의 DNA 패턴을 나타냈으나, Sf 세포주의 경우 약 1.15 kb와 1.8 kb의 주밴드를, Bm 세포주는 약 0.7 kb의 주밴드를 나타냈다.

본 실험에서 사용된 3가지 PCR primer를 이용하여 RAPD방법으로 Bm 세포주와 Sf 세포주의 genomic DNA를 분석하였을 때, PCR 산물은 Bm 세포주와 Sf 세포주에서의 genomic DNA패턴에 있어서 뚜렷하게 차이를 나타내어, 이들은 효과적인 DNA 표식자로 이용될 수 있으리라 기대된다.

적 요

곤충세포주로 널리 이용되고 있는 Sf 세포주와 Bm 세포주의 분자생물학적 표식자를 탐색하기 위하여, 총 세포 단백질의 SDS-PAGE와 genomic DNA를 RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) 방법으로 분석하였다. 그 결과, 총 세포 단백질 및 genomic DNA 패턴에서 두 세포주를 뚜렷하게 구별할 수 있는 밴드를 탐색하였으며, 이들은 유용한 분자생물학적 표식자로 이용될 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 학술진흥재단 신진연구비 지원에 의하여 수행되었슴.

참 고 문 헌

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

Maeda, S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Sato and M. Furusawa. (1985) Production of human α-interferon in

silkworm using a baculovirus vector. Nature 315: 592-594.

O'Reilly, D. R., L. K. Miller and V. A. Luckow. (1992) Baculovirus expression vectors. W. H. Freeman and Company, New York.

Sambrook, J., E. F. Frisch and T. Maniatis. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory 9.16-9.19.

Smith, G. E., M. D. Summers and M. J. Fraser. (1983) Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell Biol. 3:183-192.

Summers, M. D. and G. E. Smith. (1987) A methods for baculovirus vector and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555.