

새로운 Baculovirus 전이벡터를 이용한 *Escherichia coli* β -galactosidase 유전자의 발현

우수동 · 김우진 · 김혜성 · 진병래 · 강석권*
서울대학교 농업생명과학대학 농생물학과

Expression of *Escherichia coli* β -galactosidase Gene by New Transfer Vector of Baculovirus. Soo-Dong Woo, Woo-Jin Kim, Hye-Seong Kim, Byung-Rae Jin and Seok-Kwon Kang. Department of Agricultural Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea - To investigate the expression efficiency of new transfer vector of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV), *Escherichia coli lacZ* gene was inserted into new transfer vector pBmKSK1, under the control of polyhedrin promoter and expressed in BmN-4 cells and larvae of silkworm, *Bombyx mori*. The recombinant virus containing *lacZ* gene was isolated from BmN-4 cells coinfecting with transfer vector pBmKSK1-LacZ and wild type BmNPV genome, and analysed by Southern blotting. The expression of β -galactosidase was characterized by SDS-PAGE, Western blotting and β -galactosidase activity assay. The results showed that the level of expression in silkworm larvae was higher than that of BmN-4 cells.

약 600여종의 곤충으로 부터 분리, 보고되고 있는 baculovirus 중 subgroup A에 속하는 핵다각체병 바이러스 (nuclear polyhedrosis virus : 이하 NPV라 약함)는 DNA 바이러스로, 다각체라는 특이한 포매형태 때문에 바이러스 살충제로서 오래전부터 연구되고 이용되어 왔다 (1-3). 근래에는 이러한 NPV의 다각체를 구성하는 다각체 단백질 유전자를 외래 유전자로 대체함으로써 유용물질을 생산할 수 있는 baculovirus 발현벡터계가 개발되어 살충제로서 뿐만 아니라 산업적으로 유용물질의 생산을 위하여 NPV에 대한 관심 및 연구가 집중되고 있다(4-6).

Baculovirus 발현계는 발현수준이 높을 뿐만 아니라 안정하며, 또한 생산된 단백질은 생물학적 활성 및 면역학적 성질이 원래의 단백질과 매우 유사한 것으로 보고됨으로써 진핵 및 원핵생물의 다양한 유전자를 곤충 세포계 및 유충에서 발현시키는데 이용되고 있다(5, 7, 8). 이러한 baculovirus 발현계는 현재, *Autographa californica* NPV(이하 AcNPV라 약함)와 *Spodoptera frugiperda* 곤충 세포계를 이용한 것과 *Bombyx mori* NPV(이하 BmNPV라 약함)와 누에 유충계를 이용한 두가지 벡터계가 개발되어져 있다. 그중 BmNPV 벡터계의 경우, 곤충 유충 생체를 직접 이용하므로써 생산된 물질의 활성 및 발현량이 더욱 높은 장점을 가지고 있으나, AcNPV에 비해서 그 연구가 미흡한 상태이다(5, 8, 9). 한편, 국내에서의 baculovirus 연구는 흰불나방 NPV에 대한 연구가 보고되고 있으나(10, 11), 발현벡터계에 대한 연구는 거의 보고되지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 새로운 baculovirus 발현벡터계 개발을 위해, 국내에서 분리된 Bm-

NPV를 이용한 전이벡터 제작(12)과 외래 유전자로서 *E. coli*의 *lacZ* 유전자를 전이벡터에 삽입하여 누에 세포주 및 5령 유충에서 발현하고 그 효율을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

곤충 및 바이러스

공시충은 농촌진흥청 잠사곤충 연구소에서 분양받은 누에(*Bombyx mori*)를 잠사곤충연구소의 표준사육관리법에 따라 사육하며 실험에 이용하였다. BmNPV는 국내 양잠농가에서 분리된 것으로 누에 유충 및 배양세포에서 증식시켰다.

곤충세포주

본 실험에 이용된 BmN-4 세포주는 누에의 난소에서 유래된 것으로 일본잠사 곤충농업기술연구소의 Kobayashi 박사로부터 분양받아 Summers 등 (13)의 방법에 따라 10% fetal bovine serum(Gibco Co.)이 함유된 TC-100(Sigma Co.) 곤충세포 배양액으로 27°C에서 배양하였다.

E. coli lacZ 유전자의 클로닝 및 재조합 바이러스 제작

플라스미드 조작은 일반적인 조작방법에 따라 수행하였다(14). *E. coli lacZ* 유전자는 플라스미드 pCH110(Pharmacia Co.)으로 부터 *lacZ* 유전자를 함유한 3.7 Kb의 DNA 절편을 elution하고 Klenow fragment에 의하여 평면말단을 형성시킨 후, 전이벡터에 역시 *EcoRI*-Klenow fragment 처리에 의하여 평면말단을 형성시켜 클로닝

*Corresponding author.

Key words: Baculovirus, expression vector, *Bombyx mori*, NPV

하였다. *lacZ* 유전자를 포함한 전이벡터는 liposome mediated transfection 방법(Boehringer Mannheim Co.)에 의하여 BmNPV DNA와 함께 세포에 cotransfection 시켜 재조합 바이러스를 제작하였다.

End-point 회색에 의한 바이러스 순화

재조합 바이러스를 분리하기 위하여 전이벡터와 BmNPV DNA를 cotransfection 시킨 후 5일 경과된 세포의 배양액을 10^{-6} ~ 10^{-7} 으로 희석하고, 96 well plate에 1×10^5 세포개/ml의 농도로 분주된 배양세포에 각 희석액을 접종하고 27°C에서 배양하였다. 접종 후 4일부터 세포내 다각체 형성 및 바이러스 감염유무를 도립 현미경으로 관찰하여 다각체를 형성하지 않는 감염세포를 선발하였다. 동일한 방법으로 3회의 순화과정을 거쳐 재조합 바이러스를 선발하였다.

재조합 바이러스의 접종

배양 세포주에 대한 재조합 바이러스의 접종은 세포 배양용 플라스크(25 cm²) 당 2×10^5 농도로 monolayer가 형성된 세포에 1×10^5 PFU 농도로 바이러스 NOV(non-occluded virus)를 접종하였다. 접종 1시간 후 감염되지 않은 바이러스를 제거하기 위하여 새 배양액으로 2~3회 세척하고, 배양액 5 ml를 보충하여 27°C 항온기에서 배양하였다.

다각체를 형성하지 않는 재조합 바이러스의 유충에 대한 접종은 1×10^6 PFU/ml 농도의 바이러스 접종액 10 μ l를 누에 5령 1일째의 유충에 체강주사하고 인공사료로 계속하여 사육하면서 시간별로 유충의 복지로 부터 체액을 추출하였다.

바이러스 DNA 분리

DNA 분리는 Smith와 Summers(6) 방법에 따라서 바이러스 접종 후 72시간된 배양세포액을 5,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상청액을 다시 25,000 rpm으로 4°C에서 1시간동안 초원심 분리하여 NOV 침전을 얻고 TE buffer로 녹인 후, SDS를 1%, Proteinase K(Sigma Co.)를 0.5 mg/ml가 되도록 각각 첨가하여 37°C에서 4시간 이상 처리하였다. 그 후 phenol/chloroform 방법으로 3회 정제하고 냉에탄올로 DNA 침전을 얻어 TE buffer에 녹여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Southern blotting 분석

Southern hybridization(15)에 사용된 probe는 플라스미드 pCH110의 *lacZ* 유전자를 함유한 DNA 절편을 DIG DNA Labeling Kit(Boehringer Mannheim Co.)를 사용하여 제조회사의 방법에 따라 labeling 하여 이용하였다. Southern blotting은 바이러스의 DNA에 여러가지 제한 효소를 처리하고 전기영동한 gel을 상온에서 denaturation 용액(0.5M NaOH, 1.5M NaCl)으로 15분간 침지하여

DNA를 변성시킨 후, neutralization 용액(1M Tris-HCl (pH 7.4), 1.5M NaCl)으로 15분간 중화시켰다. 중화시킨 gel은 $20 \times$ SSC 용액(3M NaCl, 0.3M sodium citrate)으로 nylon membrane 위로 capillary transfer 시킨 후, 120°C에서 30분간 처리하여 고정시켰다. 이와 같이 처리된 membrane을 DIG labeling된 probe로 hybridization 반응시킨 후, DIG Luminescent Detection Kit(Boehringer Mannheim Co.)를 이용하여 그 결과를 조사하였다.

SDS-PAGE와 Western blotting 분석

단백질 전기영동은 바이러스 접종 후 12시간 간격으로 세포를 수거하여 PBS 완충액으로 2회 세척하고 단백질 용해액(0.0625M Tris-HCl[pH 6.8], 2% SDS, 10% Glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue)을 더한 후, 100°C에서 10분간 처리하여 전기영동 시료를 준비하였다.

전기영동은 Laemmli 방법(16)에 따라 10% SDS-polyacrylamide gel에서 수행하고 Coomassie brilliant blue로 염색하여 관찰하였다.

Western blotting은 SDS-PAGE gel을 nitrocellulose filter에 electro-transfer 하고 생쥐로부터 제작한 β -galactosidase 항체를 붙인 후, alkaline phosphatase가 결합된 Anti-IgG 2차 항체(Sigma Co.)로 분석하였다.

β -Galactosidase 활성 검정

β -Galactosidase의 활성은 시간별로 수거된 각 시료를 β -galactosidase Enzyme Assay Kit(Promega Co.)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 처리하고 420 nm 흡광도에서 측정하였다.

결과 및 고찰

재조합 바이러스의 제작

새로운 BmNPV 전이벡터 pBmKSK1의 외래유전자 발현효율을 조사하기 위하여 표지유전자로 *E. coli lacZ* 유전자를 가진 플라스미드 pCH110으로부터 *lacZ* 유전자를 pBmKSK1의 다각체 단백질 유전자 promoter 조절하에 클로닝하여 pBmKSK1-*LacZ*로 명명하였다(Fig. 1).

LacZ 유전자를 가진 재조합 바이러스의 제작을 위하여 pBmKSK1-*LacZ* 플라스미드와 BmNPV DNA를 liposome mediated transfection 방법에 의하여 BmN-4 세포주에 cotransfection 시키고 접종 5일 후에 *in situ* 검정에 의하여 *lacZ* 유전자의 발현여부를 확인하였다. 재조합 바이러스의 순수한 분리를 위해 모 바이러스 및 재조합 바이러스가 혼재되어 있는 배양액을 end-point 회색을 실시하여 재조합 바이러스를 선발하고 BmK1-*lacZ*로 명명하였다.

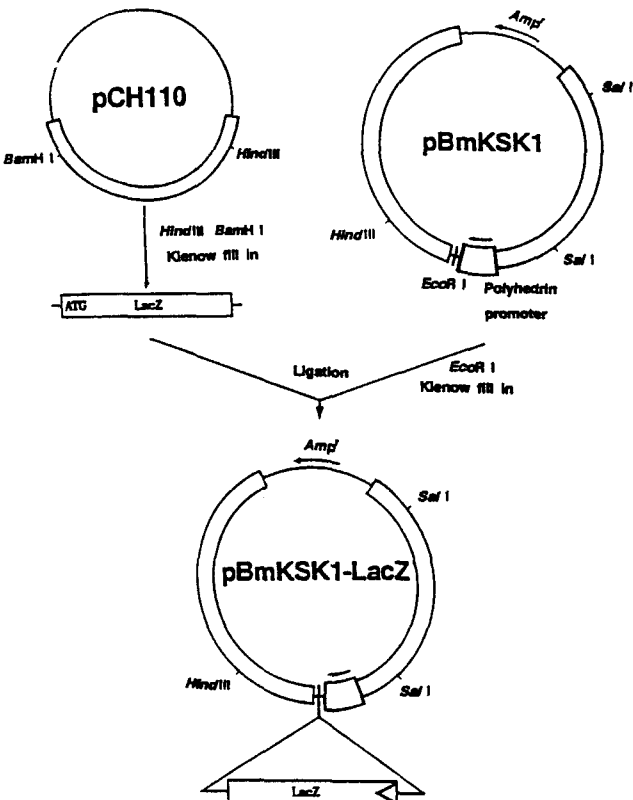


Fig. 1. Schematic diagram of the construction of transfer vector pBmKSK1-LacZ.

The *lacZ* gene was ligated to the transfer vector pBmKSK1, under the control of BmNPV polyhedrin promoter.

재조합 바이러스의 genome 분석

재조합 바이러스에서 *lacZ* 유전자의 존재 여부를 확인하기 위하여 *lacZ* 유전자를 probe로 Southern blotting을 수행한 결과 모바이러스에서는 *lacZ* 유전자의 존재를 확인할 수 없었으며 재조합 바이러스에서만 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한 재조합 바이러스 DNA의 제한 효소처리 패턴은 *lacZ* 유전자를 가짐으로써 모바이러스와 상이하게 나타났다.

β-Galactosidase의 발현

β-Galactosidase의 발현은 재조합 바이러스를 누에 세포주에 접종한 후 12시간 간격으로 세포를 수거하여 SDS-PAGE와 Western blotting으로 분석하였다(Fig. 3). 그 결과, 재조합 바이러스가 감염된 세포에서는 BmN-4 세포와 모바이러스가 감염된 세포에서는 나타나지 않는 약 116 kDa의 β-galactosidase 단백질 밴드를 관찰할 수 있었다(Fig. 3-A). β-Galactosidase 항체를 이용한 Western blotting 분석 역시 마찬가지로의 결과로 BmN-4 세포에서 재조합 바이러스 접종 후 24시간이 경과하면서부터 β-galactosidase 발현이 관찰되기 시작하여 그 발현량은 시간의 경과와 더불어 증가하였다(Fig. 3-B).

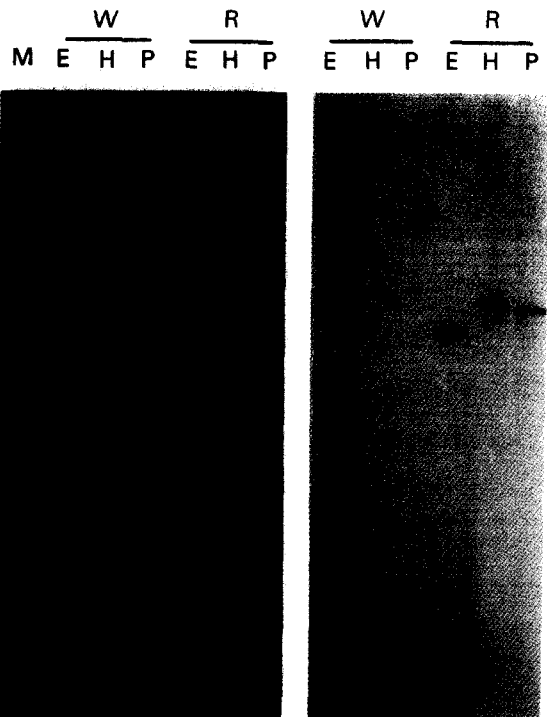


Fig. 2. Southern blot analysis of recombinant virus containing *lacZ* gene.

The recombinant virus was isolated from cells coinfecting with transfer vector pBmKSK1-LacZ and wild type BmNPV genome. Recombinant virus DNA was digested with various restriction endonuclease (left panel), and hybridized with labeled *lacZ* coding gene (right panel).

W, wild type BmNPV; R, recombinant virus containing *lacZ* gene; M, lambda DNA digested with *HindIII*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; P, *PstI*.

곤충 세포주와 유충 개체에서의 β-galactosidase 발현량 비교

새로운 전이벡터의 곤충 세포주와 유충 개체에서의 외래 유전자 발현효율을 조사하기 위하여, 누에 세포주 및 누에 5령 유충에 재조합 바이러스를 각각 접종하고 24시간 간격으로 세포배양액 및 누에 체액을 수거하여 β-galactosidase 활성을 조사하였다(Fig. 4).

그 결과, β-galactosidase 활성은 세포주에서의 경우 접종 후 3일부터 높아지기 시작하여 5일째 최대의 발현량을 보였다. 반면 유충에서의 경우에는 접종 후 2일이 경과하면서부터 발현량이 급격히 증가하기 시작하여 접종 후 5일째에는 세포주에 비해 약 50배 가량 높은 발현량을 보였다. 이와 같은 결과는 이미 보고된(17-19) 유충에서의 높은 발현량과 일치하는 결과로서 본 전이 벡터 역시 이상적인 외래유전자 발현능력을 가짐을 보여주는 결과이다.

이상의 결과에서 국내 분리주인 BmNPV를 이용하여 새로이 개발된 전이벡터 pBmKSK1은 발현벡터로서 제 기능을 수행하며 특히, 양잠산업의 발전과 함께 생리,

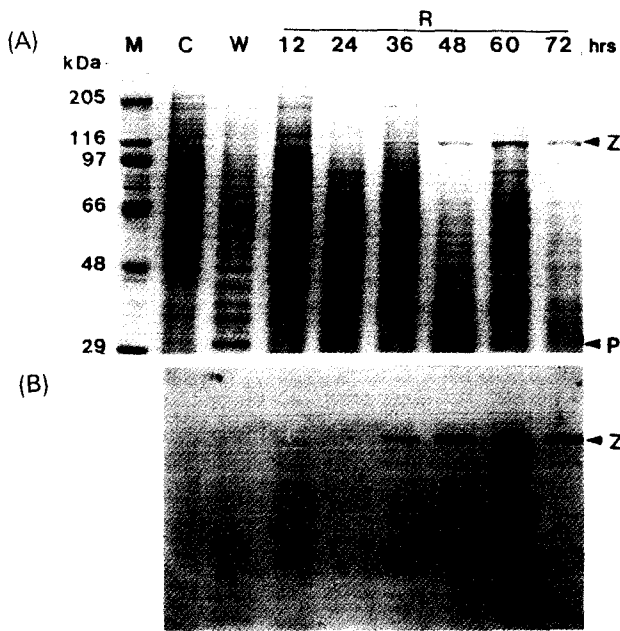


Fig. 3. SDS-PAGE and Western blot analysis of β -galactosidase produced by a recombinant baculovirus. The BmN-4 cells were infected with recombinant virus and collected at 12, 24, 36, 48, 60, and 72 hours postinfection. Cell lysates were analyzed by SDS-PAGE (A) and Western blotting using β -galactosidase antibody (B). M, molecular weight marker; C, mock-infected BmN-4 cells; W, BmN-4 cells infected with wild type BmNPV; Z, β -galactosidase; P, polyhedrin.; R, BmN-4 cells infected with recombinant virus.

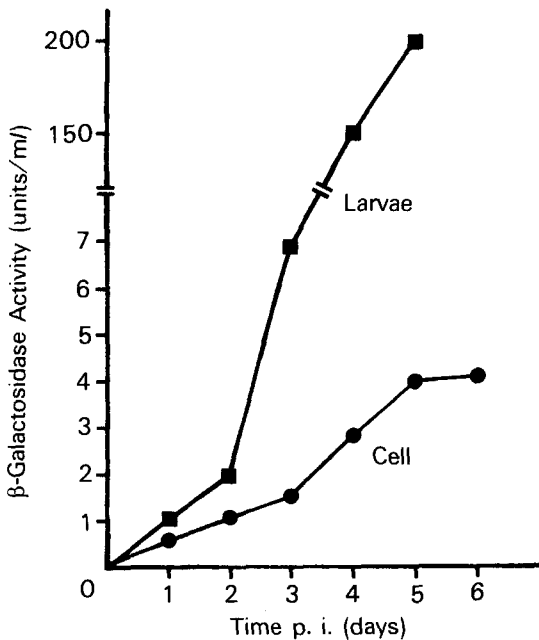


Fig. 4. The assay of β -galactosidase activity in BmN-4 cells and *B. mori* larvae infected with recombinant virus. *B. mori* cells and larvae were infected with recombinant virus and the samples for the assay of β -galactosidase activity were collected at various times postinfection.

생화학 및 유전 육종 등의 연구가 많이 진전된 누에 유충생체를 이용할 경우 높은 발현량으로 상당히 효율적이었다. 따라서 앞으로 농업 및 의약산업 등 여러 분야에서 유용한 물질의 생산에 본 전이벡터의 이용이 기대된다.

요 약

국내에서 분리된 BmNPV를 이용하여 제작된 새로운 전이벡터 pBmKSK1에 외래 유전자로서 *E. coli lacZ* 유전자를 클로닝하고 재조합 바이러스를 제작하였다. 재조합 바이러스에 대하여 Southern blotting 분석을 실시하여 *lacZ* 유전자의 존재를 확인하였으며, 재조합 바이러스가 접종된 세포의 SDS-PAGE 및 Western blotting 분석을 통하여 β -galactosidase의 발현을 확인하였다. 재조합 바이러스의 발현효율을 누에 세포주 및 유충에서 비교 조사한 결과, 유충에서 더욱 높은 발현량을 보임을 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 서울대학교 농업생명과학연구소와 농업특정연구개발사업 '95 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

- Blissard, G.W. and G.F. Rohrmann. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 127-155.
- Kelly, D.C. 1985. The structure and physical characteristics of baculoviruses. In *Viral Insecticides for Biological Control*. Edited by K.E. Shermann & K. Maramorosch, Academic Press: 469-488.
- Vlak, J.M. and G.E. Rohrman. 1985. The nature of polyhedrin. In *Viral Insecticides for Biological Control*. Edited by K.E. Shermann & K. Maramorosch. Academic Press: 489-542.
- Maeda, S. 1994. Expression of foreign gene in insect cells using baculovirus vectors. In *Insect cell biotechnology*. Edited by Maramorosch, K. & McIntosh A. Boca Raton: CRC Press; 1-31.
- Maeda, S, T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Soto, and M. Furusawa. 1985. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* 315: 592-594.
- Smith, G.E., M.D. Summers, and M.J. Fraser. 1983. Production of human β -interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156-2165.
- King, L.A. and R.D. Possee. 1992. The Baculovirus Expression System-A laboratory guide. Chapman & Hall, London.

8. O'Reilly, D.R., L.K. Miller, and V.A. Luckow. 1992. *Baculovirus Expression Vectors-A laboratory manual*. W. H. Freeman and Company, New York.
9. Horiuchi, T., Y. Marumoto, Y. Saeki, Y. Sato, M. Furu-sawa, A. Kondo, and S. Maeda. 1987. High-level expression of the human- α -interferon gene through the use of an improved baculovirus vector in the silkworm, *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 1573-1580.
10. Lee, H.H. and K.K. Lee. 1988. Isolation, complementation and partial characterization of temperature-sensitive mutants of the baculovirus *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* **69**: 1299-1306.
11. Lee, H.H., B.H. Min, H.K. Chung, K.K. Lee, J.K. Park, S.C. Cha, and N.S. Seo. 1992. Genomic structure and nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus. *Mol. Cells.* **2**: 303-308.
12. 우수동, 김우진, 진병래, 강석권. 1995. 누에 핵다각체병 바이러스를 이용한 새로운 전이벡터의 제작. *한국잠사학회지* **37**(1): 46-51.
13. 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.
14. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
15. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
16. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. **227**: 680-685.
17. Russell, R.J., D. Schmiel, K. Iatrou, and L. Gedamu. 1993. Transfer vectors for maximal expression of passenger genes in the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus expression system. *Biotech. Bioeng.* **42**: 1293-1300.
18. Ulrich, R., B. Blum, B.U. von Specht, H. Domdey, and J. Collins. 1992. Antibody production in silkworm cells and silkworm larvae infected with a dual recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Bio/Technology* **10**: 910-912.
19. Gretch, D.G., S.L. Sturley, P.D. Friesen, N.E. Beckage, and A.D. Attie. 1991. Baculovirus-mediated expression of human apolipoprotein E in *Manduca sexta* larvae generates particles that bind to the low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 8530-8533.

(Received 10 October 1995)