

BmNPV의 p10 유전자를 이용한 새로운 전이벡터 개발

강석우 · 진병래 · 윤은영 · 김상현 · 김근영 · 강석권*
농촌진흥청 잠사곤충연구소, *서울대학교 농업생명과학대학

Construction of the Novel Baculovirus Transfer Vector Using the p10 Gene of BmNPV

Seok Woo Kang, Byung Rae Jin, Eun Young Yun, Sang Hyun Kim,
Keun Young Kim and Seok Kwon Kang*

National Sericulture and Entomology Research Institute, R.D.A., Suwon, Korea
*College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea

ABSTRACT

To develop the novel baculovirus transfer vector, the p10 gene was cloned from the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) vB2 strain isolated from the *B. mori* larvae of sericultural farms. The novel transfer vector was constructed by using the p10 gene of BmNPV vB2 strain and its function was tested. Open reading frame of the p10 gene from BmNPV vB2 strain was 210 bp. The TAAG sequence at the -71 bp of upstream from translation initiator ATG and two polyadenylation signal site at the downstream from terminator TAA were also detected in the p10 gene. The 5' and 3' flanking region of the p10 gene amplified by PCR was cloned into pBluescriptII SK(+) and then transfer vector pBm10 was constructed. The 7.9 kb pBm10 was analysed by restriction enzymes and the map was confirmed. In order to determine the expression of foreign gene of pBm10, β -galactosidase gene was inserted in the *Sma*I site of foreign gene cloning site of pBm10. The pBm10 containing β -galactosidase gene was cotransfected with genomic DNA of BmNPV vB2 into BmN-4 cells. The recombinant baculovirus expressing β -galactosidase was also produced polyhedra in the infected cells. The results indicated that pBm10 is functional, suggesting that in the baculovirus expression vector system, the recombinant virus produced by pBm10 was effective by oral infection for the producing recombinant proteins in *in vivo* expression.

Keys words : *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, p10 gene, Transfer vector

서 언

곤충 baculovirus의 유전자는 α , β , γ , δ 혹은 immediate early, delayed early, late, very late의 4 단계로 구분되어 단계적으로 발현된다(Blissard & Rohmann, 1990). 마지막 단계에서 다각체 단백질과 함께 다량으로 발현되는 p10 단백질은 약 10kDa으로 감염된 세포의 핵이나 세포질에 섬유상 구조로 존재하면서(Van der wilk *et al.*, 1987) 다각체의 방출에 관련하는 것으로 추정하였다(Williams *et al.*, 1989). Van Oers 등(1993)도 p10 단백질은 응집과 정렬, 핵

의 파괴 및 망상구조 형성에 관련된 각각의 아미노산 영역을 가지고 있다고 하였다. 이와같은 p10 단백질의 유전자 구조분석에서 Kuzio 등(1984)은 AcNPV (*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus)는 282 염기로 구성되어 있으며, 이는 94개 아미노산으로 번역된다고 하였다. 또한 88개 아미노산으로 구성되어있는 SeMNPV(*Spodoptera exigua* multicapsid Nuclear polyhedrosis Virus)의 p10 유전자와 26%의 낮은 아미노산 상동성을 보이지만 p10 단백질의 기능에는 큰 차이가 없는 결과로부터 바이러스에 따른 p10 유전자 서열의 다양성을 보고하였다

(Zuidema *et al.*, 1993). 한편 누에 핵다각체병 바이러스(*Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus, 이하 BmNPV)의 p10 유전자에 관한 Hu 등(1994)의 보고에 따르면 p10의 구조단백질 유전자는 210bp로 70개 아미노산으로 번역되며 분자량은 약 7.7kDa으로 추정하였다. 또한 이 유전자의 염기서열은 AcNPV의 그것과 92.4%의 높은 상동성을 보였으며, C-말단의 72bp의 유전자 결손을 확인하였다. 이와같은 p10 유전자는 바이러스의 감염 및 증식에 무관하며(Fraser *et al.*, 1983), 더우기 프로모터 영역과 polyadenylation signal site 등 발현벡터의 구성요건을 갖추고 있어 p10 프로모터를 이용한 전이벡터 구축에 많은 연구가 보고되고 있다(O'Reilly *et al.*, 1992). 한편 baculovirus의 다각체 단백질 유전자의 프로모터 조절하에 외래유전자를 발현하는 재조합 바이러스는 다각체를 형성하지 않는 특징을 가진다. 이러한 재조합 바이러스를 경구접종할 경우 유충의 소화액에 의해 쉽게 불활화됨에 따라 주로 바이러스 접종은 주사에 의한 경피접종에 의존하고 있다. 이 방법은 유용물질의 대량생산시 일일이 바이러스를 주사접종해야하는 번잡함과 시간이 많이 소요되는 단점이 제기되어왔다. 따라서 본 연구에서는 유용물질의 대량생산시 경구접종에 적합한 다각체를 형성하는 재조합 바이러스를 제작할 수 있는 새로운 전이벡터를 구축하고자 BmNPV의 p10 유전자를 분석하고 이 유전자의 프로모터를 이용한 전이벡터를 구축하였다.

재료 및 방법

1. *E. coli* 균주, 벡터 및 유전자

PCR 산물의 클로닝은 pGEM-T 벡터 (Promega, U.S.A.)를, 전이벡터 구축에는 pBluescript II SK+ (Stratagene, U.S.A.) 벡터를 각각 사용하였다. 플라스미드의 증폭 및 재조합 플라스미드 형질 전환에는 JM109(Promega) 혹은 XL-1 blue 균주(Stratagene, U.S.A.)를 사용하였다. *E. coli* β -galactosidase 유전자는 Promega사(U.S.A.)의 pSV- β -galactosidase 벡터로부터 분리하여 사용하였다. 기타 유전자 조작은 Sambrook 등(1989)의 방법을 참고하였다.

2. 바이러스 및 곤충세포배양

p10 유전자의 클로닝과 동시감염에 사용한 야생형 바이러스는 국내 양잠농가로부터 수집한 핵다각체병 바이러스를 한계희석법으로 5회 실시하여 단주화한 vB2주를 사용하였다. 누에 유충을 이용한 바이러스 증식은 곤충배양세포(BmN-4)에서 증식한 배양 상청

액을 수거하고 100배 희석하여 접종액으로 하였다. 누에 접종은 12시간 절식시킨 5령 2일째 누에에 50 μ l씩 경피접종하였다. 이후 표준 사육법에 준하여 사육하면서 전형적인 바이러스 감염증상을 나타내는 누에의 배탈을 잘라 채액을 채취하였다. 다각체의 순수분리는 Maeda(1989)의 방법에 준하였으며 다각체로부터 NOV(non-occluded virus)의 분리는 Pennock 등(1984)의 방법에 따라 순수분리하였다. 분리한 NOV로부터 바이러스 DNA 추출은 Maeda(1989)의 방법에 따라 수행하였다. 야생형 및 재조합 바이러스 증식에 사용한 곤충배양세포는 누에 난소 유래의 BmN-4 세포주를 사용하였으며, 세포는 10% FBS (Fetal Bovine Serum)가 함유된 TC-100 배지를 사용하여 Maeda (1989)의 방법에 따라 5~7일 간격으로 계대 배양하였다.

3. BmNPV의 p10 유전자 클로닝

vB2 바이러스로부터 PCR로 p10 유전자를 클로닝하기 위해 Maeda가 GenBank에 등록된 BmNPV T3주의 전 염기서열(Accession No. L33180)을 참고로 primer를 설계하였다. 즉 p10 유전자의 5' flanking 영역의 클로닝에 사용한 sense primer는 5'-GGGGCCAAA-TATTGACTCGTTG-3'이며, antisense primer는 5'-TCCCCC GGGATGATAGTAAATAAAATGT-3'로 하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 0.7% agarose gel 전기영동으로 확인한 다음 Pinpoint Xa I-T 벡터 (Promega사)에 클로닝하고 선발한 재조합 플라스미드를 Pinpoint Xa I-5'f로 명명하였다. 한편 3' flanking 부위의 클로닝에 사용한 sense primer는 5'-TCCCCCGGGTCAAAGCCT AACGTTTTG-3'이며, antisense primer는 5'-GCGAGCTCAGAGACTAGAGTG-3'를 각각 합성하여 PCR 반응 하였다. 예상되는 1.9 kb의 PCR 증폭산물은 0.7% 아가로스겔 전기영동으로 확인한 후 pGEM-T 벡터에 클로닝하고 선발한 재조합 플라스미드를 pGEM-3'f로 명명하였다.

4. 염기서열 분석

vB2 바이러스의 p10 유전자의 염기서열 분석을 위해 PCR로 p10 유전자를 클로닝하였다. PCR 반응에 사용한 sense primer는 5'-ATGCATTTGAGGATGCC-3'를, antisense는 5'-CAAACACAATTGTGGCG-3'였으며, PCR산물은 0.7% 아가로스 겔에서 예상되는 크기와 증폭여부를 확인한 후 pGEM-T 벡터에 클로닝하고 선발한 재조합 플라스미드를 염기서열 분석에 사용하였다. 또한 구축한 전이벡터의 클로닝 주변부의 염기서열은 상기의 방법과 같이 수행하여 얻은 재조합 플

라스미드를 주형으로 사용하였다. 염기서열 분석은 Sanger 등(1977)의 dideoxy chain termination 방법으로 수행하였다.

5. 곤충배양 세포내 DNA 전이 및 재조합 바이러스 선발

동시감염에 사용한 곤충배양세포는 6×10^5 개/ml 농도로 조정하여 6 well 플레이트에 각 well당 1.5 ml씩 분주한 후 하룻밤 배양한 것을 사용하였다. DNA 전이는 야생형 바이러스 DNA와 전이벡터 DNA를 liposome transfection reagent인 DOTAP (Boehringer Mannheim, Germany)을 사용하여 제조회사의 방법에 따라 수행하였다. 이후 27°C 항온기에서 5~7일간 배양하면서 바이러스 감염 세포의 병징으로부터 전이여부를 확인하였다. 바이러스 감염이 인정된 세포배양액을 원심분리하여 상청액을 수거한 후 이를 재조합 바이러스 선발을 위한 바이러스 접종 원액으로 하였다. 재조합 바이러스 선발은 end-point dilution (O'Reilly *et al.*, 1992)으로 수행하였다. 즉 10^{-1} ~ 10^{-7} 농도로 조정한 바이러스 접종액을 96 well 플레이트에 분주한 후 5~7일간 배양하였다. 각 well의 β -galactosidase 발현 여부는 Kitts와 Possee(1993)의 방법에 따라 X-gal 염색으로 검정하였다. 이와같은 과정을 3회 반복하여 얻은 바이러스를 β -galactosidase 발현 재조합 바이러스로 하였다. 재조합 바이러스에 감염된 배양세포에서의 β -galactosidase 발현 양상은 *in situ* staining(O'Reilly *et al.*, 1992) 방법으로 수행하였다.

결과 및 고찰

1. p10 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

작성한 primer를 이용하여 PCR 방법으로 vB2 바이러스로부터 p10 유전자의 open reading frame이 포함된 620 bp의 단일 밴드의 DNA를 얻었다. 이 DNA 단편을 pGEM-T 벡터에 클로닝하여 얻은 재조합 플라스미드를 주형으로 하여 염기서열을 분석하였다(그림 1). 그 결과 p10 유전자의 open reading frame은 210개 뉴클레오티드로 구성되어 있었다. 프로모터 영역에는 baculovirus의 very late gene의 공통적인 전사개시에 관련된 TAAG는 번역개시점으로부터 -71 bp 상류에 위치하고 있었으며, 잠정적인 polyadenylation signal site는 종결 codon으로부터 71bp 및 140bp 하류에 존재하였다. 이러한 유전자 염기배열은 Hu 등(1994)이 보고한 BmNPV T3주의 염기서열과 동일하였으나, Kuzio 등(1984)이 보고한 AcNPV의 p10 유전자와 비

```

1  ATTATGCATT TGAGGATGCC GGGACCTTTA ATTCACCCA ACACAATATA TTACAGCTAA
61  AATAAATA TTAATAAATT AITTTATAT TAATTAATAA CTTTACTGT AAATTACATT
    ***
121 TTAITTTACTA TCATGTCAA GCCTAACGTT TTGACACGAA TTTTAGACGC CATTGCGGAA
    M S K P N V L T R I L D A I A E
181 ACTAACACAA AAGTTGACAG TGTTCAACT CAGTTAAACG GCGTGAAGA ATCGTCCAG
    T N T K V D S V Q T Q L N G L E E S F Q
241 CTTTGGACGG TTTGCCGCT CAATTGACCG AITTTAACAC TAAATCTCA GAAATTCAT
    P L D G L P A Q L D T F N T K I S E I Q
    BamHI ***
301 CCATATTGAC CCGTGACACT GCTCCGATC CTCAGACTC CTAAGAAGCTA CGCTGAAAGG
    S I L T G D T A P D P P D S
361 CCAAGCTTTT GAATTCGATT CAGACGCTCS TCGTGGTAAA CAGCATTCCA AGTATTC
    HindIII EcoRI
421 TCGTTTTTTT TAAAATAAC AAATCAATG TTTTATAATA TCGTCAGAT TCITTTGACTA
481 TGTATTCATT TGTAAATCATT AAGANGATTA CGAAAAATAT AAAAAATATG AGTITTTTGT
541 GTATAACAA
  
```

Fig. 1. Nucleotide sequence of the p10 gene of BmNPV(vB2). Deduced amino acids are represented by single-letter code under the sequence. The translation start and stop site are indicated by asterisks. The consensus baculovirus very late gene promoter, TAAG, and putative polyadenylation signals(AATAAA) are shown by shadow boxes.

교해 볼 때 vB2주 바이러스의 p10 유전자는 C-말단 영역에서 24개 아미노산이 결손되어 있었다. 이와같은 유전자 결손은 BmNPV로 감염된 곤충배양세포에 섬유상 구조를 관찰할 수 없었던 보고(Inoue & Mitsuhashi, 1984)와 AcMNPV의 p10 유전자의 C-말단 영역이 섬유상 구조 형성에 관여한다는 보고(Van Ders *et al.*, 1993)를 종합해 볼 때 vB2주 바이러스의 p10 유전자의 결손은 p10 단백질의 섬유상 구조 형성에 관여할 것이라 추정할 수 있었다. 한편 baculovirus의 p10 유전자는 감염 말기에 다량으로 발현되며 (Blissard & Rohmann, 1990) 바이러스의 감염과 증식에 무관한 유전자로 알려져 있다(Fraser *et al.*, 1983). 더우기 본 연구의 p10 유전자 분석에서 프로모터 영역과 진행생물의 mRNA의 안정성에 중요한 역할을 하는 polyadenylation signal(Manley, 1995)를 갖추고 있어, 이 유전자를 재조합 바이러스 제작을 위한 외래유전자 전이벡터 구축에 유용할 것이라 생각된다.

2. p10 유전자를 이용한 전이벡터 구축

다각체를 형성하면서 p10 유전자의 프로모터 조절 하에 외래 유전자를 발현하는 재조합 바이러스를 제작하기 위해 새로운 전이벡터를 구축하였다. 그림 2에서 보는 바와 같이 p10 유전자의 5' flanking 배열은 Pinpoint Xa1T-5'f 벡터를 *Hae*III와 *Bgl*II 제한효소

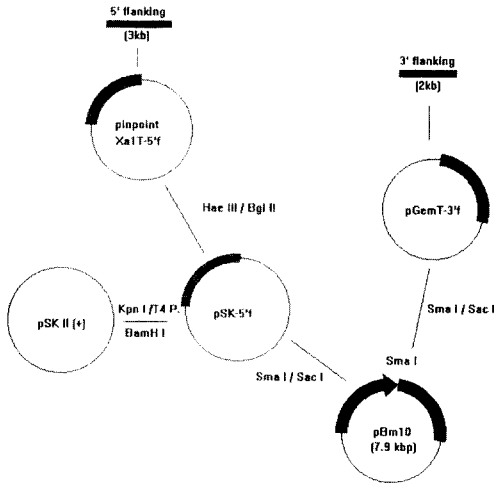


Fig. 2. Construction of the transfer vector, pBm10, using the p10 gene. The steps in the construction are detailed in the text. The arrow showed the direction of transcription from the p10 promoter.

를 처리하여 3 kb의 유전자 단편을 얻었다. 이 유전자를 *Kpn I*으로 제한효소 처리하고 T4 polymerase로 blunt end를 만든후 *BamH I*으로 절단한 pBluescript SK(+) 벡터에 연결반응시켜 약 5.9 kb의 pSK-5'f 재조합 플라스미드를 선별하였다. 또한 p10 유전자의 3' flanking 배열은 pGEM-3'f 벡터를 *Sma I* 및 *Sac I*을 처리하여 얻은 2.0 kbp의 유전자 단편을 *Sma I* 및 *Sac I*으로 절단한 pSK-5'f에 연결반응시켜 7.9 kbp의 pBm10 전이벡터를 구축하였다.

3. pBm10 전이벡터의 구조 분석

구축한 pBm10 전이벡터의 구조를 분석하기 위해 각종 제한효소를 처리하고 0.7% 아가로스겔 전기영동으로 확인하였다(그림 3). 그 결과 pBm10 전이벡터의 3' flanking 말단에 위치하는 *Sac I* 제한효소 위치와 예상되는 외래 유전자 클로닝 위치인 *Sma I* 제한효소 위치가 각각 확인되었다. 또한 pBm10 전이벡터의 5' 및 3' flanking 배열의 제한효소 위치를 결정하기 위해 *Sac I*으로 제한효소 처리한 DNA를 *BamH I*, *Cla I*, *EcoR V*, *Hind III*, *Kpn I*, *Xba I* 및 *Xho I* 제한효소를 각각 처리하였다. 절단된 유전자 단편의 크기를 측정하여 그림 4와 같은 pBm10 전이벡터의 제한효소 지도 작성하였다. 그 결과 외래 유전자의 클로닝 위치인 *Sma I*은 p10 유전자의 5' 및 3' flanking 배열의 경계부위에 존재하였으며, 이 위치를 기준으로 *BamH I*은 200 bp, *Hind III*는 230 bp, *Xba I*

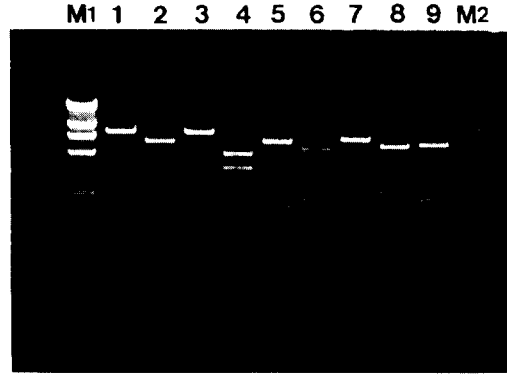


Fig. 3. Restriction endonuclease analysis of transfer vector, pBm10. The digested fragments were electrophoresed on a 0.7% agarose gel. M1: λ /Hind III marker, M2: 1kb ladder marker, 1: *Sac I*, 2: *Sac I* / *BamH I*, 3: *Sac I* / *Cla I*, 4: *Sac I* / *EcoR V*, 5: *Sac I* / *Hind III*, 6: *Sac I* / *Kpn I*, 7: *Sac I* / *Xba I*, 8: *Sac I* / *Xho I*, 9: *Sac I* / *Sma I*.

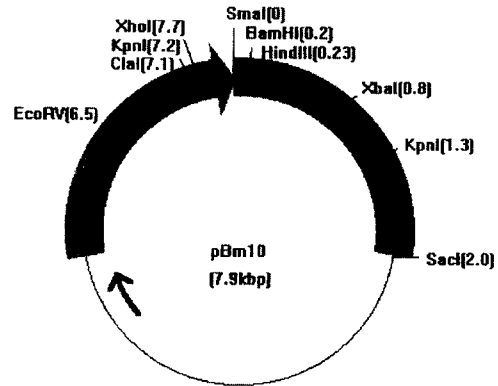


Fig. 4. Restriction enzyme map of transfer vector, pBm10. Numbers are indicated the size from cloning site *Sma I*.

I은 800 bp, *Kpn I*은 1.3 kbp 및 7.2 kbp, *Sac I*은 2.0 kbp, *EcoR V*는 6.5 kbp, *Cla I*은 7.1 kbp, *Xho I*은 7.7 kbp 하류에 각각 위치하고 있었다. 또한 전이벡터의 5' 및 3' flanking 배열의 경계부위와 그 주변부의 유전자 구조를 염기서열 분석한 결과(그림 5) p10 유전자의 번역 개시점인 ATG의 AT와 G 염기사이의 CCGG 염기배열이 삽입되어 새로운 *Sma I* 제한효소 위치가 생성되었음을 확인할 수 있었다. 이와같은 유전자 구조 변경에 따라 p10 단백질은 발현되지 않으며, 더우기 생성된 *Sma I* 위치에 번역개시점을 포함한 외래 유전자를 삽입시킴으로서 외래유전자는 p10 유전자 프로모터 조절하에 비융합형으로 발현될 것으로 추정할 수 있었다.

```

1 ATAAGAATTA TTATTAATTT ATTTGTATAT TAATTAATAAT CTIATACTGT AAATTACATT
61 TTATTTACTA TCATCCCGGTCACAAAGCCTA ACGTTTTGAC ACGAATTTTA GACGCCATTC
    SmaI
121 CGGAAACTAA CACAAAGGTT GACAGTGTTC AAATCAGTT AAACGGGCTG GANGAATCGT
181 TCCAGCTTTG GACG8TTTTGC CCGCTCAATT GACCGATTTT AACACTAAAA TCTCAGAAAT
241 TCAATCCATA TTGACCGGTG ACACTGCTCC GGATCCTCCA GACTCCTAAA GCCTACGCTG
    BamHI
    
```

Fig. 5. Nucleotide sequence of promoter and its flanking region of the transfer vector, pBm10. Translation start site and stop codon of p10 gene are indicated by shadow box and asterisk, respectively.

4. β-galactosidase 발현 재조합 바이러스 제작

BmNPV의 p10유전자를 이용해서 구축한 pBm10 전이벡터와 야생형 바이러스간의 상동재조합에 의해 외래유전자가 도입된 재조합 바이러스 제작이 가능한지를 검토하기 위해 표지 유전자로 β-gal 유전자를 사용하였다. pBm10 전이벡터에 β-gal 유전자 도입은 그림 6과 같이 수행하였다. 즉 pSV-β-galactosidase 벡터를 *Stu* I과 *Bam*H I으로 절단하여 3.7 kbp의 LacZ 유전자를 회수하였다. 이 유전자를 *Sma* I과 *Bam*H I으로 절단한 pBm10 전이벡터에 연결반응시켜 pBm10LacZ 전이벡터를 구축하였다. 이 벡터를 vB2 바이러스 DNA와 함께 BmN-4 세포에 동시감염 시키고

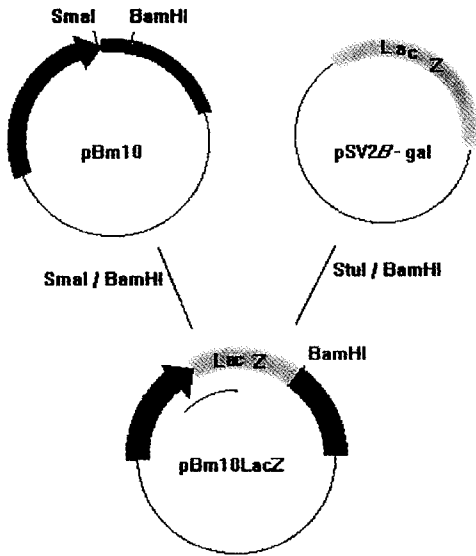


Fig. 6. Schematic diagram of the construction of recombinant transfer vector, pBm10LacZ. The β-galactosidase gene was inserted in the *Sma* I site of pBm10. The resultant plasmid contained the β-galactosidase gene under the control of p10 promoter.

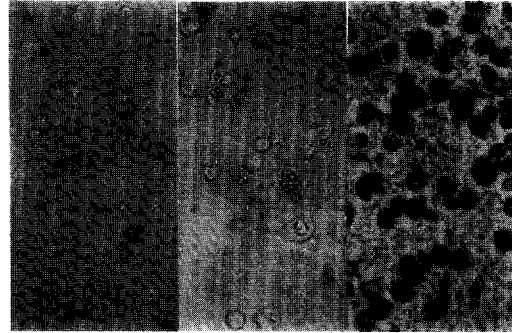


Fig. 7. In situ β-galactosidase assay of BmN-4 cells infected with recombinant virus. Mock-infected(A), BmNPV(B) and recombinant virus(C) infected BmN-4 cells were harvested at 72 hours postinfection and stained with X-gal.

Kitts & Possee의 방법(1993)에 따라 X-gal 염색하여 β-gal 발현 재조합 바이러스를 선별하였다. 선별한 재조합 바이러스는 다각체를 형성하면서 표지 유전자로 사용한 β-galactosidase를 발현하는 것을 확인할 수 있었다(그림 7). 따라서 본 연구에서 구축한 pBm10 전이벡터는 외래유전자를 야생형 바이러스에 효과적으로 전이시킬 수 있으며, 더우기 외래유전자가 도입된 재조합 바이러스는 다각체를 형성하므로써 경구접종이 가능함에 따라 유용물질의 대량생산에 응용할 경우 기존의 다각체 단백질 유전자의 프로모터를 이용한 재조합 바이러스의 경피접종에 따른 번잡함과 시간이 많이 소요되는 단점을 해결할 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

국내 양잠농가에서 수집하여 단주화한 BmNPV vB2주로부터 p10 유전자를 클로닝하고 이 유전자의 프로모터를 이용한 새로운 전이벡터를 구축하여 발현제로서의 이용 가능성을 검토한 결과 다음과 같았다.

BmNPV vB2주의 p10 유전자의 open reading frame은 210bp로 구성되어 있었으며, ATG로부터 -71bp 상류에 감염말기 유전자에 공통으로 존재하는 전사개시에 관련된 TAAG와 TAA로부터 71bp 및 140bp 하류에 잠정 polyadenylation signal site가 존재하였다. 또한 p10 유전자의 5' 및 3' flanking 부위를 PCR로 클로닝하고 pBluescript II SK(+)벡터에 각각 삽입하여 7.9 kb의 pBm10 전이벡터를 구축하였다. 구축한 pBm10 전이벡터의 제한효소절단위치를 *Sma*I 위치를 기준으로 *Bam*HI(0.2), *Hind* III(0.23),

XbaI(0.8), *KpnI*(1.3, 7.2), *SacI*(2.0), *EcoRV*(6.5), *Clal*(7.1), *XhoI*(7.7)로 결정하고 전이백터 지도를 작성하였다. pBm10의 부분염기서열 분석에서 p10 유전자의 ATG의 AT와 G사이에 CCCGG가 삽입되어 그 결과 *SmaI* 제한효소위치가 생성되었음을 확인하였다. 구축한 pBm10에 β -gal 유전자를 삽입하고 BmNPV(vB2주)와 BmN-4 세포에 동시감염시켜 선발한 재조합 바이러스는 다각체를 형성하면서 β -galactosidase을 발현하였다.

이상의 결과로부터 p10 유전자로 구축한 pBm10 전이백터로 제작한 재조합 바이러스는 다각체를 형성하면서 외래유전자를 발현하므로써 유용물질의 대량생산시 경구접종에 따른 노력 및 시간을 절약할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- Blissard, G. W. and Rohrmann, G. F. (1990) Baculovirus diversity and molecular biology, *Annu. Rev. Entomol.*, **35**: 127-155.
- Fraser, M. J., Smith, G. E. and Summers, M. D. (1983) Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses: relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis viruses, *J. Virol.*, **47**: 287-300
- Hu, N. T., Lu, Y. F., Hashimoto, Y., Maeda, S. and Hou, R. F. (1994) The p10 gene of natural isolates of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus encodes a truncated protein with an Mr of 7700, *J. Gen. Virol.*, **75**: 2085-2088.
- Inoue, H. and Mitsuhashi, J. (1984) A *bombyx mori* cell line susceptible to a nuclear polyhedrosis virus, *J. Seric. Sci. Jpn.*, **53**: 108-113.
- Kitts, P. A. and Possee, R. D. (1993) A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency, *Biotechniques*, **14**: 810-817.
- Kuzio, J., Rohel, D. Z., Curry, C. J., Krebs, A., Carstens, E. H. and Faulkner, P. (1984) Nucleotide sequence of the p10 polypeptide gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, *Virology*, **139**: 414-418.
- Maeda, S. (1989) Invertebrate cell system and applications, CRC press, Boca Raton, Fla. pp. 167-182
- Manley, J. L. (1995) Messenger RNA polyadenylation: A universal modification, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**: 1800-1801.
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K. and Luckow, V. A. (1992) Baculovirus expression vector-A laboratory manual, W. H. Freeman and Company, New York.
- Pennock, M. D., Shoemaker, C. and Miller, L. K. (1984) Strong and regulated expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in insect cells with a baculovirus vector, *Mol. Cell. Biol.*, **4**: 399-406.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) Nucleotide sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**: 5463-5467.
- Van der Wilk, F., Van Lent, J. W. M. and Vlak, J. M. (1987) Immunogold detection of polyhedrin, p10 and virion antigens in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected *S. frugiperda* cells, *J. Gen. Virol.*, **68**: 2615-2623
- Van Oers, M. M., Flipsen, J. T. M., Reusken, C. B. E. M., Sliwinsky, E. L., Goldbach, R. W. and Vlak, J. M. (1993) Functional domains of the p10 protein of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, *J. Gen. Virol.*, **74**: 563-574
- Williams, G. V., Rohel, D. Z., Kuzio, J. and Faulkner, P. (1989) A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion/deletion mutants, *J. Gen. Virol.*, **70**: 187-202.
- Zuidema, D., Van Oers, M. M., Van Strien, E. A., Caballero, P. C., Klok, E. J., Goldbach, R. W. and Vlak, J. M. (1993) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the p10 gene of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus, *J. Gen. Virol.*, **74**: 1017-1024.