

## IPTG의 첨가 시간이 대장균(*Escherichia coli*)에서 순무 모자이크 바이러스(TuMV)의 외피단백질 발현에 미치는 영향

김수중 · 박원목<sup>1\*</sup> · 류기현<sup>2</sup> · 이상선 · 이세영<sup>1</sup>

고려대학교 자연자원대학 농생물학과, <sup>1</sup>고려대학교 생명공학원

<sup>2</sup>Dept. Plant Pathology, Cornell University, Ithaca, New York, 14853. U.S.A

### Effect of Timing of IPTG Addition on Expression of Turnip Mosaic Virus Coat Protein Gene in *Escherichia coli*

Su Joong Kim, Won Mok Park<sup>1\*</sup>, Ki Hyun Ryu<sup>2</sup>, Sang Seon Lee and Se Yong Lee<sup>1</sup>

Dept. Agricultural Biology, Korea University, Seoul 136-701 Korea

<sup>1</sup>Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701 Korea

<sup>2</sup>Dept. Plant Pathology, Cornell University, Ithaca, New York, 14853, U.S.A.

**ABSTRACT:** Expression vector (pGEX-Tu) for the coat protein (CP) gene of turnip mosaic virus Ca strain (TuMV-Ca) was constructed by incorporation of TuMV CP gene into pGEX-KG vector which had  $\beta$ -galactosidase gene and IPTG (isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside) induction site. The results of ELISA and western hybridization indicated that optimal condition of the expression were when IPTG induction was carried out on YTA medium with ampicillin in 2 hours after the *E. coli* seed inoculation ( $A_{595}=0.1/ml$ ). TuMV CP gene was expressed with GST (Glutathion S-Transferase) gene fusion system, and the size of fusion protein was estimated to be 59 kDa, for TuMV CP was 33 kDa and GST was 26 kDa.

**Key words:** coat protein (CP), GST (Glutathion S-Transferase), protein expression, turnip mosaic virus (TuMV).

순무 모자이크 바이러스(turnip mosaic virus, TuMV)는 potyviridae에 속하며 세계의 많은 지역에서 십자화과 작물인 배추, 무 등에 발생하여 큰 피해를 일으키는 것으로 알려진 바이러스이다(3, 5, 10). 특히 기주 범위가 좁은 관계로 바이러스의 증식이 쉽지 않고(8, 9), potyvirus는 VPg로 인하여 자체적으로 응집이 잘 일어나며, 기주 세포내 바이러스의 농도가 높지 않으므로 순화된 바이러스를 확보하기가 어렵다. 따라서 바이러스의 외피단백질을 대장균에서 발현시킬 경우 이를 이용한 항혈청 생산이 용이해질 수 있다.

특정 유전자를 대장균에서 발현시키는 연구는 이미 많은 실험을 통해서 확인된바 있다(1, 4, 12, 15, 16). 이들의 실험 목적은 대부분 특정 유전자의 기능을 확인하기 위하여 유전자를 대장균에서 발현시키고 그 단백질을 분리하여 기능을 확인하기 위하여 실시하였다. 최근의 경우 특정 유전자의 기능을 확인하기 위하

여 발현된 단백질에 대한 항혈청을 만들고 이를 이용해서 특정 세포에서 발현되는 위치를 확인하는 실험이 주로 이루어지고 있다(4). 그러나 아직까지 바이러스의 외피단백질을 발현시켜 그 단백질에 대한 항혈청을 제조하고 바이러스 진단용 항혈청으로 이용한 경우는 없었다. 대장균에서 특정 단백질을 발현시키는 경우에는 그 적절한 조건을 확립하는 것이 가장 중요하다 할 수 있다. 때문에 이미 많은 학자들에 의해서 단백질의 발현에 영향을 주는 요인에 대한 연구가 보고되어 있다(1, 15, 16).

최 등(1992)은 강원도 대관령 주변의 배추 재배 포장에서 심한 모자이크 증상과 괴저 증상을 보이는 시료를 채집하여 바이러스를 동정한 결과 TuMV와 오이 모자이크 바이러스(cucumber mosaic virus, CMV)가 중복 감염되어 있음을 관찰하였다. 이를 국부병반형성 기주인 붉은 명아주(*Chenopodium amaranticolor*)를 이용하여 TuMV를 순수 분리하여, 기주 반응 조사를 실시한 결과 기존의 TuMV와 차이가 있음

\*Corresponding author.

을 확인하여 이를 TuMV-Ca(chinese cabbage) 계통으로 명명하였다(2, 11). TuMV는 일종의 외피단백질을 지니고 있으며 그 크기는 32-34 kDa이다. 이는 바이러스가 합성하는 polyprotein 중 바이러스의 단백질 분해효소에 의해서 분리, 형성되는 것으로 보고되어 있다(3, 6, 7, 10). TuMV-Ca는 33 kDa의 외피단백질과 이로부터 변형된 26 kDa의 외피단백질을 가지고 있다(5, 13). GST(glutathion S-transferase) gene fusion system은 대장균(*E. coli*)에서 단백질을 발현시키고 발현된 단백질을 순화할 수 있는 방법이다. GST gene fusion system은 *Schistosoma japonicum*으로 부터 분리된 26 kDa의 glutathion S-transferase와 IPTG(isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside) 발현 부위를 지니고 있기 때문에 IPTG에 의해서 목적 단백질이 GST와 함께 다량 발현된다(15). 본 실험에서는 바이러스의 외피단백질 유전자와 GST gene fusion system을 이용하여 발현백터를 구축하고 본 단백질 발현의 최적 조건을 결정하기 위하여 일차적으로 IPTG의 첨가 시간별 TuMV 외피 단백질의 발현 정도를 비교하였다.

## 재료 및 방법

**바이러스, cDNA 시료.** 순화된 바이러스를 sodium dodecyl sulfate(SDS)/chloroform/proteinase K를 처리하여 genomic RNA를 분리하여 cDNA 합성용 주형으로 사용하였다. cDNA 합성은 oligo dT primer와 SuperScript reverse transcriptase system(Super-Script™ plasmid system, Gibco BRL)을 이용하였다. 합성된 cDNA는 *NotI/SalI*으로 절단된 pSPORT1에 T<sub>4</sub> DNA ligase로 삽입시킨 후 대장균(NM522)에 형질전환 하였으며 클론은 ampicillin(Amp, 100  $\mu$ g/ml)이 첨가된 LB배지에서 선발하였다. 선발된 클론은 alkaline lysis 방법으로 plasmid를 분리한 후 제한효소 처리와 전기영동을 통해 pTUCA 35 클론이 TuMV의 외피단백질 유전자를 지니고 있었다.

**발현 벡터의 구축 및 형질전환.** pGEX-KG에 pTUCA 35를 삽입시켜서 TuMV 외피단백질 발현백터(pGEX-Tu)를 제작하였다(Fig. 1). pGEX-KG(GST fusion protein expression vector)는 IPTG 다량 발현 부위인 lacZ gene과 thrombin 절단부위인 X-site를 지니고 있다. TuMV는 polyprotein을 형성하기 때문에 외피단백질은 개시 코돈(ATG)을 지니고 있지 않으므로, TuMV 외피단백질 유전자에 *NcoI* adaptor를 결합시킨 후 *NcoI*(C/CATGG)을 절단하여 인위적으로 개시 코돈을 형성시키고 pGEX-KG에 T<sub>4</sub> DNA ligase를 사용

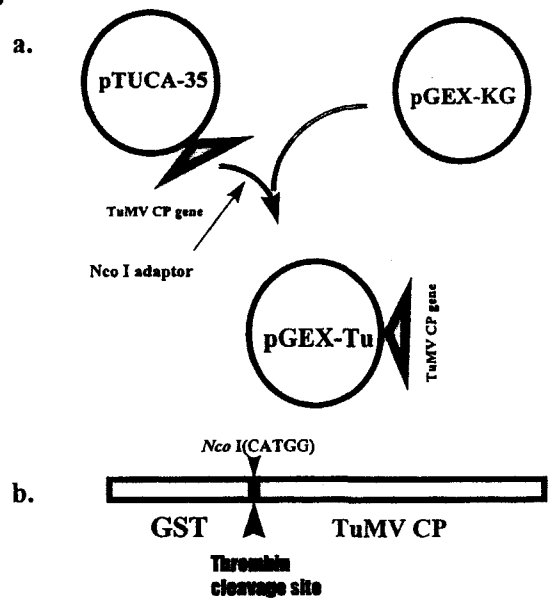


Fig. 1. Construction of TuMV CP expression vector pGEX-Tu. a: vector construction scheme TuMV CP: turnip mosaic virus coat protein, b: structure of fusion protein. GST: glutathion S-transferase.

하여 삽입시켰다. 재조합된 발현백터(pGEX-Tu)는 대장균 NM522에 형질전환시켰고, 형질전환된 개체는 암피실린이 첨가된 LB 배지에서 선발하였다.

**TuMV 외피단백질의 발현.** pGEX-Tu를 지니고 있는 대장균(NM522)을 5 ml의 YTA(trypton 15 g, yeast extract 10 g, NaCl 5 g, pH 7.0) 배지에  $A_{595}=0.1$ 의 균 농도로 접종하였다. 최적의 발현시간을 결정하기 위하여 대장균 접종 후 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 시간만에 배지 1 ml당 1 mM의 IPTG를 첨가시킨 후 37°C incubator에서 150 rpm의 속도로 총 대장균 접종후 10시간을 진탕배양 하여 IPTG 첨가 시간별 발현되는 단백질 양을 비교하였다. 전체 발현된 대장균의 단백질 분리는 배양액을 1.5 ml micro tube에 넣은 후 microcentrifuge로 15,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 대장균을 수확하였다. 수확된 대장균에 100  $\mu$ l의 10% SDS(sodium dodecyl sulfate)를 첨가시킨 후 1분간 vortexing을 실시하고 끓는 물에서 10분간 열처리한 후 원심분리 하여 전체 단백질이 함유된 상등액을 새 tube로 옮긴 후 전기영동 및 혈청학적 실험의 시료로 이용하였다(14).

**단백질 전기영동.** 전기영동을 위한 시료는 분리된 전체 단백질과 2X treatment buffer(0.125 M Tris-Cl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol and 10%  $\beta$ -mer-

captoethanol)를 1:1의 비율로 혼합한 후 5분간 끓는 물에서 열처리하여 변성시켰다. 전기영동은 12% polyacrylamide SDS gel과 Tris glycine buffer를 이용하여, 100 V에서 20분 전기영동 후 150 V에서 1시간 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 탈색용액(100 ml methanol, 70 ml glacial acetic acid/1 L)으로 탈색하여 단백질 밴드를 관찰하였다.

**혈청학적 검정.** 형질전환된 대장균에서 TuMV의 피단백질의 발현 유무를 검정을 위하여 한천젤 이중확산법(agar gel double diffusion test), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)와 Western-blotting을 실시하였다. TuMV 항혈청은 순화된 TuMV-Ca를 토끼에 근육주사한 후 2주 지나고부터 2주 간격으로 귀정맥에서 채혈한 혈액에서 항혈청을 분리하여 본 실험에 이용하였다. 한천젤 이중확산법은 phosphate buffer saline(PBS)로 0.8% agarose gel plate를 준비한 후 TuMV 항혈청을 중앙에 그리고 발현 단백질을 주위의 well에 첨가시킨 후 25°C 항온기에서 16시간 동안 반응시켜 침강선 형성의 유무를 확인하였다. ELISA는 96 well의 polystyrene plate(Green Cross, Korea)에 TuMV IgG로 1차 coating 후 발현된 단백질을 시료를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 1% Tween-20이 함유된 PBS로 3회 세척하였다. 2차 항혈청은 alkaline phosphatase로 표지된 TuMV IgG를 사용하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 같은 방법으로 3회 세척하였다. 발색반응은 p-nitrophenyl phosphate를 기질로 첨가시켜서 상온에서 반응시킨 후 EL340 ELISA reader(Bio-Tek)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Western-blotting은 단백질을 12% polyacrylamide SDS gel에서 전기영동을 실시한 후 Transphor Electrophoresis Unit(Hoefer)를 이용하여 65 V에서 16시간 동안 nylon membrane에 transfer시켰다. 단백질이 transfer된 nylon membrane은 blocking solution(5% Skimic milk, PBS)에 담은 후 25°C 항온기에서 교반(30 rpm)하여 단백질이 없는 빈 공간을 메꾸어준 다음, TuMV 항혈청을 blocking solution으로 1/1000의 비율로 희석한 용액에 membrane을 담그어 25°C에서 1시간 동안 교반(30 rpm)하여 1차 반응을 끝낸 후 PBS로 각각 5분씩 3회 세척하였다. 2차 항혈청인 Alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit antibody(Boehringer Mannheim)을 blocking solution으로 1/5000의 비율로 희석한 용액에 1시간 동안 교반(30 rpm)하였다. 반응이 끝난 membrane은 PBS로 3회 각 5분씩 세척하였다. 발색반응은 NBT 45 µl와 X-phosphate solution

(BCIP) 35 µl을 10 ml의 detection buffer(0.1 M Tris-Cl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5)에 첨가시킨 용액에 membrane을 넣고 37°C 항온기에서 15분간 정치시켜 실시하였다. 발색이 끝난 후 membrane은 증류수로 세척하여 반응을 정지시켰다.

## 결 과

**발현벡터 구축.** pGEX-KG 벡터에 pTUCA 35의 외피단백질 유전자를 도입시켜 TuMV의 외피단백질 발현벡터인 pGEX-Tu를 구축한 후 이것을 대장균 NM522에 도입시켰다. 이를 암피실린이 포함된 LB 배지에서 선발하고 선발된 클론은 agarose gel 전기영동

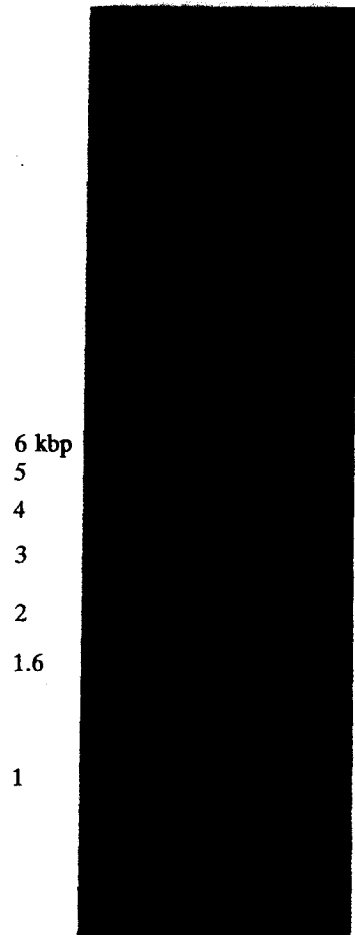


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of pGEX-KG expression vector and constructed TuMV CP expression (pGEX-Tu) vector. lane M: 1 kb DNA size marker (Gibco BRL), lane 1: pGEX-KG, lane 2: pGEX-Tu.

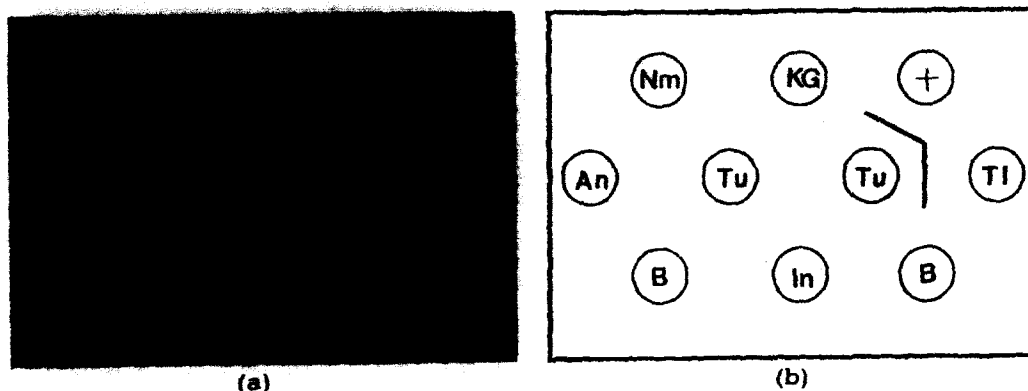


Fig. 3. Gel double diffusion test of expressed proteins with TuMV-Ca antiserum. a: The photograph of gel double diffusion test, b: The illustration of fig. (a). Tu: TuMV-Ca antiserum, TI: TuMV CP induced by IPTG and Amp, An: TuMV CP induced by IPTG, In: TuMV CP induced by Amp, KG: pGEX-KG induced by IPTG and Amp, NM: *E. coli* NM522 induced by IPTG and Amp, +: TuMV Ca virus particles, B: phosphate buffer saline.

을 통해서 크기를 확인하였다(Fig. 2). 이 클론은 제한 효소(*NcoI/BamHI*) 처리에 의해 TuMV CP gene이 삽입되어 있음을 확인하였다.

**혈청학적 검정.** TuMV 항혈청을 이용한 한천겔 이중확산법에서 pGEX-Tu로 형질전환된 대장균(NM522)의 발현된 단백질은 TuMV 항혈청과 반응하여 침강선을 보였다. 그러나 pGEX-KG만을 지니는 대장균과 pGEX-Tu가 없는 대장균(NM522)에서는 침강선을 관찰할 수 없었다. 또한 형성된 침강선에서 spore가 형성되지 않음을 보아 순화된 TuMV 바이러스의 외피단백질과 발현된 단백질이 동일한 것으로 확인되었다. 형질전환된 대장균의 경우에도 IPTG를 첨가하지 않은 경우와 암피실린을 첨가시키지 않은 경우에는 침강선을 관찰할 수 없었다(Fig. 3). ELISA를 이용한 검정에서도 pGEX-Tu가 없는 NM522와 pGEX-KG만을 가진 NM522의 경우 IPTG, 암피실린을 이용하여 단백질의 발현을 촉진하였지만 TuMV 항혈청과는 양성 반응이 일어나지 않았다. 그러나 pGEX-Tu를 지니는 NM522에서는 강한 발색반응을 보여서 TuMV 외피단백질이 합성되었음을 확인할 수 있었다. 단백질 발현 촉진제로 IPTG와 Amp를 모두 이용한 경우에서 가장 강한 반응을 보였고 Amp만을 첨가시킨 경우보다는 IPTG만을 첨가시킨 경우에서 보다 뚜렷한 양성 반응을 보였다(Fig. 4). Western-blotting의 결과에서도, ELISA의 경우와 유사하게 나타났다(Fig. 5). NM522 혹은 pGEX-KG로 형질전환된 NM522의 경우에는 양성 반응이 관찰되지 않았지만, pGEX-Tu로 형질전환된 NM522에서는 목적 밴드 위치에서 양성 반응을 보였다. 그러나 목적 단백질 뿐 아니라 예상한 크기

보다 작은 단백질에서도 양성 반응을 관찰할 수 있었으며 그 크기는 약 38 kDa 정도로 TuMV의 외피단백질보다는 더 크게 관찰되었다.

**TuMV 외피단백질 발현의 최적 조건.** IPTG 첨가 시간별로 발현된 TuMV 외피단백질의 양을 검정하여 본 결과 대장균 접종 2시간 후에 IPTG를 첨가하는 것이 가장 효과적이었다(Fig. 6). 이를 ELISA를 이용하여 발색 정도로 발현된 단백질의 양을 검정한 결과 역시 동일한 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 7). 그러므로 대장균에서 목적 단백질의 발현을 위해서는 Amp를 균의 접종과 동시에 첨가하며 2시간 후에 IPTG를 첨가하는 것이 가장 효과적인 것으로 관찰되었다.

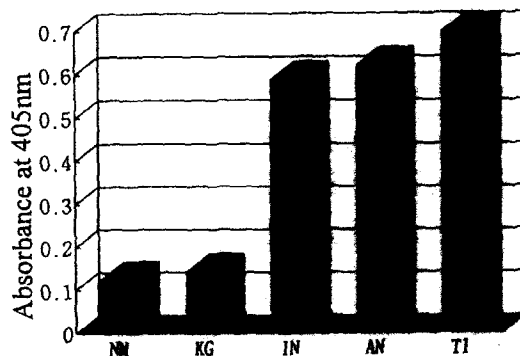


Fig. 4. ELISA test absorbance for the coat protein of TuMV. NM: *E. coli* NM522 induced by IPTG and Amp, KG: pGEX-KG induced by IPTG and Amp, In: TuMV CP induced by Amp, An: TuMV CP induced by IPTG, TI: TuMV CP induced by IPTG and Amp.

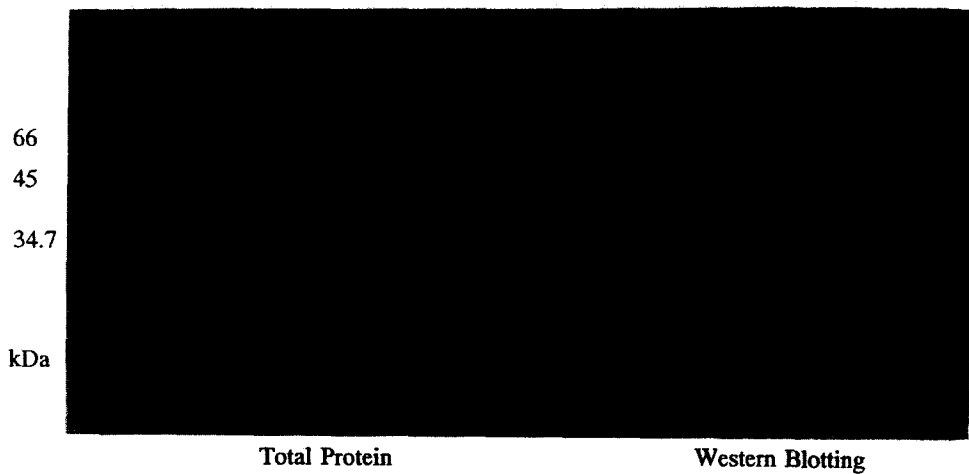


Fig. 5. Total protein and Western blotting of coat protein extracted from host cells. Arrows indicate target proteins. M: SDS-6 protein size marker (Sigma), lane 1,6: pGEX-Tu (IPTG and Amp), lane 2,7: pGEX-Tu (Amp), lane 3,8: pGEX-KG (IPTG and Amp), lane 4,9: pGEX-Tu (IPTG), lane 5,10: *E. coli* NM522 (IPTG and IPTG).

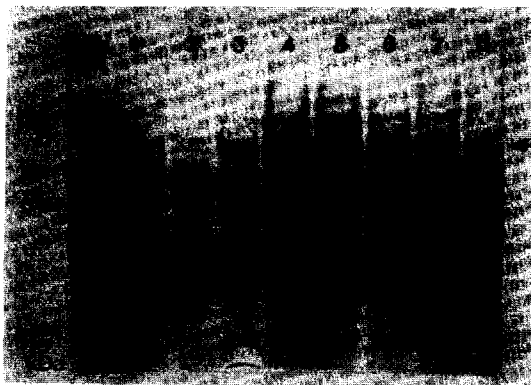


Fig. 6. SDS-PAGE profile of expressed proteins during different times of IPTG induction. Gel was stained with Commassi brilliant R-250 (Sigma). Arrows indicate target protein. M: SDS-6 protein size marker (Sigma). Lane 1: pGEX-Tu no IPTG induction, 2: IPTG induction after 0 hr, 3: IPTG induction after 1 hr, 4: IPTG induction after 2 hr, 5: IPTG induction after 3 hr, 6: IPTG induction after 4 hr, 7: IPTG induction after 5 hr, 8: IPTG induction after 6 hr.

고 찰

순무 모자이크 바이러스 Ca 계통(TuMV-Ca)의 외피 단백질 유전자를 pGEX-KG에 삽입시켜 외피단백질 발현벡터인 pGEX-Tu를 구축하고, 이를 대장균(NM522)에 형질전환시킨 결과 본 대장균에서 외피단백질이 발현되었다. 대장균을 이용한 단백질의 발현은 이

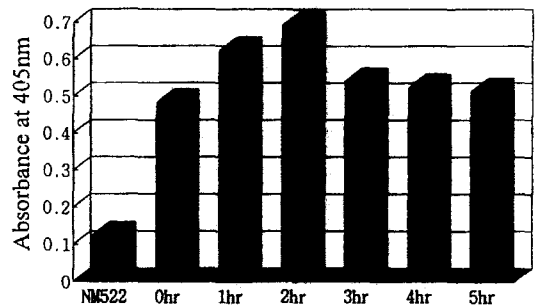


Fig. 7. ELISA test absorbance for different times of the IPTG induction time. NM522: *E. coli* NM522 strain. 0 hr: inoculation and induction were carried out same time, 1 hr: induction in 1 hr after inoculation, 2 hr: induction in 2 hr after inoculation, 3 hr: induction in 3 hr after inoculation, 4 hr: induction in 4 hr after inoculation, 5 hr: induction in 5 hr after inoculation.

미 많은 실험을 통해서 확인된바 있다(1, 4, 12, 15, 16). 이들의 실험 목적은 대부분의 경우 특정 유전자의 기능을 확인하기 위한 경우였다. 그러나 본 실험에서는 단백질의 양이 많이 분리, 수확되지 않는 바이러스의 외피단백질을 대장균에서 다량으로 합성한 뒤 항혈청을 합성하고 진단에 사용하기 위한 전 단계로서 단백질을 합성하였다. 본 실험에서 단백질 발현의 최적 조건은 발현 벡터를 지니고 있는 대장균(NM522)을 A<sub>595</sub>=0.1의 농도로 YTA배지(암피실린 100 µg/ml)에 접종한 2시간 후에 IPTG를 첨가하는 것이었다. 이는 대장균의 농도와 IPTG의 발현시간이 밀접한 관계가 있음을

알게 해준다. 이러한 최적 조건은 Smith와 Johnson (15)의 결과와 유사하였다. 그러나 그들은 IPTG 첨가 시간보다는 오히려 첨가 후의 시간별 발현 양에 더 중점을 두고 실험하여 본 실험의 방법과는 다소 차이가 있었다. IPTG만을 처리한 경우와 암피실린만을 처리한 경우 목적 단백질의 양에서 차이점이 발견되는데, 이는 단백질의 발현 양이 벡터의 수보다는 IPTG 존재 유무에 대해 더 영향을 받음을 알 수 있다. Tsung 등 (17)에 의하면 단백질의 발현량은 벡터 내부의 목적 유전자의 수와도 관계가 있으며, 특히 한 벡터 내에서 동일 유전자가 반복되어서 발현되는 경우 이들의 발현률이 오히려 감소하고 하나의 유전자만을 벡터에 삽입시킨 경우에 가장 많은 양의 단백질이 발현된다고 보고한바 있다. 본 실험의 경우 다양한 유전자의 수를 조절하지 않았기 때문에 이에 대한 분석은 어렵지만 하나의 유전자만을 이용하였으므로 발현 양에는 세균의 주어진 환경에 의하여 영향을 받는다고 생각된다. 즉 본 세균은 암피실린을 첨가하고 IPTG를 첨가한 조건에서 외피단백질이 형성되며 특히 접종후 2시간만에 IPTG의 첨가 시에 가장 외피단백질의 발현률이 높았다. 따라서 형질전환된 세균에서 목적 단백질의 생산을 위해서는 기질의 첨가 시간을 조절하여야 한다고 사료된다. 한천젤 이중확산법을 이용한 실험 결과 IPTG만을 첨가시킨 것과 암피실린만을 첨가시킨 경우의 시료에서 양성 반응을 볼 수 없었던 반면에 ELISA에서는 두 조건에서도 목적 단백질의 합성을 볼 수 있었다. 이는 IPTG 혹은 암피실린만으로는 목적 단백질의 합성이 미약하여 한천젤 이중확산법으로는 검사할 수 없었던 반면 반응이 민감한 ELISA에서는 검사가 가능하여 각 방법의 진단 한계에 의한 결과로 추정된다. Western-blotting의 결과 목적 단백질 보다 작은 크기의 단백질 밴드도 관찰되었다. 이 단백질에 대해서는 두 가지 가능성이 있다고 추정되었다. 첫째 SDS-PAGE를 이용한 바이러스 외피단백질 분석에서 나타나는 변성된 바이러스 외피단백질로 추정하였다(3, 5, 6). 그러나 변성된 형태의 단백질이 형성되는 것이 바이러스의 단백질 분해 효소에 의한 것으로 알려져 있다(3, 6). 그러므로 본 실험에서 발현시킨 단백질은 바이러스의 외피단백질 한 종류이기 때문에 바이러스의 단백질 분해 효소가 존재하지 않았기 때문에 이에 의해 형성되는 변형된 형태로 보기는 힘들다. 둘째 결합 단백질이 대장균의 시료 제조 과정에서 각각 GST와 TuMV CP로 분리되어 관찰된 것으로 추정하였다. 그러나 아직 이에 대한 보고가 없고 형성된 단백질의 크기가 외피단백질보다 큰 38 kDa으로 관찰

되었기 때문에 이에 대한 가능성도 역시 낮다고 할 수 있다. 마지막으로 대장균 자체가 형성하는 단백질 분해 효소에 의해서 단백질이 변성되었을 가능성이 있다. 그러나 이 경우에도 아직까지 이러한 현상에 대한 보고가 없어서 다소 가능성이 희박하다고 할 수 있겠다.

## 요 약

순무우 모자이크 바이러스 Ca 계통(TuMV-Ca)의 외피단백질을 대장균 NM522 strain에서 발현시켰다. 발현된 바이러스 단백질은 한천젤 이중확산법, ELISA와 Western blotting을 이용하여 확인하였다. 외피단백질 발현 벡터(pGEX-Tu)의 구축은 IPTG induction site를 지니는 pGEX-KG에 TuMV-Ca 외피단백질 유전자를 결합하였다. 최적 단백질 발현 조건은 pGEX-Tu를 지니는 대장균을 액체 배지 1 ml당  $A_{595}=0.1$ 의 농도로 접종한 후 2시간 뒤에 IPTG를 최종 농도를 1 mM로 조절하여 induction 시키는 경우였다. 합성된 목적 단백질은 발현 벡터의 특성상 GST(Glutathion S-transferase) 단백질과 결합된 형태로 약 59 kDa의 단백질이었다(TuMV CP 33 kDa + GST 26 kDa)

## 감사의 말씀

이 연구는 경상대학교의 Korea Research Foundation Plant Molecular Biology & Biotechnical Research Center의 SRC연구비에 의해서 수행되었다.

## Reference

1. Cleland, J. L. and Craik, C. S. 1996. Protein Engineering: Principles and Practice. pp. 101-127. Wiley-Liss. Inc. Canada.
2. Choi, C. W., Ryu, K. H., Choi, S. R., Park, W. M. and Yoon, K. E. 1992. Mixed infection of turnip mosaic virus and cucumber mosaic virus identified from vegetables in Daekwallyeong area. *Korean Plant Pathology Newsletter* 3(2): 85-85.
3. Choi, J. K. and Wakimoto, S. 1979. Characterization of the protein components of turnip mosaic virus. *Annals Phytopathology Society of Japan* 45: 353-357.
4. Choi, K. Y., Kim, D. H., Park, Y. S., Kim, S. S., Lew, J. and Nam, H. G. 1995. Cloning, expression and purification of the 27 kDa protease in the nuclear inclusion protein A (NIa) of turnip mosaic virus C5. *Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Fran-*

- cisco, California, USA, May 21-25, 1995. *FASEB Journal* 9(6): A1433.
5. Choi, S. R. 1994. Characterization of turnip mosaic virus isolated from *Brassica campestris* subspecies *perkinensis*. M. S. thesis, Korea university.
  6. Haq, Q. M. R., Sribastava, K. M., Raizada, K. K., Singh, B. P., Jain, R. K. Mishra, A. and Shukla, D. D. 1994. Biological, serological and coat protein properties of a strain of turnip mosaic virus causing a mosaic disease of *Brassica campestris* and *B. juncea* in India. *Journal of Phytopathology* 140: 55-64.
  7. Kong, L. J., Fang, R. X., Chen, Z. H. and Mang, K. Q. 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of coat protein gene of turnip mosaic virus. *Nucleic Acid Research* 18(18): 5555.
  8. Luciano, C. S., Murphy, J. F., Rhoads, R. E., and Shaw, J. G. 1991. VPg-mediated aggregation of potyviral RNA. *Journal of General Virology* 72: 205-208.
  9. Mandahar, C. L. 1989. Plant Viruses: Volume I Structure and Replication. pp: 19-24. CRC Press. Florida.
  10. Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. and Summers, M. D. 1995. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses (Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses). pp: 348-354. Springer-Verlag Wien New York.
  11. Park, W. M., Kim, S. J. and Ryu, K. H. 1994. Nucleotide sequence analysis of 3' untranslated region of turnip mosaic Ca strain genomic RNA. *Proceedings of KGSPB '94*. 68: 279
  12. Pecker, I., Gabbay, R., Cunningham Jr. F. X. and Hirschberg, J. 1996. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene  $\beta$ -cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Molecular Biology* 30: 807-819.
  13. Ryu, K. H. and Park, W. M. 1994. Complementary DNA cloning and restriction mapping of nuclear inclusion body and coat protein gene of turnip mosaic virus-Ca strain genomic RNA. *Korean Journal of Plant Pathology* 10(3): 135-239.
  14. Sambrook, J. F., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
  15. Smith, D. B. and Johnson, K. S. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathion S-transferase. *Gene* 67: 31-40.
  16. Sorensen, M. A., Kurland, C. G. and Pedersen, S. 1989. Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 207: 365-377.
  17. Tsung, K., Inouye, S. and Inouye, M. 1989. Factors affecting the efficiency of protein synthesis in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 264(8): 4428-4433.

(Received July 15, 1997)