

## 파밤나방 세포주에서 *Autographa californica* 핵다각체병 바이러스의 감염 특성

최재영 · 우수동 · 홍혜경 · 강석권\*  
서울대학교 농업생명과학대학 응용생물화학부

**Characteristics of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus in *Spodoptera exigua* Cell Line.** Choi, Jae-Young, Soo-Dong Woo, Hey-Kyung Hong, and Seok-Kwon Kang\*. *Division of Applied Biology & Chemistry, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea*—To study the usefulness of Se301 cells, which is originated from *Spodoptera exigua* and has susceptibility to the *Autographa californica* NPV (AcNPV), as a host for the AcNPV-based expression vector system, we compared the characteristics of AcNPV in Se301 and Sf-21 cells. The symptom by viral infection was similar in both of cells, but the ratio of polyhedra released from the cell was higher in Se301 cells than in Sf-21 cells. The overall PIB productivity of AcNPV was similar in both cells but the size of polyhedra was larger in Se301 cells. While the polyhedrin expression efficiency was about 2.4 times higher in Se301 cells than in Sf-21 cells, the viral growth was higher in Sf-21 cells. These results suggested that Se301 cell is very useful in the AcNPV-based expression system as a host.

**Key words:** AcNPV, host cell, Se301, Sf-21, expression system

곤충 바이러스인 핵다각체병 바이러스(Nuclear Polyhedrosis Virus; NPV)는 해충 방제를 위한 살충제로서 뿐만 아니라, 그 다각체 단백질(polyhedrin) 유전자의 강력한 promoter를 이용하여 유용한 물질을 생산할 수 있는 baculovirus 발현 벡터계가 개발되어 그에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다[7, 11]. Baculovirus 발현 벡터계가 처음으로 개발된 것은 Smith 등[10]에 의하여 *Autographa californica* NPV(AcNPV)와 *Spodoptera frugiperda*(Sf) 배양 세포계를 조합한 것이며, 그 후 Maeda 등[8]이 누에 핵다각체병 바이러스(*Bombyx mori* NPV; BmNPV)와 누에 종령 유충 생체를 이용한 벡터계를 개발하여 현재 이 두가지 형태의 벡터계를 중심으로 연구가 이루어지고 있다. 이러한 baculovirus 발현 벡터계는 진핵 세포계인 곤충 세포를 이용함으로써 외래 유전자의 발현 수준이 높을 뿐만 아니라 안정하며, 이 발현계를 이용하여 생산된 단백질은 생물학적 활성 및 면역학적 성질이 원래의 단백질과 매우 유사한 것으로 보고됨으로써 진핵 및 원핵 생물로부터 유래한 다양한 유전자가 이 발현 벡터계를 이용하여 발현되고 있다[5, 9].

그 중 AcNPV를 이용한 발현 벡터계의 경우 이용할 수 있는 숙주 세포로서 *S. frugiperda*의 난소 세포로부터 유래한 Sf-21 및 Sf-9 세포주와 *Tricoplusia ni*로부터 유래

한 TN-368 및 BTI-TN-5B1-4 세포주 등이 확립되어 있다[9]. 그 중 Sf-9과 Sf-21 세포주는 생장율이 우수하고 조작하기가 쉬우며 많은 연구가 이루어져 숙주 세포로서 가장 많이 이용되고 있으며, TN-368 세포주는 Sf-21 세포주와 유사한 수준의 바이러스 증식과 단백질 합성을 보이나 부유 배양시 세포가 영기는 단점을 가지고 있다[9]. 또한, BTI-TN-5B1-4 세포주의 경우는 Sf-9 세포주에 비해 10배 가량 높은 외래 유전자 발현 특성을 가지고 있으나 부유 배양이 불가능하고 바이러스와 관련된 특성에 관한 연구가 많이 이루어져 있지 않아 숙주 세포로의 사용에 제약을 받고 있다[9]. 그런데 최근에 바이러스의 증식이 매우 활발하게 이루어지는 세포주가 파밤나방(*Spodoptera exigua*)으로부터 확립됨으로써[2, 3] 이의 숙주 세포로의 이용 가능성이 제시되었다.

따라서 본 연구에서는 새로이 확립된 파밤나방 세포주의 AcNPV를 이용한 발현 벡터계의 숙주 세포로서 그 이용 가능성을 알아보기 위하여 Se301 및 Sf-21 세포주에서 AcNPV의 증식 특성 및 다각체 단백질 발현 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 바이러스 및 곤충 세포주

바이러스는 미국 도입종인 AcNPV를 각 숙주 곤충의 유충 및 세포주에서 증식시켜 실험에 이용하였다. 그 외

\*Corresponding author

Tel. 82-331-290-2481, Fax. 82-331-296-0926  
E-mail: kskipl@plaza.snu.ac.kr

*S. exigua* NPV(SeNPV), BmNPV, *S. litura* NPV(SINPV), *Hyphantria cunea* NPV(HcNPV) 및 *Helicoverpa assulta* NPV(HaNPV)는 국내에서 분리하여 본 실험실에서 보관중이던 것을 사용하였다.

곤충 세포주는 미국 Idaho 대학의 Miller 박사로부터 *S. frugiperda*의 난소에서 유래된 Sf-21 및 Sf-9 세포주를 분양받았으며, Se301 세포주는 파밤나방에서 유래된 것으로 일본 Kyushu 대학의 Kawarabata 박사로부터 분양받았다. *Mamestra brassicae*의 지방체(fat body)로부터 유래한 Mb-4 및 Mb-5 세포주와 누에의 난소로부터 유래한 BmN-4 세포주는 일본잡사·곤충농업기술연구소의 Imanishi 박사로부터 분양받았으며, *T. ni*의 난소에서 유래한 Tn5 세포주와 누에의 난소에서 유래한 Bm5 세포주는 각각 미국 캘리포니아주립대학의 Choudary 박사와 Maeda 박사로부터 분양받았다. 계대 배양은 초기 분주 농도를 플라스크(25 cm<sup>2</sup>)당 2×10<sup>6</sup> 세포로 하여 10% FBS가 함유된 곤충 세포주 배양용 TC-100 배양액(Sigma, St. Louis, MO)와 IPL-41 배양액(Gibco, Gaithersburg, MD)으로 Summers와 Smith의 방법[12]에 따라 27℃ 항온기에서 계대 배양하였다.

### 바이러스 접종

배양 세포주에 대한 바이러스의 초기 감염은 NPV에 감염된 유충의 복지를 잘라 체액을 얼음으로 냉각시킨 튜브에서 채취하고 10,000 rpm으로 4℃에서 5분간 원심 분리하여 혈구와 세포 파편 및 다각체를 제거한 후, 바이러스 입자가 포함된 상층액을 배양액으로 희석하고 0.45 μm millipore filter로 여과하여, 단층(monolayer)으로 형성된 배양 세포에 접종하였다[9]. 접종 1시간 후 감염되지 않은 NOV(non-occluded virus)를 제거하기 위해 새 배양액으로 2~3회 세척하고, 배양액을 보충하여 27℃에서 계속 배양한 후, 세포내 다각체 형성 유무 또는 바이러스 병징을 도립현미경으로 관찰하여 바이러스 감염 여부를 결정하였다.

### 바이러스 농도 결정

바이러스의 농도(titer)를 결정하기 위하여 end-point 희석 방법[9]에 따라 바이러스 접종액을 10<sup>-4</sup>~10<sup>-8</sup>까지 단계적으로 희석하고, 96 well 플레이트에 각 well당 1.0×10<sup>4</sup> 세포 개의 농도로 분주된 배양 세포에 각 희석액을 접종하고 27℃에서 배양하였다. 바이러스 농도는 O'Reilly 등[9]의 방법에 따라 바이러스가 감염된 well과 그렇지 않은 well의 비율로부터 계산하여 PFU(plaque forming unit) 농도를 결정하였다.

### 바이러스 증식율

배양 세포주에서 바이러스의 증식율은 각 세포주를 25

cm<sup>2</sup> 세포 배양용 플라스크당 1.0×10<sup>6</sup> 세포개로 분주하고, 2시간 동안 정치시킨 다음 1.0 MOI(multiplicity of infection)로 바이러스를 접종하였다. 접종 1시간 후에 바이러스 접종액을 제거하고, 이 때를 0시간으로 하여 24시간 간격으로 시료를 채취하여 end-point 희석법에 따라 바이러스 농도를 결정하였다.

### 다각체 분리 및 다각체 단백질 전기영동

배양 세포에서 증식된 다각체의 생성율을 조사하기 위하여 바이러스 감염 7일 후의 세포를 수거하고 1% Triton X-100, 0.01 M Tris hydrochloride(pH 7.0)을 처리하여 배양 세포로부터 다각체를 유리시켰다. 이 다각체 침전물을 0.01% SDS(sodium dodecyl sulfate) 용액에 부유시키고, 50 ml 원심 튜브에 40~65%(W/W) 과당 밀도 구배(sucrose density gradient)를 작성한 후, 그 위에 다각체 부유액을 분주하고 24,000 rpm(Hitachi, SRP-28SA)으로 4℃에서 1시간 원심하여 순수한 다각체 층을 얻었다. 이 층을 채취하여 0.1% SDS 용액으로 희석하고 3,000 rpm으로 10분간 2~3회 원심을 반복해서 과당을 제거하여 순수한 다각체를 분리한 후, hemocytometer 상에서 계수함으로써 다각체의 생성율을 결정하였다.

바이러스 감염 세포로부터의 다각체 단백질 전기영동을 위해서는 바이러스가 감염된 세포를 수거하여 PBS(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 완충액으로 2회 세척하고 단백질시료용액을 더한 후, 100℃에서 10분간 처리하여 전기 영동시료를 준비하였다. 단백질 전기영동은 Laemmli 방법[6]에 따라 10% SDS-polyacrylamide 겔에서 수행하고 Coomassie brilliant blue로 염색하여 관찰하였다.

## 결 과

### 바이러스의 교차 감염성

AcNPV의 교차 감염성과 Se301 세포주의 바이러스 감수성을 결정하기 위하여 Se301 세포주를 비롯한 여러 가지 곤충 세포주에 NOV의 상태로 AcNPV와 SeNPV, BmNPV, SINPV, HcNPV 및 HaNPV를 접종하고 그 감염성을 비교·조사하였다(Table 1). 그 결과 AcNPV는 Sf-21, Sf-9, Se301 및 Mb-5 세포주에 대해 감염성을 보였으나 SeNPV와 BmNPV는 자신의 고유 숙주인 Se301과 BmN-4 및 Bm-5 세포주에만 각각 감염성을 보였다.

또한 Se301 세포주는 AcNPV와 SeNPV 모두에 대해 감수성을 보였으나, Sf-21 및 Sf-9 세포주는 AcNPV에 대해서만 감수성을 가지고 있었다.

### Se301 및 Sf-21 세포주에서 AcNPV의 감염성

**Table 1. Cross infectivity of *Autographa californica* NPV against various insect cell lines and susceptibility of Se301 and Sf-21 cells to various viruses**

virus cell	virus					
	AcNPV	SeNPV	BmNPV	SINPV	HcNPV	HaNPV
Sf-21	+	-	-	-	-	-
Se301	+	+	-	-	-	-
Sf-9	+	-	-	-	-	-
BmN-4	-	-	+	-	-	-
Bm5	-	-	+	-	-	-
Tn5	+	-	-	-	-	-
Mb-4	-	-	-	-	-	-
Mb-5	+	-	-	-	-	-

Se301과 Sf-21 세포주에서 AcNPV의 감염상을 비교하기 위하여 두 세포주에 1.0 MOI로 바이러스를 접종하고 시간별로 그 감염상을 조사하였다. 그 결과, 두 세포주 모두에서 감염 2일 후부터 다각체의 형성이 관찰되기 시작하여 감염 3일 후에는 비교적 많은 세포에서 다각체가 형성되었으며(Fig. 1 C, D), 감염 5일 후부터는 거의 모든 세포에서 다각체가 형성되었다. 그러나, 감염 7일 후에 세포의 lysis로 인해 세포로부터 방출된 다각체는 Sf-21 세포주에 비해 Se301 세포주에서 매우 많이 관찰되었다(Fig. 1 E, F). 또한 Sf-21 세포주에서 생성된 다각체에 비해 Se301 세포주에서 생성된 다각체의 크기가 더욱 크게 관찰되었다(Fig. 1 G, H).

#### AcNPV의 다각체 생성을 및 다각체 단백질 발현 특성

Se301과 Sf-21 세포주에서 AcNPV의 다각체 생성을 비교·조사하기 위하여  $1.0 \times 10^6$ 개의 세포에 1.0 MOI로 바이러스를 접종하고 접종 7일 후에 세포 내외에 존재하는 다각체를 수거하여 그 수를 hemocytometer 상에서 조사하였다. 그 결과, Se301 세포주에서는 ml당  $1.23 \times 10^7$ 개의 농도로 다각체가 생성되었고 Sf-21 세포주에서는 ml당  $1.18 \times 10^7$ 개의 농도로 다각체가 형성되어, 두 세포주에서 AcNPV의 다각체 생성율은 거의 유사함을 보여주었다(Fig. 2).

또한, Se301과 Sf-21 세포주에서 AcNPV에 의한 다각체 단백질의 전체 발현량을 비교하기 위하여  $1.0 \times 10^6$ 개의 세포에 1.0 MOI로 바이러스를 접종하고 접종 7일 후에 세포를 수거하여 SDS-PAGE 분석을 수행하고 densitometer에 의해 그 발현량을 조사하였다. 그 결과, Se301 세포주에서의 다각체 단백질 발현량이 Sf-21 세포주에서의 경우보다 약 2.4배 높게 나타났다(Fig. 3).

#### Se301 및 Sf-21 세포주에서 AcNPV의 증식

AcNPV의 세포주에서의 증식상을 알아보기 위하여 각각  $1.0 \times 10^6$ 개의 Se301 및 Sf-21 세포에 1.0 MOI로 바이러스를 접종하고 1일 간격으로 7일 동안 각 세포주에

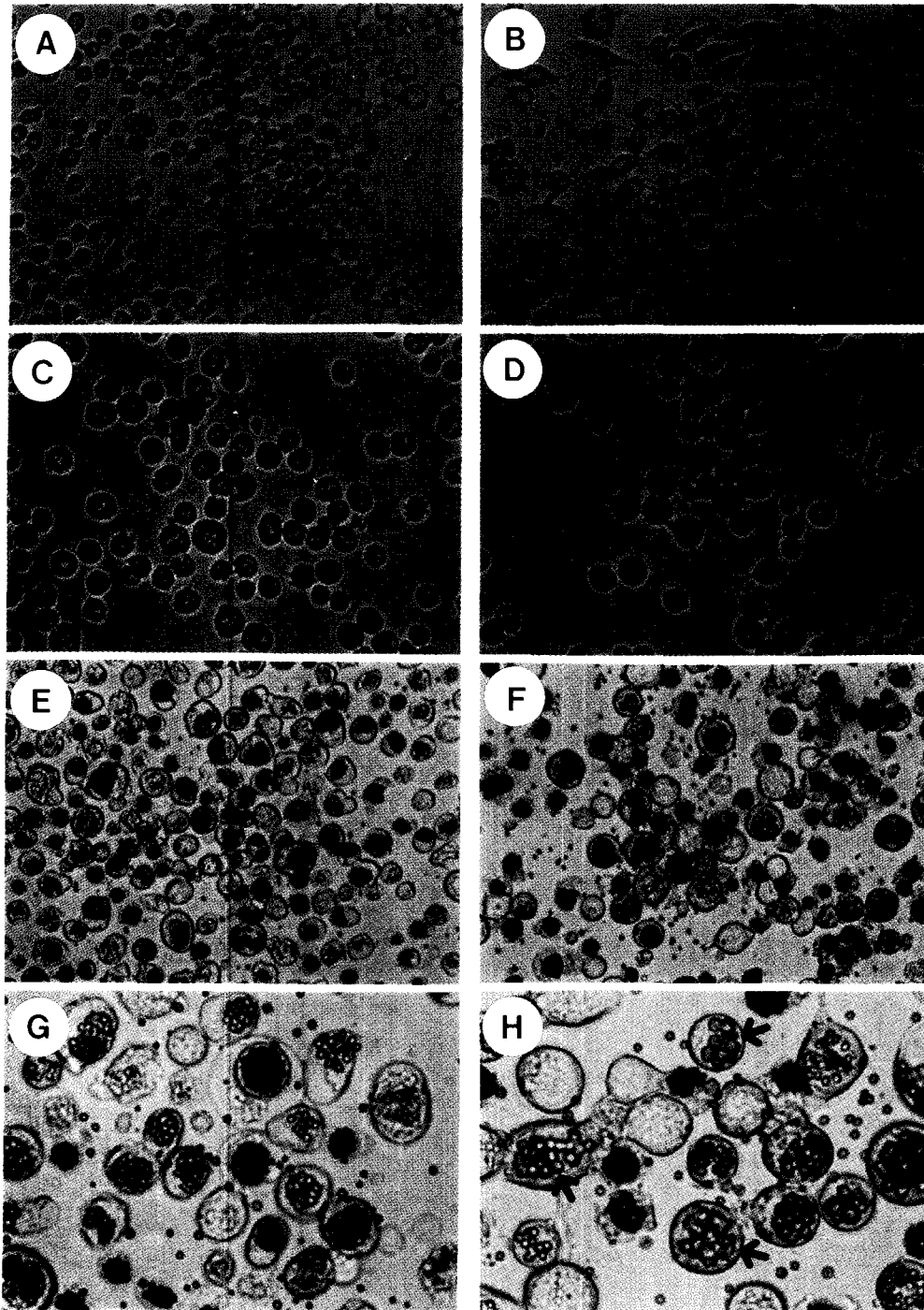
서 AcNPV의 증식상을 비교·조사하였다. 그 결과 Sf-21 세포주에서는 감염 1일 후부터 감염 3일 후까지 바이러스의 증식율이 크게 증가하다가 감염 4일 후부터는 그 증가율이 점차 감소하여서 감염 6일 후에  $1.38 \times 10^8$  plaque forming unit(PFU)/ml로 최대 증식율을 보였고, Se301 세포주에서는 감염 1일 후부터 바이러스의 증식율이 계속 증가하여 감염 7일 후에  $2.09 \times 10^7$  PFU/ml로 최대 증식율을 보였다(Fig. 4). AcNPV의 증식율은 Sf-21 세포주에서 Se301 세포주에서보다 최고 15배 가량 높았으나 감염 후 시간이 경과할수록 그 차이가 감소하여 감염 7일 후에는 거의 유사한 수준의 바이러스 증식율을 보였다(Fig. 4).

## 고 찰

AcNPV의 여러 가지 곤충 세포주에 대한 감염성을 수종 바이러스와 비교한 결과, AcNPV는 *S. frugiperda*로부터 유래한 Sf-21 및 Sf-9 세포주와 파밤나방으로부터 유래한 Se301 및 *M. brassicae*로부터 유래한 Mb-5 세포주에 감염성을 보여서 각자 고유의 숙주로부터 유래한 세포주에 대해서만 감염성을 보인 SeNPV와 BmNPV에 비해서 숙주범위가 상당히 넓음을 알 수 있었다(Table 1). 또한, Se301 세포주는 SeNPV와 AcNPV 모두에 대해서 감수성을 보였는데(Table 1), 이러한 결과는 파밤나방 유충이 AcNPV에 대해 감수성을 보인다는 Im 등 [4]의 *in vivo*에서의 보고와 일치하는 결과였다.

따라서, AcNPV에 대해 감수성을 가지고 있는 파밤나방 세포주인 Se301 세포주의 AcNPV 발현 벡터계에서 숙주 세포로서의 유용성을 알아보기 위하여 Se301 세포주에서 AcNPV에 의한 바이러스 감염상 및 다각체 생성율, 다각체 단백질 발현 특성 등을 Sf-21 세포주에서와 비교·조사하였다. 그 결과, AcNPV의 감염상은 두 세포주에서 대체적으로 비슷하였지만 감염 7일 후에 세포의 lysis로 인하여 세포로부터 방출된 다각체는 Se301 세포주에서 훨씬 많이 관찰되었다(Fig. 1 E, F). 또한, 두 세포주에서의 AcNPV에 의한 다각체 생성율은 각각  $1.23 \times 10^7$  PIB/ml과  $1.18 \times 10^7$  PIB/ml로 거의 유사하였으나(Fig. 2), Se301 세포주에서 생성된 다각체 중에서 그 크기가 큰 다각체가 Sf-21 세포주에서의 경우보다 더욱 많이 관찰되었다(Fig. 1 G, H). 이러한 결과는 바이러스 다각체의 세포로부터 방출이나 모양 형성이 바이러스 자체의 요인에 의존한다는 기존의 보고[1, 13]와는 배치되는 결과로 바이러스 자체의 요인 뿐만 아니라 숙주 세포의 어떤 요인들이 다각체의 세포로부터 방출이나 모양 형성에 영향을 미침을 보여주는 결과이다.

한편, 각 세포주에서의 AcNPV에 의한 다각체 단백질의 전체 발현량을 조사한 결과 Sf-21 세포주에서 보다

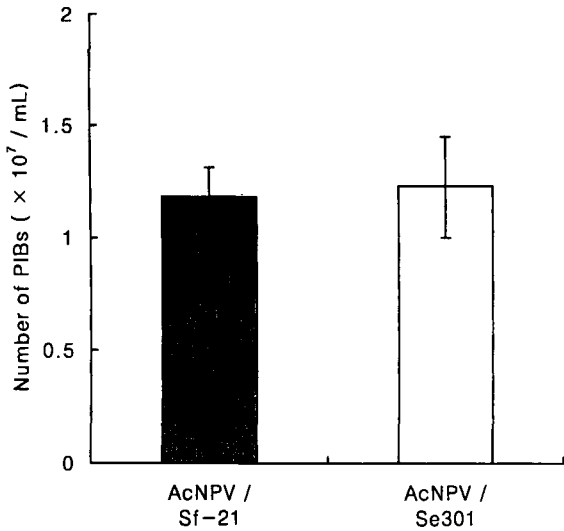


**Fig. 1.** Phase-contrast micrographs of Se301 and Sf-21 cells infected with *Autographa californica* NPV. A, Mock-infected Sf-21 cells ( $\times 100$ ); B, mock-infected Se301 cells ( $\times 100$ ); C, Sf-21 cells at 3 days p. i. ( $\times 100$ ); D, Se301 cells at 3 days p. i. ( $\times 100$ ); E, Sf-21 cells at 7 days p. i. ( $\times 100$ ); F, Se301 cells at 7 days p. i. ( $\times 100$ ); G, Sf-21 cells at 7 days p. i. ( $\times 200$ ); H, Se301 cells at 7 days p. i. ( $\times 200$ ). The arrows indicate the larger polyhedra.

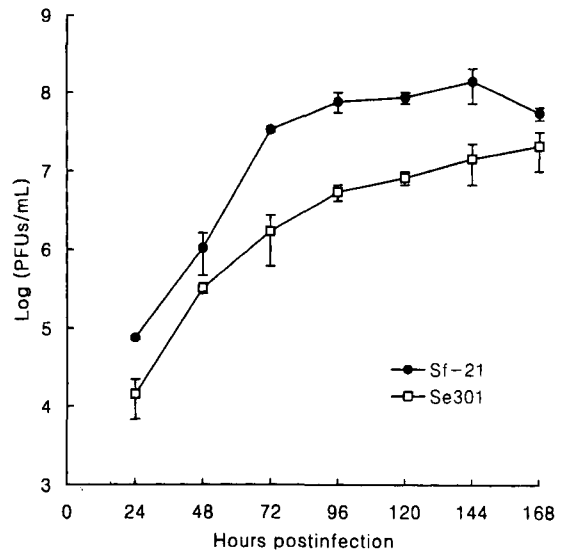
Se301 세포주에서 약 2.4배 많은 다각체 단백질이 발현되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과는 비록 다각체의 생성율은 두 세포주에서 비슷하지만 생성된 다각체중 크기가 큰 다각체가 Se301 세포주에서 더욱 많이 관찰된 결과와 일치하는 것으로, Se301 세포주를 AcNPV

발현 벡터계에서 숙주 세포로 사용할 경우 다각체 단백질 유전자의 프로모터에 의한 외래 유전자의 발현 역시 더욱 높게 기대할 수 있는 결과이다.

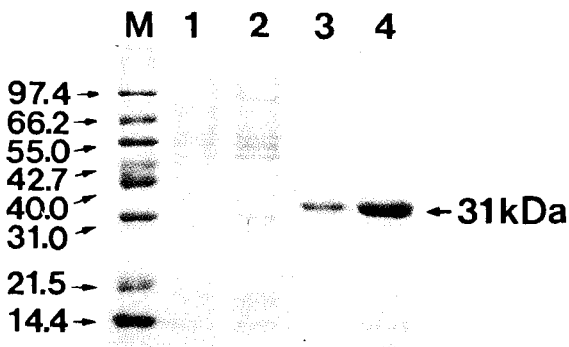
따라서 Se301 세포주에서 이러한 다각체 단백질의 많은 발현이 바이러스 증식상의 차이에 의한 것인지 조사



**Fig. 2.** PIB production of Se301 and Sf-21 cells infected with *Autographa californica* NPV.  $1.0 \times 10^6$  cells were infected with the virus at a MOI of 1.0. Cells were harvested at 7 days postinfection, lysed, and three independent polyhedra counts were made using a hemocytometer.



**Fig. 4.** Growth curves of *Autographa californica* NPV in Se301 and Sf-21 cells.  $1.0 \times 10^6$  cells were infected with the virus at a MOI of 1.0. Virus titers were determined by end-point dilution assay.



**Fig. 3.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of polyhedral protein from Se301 and Sf-21 cells infected with *Autographa californica* NPV.  $1.0 \times 10^6$  cells were infected with the virus at a MOI of 1.0 and harvested at 7 days postinfection. Equal volumes of cell lysates were analyzed by SDS-polyacrylamide gel. Lane: M, protein molecular weight marker; 1, mock-infected Sf-21 cells; 2, mock-infected Se301 cells; 3, Sf-21 cells infected with AcNPV; 4, Se301 cells infected with AcNPV. The arrow indicates the polyhedral protein band.

하기 위해 각 세포주에서 AcNPV의 증식상을 비교한 결과, 감염 초기에는 Se301 세포주에 비해 Sf-21 세포주에서 증식율이 최고 15배 가량 높았다가 감염 시간이 경과할수록 그 차이가 감소하여 감염 말기에는 거의 비슷해졌으나 전체적으로 Se301 세포주에 비해 Sf-21 세포주에서 높게 나타났다(Fig. 4). 또한 두 세포주의 증식율 역시 Sf-21이 다소 높은 수준을 보여 주었다(자료 미제

시). 이러한 결과는 Se301 세포주에서 다각체 단백질의 높은 발현이 세포주 및 바이러스 증식율의 차이에 의한 것이 아니라 다각체 단백질 유전자의 발현, 또는 그 안정성에 대한 세포주의 영향에 의한 차이임을 지적해주는 것이었다.

이상의 결과에서 Se301 세포주는 AcNPV에 대해 Sf-21 세포주보다 우수하거나 유사한 특성을 보여주어 AcNPV를 이용한 발현 벡터계에서 숙주 세포로서 매우 유용하게 이용될 수 있음을 확인할 수 있었다. 특히, 생성된 다각체의 크기가 크고 발현된 다각체 단백질이 약 2.4배나 높다는 것은 발현 벡터계에서 숙주 세포로의 이용시 유용 물질의 대량 발현을 기대할 수 있다는 점에서 Sf-21 세포주에 비해 유용하리라 여겨진다. 현재, 이상의 결과를 바탕으로 Se301 세포주에서 실제 외래 유전자의 발현성 및 발현 효율에 대한 연구를 수행중이다.

**요 약**

AcNPV에 대해 감수성을 보이는 파밤나방 세포주인 Se301 세포주의 AcNPV를 이용한 발현 벡터계에서의 유용성을 알아보기 위하여 Se301 세포주에서 AcNPV의 감염 특성을 Sf-21 세포주에서와 비교하였다. 그 결과, 바이러스의 감염상은 두 세포주에서 거의 유사하였으나 감염 7일 후에 세포로부터 방출된 다각체의 비율은 Se301 세포주에서 훨씬 높았다. 또한 전체 다각체 생성율은 Se301 세포주에서 약간 높았지만 그 차이는 매우 근소하여 대체적으로 두 세포주에서 거의 비슷하였으나 생

성된 다각체의 크기는 Se301 세포주에서 더욱 컸다. 한편, 세포주나 바이러스의 증식율과는 무관하게 AcNPV에 의한 다각체 단백질의 발현량이 Se301 세포주에서 약 2.4배 높게 나타남으로써 Se301 세포주가 AcNPV를 이용한 발현 벡터계에서 숙주 세포로서 매우 유용하게 이용될 수 있음을 보여 주었다.

### 감사의 말

본 연구는 1995년도 농림수산 특정연구과제(첨단농림수산물기술개발과제)와 서울대학교 농업생명연구소재연구센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

### 참고문헌

- Carstens, E. B., G. V. Williams, P. Faulkner, and S. Partington. 1992. Analysis of polyhedra morphology mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: molecular and ultrastructural features. *J. Gen. Virol.* **73**: 1471–1479.
- Hara, K., M. Funakoshi, K. Tsuda, and T. Kawarabata. 1993. New *Spodoptera exigua* cell lines susceptible to *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **29A**: 904–907.
- Hara, K., M. Funakoshi, K. Tsuda, and T. Kawarabata. 1995. A cloned cell line of *Spodoptera exigua* has a highly increased susceptibility to the *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Can. J. Microbiol.* **41**: 1111–1116.
- Im, D. J., K. M. Choi, and S. K. Kang. 1991. Pathogenicity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus and cross infection of baculoviruses to the beet armyworm, *S. exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Korean J. Appl. Entomol.* **30**(3): 212–218.
- King, L. A. and R. D. Possee. 1992. *The Baculovirus Expression Vector System*. Chapman and Hall.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* **227**: 680–685.
- Maeda, S. 1994. Expression of foreign gene in insect cells using baculovirus vectors, pp. 1–31. In K. Maramorosch and A. McIntosh (eds.), *Insect Cell Biotechnology*, Boca Raton: CRC Press.
- Maeda, S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Soto, and M. Furusawa. 1985. Production of human  $\alpha$ -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; A Laboratory Manual*. W. H. Freeman and Company, New York.
- 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**: 2156–2165.
- Smith, G. E., M. J. Fraser, and M. D. Summers. 1983. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedron gene. *J. Virol.* **46**: 584–593.
- 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.
- Van Oers, M. M. and J. M. Vlak. 1997. The baculovirus 10-kDa protein. *J. Inverteb. Pathol.* **70**: 1–17.

(Received January 16, 1998)