

파밤나방 핵다각체병 바이러스의 p10 유전자 구조

Structure of *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus p10 Gene

최재영 · 우수동 · 홍혜경 · 이해광 · 제연호 · 강석권

Jae Young Choi, Soo Dong Woo, Hye Kyung Hong, Hae Kwang Lee,
Yeon-Ho Je and Seok-Kwon Kang

Abstract - To develop the baculovirus expression vector system (BEVS) adopting p10 gene promoter of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeNPV), we characterized the p10 gene of SeNPV. The nucleotide sequence of 545 bases including the coding region of p10 gene was determined. Compared with the previously reported SeNPV p10 gene (Zuidema *et al.*, 1993), 4 bases were different in the 5' and 3' flanking region but no difference was found in the coding region. The p10 gene was located within *Xho* I 1.5 Kb, *Sph* I 2.4 Kb and *Cla* I 4.0 Kb fragments by Southern hybridization analysis. Also, the *Sph* I 2.4 Kb and the *Cla* I 4.0 Kb fragments were cloned and their restriction enzyme maps were determined.

Key Words - SeNPV, Expression vector, p10 gene

초 록 - 야생주 핵다각체병 바이러스의 낮은 병원성에 대해 살충제로서의 파밤나방 핵다각체병 바이러스(*Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus : SeNPV)의 병원성 향상을 피함과 동시에 재조합 바이러스가 다각체 내에 매립됨으로써 살충제로의 적용시 야외에서의 안정성을 확보할 수 있는 p10 유전자의 프로모터를 이용한 새로운 발현벡터계를 개발하기 위하여 국내분리주 SeNPV의 p10 유전자 구조를 분석하였다. 그 결과, SeNPV p10 유전자의 프로모터와 구조유전자 부위를 포함한 545 염기서열을 결정하여 기존에 보고된 SeNPV p10 유전자(Zuidema *et al.*, 1993)와 비교한 결과 구조유전자 부위에서는 100%의 상동성을 보였으나 5' 및 3' flanking region의 4개 염기서열에서 차이를 보였다. Southern hybridization에 의하여 SeNPV 전체 genomic DNA상에서 p10 유전자는 *Sph* I 2.4 Kb와 *Cla* I 4.0 Kb 단편내에 각각 존재함을 확인하였으며, p10 유전자를 포함하는 이들 단편을 각각 클로닝하여 제한효소 지도를 작성하였다.

검색어 - 파밤나방 핵다각체병 바이러스, 발현벡터계, p10 유전자

파밤나방(*Spodoptera exigua*)은 채소, 화훼, 과수 등 가해하는 숙주 범위가 넓으며 파, 배추, 수박 등 시설 재배지에도 대발생하여 전국적으로 극심한 피해를 주고 있어 최근에 주요 문제 해충으로 대두되고 있다(Goh *et al.*, 1991). 또한, 파밤나방은 3령 유충 이후에는 유기합성 살충제에 대한 강한 저항성을 나타내어 방제가 어려운 해충으로 구분되고 있으며(Meinke and Ware, 1978), 생물농약으로 주목받고 있는 *Bacillus thuringiensis* (Bt) subsp. HD-1과 HD-73에 대해서도 양

배추금무늬나방(*Trichoplusia ni*)보다 450배가 높은 LC₅₀ 값을 보여(MacIntosh *et al.*, 1990) Bt에 대해서도 저항성이 문제가 되고 있다. 이와 같이 유기합성 살충제에 저항성을 나타내며, *B. thuringiensis*에도 감수성이 낮은 파밤나방은 바이러스를 이용한 방제법이 가장 효과적인 것으로 알려져 있다(Smits and Vlask, 1988). 파밤나방 바이러스병은 핵다각체병(nucleopolyhedrovirus: NPV), 과립병 및 세포질다각체병이 보고되어 있다(Hunter and Hall, 1968; Gelernter and Federici,

1986). 이 중 핵다각체병 바이러스는 이미 10여종의 바이러스 살충제가 상품화되어 있으며, 파밤나방 핵다각체병 바이러스 (*S. exigua* nucleopolyhedrovirus: SeNPV)도 BIOTROL/VES란 이름으로 방제에 이용되고 있다 (Chauthani and Rehnberg, 1971).

그러나, 핵다각체병 바이러스의 경우 유기합성 살충제에 비해 상대적으로 병원성이 느린 단점을 가지고 있으며, 최근에 baculovirus expression vector system (BEVS)을 이용하여 바이러스의 genome 상에 곤충 특이 독소, hormone, 효소 등의 유전자를 도입함으로써 핵다각체병 바이러스의 살충성을 향상시키려는 시도가 많이 이루어지고 있다 (Stewart *et al.*, 1991; Tomalski and Miller, 1991; McCutchen *et al.*, 1991; Bonning and Hammock, 1996). 그러나, 이와 같이 핵다각체병 바이러스의 병원성을 증가시킴에 있어서 외래 유전자의 삽입 위치로 현재 가장 많이 이용되고 있는 다각체 단백질 유전자 (polyhedrin gene)를 사용할 경우 다각체 단백질이 발현되지 않아서 재조합 바이러스가 다각체 내에 매립되지 않기 때문에 상업적으로 이용시 야외에서의 안정성이 크게 감소하는 문제가 발생하는 것으로 알려져 있다 (Wood, 1995). 이러한 문제점을 극복하기 위하여 바이러스의 복제나 증식에 영향을 미치지 않고 감염 말기에 대량으로 발현되는 p10 유전자의 프로모터를 이용하여 병원성을 증가시키려는 시도가 이루어지고 있다 (Merryweather *et al.*, 1990; Martens *et al.*, 1995).

따라서 본 연구에서는 p10 유전자 프로모터를 이용함으로써 SeNPV의 병원성 향상을 피할 수 있는 새로운 발현벡터계의 개발을 위한 기초연구로서, 국내에서 분리된 SeNPV의 p10 유전자의 염기서열을 결정하였고 genomic DNA 상에서 이 유전자를 포함하는 제한효소 단편을 탐색함으로써 구조 및 위치를 결정하였다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 곤충

파밤나방 핵다각체병 바이러스는 야외에서 채집하여 본 연구실에서 보관중이던 것 (Im *et al.*, 1991)을 이용하였다. 바이러스의 증식을 위한 파밤나방은 인공 사료로 25°C에서 제대사육하면서 바이러스의 증식에 사용하였다.

2. 바이러스 DNA 분리 PCR

바이러스 DNA는 Smith와 Summers의 방법 (1982)에 따라서 정제된 다각체로부터 분리하였다. SeNPV의 p10 유전자 부위를 클로닝하기 위한 oligonucleotide primers로는 5'-ATCGA TATCACGATGGTCTCA-

GGGCG-3'의 sense primer와 5'-ATCGATGGTACGAC AATCTC-3'의 antisense primer를 이용하였다. PCR은 PreMix™-Top (Bioneer)을 이용하여 50 ng의 SeNPV DNA와 sense 및 antisense primer를 각각 100 pmole씩 첨가하고 PCR용 시약 혼합액과 섞어 증류수로 최종 부피를 20 µl로 맞춘 후, 94°C에서 5분, 43°C에서 2분, 72°C에서 2분씩 1 과정, 94°C에서 1분, 48°C에서 2분, 72°C에서 2분씩 34 과정과 마지막 72°C에서 7분의 과정에 의해 Thermal Cycler (Perkin Elmer)로 반응을 수행하였다. PCR에 의해 증폭된 p10 유전자 단편은 pGemT vector (Promega)에 제조회사의 방법에 따라 클로닝하였다.

3. 염기서열 결정

염기서열 결정은 dideoxy chain termination 방법 (Sanger *et al.*, 1977)에 따라 M13 forward 및 reverse sequencing primers (Amersham)와 Sequenase® version 2.0 kit (Amersham)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 수행하였다. 염기서열 결정을 위한 전기영동은 Sequencing용 유리판 (20 × 40 cm)의 한 면을 silicization 시키고, 6% buffer-gradient polyacrylamide gel을 작성하여 시료를 loading한 후에 1,800 V로 2시간 이상 전기영동하였다. 영동이 끝난 gel은 3 M 여과지 (Whatman)로 옮기고 gel 건조기에서 2시간 이상 건조시킨 후, 상온에서 48시간 동안 X-ray 필름으로 감광하였다.

4. 제한효소 분석 및 Southern blot 분석

제한효소 (POSCOCHEM) 처리는 플라스미드 DNA 용액에 10X 제한효소 반응액을 1/10 부피로 첨가하고 각 제한효소를 첨가한 후, 각 제한효소의 반응온도에서 4시간 이상 처리하고 반응정지 완충액 (0.1 M EDTA, 50% glycerol, 0.5% bromophenol blue)을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 처리된 DNA는 agarose gel에서 전기영동을 행하고 ethidium bromide로 염색하여 U.V. transilluminator로 관찰하였다.

Southern hybridization (Southern, 1975)에 사용된 probe는, 목적 DNA 절편을 DIG DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim)를 사용하여 제조회사의 방법에 따라 labeling 하여 이용하였다. Southern blot은 바이러스의 DNA에 여러가지 제한효소를 처리하고 전기영동한 gel을, 상온에서 변성용액 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)으로 15분간 침지하여 DNA를 변성시킨 후, 중화용액 (1 M Tris-HCl (pH 7.4), 1.5 M NaCl)으로 15분간 중화시켰다. 중화시킨 gel은 20 × SSC 용액 (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate)으로 나일론막 (nylon membrane, Phamacia Biotech) 위로 capillary 전이시킨 후, 120°C에서 10분간 처리하여 DNA를 고정시켰다. 이

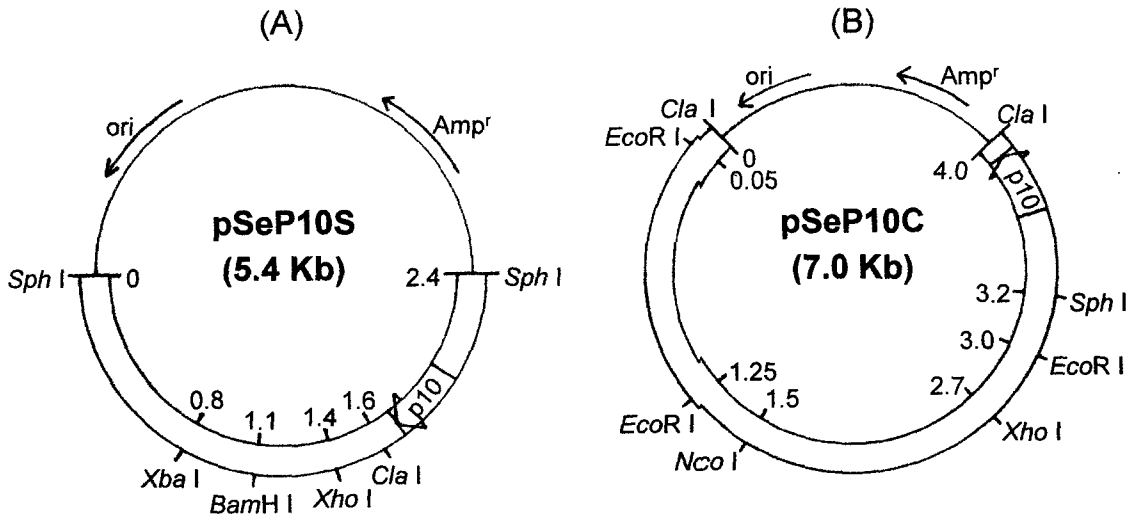


Fig. 3. Cloning and restriction endonuclease maps of pSeP10S (A) and pSeP10C (B). The *Sph* I 2.4 Kb and the *Cla* I 4.0 Kb fragments which contained the entire p10 gene of SeNPV-K1 were ligated to pGem7zf (-) and pBluescript II KS (+) to obtain the plasmid pSeP10S and pSeP10C, respectively.

분자량은 약 9.6kDa 정도였다(그림 1).

2. 다각체 단백질 유전자 위치 구명

p10 유전자를 가진 DNA 단편을 탐색하기 위하여 SeNPV의 genomic DNA에 수종의 제한효소를 처리하고, PCR로 합성된 SeNPV의 p10 유전자를 probe로 하여 Southern hybridization을 수행하였다. 그 결과 *Xho* I 1.5 Kb, *Sph* I 2.4 Kb 및 *Cla* I 4.0 Kb 단편에 각각 단일 밴드로 hybridization 됨으로써 이들 단편에 p10 유전자가 위치하고 있음을 확인하였다(그림 2).

Southern hybridization에 의해 탐색되어진 p10 유전자를 포함하고 있는 *Sph* I 2.4 Kb와 *Cla* I 4.0 Kb 단편을 각각 pGem7zf (-) vector (Promega)와 pBluescript II KS (+) vector (Stratagene)에 클로닝하고 각각 pSeP10S와 pSeP10C로 명명하였다. 클로닝된 DNA에 대해 여러가지 제한효소를 처리한 후 전기영동하여 각 단편 내에서의 p10 유전자의 위치를 결정하고 제한효소 지도를 작성하였다(그림 3).

국내분리주 SeNPV의 p10 유전자의 염기서열을 결정하고 이 유전자를 포함하는 단편을 클로닝함으로써 genomic DNA 상에서의 그 유전자의 구조 및 위치를 결정한 본 연구의 결과는 국내분리주 SeNPV의 p10 유전자 프로모터를 이용하여 발현벡터계를 구축함에 있어서 중요한 기초자료로 매우 유용하게 이용될 것이다. 또한 p10 유전자 프로모터를 이용한 발현벡터계는 이를 이용하여 외래의 곤충특이 독소유전자 등을 바이러스의 genomic DNA상에 도입함으로써 살충제로서의 SeNPV의 병원성을 향상시키는데 매우 유용

하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 1995년도 농림수산 특정연구과제(첨단 농림수산 기술개발과제)와 서울대학교 농업생물 신소재 연구센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

인 용 문 헌

Bonning, B.C. and B.D. Hammock. 1996. Development of recombinant baculoviruses for insect control. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 191~210.
 Chauthani, A.R. and C.S. Rehnberg. 1971. Dosage mortality data on the nuclear polyhedrosis viruses of *Spodoptera exigua*, *Trichoplusia ni* and *Prodenia ornithogalli*. *J. Invertebr. Pathol.* 17: 234~237.
 Choi, J.Y., W.J. Kim, S.D. Woo, H.S. Kim, K.Y. Seol and S.K. Kang. 1996. Characterization of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene structure. *Korean J. Appl. Entomol.* 38: 144~149.
 Gelernter, W.D. and B.A. Federici. 1986. Isolation, identification and determination of virulence of a nuclear polyhedrosis virus from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera, Noctuidae). *Environ. Entomol.* 15: 240~245.
 Goh, H.G., J.D. Park, Y.M. Choi, K.M. Choi and I.S. Park. 1991. The host plants of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), (Lepidoptera, Noctuidae) and its occurrence. *Korean J. Appl. Entomol.* 30: 111~116.

- Hunter, D.K. and I.M. Hall. 1968. Pathogenicity of a nuclear polyhedrosis virus of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. J. Invertebr. Pathol. 12: 83~85.
- 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: 212~218.
- MacIntosh, S.C., T.B. Stone, S.R. Sims, P.L. Hunst, J.T. Greenplate, P.G. Marrone, F.J. Periak, D.A. Fischhoff and R.L. Fuchs. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. J. Invertebr. Pathol. 56: 258~266.
- Martens, J.W.M., M. Knoester, F. Weijts, S.J.A. Groffen, Z.H. Hu, D. Bosch and J.M. Vlak. 1995. Characterization of baculovirus insecticides expressing tailored *Bacillus thuringiensis* Cry I A(b) crystal proteins. J. Invertebr. Pathol. 66: 249~257.
- McCutchen, B.F., P.V. Choudary, R. Crenshaw, D. Maddox, S.G. Kamita, S. Volrath, E. Fowler, B.D. Hammock and S. Maeda. 1991. Development of a recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin-Potential for pest control. Bio/Technology 9: 848~852.
- Meinke, L.J. and G.W. Ware. 1978. Tolerance of three beet armyworm strains in Arizona to methomyl. J. Econ. Ent. 71: 645~646.
- Merryweather, A.T., U. Weyer, M.P.G. Harris, M. Hirst, T. Booth and R.D. Possee. 1990. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 delta endotoxin. J. Gen. Virol. 71: 1535~1544.
- Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463~5467.
- Smith, G.E. and M.D. Summers. 1982. DNA homology among subgroup A, B and C baculoviruses. Virology 123: 393~406.
- Smits, P.H. and J.M. Vlak. 1988. Biological activity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus against *S. exigua* larvae. J. Invertebr. Pathol. 51: 107~114.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503~517.
- Stewart, L.M.D., M. Hirst, M.L. Ferber, A.T. Merryweather, P.J. Calay and R.D. Possee. 1991. Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. Nature 352: 85~88.
- Tomalski, M.D. and L.K. Miller. 1991. Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. Nature 352: 82~85.
- Wood, H.A. 1995. Development and testing of genetically improved baculovirus insecticides. pp.91~102 in Baculovirus expression system and biopesticides, eds. by M.L. Shuler, H.A. Wood, R.R. Granados and D.A. Hammer. 259pp. Wiley-Liss Inc, New York.
- Zuidema, D., M.M. van Oers, E.A. van Strien, P.C. Caballero, E.J. Klok, R.W. Goldbach and J.M. Vlak. 1993. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the p10 gene of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. J. Gen. Virol. 74: 1017~1024.

(1998년 12월 24일 접수, 1999년 6월 11일 수리)