

Autographa californica 핵다각체병 바이러스의 IE1 유전자에 의해 형질전환된 곤충세포주의 특성

동아대학교 생명자원과학대학¹, 농업과학기술원 잠사곤충부²

조은숙¹ · 박혜진¹ · 이광식¹ · 강석우² · 윤은영² · 김근영²
손흥대¹ · 진병래^{1*}

=Abstract=

Characterization of Insect Cells Transformed with *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus IE1 Gene

Eun Sook Cho¹, Hae Jin Park¹, Kwang Sik Lee¹, Seok Woo Kang², Eun Young Yun²,
Keun Young Kim², Hung Dae Sohn¹ and Byung Rae Jin^{1*}

College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University¹, Pusan 604-714,
Korea, Department of Sericulture and Entomology², The National Institute of
Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-744, Korea

Transformation efficiency, virus multiplication and foreign gene expression were characterized in the insect cells transformed with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) immediate early 1 gene (IE1). Transformation efficiency of insect cells by AcNPV IE1 gene vector harboring foreign gene was approximately 8-fold higher in the Sf9 cells transformed previously with AcNPV IE1 gene than in the normal Sf9 cells. Virus multiplication and foreign gene expression of recombinant baculovirus in the Sf9 cells transformed with AcNPV IE1 gene were similar to those of the normal Sf9 cells. These results suggest that transformed cells displaying foreign gene product by using AcNPV IE1 gene promoter will be useful for the diverse applications of insect cells.

Key Words: Insect cells, Baculovirus, Transformation, Expression

서 론

곤충세포주와 베컬로바이러스의 조합에 의한 베컬로바이러스 발현벡터는 외래유전자 산물을 대량으로 생산할 수 있다는 장점으로 인하여 발현벡터계로서 주목받고 있다. 베컬로바이러스 발현벡터는 주로 *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV), *Bombyx mori* nuclear po-

lyhedrosis virus (BmNPV)와 *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus (HcNPV) 등의 강력한 다각체 단백질 유전자 프로모터를 사용하고 있다 [4, 12, 15, 16]. 또한 베컬로바이러스 발현벡터는 고등진핵세포인 곤충세포주를 이용하기 때문에 생산된 재조합 단백질의 생물학적 및 면역학적 기능과 활성이 원래의 단백질과 거의 유사하다는 장점을 아울러 가지고 있다 [15, 16]. 곤충세포주는 다른 동물세포주와 마찬가지로 부유배양이 일부

접수 : 1999년 6월 17일

책임저자: 진병래, 부산시 사하구 하단동 840, 동아대학교 생명자원과학부. Tel: (051) 200-7594, Fax: (051) 200-7594, E-mail: brjin@seunghak.donga.ac.kr

가능하기 때문에 외래유전자 산물을 다량으로 확보가 가능하며, 무혈청배지 역시 개발되어 실용화되고 있다 [16]. 또 곤충베쿨로바이러스는 숙주 특이성을 가지고 있다. 이러한 숙주특이성을 확장하기 위한 시도로 helicase 유전자를 이용한 광범위 숙주영역을 가지는 재조합 베쿨로바이러스 제작이 보고되었다 [9,10].

베쿨로바이러스 발현백터를 이용한 외래유전자 발현은 한시적이라고 할 수 있다. 즉 베쿨로바이러스는 숙주세포에서 증식과 함께 외래유전자 산물을 대량으로 발현하기에 결국 숙주세포는 죽게되기 때문이다 [8]. 따라서 곤충세포주를 이용하여 외래유전자 산물을 대량으로 발현 시 항상 숙주세포의 대량배양이 선행되어야 한다. 이러한 점을 극복하기 위한 한 시도로 베쿨로바이러스가 숙주세포에 감염 시 바이러스 단백질 합성과 관계없이 바이러스 DNA가 숙주세포에 들어가자마자 숙주세포의 RNA polymerase를 이용하여 전사하는 초기발현 유전자 IE1 (immediate early gene 1) [5-7]을 이용하여 숙주세포를 죽이지 않고 외래유전자 산물을 안정적으로 발현할 수 있는 백터가 개발되었다 [8]. IE1 유전자 프로모터의 조절 하에 삽입된 외래유전자는 IE1 유전자의 염기서열과 함께 숙주세포의 염색체 내로 삽입되어 세포분열과 함께 안정적으로 외래유전자 산물을 생산하였다. 그러나 IE1 유전자 프로모터는 다각체 단백질 유전자 프로모터에 비해 프로모터의 기능이 약하기 때문에 외래유전자 산물의 발현은 충분히 확인할 수 있었으나 [3,8], 대량생산용 발현백터로 이용하기에는 지속적인 연구가 필요하다고 판단된다.

IE1 유전자 프로모터를 이용한 발현백터는 베쿨로바이러스 발현백터계와 달리 바이러스 감염 없이 계속적으로 외래유전자 산물을 발현한다 [8]. AcNPV IE1 유전자는 BmNPV IE1 유전자와 95.3%의 염기서열 상동성을 갖고 있으며 [7], 일시 발현 검정 (transient expression assay)에서 몇 종류의 인시목 곤충세포주에서 발현되어 진다고 알려졌다 [14]. 또한 AcNPV IE1 유전자 프로모터를 이용하여 숙주영역이 다른 누에 유래 Bm5 세포주를 안정적으로 형질전환이 가능함을 보고하였다 [1,2]. IE1 유전자 프로모터 이용 발현백터는 곤충세포주를 죽이지 않고 안정적으로 외래유전자 산물을 발현하기 때문에 다양한 목적의 형질전환 곤충세포주 제작에 유용하게 사용될 수 있

다. 따라서 본 연구자들은 전보에서 AcNPV IE1 유전자 프로모터를 이용한 발현백터를 제작하였고, 용이한 선발 표식유전자로서 neomycin 저항성 유전자 및 초록색 형광 단백질 (green fluorescent protein) 유전자를 곤충세포주 Sf9 및 Bm5에 도입함으로써 형질전환 세포주를 개발하였다 [1, 2]. 본 연구에서는 AcNPV IE1 유전자를 이용하여 형질전환된 세포주의 특성을 조사하기 위하여, 이미 형질전환된 곤충세포주에 외래유전자만 다른 동일한 IE1 유전자 발현백터 도입 시 그 도입효율을 조사하였다. 또 형질전환 세포주에서 재조합 베쿨로바이러스의 증식 및 외래유전자 발현을 정상적인 세포주와 비교 분석하였다.

재료 및 방법

1. 곤충세포주 및 바이러스

곤충세포주 *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) [19] 과 AcNPV IE1 유전자 프로모터 조절 하에 neomycin 저항성 유전자가 삽입된 발현백터 pAcIE1-neo [1]와 GFP 유전자가 삽입된 발현백터 pAcIE1-GFP에 의해 형질전환된 각각의 형질전환 Sf9 세포주 [1,2]는 열처리한 10% 혈청 (Fetal bovine serum)이 함유된 TC-100 배양액 (Gibco)으로 27℃ 항온기에서 표준방법에 의해 계대배양하였다 [16, 17]. 재조합 AcNPV (BacPAK6, Clontech)는 Sf9 세포주에서 증식하였다. 바이러스 역가는 ml 당 PFU (Plaque forming unit)로 나타내었으며, plaque assay 방법을 이용하였다 [13,16,17]. 곤충세포주는 도립현미경 (Nikon)으로 관찰하고 사진촬영하였다.

2. 발현백터의 세포내 도입 (Transfection)

발현백터 pAcIE1-GFP로 이미 형질전환된 Sf9 세포주 [2]와 정상적인 Sf9 세포주를 1.0×10^6 의 농도로 지름 35 mm의 세포배양용 접시 (Nunc)에 옮기고, 부착을 위해 27℃ 항온기에서 1시간 동안 방치하였다. 20 mM HEPES 용액 (Gibco)에 각각 1 µg의 발현백터 pAcIE1-neo를 포함하고 있는 50 µl의 용액과 100 µg/ml의 Lipofectin (Gibco) 50 µl와 폴리스틸렌 시험관에서 부드럽게 혼합하고 실온에서 30분 동안 방치하였다. 세포주는 2 ml의 무혈청 TC-100 배양액 (Gibco)으로 2번 세척한 후, 다시 1.5 ml의 무혈청 TC-100 배양액을 첨가하였다. 그리고 Lipofectin-DNA 혼합액은 각각

의 곤충세포주 Sf9에 부드럽게 흔들면서 끌고루 가하였다. 그런 다음 27℃ 항온기에 5시간 방치한 뒤 1.5 ml의 10% 혈청이 포함된 TC-100 배양액을 가하고 계속 27℃ 항온기에서 배양하였다. 3일 후 각각 1 mg/ml 농도의 G418 (Gibco)을 2주일 동안 처리하여 G418에 저항하여 형성된 각 세포클론의 숫자로 도입 효율을 계산하였다.

3. 곤충세포 염색체 DNA 추출

곤충세포주로부터 염색체 DNA 추출은 Wizard™ genomic DNA (Promega) 추출 키트를 사용하여 제조회사 추천 방법으로 10⁶ 세포로부터 추출하였다.

4. Polymerase chain reaction (PCR) 분석

곤충세포주로부터 추출된 염색체 DNA를 PCR을 위한 주형으로 사용하였다. 외래유전자를 포함하고 있는 IE1 유전자를 확인하기 위한 프라이머는 Guarino와 Summers [5]에 의해 보고된 IE1 프로모터 영역의 5'-TATCGTGTTCGCCATTAGGG-CAG-3'와 구조유전자 부위의 5'-GCTGTATTTG-TACGTGAGCGTAC-3'를 사용하였다. PCR 반응은 Accupower™ PreMix-Top (Bioneer)을 이용하여 35 사이클 (94℃ 1분, 55℃ 1분, 72℃ 1분) 증폭하였다. PCR 산물은 에타놀 침전과 10,000 ×g로 원심하고 70% 에타놀로 세척하였다. 그리고 그 산물은 1% 아가로스겔 전기영동으로 분석하였다.

5. 플라크 검정

정상적인 Sf9 세포주와 pAcIE1-neo로 형질전환된 Sf9 세포주를 지름 35 mm의 세포배양용 접시에 각각 10⁶ 세포를 분주하고, 27℃ 항온기에서 부착을 위해 1시간 동안 방치한 후, 희석된 재조합바이러스를 농도별로 접종하였다. 접종 1시간 후, 접종액을 제거하고 TC-100 배지로 2번 세척한 뒤 혈청이 포함된 2 × TC-100 배지를 이용하여 조제한 1% Low melting agarose (FMC)에 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)의 최종 농도가 ml 당 120 μg 되도록 섞은 뒤 조심스럽게 세포 위에 도말하였다. 1시간 후 바이러스 접종에 이어 아가로스가 도말된 세포배양용 접시를 거꾸로 놓은 상태로 27℃ 항온기에서 배양하였다. 배양 5일 후, 바이러스 증식은 재조합바이러스에 의해 발현된 β-galactosidase에 의해 염색된 플라크 수 (PFU)로 조사하였다 [12,16,17].

6. 단백질 전기영동 (SDS-PAGE) 및 Western blot 분석

곤충세포주는 지름 35 mm의 세포배양용 접시에 10⁶의 세포로 분주하고, 5 MOI (Multiplicity of infection)로 재조합바이러스를 각각 접종한 후, 27℃ 항온기에서 배양하면서 2, 3, 4, 5일 후에 세포를 각각 수거하였다. 수거한 세포는 PBS (140 mM NaCl, 27 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.3)로 2번 세척한 후, 2 × 단백질 시료 용액 (5% SDS, 10% β-mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue, 20% glycerol)을 첨가하고 5분간 가열하여 상청액을 전기영동 시료로 사용하였다. Laemmli [11]의 방법에 따라 10% SDS-PAGE를 수행하였고, Towbin 등 [18]의 방법에 따라 β-galactosidase 항체 (Clontech)를 이용하여 Western blot 분석을 수행하였다. 이차 항체로는 alkaline phosphatase 결합된 생쥐 항체 (Sigma)를, 발색을 위한 기질로는 BCIP (5-bromo-4-chloroindoxyl phosphate, Gibco)와 NBT (notro-blue tetrazolium, Gibco)를 사용하였다.

7. β-Galactosidase 활성 검정

곤충세포주는 지름 35 mm의 세포배양용 접시에 10⁶의 세포로 분주하고, 5 MOI의 재조합바이러스를 각각 접종한 후, 27℃ 항온기에서 배양하면서 1, 2, 3, 4, 5일 후에 세포배양액을 수거하였다. 세포배양액은 10,000 ×g에서 5분간 원심분리한 후 상청액을 96 well plate에 희석하여 각각 100 μl씩 분주하고, 검정은 β-galactosidase assay kit (Promega)를 이용하여 제조회사 추천방법에 따라 420 nm에서 흡광도로 조사하였다.

결 과

1. 곤충세포 염색체 내에 외래유전자 도입 효율

AcNPV IE1 유전자를 이용한 발현벡터의 곤충세포내 도입 (transfection) 효율은 AcNPV IE1 유전자 프로모터 조절 하에 neomycin 저항성 유전자가 삽입된 발현벡터 pAcIE1-neo를 정상적인 Sf9 세포주와 이미 AcNPV IE1 프로모터 조절 하에 초록색 형광 단백질 GFP 유전자가 삽입된 발현벡터 pAcIE1-GFP에 의해 형질전환된 세포주에 각각 도입하고, G418 처리함으로써 pAcIE1-neo 도입에 의해 G418에 저항성을 나타내는 세포 클론

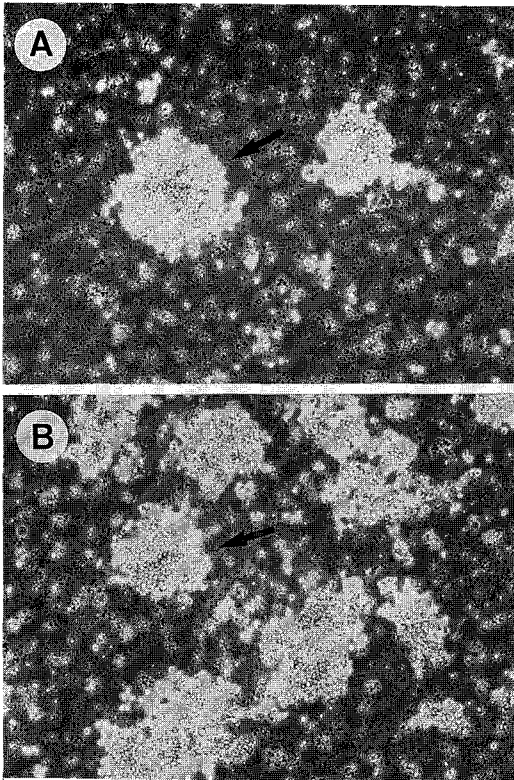


Figure 1. Micrographs of the neomycin-resistant cell clones. Normal (A) and transformed (B) Sf9 cells (1.0×10^6 cells) were transfected with $1 \mu\text{g}$ of pAcIE1-neo vector DNA and selected with G418. Cell clones were observed by phase contrast microscopy ($\times 100$). Cell clone is indicated by arrow.

수로 조사하였다 (Figure 1, Table 1). 정상적인 Sf9 세포주와 이미 형질전환된 세포주에서 pAcIE1-neo 도입에 의해 G418에 저항성을 나타내는 세포 클론은 Figure 1에서 보여지는 것처럼 세포 클론수에 있어서 현저한 차이를 나타내었다. 세포 클론수는 1.0×10^6 세포 당 정상적인 Sf9 세포주는 약 31 세포 클론을, 이미 형질전환된 세포주에서는 약 250 세포 클론을 얻을 수 있었다. 그 효율 면으로 볼 때, Table 1에 나타난 것처럼 정상적인 Sf9 세포주에서는 3.1×10^5 , 이미 형질전환 세포주에서는 2.5×10^4 로 나타나 약 8배의 차이를 보였다.

또한 세포 클론들의 형질전환 여부는 정상적인 Sf9 세포주, 정상적인 Sf9 세포주에 발현백터 pAcIE1-neo를 도입한 형질전환 세포주, 발현백터 pAcIE1-GFP에 의한 형질전환 세포주 및 이미 발

Table 1. Transformation efficiency of insect cells

Cell lines	Transformation efficiency*
Transformed Sf9 cells	2.5×10^4
Control Sf9 cells	3.1×10^5

*Transformation efficiency was calculated as number of neomycin-resistant cell clone from 1.0×10^6 Sf9 cells transfected with $1 \mu\text{g}$ of pAcIE1-neo vector DNA

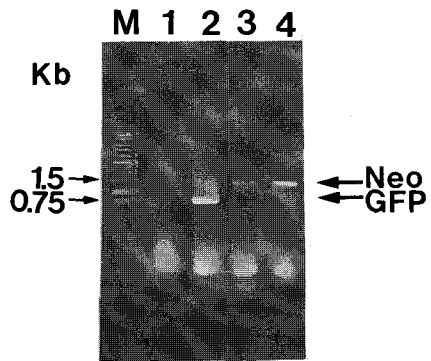


Figure 2. PCR products of genomic DNA of the transformed Sf9 cells. Lanes M, Molecular size markers; 1, normal Sf9 cells; 2, Sf9 cells transformed with pAcIE1-GFP; 3, Sf9 cells transformed with pAcIE1-neo; 4, Sf9 cells re-transformed with pAcIE1-neo in transformed Sf9 cells displaying GFP. PCR products expected are indicated by arrows.

현백터 pAcIE1-GFP에 의해 형질전환된 세포주에 다시 발현백터 pAcIE1-neo로 재도입한 형질전환 세포들로부터 염색체 DNA를 추출한 후, PCR 분석으로 확인하였다 (Figure 2). 그 결과 발현백터 pAcIE1-neo를 도입한 형질전환 세포주에서는 약 1.45 kb의 neomycin 저항성 유전자 밴드가, 발현백터 pAcIE1-GFP에 의해 형질전환 세포주에서는 약 0.75 kb의 GFP 유전자 밴드를 그리고 이미 발현백터 pAcIE1-GFP에 의해 형질전환 세포주에 다시 발현백터 pAcIE1-neo로 재도입한 형질전환 세포주에서는 약 1.45 kb의 neomycin 저항성 유전자 밴드를 확인할 수 있었다.

2. 형질전환 세포에서 재조합바이러스의 증식 및 발현

형질전환 세포주에서 재조합바이러스의 증식을 조사하기 위하여, 정상적인 Sf9 세포주와 pAcIE1-neo 도입에 의해 neomycin 저항성을 나타

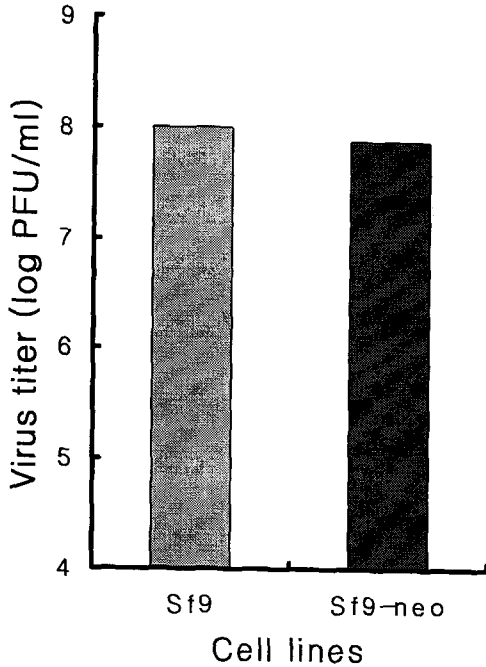


Figure 3. Titration of recombinant baculovirus in the normal and transformed Sf9 cells. The diluted recombinant baculovirus BacPAK6 was infected into a monolayer of normal (Sf9) and transformed (Sf9-neo) Sf9 cells. Virus titers were determined by plaque assay.

내는 형질전환 세포에 β -galactosidase를 발현하는 재조합바이러스를 각각 회석하여 감염시키고 플라크 검정함으로써 증식된 바이러스 역가를 결정하였다. 그 결과 (Figure 3), 정상적인 Sf9 세포에서는 약 1.0×10^8 pfu, 형질전환 세포주에서는 약 9.0×10^7 pfu의 바이러스 플라크가 나타났다.

정상적인 Sf9 세포와 neomycin 저항성을 나타내는 형질전환 세포에서 재조합바이러스에 의한 β -galactosidase의 발현을 단백질 전기영동법으로 분석하였다 (Figure 4A). 재조합바이러스가 감염되지 않은 세포에서는 관찰할 수 없는 β -galactosidase 밴드를 재조합바이러스가 감염된 정상적인 Sf9 세포와 neomycin 저항성을 나타내는 형질전환 세포에서는 뚜렷하게 관찰할 수 있었다. 재조합바이러스에 의한 β -galactosidase의 발현 정도는 감염 후 일수가 경과할수록 뚜렷하였다. 반면에 5일째는 바이러스 증식에 의한 세포의 파괴에 의한 낮은 세포단백질 농도를 관찰할 수 있었다. 또한 발현된 116 kDa의 β -galactosidase는 그 항체를 이용하여 Western blot 분석으로 확인하였다 (Figure 4B).

재조합바이러스 증식에 의해 정상적인 Sf9 세포와 neomycin 저항성을 나타내는 형질전환 세포에서 배지로 생산한 β -galactosidase의 활성을 검정

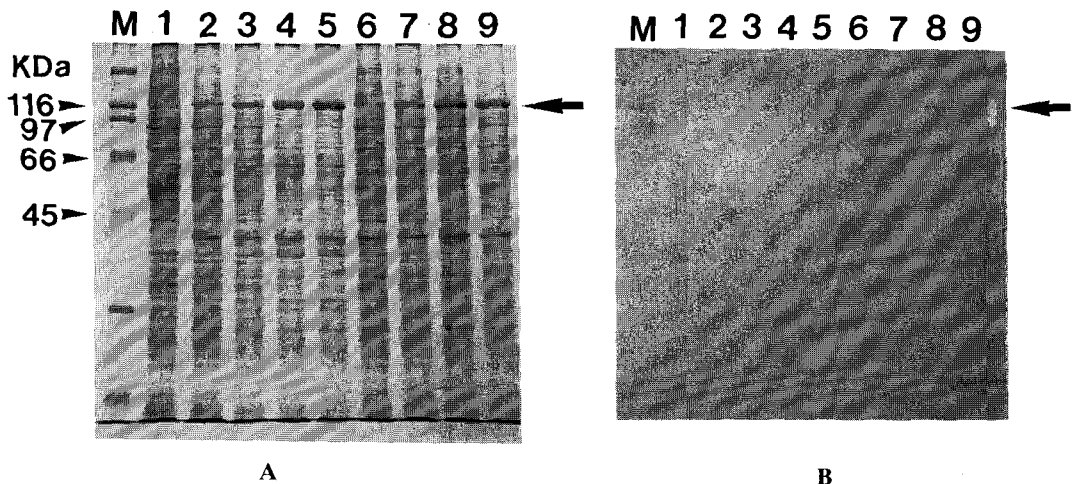


Figure 4. SDS-PAGE and Western blot analyses of β -galactosidase expressed by recombinant baculovirus in the normal and transformed Sf9 cells. Normal (lanes 2, 3, 4, and 5) and transformed (lanes 6, 7, 8, and 9) Sf9 cells were infected with recombinant baculovirus BacPAK6 at an MOI of 5 PFU per cell. Cells were collected at 2 (lanes 2 and 6), 3 (lanes 3 and 7), 4 (lanes 4 and 8), and 5 (lanes 5 and 9) days p.i. Total cellular lysates were subjected to 10% SDS-PAGE (A) and immunoblotted with β -galactosidase antibody (B). Uninfected Sf9 cells (lane 1) and SDS-PAGE molecular weight standards (lane M) are also shown. β -Galactosidase bands (solid arrows) are indicated on the right of each panel.

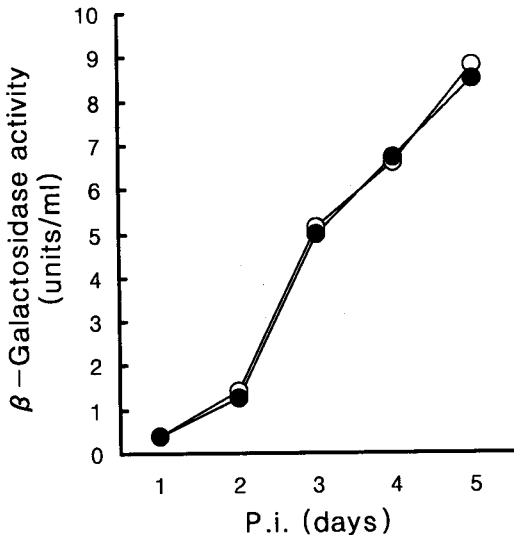


Figure 5. The activity assay of β -galactosidase expressed by recombinant baculovirus in the normal and transformed Sf9 cells. Normal (open circle) and transformed (closed circle) Sf9 cells were infected with recombinant baculovirus BacPAK6 at an MOI of 5 PFU per cell. The culture supernatant was collected at 1, 2, 3, 4, and 5 days p.i. and β -galactosidase activity was determined by using purified β -galactosidase as a control.

하였다 (Figure 5). 정상적인 Sf9 세포에서는 5일째 최고치로 배지 ml 당 약 8.8 units이었으며, 형질전환 세포에서도 5일째가 최고치로 배지 ml 당 약 8.5 units을 나타내어 발현 정도에 있어서 차이를 관찰할 수 없었다.

고 찰

베쿨로바이러스 초기발현 유전자 IE1을 이용하여 숙주세포를 죽이지 않고 외래유전자 산물을 안정적으로 발현하기 위하여 개발된 발현벡터는 IE1 유전자의 프로모터 조절 하에 삽입된 외래유전자와 함께 숙주세포의 염색체 내로 삽입시키어 세포분열과 함께 안정적으로 외래유전자 산물을 생산하는 장점을 가지고 있다 [8]. 그러나 IE1 유전자 프로모터는 기능이 약하여 외래유전자 산물의 대량 생산을 위한 발현벡터로 이용하기보다는 다양한 목적의 형질전환 곤충세포주 제작에 유용하게 사용될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 neomycin 저항성 유전자 및 GFP 유전자 등의 표식유전자를 transfection하여 삽입한 형질

전환 곤충세포를 제작하였다 [1,2]. 이러한 형질전환 곤충세포주 제작에 이어 그 세포들의 특성 구명은 필수적이라 하겠다.

본 연구에서 이미 AcNPV IE1 유전자를 이용한 발현벡터에 의해 형질전환된 세포에 외래유전자만 다른 AcNPV IE1 유전자 발현벡터를 재도입하였을 시, 정상적인 세포주에 비해 약 8배 정도의 높은 효율로 형질전환됨을 보여주었다 (Table 1). 이는 이미 염색체에 삽입되어 있는 발현벡터 유래의 IE1 유전자 염기서열과 재도입된 발현벡터의 IE1 유전자 염기서열 간의 상동재조합에 기인한 것으로 생각된다. 또 Figure 2에서 보여지는 염색체 DNA의 PCR 결과는 발현벡터의 IE1 유전자 프로모터 조절 하에 삽입된 외래유전자가 IE1 유전자 염기서열과 함께 숙주세포의 염색체에 삽입된다는 것을 보여주었으며 [8], 아울러 이미 들어있던 발현벡터는 재도입된 발현벡터에 의해 바뀐다는 것을 보여주고 있다. 이러한 결과들은 IE1 유전자 이용 발현벡터를 사용하여 곤충세포주를 형질전환 할 때, 이미 외래유전자만 다른 동일한 벡터로 형질전환된 곤충세포주를 이용하는 것이 형질전환 효율 면에서 효과적임을 시사한다.

형질전환 곤충세포주에서 재조합베쿨로바이러스의 증식과 발현 결과들로 볼 때, 정상적인 세포주에 비해 AcNPV IE1 유전자를 이용한 발현벡터에 의해 형질전환된 세포주는 재조합 AcNPV 증식과 외래유전자 발현에 있어서 거의 유사함을 알 수 있었다. 감염 초기 동안에 AcNPV 유전자들은 숙주의 RNA polymerase에 의해 전사되어지기 때문에 초기발현 유전자인 IE1은 바이러스 단백질 합성과 관계없이 숙주세포주에 바이러스 게놈이 들어가자마자 즉시 발현한다 [5-7]. 이러한 점에서 이미 AcNPV IE1 유전자를 이용한 발현벡터에 의해 형질전환된 세포주의 경우 바이러스 증식과 외래유전자 발현은 정상적인 세포주와 거의 유사하여, 형질전환 세포주의 염색체에 삽입된 발현벡터 유래의 AcNPV IE1 유전자의 부분적인 존재 또는 숙주의 RNA polymerase에 의해 그 프로모터가 조절되고 있음에 의한 영향은 없는 것으로 보여진다. 따라서 이상의 형질전환 세포주의 특성으로 볼 때, IE1 유전자 발현벡터를 이용하여 다양한 목적과 종류의 형질전환 곤충세포주 개발이 충분히 가능할 것으로 기대된다.

결 론

AcNPV IE1 유전자를 이용한 발현벡터에 의해 이미 형질전환된 세포주에 외래유전자만 다른 AcNPV IE1 발현벡터를 재도입 하였을 시, 정상적인 세포주에 비해 약 8배 정도의 높은 효율로 형질전환 되었다. 또 AcNPV IE1 유전자를 이용한 발현벡터에 의해 형질전환된 Sf9 세포주에 있어서 재조합바이러스 증식과 외래유전자 발현은 정상적인 Sf9 세포주에서와 거의 유사하였다.

감사의 글

본 논문은 1998년도 과학기술부 G7 연구비에 의하여 수행되었음.

참 고 문 헌

- 1) **Cho ES, Jin BR, Sohn HD, Choi KH, Kim SR, Kang SW, Yun EY, Kim SH, Kim KY, Je YH, Kang SK:** Construction of stably transformed Bm5 cells by using *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE1 gene. *Kor J Seric Sci* **40**: 111-116, 1998.
- 2) **Cho ES, Park HJ, Lee KS, Je YH, Kang SW, Yun EY, Kim KY, Sohn HD, Kang SK, Jin BR:** Construction of stably transformed Bm5 and Sf9 cells displaying green fluorescence by using *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE1 gene. *J Asia-Pacific Entomol* **2**: In Press, 1999.
- 3) **Cho ES, Park HJ, Jin BR, Sohn HD, Kang SW, Yun EY, Kim KY, Je YH, Kang SK:** Analysis of promoter strength of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE1 gene by using recombinant baculovirus. *Kor J Seric Sci* **41**: In Press, 1999.
- 4) **Choudary PV, Kamita SG, Maeda S:** Expression of foreign genes in *Bombyx mori* larvae using baculovirus vector. 243-264. In Richardson CD (Ed.), *Baculovirus expression protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, 1995.
- 5) **Guarino LA, Summers MD:** Nucleotide sequence and temporal expression of a baculovirus regulatory gene. *J Virol* **61**: 2091-2099, 1987.
- 6) **Huh NE, Weaver RF:** Identifying the RNA polymerases that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol* **71**: 195-201, 1990.
- 7) **Huybretschs R, Guarino LA, Brussel MV, Vulsteke V:** Nucleotide sequence of a transactivating *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus immediate early gene. *Biochem Biophys Acta* **1129**: 328-330, 1992.
- 8) **Jarvis DL, Fleming JGW, Kovacs GR, Summers MD, Guarino LA:** Use of early baculovirus promoters for continuous expression and efficient processing of foreign gene products in stably transformed lepidopteran cells. *Bio/Technology* **8**: 950-955, 1990.
- 9) **Jin BR, Yoon HJ, Choudary PV, Kang SK:** Characterization of recombinant *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (NPV) expressing the β -galactosidase gene in both Sf21 and Bm5 cells by *Bombyx mori* NPV p143 helicase gene. *Mol Cells* **7**: 762-768, 1997.
- 10) **Jin BR, Yoon HJ, Yun EY, Kang SK, Cho ES, Kang SK:** Expression of green fluorescent protein in both *Spodoptera frugiperda* cells and *Bombyx mori* larvae by Ac-Bm hybrid virus. *J Kor Soc Virol* **28**: 225-232, 1998.
- 11) **Laemmli UK:** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* **227**: 680-685, 1970.
- 12) **Lee HH, Kang BJ, Park KJ:** Construction of a baculovirus expression system using *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus for eukaryotic cell. *J Microbiol Biotechnol* **8**: 676-684, 1998.
- 13) **Lee HH, Miller LK:** Isolation and initial characterization of temperature-sensitive mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* **31**: 240-252, 1979.
- 14) **Lu M, John RR, Iatrou K:** Trans-activation of a cell housekeeping gene promoter by the IE1 gene product of baculoviruses. *Virology* **218**: 103-113, 1996.
- 15) **Luckow VA, Summers MD:** Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology* **6**: 47-55, 1988.
- 16) **O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA:** Baculo-

virus expression vectors: A laboratory manual, WH Freeman & Co, New York, 1992.

- 17) **Summers MD, Smith GE:** A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Texas Agriculture Experiment Station Bulletin No. 1555*, 1987.
- 18) **Towbin H, Staehelin T, Gordon J:** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide

gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354, 1979.

- 19) **Vaughn JL, Goodwin RH, Thompkins GJ, McCawley P:** The establishment of two insect cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro* **13**: 213-217, 1977.
-