

## Bovine Viral Diarrhea Virus를 이용한 포유동물세포 발현벡터의 개발

이영민\*

충북대학교 의과대학 미생물학교실, 의학연구소

최근 인간을 비롯한 다양한 생명체의 genome project 연구결과 밝혀진 유전자들의 염기서열을 토대로, 생명체 구성성분의 실질적인 역할을 하는 단백질의 기능을 밝히는 proteomics에 관한 연구의 필요성이 대두되고 있다. 따라서, 이 연구는 post-genomics 시대에 다양한 종류의 단백질 기능과 상호작용의 기초연구에 필수적인 새로운 포유동물세포 유전자 발현벡터를 RNA 바이러스인 소설사성 바이러스(Bovine Viral Diarrhea Virus)의 infectious cDNA molecular clone을 이용하여 개발하였다. 먼저 BVDV의 infectious cDNA molecular clone (pNADLcIns-)을 이용하여 puromycin 항생제에 저항성을 나타내는 puromycin acetyltransferase (pac) 유전자를 삽입하여 recombinant full-length infectious cDNA clone을 합성하였다. 합성된 viral recombinant cDNA clone을 주형으로 T7 RNA polymerase를 사용하여 *in vitro* transcribed full-length viral RNA를 합성하였다. 합성된 viral RNA의 자가복제 여부는 MDBK 세포에 transfection시킨 후, <sup>32</sup>P로 metabolically label함으로써 확인하였다. 또한, transfection된 세포에서의 바이러스 단백질 발현여부는 바이러스에 특이적으로 반응하는 anti-NS3 단클론항체를 사용하여 분석하였다. 또한, infectious cDNA clone을 응용하여 새로운 포유동물세포 유전자 발현벡터의 개발을 위해서, 먼저 바이러스의 구조단백질이 바이러스의 자가복제에 필수적인 지를 평가하였다. 실험결과, 각각의 구조단백질 유전자를 deletion한 recombinant cDNA clone으로부터 합성된 viral RNA의 자가복제여부는 pac 유전자의 발현여부로 recombinant cDNA clone으로부터 합성된 recombinant viral RNA를 MDBK 세포에 transfection시킨 후, puromycin으로 selection함으로써 할 수 있었다. Deletion 실험결과, 각각의 구조단백질 capsid 및 E0, E1, E2는 바이러스의 자가복제에 영향을 끼치지 않음을 알 수 있었다. 이와 더불어, 바이러스의 모든 구조단백질을 함께 deletion하였을 경우에도 자가복제에는 영향을 끼치지 않는 것을 합성된 viral replicon을 이용한 실험에서 알 수 있었다. 이렇게 합성된 BVDV의 replicon을 사용하여 포유동물의 발현벡터로써 사용할 수 있는지의 여부를 분석하기 위해서 pac 유전자 이외에 luciferase 유전자를 사용하여 MDBK 및 HeLa, BHK 세포에서의 단백질 발현 정도를 시간 별로 분석한 결과, BVDV의 replicon을 다양한 종류의 유전자 발현벡터로 사용할 수 있음을 알 수 있었다. 그러므로, RNA 바이러스의 하나인 BVDV의 viral replicon을 이용하여 다양한 종류의 포유동물 세포에 유전자 발현벡터로써 사용할 수 있음으로 post-genomics 시대에 다양한 종류의 단백질 기능연구에 많은 도움이 되리라 기대한다.

**Key words** □ bovine viral diarrhea virus, expression vector, RNA virus, viral replication

인간을 포함한 다양한 종류의 생명체의 가장 중요한 구성성분 중의 하나가 각각의 유전자로부터 발현된 단백질이다. 세포 내에는 여러 종류의 단백질들이 세포의 구조와 기능을 조절함으로써 생명체를 유지한다. 따라서, 생명체 구성성분의 실질적인 역할을 하는 단백질의 기능을 밝히는 proteomics의 연구가 여러 생명체의 genome project가 끝난 이후, 생명공학의 기초연구분야에서 절실히 요구되고 있다. 특히, 최근에 전 세계적으로 인간유전체 사업(human genome project)의 결실로 인해 여러 종류의 질병을 유전자 수준에서 연구하는 것이 가능해졌으므로 유전자조작을 통해 각종 질병을 치료하기 위한 연구가 시작되었다. 이와 같이 기초연구분야 뿐 만 아니라, 의학의 응용연구분야에서도 단백질의 기능과 다른 단백질간의 상호작용을 연구하기 위해서는 연구자가 원하는 유전자를 적절한 세포 내에서 발현할 수 있어야한

다. 연구자가 원하는 각종 유전자를 적절한 세포 내에서 단백질로 발현하기 위해서는 다양한 용도에 맞는 적절한 유전자발현 시스템이 요구된다. 여러 종류의 유전자발현 시스템 중에서도 인체를 포함한 포유동물세포에서 유전자를 발현시킬 수 있는 시스템이 최근 완료된 인간유전체사업의 결실과 더불어 인간 유전자의 기능을 밝히는데 특히 절실히 요구된다.

현재 일반적으로 사용하고 있는 포유동물세포 유전자발현 시스템은 여러 가지가 있지만, 대부분 DNA 바이러스인 cytomegalovirus (CMV)의 promoter 혹은 RNA 바이러스인 retrovirus의 long terminal repeat (LTR) promoter를 가진 DNA plasmid를 인위적으로 세포 내에 삽입함으로써, 단기간의 단백질 발현을 필요로 하는 유전자발현 시스템으로 사용하고 있다. 하지만, 이러한 유전자발현 시스템들은 현재의 생명공학 분야에서 필요로 하는 여러 가지 용도에 다양하게 사용될 수 없다. 특히, 기존의 시스템은 발현효율이 낮고, 발현정도를 조절할 수 없으며, 신경세포와 같이 최종분화가 끝난 세포에서는

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 043-261-2863, Fax: 043-272-1603  
E-mail: ymlee@med.chungbuk.ac.kr

그 기능을 제대로 하지 못한다. 또한, 기존의 방법으로 stable cell line을 만들 경우, 장기간의 시간이 필요로 하는 등의 여러 문제점들이 있다.

Flaviviridae family는 flavivirus, pestivirus, 및 hepacivirus의 세 개의 속으로 구성되어 있다. Flavivirus 속에는 일본뇌염 바이러스 (Japanese encephalitis virus), 및 뎅기열 바이러스(dengue virus), 황열 바이러스(yellow fever virus)가 대표적이며, pestivirus 속에는 축산업에 경제적 손실을 끼치는 소 설사성바이러스(BVDV), 및 돼지 콜레라바이러스(classical swine fever virus), 양의 border disease virus들이 분류되어 있다. 이와 더불어, hepacivirus 속에는 현재 hepatitis C virus만이 분류되어 있다. 이들 바이러스는 single-stranded, positive-sense RNA 바이러스이며, 지질 외막이 바이러스의 capsid core를 둘러싸고 있다(11,17).

BVDV 바이러스는 하나의 긴 open reading frame을 암호화하는 약 13 kb 크기의 게놈을 가지고 있다(11). 바이러스의 구조 단백질들은 게놈 구조 중에서 5' 말단에 위치하는 반면, 바이러스 복제 과정에 관여하는 비구조단백질들은 3' 말단에 자리잡고 있다. Open reading frame 이외에도, 게놈의 양쪽 끝에 바이러스의 복제, 및 전사, 해독에 관여하는 5' NTR과 3' NTR의 두 cis-acting element들이 있다(10,12). Cell-free translation system과 mammalian gene expression system들을 이용하여 바이러스의 유전자 순서를 BVDV의 경우 다음과 같이 밝혔다: NH<sub>2</sub>-N-C-E0-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH(8). 일반적으로, C (capsid)는 염기성 RNA 결합 단백질로 nucleocapsid protein이며, E1과 E2는 바이러스 외막 당단백질(3,9,18), NS<sub>2</sub>는 NS2-3 단백질 분해효소의 촉매 영역, NS3 단백질의 N-말단 영역은 주된 바이러스 단백질분해효소의 기능을 가지고 있으며(1,4, 16,21,22), C-말단 영역은 nucleoside triphosphase와 helicase의 기능들을 가지고 있다. NS4A의 경우, NS3 단백질분해효소의 절단효율을 증가시켜주는 보조요인 역할을 한다. 마지막으로, NS5B는 RNA-dependent RNA polymerase의 Gly-Asp-Asp motif를 가지고 있으며, 또한 그것의 활성도 정제된 단백질을 가지고 증명된 바 있다(5,6,11,23).

최근의 BVDV를 포함한 pestivirus들 중에서 몇몇 바이러스의 infectious cDNA molecular clone이 성공적으로 합성되어 분자생물학적인 측면에서 pestivirus의 기초연구에 결정적인 전환점을 제공하였다. 또한, BVDV의 경우 바이러스를 조직배양세포에 감염시 cytopathogenicity를 나타내면서 세포를 사멸시키는 cytopathic NADL strain과, 사멸시키지 않는 noncytopathic NADLcIns- strain의 isogenic virus pair에 대한 infectious cDNA clone을 합성하는 데 성공함으로써, 이들 cDNA clone (pNADLcIns-와 pNADL)들을 토대로 다양한 종류의 포유동물세포 유전자발현 system을 개발하고자 하였다. 특히, 이번 연구에서는 바이러스의 자가복제에 필요한 최소한의 genetic element를 가진 BVDV의 viral replicon을 사용하여, 원하는 유전자를 T7 RNA polymerase를 사용하여 *in vitro* transcription으로 얻은 RNA molecule로부터 발현을 시작하는 RNA-launched gene expression system으로 개발하려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 세포 배양

MDBK (bovine kidney cell) 세포는 10% horse serum 및 sodium pyruvate, penicillin/streptomycin이 들어 있는 D-MEM 배지에 배양하였다. BHK (hamster kidney cell) 세포는 10% fetal bovine serum 및 vitamine, L-glutamine, penicillin/streptomycin이 들어 있는  $\alpha$ -MEM 배지에 배양하였다. HeLa (human cervix cancer cell) 세포는 10% fetal bovine serum과 penicillin/streptomycin이 들어있는 D-MEM 배지에 배양하였다. 세포배양 시 사용한 모든 재료들은 Gibco BRL Life Tech. (Gaithersburg, USA)로부터 구입하였다.

### Plasmid 제조

최근에 성공적으로 합성된 BVDV의 infectious cDNA molecular clone인 pNADLcIns- (7)을 이번 연구에 사용하였다. Infectious cDNA clone pNADLcIns-/pac을 재합성하기 위해서 *ubi-pac*-EMCV IRES cassette를 pRS2 sublong vector에 먼저 PCR 증폭으로 cloning을 하여 염기서열을 확인하였다. PCR 증폭단계에서 각각의 말단에 제한효소 자리 *Sph* I과 *Sac* I을 삽입 하였으면, 최종적인 cloning 단계에서 이들 제한효소를 이용하여 infectious cDNA clone pNADLcIns-에 삽입하였다.

Infectious cDNA clone pNADLcIns-/pac을 이용하여 BVDV 각각의 구조단백질(C, E0, E1, E2)들을 PCR를 통해 in-frame deletion을 가진 recombinant cDNA clone을 합성하였다. PCR 반응시 사용할 oligo primer들은 다음과 같다. 바이러스의 capsid (C) 단백질의 유전자를 제거할 경우(pNADLcIns-/pac/ $\Delta$ C), 5'-GAT CTC GAG TTC AAT ATT GTA CCA GTT-3', 및 5'-GAT AAG CTT GCA TTG TTG GCG TGG GCA-3', 5'-GAT AAG CTT GCA TTG TTG GCG TGG GCA-3', 5'-CTT AGG TCC CAA GTT ATA-3'를 사용하여 제거될 양쪽부위들을 증폭하였다. 이때 DNA cloning 단계를 보다 원활하게 하고, 이후에 합성된 각각의 in-frame deletion을 재조합하는데 사용하기 위해서 제한효소인 *Hind* III 자리(사용된 oligo primer상에 밑줄로 표시)를 제거된 자리에 새로이 삽입하였다. 바이러스의 E0 단백질의 유전자를 제거할 경우(pNADLcIns-/pac/ $\Delta$ E0), 5'-GAT CTC GAG TCC GGA TGC TAC AAT AGT-3', 및 5'-GAT AAG CTT GTT CCA CTG TGT TAT GTT-3', 5'-GAT AAG CTT GGC AAG CAG CTC GGG ATA-3', 5'-GAT CTC GAG CAG CTG TTG TCA GCT CCA-3'를 사용하여 제거될 양쪽부위들을 증폭하고, 새로운 *Hind* III자리를 삽입하였다. 바이러스의 E1 단백질의 유전자를 제거할 경우(pNADLcIns-/pac/ $\Delta$ E1), 5'-GAT CTC GAG GGG CCC CTG CAA CTT TGA-3', 및 5'-GAT AAG CTT TTT GCG ATC GAC ATC ACA-3', 5'-GAT AAG CTT GAG GTA CTA CTA CTT TCT-3', 5'-GAT CTC GAG GGC CGG TCC GTT CAG CAG-3'를 사용하여 제거될 양쪽부위들을 증폭하고, 새로운 *Hind* III자리를 삽입하였다. 바이러스의 E2 단백질의 유전자를 제거할 경우(pNADLcIns-/pac/ $\Delta$ E2), 5'-

GAT CTC GAG CAG CTG AAG TAA TAC CAG-3', 및 5'-GAT AAG CTT GGC ATA CGA GAA TTC AGG-3', 5'-GAT AAG CTT TGG TTT GAC CTG GAG GTG-3', 5'-GAT CTC GAG CTT TAC GCT CTC CTC CCT-3'를 사용하여 제거될 양쪽 부위들을 증폭하고, 새로운 *Hind* III자리를 삽입하였다. 이렇게 증폭된 바이러스의 DNA 단편들은 일반적인 DNA 재조합 기술을 사용하여 pRS2 subcloning vector에서 염기서열을 확인한 후, pNADLcIns-의 infectious cDNA clone에 재조합하였다. 이 결과 바이러스의 capsid, 및 E0, E1, E2의 염기서열중에서 nt. 2494-2718, 및 nt. 2794-3384, nt. 3484-3618, nt. 4072-5016 부위가 각각 제거되었다(염기서열의 번호는 BVDV 바이러스의 NAD-LcIns- strain을 토대로 함). 제거된 바이러스의 염기서열 부위는 각 단백질의 topology를 신중히 고려하여 결정되었다. 위에서 바이러스의 각 구조단백질이 deletion된 네 가지의 viral replicon들과 함께, 바이러스의 구조단백질(C, E0, E1, E2) 모두가 deletion된 viral replicon을 재조합하기 위해서 pNADLcIns-/pac/ $\Delta$ C와 pNADLcIns-/pac/ $\Delta$ E2의 in-frame deletion 단계에서 새로이 삽입된 *Hind* III 제한효소자리를 이용하여 pRS2 subcloning vector를 거쳐 pNADLcIns-/pac/ $\Delta$ S (Fig. 5)라고 하는 viral replicon을 재조합하였다.

### In vitro Transcription

약 1  $\mu$ g의 wild type 또는 recombinant cDNA plasmid를 *Sda* I 제한효소를 이용하여 절단함으로써 *in vitro* transcription시 필요한 run-off site를 만들었다. 이후, 제한효소 반응액은 200  $\mu$ g/ml proteinase K와 0.5% SDS와 함께 15 시간 동안 배양시킨 후, phenol-chloroform으로 추출하고 ethanol로 침전시킨 후, 10  $\mu$ l nuclease-free dH<sub>2</sub>O에 녹임으로써 RNase-free DNA template를 준비하였다. Transcription은 7.5 mM dNTPs, T7 RNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, USA)들이 들어있는 20  $\mu$ l 반응액을 37°C에서 1 시간 동안 배양하였다. 이렇게 생성된 viral replicon RNA는 2.5 M LiCl를 사용하여 -20°C에서 1 시간 동안 침전시키고, 14,000 rpm에서 1 분 동안 원심 분리하였다. 분리된 RNA는 70% ethanol를 사용하여 salt를 제거한 후, 20  $\mu$ l nuclease-free dH<sub>2</sub>O에 녹였다. 이 결과 합성된 RNA는 denaturing formalde-hyde-agarose gel를 사용하여 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

### Transfection

합성된 viral replicon RNA는 DOTAP lipofection reagent (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 사용하여 transfection시키거나, capacitance extender를 가진 gene pulser (Bio-Rad, Hercules, USA)를 사용하여 electroporation시킴으로써 인위적으로 MDBK, HeLa, 및 BHK 세포 내로 삽입시켰다.

DOTAP lipofection reagent를 사용하여 lipofection을 할 경우, 2.5 pg-5  $\mu$ g의 RNA와 50  $\mu$ g DOTAP을 20 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES, pH 7.4)가 포함된 200  $\mu$ l 반응액에 5 분 동안 상온에서 배양하였다. 반응액은

5 ml OptiMEM 1 (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)에 희석시킨 후, OptiMEM 1에서 4 시간 동안 배양된 MDBK 세포 위에 떨어뜨린다. 16 시간 동안 배양한 후, OptiMEM 1은 10% horse serum (Sigma, St. Louis, USA)이 포함된 DMEM으로 대체시킨다.

Gene pulser를 사용하여 electroporation할 경우, 70-80% 정도 적절하게 자란 MDBK 및 HeLa, BHK 세포를 trypsin을 사용하여 배양접시에서 분리한 다음, 10<sup>7</sup> cell/ml의 밀도로 10% horse serum을 포함한 Hanks MEM이나 10% horse serum을 포함한 DMEM에 다시 준비하였다. 2.5 pg-5  $\mu$ g의 viral replicon RNA와 준비된 세포를 섞은 다음 0.4-cm electroporation cuvette (Bio-Rad)에 옮긴 후 300 V (750 V/cm)와 960  $\mu$ F에서 계속 두 번 electroporation을 실시하였다. 이후, 세포들은 8 ml의 10% horse serum을 포함한 DMEM으로 옮겨 배양하였다.

### Western blotting

Viral RNA로부터 translation된 결과 만들어진 바이러스 단백질의 발현유무를 분석하는 방법으로 viral replicon RNA의 자가복제여부를 분석하였다. Transfection 이후 72 시간이 경과하였을 때, transfection된 세포의 cell lysate를 sample buffer를 이용하여 lysis시켰다. 전체단백질들을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로 분리한 후, nitrocellulose membrane에 transfer한 다음, primary antibody로 mouse anti-NS3 단클론항체를 사용하여 nitrocellulose membrane을 decoration하였다. Primary antibody로 decoration된 membrane은 HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody로 염색하였다. Decoration된 BVDV 바이러스 NS3 단백질은 ECL 반응을 사용하여 발현유무를 분석하였다.

### Puromycin selection

Wild type을 비롯한 다양한 종류의 recombinant viral RNA를 다양한 세포에 electroporation하고, transfection된 세포의 1/10을 6-well plate에 seeding하였다. 12 시간이 경과한 이후, 10  $\mu$ g/ml puromycin과 10% horse serum이 포함된 D-MEM으로 selection을 하였다. Selection이 시작되지 3-4 일 경과하였을 때, 7.5% formaldehyde로 고정시킨 후, 5% crystal violet으로 세포를 염색하였다.

### Luciferase assay

Wild type을 비롯한 다양한 종류의 recombinant viral RNA로 transfection된 세포를 6-well plate에 seeding 하고 PBS로 두 번 washing 하였다. 세포는 200  $\mu$ l의 lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH7.8, 2 mM DTT, 2 mM EGTA, 1% [v/v] Triton X-100)를 사용하여 준비하고, 상온에서 20 분동안 배양하였다. 그 다음 cell debris를 제거하기 위해서 cell lysate을 2 분간 12,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 얻었다. 10-20  $\mu$ l의 cell extract를 100  $\mu$ l의 luciferase assay reagent (20 mM Tricine, 1.07 mM (MgCO<sub>3</sub>)<sub>4</sub> Mg(OH)<sub>2</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 2.67 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, 270  $\mu$ M coenzyme A (Sigma, St. Louis USA), 470  $\mu$ M

luciferin (Promega, Madison, USA), 530  $\mu$ M ATP와 섞어서 곧 바로 luciferase activity를 luminometer로 측정하여 relative light unit (RLU)로 나타내었다.

**결 과**

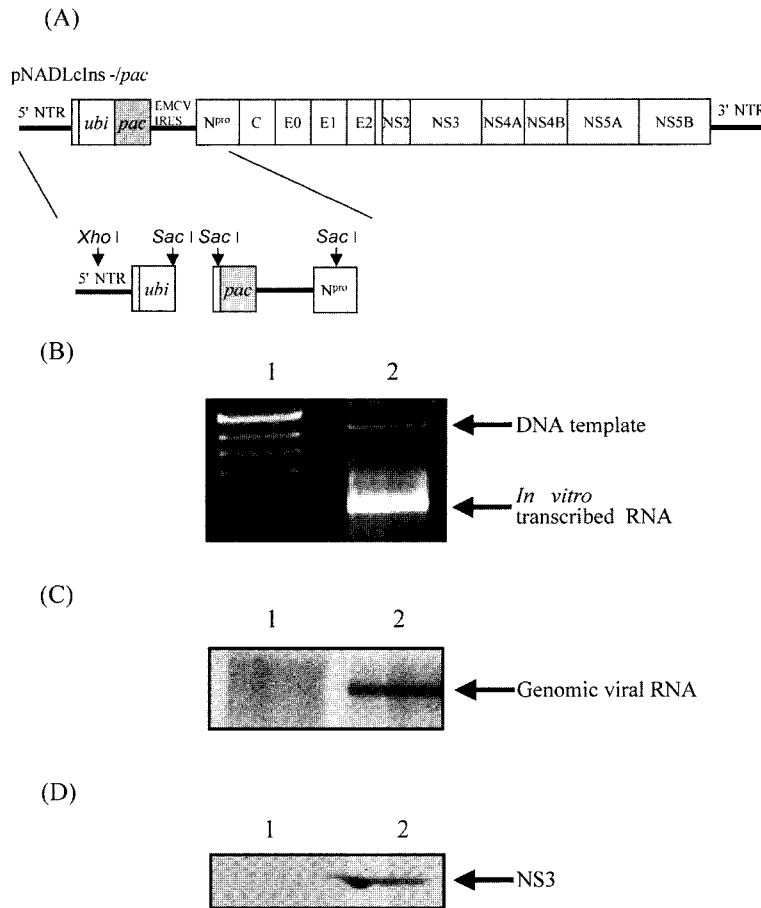
**Selective marker인 puromycin acetyltransferase (*pur*<sup>R</sup>) 유전자를 발현하는 infectious cDNA molecular clone의 합성**

이 연구에서는 최근에 성공적으로 합성된 BVDV의 infectious cDNA molecular clone인 noncytopathic (ncp) strain의 pNADLcIns-(7)를 사용하였다. Fig. 1A에 나타난 것과 같이, BVDV의 자가복제 유무를 손쉽게 알기 위해서 selective marker인 puromycin acetyltransferase (*pac*) 유전자를 바이러스가 복제할 때만 발현이 되도록 DNA 재조합 기술을 이용하여 재합성하였다. 재료 및 방법에 자세하게 설명한 것과 같이, 재합성시 *Pac* 단백질의 N-말단을 정확하게 발현시키기 위해서 세포의 ubiquitin (*ubi*)

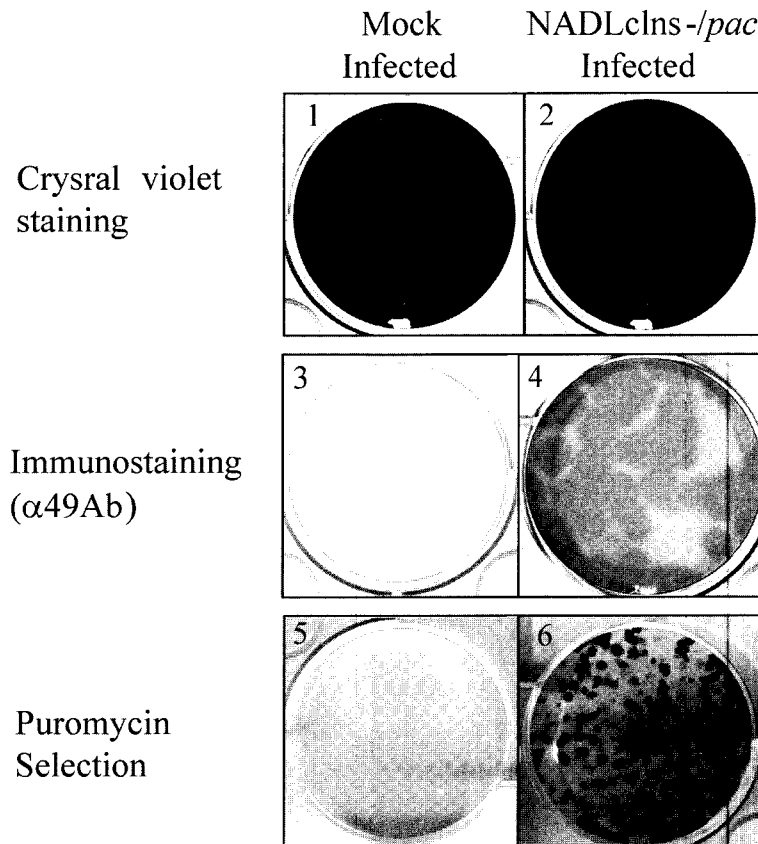
유전자를 *pac* 유전자의 5' 말단에 in-frame으로 삽입하였다(Fig. 1A) (19).

먼저 infectious cDNA clone으로부터 T7 RNA polymerase를 사용하여 *in vitro* transcription을 통해 합성된 다량의 viral RNA 중 1  $\mu$ g를 전기영동 후, ethidium bromide로 염색을 통해 확인하였다(Fig. 1B). 합성된 1-2  $\mu$ g의 viral RNA를 MDBK세포에 electroporation 방법으로 transfection시킨 후, <sup>32</sup>P 방사선 동위원소로 metabolically labelling된 viral RNA를 탐지하여 viral RNA의 자가복제 유무를 확인하였다(Fig. 1C). 또한, transfection된 MDBK 세포에서의 바이러스 단백질의 발현여부를 분석하기 위해서 BVDV NS3 단백질에 특이하게 반응하는 anti-NS3 단클론항체를 이용하여 western blotting를 통해서 알 수 있었다(Fig. 1D).

Infectious cDNA clone에 삽입된 *pac* 유전자가 바이러스 자가 복제시 *Pac* 단백질의 발현유무를 알아보기 위해서 focus assay를 수행하였다(Fig. 2). 이 실험을 위해서 먼저 ncp strain인 NAD-



**Fig. 1.** Generation and analysis of infectious BVDV cDNA clone pNADLcIns-/pac containing puromycin acetyltransferase gene (*pac*). (A) Schematic diagram of pNADLcIns-/pac cDNA as described in Materials and Methods. (B) *In vitro* transcribed viral RNA using T7 RNA polymerase. Lane 1, 1 kb DNA ladder; lane 2, 1  $\mu$ g of NADLcIns-/pac viral RNA. (C) <sup>32</sup>P-labelled NADLcIns-/pac genomic viral RNA from transfected MDBK cells. After transfection as described in Materials and Methods in detail, one-third of total cellular RNA from a 6-well plate was loaded in a 10% glyoxal-agarose gel. Lane 1, mock-transfected; lane 2, NADLcIns-/pac-transfected. (D) Cell lysate from either mock-transfected (lane 1) or NADLcIns-/pac-transfected MDBK cells (lane 2) was separated by 10% SDS-PAGE. BVDV NS3 protein was detected by a mouse anti-NS3 antibody (G40), and NS3 protein was subsequently visualized by a HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibody and ECL reaction.



**Fig. 2.** Expression of the *pac* gene inserted in pNADLcIns-/pac cDNA clone. MDBK cells were mock-transfected (1, 3, 5) or NAD-LcIns-/pac viral RNA-transfected (2, 4, 6). Transfected cells in a 6-well plate were incubated for 3 days. Viable cells were stained with 5% crystal violet solution (1 & 2). Immunostaining of NAD-LcIns-/pac-transfected MDBK cells using  $\alpha 49$  BVDV antiserum (3 & 4). Transfected cells were selected with 10  $\mu\text{g/ml}$  of puromycin by adding to the overlaid agar (5 & 6).

LcIns-/pac 바이러스를 MDBK 세포에 감염후 0.5% overlay agar를 덮었다. 감염후 72 시간이 경과한 다음, 감염된 세포를 고정시키고, crystal violet으로 살아남은 세포들을 염색하였다(Fig. 2, 2). 실험결과, mock-infection된 세포와 비교해 보았을 때, ncp strain의 NADLcIns-/pac 바이러스가 감염된 세포에서 예상했던 대로 cytopathic effect는 전혀 나타나지 않았다(Fig. 2, 1-2). Cytopathogenicity를 나타내지 않는 ncp strain의 바이러스 자가복제 유무는 BVDV 바이러스 항원에 특이하게 반응하는 anti-BVDV antiserum ( $\alpha 49$ )을 사용한 immunostaining 실험 결과 알 수 있었다(Fig. 2, 3-4).

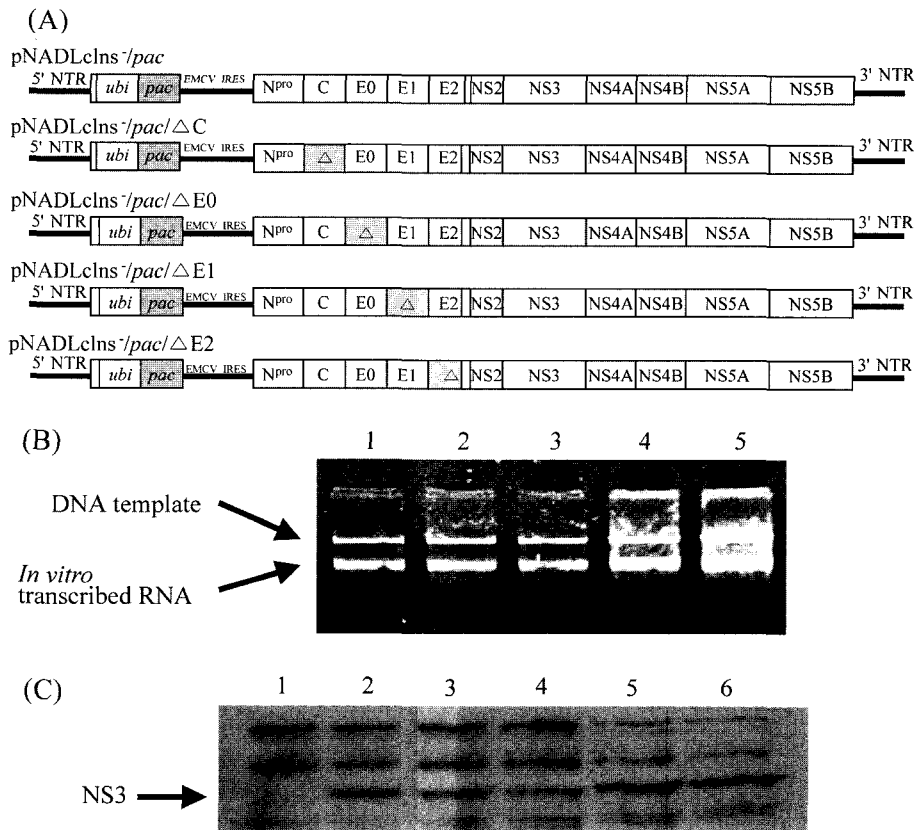
#### Infectious cDNA molecular clone으로부터의 $\text{pur}^R$ 유전자의 발현

재조합된 infectious cDNA molecular clone으로부터 바이러스의 자가복제시 삽입된 selective marker *pac* 유전자가 발현하는지의 여부를 분석하기 위해서 다음과 같은 실험을 하였다. 먼저 MDBK 세포를 각각 NADLcIns-/pac 바이러스로 감염시킨 후 0.5% overlay agar를 덮었다. 바이러스 감염 후 48 시간이 경과한 다음, 10  $\mu\text{g/ml}$  농도의 puromycin이 첨가된 배양액을 사용하

여 3일간 배양하였다. 그 결과, ncp strain인 NADLcIns-/pac 바이러스가 감염된 세포는 puromycin 항생제에 저항성이 있는 세포들이 colony를 형성하면서 성장하였으며(Fig. 2, 6), 전혀 감염되지 않은 세포는 항생제에 의해서 사멸하였다(Fig. 2, 5). 따라서, 이 실험 결과로 infectious cDNA clone에 삽입된 *pac* 유전자가 BVDV 바이러스의 복제시 발현됨을 알 수 있었다.

#### BVDV 자가복제에 필요한 최소한의 genetic element의 분석

BVDV의 genome은 바이러스의 구조단백질(C, E0, E1, E2)과 비구조단백질(NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B)을 암호화하고 있는 유전자들로 나눌 수 있다. 위 실험 결과 재조합된 *pac* selective marker를 가진 infectious cDNA clone을 이용하여 바이러스 구조단백질이 바이러스의 자가복제에 필수적인지의 여부를 알기 위해서 각각의 구조단백질을 infectious cDNA clone상에서 각 단백질의 topology를 신중히 고려하여 제거하였다(Fig. 3A). 이렇게 재조합된 recombinant cDNA clone을 주형으로 사용하여 T7 RNA polymerase를 이용하여 재료 및 방법에 자세히 기술한 것과 같이 *in vitro* transcription을 하여 다량의 recombinant viral RNA를 합성하였다(Fig. 3B). 다음으로, 합성된



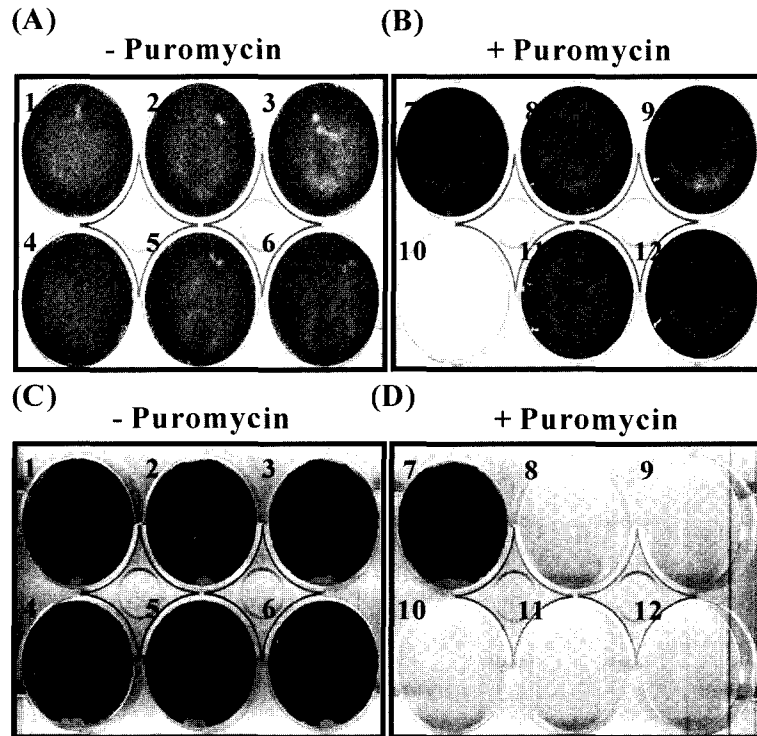
**Fig. 3.** Identification of the minimal genetic element required for BVDV viral replication. (A) Schematic diagram of recombinant cDNA constructs containing a deletion in the BVDV viral structural genes. (B) Recombinant viral RNAs were transcribed by using T7 RNA polymerase as described in Materials and Methods. Lane 1, NADLcIns-/pac; lane 2, NADLcIns-/pac/ΔC; lane 3, NADLcIns-/pac/ΔE0; lane 4, NADLcIns-/pac/ΔE1; lane 5, NADLcIns-/pac/ΔE2. (C) Cell lysate of transfected MDBK cells were separated by 10% SDS-PAGE. Expression of NS3 protein was confirmed by western blotting. Lane 1, mock-transfected; lane 2, NADLcIns-/pac-transfected; lane 3, NADLcIns-/pac/ΔC-transfected; lane 4, NADLcIns-/pac/ΔE0-transfected; lane 5, NADLcIns-/pac/ΔE1-transfected; lane 6, NADLcIns-/pac/ΔE2-transfected.

recombinant viral RNA로부터 바이러스 자가복제로 인해 단백질이 발현되는지의 여부를 평가하였다. 이를 위해 recombinant viral RNA를 MDBK 세포에 transfection시킨 후, 10% polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 cell lysate의 모든 단백질을 분리하였으며, BVDV 바이러스에 특이적으로 반응하는 anti-NS3 단클론항체를 사용하여 western blot analysis를 수행하였다 (Fig. 3C). Western blot 결과, wild type NADLcIns-/pac과 마찬가지로 recombinant viral RNA NADLcIns-/pac/ΔC 및 NADLcIns-/pac/ΔE0, NADLcIns-/pac/ΔE1, NADLcIns-/pac/ΔE2 모두 바이러스 NS3 단백질을 발현함을 알 수 있었다(Fig. 3C).

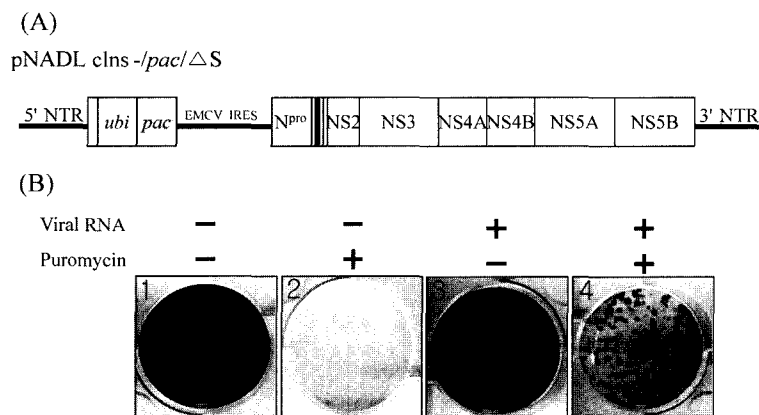
또한, 각각의 recombinant viral RNA를 transfection시킨 MDBK 세포를 사용하여 삽입된 selected marker인 *pac* 유전자의 발현 여부를 분석하였다. 이 실험을 위해서 transfection된 MDBK 세포를 puromycin 항생제를 첨가하거나 또는 대조군으로 첨가하지 않고 관찰하였다(Fig. 4A). Puromycin을 첨가하였을 경우, 항생제를 첨가하지 않았을 경우와 마찬가지로 mock-transfection된 세포를 비롯하여 wild type NADLcIns-/pac, NADLcIns-/pac/ΔC 및 NADLcIns-/pac/ΔE0, NADLcIns-/pac/

ΔE1, NADLcIns-/pac/ΔE2의 recombinant viral RNA가 transfection된 세포들 모두 사멸하지 않고 잘 자라는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4A). 따라서, Western blot 실험결과와 마찬가지로, 각 구조 단백질을 제거하였을 경우에 viral RNA replication에는 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다.

다음으로, 각각의 구조단백질이 infectious viral particle 생성에는 어떠한 영향을 끼치는지를 분석하기 위해서 다음과 같은 실험을 수행하였다. 각각의 recombinant viral RNA가 transfection된 세포에서 infectious viral particle이 생성되었다면, transfection된 세포에서 얻어진 상층액에 infectious virion이 존재한다. 따라서, transfection후 얻어진 조직배양액을 가지고 MDBK 세포를 감염시킨 후 puromycin으로 selection함으로써 infectious virion의 생성 여부를 분석하였다(Fig. 4B). 이 실험 결과 Fig. 4B에서 나타난 것과 같이, wild type NADLcIns-/pac viral RNA를 transfection시킨 세포에서 얻어진 배양액을 다시 감염하였을 경우, 감염된 세포들이 항생제가 첨가된 배양액에서 사멸하지 않고 자라는 것을 알 수 있었다. 하지만, 각각의 바이러스 구조단백질이 제거된 recombinant viral RNA가 transfection된 세포에서 얻



**Fig. 4.** A deletion in the viral structural protein of BVDV does not affect viral replication but abolishes infectious viral particle formation. (A and B) MDBK cells were mock-transfected or transfected with various recombinant viral RNAs described in Fig. 3A. Transfected cells were seeded in a 6-well plate and incubated in the absence (A) or in the presence (B) of 10  $\mu\text{g/ml}$  of puromycin. After selection, viable cells were visualized by staining with 5% crystal violet. (C and D) The supernatant obtained from transfected cells were used to infect naive MDBK cells. After 24 hr post-infection, infected cells were incubated in the absence (C) or in the presence (D) of 10  $\mu\text{g/ml}$  of puromycin, and stained with 5% crystal violet. 1 and 7, wild-type NADLcIns-/pac; 2 and 8, NADLcIns-/pac/ $\Delta\text{C}$ ; 3 and 9, NADLcIns-/pac/ $\Delta\text{E0}$ , 4 and 10, mock; 5 and 11, NADLcIns-/pac/ $\Delta\text{E1}$ ; 6 and 12, NADLcIns-/pac/ $\Delta\text{E2}$ .



**Fig. 5.** Replication of BVDV viral replicon containing *pac* gene. (A) Schematic diagram of BVDV viral replicon NADLcIns-/pac/ $\Delta\text{S}$  containing *pac* gene. (B) Expression of the *pac* gene from BVDV viral replicon NADLcIns-/pac/ $\Delta\text{S}$ . Viral replicon-transfected MDBK cells were incubated in the absence (1 & 3) or in the presence (2 & 4) of 10  $\mu\text{g/ml}$  of puromycin in the culture media. 1 & 2, mock-transfected; 3 & 4, NADLcIns-/pac/ $\Delta\text{S}$ -transfected.

어진 배양액을 가지고 다시 감염하였을 경우, 감염된 세포가 자라지 않는 것을 알 수 있었다(Fig. 4B, 8, 9, 11, 12). 따라서, 바이러스 구조단백질 capsid 뿐만이 아니라, E0, E1, E2 단백질 모두 infectious viral particle 생성에 필요하다는 것을 알 수 있었다.

**BVDV viral replicon의 합성 및 자기복제 유무의 분석**

더 나아가, 위에서 얻어진 실험결과를 토대로 바이러스의 구조 단백질 모두가 제거된 viral replicon (NADLcIns-/pac/ $\Delta\text{S}$ )을 재조합하려고 하였다. 이를 위해서 각각의 구조단백질을 제거할 때 삽입한 *Hind III*를 이용하여 viral replicon cDNA clone을 재료

및 방법에서 자세히 기술한 것과 같이 재조합하였다(Fig. 5A). 이렇게 만들어진 viral replicon NADLcIns-/pac/ΔS으로부터 *in vitro* transcription을 통해 viral RNA를 합성하였으며, 합성된 viral RNA의 자가복제 유무를 분석하기 위해서 MDBK 세포에 transfection시킨 후 *pac* gene의 발현을 puromycin selection으로 분석하였다(Fig. 5B). 실험결과, BVDV viral replicon RNA가 transfection된 세포는 puromycin이 첨가된 배양액에서 사멸하지 않고 colony를 형성하면서 자라는 것을 알 수 있었다(Fig. 5B, 4). 대조군으로 puromycin을 첨가하지 않은 경우 mock-transfection된 세포(Fig. 5B, 1)와 viral replicon NADLcIns-/pac/ΔS-transfection된 세포(Fig. 5B, 3) 모두 자라는 것을 알 수 있었다. 또한 예상했던 대로 mock-transfection된 세포는 puromycin을 첨가했을 때 모두 사멸하는 것을 알 수 있었다(Fig. 5B, 2).

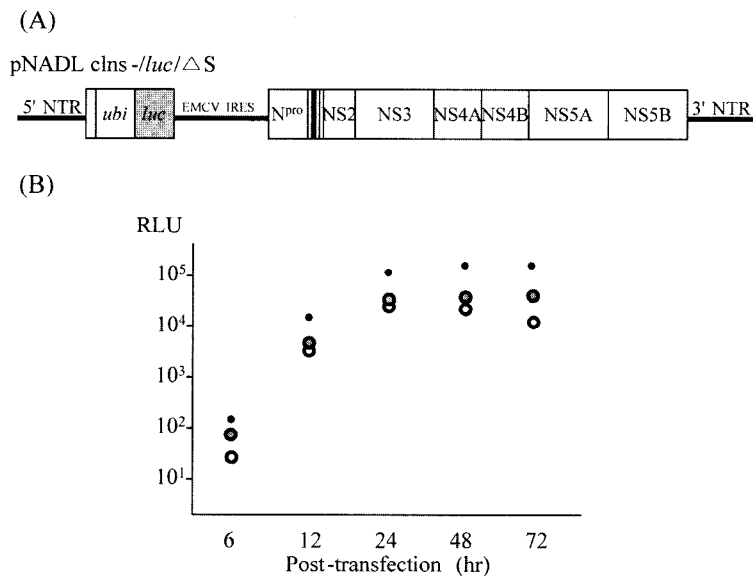
**다양한 종류의 포유동물 세포에서의 단백질 발현 유무의 분석**

이 연구에서 개발된 BVDV viral replicon이 permissive cell인 MDBK 세포이외에, 다른 non-permissive 세포에서도 원하는 유전자의 발현이 이루어지는 것을 알아보고 하였다. 먼저 이 실험을 위해서 *pac* 유전자가 아닌 luciferase 유전자를 가진 recombinant viral replicon (NADLcIns-/luc/ΔS)을 Fig. 6A에 나타난 것과 같이 재조합하였다. 재조합된 NADLcIns-/luc/ΔS의 cDNA clone으로부터 재료 및 방법에서 기술한 것과 같이 *in vitro* transcription을 통해서 recombinant viral RNA를 합성하였다. 합성된 viral RNA를 MDBK 세포 뿐 만 아니라, non-permissive 세포인 HeLa 또는 BHK 세포에 transfection시킨 후, reporter 유전자인 luciferase 유전자의 발현을 시간 별로 관찰하

였다. Fig. 6B에서 나타난 것과 같이, MDBK 세포에서 transfection한지 6 시간이 경과했을 때 cell lysate으로부터 luciferase activity가  $1.5 \times 10^5$  RLU가 나타났으며, 시간이 지남에 따라 이 값은 viral replicon의 자가복제에 의해서  $2.1 \times 10^4$ ,  $3.2 \times 10^5$ ,  $3.6 \times 10^5$  RLU로 증가한 다음 안정화되었다(Fig. 6B). HeLa와 BHK 세포를 이용했을 경우에도, 이와 유사한 실험 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 6B). 따라서, 이 연구결과 개발된 BVDV의 viral replicon은 MDBK 및 HeLa, BHK 세포와 같은 포유동물세포에서 다양한 종류의 단백질 발현이 가능하다는 것을 알 수 있었다.

**고 찰**

이 연구에서는 RNA 바이러스중에서 *Flaviviridae* family에 속하는 pestivirus의 BVDV를 이용하여 다양한 종류의 단백질을 여러 종류의 포유동물세포에서 원하는 유전자를 발현시킬 수 있는 발현벡터를 개발하려고 하였다. 먼저, BVDV infectious cDNA molecular clone pNADLcIns-를 이용하여 puromycin 항생제에 저항성을 나타내는 *pac* 유전자를 바이러스의 genome상에 바이러스의 자가복제시 발현되도록 recombinant infectious cDNA clone pNADLcIns-/pac을 성공적으로 개발하였다(Fig. 1, 2). 개발된 full-length infectious cDNA clone을 토대로 바이러스의 자가복제에 필요하지 않는 유전자들을 제거하기 위해서 바이러스 자가복제에 필수적인 genetic element를 deletion analysis로 분석하였다. 분석결과, BVDV 바이러스의 구조단백질 capsid, E0, E1, E2 단백질 모두가 자가복제에는 필요하지 않다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3, 4). 따라서, BVDV 바이러스의 구조단백질 모두를 pNADLcIns-/pac cDNA clone상에서 제거함으로써 pNADLcIns-/



**Fig. 6.** Replication of BVDV viral replicon contain luc gene in various mammalian cell lines. (A) Schematic diagram of BVDV viral replicon containing luc gene. (B) Naive MDBK (solid circle), HeLa (shaded circle), or BHK (open circle) cells were transfected with viral replicon NADLcIns-/luc/ΔS and seeded in a 6-well plate. At various time points as indicated in this figure, cell lysate was prepared by addition of 200 μl of lysis buffer in each well and one-tenth of the lysate was subsequently used for luciferase assay as described in Materials and Methods in detail.



*pac*/ $\Delta$ S viral replicon을 성공적으로 합성하였다(Fig. 5). 이렇게 합성된 BVDV viral replicon은 유전자발현 벡터로써 *pac* 유전자 대신에 원하는 유전자를 삽입함으로써 가능하였다. 그 예로, 이 연구결과에서 나타난 것과 같이 luciferase 유전자를 viral replicon에 삽입함으로써 삽입된 유전자의 발현정도를 시간 별로 정량적으로 분석할 수 있었다(Fig. 6). 또한, 이렇게 개발된 viral replicon은 BVDV의 permissive 세포인 MDBK 뿐 만 아니라, HeLa와 BHK 세포에서도 MDBK 세포에서와 같이 원하는 유전자를 발현할 수 있었다.

BVDV이외에 지금까지 유전자 발현벡터에 이용된 바이러스는 Sindbis virus (2)가 있다. 이 발현벡터 또한 infectious cDNA clone을 이용하여 구조단백질을 제거함으로써 개발되었다. 하지만, Sindbis virus의 경우, 바이러스의 자가복제시 발생하는 cytopathogenicity 때문에 경우에 따라서는 원하는 유전자의 기능 연구에 적합하지 않다(2). 이와는 달리, 이 연구결과 개발된 BVDV의 viral replicon을 유전자 발현벡터로 사용할 경우, 바이러스 자가복제로 인한 cytopathogenicity가 나타나지 않음으로 원하는 단백질의 기능연구 및 여러 단백질 간의 상호작용을 분석하는 데 적절하다고 판단된다.

이 연구결과 개발된 BVDV viral replicon은 원하는 단백질을 일시적으로 발현하는 transient expression에는 적합하지만, 4-5 일 이상 장기간 발현을 원할 때는 적합하지 않다. 그 원인은 아직 알 수 없으나, 시간이 지남에 따라 바이러스의 자가복제가 감소함을 실험결과 알 수 있었다(data not shown). 이것은 BVDV를 포함한 positive sense 바이러스가 복제시 중간물질로 생성되는 double-stranded RNA 때문에 interferon과 같은 세포의 defense mechanism인 것으로 추측된다(14,15). 따라서, BVDV의 viral replicon을 이용하여 원하는 단백질의 장기간 발현을 위한 stable expression vector의 개발을 위해서는 세포의 defense mechanism을 피할 수 있는 방법을 고안해야 할 것으로 생각된다.

*pac* 유전자를 가진 infectious cDNA clone을 이용하여 BVDV 각각의 구조단백질을 deletion한 recombinant viral RNA는 replication-competent하다는 것을 transfection된 세포를 puromycin 항생제로 selection함으로써 알 수 있었다(Fig. 1). 또한, transfection된 세포의 배양액을 이용하여 naive MDBK 세포를 다시 infection함으로써, capsid 뿐 만이 아니라 세 개의 바이러스 당단백질(E0, E1, E2) 모두 infectious viral particle 형성에 관여함을 알 수 있었다(Fig. 2). E0 단백질의 경우, 당단백질이 RNase 기능을 가지고 있다는 것은 알려져 있지만(13), 바이러스의 replication cycle중에서 어떠한 역할을 하는지는 아직 밝혀진 바가 없다. 이러한 측면에서, E0는 infectious viral particle 형성에 중요한 역할을 한다는 것을 본 연구결과를 통해서 알 수 있었다. 아마도, E0 당단백질은 major viral receptor인 E2 단백질과 heteromultimer를 형성함으로써 functional receptor를 형성할 것으로 추측된다. 이러한 가설은 항체를 이용한 neutralization assay 실험결과 E0 당단백질의 일부분에 neutralization epitope이 존재한다는 사실로 뒷받침해준다(20).

## 감사의 말

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2001-042-D00071).

## 참고문헌

1. Bazan, J.F. and R.J. Fletterick. 1989. Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* 171: 637-639.
2. Bredenbeek, P.J., I. Frolov, C.M. Rice and S. Schlesinger. 1993. Sindbis virus expression vectors: packaging of RNA replicons by using defective helper RNAs. *J. Virol.* 67: 6439-6446.
3. Deregt, D., S.R. Bolin, J. van den Hurk, J.F. Ridpath, and S.A. Gilbert. 1998. Mapping of a type 1-specific and a type-common epitope on the E2 (gp53) protein of bovine viral diarrhea virus with neutralization escape mutants. *Virus Res.* 53: 81-90.
4. Gorbalenya, A.E., A.P. Donchenko, E.V. Koonin, and V.M. Blinov. 1989. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res.* 17: 3889-3897.
5. Kao, C.C., A.M. Del Vecchio, and W. Zhong. 1999. De novo initiation of RNA synthesis by a recombinant flavivirus RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 253: 1-7.
6. Lai, V.C., C.C. Kao, E. Ferrari, J. Park, A.S. Uss, J. Wright-Minogue, Z. Hong, and J.Y. Lau. 1999. Mutational analysis of bovine viral diarrhea virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* 73: 10129-10136.
7. Mendez, E., N. Ruggli, M.S. Collett, and C.M. Rice. 1998. Infectious bovine viral diarrhea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J. Virol.* 72: 4737-4745.
8. Meyer, G. and H.J. Thiel, 1996. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. in Virus Res.* 47: 53-118.
9. Paton, D.J., J.P. Lowings, and A.D. Barrett. 1992. Epitope mapping of the gp53 envelope protein of bovine viral diarrhea virus. *Virology* 190: 763-772.
10. Poole, T.L., C.Y. Wang, R.A. Popp, L.N.D. Potgieter, A. Siddiqui, and M.S. Collett. 1995. Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* 206: 750-754.
11. Rice, C.M. 1996. Flaviviridae: The viruses and their replication, p.931-960. In B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley (ed), Fields Virology, Third ed, vol. 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
12. Rijnbrand, R., T. van der Straaten, P.A. van Rijn, W.J.M. Spaan, and P.J. Bredenbeek. 1997. Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J. Virol.* 71: 451-457.
13. Schneider, R., G. Unger, R. Stark, E. Schneider-Scherzer, and H.J. Thiel. 1993. Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* 261: 1169-1171.
14. Schweizer, M. and E. Peterhans. 2001. Noncytopathic bovine viral diarrhea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. *J. Virol.* 75: 4692-4698.
15. Sentsui, H., R. Takami, T. Nishimori, K. Murakami, T. Yokoyama, and Y. Yokomizo. 1998. Anti-viral effect of interferon-alpha on bovine viral diarrhea virus. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 1329-1333.

16. Tautz, N., A. Kaiser, and H.J. Thiel. 2000. NS3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology* 273: 351-363.
17. Thiel, H.J., P.G.W. Plagemann, and V. Moennig. 1996. Pestiviruses, P. 1059-1073. In B.N. Field, D.M. Knipe, and P.M. Howley (ed), *Fields Virology*. Raven Press, New York, N.Y.
18. Toth, R.L., P.F. Nettleton, and M.A. McCrae. 1999. Expression of the E2 envelope glycoprotein of bovine viral diarrhea virus (BVDV) elicits virus-type specific neutralising antibodies. *Vet. Microbiol.* 65: 87-101.
19. Tratschin, J.D., C. Moser, N. Ruggli, and M.A. Hofmann. 1998. Classical swine fever virus leader proteinase N<sup>pro</sup> is not required for viral replication in cell culture. *J. Virol.* 72: 7681-7684.
20. Windisch, J.M., R. Schneider, R. Stark, E. Weiland, G. Meyers, and H.J. Thiel. 1996. RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J. Virol.* 70: 352-358.
21. Wiskerchen, M. and M.S. Collett. 1991. Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology* 184: 341-350.
22. Xu, J., E. Mendez, P.R. Caron, C. Lin, M.A. Murcko, M.S. Collett, and C.M. Rice. 1997. Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.* 71: 5312-5322.
23. Zhong, W., L.L. Gutshall, and A.M. Del Vecchio. 1998. Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* 72: 9365-9369.

(Received February 26, 2002/Accepted April 15, 2002)

---

**ABSTRACT : Generation of a Mammalian Gene Expression Vector Using Bovine Viral Diarrhea Virus**  
**Young-Min Lee** (Department of Internal Medicine, College of Medicine and Medical Research  
 Institute, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

As a result of genome projects, the research to elucidate the function of a protein of interest has recently been well-recognized. In order to facilitate functional genomics, a useful mammalian gene expression vector is required. Using an infectious cDNA clone of BVDV, pNADLcIns-, we have developed a mammalian gene expression vector. In this study, a replication-competent full-length infectious cDNA clone containing puromycin acetyltransferase (*pac*) gene (pNADLcIns-/*pac*) was successfully generated. The viral RNA replication and viral protein NS3 synthesis were examined by detecting metabolically <sup>32</sup>P-labelled genomic viral RNA and immunoblotting with a mouse anti-NS3 antibody. To generate viral replicon as an expression vector, we examine if the viral structural genes (C, E0, E1, E2) are required for viral replication by deletion analysis. As a result, all of the structural proteins are dispensable for viral replication per se, but essential for infectious viral particle formation. Based on our deletion analysis, we have generated a replication-competent BVDV viral replicon (pNADLcIns-/*pac*/ΔS), whose structural genes are all deleted. In addition to NADLcIns-/*pac*/ΔS, NADLcIns-/*luc*/ΔS viral replicon containing luciferase gene as a reporter was constructed and found to be replication-competent in HeLa and BHK cells as well as MDBK cells. Therefore, BVDV viral replicon developed in our study will be a useful tool to express a protein of interest in various mammalian cells.