

## 배추흰나비 과립병바이러스 DNA의 생화학적 특성

### Biochemical Characteristics of the Granulosis Viruses DNA of Common Cabbage Worm, *Pieris rapae* and *Pieris brassicae*

柳 江 善<sup>1</sup> · 陳 炳 來<sup>2</sup> · 姜 錫 權<sup>2</sup>

Kang Sun Ryu<sup>1</sup>, Byung Rae Jin<sup>2</sup>, and Seok Kwon Kang<sup>2</sup>

**ABSTRACT** This study was carried out to acquire some basic biochemical informations on the granulosis virus (GV) DNA of *Pieris rapae* and *Pieris brassicae*. The thermal denaturation temperature (Tm) and G+C content of the DNA of the viruses were 83.7°C and 35.5% for *P. rapae* GV, 84.0°C and 35.9% for *P. brassicae* GV, respectively. There were some differences in the DNA fragmentation patterns of the two GV's produced by digestion with restriction endonucleases such as EcoR I, BamH I and Hind III. The homology between the two DNAs was calculated to be 97.0%. The size of the genome was estimated to be 103 kbp for *P. rapae* GV and 108 kbp for *P. brassicae* GV.

**KEY WORDS** *Pieris rapae*, granulosis virus, thermal denaturation temperature, homology

**초 록** 배추흰나비 *P. rapae*와 *P. brassicae* GV의 DNA성상과 이를 기초로한 상동성을 검정한 결과 Tm값에서는 *P. rapae* GV DNA는 83.7°C이고, *P. brassicae* GV DNA는 경우는 84.0°C로 G + C 함량은 전자가 35.5%, 후자가 35.9%였다. 그리고 制限酸素處理에 의한 DNA의 분석에서는 *P. rapae* GV의 genome의 크기는 103 kb, *P. brassicae* GV DNA는 108 kb로 나타났으며, 두 바이러스 간의相同성은 97.0%였다.

**검 색 어** 배추흰나비, 과립병바이러스, Tm값, 상동성

GV genome에 관한 연구는 숙주 및 지역간의相同성에 관한 분석을 비롯하여, genome 자체와 封入體蛋白質 遺傳子の sequencing에 관한 연구등 많은 보고를 볼 수 있다. Brown 등 (1977)은 *P. brassicae* GV DNA의 Tm값이 84.5°C ± 0.6이고, G+C함량이 37%라고 보고하였으며, *T. ni* GV(Akiyoshi 등 1985)와 *P. brassicae* GV (Chakerian 등 1985)에서는 약

1 kb정도의 封入體蛋白質 遺傳子 sequence가 밝혀졌다. *P. rapae*의 경우는 Genome size가 106 kb임과 physical mapping에 대한 보고도 있다(Dwyer & Granados 1987). 또한 Crook (1981)는 *P. brassicae* GV DNA간의 制限酸素處理에 의한 DNA의相同성을 97.7%로 보고하였고, Smith와 Summers(1978)는 2종의 GV와 7종의 NPV pattern에 대한 相異性을 보고하였다. 한편 Crook(1986)는 분리된 지역이 다른 *P. rapae* GV 13계통과 *P. brassicae* GV 2계통간 制限酸素處理에 의한 바이러스 DNA의 차이에 따라 유럽, 북아메리카, 아시아 및 호주

1 농촌진흥청 잠업시험장 (Sericultural Experiment Station, RDA, Suwon, Korea, 441-100)  
2. 서울대학교 농과대학(College of Agriculture, Seoul National University, Suwon Korea, 441-744)

등 4개群으로 나눌 수 있다고 하였다.

본 연구에서는 한국에 주로 분포하고 있는 *P. rapae* GV의 DNA특성을 *P. brassicae* GV와 비교분석하여 GV를 이용한 분자유전학적 연구의 기초자료로 활용할 수 있는 일련의 결과를 얻었다.

### 재료 및 방법

정제된 封入體를 알칼리용액(0.14M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.01 M EDTA, 0.17 M NaCl; pH10.9)에 浮遊시켜 37°C에서 1시간 가온 후 12,000 rpm에서 5분간 microcentrifuge하여 용해되지 않은 沈澱物을 제거한 후, 上澄液을 취하여 1% SDS, proteinase K 0.5 mg/ml가 되도록 각각 첨가하고, 37°C에서 1시간 반응시켰다(Smith & Summers 1978). 여기에 1 mM EDTA를 함유한 10mM Tris-HCl 완충액(pH7.5)으로 포화된 phenol을 동량 첨가하여 혼합하고 5분간 원심 분리하여 분리된 상부의 水層을 채취하는 과정을 2번 반복하였다. 동일한 방법으로 phenol : chloroform : isoamylalcohol = 25 : 24 : 1 용액을 사용하여 각각 2번씩 반복하여 DNA를 추출하였다. 함유한 용액을 투석관에 넣어 0.1×SSC(1×SSC=0.015 M sodium citrate+0.15M NaCl, pH7.5)용액으로 40시간 透析하였다. 透析이 끝난 용액을 遠心管에 옮긴 후 2배량의 冷에탄올을 첨가 혼합하여 -20°C에서 하룻밤 동안 DNA를 침전시킨 다음, 5분간 원심분리하여 DNA沈澱物을 얻어 이것을 70% 에탄올로 2회 세정하고 난다음, 에탄올을 evaporator로 제거하고 1 mM EDTA를 함유한 10 mM Tris-HCl 완충액(pH7.5)으로 100 μg/ml의 농도가 되도록 DNA를 浮遊시켰다. 상기의 DNA용액을 60 ~ 100°C 범위에서 3분 간격으로 흡광도 (PU8800-UV spectrophotometer)를 측정하여 T<sub>m</sub>值를 구하고 T<sub>m</sub>=69.3+0.41(G+C)의 공식(Mamur & Doty 1962)에 의해 GC함량을 계산하였다.

바이러스 DNA의 제한효소 처리에 의한 전

기영동은 DNA 용액 18 μl(1.8 μg)와 10×digestion buffer 2 μl에 각 制限酵素 15~20 unit씩 첨가한 후 37°C에서 하룻밤 동안 반응시키고 stop buffer(0.1 M EDTA, 50% glycerol, 0.5% bromophenol blue) 3 μl 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이를 다시 60°C에서 15분간 가온한 후 냉각시켜 0.7% agarose gel에서 전기영동하였다. 영동이 끝난 gel은 ethidium bromide 1 μg/ml용액에서 20분간 염색한 후 물로 세척하여 transilluminator를 사용하여 302 nm의 파장에서 관찰하였다.

### 결과 및 고찰

정제된 封入體로부터 추출한 DNA의 純度를 검정하기 위하여 0.7% agarose gel에서 125 V, 1시간 전기영동을 한 결과에서도 단일 band로 나타나 純度가 매우 높음이 확인되었다(그림 1).

M Pr Pb



Fig. 1. Purified *P. rapae*(Pr) and *P. brassicae*(Pb) GV DNA electrophoresed on 0.7% agarose gel, 125 V, 40 mA 1 hr.

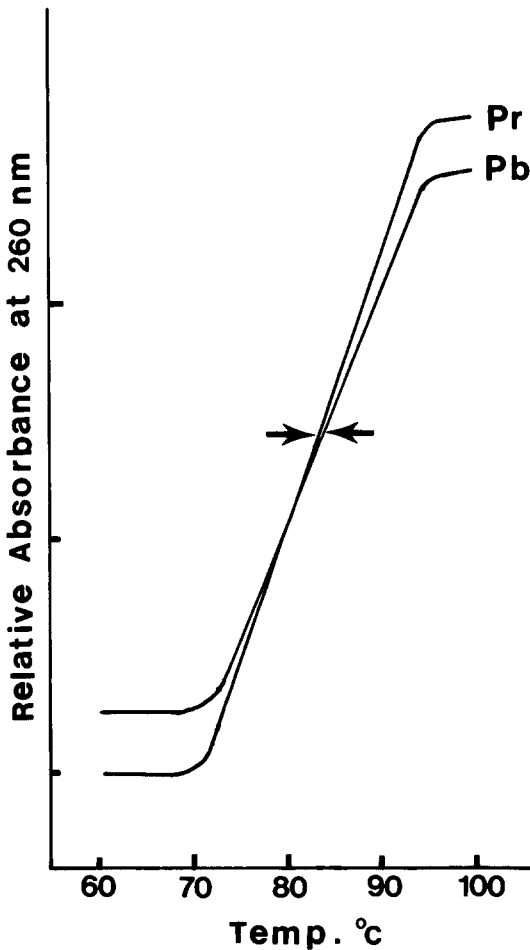


Fig. 2. Thermal denaturation profiles comparing *P. rapae* (Pr) and *P. brassicae* (Pb) GV DNAs.

$T_m$  값은 그림 2와 같이 *P. rapae* GV DNA는 83.7°C이고 *P. brassicae* GV DNA의 경우는 84.0°C로 큰 차이가 없었으며 그 결과 계산된 G+C 함량은 전자가 35.5%, 후자가 35.9%였다. Brown 등(1977)은 *P. brassicae* GV DNA의  $T_m$  값은 84.5°C  $\pm$  0.6이고 G+C 함량은 37%이라고 한 보고와 거의 같은 값이며 두 바이러스간에도 큰 차이점은 없었다.

*P. rapae*와 *P. brassicae* GV의 DNA를 3가지의 제한효소로 처리한 후 agarose gel 상에서 전기泳動하여 DNA fragment pattern을 분석한

결과(그림 3, 4, 5, 표 1) EcoR I 처리의 경우는 *P. rapae* GV DNA는 17개, *P. brassicae* GV DNA는 18개의 fragment였으며, 그중 3개의 fragment에서, BamH I은 *P. rapae* GV, *P. brassicae* GV DNA 모두 14개의 fragment였으나 8개의 fragment에서, Hind III는 *P. rapae* GV, *P. brassicae* GV DNA 모두 14개의 fragment였으나 8개의 fragment에서 각각 차이가 관찰되었다. 제한효소 처리에 의한 DNA 분석으로 이 바이러스들의 genome 크기를 측정한 결과는 *P. rapae* GV DNA가 약 103 kb이며, *P. brassicae* GV DNA는 약 108 kb임을 추정할 수 있었다(표 1). 또 *P. rapae*와 *P. brassicae* GV DNA의 제한효소 처리에 의한 전기泳動상에 나타난 두 바이러스의相同性은 Upholt(1977)의 방법에 준하여 산정한 결과, 3종의 제한효소에 의한 상동성의 평균값이 97.0%로 매우 높게 나타났다(표 1).

제한효소는 생태적, 진화적 연관성을 DNA 수준에서 구명하는데 매우 귀중한 수단으로 이용되고 있으며, 바이러스의 genome size를 결정하는데도 매우 유용하여 숙주곤충이 서로 다른 GV genotype의相同性 구명에도 많은 연구가 되어왔다(Smith & Summers 1978, Tweenten 등 1980a, Crook 1981, Crook 등 1985). *P. rapae* GV의 경우는 Genome의 크기가 106 kb라는 것과 physical mapping(Dwyer & Granados 1987)이 보고되었는 반면 *T. ni* GV(Akiyoshi 등 1985)와 *P. brassicae* GV(Chakerian 등 1985)는 봉입체단백질 유전자의 sequence가 밝혀졌고, *P. brassicae* GV의 genome 크기가 113 kb(Brown 등 1977)라는 것이 보고되어 있다. 본 실험에서는 제한효소 처리에 의한 두 바이러스 간의相同性에서 Crook(1981)가 보고한 97.7%와 유사한 97.0%로 매우 높은相同性을 나타내고 있다. 또 genome의 크기에서는 이미 보고된 결과(Dwyer & Granados 1987, Brown 등 1977)보다 *P. rapae*의 경우 약 3 kb 정도, *P. brassicae* GV DNA는 약 5 kb 정도 각각 낮게 나타났다.

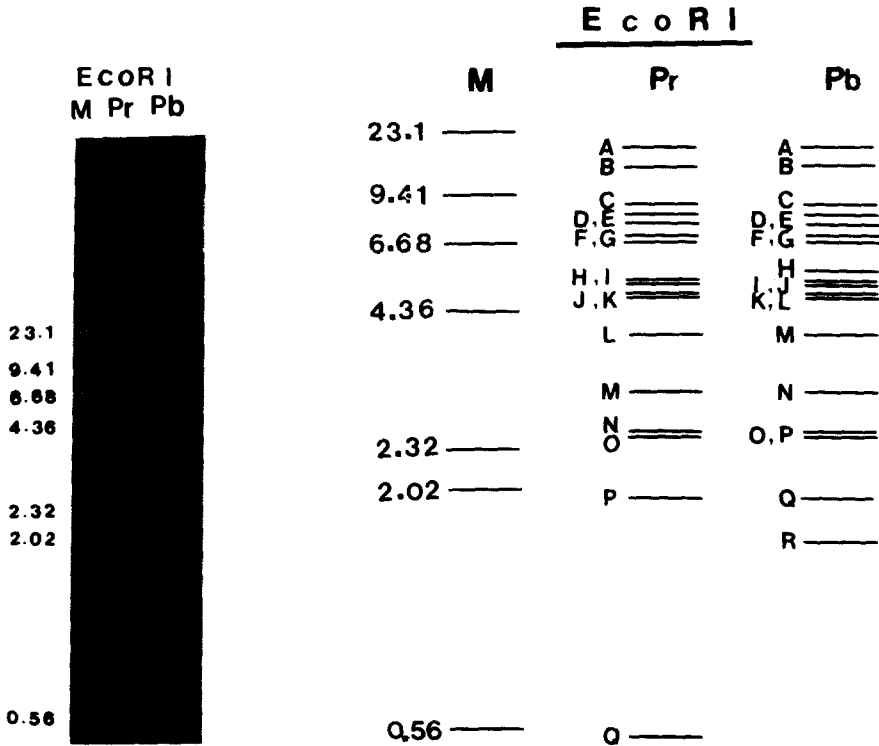


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of *P. rapae*(Pr) and *P. brassicae*(Pb) GV DNAs after digestion with EcoR I restriction endonuclease. Lambda bacteriophage DNA digested with Hind III (M) was used as size markers(kb).

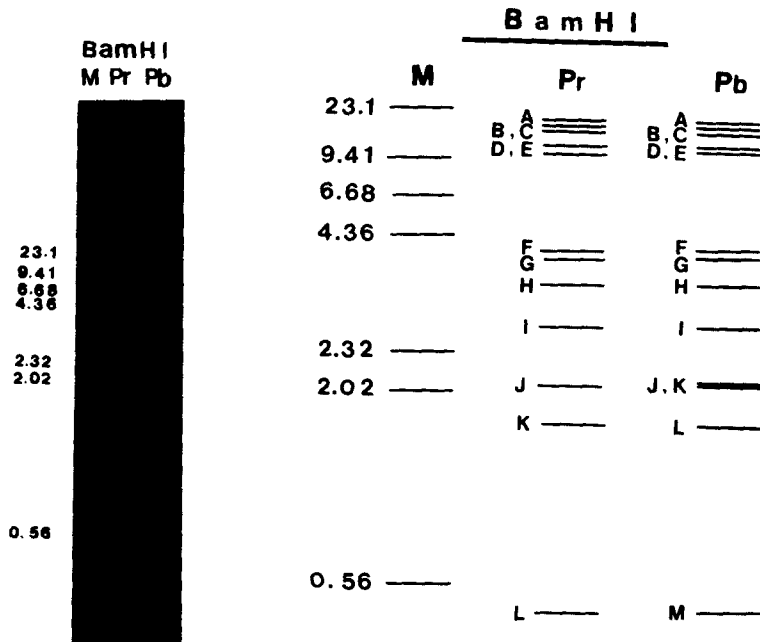


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of *P. rapae*(Pr) and *P. brassicae*(Pb) GV DNAs after digestion with BamH I restriction endonuclease. The standard DNA(M) are the same as in the Fig. 3.

Table 1. Size of the fragments of *P. rapae*(Pr) and *P. brassicae*(Pb) GV DNA digested with three restriction endonucleases

Frag.	(Unit : kb)					
	EcoR I		BamH I		Hind III	
	Pr GV	Pb GV	Pr GV	Pb GV	Pr GV	Pb GV
A	20.43	20.43	20.86	20.86	28.46	22.24
B	15.01	15.01	18.89	18.89	22.24	17.57
C	9.36	9.36	17.26	17.26	13.33	14.40
D	8.36	8.36	12.35	12.35	12.39	12.69
E	7.61	7.61	10.38	11.53	5.10	12.39
F	6.89	6.89	3.62	3.62	5.04	5.10
G	6.68	6.68	3.50	3.50	4.45	5.04
H	5.20	5.66	2.98	2.98	3.95	4.45
I	5.16	5.20	2.66	2.66	3.88	3.95
J	4.85	5.16	2.01	2.06	2.31	3.88
K	4.81	4.85	1.71	2.03	2.09	2.31
L	3.96	4.81	0.30	1.71	0.99	2.09
M	2.92	3.96		0.30	0.51	0.99
N	2.42	2.92			0.35	0.35
O	2.39	2.42				
P	1.98	2.39				
Q	0.47	1.98				
R		1.71				
Total	108.50	115.40	96.52	99.75	105.09	107.45
Homology		98.51		96.34		96.06
Average genome size			Pr GV DNA : 103.37		Pb GV DNA : 107.53	

\* The size of fragment was determined from scan of agarose gels following the procedure of Southern (1979).

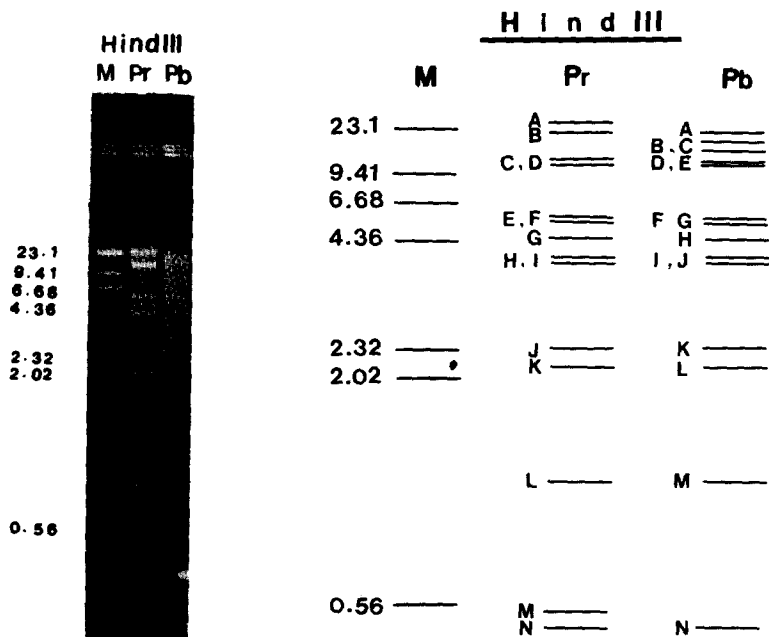


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of *P. rapae*(Pr) and *P. brassicae*(Pb) GV DNAs after digestion with Hind III restriction endonuclease. The standard DNA(M) are the same as in the Fig. 3.

이는 電氣永動의 조건과 분자량의 측정방법에 기인되는 차이라 간주되며, Crook(1986)가 보고한 것처럼 지역간의 차이일 수도 있다고 생각한다.

#### 인 용 문 헌

- Akilyoshi, D., R. Chakerian, G. F. Rohrmann, M. H. Nesson & G. S. Eaudreau. 1985. Cloning and sequencing of the granulin gene from the *Trichoplusia ni* granulosis virus. *Virology* 141, 328~332.
- Brown, D. A., H. M. Bud & D. C. Kelly. 1977. Biophysical properties of the structural components of a granulosis virus isolated from the cabbage white butterfly (*Pieris brassicae*). *Virology* 81, 317~327.
- Chakerian, R., G. F. Rohrmann, M. H. Nesson, D. J. Leisy & G. S. Beaudreau. 1985. The nucleotide sequence of the *Pieris brassicae* granulosis virus granulin gene. *J. Gen. Virol.* 66, 1263~1269.
- Crook, N. E. 1981. A comparison of the granulosis viruses from *Pieris brassicae* and *Pieris rapae*. *Virology* 115, 173~181.
- Crook, N. E. 1986. Restriction enzyme analysis of granulosis viruses isolated from *Artogeia rapae* and *Pieris brassicae*. *J. Gen. Virol.* 67, 781~787.
- Crook, N. E., R. A. Spencer, C. C. Payne & D. J. Leisy. 1985. Variation *Cydia pomonella* granulosis virus isolates and physical maps of the DNA from three variants. *J. Gen. Virol.* 66, 2423~2430.
- Dwyer, K. G. & R. R. Granados. 1987. A Physical map of *Pieris rapae* granulosis virus genome. *J. Gen. Virol.* 68, 1471~1476.
- Marmur, J. & P. Doty. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* 5, 109~118.
- Smith, G. E. & M. D. Summers. 1978. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology* 89, 517~527.
- Tweenten, K. A., L. A. Jr. Bulla & R. A. Consigil. 1980a. Restriction enzyme analysis of the genome of *Plodia interpunctella* and *Pieris rapae* granulosis viruses. *Virology* 104, 514~519.
- Upholt, W. B. 1977. Estimation of DNA sequence divergence from comparison of restriction endonuclease digests. *Nucleic Acids Res.* 4, 1257~1265.

(1991년 3월 30일 접수)