韓蠶學誌 39(1), 36~43(1997)
Korean J. Seric. Sci.
<論 文>

Yeast 2 μm 플라스미드 유래 FLP recombinase 유전자의 곤충 배양세포내 발현

강석우 · 윤은영 · 김상현 · 김근영 · 한명세* · 강석권**
농촌진흥청 잠사곤충연구소, *경북대학교 농과대학, **서울대학교 농업생명과학대학

Expression of the FLP recombinase of the 2 μm plasmid of yeast in the cultured cells of *Bombyx mori* using a transient expression vector

Seok Woo Kang, Eun Young Yun, Sang Hyun Kim, Keun Young Kim, Myung Sae Han* and Seok Kwon Kang**
National Sericulture and Entomology Research Institute, R.D.A., Suwon 441-100, Korea
**College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea,*
***College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea*

ABSTRACT

In order to express the FLP recombinase in *B. mori* cultured cell line, BmN-4, transient expression system using a heat shock protein gene (hsp70) promoter of *Dorosophilla melanogaster* was constructed. This vector was designated as pHsSV. Activity strength of the hsp70 promoter was compared with that of immediate early gene (IE-1) and polyhedrin gene of BmNPV employing the *E. coli* β-galactosidase gene as a reporter gene. The result showed that the pHs β-gal plasmid vector expressed the β-galactosidase at 2nd and 3rd day after the transfer of plasmid DNA into BmN-4 cells, which was similar to that of pIE1 β-gal vector, but different from that of a recombinant virus, vBm β-gal. For the construction of FLP recombinase transient expression vector, the FLP recombinase gene was cloned by polymerase chain reaction technique. To express the FLP recombinase, this gene was inserted into pHsSV plasmid vector, under the control of the hsp70 promotor, and tranfected in BmN-4 cells. The expressed FLP recombinase was estimated at 44kDa on a 12.5% SDS-PAGE.

Key words : Expression Vector, BmN-4 Cell, FLP Recombinase gene

서 론

이종 단백질의 발현계로써 곤충 baculovirus와 곤충 배양세포를 조합한 Baculovirus Expression Vector System (BEVS)은 최종 발현 산물이 천연물에 유사한 구조, 면역원성, 효소활성 및 DNA 결합성 등 생물학적 특성을 가지는 것으로 알려져 있다. 이와같은 특징에 의해 BEVS는 바이러스병 진단용 및 백신 개발용 단백질이나 효소, 성장호르몬 등 각종 물질생산 (O'Reilly *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1992)에 이용될 뿐 아니라, 바이러스 제제의 살충성 제고를 위한 재조합 바이러스 제작에 관한 연구 등이 다각도로 이루어지고 있다(Eldridge *et al.*, 1992; Maeda, 1989b; Maeda *et al.*, 1991; McCutchen *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 1991; Tomalski and Miller, 1991; Tomalski and Miller, 1992). 그러나 BEVS는 바이러스의 증식과 함께 이종 단백질을 발현시키는 것으로 바이러스 감염에 따른 기주세포의 기능 변화와 궁극적인 치사는 이종 단백질의 안정적 발현이나 영속적인 발현계에 있어서 해결해야 할 어려운 문제점으로 제기되고 있다. 따라서 바이러스 감염에 의하지 않은 새로운 벡터 발현계의 연구 개발에 관심이 모아지고

있다. 특히 초파리의 열충격 단백질 유전자(hsp70)에 관한 많은 연구는 외래유전자 발현 연구에 크게 기여하고 있다. 이 hsp70은 약 70kDa의 구조단백질을 암호화하고 있고 5' noncoding 부위의 -244 염기인 A에서 전사가 개시되며, RNA polymerase II 결합부위인 TATA box는 -274~-267의 TATAAATA로 보존되어 있다(Ingolia *et al.*, 1980). 열충격에 따른 전사조절 부위는 TATA box 상류에 55bp 영역으로 존재하고, 여기에 HSTF(heat shock transcription factor)가 결합하여 전사를 조절하는 것으로 알려져 있다(Parker and Topol, 1984). 이러한 hsp70 프로모터는 동물세포(Corces *et al.*, 1981; Pelham, 1982), 곤충배양세포(Maisonhaute and Echalier, 1986; Okano *et al.*, 1992; Rio and Rubin, 1985; Zuidema *et al.*, 1990), 누에 초기배자(Tamura and Kanda, 1990), 초파리(Golic and Lindquist, 1989) 및 누에유충(Mori *et al.*, 1995)에서 외래유전자를 효과적으로 발현시킨다고 보고하고 있다. 한편, FLP recombinase는 *Saccharomyces cerevisiae* 2 μm 플라스미드에 1,272bp로 보존되어 있으며(Hartley and Donelson, 1980), 이 효소의 최소 인식배열인 FRT(FLP recombinase Recognition Target)는 8bp의 core 부분과 13bp의 inverted repeats로 구성되어 있는 것으로 밝혀졌다(Senecoff *et al.*, 1985; Jayaram, 1985). FLP recombinase의 FRT 인식부위는 다른 integrase와 같이 His-305, Arg-308, Tyr-343 영역이 잘 보존되어 있으며(Argos *et al.*, 1986), 특히 Tyr-343은 DNA cleavage에 Arg-308은 Tyr-343의 작용을 도와주는 역할을 하며, His-305는 DNA 가닥의 교체 및 재결합에 관여하고(Parsons *et al.*, 1988), Arg-191도 DNA와의 결합과 연결에 중요한 역할을 담당한다고 하였다(Friesen and Sadowski, 1992). 이러한 FLP recombinase는 게놈에 존재하는 FRT 사이의 유전자를 제거하거나 방향을 바꿀 수 있으며, 분자간의 유전자 재조합을 촉매할 수 있기 때문에 게놈 유전자 조작 연구에 유용하다고 하였다(Golic and Lindquist, 1989; Kilby *et al.*, 1993).

본 연구는 곤충배양세포의 기능 변화나 치사없이 FLP recombinase를 발현시킬 목적으로 초파리의 열충격 단백질 유전자(hsp70)의 프로모터를 이용한 발현 벡터를 제작하고,이 벡터의 프로모터 활성 검정과 FLP recombinase의 발현 여부를 각각 조사하였다.

재료 및 방법

1. *E. coli* 균주, 벡터 및 유전자

플라스미드를 형질전환하기 위해 사용한 *E. coli* 균주는 JM 109(Takara, Japan) 및 XL1-blue(Stratagene, U.S.A)였으며, 유전자 클로닝에 사용한 벡터는 Stratagene사의 pBluescript II SK$^+$를, PCR 산물의 클로닝은 Promega(U.S.A)사의 pGem-T 벡터를 이용하였다. pBm4 전이벡터(Kobayashi *et al.*, 1992)와 pBmIE 1SV 벡터는 일본 잠사곤충농업기술연구소의 세포공학 연구실에서 분양받은 것을 사용하였다. β-galactosidase 유전자는 Promega사의 pSV-β-Galactosidase 벡터로 부터 분리하여 사용하였다.

2. 곤충 배양세포주

누에난소 유래의 BmN-4 세포주는 일본 잠사곤충농업기술연구소의 今西박사로 부터 분양받아 사용하였다. BmN-4 세포주의 계대배양은 10% FBS가 함유된 Ex-cell 400배지 혹은 TC-100배지로 25°C에서 5~7일간 배양한 세포를 도립현미경으로 관찰하여 증식정도를 확인한 다음, 파스퇴르 피펫으로 세포를 부유시킨 후 신선배지 4 m*l*이 든 25 cm^2 플라스크에 1 m*l* 씩 분주하고 25°C에서 배양하였다(Maeda, 1989a).

3. 곤충 배양세포내 DNA 전이

플라스미드 DNA를 곤충 배양세포에 전이시키기 위해 liposome transfection reagent인 DOTAP 또는 DOSPER(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 수행하였다. 플라스미드 DNA 전이액의 조제는 플라스미드 DNA 0.5 μg에 20 mM HEPES완충액(pH 7.2)을 부가하여 전체 6 μ*l*되게 한 후 여기에 DOSPER 3 μ*l*와 20 mM HEPES 3 μ*l* 섞은 액을 부가하여 25°C에 15분간 반응시켰다. 이 반응액을 전날 10^5개 세포로 분주한 24 well 플레이트에 부가하고 25°C에서 6시간 반응시킨 후 신선한 배지로 교체하고 27°C에 배양하였다.

4. DNA 염기서열 분석

DNA 염기서열은 자동염기서열 분석장치(Applied Biosystems Inc., U.S.A)를 이용하여 제작회사의 방법에 따라 수행하였다. 염기서열 분석에 사용할 DNA는 PCR로 증폭하여 pGem-T 벡터(Promega, U.S.A)에 클로닝 하였거나, 직접 클로닝 벡터에 삽입하였다. 각 염기의 표지는 dye deoxy cycle sequencing kit (Applied Biosystems Inc., U.S.A)를 이용하여 A, G, C, T dye terminator와 Tag polymerase 반응액 9.5 μ*l*에 주형 DNA 1 μg, primer 3.2 pmole을 각각 넣고 멸균증류수로 전체 20 μ*l*로 만든 다음 96°C 30초, 50°C 15초, 60°C 4분의 과정을 25회 PCR로 수행하였다. PCR 반응산물의 정제는 페놀과 냉 에탄올을 처리하고

70% 에탄올로 세척한 후 자연건조 하였다. 염기서열 분석은 6% 아크릴아마이드겔에서 수행하였고,예비통전은 30왓트로 30초~1분간 하였다. 시료주입은 보관중인 시료에 formamide 5 μl와 50 mM EDTA 1 μl를 넣어 100℃에 2분간 처리하고 급냉한 후 각 well에 6 μl씩 하였다. 전기영동은 1,450 volt에서 하룻밤 통전하였으며, 염기서열은 기기로 부터 인쇄한 데이타로부터 결정하였다.

5. 단백질 전기영동

플라스미드 발현 벡터로 발현시킨 FLP recombinase는 Laemmli의 방법(1970)에 따라 불연속 SDS-polyacrylamide 겔 전기영동으로 분석하였다. 전기영동 시료는 Sambrook 등(1989)의 방법을 수정하여 준비하였다. 즉 24 well 플레이트의 BmN-4 배양세포에 DNA를 전이한 후 2일, 3일째에 냉 PBS(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4, 1.4 mM KH_2PO_4)로 2회 세척한 후 세포를 수거하고 15,000 rpm에서 5분간 원심으로 침전시켰다. 여기에 20 μl의 PBS를 첨가한 후 -70℃에 동결하고 37℃에서 용해하는 과정을 3회 반복하였다. 처리한 세포 추출액에 2X 단백질 시료용액(0.0625M Tris-Cl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.001% bromphenol blue)을 동량 첨가한 후 100℃에서 5분간 처리한 용액을 전기영동 시료로 하였다. 전기영동은 12.5% 겔에 시료 5 μl를 주입한 후 15 mA에서 1시간 영동하였다. 단백질 염색은 coomassie blue 용액(0.025% coomassie brilliant blue R 250, 40% methanol, 7% acetic acid)으로 40분~1시간 하였으며, 탈색은 7% acetic acid와 5% methanol이 함유된 액으로 하였다. 단백질 표준시료는 Promega(U.S.A)사의 Mid-Range protein Markers(Phospholyase B, 97, 400; Bovine Serum Albumin, 66,200; Glutamate Dehydro- genase, 55,000; Ovalbumin, 42,700; Aldolase, 40,000; Carbonic Anhydrase, 31,000; Soybean Trypsin lnhibitor, 21,500; Lysozyme 14,400)를 사용하였다.

6. Oligonucleotides 합성 및 PCR

FLP recombinase 유전자는 O'Gorman 등(1991)이 제작한 pOG44 벡터로 부터 PCR로 클로닝하였다. Sense primer는 pOG44 벡터의 1330~1348에 해당하는 부위의 5' 말단에 3개 염기를 추가하여 5'-CGGC-ATGCCACAATTTGATATA-3'와 같이 합성하였으며, antisense primer는 2676~2696에 해당하는 5'-TCACAGTTCTCGTCGC ACCTA-3'와 같이 제작하였다. PCR 반응액은 *Taq* DNA polymerase(Boehringer Mannheim, U.S.A) 2.5 unit와 10X 반응 완충액 5 μl, $MgCl_2$, dNTPs, sense 및 antisense primer를 최종농도가 2.0 mM, 2.5 mM 및 20 pmole이 되게 각각 부가하고, pOG44 벡터 DNA를 1 ng 첨가한 다음 멸균증류수로 50 μl 되게 조제 하였다. PCR 반응은 Themer cycler(Perkin Elmer)로 94℃ 3분간 반응시킨 후 94℃에서 1분, 55℃에서 2분, 72℃에서 3분 과정을 30회 반복하고 72℃에서 5분 추가 반응으로 종료하였다. PCR 반응산물의 확인은 0.7% 아가로스 겔 전기영동으로 수행하였다.

7. β-galactosidase의 검정

β-galactosidase의 발현여부는 β-Galactosidase Enzyme Assay Kit(Promega, U.S.A)를 이용하여 제작회사의 방법에 따라 시료를 조제하고, ONPG(O-nitrophenyl-β-D-galactopyronoside) 정색반응으로 검정하였다. 반응액 조제는 β-galactosidase 유전자를 삽입한 플라스미드 발현벡터를 곤충 배양세포에 전이시킨 후 1일 간격으로 수거한 세포 침전물에 1X reporter lysis 완충액을 넣어 15분간 처리한 후 15,000 rpm에 5분간 원심하여 회수한 상청액으로 하였다. ONPG 정색반응은 세포추출액에 동량의 2X β-galactosidase 검정 완충액을 넣어 37℃에서 30분간 반응시킨 후 1.5배량의 1M sodium carbonate 용액을 부가하여 반응을 정지시켰다. 반응액을 ELISA reader(Molecular Devices, UV max)로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. *D. melanogaster* hsp70 프로모터를 이용한 발현벡터 제작

곤충 배양세포에서 기주세포에 감염없이 외래유전자를 발현시키기 위해 초파리의 열충격 단백질 유전자(hsp70)의 프로모터를 이용하여 발현벡터를 작성하였다. 진핵생물에서 전사되는 mRNA의 안정성에 중요한 역할을 하는 poly A site를 클로닝하기 위해 pSrCAT 플라스미드를 *Sau*3AI 과 *Bam*H I제한효소로 절단한 후 230 bp의 유전자 단편을 회수하였다. 이 DNA를 pBluescript II SK+의 *Bam*H I 제한효소 위치에 삽입하여 재조합 플라스미드 pSV를 작성하였다. hsp70 프로모터 부위는 puchsπΔ 2~3 플라스미드를 *Sal* I과 *Hind* III 제한효소로 처리하여 1.39 kbp의 DNA 단편을 회수하였다. 회수한 DNA를 pSV 플라스미드의 *Sal* I과 *Hind* III 제한효소 위치에 연결하여 pHsSV 발현벡터를 작성하였다(그림 1).

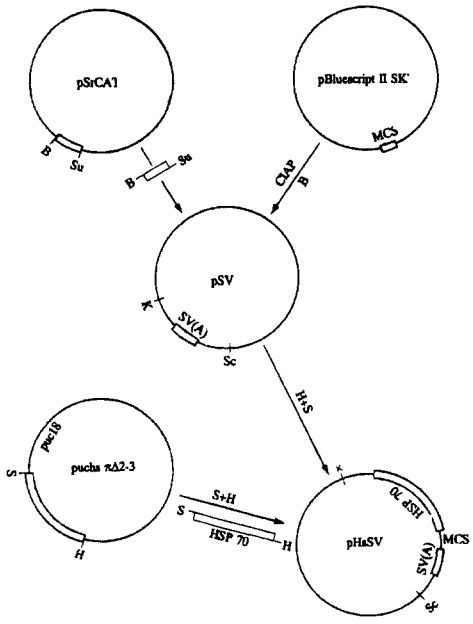

Fig. 1. *Plasmid for transient expression assay constructed with the D. melanogaster hsp70 promoter. The plasmid was constructed with hsp70 promoter from pushsπ Δ2-3, polylinker and SV40 poly A tail from pSrCAT. Abbreviations used for restriction enzymes are as follows: BamH I (B); Sau3A I (Su); Sal I (S); Hind III (H); Kpn I (K); Sac I (Sc).*

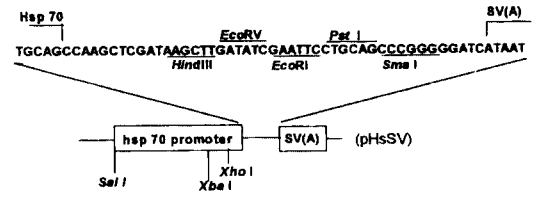

Fig. 2. *Nucleotide sequences of the junction region between the cloned hsp 70 promoter and poly A tail. Restriction endonuclease, Hind III, EcoR V, EcoR I, Pst I and Sma I as cloning sites are indicated.*

작성한 pHsSV의 유전자 구조를 확인하기 위해 염기서열을 분석한 결과(그림 2), hsp70 프로모터의 하류쪽에 *Hind* III, *Eco*R V, *Eco*R I, *Pst* I, *Sma* I 제한효소 배열과 poly A tail이 차례대로 보존되어 있었다. 따라서 작성한 pHsSV는 Ingolia 등(1980)의 hsp 70 유전자의 염기서열 분석으로부터 발현벡터의 구성요건인 ribosome binding site가 프로모터에 존재할 뿐 아니라, 프로모터 하류에 클로닝 위치를 둠으로써 삽입된 외래유전자가 hsp70 프로모터에 의해 전사조절 되도록 구축되었다. 또한 고등생물 환경에서 전사되는 mRNA의 안정성에 중요한 역할을 하는 poly A site(Manley, 1995)가 클로닝 위치의 하류에 배열되어 있어 본 연구에서 제작한 발현계는 곤충이나 곤충 배양세포에서 외래 유전자를 일시적으로 발현시키거나 또는 염색체에 삽입시킴으로써 이종 단백질을 안정적으로 영속 발현시키는 시스템 개발에 유용할 것으로 생각된다.

2. pHsSV 발현벡터의 프로모터 활성검정

제작한 pHsSV 발현벡터의 외래유전자 발현 여부와 그 정도를 검정하기 위해 표지 유전자로 *E. coli* β-galactosidase 유전자를 프로모터 하류에 위치하도록 삽입하였다. 즉 pHsSV 벡터의 *Hind* III와 *Pst* I 제

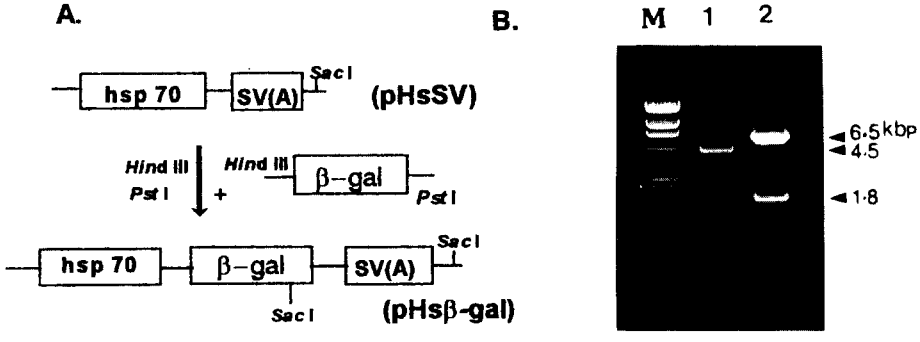

Fig. 3. *Construction and restriction endonuclease analysis of the E. coli β-galactosidase expression vector, pHsβ-gal*
A: Schematic diagram of pHsβ-gal vector construction. pHsβ-gal was constructed by inserting the Hind III-Pst I fragment of the pSV-β-Galactosidase vector into Hind III-Pst I sites of pHsSV. The resulting plasmid, pHsβ-gal, contains the lac-Z gene under the control of D. melanogaster heat shock protein (hsp 70) promoter.
B: Restriction endonuclease analysis of the pHsβ-gal. The vector plasmid was digested with Sac I and electrophoresed on a 0.7% agarose gel. M: Lambda DNA digested with Hind III, 1; pHsSV, 2; pHsβ-gal

한효소 위치를 각각 절단하고 벡터 DNA를 회수하였다. β-galactosidase 유전자는 pSV-β-Galactosidase 벡터(Promega, U.S.A)로 부터 *Hind* III와 *Pst* I을 처리하여 3.7 kb의 DNA 단편을 회수하였다. 이들을 연결반응시켜 재조합 플라스미드 pHs β-gal 제작하였다(그림 3-A). 또한 β-galactosidase 유전자의 삽입 유무를 확인하기 위해 *Sac* I으로 절단하고 아가로스 전기영동으로 분석한 결과(그림 3-B), pHsβ-gal 플라스미드에서 6.53 kb와 1.8 kb의 DNA 단편이 관찰됨으로써 β-galactosidase 유전자가 삽입되었음을 확인할 수 있었다.

작성한 pHsβ-gal의 β-galactosidase 발현양상을 BmNPV의 IE1(immediate early gene) 유전자 프로모터로 제작한 pIE1β-gal 및 β-galactosidase 발현 재조합 바이러스인 vBmβ-gal과 비교하기위해 각각의

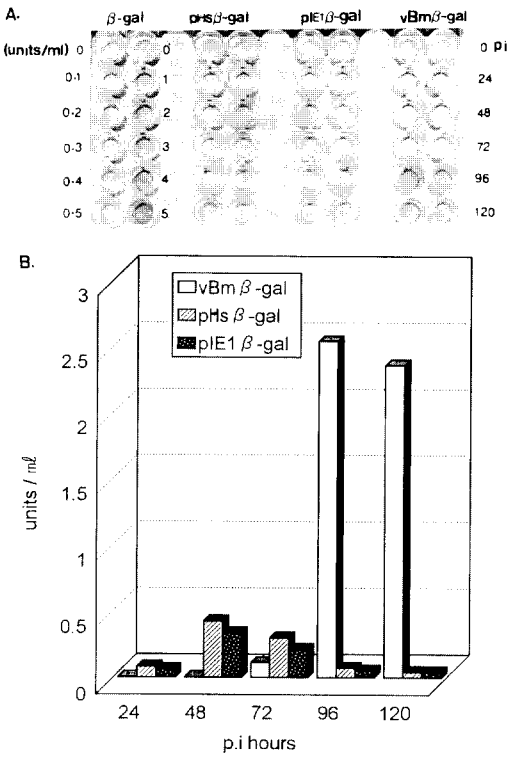

Fig. 4. *Assay of β-galactosidase activity in BmN-4 cells transfected with pHsβ-gal, pIEβ-gal and recombinant virus, vBmβ-gal, respectively. Cell extracts for β-galactosidase activity asssay were prepared various times post-transfection at 24 hrs. intervars. Assay was performed by adding the substrate ONPG (O-nitrophenyl-β-D-galatosyranoside) to cell extracts and incubating at 37°C for 30 min. The absorbance at 420 nm was measured with ELISA reader.*

DNA를 0.5 μg씩 곤충배양세포(BmN-4)에 6시간 전이시킨 후 27°C 배양하면서 24시간 간격으로 세포를 수거하였다. 수거한 세포로부터 추출한 추출액을 ONPG(O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)로 정색반응한 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과(그림 4-A), pHsβ-gal을 전이한 세포는 2일째 및 3일째에 정색반응이 관찰되었으며, 이는 pIE1β-gal을 전이한 경우와 비슷한 발현양상이었다. 반면에 재조합 바이러스에 의한 β-galactosidase 발현은 3일째 부터 관찰되기 시작하여 4일째와 5일째에 강한 정색반응을 나타내었다.

또한 β-galactosidase의 발현량을 측정하기 위해 각각의 정색반응물과 β-galactosidase 효소를 각 농도별로 조제하여 정색반응시키고 흡광도를 측정한 후 회귀직선을 산출하였다. 즉 β-galactosidase 농도가 0.1~0.5 unit/m*l* 범위에서 산출한 회귀직선, β-galactosidase(unit/m*l*)=3.15072 흡광도 -0.0705247는 pHsβ-gal과 pIE1β-gal에, 1~5 unit/*ll* 범위에서 산출한 회귀직선, β-galactosidase(unit/m*l*)=3.955901×흡광도 -0.308856은 재조합 바이러스의 β-galactosidase 농도 측정에 사용하였다. 그 결과 pHsβ-gal의 β-galactosidase는 DNA 전이 후 1일째는 인정되지 않았으나 2일째에 0.42 unit로 최고치를 나타내었고 3일째는 0.29 unit였으며, 4, 5일째는 인정되지 않았다(그림 4-B). 이것은 Okano 등(1992)이 초파리 hsp70 프로모터로 chloramphenicol acetyltransferase(CAT)유전자를 누에 배자 유래의 배양세포에서 발현시킨 결과와 비슷한 경향이었다. 또한 BmNPV 유래의 IE1 프로모터로 구축한 pIE1β-gal의 발현양상과 비슷한 경향이었으나, 발현량에 있어서 pIE1β-gal의 2, 3일째 발현량인 0.33 및 0.21 unit 보다 다소 높게 나타났다. 반면에 재조합 바이러스에 의한 β-galactosidase 발현은 접종 후 3일째에 0.11 unit로 발현이 시작되어 4일째에 2.53 unit의 최고치를 보인 후 5일째 2.35 unit로 감소하는 경향을 보였는데, 이는 pHsβ-gal의 발현양상 비교해 볼때 큰 차이를 보였다. 그러나 pHsβ-gal과 pIE1β-gal는 재조합 바이러스에 비해 발현량은 낮지만 배양세포의 감염없이 β-galactosidase를 발현시킬 수 있는 것은 이들 프로모터가 기주 세포의 RNA polymerase II에 의해 전사조절(Huh and Weaver, 1990; Parker and Topol, 1984)되기 때문인 것으로 생각된다.

3. FLP recombinase 발현계 구축

곤충 배양세포의 감염없이 FLP recombinase를 발현시키기 위해 pHsSV벡터의 hsp70 프로모터 하류에 FLP 유전자를 삽입하였다. FLP 유전자를 PCR로 클

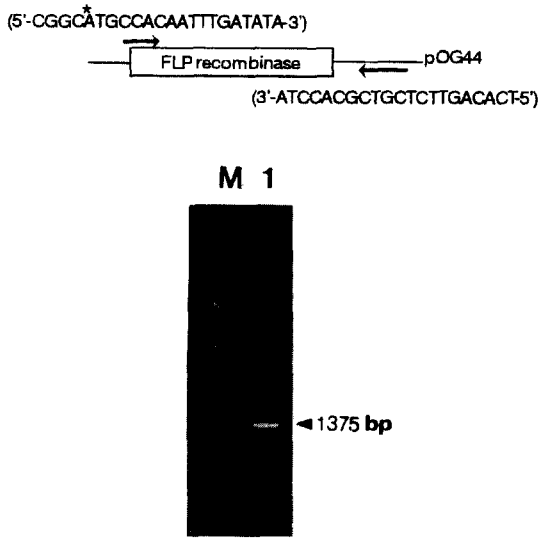

Fig. 5. *Cloning of the FLP recombinase gene.*
The polymerase chain reaction was performed by using sense and antisense primers from the pOG44 vector containing FLP recombinase gene. The amplified fragment was confirmed by 1.0% agarose gel electrophoresis. M; Lambda DNA/EcoR I+Hind III markers, lane 1; the PCR products. An asterisk represents the translational start site of FLP recombinase gene.

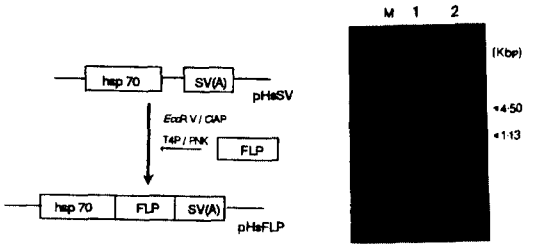

Fig. 6. *Construction of the FLP recombinase ecpression vector, pHsFLP.*

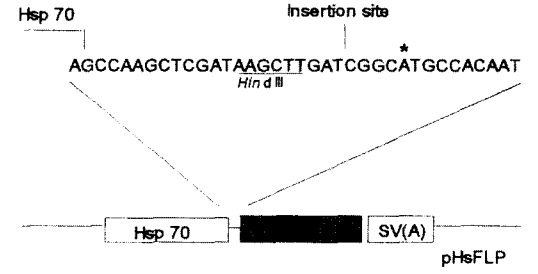

Fig. 7. *Nucletide sequences of the junction region containing the FLP recombinase gene.*
An asterisk inducates the translation start codon of FLP recombinase gene.

로닝하기 위해 사용한 sense primer는 FLP 유전자의 번역개시 codon을 포함되게 하였으며, antisense primer는 종결점의 하류에 위치하도록 각각 합성한 후 pOG44 벡터(Stratagene, U.S.A.)를 주형으로 PCR을 수행하였다. 반응 산물을 아가로스 겔로 전기영동한 결과, 예상되는 1.37 kbp의 DNA 증폭 단편을 확인할 수 있었다(그림 5). 이를 pHsSV에 삽입하기 위해 T4 polymerase 처리로 blunt-end로 만든 다음 T4 nuclo- tide kinase로 양쪽 5' 말단에 인산기를 부가하였다. 처리한 DNA 단편을 EcoR V로 절단하고 CIAP 처리한 pHsSV 벡터에 연결하여 pHsFLP 발현벡터를 작성하였다. 제작한 pHsFLP를 제한효소 *Pst* I으로 절단하고 아가로스 전기영동으로 분석한 결과(그림 6), pHsSV 벡터는 4.5 kb의 DNA 단편이 관찰된 반면, pHsFLP 벡터는 예상되는 1,133 bp의 새로운 DNA 단편이 관찰되어 FLP 유전자가 삽입되었음을 추정 할 수 있었다. 또한 FLP 유전자의 삽입 위치와 그 주변부의 유전자 배열을 분석한 결과, hsp70 프로모터 하류의 *Eco*R V 제한효소 위치에 삽입되어 있었다(그림 7).

이와같이 제작한 pHsFLP의 FLP recombinase 발현 여부를 검정하기 위해 DNA를 배양세포에 전이시키고 48시간 및 72시간째 수거한 세포 추출액을 SDS-PAGE한 결과, DNA를 전이하지 않은 건강세포 추출액에서는 관찰되지 않은 44kDa의 밴드가 관찰되어 FLP recombinase가 발현되는 것을 추정할 수 있었다(그림 8). 이러한 발현양상은 pHsβ-gal 을 전이한 후 2, 3일째 β-galactosidase 발현이 인정된 것과 동일한 경향이였으나, 발현된 FLP recombinase는 이 유전자가 암호화하고 있는 1,272 bp로 부터 추정된 48kDa(Hartley and Donelson, 1980)보다 작은 것으로 나타났다. 이것은 Babineau 등(1985)이 *E. coli*에서 발현시킨 경우 약 45kDa으로 추정된 것과 비슷한 크기였다. 또한 그들은 추정치보다 분자량이 작게 나타난 원인으로 *E. coli*에서 발현된 FLP recombinase는 SDS-PAGE에서 비정상적으로 빨리 이동하는지 혹은 기주내에서 C-말단이 수식된 결과인지는 불분명하다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 곤충 배양세포에서 발현시킨 것으로 *E. coli*에서와 같은 연유로 분자량이 작게 나타나는지 아니면 다른 어떤 작용기구에 의한 것인지 금후 이에 대한 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과로부터 Kilby 등(1993)이 보고한 바와 같이 본 연구에서 구축한 pHsFLP 발현벡터는 곤충 배양세포의 게놈 조작이나 재조합 바이러스 제작에 유용할 것으로 사료된다.

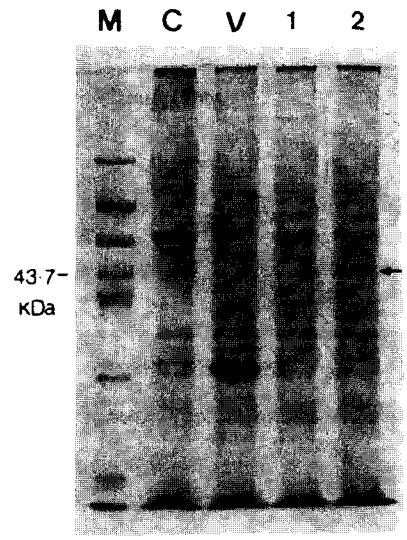

Fig. 8. *SDS-PAGE analysis of FLP recombinase produced by a pHsFLP plasmid. The BmN-4 cells were transfected with pHsFLP plasmid and harvested at 48 and 72 hrs. post-transfection, respectively. Cell lysates were analyzed by 12.5% SDS-PAGE. M; protein size markers, C; mock-infected BmN-4 cell, V; BmN-4 cells infected with wild type BmNPV, 1; BmN-4 cells harvested at 48 hrs. after pHsFLP transfection, 2; 72, BmN-4 cells harvested at 72hrs. after pHsFLP transfection.*

적 요

곤충 baculovirus를 이용한 BEVS의 바이러스 감염에 따른 기주세포의 기능 변화와 궁극적인 치사의 문제점을 개선한 새로운 발현계를 구축하고 이를 이용하여 곤충 배양세포에서 yeast에서 유래된 FLP recombinase의 발현여부를 조사하였다.

이를 위해 곤충배양세포(BmN-4)를 치사함이 없이 일시적인 외래유전자의 발현계로써 초파리 열충격 단백질 유전자(hsp70)의 프로모터를 이용한 pHsSV 발현벡터를 제작하였다. 이 벡터의 프로모터의 활성 검정을 위해 β-galactosidase 유전자를 삽입시켜 pHsβ-gal 벡터를 작성하고 곤충세포에 전이시킨 결과 2일째와 3일째 발현이 확인되었다. 또한 yeast의 FLP recombinase 유전자를 PCR로 클로닝하고 pHsSV에 삽입하여 제작한 pHsFLP 벡터도 DNA 전이 후 2일째와 3일째 44kDa의 FLP 단백질이 발현되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 구축한 pHsFLP는 yeast의 FLP/FRT 시스템을 응용한 곤충 배양세포의 게놈 조작이나 재조합 바이러스 제작 연구시 FLP recombinase 발현벡터로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

Argos, P. A., Landy, K., Abremski, J. B., Egan, E. H., Lindquist, R. H., Hoess, M. L., Kahn, S. V. L., Manayana, L. S., Pierson III, Sternberg, N. and Leong, J. M. (1986) The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity, EMBO. J., 5: 433-440.

Babineau, D., Vetter, D., Andrews, B. J., Gronostajski, R. M., Proteau, G. A., Beatty, L. G. and Sadowski, P. D. (1985) The FLP protein of the 2-micron plasmid of yeast. Purification of the protein from *Escherichia coli* cells expressing the cloned FLP gene, J. Biol. Chem., **260**: 12313-12319.

Corces, V., Pellicer, A., Axel, R. and Meselson, M. (1981) Integration, transcription and control of a Drosophila heat shock gene in mouse cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **78**: 7038-7042.

Eldridge, R., O'Reilly, D. R., Hammock, B. D. and Miller, L. K. (1992) Insecticidal properties of genetically engineered baculoviruses expressing an insect juvenile hormone esterase gene, Appl. Environ. Microbiol., **58**: 1583-1591.

Friesen, H. and Sadowski, P. D. (1992) Mutagenesis of a conserved region of the gene encoding the FLP recombinase of *Saccharomyces cerevisiae*. A role for arginine 191 in binding and ligation, J. Mol. Biol., **225**: 313-326.

Golic, K. G. and Lindquist, S.(1989) The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the Drosophila genome, Cell, **59**: 449-509.

Hartley, J. L. and Donelson, J. E. (1980) Nucleotide sequence of the yeast plasmid, Nature, **286**: 860-865.

Huh, N. E. and Weaver, R. F. (1990) Identifying the RNA polymerases that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, J. Gen. Virol., **71**: 195-202.

Ingolia, T. D., Craig, E. A. and McCarthy, B. J. (1980) Sequence of three copies of the gene for the major Dorosophila heat shock induced protein and their flanking regions, Cell, **21**: 669-679.

Jayaram, M.(1985) Two-micrometer circle site-specific recombination: The minimal substrate and the possible role of flanking sequences, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **82**: 5875-5879.

Kilby, N. J., Snaith, M. R. and Murray, J. A. H. (1993) Site-specific recombinases: tools for genome engineering, Trends Genet., **9**: 413-421.

Kobayashi, J., Imanishi, S., Inoue, H., Ohsuye, K., Yamaichi, K., Tsuruoka, N. and Tanaka, S. (1992) High level expression of a frog α-amidating enzyme, AE-II, in cultured cells and silkworm using a *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus expression vector, Cytotechnology, **8**: 103-108.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structual proteins during the assembly of bacteriophage T4, Nature, **227**: 680-685.

Maeda, S. (1989a) Invertebrate cell system and applications, CRC press, Boca Raton, Fla pp. 167-182.

Maeda, S. (1989b) Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene, Biochem. Biophys. Res. Commun., **165**: 1177-1183.

Maeda, S., Volrath, S. L., Hanzlik, T. N., Harper, S. A., Majima, K., Maddox, D. W., Hammock, B. D. and Fowler, E. (1991) Insecticidal effects of an insect-specific neurotoxin expressed by a recombinant baculovirus, Virology, **184**: 777-780.

Maisonhaute, C. and Echalier, G. (1986) Stable transformation of Drosophila Kc cells to antibiotic resistance with the bacterial neomycin resistance gene, FEBS Lett., **197**: 45-49.

Manley, J. L. (1995) Messenger RNA polyadenylation: A universal modification, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **92**: 1800-1801.

McCutchen, B. F., Choudary, P. V., Crenshaw, R., Maddox, D., Kamita, S.G., Palekar, N., Volrath, S., Fowler, E., Hammock, B. D. and Maeda, S. (1991) Development of a recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin: potential for pest control, Bio/Technology, **9**: 848-852.

Mori, H., Yamao, H., Nakazawa, H., Sugahara, Y., Shirai, N., Matsubara, F., Sumida, H. and Imamura, T. (1995) Transovarian transmission of a foreign gene in the silkworm, *Bombyx mori, by Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, Bio/Technology, **13**: 1005-1007.

O'Gorman, S., Fox, D. T. and Wahl, G. M. (1991) Recombinase -mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells, Science, **251**: 1351-1355.

Okano, K., Miyajima, N., Takada, N., Kobayashi, M. and Maekawa, H. (1992) Basic conditions for the drug selection and transient gene expression in the cultured cell line of *Bombyx mori, In vitro* cell. Dev. Biol., **28A**: 779-781.

O'Reilly, D. R., Miller, L. K. and Luckow, V. A. (1992) Baculovirus expression vectors-A laboratory manual, W. H. Freeman and Company, New York.

Parker, C. S. and Topol, J. (1984) A Drosophila RNA polymerase II transcription factor binds to the regulatory site of an hsp70 gene, Cell, **37**: 273-283.

Parsons, R. L., Prasad, P. V., Harshey, R. M. and Jayaram, M. (1988) Step-arrest mutants of FLP recombinase: implications for the catalytic mechanism of DNA recombination, Mol. Cell. Biol., **8**: 3303-3310.

Pelham, H. R. B. (1982) A regulatory upstream promoter element in the Drosophila hsp70 heat shock gene, Cell, **30**: 517-528.

Rio, D. C., and Rubin, G. M. (1985) *Drosophila melanogaster* cells with a dominant selectable marker, Mol. cell. Biol., **5**: 1833-1838.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning, A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, New York.

Senecoff, J. F., Bruckner, R. C. and Cox, M. M. (1985) The FLP recombinase of the yeast 2-μm plasmid: Characterization of its recombination site, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **82**: 7270-7274.

Stewart, L. M. D., Hirst, M., Ferber, M. L., Merryweather, A. T., Cayley, P. J. and Possee, R. D. (1991) Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect specific toxin gene, Nature, **352**: 85-88.

Tamura, T. and Kanda, T.(1990) Transient expression of CAT genes injected into early embryos of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, Jap. J. Genetics, **65**: 401-410.

Tomalski, M. D. and Miller, L. K. (1991) Insect paralysis baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene, Nature, **352**: 82-85.

Tomalski, M. D. and Miller, L. K. (1992) Expression of a paralytic neurotoxin gene to improve insect baculoviruses as biopesticides, Bio/Technology, **10**: 545-549.

Zuidema, D., Schouten, A., Usmany, M., Maule, A. J., Belsham, G. J., Roosien, J., Klinge-Roode, E. C., Van Lent, J. W. M. and Vlak, J. M. (1990) Expression of cauliflower mosaic virus gene I in insect cells using a novel polyhedrin-based baculovirus expression vector, J. Gen. Virol., **71**: 2201-2209.