

Yeast의 FLP/FRT 시스템을 이용한 BmNPV의 유전자 재조합

강석우 · 윤은영 · 김상현 · 김근영 · 한명세* · 강석권**

농촌진흥청 잠사곤충연구소, *경북대학교 농과대학, **서울대학교 농업생명과학대학

Construction of Recombinant *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus Using a FLP/FRT System of Yeast, *Saccharomyces cerevisiae* 2 μ m plasmid

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, Korea

*College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, Korea

**College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea

ABSTRACT

For the construction of plasmid and BmNPV carrying the FRT recognition site for the FLP recombinases, we synthesized the wild type FRT oligonucleotides. The target FRT sequences consist of three 13bp repeated DNA sequences; two repeats in a direct orientation and one inverted relative to the other two. In addition, there is an 8bp spacer region between the repeats which determine the orientation of the FRT recombination site. In order to place the FRT site both in the target BmNPV genome and the transfer vector, we constructed a plasmid, pFRT β -gal, carrying the FRT sites within the cloning sites of pSV vector and a recombinant BmNPV, vFRTPH, carrying the FRT sites at a downstream of polyhedrin promoter, respectively. In order to test the functionality of the FLP/FRT site-specific recombination system, vFRTPH, pFRT β -gal and pHsFLP DNA were co-transfected into BmN-4 cells. The resulting recombinant virus was designated a vFRT β -gal. From construction analysis of the vFRT β -gal with PCR technique it was concluded that the entire pFRT β -gal plasmid with β -galactosidase gene and origins of replication flanked by two functional hybrid FRT sequences. The efficiency of recombination was 8.7%, which was higher than that(2.2%) of recombination between a conventional transfer vector and the wild type BmNPV.

Key words : FLP/FRT system, Site-specific recombination, BmNPV

서 론

진핵 및 원핵생물의 특정 유전자를 제거하거나 게놈내에 외래유전자 삽입 등의 게놈 조작 연구는 부위 특이적 재조합이나 상동재조합으로 가능하다고 알려져 있다(Vega, 1994). 약 130kb 크기의 곤충 baculovirus 게놈에 외래 유전자 도입은 전이벡터와 야생형 바이러스간의 상동 재조합으로 가능하다. 이들 DNA 간의 상동 재조합은 곤충 배양세포의 효소기능에 의해 일어나며, 그 산물은 야생형, single crossover 및

double crossover된 바이러스가 혼재되어 있다. 그중 single crossover된 바이러스는 재조합 바이러스의 특징을 가지나 바이러스 게놈에 중복된 염기배열이 존재하므로 유전적으로 불안정한 반면 양쪽의 상동 염기배열에서 교체가 일어난 경우 유전적으로 안정된 재조합 바이러스를 얻을 수 있게 된다. 이때 상동 재조합의 효율은 전이벡터의 상동 염기배열의 크기에 따라 차이가 있으나, 일반적으로 0.1%~1% 정도라고 하였다(O'Reilly *et al.*, 1992; Vialard *et al.*, 1990).

이와같은 상동 재조합의 낮은 재조합 효율과 sin-

gle crossover된 바이러스 선별 등의 문제점을 개선하기 위한 연구가 많이 보고되고있다 (Kitts *et al.*, 1990; Patel *et al.*, 1992; Kitts & Possee, 1993; Luckow *et al.*, 1993). 특히 Peakman 등(1992)은 부위 특이적 재조합 효소로 *in vitro*에서 재조합 바이러스 제작이 가능하다고 하였는데, 그는 bacteriophage P1의 Cre recombinase와 target sequence인 34bp의 loxP를 가진 야생형 바이러스와 전이 플라스미드를 *in vitro*에서 반응시켜 약 50%의 재조합 바이러스를 얻었으며, 역반응에 의해 재조합 바이러스로부터 전이 플라스미드와 야생형 바이러스를 쉽게 회수할 수 있다고 하였다. 이 방법은 Cre recombinase가 loxP를 특이적으로 인식하고 절단한 후 다른 loxP에 연결시키는 기능을 이용한 것으로서 상동 재조합과 다른 부위 특이적 재조합 방법으로 구별되고 있다.

한편, Cre recombinase와 유사한 기능을 가진 FLP recombinase는 *Saccharomyces cerevisiae* 2 μ m 플라스미드에 1,272bp로 보존되어 있으며, 이 효소의 특이 인식 염기배열로 599bp의 inverted repeats(IR)를 포함하고 있다고 하였다(Hartley & Donelson, 1980). 그 후 Senecoff 등(1985)과 Jayaram(1985)에 의해 FLP recombinase의 최소 인식 배열인 FRT(FLP recombinase Recognition Target)는 8bp의 core 부분과 13bp의 inverted repeats로 구성되어 있는 것으로 밝혀졌다.

이러한 FLP recombinase는 계놈에 존재하는 FRT 사이의 유전자를 제거하거나 방향을 바꿀 수 있으며, 분자간의 유전자 재조합을 촉매할 수 있기 때문에 계놈 유전자 조작 연구에 유용하다고 하였다(Golic & Lindquist, 1989; Kilby *et al.*, 1993). 또한 FLP/FRT 시스템은 *E. coli*(Huang *et al.*, 1991), 동물세포(Jung *et al.*, 1993; O'Gorman *et al.*, 1991), 옥수수과 버의 protoplast(Lyznik *et al.*, 1993), 담배(Lloyd & Davis, 1994), 초파리(Choi & Perrimon, 1992; Golic, 1991; Golic & Lindquist, 1989), 모기(Morris *et al.*, 1991) 등의 계놈 유전자에서 외래유전자를 활성화시키거나 제거 또는 삽입 반응을 촉매하며 이러한 반응은 FLP recombinase의 발현 양상에 따라 가역적으로 일어난다고 하였다.

본 연구는 상동 재조합의 낮은 바이러스 재조합 효율과 single crossover의 문제점을 개선하고자 yeast의 FLP/FRT 시스템을 개조하여 BmNPV 계놈에 부위 특이적으로 외래유전자를 삽입할 수 있는 새로운 시스템을 개발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. *E. coli* 균주, 벡터 및 유전자

플라스미드 DNA의 형질전환에 사용한 *E. coli* 균주는 JM 109(Takara, Japan) 및 XL1-blue(Stratagene, U.S.A)였으며, 유전자 클로닝에 사용한 벡터는 Stratagene사의 pBluescript II KS⁺ 및 SK⁺를, PCR 산물의 클로닝은 Promega(U.S.A)사의 pGem-T 벡터를 사용하였다.

pBm4 전이벡터(Kobayashi *et al.*, 1992) 및 pSV 벡터는 일본 잠사곤충농업기술연구소의 세포공학 연구실로부터 분양받은 것을, 그리고 FLP recombinase 발현벡터는 姜 등(1997)이 보고한 pHsFLP 발현벡터를 사용하였다. β -galactosidase 유전자는 Promega사의 pSV- β -Galactosidase 벡터로부터 분리하여 사용하였다. 기타 유전자 조작은 Sambrook 등(1989)의 방법에 준하여 수행하였다.

2. 공시 바이러스 및 곤충 세포 배양

공시 바이러스는 일본 잠사곤충농업기술연구소의 세포공학 연구실에서 분양받은 누에 핵다각체형 바이러스(P6E)를 사용하였다.

곤충 배양세포에서의 바이러스 증식은 10⁶pfu(plaque forming units)농도의 P6E 바이러스액 20 μ l를 BmN-4 세포에 접종한 후 27°C 항온기에서 배양하면서 5~7일째 다각체 형성 유무를 확인한 후 파스퇴르 피펫으로 배양액을 수거하였다. 이를 15 ml 원심튜브에 옮겨 3,000 rpm으로 10분간 원심하여 세포를 제거한 상청액을 바이러스 접종 원액으로 하고, effendorf 튜브에 1 ml씩 분주하여 -70°C에 보관하였다. 바이러스의 농도는 O'Reilly 등(1992)의 방법에 따라 TCID₅₀(tissue culture infectious dose)를 산출하였다. 바이러스 DNA는 Pennock 등(1984)의 방법에 따라 다각체로부터 NOV(non-occluded virus)를 분리한 후 Maeda(1989)의 방법에 따라 NOV로부터 추출하였다.

곤충 배양세포주는 일본 잠사곤충농업기술연구소의 세포공학연구실로부터 누에난소 유래의 BmN-4 세포주를 분양받아 사용하였다. BmN-4 세포주의 계대배양은 10% FBS가 함유된 Ex-cell 400배지 혹은 TC-100배지로 25°C에서 5~7일간 배양한 세포를 도립현미경으로 관찰하여 증식 정도를 확인한 다음, 파스퇴르 피펫으로 세포를 떼어낸 후 신선배지 4 ml이 든 25 cm² 플라스크에 1 ml씩 분주하고 25°C에서 배양하였다(Maeda, 1989).

3. DNA 동시 전이

곤충 배양세포에 바이러스 DNA와 전이벡터 DNA를 동시전이기 위해 liposome transfection reagent인

DOSPER(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 수행하였다.

즉, 바이러스 DNA와 전이벡터 DNA를 각각 혼합한 후 20 mM HEPES를 가하여 최종적으로 6 μ l 되게 한 후 여기에 DOSPER 3 μ l와 20 mM HEPES 3 μ l 섞은 액을 첨가하여 잘 섞은 후 25°C에 15분간 반응시켰다. 이 반응물을 전날 10⁶개 세포로 분주한 24 well 플레이트에 첨가하고 25°C에서 6시간 반응시킨 후 신선한 배지로 교체하고 27°C항온기에 배양하였다. 이 후 5~7일간 배양하면서 세포내 다각체 형성이나 세포병징 관찰로 DNA 전이 여부를 확인 하였다.

4. DNA 염기서열 분석

DNA 염기서열은 자동염기서열 분석장치(Applied Biosystems Inc., U.S.A)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 수행하였다. 각 염기의 표지는 dye deoxy cycle sequencing kit(Applied Biosystems Inc., U.S.A)를 이용하여 반응액을 조제하고 PCR을 수행하였다. PCR 반응산물을 정제한 후 4.5% 아크릴아마이드겔에 전개하였다.

아크릴아마이드겔의 예비통전은 30와트로 30초~1분간 하였으며, 시료주입은 정제한 PCR 산물에 formamide 5 μ l와 50 mM EDTA 1 μ l를 넣어 100°C에 2분간 처리하고 급냉한 후 각 well에 6 μ l씩 주입하였다. 전기영동은 1,450 volt에서 하룻밤 통전하였으며, 염기서열은 기기로부터 인쇄한 데이터로부터 결정하였다.

5. Oligonucleotides 합성 및 PCR

FLP recombinase의 표적 부위인 FRT는 Pan 등(1991)이 보고한 염기서열을 참고로하여 sense primer는 5'-ACGCGTCGACGAAGTTCCTATTCCG-AAGTTCCTATTCTCTAGAAA-3'와 같이 45mer를, antisense primer는 5'-CCATCGATGAAGTTCCTAT ACTTTCTAGA-3'의 29mer를 설계하여 한국생공(주)에 합성 의뢰하였다.

BmNPV의 다각체 단백질 유전자를 클로닝하기 위한 primer는 Iatrou 등(1985)이 보고한 다각체 단백질 유전자의 염기서열을 참고로 하여 제작하였다. Sense primer는 다각체 단백질 유전자의 -2~+19에 해당하는 21bp의 5' 말단에 제한효소 *Nru* I 위치를 부가하여 5'-CGTCGCGATATGCCGAATTATTCA-TACA-3'와 같이 28mer로 제작하였으며, antisense는 1201~1220 염기에 해당하는 5'-CAATAATGCGCC-TAACGC G-3'로 합성하였다. PCR 반응액은 Premix-Top 키트(Korea Biotech Inc., Korea)를 이용하여 조

제하였다. PCR은 94°C에 3분간 전 처리 및 94°C에 30초, 55°C에 1분, 72°C에 1분30초의 반응과정을 30회 반복하고 72°C에 7분간 반응시켰다.

재조합 바이러스 동정을 위한 PCR은 O'Reilly 등(1992)의 방법을 참고로 하여 수행하였다. 다각체 단백질 유전자 동정을 위한 sense primer는 -93~-74에 해당하는 5'-ATTAACGATACAAATGGAAA-3'와 antisense primer는 +590~+610 위치의 5'-AGAAGTTCCTCC-CATATGACG-3'와 같이 합성하였다. β -galactosidase 유전자 동정을 위해 합성한 antisense primer는 pSV- β -Galactosidase 벡터의 716~735 위치에 해당하는 5'-TCTTCGCTATTACGCCAGCT-3'와 같이 합성하였다.

Long PCR은 Takara(Japan)의 LA PCR kit를 사용하여 제조회사의 조작 방법에 따라 반응액을 조제한 후 Thermo cycler(Perkin Elmer)에서 PCR 하였다.

그 외 염기서열 결정을 위한 primer는 Stratagene (La Jolla U.S.A)의 M13 primer(5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3')와 reverse primer(5'-GGAAACAGC-TAT GACCATG-3') 및 Promega(U.S.A)사의 pUC/M13 forward primer(5'-GTTTTCCC AGTCACGAC-3')와 reverse primer(5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')를 구입하여 사용하였다.

6. BmNPV의 유전자 재조합 효율 검증

Yeast의 FLP/FRT 시스템을 재조합 BmNPV 제작 기술로 이용하기 위해 구축한 재조합 플라스미드와 바이러스 DNA간의 유전자 재조합 여부 및 효율 검정은 다음과 같이 수행하였다.

FLP recombinase 발현벡터, FRT와 β -galactosidase 유전자를 함유한 전이벡터 및 바이러스 DNA를 배양 세포에 6시간 동시감염 시킨 후 5 일째 회수한 배양액을 10배 단계 희석하여 O'Reilly 등(1992)의 방법에 따라 바이러스의 TCID₅₀를 산출하였다. 이를 참고로 하여 바이러스 원액을 96 well 플레이트에 10%정도 감염될 수 있는 농도로 조정하여 바이러스 접종액으로 하였다.

바이러스 접종 및 배양은 전날 well당 10⁶개 세포로 분주해 둔 96 well 플레이트에 바이러스 접종액을 50 μ l씩 부가한 후 27°C에서 배양하면서 5~7일째에 각 well의 다각체형성 유무를 기준으로 재조합 바이러스를 1차 선발하였다. 선발한 재조합 바이러스의 외래 유전자 재조합 여부를 확증하기 위해 각 well의 세포 배양액을 수거하고 이를 바이러스 접종액으로 하여 위와 같은 방법으로 2~3회 반복하였다. 최종적으로 선발한 재조합 바이러스의 β -galactosidase 발현 여부는 X-gal 염색(O'Reilly *et al*, 1992)으로 확인하였다.

또한 상동재조합은 O'Reilly 등(1992)의 방법으로 수행하고 위와같은 방법으로 재조합 바이러스를 선별하였으며, 재조합 효율은 재조합 바이러스로 확증된 well의 수로부터 산출하였다.

결과 및 고찰

1. FRT를 포함한 전이 벡터 제작

FLP recombinase의 표적 유전자인 FRT(FLP Recombinase Target site)를 합성하고, 이를 클로닝 벡터에 삽입하여 FRT를 가진 전이 플라스미드를 작성하였다. FRT를 합성하기 위해 5' 말단에 *Sal* I 제한효소 위치를 포함시킨 45mer의 sense primer를, 3' 말단에 *Cla* I 제한효소 위치를 포함시킨 29mer의 antisense primer를 각각 합성하였다. 합성한 primer를 Stratagene(La Jolla, U.S.A)사의 Klenow Fill-in kit를 사용하여 제작회사의 방법에 따라 66bp의 FRT를 제작하였다. FRT를 phenol/chloroform 방법으로 회수한 후 *Sal* I과 *Cla* I 제한효소로 각각 처리하고 아가로스 겔 전기영동으로 DNA를 회수하였다(그림 1). 회수한 FRT를 *Sal* I과 *Cla* I 제한효소로 처리한 pSV 벡터에 연결반응 시켜 pFRTSV를 얻었다.

pFRTSV 벡터의 FRT 삽입 유무와 주변부의 유전자 구조를 확인하기 위해 염기서열을 분석하였다(그림 2). 그 결과 삽입된 FRT는 Zhu 등(1995)이 보고한 바와 같이 FLP recombinase에 의한 염기 가닥의 절단과 재조합 반응이 일어나는 8bp의 core 부위와 이를 중심으로 FLP recombinase의 결합 부위로 알려진 13bp의 염기배열이 inverted repeats로 배열되어 있었다. 더욱이 *E. coli*와 yeast에서 재조합 반응 효율을 증대시키는 것으로 보고된 3번째의 13bp(Senecoff *et al.*, 1985; Jayaram, 1985)가 보존되어 있어 곤충 배양 세포에서 FLP recombinase에 의한 분자간 재조합 효율을 증대시킬 수 있을 것으로 추정되었다. 또한 FRT의 상류부분에 *Sal* I 제한효소 위치와 하류부분의 *Cla* I, *Hind* III, *Eco* R V, *Eco* R I, *Pst* I, *Sma* I 제한효소 위치 및 poly A tail이 차례대로 배열되어 있었다. 따라서 이 벡터는 FRT 하류에 외래 유전자 삽입이 용이할 뿐 아니라 poly A tail을 갖추고 있어 진핵 생물계에서 FLP recombinase에 의한 유전자 재조합 반응과 발현연구에 유용하다고 생각된다.

한편 곤충 배양세포에서 FLP recombinase에 의한 FRT 분자간 유전자 재조합 유무를 검정하기 위해 pFRTSV 벡터에 β -galactosidase 유전자를 삽입하여 pFRT β -gal을 작성하였다(그림 3). 제작한 pFRT β -gal 전이벡터는 O'Gorman 등(1991)이 FRT와 β -galac-



Fig. 1. Synthesis of the FLP recognition target (FRT) site. Two primers were annealed and filled in with a Klenow fragment. The resulting double-stranded DNA fragment was cleaved with *Sal* I and *Cla* I, respectively. The FLP recombinase binding site and orientation are indicated by arrows.



Fig. 2. Partial sequence of the plasmid, pFRTSV containing FRT sites. FLP recombinase target vector was constructed by ligating the FRT oligonucleotides between *Sal* I and *Cla* I site of the pSV vector. Abbreviations used for restriction enzymes are as follows: BamH I (B); *Cla* I (C); *Eco* R I (RI); *Eco* R V (RV); *Kpn* I (K); *Hind* III (H); *Pst* I (P); *Sal* I (S); *Sma* I (Sm); *Xba* I (X).

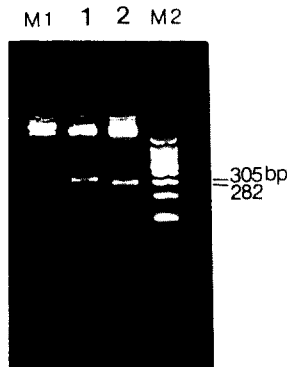


Fig. 3. Restriction enzyme digestion analysis of the β -galactosidase transfer plasmid, pFRT β -gal. The *Hind* III-*Pst* I fragment containing β -galactosidase gene was ligated at the same sites of pFRTSV plasmid. The cloning vector pFRTSV and transfer vector pFRT β -gal were digested with *Xba* I, respectively and electrophoresed on a 2.5% agarose gel. M1; Lambda DNA digested with *Hind* III, M2; 100bp ladder marker, Lane 1; pFRTSV digested with *Xba* I, Lane 2; pFRT β -gal with *Xba* I.

tosidase 유전자를 포함한 전이벡터를 구축하여 동물 세포에서 FLP recombinase에 의한 분자간 유전자 재조합 반응 유무를 β -galactosidase의 발현 여부로 검

정한 사실로부터 곤충 및 곤충 배양세포에서 FLP recombinase에 의한 분자간의 유전자 재조합 유무 검증에 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

2. FRT 및 다각체 단백질 유전자를 포함한 재조합 바이러스 제작

FLP recombinase의 부위 특이적 유전자 재조합 기능에 의해 FRT를 포함한 전이벡터와 BmNPV간의 유전자 재조합이 일어나는지를 검증하기 위해 야생형 바이러스의 다각체 단백질 유전자 위치에 FRT와 그 하류에 다각체 단백질 유전자를 삽입시킨 재조합 바이러스를 제작하였다.

그림 4는 FRT와 다각체 단백질 유전자를 pBm4 전이벡터에 클로닝하는 과정을 모식화한 것으로 PCR로 증폭한 다각체 단백질 유전자를 pGem-T 벡터에 연결 반응시켜 pGem-PH를 선별하였다. pGem-PH로부터 *Nru I*과 *Hind III* 제한효소를 처리하여 1.23kb의 다각체 단백질 유전자를 회수하고, 이 유전자 단편

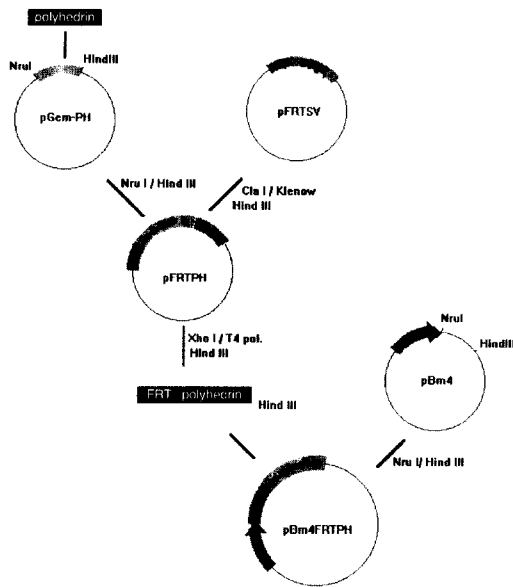


Fig. 4. Construction of the transfer vector, pBm4FRTPH. The PCR product containing the polyhedrin encoding gene was introduced into pGem-T vector. The *Nru I*-*Hind III* fragment containing polyhedrin gene from pGem-PH vector was ligated between the *Cla I* site filled in with Klenow polymerase and *Hind III* site of the pFRTSV vector. The pFRTPH cleaved *Xho I* was filled-in using T4 polymerase and digested with *Hind III*. The FRTPH fragment was introduced into the transfer vector pBm4 prepared by digestion with *Nru I* and partial digestion with *Hind III*.

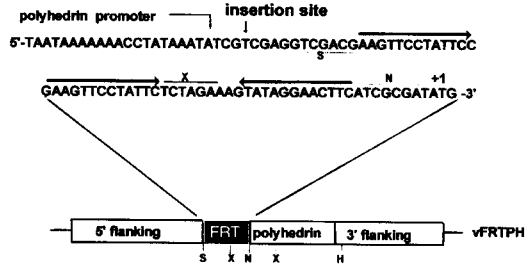


Fig. 5. Sequence of the recombination region of the recombinant virus, vFRTPH. Recombination region was PCR amplified and cloned into the pGem-T vector. The resulting plasmid was sequencing. Abbreviations used restriction enzymes are as follows: *Hind III*(H); *Sal I* (S); *Nru I*(N); *Xba I*(X).

을 *Cla I*으로 절단한 다음 Klenow polymerase 처리로 blunt end로 만든 후 *Hind III*로 재 절단한 pFRTSV에 삽입하여 pFRTPH를 구축하였다.

또한 FRT와 다각체 단백질유전자를 pBm4 전이벡터에 동시에 삽입하기위해 pFRTPH를 *Xho I*으로 절단한 다음 Klenow polymerase로 blunt end로 만들고, 이를 *Hind III*로 절단하여 1,244bp의 FRTPH 단편을 얻었다. 이 단편을 *Nru I*과 *Hind III*로 부분 절단하여 얻은 8.8Kb의 pBm4 전이벡터에 연결하여 pBm4 FRTPH를 제작하였다.

이상에서 제작한 pBm4FRTPH 전이벡터와 야생형 바이러스 DNA를 BmN-4 세포에 동시감염 시킨 후 end-point 희석법으로 다각체를 형성하는 재조합 바이러스를 선별하고, 이를 vFRTPH로 명명하였다. 삽입된 유전자 주변부를 염기서열 분석한 결과(그림 5), 다각체 단백질 유전자의 프로모터 하류에 FRT와 다각체 단백질 유전자가 차례대로 배열되어 있었으며, 다각체 단백질의 번역개시점은 프로모터로부터 70bp 하류에 위치하고 있었다. 이와같은 유전자 배열로부터 vFRTPH 재조합 바이러스는 다각체 단백질 프로모터와 구조단백질 유전자 사이에 삽입되어 있는 FRT에 관계없이 다각체를 형성하는 것으로 판명되었다. 따라서 선별한 재조합 바이러스는 FLP recombinase를 이용한 유전자 재조합 시스템의 표적 바이러스로 유용하다고 생각된다.

3. pFRTβ-gal과 vFRTPH간의 유전자 재조합 및 효율 검증

pHsFLP를 이용하여 pFRTβ-gal과 vFRTPH간의 유전자 재조합 반응과 그 효율을 조사하였다. 재조합 반응은 pHsFLP 0.5 μg, pFRTβ-gal 0.5 μg 및 vFRTPH

Table 1. Efficiency of FLP-mediated recombination between wild type virus, vFRTPH, and transfer plasmid, pFRT β -gal

Method	Infected wells ^a	occ ^c	occ ^c / β -gal ^b	b/a(%)
Homologous recombination	139	136	3	2.2
FLP/FRT system	23	21	2	8.7

DNA 4 μ g을 곤충세포에 동시 전이시킨 후 27°C에 배양하였다. 배양 5일째 수거한 배양액으로부터 occ- 형태의 바이러스를 1차 선발한 후 β -galactosidase의 발현여부를 X-gal염색으로 확인하여 재조합 효율을 결정하였다. 그 결과(표 1) 23개의 감염 well중 2개 well에서 X-gal 염색이 일어났으며, 이는 전체 감염 well의 8.7%였다. 이것은 야생형 바이러스와 전이벡터간의 상동 재조합으로 얻은 2.2%의 재조합 효율보다 높았다. 그러나 8.7%의 재조합 효율은 O'Gorman 등(1991)이 구축한 FLP/FRT시스템으로 동물세포에서 60%의 재조합 효율과 Peakman 등(1992)이 FLP recombinase와 유사한 재조합 기능을 가진 bacteriophage P1유래의 Cre recombinase로 *in vitro*에서 얻은 50%의 재조합 효율보다 낮았다. 이러한 차이는 재조합 반응이 일어나는 기주에 따라 발현된 재조합 효소의 활성 차이에 기인하는 것인지 아니면 세포내 DNA 전이 효율, 기주에 의한 이중 DNA의 분해 정도, 재조합 효소의 발현량의 차이에 의한 것인지는 불분명하였다. 금후 이에 대한 연구가 이루어짐으로써 재조합 효율을 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

4. 부위특이적 재조합 바이러스의 유전자 구조 분석

선발한 부위특이적 재조합 바이러스, vFRT β -gal의 유전자 구조를 PCR로 분석하였다(그림 6).

즉, 다각체 단백질 유전자의 프로모터 부위를 sense primer로 하고 다각체 단백질 유전자의 610~630위치의 염기서열을 antisense로 조합하여 야생형 바이러스인 vFRTPH와 vFRT2 β -gal을 PCR한 결과(lane 1,2), 783bp와 7,822bp로 추정되는 증폭밴드가 관찰되었다. 이러한 결과로부터 야생형 바이러스의 다각체 단백질 유전자 위치에 7,039bp 크기의 외래유전자가 삽입된 것을 확인할 수 있었다.

또한 삽입된 유전자가 재조합 반응에 사용한 pFRT β -gal인지 확인하기 위해 다각체 단백질 유전자의 프로모터 부위와 FRT 합성에 사용한 primer를 sense로 하고 β -galactosidase 유전자 부위를 antisense

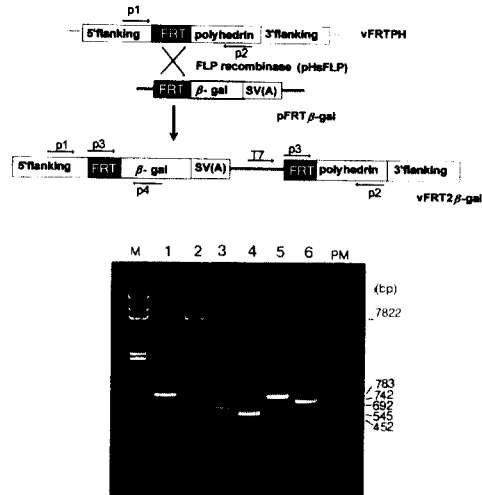


Fig. 6. Identification of a recombinant virus, vFRT β -gal by PCR amplification. Expected recombination event by the Fip recombinase between the wild type virus and the transfer plasmid illustrated and showed the position of primers used for PCR reactions (upper panel). M: λ DNA digested with Hind III, PM: PCR marker, Lane 1,2; the fragment amplified by primers p1 and p2 from w.t. virus, vFRTPH or recombinant virus, vFRT β -gal, respectively. Lane 3; the fragment amplified by primers P1 and P4 from recombinant virus, vFRT β -gal. Lane 4; the fragment amplified by primers p3 and p4 from recombinant virus, vFRT β -gal. Lane 5; the fragment amplified by primers T7 and P2 from recombinant virus, vFRT β -gal. Lane 6; the fragment amplified by primers P3 and P2 from recombinant virus, vFRT β -gal(lower panel B)

primer로 각각 조합하여 PCR하였다. 그 결과 (lane 3, 4) 545bp와 452bp로 추정되는 유전자가 증폭된 것으로 보아 다각체 단백질 유전자의 프로모터 하류에 FRT 및 β -galactosidase 유전자가 배열되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 pBluescript IISK+ 벡터 유래의 T7 primer 및 FRT 합성에 사용한 sense primer와 다각체 단백질 유전자 부분을 antisense primer로 조합하여 PCR한 경우(lane 5,6), 742bp와 692bp가 각각 증폭되었다. 이것은 pBluescript II SK⁺ 벡터의 T7 프로모터 하류에 FRT와 다각체 단백질 유전자가 차례로 배열되어 있는 것을 추정할 수 있었다.

이상의 결과에서 pFRT β -gal이 vFRTPH의 FRT 위치에 부위 특이적으로 재조합된 것을 확인할 수 있었으며, 또 삽입된 β -galactosidase 유전자는 다각체 유전자의 프로모터에 의해 전사조절되는 것으로 추정할 수 있었다.

Kilby 등(1993)과 Peakman(1992)은 recombinase에

의한 분자간 유전자 재조합은 single crossover로 일어나기 때문에 외래유전자의 크기에 관계없이 재조합이 일어난다는 보고로부터 본 연구에서 구축한 FLP/FRT 시스템은 기존의 상동 재조합의 single crossover된 바이러스의 선별 문제(O'Reilly *et al.*, 1992; Vialard *et al.*, 1990)없이 재조합 바이러스를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과로부터 본 연구에서 구축한 FLP/FRT 시스템은 BmNPV의 게놈에 삽입된 48bp의 FRT 위치에 FRT와 β -galactosidase 유전자를 포함하고 있는 전이벡터 DNA를 정확하게 재조합 시킴으로써 재조합 바이러스의 제작이 가능하였다. 더욱이 β -galactosidase 유전자가 발현된 8.7%는 모두 재조합 바이러스였다. 따라서 기존의 상동재조합에 의한 낮은 재조합 효율과 재조합 바이러스 선별의 문제점을 개선할 수 있는 것으로 생각된다. 또한 선별한 재조합 바이러스는 FLP recombinase에 의해 FRT사이의 외래유전자가 제거되는 역 반응(Kilby *et al.*, 1993; O'Gorman *et al.*, 1991)이 일어날 수 있는 것으로 추정되기 때문에 FRT 전이 벡터와 야생형 바이러스 DNA를 쉽게 회수할 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

곤충 Baculovirus의 유전자 재조합은 전이벡터와 야생형 바이러스간의 상동재조합으로 이루어지며, 반응 산물로부터 재조합 바이러스를 선별하는 데는 많은 노력과 시간이 소요되고 있다. 이와같은 상동재조합의 문제점을 개선하고자 본 연구에서는 yeast의 FLP/FRT 시스템을 재조합 BmNPV 제작 기술로 적용하기 위한 새로운 시스템을 구축하고 그 이용 가능성을 검토하였다.

FLP recombinase의 특이 인식부위인 FRT를 합성하고 이를 클로닝 벡터 및 야생형 BmNPV의 다각체 단백질 프로모터 하류에 삽입하여 pFRT β -gal 전이벡터와 vFRTPH 재조합 바이러스를 각각 제작하였다. 제작한 전이벡터, 야생형 바이러스 및 FLP recombinase 발현벡터를 곤충배양세포에 동시전이하고 선별한 부위특이적 재조합 바이러스, vFRT β -gal의 유전자의 구조를 PCR로 분석한 결과, 바이러스의 FRT 위치에 pFRT β -gal 전이벡터의 전체 DNA가 2개의 재조합 FRT 사이에 삽입되어 있었으며, β -galactosidase 유전자는 바이러스의 다각체 단백질 유전자 프로모터 하류에 위치하고 있었다. 또한, FLP/FRT 시스템의 부위특이적 재조합 효율은 8.7%로 상동재조합에 의한 2.2%보다 높았다.

인용문헌

- Choi, T. B. and N. Perrimon(1992) Use of a Yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics*. **131**:643~653.
- Golic, K. G. (1991) Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science*. **252**:958~961.
- Golic, K. G. and S. Lindquist(1989) The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *cell*. **59**:449~509.
- Hartley, J. L. and J. E. Donelson.(1980) Nucleotide sequence of the yeast plasmid. *Nature*. **286**:860~865.
- Huang, L. C., E. A. Wood and M. M. Cox.(1991) A bacterial model system for chromosomal targeting. *Nucleic Acids Res.* **19**:443~448.
- Iatrou, K., K. Ito and H. Witkiewicz.(1985) Polyhedrin gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* **54**:436~445.
- 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.
- Jung, S., K. Rajewsky and A. Radbruch(1993) Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science*. **259**:984~987.
- Kang, S. K., E. Y. Yun, S. H. Kim, K. Y. Kim, M. S. Han and S. K. Kang(1997) Expression of the FLP recombinase of the 2 μ m plasmid of yeast in the cultured cells of *Bombyx mori* using a transient expression vector. *Korean J. Seric. Sci.* **39**(1):36~43
- Kilby, N. J., M. R. Snaith and J. A. H. Murray(1993) Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* **9**:413~421.
- Kitts, P. A., M. D. Ayres and R. D. Possee(1990) Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids Res.* **18**:5667~5672.
- Kitts, P. A. and R. D. Possee(1993) A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques*. **14**:810~817.
- Kobayashi, J., S. Imanishi, H. Inoue, K. Ohsuye, K. Yamaichi, N. Tsuruoka and S. Tanaka (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.
- Lloyd, A. M. and R. W. Davis (1994) Functional expression of the Yeast FLP/FRT site-specific recombination system in *Nicotiana tabacum*. *Mol. Gen. Genet.* **242**:653~657.

- Luckow, V. A., S. C. Lee, G. F. Barry and P. O. Olins(1993) Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **67**:4566~4579.
- Lyznik, L. A., J. C. Mitchell, L. Hirayama and T. K. Hodges(1993) Activity of Yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts. *Nucleic Acids Res.* **21**:969~975.
- Maeda, S. (1989) Invertebrate cell system and applications. CRC press, Boca Raton, Fla., pp. 167~182
- Morris, A. C., T. L. Schaub and A. A. James(1991) FLP-mediated recombination in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Nucleic Acids Res.* **21**:5895~5900.
- O'Gorman, S., D. T. Fox and G. M. Wahl(1991) Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science.* **251**:1351~1355.
- O'Reilly, D. R., L. K. Miller and V. A. Luckow (1992) Baculovirus expression vectors-A laboratory manual. W. H. Freeman and Company, New York. pp 107~213.
- Pan, H., D. Clary and P. D. Sadowski(1991) Identification of the DNA-binding domain of the FLP recombinase. *J. Biol. Chem.* **266**:11347~11354.
- Patel, G., K. Nasmyth and N. Jones(1992) A new method for the isolation of recombinant baculovirus. *Nucleic Acids Res.* **20**:97~104.
- Peakman, T. C., R. Harris and D. R. Gewert(1992) Highly efficient generation of recombinant baculoviruses by enzymatically mediated site-specific *in vitro* recombination. *Nucleic Acids Res.* **20**:495~500.
- Pennock, M. D., C. Shoemaker and L. K. Miller(1984) Strong and regulated expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Mol. Cell. Biol.* **4**:399~406.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis(1989) Molecular cloning, A laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor, New York.
- Senecoff, J. F., R. C. Bruckner and M. M. Cox (1985) The FLP recombinase of the yeast 2- μ m plasmid:Characterization of its recombination site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**:7270~7274.
- Vega, M. A. (1995) Gene targeting. CRC press, Florida, pp. 11-16.
- Vialard, J., M. Lalumiere, T. Vernet, D. Briedis, G. Alkhatib, D. Henning, D. Levin and C. Richardson (1990) Synthesis of the membrane fusion and hemagglutinin proteins of measles virus, using a novel baculovirus vector containing the β -galactosidase gene. *J. Virol.* **64**:37~50.
- Zhu, X. D., G. Pan, K. Luetke and P. D. Sadowski (1995) Homology requirements for ligation and strand exchange by the FLP recombinase. *J. Biol. Chem.* **270**:11646~11653.