

최 종
연구 보고서

새로운 재조합 베쿨로바이러스를 이용한
환경보전형 미생물 살충제 개발
Development of Environment-Safe Microbial
Insecticide using Novel Recombinant Baculovirus

서울대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “새로운 재조합 벡칼로바이러스를 이용한 미생물 살충제 개발”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 14일

주관연구기관명 : 서울대학교
총괄연구책임자 : 제 연 호
연 구 원 : 심 희 진
연 구 원 : 최 재 영
연 구 원 : 이 명 순
연 구 원 : 박 지 현
연 구 원 : 박 수 진
연 구 원 : 정 규 석
연 구 원 : 왕 용
연 구 원 : 강 중 남
연 구 원 : 최 희 규
연 구 원 : 서 정 희
연 구 원 : 유 철 우
연 구 원 : 윤 태 엄
연 구 원 : 유 선 희

협동연구기관명 : 동아대학교

협동연구책임자 : 진 병 래

연 구 원 : 이 건 홍

연 구 원 : 이 광 식

연 구 원 : 변 경 민

연 구 원 : 위 아 동

연 구 원 : 추 영 무

연 구 원 : 노 위

협동연구기관명 : 동부농화학(주)

협동연구책임자 : 장 성 식

연 구 원 : 이 한 영

연 구 원 : 김 영 권

연 구 원 : 양 규 완

연 구 원 : 이 인 기

연 구 원 : 신 세 영

연 구 원 : 김 재 수

연 구 원 : 박 중 성

요 약 문

I. 제 목

새로운 재조합 베큘로바이러스를 이용한 환경보전형 미생물 살충제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

환경보전과 인류보건에 대한 사회저변의 인식이 확대되면서 유기합성농약 일변도의 방제 방식으로 인한 환경오염, 잔류독성 및 저항성 해충의 출현 등 부작용이 오늘날 심각한 사회문제로 대두되면서 그 해결방안을 모색하기 위하여 다방면에서 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이러한 연구의 일환으로서 해충의 종합적 관리 (Integrated Pest Management: IPM)라는 개념이 도입·부각되어 이에 적용 가능한 다양한 방법이 연구되고 있으며, 특히 곤충병원성 미생물을 이용한 무공해, 무저항성 살충제의 개발에 많은 노력이 집중되고 있다. 살충제로서 이용 가능한 곤충 병원성 미생물 중 베큘로바이러스는 곤충을 숙주로 하여 바이러스의 증식력에 의해 살충력을 가지기 때문에 척추동물에는 전혀 무해하고, 다각체라는 특이한 봉입체 형태로 존재하여 야외에서 장기간 활성을 유지할 수 있다는 장점으로 인하여 이를 이용한 십여 종의 살충제가 이미 개발되어 있다.

미생물 살충제로서의 뛰어난 유용성이 인정되는 베큘로바이러스는 다른 화학살충제나 *Bacillus thuringiensis* (Bt)를 이용한 미생물 살충제에 비해 한정된 숙주범위를 가지며 살충효과가 느리게 나타난다는 단점을 가지고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 베큘로바이러스 발현벡터 시스템 (Baculovirus expression vector system)을 이용하여 해충에 대한 독소 유전자가 발현되는 재조합 베큘로바이러스를 개발하려는 시도가 활발하게 진행되고 있다. 그 중, 최근

베컬로바이러스의 다각체가 곤충의 중장 내에서 알칼리 조건과 단백질 분해효소에 의해 분해된다는 점에 착안하여, polyhedrin에 Bt 독소단백질을 융합하여 다양한 Bt 독소가 함유된 다각체를 생산하는 재조합 베컬로바이러스를 제작함으로써 신속하면서도 우수한 살충력을 갖는 새로운 형태의 베컬로바이러스 살충제 개발 연구가 활발히 진행되고 있다.

한편, 유전자조작 생물(GMO)에 대한 우려가 생물농약 분야에서도 문제가 되어 유전자가 조작된 미생물이나 생물을 등록하기 위해서는 많은 시간과 경비가 소요된다. 이러한 GMO에 대한 문제해결을 위해 처리 후 일정 기간이 경과되면 재조합 베컬로바이러스 활성이 사라지고 야생주 베컬로바이러스로 되돌아감으로써 환경에 대한 위험성을 제거시키는 기술에 대한 연구가 절실히 요구되는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 Bt 내독소단백질, 곤충 및 거미 유래의 살충성 독소와 바이러스의 증식력을 모두 갖춘 재조합 베컬로바이러스의 제작뿐만 아니라 처리 후 일정시간이 지난 뒤에 야생주 베컬로바이러스로 변환되는 새로운 개념의 재조합 베컬로바이러스 살충제 개발을 목표로 하고 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

현재 국내에서 배추 및 파 등의 재배 농가에 심각한 피해를 주고 있는 배추좀나방과 파밤나방을 대상으로 환경에 안전하고 효과가 우수한 새로운 재조합 베컬로바이러스를 이용한 미생물 살충제를 개발하여 상업화 하는 것을 최종 목표로 하여, 새로운 Bt 내독소단백질 유전자와 곤충 및 거미 유래의 살충성 유전자를 확보하고, 이들 유전자의 발현 및 생물검정을 통하여 살충 효과가 우수한 살충성 유전자를 선발하였다. 이렇게 선발된 Bt 내독소단백질 및 살충성 독소를 동시에 발현하며 Bt 내독소 단백질의 재조합 다각체를 생산하는 새로운 재조합 베컬로바이러스를 제작하고 이의 분자생물학적 및 생화학적 특성을 구명하였으며, 재조합 베컬로바이러스의 계대 배양에 따른 야생주 바이러스로의 전환을

검정하였다.

또한, 새로운 재조합 베쿨로바이러스를 이용한 미생물 살충제의 개발을 위하여 곤충 생체 및 곤충 세포를 이용한 재조합 베쿨로바이러스의 대량생산 체계를 확립하였으며, 야외에서 적용 가능한 제형 개발 및 제제화 시험을 수행하였다. 재조합 베쿨로바이러스 제제의 야외 실증 시험과 안정성 검정을 통하여 농약등록 시험을 추진 중에 있다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- 본 연구를 통해 획득하는 새로운 개념의 재조합 베쿨로바이러스 개발 기술은 현재 밝혀지고 있는 새로운 Bt 내독소 단백질 유전자와 다른 베쿨로바이러스 등에도 접목이 가능한 기술로, 다양한 해충에 대한 미생물 살충제 개발에 활용할 수 있다.
- 순수 국내자원으로부터 분리한 생물과 Bt, 곤충·거미 유래 살충성 유전자는 이후의 실제 생산 및 산업화에 있어 제한이 되는 특허의 제약을 극복할 수 있으며, 아울러 다양한 균주 및 유전자의 특성 조사를 통하여 새로운 특허를 창출할 수 있다.
- 제제화가 완료된 재조합 베쿨로바이러스 살충제는 생물 농약으로의 등록시험을 추진하며 국내 기업을 통해 제품화 및 실용화가 가능할 것이다.

SUMMARY

To develop novel viral insecticides using recombinant baculovirus enabling environment-safe control of economic lepidopteran pests, novel crystal protein genes and recombinant crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* were screened. Crystal protein gene profiles of *B. thuringiensis* K1 and *B. thuringiensis* 2385-1 which were highly toxic to lepidopteran insects and predicted to contain various novel crystal protein genes were investigated using PCR-RFLP analysis. Five novel crystal protein genes were cloned from these two *B. thuringiensis* isolates, and their insecticidal activities were estimated using recombinant baculoviruses expressing corresponding novel crystal protein. All of five novel genes showed high toxicities against *Plutella xylostella* larvae. In addition, two genes, cry1-1 and cry1-5, showed high level of insecticidal activities against *Spodoptera exigua* larvae.

For the expression of recombinant crystal protein of Cry1Ac and Cry1C, recombinant baculovirus, ApPAC-F, expressing Cry1Ac-EGFP-Cry1C fusion protein were constructed. About 190 kDa of Cry1Ac-EGFP-Cry1C fusion protein expressed by ApPAC-F was occluded into the polyhedra produced by the recombinant virus, and activated as 65 kDa of crystal protein when treated with gut-juice of *Bombyx mori*. The insecticidal activity of ApPAC-F against *P. xylostella* larvae was about 1.7 fold higher than that of recombinant virus, Ap1Ac expressing Cry1Ac. Also, *S. exigua* larvae fed the recombinant polyhedra of ApPAC-F refused to consume the contaminated diets.

In order to develop recombinant baculovirus highly toxic to insect pests which were difficult to control and resistant to other insecticides by expressing insect-specific neurotoxin, recombinant viruses, ApAvT, ApPrT and ApAaIT,

expressing AvT, PrT and AaIT neurotoxin genes isolated from spider, firefly and scorpion, respectively, were constructed. When the insecticidal activities of these neurotoxin genes against *S. exigua* larvae were investigated using corresponding recombinant viruses, the AaIT showed the highest toxicity among three neurotoxin genes.

On the basis of above results, novel recombinant baculovirus, AcB5B-AaIT expressing Cry1-5 crystal protein as a fusion protein of polyhedrin-Cry1-5-polyhedrin under the control of polyhedrin gene promoter and AaIT under the control of early promoter of ORF305 from *Cotesia plutellae* bracovirus was constructed. About 150 kDa of polyhedrin-Cry1-5-polyhedrin fusion protein expressed by AcB5B-AaIT was occluded into the polyhedra produced by the recombinant virus, and activated as 65 kDa of crystal protein when treated with gut-juice of *Bombyx mori*. The AcB5B-AaIT showed about 50% reduced LT_{50} value compared to that of the recombinant virus, Ap1Ac, expressing Cry1Ac against *P. xylostella* larvae. In addition, *S. exigua* larvae fed the recombinant polyhedra of AcB5B-AaIT showed about 4 fold higher refusing diet effect compared *S. exigua* larvae fed the recombinant polyhedra of the recombinant virus, Ap1C, expressing Cry1C. These results suggested that the novel recombinant baculovirus, AcB5B-AaIT, could be applied as advanced viral insecticide overcoming major defects of wild-type baculoviruses such as narrow host range and slow pathogenicity.

AcB5B-AaIT could be transferred to wild-type baculovirus along with serial passage by the homologous recombination between two polyhedrin genes contained in polyhedrin-*cry1-5*-polyhedrin fusion protein gene. This character could make AcB5B-AaIT get out of the feasible problems as a genetically modified organisms.

The gene structure, expression and enzyme activity of a serine protease from

the firefly, *Pyrocoelia rufa* (PrSP) were examined. The *PrSP* gene spans 1,474 bp and consists of two introns and three exons coding for 257 amino acid residues. Southern blot analysis of genomic DNA suggested the presence of *PrSP* gene as a single copy. Western blot analysis and enzyme activity assay exhibited midgut-specific expression, suggesting that the midgut is the prime site where large quantities of PrSP are synthesized for degrading the absorbed protein from the diet. The cDNA encoding *PrSP* was expressed as a 31-kDa polypeptide in the baculovirus-infected insect Sf9 cells and the recombinant *PrSP* showed activity in the protease enzyme assay using gelatin as a substrate.

We describe here the cDNA sequence and mRNA expression of a novel venom lipase from the bumblebee, *Bombus ignitus*. The 954 bp cDNA encodes for 317 amino acid residues. The deduced protein of *B. ignitus* venom lipase gene (BiLP) contains the conserved catalytic site (GX SXG). Alignment of the deduced protein of *BiLP* showed high identity with insect lipase genes (*P. papatasi*, *C. pipiens*, *D. melanogaster*, *B. mori*, *P. annularis*, *A. aegypti*, and *A. stephensi* lipase genes). Northern blot analysis revealed that the *B. ignitus* *BiLP* mRNA expression was detected only in fat body. In addition, *B. ignitus* *BiLP* mRNA was expressed in both female and queen, but no expression was found in the male.

A venom protease gene (BiVP) was cloned from the bumblebee, *Bombus ignitus*. The *B. ignitus* *BiVP* cDNA contains an open reading frame of 1,080 bp encoding for 360 amino acid residues. The deduced amino acid sequence of the *B. ignitus* *BiVP* cDNA was closest in structure to *Apis mellifera* venom protease (61% protein sequence identity). *B. ignitus* BiVP possesses catalytic triad residues and 14 cysteine residues common to venom proteases. Northern blot analysis revealed that the *B. ignitus* *BiVP* mRNA expression was detected only in fat body. In addition, *B. ignitus* *BiVP* mRNA was expressed in both female

and queen, but no expression was found in the male.

We have cloned cDNAs encoding toxin from the spider, *Araneus ventricosus*, and constructed a recombinant baculovirus expressing the insecticidal toxin. The cDNAs encoding toxin were cloned from the cDNA library of *A. ventricosus*. Sequence analysis of the cDNAs encoding the toxin of *A. ventricosus* revealed that the 240 bp cDNA for AvTox1 and 192 bp cDNA for AvTox2 have an open reading frame of 80 and 64 amino acid residues, respectively. The deduced protein sequence of the toxin genes of AvTox1 and AvTox2 was aligned to that of the snake *Anemonia sulcata* and scorpion *Centruroides limpidus limpidus*, respectively.

Furthermore, we have explored the possibility of improving baculovirus by incorporating the *P. rufa* serine protease (PrSP) or *A. ventricosus* toxin genes (AvTox1 and AvTox2) into *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome under the control of polyhedrin promoter. To determine the toxicities of the three recombinant baculoviruses expressing PrSP, AvTox1 or AvTox2, toxicities of the recombinant baculoviruses were evaluated against fifth-instar armyworm larvae and compared with wild-type AcNPV. The improved insecticidal activities of the recombinant baculoviruses were demonstrated by reduction in LT₅₀ value. 1) The LT₅₀ value for recombinant baculovirus expressing PrSP was reduced to 130.72 hours compared with the wild-type AcNPV. 2) The LT₅₀ values for recombinant baculoviruses expressing AvTox1 and AvTox2 were significantly reduced to 124.53 and 125.72 hours compared with 143.02 hours in the wild-type AcNPV, potentializing the serine protease as an effective insecticide. In this study, we demonstrated that the recombinant baculoviruses expressing PrSP, AvTox1 or AvTox2 are more effective in killing of armyworms than the wild-type virus.

Mass production of recombinant baculovirus *in vitro* and *in vivo* system and

formulation of wettable powder (WP) and suspension concentrate (SC) were performed in this project.

In vitro systems, monolayer culture and suspension culture system was confirmed using *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) insect cell line. Especially to scale up of insect cell culture in 5L bioreactor, a paddle type impeller in current bioreactor was changed to marine type impeller to minimize a damage to insect cells and to maximize a flowing powder. High-Five cell line among 5 kind of insect cell lines showed the largest amount of productivity of recombinant fusion protein and recombinant polyhedra in monolayer and liquid culture. Using High-Five insect cell line optimum viral infection and cell culture condition were established in suspension culture. The artificial cell culture media for Sf-9 and High-Five cell lines were tested to reduce the production cost, but the stability of insect cells and productivity of polyhedra in the artificial media were not good.

In vivo system, third instars of *Spodoptera exigua* larva was used and optimum viral infection method was established. Viral inoculum was sprayed on the selected artificial diet I at 10^3 polyhedra/ml. *S. exigua* larva were maintained in large size plastic container (13×21×7 cm) at 25~27°C. Infected larva were harvested about 7 days after infection and washed and freeze-dried. *In vivo* system was more practicable and economical than *In vitro* system.

Using recombinant baculovirus technical powder WP and SC formulations were established. UV protectant, sodium ligno sulfate was selected and inserted into formulations. Physical properties of established WP formulation were good enough in wetting time (2' 30''), suspensibility (80% up), particle size (11.3 μm) and pH (6.7). Those of SC formulation were excellent in suspensibility (90% up), viscosity (190), particle size (8.3 μm) and pH (6.5). The WP formulation was stable at room temperature for 6 month and has being examined continuously. There was close correlation between stability of SC formulation and washing

process of harvested sludge. The SC formulation made by washed technical powder was stable at room temperature 6 month and has being examined.

Recombinant baculovirus, Bactrus WP and SC formulation showed about 80-90% efficacy against *S. exigua* and *Plutella xylostella* larva in the field. On the point of change to wild-type, expression level of fusion protein in Bactrus was decreased along serial passage. But the decrease of the fusion protein expression was smaller in Sf-9 cells infected with Bactrus passaged at 10 MOI than that passaged at 1 MOI. Also insecticidal activity of recombinant polyhedra produced by the Bactrus serial-passaged at 1 and 10 MOI against *P. xylostella* larvae was decreased along serial passage with similar trend to the result of fusion protein expression pattern.

Recombinant baculovirus, Bactrus WP and SC showed the decrease of insecticidal activity 10 days after spray in glass house. 2 or 3 times of application of product at an interval of 7-10 days is to be performed to control target pest properly.

CONTENTS

Chapter 1.	Introduction	17
Section 1.	Objectives and importance of research	17
Section 2.	Contents and scopes of research	21
Chapter 2.	Current status of domestic and foreign research	29
Section 1.	Current status of domestic research	29
Section 2.	Current status of foreign research	30
Section 3.	Future prospect of research	31
Chapter 3.	Contents and Results of research	33
Section 1.	Development of novel recombinant baculovirus	33
Section 2.	Cloning of insecticidal genes from insects · spider	74
Section 3.	Mass-production and formulation of novel recombinant baculovirus	125
Chapter 4.	Achievement of objectives and contribution to related areas	198
Section 1.	Objectives of research and points of evaluation	198
Section 2.	Achievement of objectives	200
Section 3.	Contribution to related areas	204
Chapter 5.	Application plan of research results	206
Chapter 6.	References	207

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	17
제 1 절	연구개발의 목적 및 중요성	17
1.	연구개발의 배경 및 목적	17
2.	연구개발의 필요성	18
가.	기술적 측면	18
나.	경제·산업적 측면	19
다.	사회·문화적 측면	20
제 2 절	연구개발의 내용 및 범위	21
1.	연구개발의 목표와 내용	21
2.	연차별 연구개발 목표와 내용	22
3.	연구추진 내용 및 계획	25
가.	연구추진 전략	25
나.	연구개발 내용	26
제 2 장	국내외 기술개발 현황	29
제 1 절	국내 기술현황	29
제 2 절	국외 기술현황	30
제 3 절	기술개발의 파급효과 및 금후의 전망	31
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	33
제 1 절	새로운 재조합 벡클로바이러스 개발	33
1.	재료 및 방법	33
가.	새로운 Bt 내독소단백질 유전자의 확보	33
나.	새로운 Bt 내독소단백질 재조합 유전자의 제작	35

다. 거미, 반딧불이 및 전갈 유래 살충성 유전자의 선발	43
라. 살충성 Bt 유전자와 신경 살충성 유전자를 발현하는 재조합 바이러스, AcB5B-AaIT의 제작	44
2. 결과 및 고찰	47
가. 새로운 Bt 내독소단백질 유전자의 확보	47
나. 새로운 Bt 내독소단백질 재조합 유전자의 제작	50
다. 거미, 반딧불이 및 전갈 유래 살충성 유전자의 선발	55
라. 살충성 Bt 유전자와 신경 살충성 유전자를 발현하는 재조합 바이러스, AcB5B-AaIT의 제작 및 특성 검정	59
3. 결론	71
제 2 절 곤충·거미 유래 살충성 유전자 선발	74
1. 재료 및 방법	74
가. 곤충(반딧불이 유충과 호박벌) 및 거미류 시료 채집	74
나. 늦반딧불이, 호박벌, 거미등의 cDNA 유전자은행 제작	74
다. cDNA 유전자은행 탐색을 통한 살충성 유전자 확보	75
라. 곤충유래 살충성 독소가 포함된 다각체를 생산하는 베쿨로바이러스 제작	76
마. 독소 유전자들의 특성 분석	78
바. 새로운 재조합 베쿨로바이러스의 목적해충에 대한 생물검정	81
사. 살충제로의 이용가능성 분석	81
2. 결과 및 고찰	82
가. 늦반딧불이, 호박벌, 거미등의 cDNA 유전자은행 제작	82
나. cDNA 유전자은행 탐색을 통한 살충성 유전자 확보	82
다. 곤충유래 살충성 독소가 포함된 다각체를 생산하는 베쿨로바이러스 제작	98
라. 독소 유전자들의 특성 분석	100

마. 재조합 벡콜로바이러스의 목적해충에 대한 생물검정 및 살충제로의 이용가능성 분석	115
3. 결론	123
제 3 절 새로운 재조합 벡콜로바이러스의 대량생산 체계 확립 및 제제화	125
1. 재료 및 방법	125
가. 곤충 세포를 이용한 재조합 벡콜로바이러스 대량생산 연구	125
나. 곤충 유충을 이용한 재조합 벡콜로바이러스 대량생산 연구	132
다. 실내조건에서의 재조합 벡콜로바이러스의 살충효과 검정	137
라. 제형화 연구	141
마. 최적화된 제제품의 야외조건에서의 실증연구	142
2. 결과 및 고찰	144
가. 곤충 세포를 이용한 재조합 벡콜로바이러스 대량생산 연구	144
나. 곤충 유충을 이용한 재조합 벡콜로바이러스 대량생산 연구	161
다. 실내조건에서의 재조합 벡콜로바이러스의 살충효과 검정	173
라. 제형화 연구	182
마. 최적화된 제제품의 야외조건에서의 실증연구	192
3. 결론	195
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	198
제 1 절 연구개발 목표와 평가의 착안점	198

1. 연구개발 목표	198
2. 연구평가의 착안점	198
제 2 절 연구개발목표의 달성도	200
1. 새로운 재조합 베쿨로바이러스 개발	200
2. 곤충·거미 유래 살충성 유전자 선발	201
3. 새로운 재조합 베쿨로바이러스의 대량생산 체계 확립 및 제제화	202
제 3 절 연구개발의 관련분야 기여도	204
1. 기술적 측면	204
2. 경제·산업적 측면	204
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	206
제 6 장 참고문헌	207

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 배경 및 목적

유기합성 농약의 획일적이고 무분별한 대량살포로 인하여 환경오염, 잔류독성 및 저항성 해충의 출현 등 심각한 사회문제가 대두되고 있는 현실이다. 이와 더불어 전 세계 유기합성 농약 시장은 현재 약 30조원에 달할 것으로 추산되고 있으며, 그 중 살충제는 약 8조 7,000억 원을 차지하고 매년 평균 5.4%의 매출 성장률을 나타냄으로서, 인류의 보건복지 및 환경보전을 위하여 유기합성 살충제를 대체할 수 있는 새로운 무공해 살충제 개발이 시급히 요청되고 있는 실정이다.

화학적 방제법의 보완 또는 해결책으로서 이미 미국을 비롯한 선진국에서는 수십종의 미생물 살충제가 연구·개발되어 시판되고 있으며, 우리나라에서는 10여개 농약회사들이 이들 미생물 살충제를 수입·시판하고 있고, 그 수입량 또한 계속 증가추세에 있다. 그러나 우리나라에서는 무공해 미생물 농약 분야에 대한 연구가 극히 부진한 실정이므로, 해충을 무공해 적으로 방제할 수 있는 미생물 살충제의 개발이 절실히 요청되고 있다.

곤충 바이러스 중 베쿨로바이러스는 척추동물에는 전혀 무해하고 다각체라는 특수 구조에 의해 활성을 장기간 유지하는 장점이 있어 환경친화형 생물농약으로 개발되어 있다. 그러나 베쿨로바이러스를 이용한 미생물 살충제는 여타 살충제에 비해 숙주 범위가 좁고 살충 효과가 느리게 나타난다는 단점으로 인하여 살충제로의 사용에 제한이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해, 베쿨로바이러스 발현벡터 시스템 (Baculovirus expression vector system)을 이용하여 해충에 대한

독성유전자를 발현하는 재조합바이러스를 개발하려는 시도가 활발하게 진행되고 있다. 최근 polyhedrin에 Bt 내독소단백질을 융합하여 다양한 Bt 내독소단백질이 함유된 다각체를 생산하는 재조합 베쿨로바이러스를 제작함으로써 신속하면서도 우수한 살충력을 갖는 새로운 형태의 베쿨로바이러스 살충제가 개발된 바 있다. 그러나 유전자조작 생물 (GMO)에 대한 우려가 생물농약 분야에서도 문제가 되어 유전자가 조작된 미생물이나 생물을 등록하기 위해서는 많은 시간과 경비가 소요된다.

현재까지 국내에서의 재조합 베쿨로바이러스를 이용한 미생물 살충제에 대한 연구는 기초 연구와 파생적인 제제화 연구까지 소규모적으로 이루어지고 있었으나, 이는 그 결과를 크게 기대할 수 없는 실정이므로 이에 대한 개발 및 산업화에 명확한 목표를 둔 집중적인 연구 투자가 필요하다. 이에 본 연구에서는 처리 후 일정 기간이 경과하면 도입된 살충성 유전자가 재조합에 의하여 탈락하여 야생주 바이러스로 되돌아감으로써 환경에 대한 위험성이 제거된 재조합 베쿨로바이러스를 제작하고, 이를 이용하여 새로운 미생물 살충제를 개발·등록 및 산업화 함을 그 목표로 하고 있다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 최근 환경보전형 지속농업 또는 환경친화형 농업을 위한 연구·기술 개발은 범세계적인 추세이다. 생물농약 개발 기술은 이러한 농업형태를 가능하게 하며, 이중 곤충병원 미생물을 이용한 미생물 살충제는 전체 생물농약 시장의 약 80%를 점유하고 있다. 또한 그 기술적 수준이 타 분야에 비해 우수하며 높은 경쟁력을 가지고 있어 새로운 미생물 살충제의 개발 가능성이 매우 높다.

- 베칼로바이러스 (baculovirus)는 곤충에 대해서는 강력한 살충력과 증식력을 가지며, 척추동물에는 전혀 무해하다. 베칼로바이러스는 다각체라는 특수한 구조에 의해 장기간 활성을 유지하는 장점이 있어 환경친화형 생물농약으로 개발되어지고 있다. 그러나 베칼로바이러스를 이용한 미생물 살충제는 다른 화학살충제나 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 같은 미생물을 이용한 살충제에 비해 숙주범위가 좁고 살충효과가 느린 단점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해, 최근에는 베칼로바이러스 발현 벡터 시스템 (Baculovirus expression vector system)을 이용하여 해충에 대한 독성 유전자를 발현하는 살충성 재조합 베칼로바이러스를 개발하려는 시도가 활발하게 진행되고 있다.
- 미생물 살충제 중에서 높은 살충 효과로 인해 널리 활용되고 있는 Bt는 토양 세균으로 다양한 살충성 유전자가 분리되고 있어 이를 이용한 재조합 베칼로바이러스 살충제를 개발함으로써 숙주범위가 확대되고 살충력이 강화된 새로운 살충제를 개발할 수 있다. 반딧불이, 호박벌, 거미 등으로부터도 새로운 살충성 유전자를 분리하여 Bt 내독소 단백질과 동시에 발현시키므로 살충효과가 증대된 재조합 베칼로바이러스를 개발할 수 있다.
- 최근 유전자조작 생물 (GMO)에 대한 우려가 생물농약 분야에도 문제가 되어 유전자 조작된 미생물이나 생물을 등록하기 위해서 많은 시간과 돈이 소요된다. 이러한 GMO에 대한 문제해결을 위해 재조합베칼로바이러스를 작물보호제로 생산하여 처리된 후 일정기간이 경과되면 자연상태에서 재조합 베칼로바이러스 활성이 사라지고 야생 베칼로바이러스로 돌아가게 되어 환경에 대한 위험성을 제거시키는 기술을 도입하고자 한다.

나. 경제·산업적 측면

- 2001년 말 현재 전 세계적으로 60여종의 미생물을 이용한 250여 가지 미생물

농약이 개발·유통되고 있으며, 시장규모도 1998년 이후 매년 10% 이상 성장, 2000년에는 전체 농약시장의 0.5%인 1억5,000만 달러 규모로 성장했으며 2010년에는 전 세계 농약시장의 6~7%를 차지할 것으로 예상된다.

- 2000년 국내 농약시장에서 미생물 농약은 77억 원의 매출실적을 나타냈고, 2010년에는 800억 원 정도로 시장이 확대될 것으로 전망되고 있다. 그러나 국내 생물농약 시장은 Thuricide나 Dipel 등과 같은 Bt 제제가 주요 미생물 살충제 제품이며, 이는 수입에 의존하고 있는 실정이다.
- 순수 국내자원으로부터 분리한 Bt, 반딧불이, 호박벌, 거미 등을 대상으로 하여 새로운 살충성 유전자를 분리하여 재조합 벡칼로바이러스를 만들고 처리 후 일정기간이 경과된 후 야생주 벡칼로바이러스로 전환되는 재조합 벡칼로바이러스 제제를 개발함으로써 국내 생물농약 산업에 있어 새로운 기술 및 특허를 창출할 수 있다.
- 국내 순수 기술로 이러한 생물농약을 개발하므로 현재 수입에 의존하는 생물농약 시장을 대체함으로써 많은 외화 유출도 줄일 수 있을 것으로 생각된다.

다. 사회·문화적 측면

- 살충력이 증가된 재조합 벡칼로바이러스가 개발되면 유기합성 농약의 오용과 남용에 의한 인축에의 독성, 수질과 토양에 대한 환경오염, 잔류독성 및 저항성 해충의 출현 등 각종 부작용들을 감소시킬 수 있을 것으로 예상된다.
- 국내에서도 난방제해충인 배추좀나방, 파밤나방 등의 방제를 위해 미생물 살충제인 Bt 제제를 수입하여 사용하고 있고, 국민들의 건강과 환경 보전 의식 제고로 인해 그 수요가 점점 확대될 것으로 예상된다.

- 재조합 벡콜로바이러스도 GMO의 일종으로 자연환경에 미치는 영향에 대한 우려를 본 연구 결과물인 재조합 벡콜로바이러스는 처리 후 일정기간 경과 후 야생주 벡콜로바이러스로 환원되므로 자연환경에 대한 영향을 불식시킬 수 있어 새로운 GMO 개발에 대한 이정표를 제시할 것이다.
- 앞으로 국내 농산물에 있어서 미생물 살충제 등과 같은 생물농약 사용에 의한 무공해 농산물의 생산은 수입 농산물과의 차별화를 통해 우리농산물 보호 및 소비 촉진을 유도할 수 있어 농가 경쟁력 확보에 필수적인 요소로 대두될 것이다.

제 2 절 연구개발의 내용 및 범위

1. 연구개발 목표와 내용

본 연구 연구개발의 최종목표는 환경에 안전하고, 효과가 우수한 새로운 개념의 재조합 벡콜로바이러스를 제작하고, 이를 이용한 새로운 개념의 미생물 살충제를 개발하여 상업화 하는 것이다. 이를 위하여 새로운 Bt 내독소단백질 유전자와 곤충·거미 유래 살충성 유전자를 확보 및 선별하고, 곤충·거미 유래 살충독소를 발현하며 Bt 내독소단백질의 재조합 다각체를 생산하는 재조합 벡콜로바이러스를 제작하여 그 특성을 조사하며, 새로운 재조합 벡콜로바이러스의 대량 생산, 제제화 및 실증 시험을 수행한다.

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2003)	새로운 Bt 내독소단백질 유전자와 재조합 유전자의 확보 및 선별	<ul style="list-style-type: none"> ○ 새로운 Bt 내독소단백질 유전자의 확보 및 재조합 유전자의 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 새로운 다수의 Bt 내독소단백질 유전자 분리 - <i>cryIAc</i>와 <i>cryIC</i> 유전자의 shuffling과 곤충 세포 내에서의 재조합을 통한 새로운 Bt 내독소단백질 유전자의 확보 ○ 각 유전자들의 발현과 생물검정을 통한 살충성 유전자 선별 <ul style="list-style-type: none"> - 재조합된 Bt 내독소단백질이 포함된 다각체를 생산하는 베쿨로바이러스 제작 - 배추좀나방, 과밤나방을 대상으로 한 살충성 검정 및 선별
	곤충·거미 유래 살충성 유전자의 확보 및 선별	<ul style="list-style-type: none"> ○ 곤충·거미 유래 살충성 유전자의 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 반딧불이, 거미, 호박벌 등의 cDNA library 제작 - cDNA library 탐색을 통한 살충성 유전자 확보 ○ 각 유전자들의 발현과 생물검정을 통한 살충성 유전자 선별 <ul style="list-style-type: none"> - 곤충 유래 살충성 독소가 포함된 다각체를 생산하는 베쿨로바이러스 제작 - 배추좀나방, 과밤나방을 대상으로 한 살충성 검정 및 선별
	재조합 베쿨로바이러스의 대량생산 기초연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대량배양 시스템 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 곤충 생체를 이용한 대량생산 연구 - 곤충 세포를 이용한 대량배양 연구 ○ Btrus를 이용한 대량생산 기초연구 <ul style="list-style-type: none"> - 기 제작된 재조합 베쿨로바이러스 (Btrus)를 이용한 대량생산 기초연구

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2004)	곤충·거미 살충 독소와 Bt 재조합 다각체를 생산하는 베쿨로바이러스 제작 및 특성	<ul style="list-style-type: none"> ○ Bt 내독소단백질 유전자와 곤충·거미 유래 살충성 유전자가 도입된 새로운 베쿨로바이러스의 제작 <ul style="list-style-type: none"> - Bt 재조합 다각체를 생산함과 동시에 곤충·거미 유래 살충성 독소를 발현하는 베쿨로바이러스 제작 ○ 새로운 재조합 베쿨로바이러스의 분자적, 생화학적 특성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 도입 유전자의 전사 및 발현 조사 - 베쿨로바이러스의 분자적, 생화학적 특성 조사 - 다각체 단백질 및 독소 단백질의 분자적, 생화학적 특성 조사
	곤충·거미 유래 살충성 유전자의 선별 및 재조합 베쿨로바이러스의 생물검정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 곤충·거미 유래 살충성 유전자의 선별 <ul style="list-style-type: none"> - cDNA library 탐색을 통한 살충성 유전자 확보 및 이 살충성 독소가 포함된 다각체를 생산하는 베쿨로바이러스의 살충성 검정 ○ 새로운 재조합 베쿨로바이러스의 목적 해충에 대한 생물검정 <ul style="list-style-type: none"> - 배추좀나방, 과밤나방을 대상 생물검정 - 살충제로의 이용가능성 분석
	새로운 재조합 베쿨로바이러스의 대량생산체계 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대량배양 조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 곤충 생체 대량배양체계 확립 - 곤충 세포를 이용한 대량배양체계 확립 ○ 베쿨로바이러스의 대량생산체계 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 대량생산에 적합한 배양조건 확립 ○ 제형 개발 기초연구

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2005)	새로운 재조합 베칼로바이러스의 대량생산 및 제제화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 새로운 재조합 베칼로바이러스의 대량생산 <ul style="list-style-type: none"> - 확립된 대량배양법 이용한 재조합 베칼로바이러스의 대량생산 - 원재 확보 ○ 제제 기술의 개발 및 제제화 <ul style="list-style-type: none"> - 최적 제제처방 선발 및 제제 기술 개발 - 제제화
	새로운 재조합 베칼로바이러스 제제의 실증 시험	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제제의 실내 실증 시험 <ul style="list-style-type: none"> - 각 제형의 제제를 대상으로 한 실내 생물 검정 ○ 제제의 야외 실증 시험 <ul style="list-style-type: none"> - 야외 포장을 대상으로 한 제제의 생물 검정 및 역가 평가
	새로운 재조합 베칼로바이러스 안정성 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 새로운 재조합 베칼로바이러스의 사용 후 야생주로 전환 검정 <ul style="list-style-type: none"> - Homologous recombination 현상을 이용하여 야생주 베칼로바이러스로 전환 ○ 제제의 생물적 안정성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 제제화로 인한 베칼로바이러스의 안정성 여부 조사 ○ 야외환경에서의 안정성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 야외환경에서의 물리·화학적인 조건에 대한 제제의 안정성 검정
	새로운 재조합 베칼로바이러스 농약등록	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제제의 농약등록 <ul style="list-style-type: none"> - 농약등록 시험 1년차 신청

3. 연구추진 내용 및 계획

가. 연구추진 전략

- 본 과제의 대상해충인 배추좀나방과 파밤나방은 배추 및 파 등의 재배 농가에 심각한 피해를 주고 있으며 기존의 방제방법으로 유기합성농약의 사용이 주를 이루고 있다.
- 특히 배추좀나방의 경우 Bt 살충제에 대한 저항성유발이 빠른 것으로 기존에 보고되어 있으며, 파밤나방의 경우는 기존의 유기합성 농약으로도 그 방제 효율이 매우 떨어지는 것으로 알려져 있다.
- 새로운 환경친화적 재조합 베쿨로바이러스 살충제는 기존의 Bt 살충제와 베쿨로바이러스 살충제뿐만 아니라 이들과는 다른 기작을 갖는 곤충·거미 유래 살충성 독소를 발현하는 기술로 난방제 해충 및 저항성 해충에 대하여 살충효과가 뛰어난 새로운 개념의 미생물살충제라 할 수 있다.
- 본 과제를 수행하기 위해서는 새로운 Bt 내독소단백질 유전자의 선발, 곤충·거미 유래 살충성 유전자의 선발, 재조합 베쿨로바이러스의 제작기술 및 재조합 베쿨로바이러스의 대량배양 및 제제화기술 등의 곤충병리·분자생물학 분야와 기존의 기업이 보유하고 있는 대량배양기술 및 제제화 기술 분야의 접목이 유기적으로 추진되어야 한다.
- 서울대학교 곤충미생물공학 연구팀은 그 동안 국내자원으로부터 600여개 이상의 Bt 균주를 분리하였으며 목적 해충에 특이적인 균주들을 다수 확보하고 있다.
- 동아대학교 생명자원과학부 곤충병리학 연구팀은 이미 버섯파리의 방제를 위한

환경친화적 방제제 개발 수행한 경험을 가지고 있으며, 현재는 국내의 다양한 곤충자원을 대상으로 cDNA library의 제작 및 탐색을 이용한 유용유전자 확보에 대한 연구를 진행하고 있다.

- (주)동부한농화학은 농업기술연구소는 Bt 살충제를 비롯하여 미생물 살균제등의 개발 및 대량배양 기술 개발 및 제제화 연구를 수행한 경험을 가지고 있다.
- 이상에서와 같이 본 과제에 참여하는 주관기관 및 협동기관들은 기존의 공동연구를 통해 환경보전형 미생물 살충제 개발에 대한 다양한 Know-how를 확보하고 있어 협동 연구를 통해 본 연구개발 목표를 성공적으로 달성하고자 한다.

나. 연구개발 내용

- 1) 새로운 살충성 Bt 내독소단백질 유전자와 재조합 유전자의 확보
 - 다수의 Bt 균주를 대상으로 유전자를 분리하고, 유전자의 염기서열 분석을 통하여 신규가능성이 있는 유전자를 확보한다.
 - Bt 내독소단백질 유전자, *cryIAC*와 *cryIC* 유전자를 융합한 후 곤충 세포 내에서 homologous recombination에 의해 자연적인 shuffling이 일어나도록 하여 새로운 재조합 유전자를 제작한다.
- 2) 곤충·거미 유래 살충성 유전자의 확보
 - 반딧불이, 호박벌, 거미 등의 mRNA를 분리하고 그로부터 cDNA library를 제작한다. 각각의 cDNA library로부터 유용 유전자를 탐색하여 새로운 살충성 유전자들을 확보한다.
- 3) 각 살충성 유전자를 도입한 재조합 벡로바이러스의 제작 및 발현

- polyhedrin 유전자 프로모터의 조절 하에 Bt 내독소단백질 유전자들과 곤충·거미 유래 살충성 유전자들을 polyhedrin과 융합한 전이백터를 제작하고 이를 베컬로바이러스 DNA (bApGOZA)와 co-transfection하여 재조합 다각체를 생산하는 베컬로바이러스를 선발한다.
- 4) 재조합 베컬로바이러스의 생물검정을 통한 살충성 유전자 선발
- 배추좀나방, 파밤나방을 대상으로 하여 각 재조합 베컬로바이러스의 살충성 검정을 통하여 가장 강력한 Bt 내독소단백질 유전자와 곤충·거미 유래 살충성 유전자를 각각 선발한다.
- 5) 곤충·거미 유래 살충성 독소를 발현하며 Bt 재조합 다각체를 생산하는 재조합 베컬로바이러스의 제작
- Bt 내독소단백질은 polyhedrin 유전자 프로모터의 조절 하에 두개의 polyhedrin 사이에 융합발현 되어 Bt 재조합 다각체를 생산하며, 곤충·거미 유래 살충성 유전자는 p10 프로모터의 조절 하에 동시에 발현되는 재조합 베컬로바이러스를 제작한다.
- 6) 새로운 재조합 베컬로바이러스의 분자적, 생화학적 특성 조사
- 베컬로바이러스에서 도입 유전자의 전사여부를 mRNA를 이용한 Northern blot 분석 등의 방법을 통하여 조사한다..
 - 재조합 다각체의 내·외부 구조의 관찰은 TEM과 SEM을 이용하며 면역학적 관찰은 immunogold labelling 방법으로 Bt 내독소단백질 항체 및 polyhedrin 항체를 결합하여 TEM으로 관찰한다. 살충성 독소단백질은 *in situ* hybridization 등의 방법을 통하여 곤충세포내의 발현양상을 조사한다.
- 7) 새로운 재조합 베컬로바이러스의 살충효과 검정
- 목적해충인 배추좀나방 3령 유충과 파밤나방 2령 유충을 대상으로 농도를

다르게 3회 반복 생물검정을 실시하여 50% 살충값 (LD₅₀) 과 50% 살충시간 (LT₅₀)을 측정한다.

8) 새로운 재조합 베쿨로바이러스의 사용 후 야생주로 전환 검정

- 두 개의 polyhedrin 유전자 사이의 homologous recombination 현상에 의한 재조합 베쿨로바이러스의 계대 배양에 따른 야생주 베쿨로바이러스로 전환을 검정한다.

9) 재조합 베쿨로바이러스의 대량생산 기초 연구 및 체계 확립

- 곤충 생체 및 곤충 세포를 이용한 배양을 연구하며, 재조합 베쿨로바이러스를 대상으로 대량생산을 위 배양조건, 배양수율 등을 측정한다.
- 새로운 재조합 베쿨로바이러스의 대량생산을 위한 체계를 확립하고 대량생산을 통해 제제화를 위한 원제를 확보한다.

10) 재조합 베쿨로바이러스의 제제기술 개발 및 제제화

- 여러 가지 제제 (수화제, 과립수화제 및 액상 수화제 등) 검토를 통하여 최적의 제형을 선발하여 베쿨로바이러스의 상업화 제형을 확립한다.

11) 재조합 베쿨로바이러스 제제의 실증시험 및 안정성 검정

- 각 제형의 제제를 대상으로 한 실내 및 야외 실증시험을 통하여 베쿨로바이러스 제제의 실제 야외 적용 시 방제가를 적정한 수준으로 얻을 수 있는지 검토한다.
- 베쿨로바이러스 제제의 제제화로 인한 안정성 여부 및 환경조건에서의 안정성을 검정한다.

12) 새로운 재조합 베쿨로바이러스 제제의 농약등록 시험 추진

- 제제의 시험결과를 바탕으로 농약등록 시험을 추진하여 상업화를 추진한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술현황

- Bt 제의 사용에 있어서 내독소단백질에 저항성을 보이는 해충들이 보고되고 있다. 이미 야외에서의 배추좀나방 저항성 균이 출현하는 것으로 나타났고, 특히 담배나방에 있어서 적은 양의 Bt 내독소단백질의 사용도 저항성을 유발시키는 것으로 알려져 있다.
- 이러한 저항성을 지연시키거나 억제하려는 시도와 연구는 내독소 단백질 유전자의 복합 이용, 그리고 새로운 내독소 단백질의 탐색과 분리 등의 방법 등 다각적으로 이루어지고 있다.
- 서울대학교 곤충병리·유전공학 연구실에서는 polyhedrin에 Bt 내독소단백질을 융합하여 Bt 내독소 다각체를 생산하는 재조합 베쿨로바이러스 (Btrus)를 제작함으로써 기존의 단점을 극복한 속효성이면서 우수한 살충력을 갖는 새로운 형태의 베쿨로바이러스를 개발하였다.
- 현재 이 기술은 서울대와 (주)동부한농화학이 함께 국내 특허는 물론 미국 (US patent No. 6,338,846), 중국 (No. CN 1161458C) 및 일본 (No. 3790100) 특허 등록을 완료하였으며, EU를 비롯한 세계 19개국 (영국, 프랑스, 호주, 멕시코 등)에 국제 특허 (PCT/KR98/00338)를 출원, 등록이 진행 중에 있다.
- 특히 이 기술은 바이러스 내에 존재하는 동일 다각체 유전자의 Homologous Recombination 현상을 이용하여 야생 베쿨로바이러스로 전환시킬 수 있기 때문에

실제 야외 적용 시, 자연 생태계 내에서 재조합의 위험으로부터 안정성을 확보 할 수 있다.

- 또한 본 연구실은 국내 토양에서 분리한 600여 종의 다양한 Bt 균주를 확보하고 있으며, 이들로부터 새로운 내독소단백질 유전자를 분리하고 그 특성에 대한 연구를 진행 중에 있다.
- 동아대학교 생명자원과학대학에서는 반딧불이, 거미 등으로부터 살충성 유전자를 분리한 바 있으며, 다수의 곤충에 대한 cDNA library를 제작, 이로부터 유용 유전자를 선별하여 그에 대한 특성조사를 수행하고 있다.
- 동부한농화학(주)은 서울대와의 협력 하에 2001년부터 재조합 베쿨로바이러스의 개발연구를 수행해 오고 있으며, 이들의 대량 생산을 위한 연구와 제형개발을 집중적으로 진행하고자한다.

제 2 절 국외 기술현황

- 본 연구에서 사용하는 베쿨로바이러스는 다각체라는 구조를 가지고 있어서 환경의 영향에 안정한 장점을 가지고 있으나 살충효과가 느리고 숙주범위가 좁은 단점을 가지고 있다.
- 이러한 문제를 극복하기 위해 곤충에 독성을 갖는 단백질 유전자를 도입하는 연구가 활발히 진행되고 있다.
- 최근 전갈 독소유전자, mite 독소유전자, 거미 독소유전자, Bt 독소유전자,

이노호르몬 유전자, 유약호르몬 esterase 유전자, ecdysteroid UDP-glycosyltransferase 유전자 등 많은 유전자들이 polyhedrin 유전자 프로모터의 조절 하에 삽입된 재조합 베컬로바이러스들이 보고되었다.

- 그 중 전갈과 mite 독소유전자가 도입된 재조합 베컬로바이러스는 실질적으로 높은 살충력을 보였으며, 특히 전갈유전자가 도입된 재조합 베컬로바이러스의 경우 농약등록을 위한 야외실증시험이 실시되었고 그 안정성 또한 검증되었다.
- 그러나 전갈과 mite 독소유전자가 도입된 재조합 베컬로바이러스도 여전히 지효성의 문제를 가지고 있었다.

제 3 절 기술개발의 파급효과 및 금후의 전망

- 외국에서 상품화되어 있는 미생물 살충제를 수입하여 시판하고 있는 것이 국내 여건으로 볼 때 새로운 미생물 살충제의 국내 개발이 시급한 실정이다.
- 또한 이는 수입 대체효과와 무공해 농산물 생산에 따른 경쟁력 확보로 농가소득 증대와 안정적인 농업 기반 조성에도 크게 기여할 것이다.
- Bt와 호박벌, 반딧불이 같은 곤충과 거미로부터 확보한 살충성 유전자는 새로운 미생물 살충제 개발의 재료로 이용될 수 있으며, 또한 Bt 균주로부터 새로운 유전자를 확보하므로 새로운 미생물살충제의 원재로도 이용될 수 있을 것이다.
- 야외에서 안정한 다각체 구조에 Bt의 내독소 단백질을 융합시키고, 베컬로바이러스가 증식함에 따라 다른 살충성 유전자를 발현하도록 하는 기술

개발이 가능할 것이다.

- 또한 재조합된 벡쿨러바이러스가 처리 후 일정기간이 경과된 후 야생주 벡쿨로바이러스로 환원시킬 수 있는 기술은 GMO 등록상의 문제점을 해결할 수 있는 대안으로, 향후 더 나은 살충성 독소를 확보하여 더욱 향상된 재조합 미생물 살충제를 개발이 가능할 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 새로운 재조합 베쿨로바이러스 개발

1. 재료 및 방법

가. 새로운 Bt 내독소단백질 유전자의 확보

1) 새로운 유전자의 탐색

새로운 Bt 살충성 단백질 유전자를 탐색하기 위하여, 나비목 해충에 높은 살충성을 보이는 동시에, 예비실험을 통하여 새로운 유전자를 다수 포함하고 있을 것으로 예상되는 Bt K1 균주와 Bt 2385-1 균주의 plasmid DNA를 각각 분리하였다. 두 균주로부터 새로운 유전자의 toxic region 약 2.4 kb fragment를 얻기 위하여 대부분의 Bt *cryI*-type의 toxic fragment를 detection할 수 있는 primer set (ATG1-F와 N400-R)를 제작하고 분리된 각각의 plasmid DNA를 template로 하여 PCR을 수행하였다 (표 1). 증폭된 산물을 pGEM-T Easy vector에 클로닝하고, 얻은 클론들은 RFLP와 염기서열 분석을 통하여 신규성을 확인하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers used to amplify crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* and neurotoxin genes

Primer name	Sequence ¹⁾
ATG1-F	5'ATGCAATGCGTACCTTACAATTGTTTAAGTAAT3'
N400-R	5'CATCGATTTCGGTTCACCGCACCTTCC3'
XhoI-ATG1-F	5' <u>CCCTCGAGATGCAATGCGTACCTT</u> AC3'
BglIIN400-R	5' <u>CCAGATCTCCATCGATTTCGGTTCACCGC</u> 3'
AvT-FXh	5' <u>AAACTCGGAGATGGCACTTGC</u> ACTGCTG3'
AvT-RNt	5'AAAAGCGGCCGCTCAAGAAGGTTTTACGCATAC3'
PrT-FXh	5' <u>AAACTCGAGATGAAA</u> ACTCTGCTGATTAAAGAC3'
PrT-RNt	5'AAAAGCGGCCGCTCACGAGTTACACTTATC3'
AaT-FXh	5' <u>AAACTCGAGATGA</u> AGATACTCCTTGCTATTG3'
AaT-RNt	5'AAAAGCGGCCGCTTAGTTGATGATAGTGTC3'

¹⁾ Restriction endonuclease sites used to clone the amplified fragment was underlined.

2) 새로운 살충성 유전자 발현 및 기능 분석

새로운 *cryI*-type 유전자의 나비목 곤충에 대한 활성을 알아보기 위하여 클로닝한 유전자들을 BEVS에 적용하여 발현시켰다. 각 유전자들을 포함한 재조합 바이러스를 제작하여 배추좀나방 3령 유충과 과밤나방 1령 유충에 대한 살충력을 확인하였다. 다각체의 단백질을 2,000 ng/ml부터 일련으로 희석한 다음 4 cm² 크기의 배춧잎에 도말하여 건조시킨 후, 과밤나방 유충 12마리에

섭식시켰으며 각 농도별로 3 반복하였다. 12시간 마다 사충의 수를 조사하였으며 4일 동안 관찰하였다.

나. 새로운 Bt 내독소단백질 재조합 유전자의 제작

1) Transfer vector 제작

EGFP 유전자는 EGFP-FXh와 EGFP-RBg primer를 사용하여 pEGFP (Promega, USA)로부터 증폭하였다. 증폭산물은 pGEM-T easy vector에 cloning한 후 (pGT-F), *Sac*II와 *Not* I 을 처리하여 EGFP 유전자를 덜어내어 다시 pGEM-5Zf(-)에 cloning하였다 (pGEM-F). 1Ac-FSc/SI과 1Ac-RXh primer를 사용하여 Bt HD73 strain의 Cry1Ac 유전자가 cloning되어 있는 pProAc로부터 Cry1Ac N-말단 유전자를 증폭한 후 *Sac*II와 *Xho* I 을 처리하여 같은 효소로 처리한 pGEM-F에 cloning하였다 (pGEM-AF). 한편 Cry1Ca N-말단 유전자는 1C-FBH와 1C-RNt primer를 사용하여 Bt HD133 strain의 Cry1Ca 유전자가 들어 있는 pBacPHcry1C로부터 증폭하였다. 증폭 산물은 *Bam*HI 과 *Not* I 을 처리한 후 *Bgl*II와 *Not* I 을 처리한 pGEM-AF에 cloning하였다 (pGEM-AFC). pGEM-AFC로부터 *Sal* I 과 *Not* I 을 처리하여 얻은 DNA 단편을 *Xho* I 과 *Not* I 을 처리한 pOB I vector에 clonig하여, 베칼로바이러스 AcNPV polyhedrin 유전자 뒤에 Cry1Ac, EGFP, Cry1Ca 유전자 순으로 존재하는 transfer vector pBacPAC-F를 제작하였다 (표 2, 그림 1).

Table 2. Oligonucleotide primers used to amplify crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* and EGFP gene

Primer name	Sequence ¹⁾
EGFP-FXh	5'AACTCGAGATGGT <u>GAGCAAGGGCGAG</u> 3'
EGFP-RBg	5'AAAAGATCTCTTGTACAGCTCGTCCAT3'
1Ac-FSc/Sl	5'AAACCGCGGGT <u>CGACATGGATAACAATCCGAAC</u> 3'
1Ac-RXh	5'AACTCGAGTGTGTCAGTAACTGGAAT3'
1C-FBH	5'AAGGATCCATGGAGGAAAATAATCAA3'
1C-RNt	5'AAAAGCGGCCG <u>CAGTAAACAGGGCATT</u> CAC3'
1C-FSl	5'AAAGTCGACATGGAGGAAAATAATCAA3'
1Ac-FBH/G	5'AAGGATCCGATGGATAACAATCCGAACATC3'
1C-FBH/G	5'AAGGATCCGATGGAGGAAAATAATCAA3'
1C-RSl	5'AAAGTCGACAGTAAACAGGGCATTCAC3'
1Ac-FSl	5'AAAGTCGACATGGATAACAATCCGAAC3'
1Ac-RNt	5'AAAAGCGGCCGCTGTTGCAGTAACTGGAAT3'
EGFP-FSl	5'AAAGTCGACGCGCAACGCAATTAATG3'
EGFP-RSl	5'AAAGTCGACTTACTTGTACAGCTGGTC3'

¹⁾ Restriction endonuclease sites used to clone the amplified fragment was underlined.

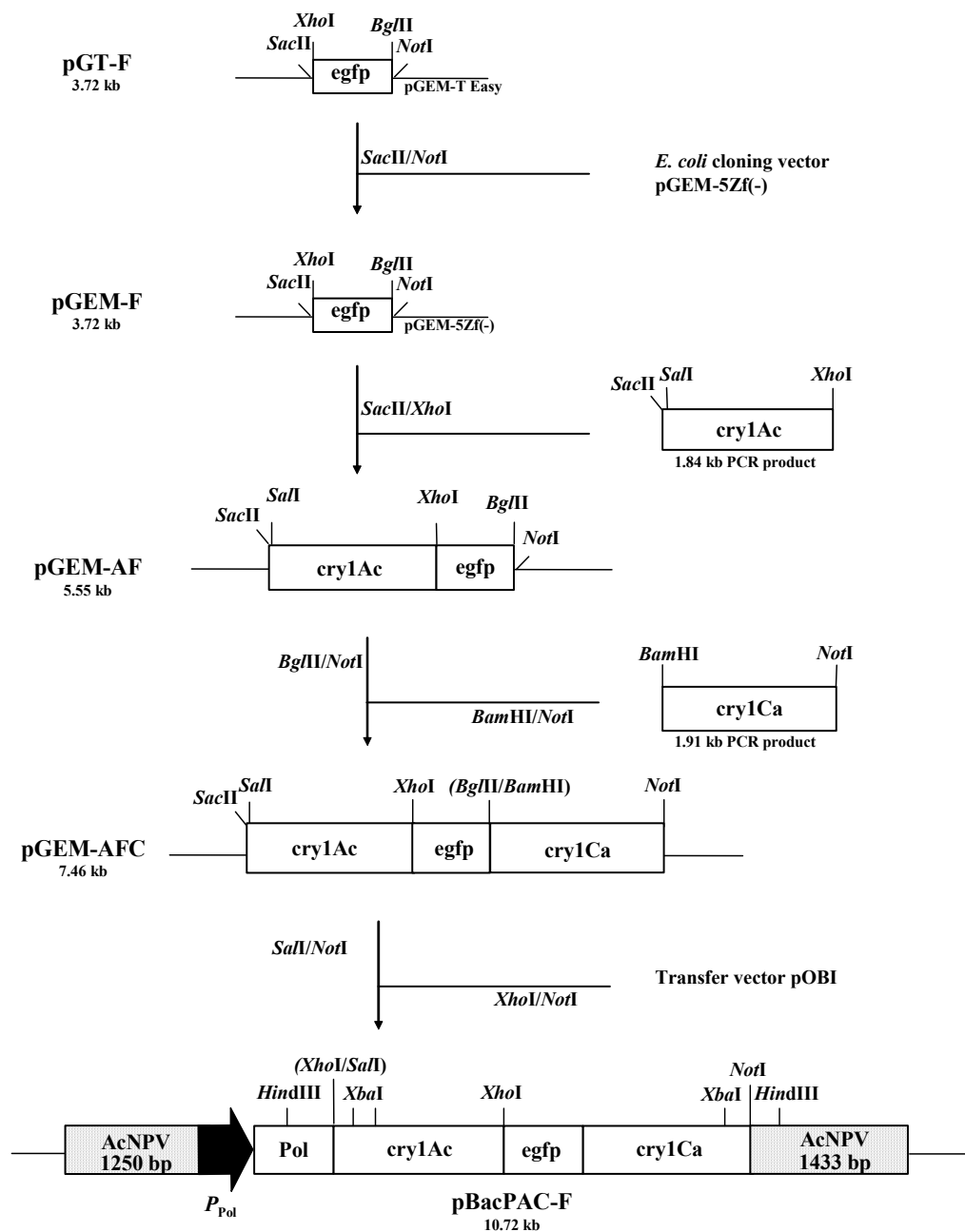


Fig. 1. Construction map of the transfer vector, pBacPAC-F.

2) 재조합 바이러스의 생산

재조합 바이러스의 생산을 위해서 모바이러스로 bApGOZA를 사용하였다. bApGOZA의 DNA는 polyhedrin 위치에 MiniF 유전자와 카나마이신 저항성 유전자가 대신하고 있어서 카나마이신 존재 하에 대장균 내에서 복제가 가능한 AcNPV 유래 DNA이며, 필수 유전자인 ORF1629 유전자가 부분 결손 되어 있어서 Sf9 세포에서 transfer vector와 co-transfection된 재조합 바이러스만이 증식할 수 있도록 제작된 DNA이다. 또한 p10 유전자 promoter의 조절 하에 polyhedrin이 발현되므로 Sf9 세포 내에서 다각체를 형성할 수 있다. Transfer vector, pBacPAC-F와 bApGOZA DNA를 LIPOFECTIN과 함께 co-transfectin한 후 plaque assay를 통해 순수 분리하고 PCR과 형광현미경 관찰을 통해 재조합 여부를 확인하였다 (그림 2).

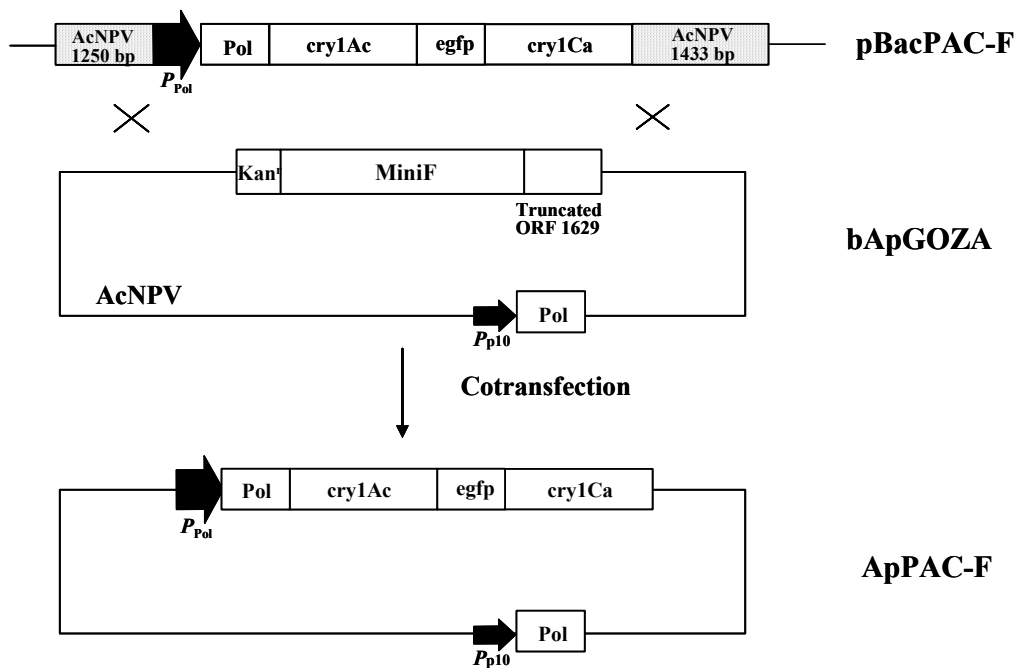


Fig. 2. Generation of the recombinant baculovirus, ApPAC-F.

3) 재조합 바이러스 다각체의 단백질 전기영동 분석 (SDS-PAGE)

Sf9 세포에서 증식한 베쿨로바이러스 다각체를 수거하여 0.5% SDS와 0.5 mM NaCl 용액을 사용하여 다각체를 정제하고 Laemmli (1970)의 방법으로 전기영동을 수행하였다. 정제된 다각체에 5× sample buffer를 섞은 다음 100°C에서 5분 동안 가열한 후 10% polyacrylamide gel에서 전기영동을 수행하였다.

4) 발현된 내독소 단백질의 activation 분석

다각체에 소량의 누에 소화액을 처리하고 위의 SDS-PAGE 방법을 통해, 발현된 내독소 단백질의 activation 여부를 분석하였다. 대조구로서 AcNPV와 Cry1Ac만을 발현하는 재조합 바이러스 Ap1Ac의 다각체를 사용하였다.

5) 재조합 바이러스의 병원성 검정

가) 배추좀나방에 대한 병원성 검정

다각체 현탁액을 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 , 1×10^7 PIBs/ml (DW, 0.01% Triton X-100)의 농도로 준비하고, 3.14 cm² 크기의 배추잎에 도말하여 말린 후, 배추좀나방 3령 유충 12마리에 섭식시켰으며 각 농도별로 4 반복하였다. 12시간 마다 사충의 수를 조사하였으며 72시간 동안 관찰하였다.

나) 과밤나방의 섭식 거부 측정

다각체 현탁액을 2×10^7 PIBs/ml (DW, 0.01% Triton X-100)의 농도로 준비하고, 3.49 cm²의 배추잎에 도말하고 과밤나방 1령 충 20마리를 섭식시켜 (3반복) 48 시간 후에 Leaf area meter CI-202 (CID, USA)로 잎 면적을 측정하였다.

6) 대장균 발현 벡터의 제작

1C-FSI과 1C-RNt primer를 사용하여 pBacPHcry1C로부터 Cry1Ca N-말단 유전자를 증폭한 후 *Sal* I 과 *Not* I 을 처리하여 같은 효소로 처리한 pET-41b(+)에 cloning하였다 (pET-1Ca/SI). Cry1Ac N-말단 유전자는 1Ac-FBH/G와 1Ac-RSI primer를 사용하여 pProAc로부터 증폭하였다. 증폭 산물은 각각 *Bam*H I 과 *Sal* I 을 처리한 후 같은 효소를 처리한 pET-1Ca/SI에 cloning하였다 (pET-AC). *lac* promoter가 포함된 EGFP 유전자는 EGFP-FSI과 EGFP-RSI primer를 사용하여 증폭하고 *Sal* I 을 처리한 후 같은 효소로 처리한 pET-AC에 cloning하여 pET-AFC를 제작하였다. (그림 3).

발현 벡터 pET-CFA의 제작은 다음과 같다. 1C-FBH/G와 1C-RSI primer를 사용하여 pBacPHcry1C로부터 Cry1Ca N-말단 유전자를 증폭한 후 *Bam*H I 과 *Sal* I 을 처리하여 같은 효소로 처리한 pET-41b(+)에 cloning하였다 (pET-1Ca/BH). Cry1Ac N-말단 유전자는 1Ac-FSI과 1Ac-RNt primer를 사용하여 pProAc로부터 증폭하였다. 증폭 산물은 각각 *Bam*H I 과 *Sal* I 을 처리한 후 같은 효소를 처리한 pET-1Ca/BH에 cloning하였다 (pET-CA). EGFP 유전자는 EGFP-FSI과 EGFP-RSI primer를 사용하여 *lac* promoter가 포함된 상태로 증폭하고 *Sal* I 을 처리한 후 같은 효소로 처리한 pET-CA에 cloning하여 pET-CFA를 제작하였다 (그림 4).

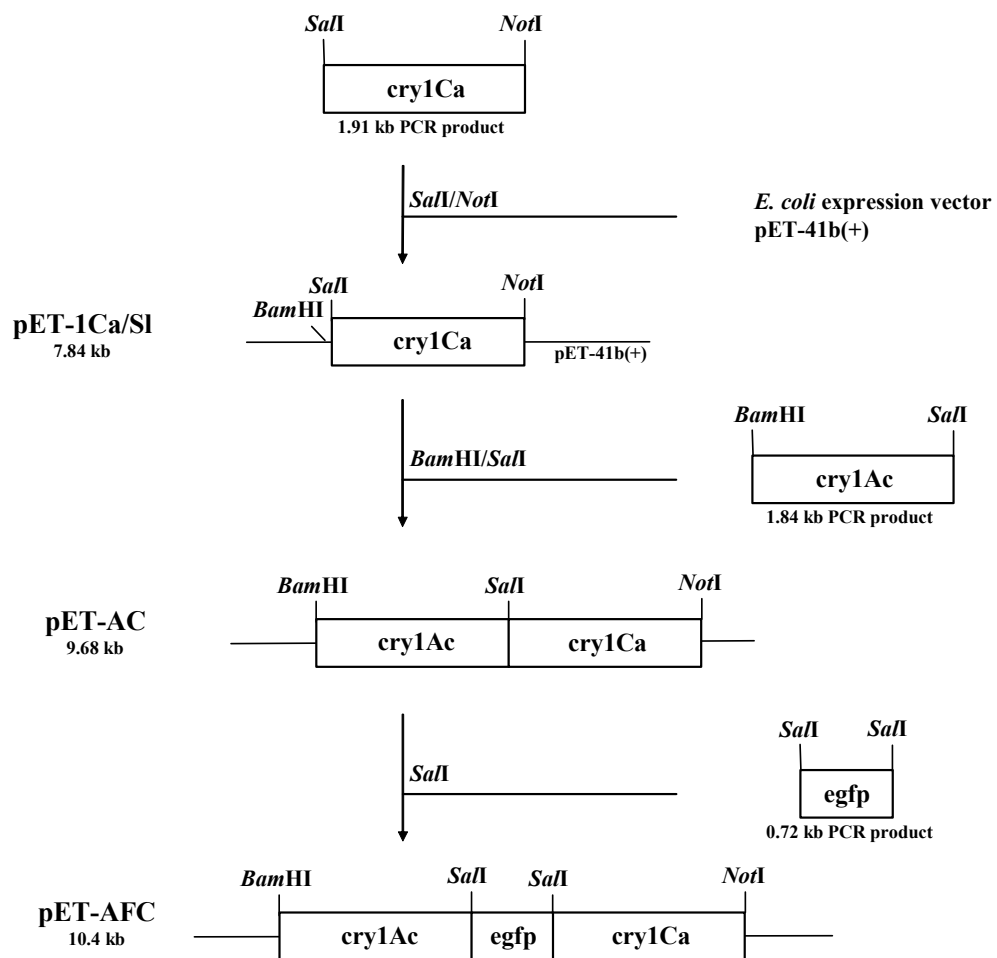


Fig. 3. Construction map of the *Escherichia coli* expression vector, pET-AFC.

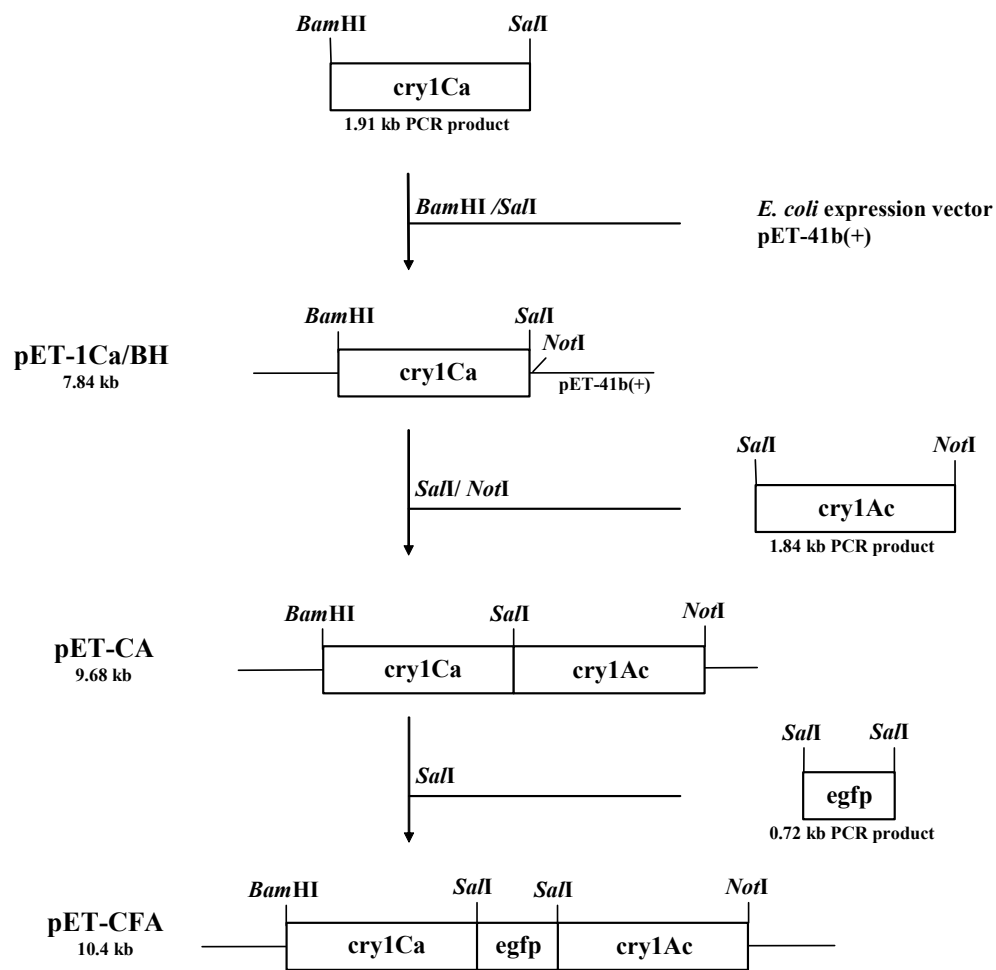


Fig. 4. Construction map of the *Escherichia coli* expression vector, pET-CFA.

다. 거미, 반딧불이 및 전갈 유래 살충성 유전자의 선발

산왕거미 (*Araneus ventricosus*), 늦반딧불이 (*Pyrocoelia rufa*) 및 전갈로부터 얻은 신경 살충성 유전자들을 각각 AvT, PrT 및 AaIT로 명명하고 새로운 프로모터가 적용된 베쿨로바이러스 발현 벡터계를 이용하여 각각을 발현한 다음 살충성 검정을 실시하였다.

1) 전이벡터의 제작

신경 살충성 유전자를 이용하여 다각체를 생산하는 재조합 베쿨로바이러스를 제작하기 위하여 실험실에서 분리된 *Cotesia plutellae* bracovirus (CpBV)의 ORF305 프로모터를 이용하였다. 기 제작된 pBac8-Pro305EGFP 전이벡터의 EGFP 유전자 위치에 *NotI*과 *XhoI*으로 처리한 후, 신경 살충성 유전자를 삽입하여 pBac8-Pro305AvT, pBac8-Pro305PrT 및 pBac8-Pro305AaIT 전이벡터를 제작하였다.

2) 재조합 바이러스의 생산

재조합 바이러스의 생산을 위해서 모바이러스로 bApGOZA를 사용하였다. bApGOZA의 DNA는 polyhedrin 위치에 Mini-F 유전자와 카나마이신 저항성 유전자가 대신하고 있어서 카나마이신 존재 하에 대장균 내에서 복제가 가능한 AcNPV 유래 DNA이며, 필수 유전자인 ORF 1629 유전자가 부분 결손되어 있어서 Sf9 세포에서 transfer vector와 cotransfection된 재조합 바이러스만이 증식할 수 있도록 제작된 DNA이다. 또한 p10 유전자 promoter의 조절 하에 polyhedrin이 발현되므로 Sf9 세포 내에서 다각체를 형성할 수 있다. 전이벡터와 bApGOZA DNA를 lipofectin으로 혼합하여 co-transfection한 후, plaque assay를 통해 재조합 베쿨로바이러스를 순수 분리하고 PCR과 현미경 관찰을 통해 재조합 여부를 확인하였다.

3) 재조합 바이러스의 살충성 검정

2령의 파밤나방을 대상으로 살충성 검정을 수행하였다. 다각체 현탁액을 1×10^4 , 5×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 PIBs/ml (D.W., 0.01% Triton X-100)의 농도로 준비하고, 100 μ l의 준비물을 4 cm² 크기의 배춧잎에 도말하여 건조시킨 후, 파밤나방 유충 10마리에 섭식시켰으며 각 농도별로 3 반복하였다. 12시간 마다 사충의 수를 조사하였으며 7일 동안 관찰하였다.

라. 살충성 Bt 유전자와 신경 살충성 유전자를 발현하는 재조합 바이러스, AcB5B-AaIT의 제작

1) 전이벡터의 제작

XhoI-ATG-F와 BglIII-N400-R 프라이머를 이용하여 살충성 Bt 유전자를 증폭한 다음 전이벡터인 pOBII의 Xho I 과 BglII site에 클로닝하여 pB(1-5)B를 제작하였다. CpBV에서 유래한 ORF305 프로모터의 조절 하에서 곤충 유래 살충성 단백질을 발현하기 위하여 제작된 발현벡터 pAcUW-305ProAaIT의 Xba I 과 BamHI site에 polyhedrin 프로모터와 유전자를 역방향으로 클로닝하여 pAaIT-B를 제작하였다. 제작된 pB(1-5)B 벡터에서 Xho I 과 SnaBI 효소를 이용하여 cryI-5-polyhedrin 부위를 떼어내어 pAaIT-B의 polyhedrin 유전자의 뒤에 삽입하였다. 최종적으로 ORF305 프로모터 조절 하에 신경독소가 발현되고 polyhedrin 프로모터의 조절 하에 polyhedrin-cryI-5-polyhedrin fusion 유전자가 발현되는 pB5B-AaIT dual 벡터를 제작하였다.

2) 재조합 바이러스의 제작

재조합 바이러스의 제작을 위해서 모바이러스로 bAcGOZA를 사용하였다. bAcGOZA의 DNA는 bAcGOZA와 마찬가지로 polyhedrin 위치에 Mini-F 유전자와 카나마이신 저항성 유전자가 대신하고 있어서 카나마이신 존재 하에 대장균 내에서 복제가 가능한 AcNPV 유래 DNA이며, 필수 유전자인 ORF1629

유전자가 부분 결손되어 있어서 Sf9 세포에서 transfer vector와 co-transfection된 재조합 바이러스만이 증식할 수 있도록 제작된 DNA이다. 전이벡터와 bAcGOZA DNA를 lipofectin으로 혼합하여 co-transfection한 후 plaque assay를 통해 재조합 바이러스를 순수 분리하고 PCR과 현미경 관찰을 통해 재조합 여부를 확인하였다.

3) 재조합 바이러스 다각체의 단백질 전기영동 분석 (SDS-PAGE)

Sf9 세포에서 증식한 베쿨로바이러스 다각체를 수거하여 0.5% SDS와 0.5 mM NaCl 용액을 사용하여 다각체를 정제하고 Laemmli (1970)의 방법으로 전기영동을 수행하였다. 정제된 다각체에 5× sample buffer를 섞은 다음 100°C에서 5분 동안 가열한 후 10% polyacrylamide gel에서 전기영동을 수행하였다.

4) 발현된 내독소 단백질의 activation 분석

다각체에 소량의 누에 소화액을 처리하고 위의 SDS-PAGE 방법을 통해, 발현된 내독소 단백질의 activation 여부를 분석하였다. 대조구로는 Cry1Ac를 발현하는 Bt HD73의 crystal과 야생주 AcNPV의 다각체를 사용하였다.

5) 재조합 바이러스의 살충성 검정

가) 배추좀나방에 대한 병원성 검정

다각체 현탁액을 2.5×10^2 , 5×10^2 , 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 PIBs/larva (DW, 0.01% Triton X-100)의 농도로 준비하고, 2 cm² 크기의 배추잎에 도말하여 말린 후, 배추좀나방 2령 유충 10마리에 섭식시켰으며 각 농도별로 3 반복하였다. 12시간 마다 사충의 수를 조사하였으며 5일 동안 관찰하였다.

나) 파밤나방의 섭식 거부 측정

다각체 현탁액을 1×10^4 , 1×10^5 PIBs/larva (DW, 0.01% Triton X-100)의 농도로 준비하고, 2 cm²의 배추잎에 도달한 후 파밤나방 2령 총 10마리를 섭식시켜 (3반복) 48 시간 후의 Leaf area meter CI-202 (CID, USA)로 섭식하지 않은 잎 면적을 측정하였다.

6) 재조합 베쿨로바이러스의 야생주 베쿨로바이러스로의 전환 검정

Sf9 세포에 재조합 베쿨로바이러스를 10 MOI로 접종하고 각 계대배양 횟수에서 생성된 다각체를 수거하여 0.5% SDS와 0.5 mM NaCl 용액을 사용하여 다각체를 정제하고 Laemmli (1970)의 방법으로 전기영동을 수행하였다. 정제된 다각체에 5× sample buffer를 섞은 다음 100°C에서 5분 동안 가열한 후 10% polyacrylamide gel에서 전기영동을 수행하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 새로운 Bt 내독소단백질 유전자의 확보

1) 곤충병원성 Bt로부터 새로운 살충성 유전자 구조 분석

Bt K1 균주와 Bt 2385-1 균주의 plasmid DNA를 template로 하고 ATG1-F와 N400-R primer (표 1)를 이용하여 PCR 반응을 수행한 결과, 예상한대로 약 2.4 kb 정도의 PCR 산물을 확인할 수 있었다 (그림 5). 얻은 PCR 산물을 pGEM-T Easy PCR cloning vector에 cloning하고 얻은 colony들에 대하여 RFLP 분석을 한 결과 모두 8 group의 서로 다른 패턴의 colony들을 확인할 수 있었다. 각 group의 유전자를 염기서열 분석한 결과 모두 5 종의 새로운 유전자와 3 종의 기존 유전자를 확인할 수 있었다 (표 3).

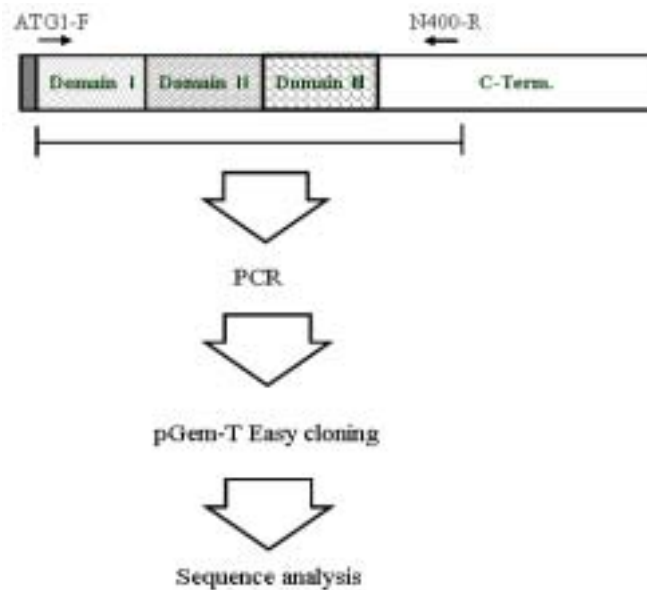


Fig. 5. Screening of novel crystal protein genes from *B. thuringiensis* K1 and *B. thuringiensis* 2385-1 strains.

Table 3. Similarity comparison of nucleotide and deduced amino acid sequences of novel crystal protein genes from *B. thuringiensis* K1 and *B. thuringiensis* 2385-1 strains with reported crystal protein genes

<i>cryI</i> -type genes	Max. homology (%)	
	Nucleotide	Deduced amino acid
<i>cryI-1</i>	73.3	78.0 (with <i>cryI Hbl</i>)
<i>cryI-2</i>	100	100 (with <i>cryI Eal</i>)
Bt K1 <i>cryI-7</i>	99.8	99.7 (with <i>cryI Bel</i>)
<i>cryI-31</i>	100	100 (with <i>cryI Aal</i>)
<i>cryI-44</i>	92.2	91.0 (with <i>cryI Ac2</i>)
<i>cryI-5</i>	97.9	98.0 (with <i>cryI Ab1</i>)
Bt <i>cryI-12</i>	89.0	80.0 (with <i>cryI Jal</i>)
2385-1 <i>cryI-15</i>	100	100 (with <i>cryI Jal</i>)

2) 새로운 유전자의 살충성 검증

클로닝된 새로운 살충성 유전자와 기존의 유전자를 각각 발현하는 재조합 벡로바이러스를 제작하여 배추좀나방과 파밤나방에 대하여 살충성을 검증하였다. 그 결과, 5종의 재조합 바이러스 모두 Ap1Ac에 비하여 배추좀나방에 높은 살충성을 나타내었고 (표 4), Ap1과 Ap5 바이러스는 파밤나방에도 높은 살충성을 나타내었다 (표 5). 새롭게 분리된 5종의 *cryI*-type 유전자들은 모두 미생물 살충제로의 이용 가치가 있으며, 그 중에서도 *cryI-5*는 두 종의 곤충에 모두 높은 살충성을 보이므로 이 유전자를 이용하여 이후의 실험을 수행하게 되었다.

Table 4. Insecticidal activities of recombinant baculoviruses expressing novel crystal proteins from *B. thuringiensis* K1 and *B. thuringiensis* 2385-1 strains against *Plutella xylostella* larvae

Viruses	LC ₅₀ (ng/ml)	FL ₉₅
Wt AcNPV	> 500	-
ApAc	46.6	17.35-94.89
Ap1C	> 500	-
Ap1	91.1	39.05-193.83
Ap5	15.9	10.75-32.7
Ap7	199.6	117.05-380.52
Ap12	> 500	-
Ap44	25.3	11.29-58.08

Table 5. Insecticidal activities of recombinant baculoviruses expressing novel crystal proteins from *B. thuringiensis* K1 and *B. thuringiensis* 2385-1 strains against *Spodoptera exigua* larvae

Viruses	LC ₅₀ (ng/ml)	FL ₉₅
Wt AcNPV	> 2,000	-
ApAc	> 2,000	-
Ap1C	434.9	373.1-532.1
Ap1	1,105.5	932.8-1,203.0
Ap5	480.8	360.9-646.5
Ap7	> 2,000	-
Ap12	> 2,000	-
Ap44	> 2,000	-

나. 새로운 Bt 내독소단백질 재조합 유전자의 제작

1) 새로운 Bt 내독소 단백질 유전자의 제작과 재조합 베쿨로바이러스의 생산

Cry1Ac와 Cry1Ca의 N-말단 유전자들이 연결된 새로운 Bt 내독소 단백질을 발현하는 재조합 베쿨로바이러스를 생산하기 위해 transfer vector pBacPAC-F를 제작하고 (그림 1) 제한 효소의 처리와 sequencing을 통해 cloning 여부를 확인하였다 (그림 6).

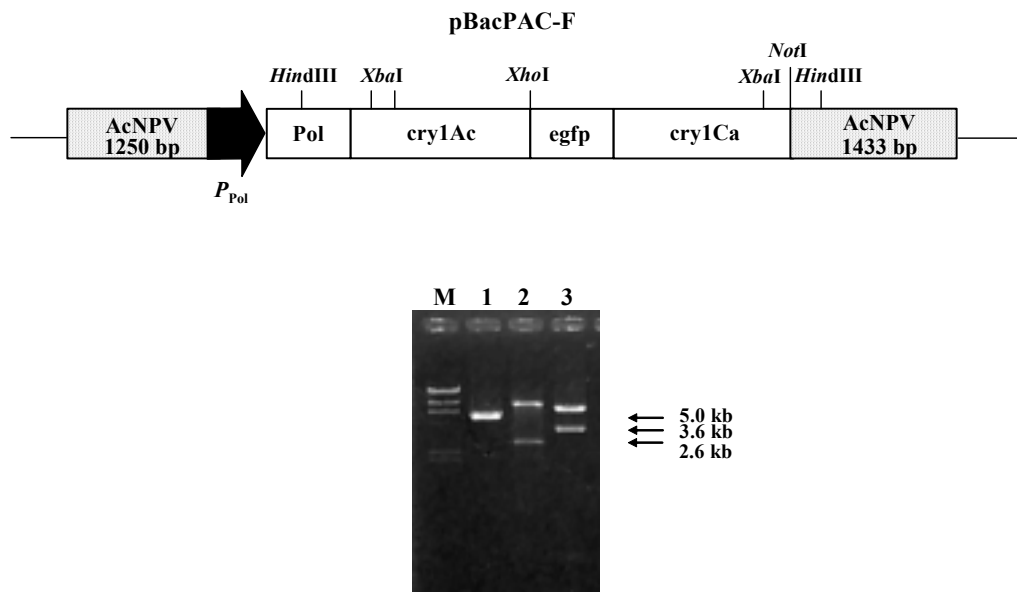


Fig. 6. Restriction endonuclease digestion pattern of the transfer vector, pBacPAC-F. Lanes: M, λ DNA digested with *Hind*III; 1, *Hind*III; 2, *Xho*I and *Not*I; 3, *Xba*I.

Transfer vector pBacPAC-F와 bApGOZA를 Sf9 세포 내에서 co-transfection하여 재조합 베쿨로바이러스 ApPAC-F를 생산하고, PCR과

현미경 관찰을 통해 재조합 여부를 확인하였다 (그림 7, 8). ApPAC-F 재조합 바이러스는 Sf9 세포 내에서 다각체를 형성하였으며 형광 filter를 사용하여 있을 때 초록색 다각체가 형성된 것을 관찰할 수 있었다 (그림 8).

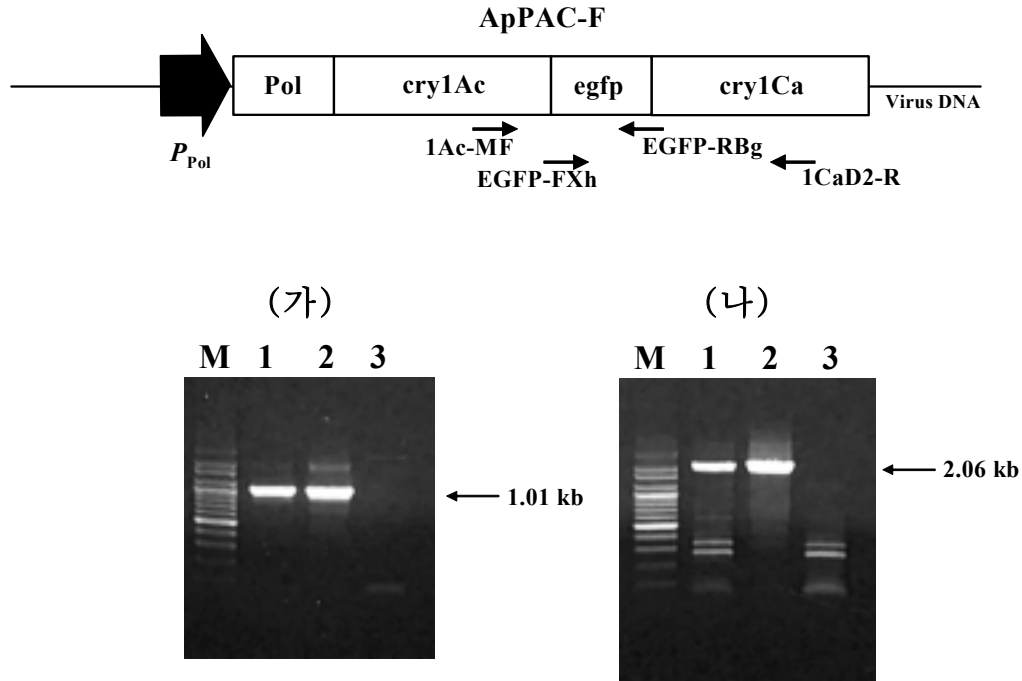


Fig. 7. Verification of the genome structure of the recombinant virus, ApPAC-F, by PCR using *1Ac-MF/EGFP-RBg* primer set (가) and *EGFP-FXh/1CaD2-R* primer set (나). Lanes: M, 100 bp ladder; 1, ApPAC-F; 2, pBacPAC-F; 3, wild-type AcNPV.

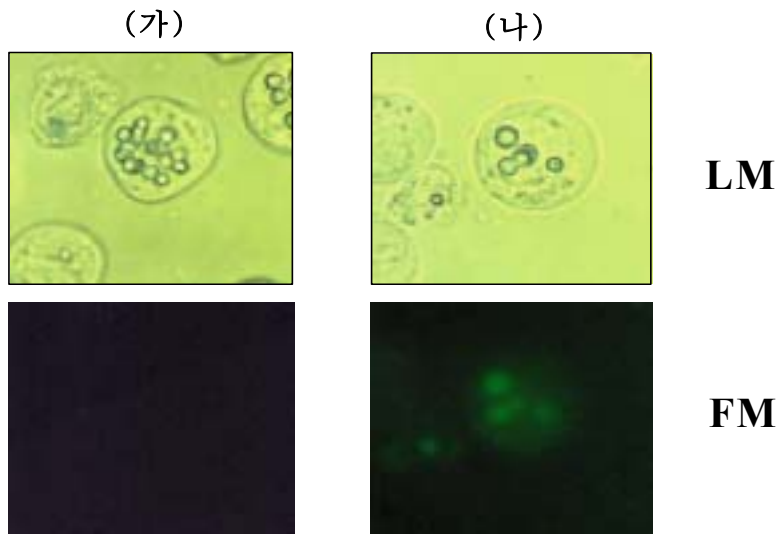


Fig. 8. Microscopy of Sf9 cells infected with wild-type AcNPV (가) and recombinant virus, ApPAC-F (나). Sf9 cells infected with wild-type AcNPV and ApPAC-F were observed by light (LM) or fluorescent (FM).

ApPAC-F 다각체의 단백질 전기영동을 통해 약 30 kDa의 polyhedrin 단백질 외에 AcNPV에서는 볼 수 없는 약 190 kDa의 단백질이 발현되는 것을 확인하였고, 이것은 Cry1Ac와 EGFP, Cry1Ca가 fusion된 단백질인 것으로 추정되었다 (그림 9가). 한편, 발현된 Bt 내독소 단백질이 곤충 체내에서 activation 되는 지의 여부를 확인하기 위해 누에 소화액을 처리하고 전기영동한 결과, Ap1Ac의 Cry1Ac가 65 kDa으로 activation된 것과 마찬가지로 fusion 단백질 내의 Cry1Ac와 Cry1Ca가 activation되는 것을 확인할 수 있었고 (그림 9나), 이들 단백질의 양을 측정된 결과 약 2.5×10^6 개의 다각체가 100 ng의 activation된 내독소 단백질을 생산하는 것으로 조사되어, 같은 양의 Cry1Ac를 1.8×10^6 개의 다각체가 생산하는 Ap1Ac보다는 발현 양이 약간 떨어지는 것으로

확인되었다. 이는 유전자의 크기에 대한 발현 양의 차이에 의한 것으로 추정되었다.

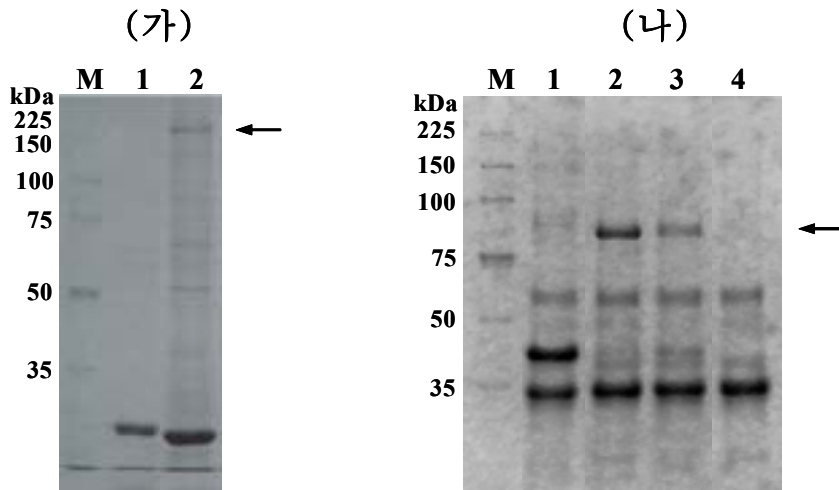


Fig. 9. SDS-PAGE (가) and activation (B) analysis of the recombinant virus, ApPAC-F, containing Cry1Ac-EGFP-Cry1C fusion protein. (가) Lanes: M, protein molecular weight marker; 1, AcNPV; 2, ApPAC-F (나) Lanes: M, protein molecular weight marker; 1, AcNPV; 2, Ap1Ac; 3, ApPAC-F; 4, gut juice of Bombyx mori. arrows indicate fusion protein (가) and activated crystal protein (나), respectively.

2) 재조합 베칼로바이러스 ApPAC-F의 병원성 검정

배추좀나방 3령 유충에 대한 ApPAC-F의 병원성을 AcNPV와 Ap1Ac를 대조구로 하여 조사한 결과, ApPAC-F 다각체의 반수 치사농도 (LC₅₀)가 Ap1Ac에 비해 약 1.7 배 높은 것으로 나타났다 (표 6). 이는 ApPAC-F 다각체 내에 함유된 내독소 단백질의 양이 약 1.4 배 낮고 배추좀나방에 대해

Cry1Ac보다 독성이 낮은 Cry1Ca가 같이 발현되기 때문인 것으로 추정되었다. AcNPV는 배추좀나방 유충에 병원성을 나타내지 않았다.

Table 6. Insecticidal activity of the recombinant baculovirus, ApPAC-F, expressing Cry1Ac-EFGP-Cry1C fusion protein against *Plutella xylostella* larvae

	LC ₅₀ ¹⁾	95% FL ²⁾
AcNPV	-	-
Ap1Ac	1.91×10 ⁴	1.64 - 55.96
ApPAC-F	3.33×10 ⁴	2.55 - 117.2

¹⁾ PIB/ml

²⁾ ×10⁴ PIB/ml

파밤나방에 대한 독성을 검정하기 위하여, 재조합 베쿨로바이러스 ApPAC-F에 의해 파밤나방 유충의 섭식 거부에 의한 배춧잎의 섭식량 감소를 조사하였다. 2×10⁷ PIBs/ml 농도의 다각체 현탁액을 도말한 배춧잎을 1령 유충에 섭식시켜 48 시간 후 그 면적을 측정하고 섭식량을 계산하였다. 그 결과, 10 마리의 파밤나방 유충이 2일 동안 무처리는 49.36 mm², AcNPV는 35.66 mm², Ap1Ac는 35.53 mm², ApPAC-F는 15.65 mm²의 섭식량을 나타내었다 (그림 10). 이러한 결과는 ApPAC-F 다각체 내의 내독소 단백질인 Cry1Ca가 파밤나방에 독성 효과를 나타내어 섭식을 거부하기 때문인 것으로 보이며, 역시 같은 이유로 Cry1Ac만을 발현하는 Ap1Ac 다각체에 비해서도 ApPAC-F 다각체가 더 높은 독성을 갖는 것으로 판단되었다.

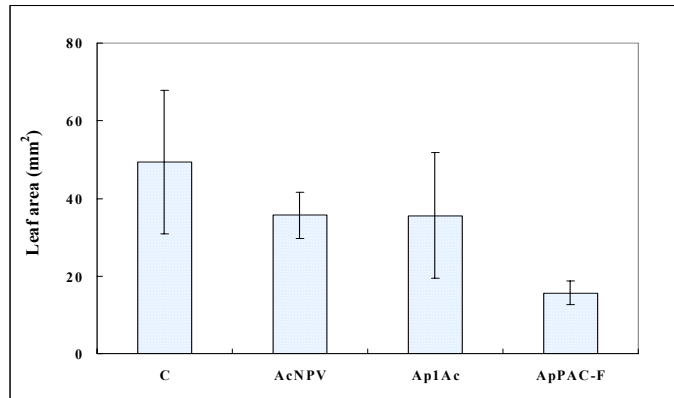


Fig. 10. Refusing diet of *Spodoptera exigua* larvae by the recombinant baculovirus, ApPAC-F, expressing Cry1Ac-EFGP-Cry1C fusion protein.

이상의 결과, 재조합 바이러스 ApPAC-F는 야생주 AcNPV에 비해서 배추좀나방 유충과 파밤나방 유충에 대해 양독성을 갖는 장점을 보였으며 AcNPV의 좁은 숙주 범위와 지효성을 극복할 수 있을 것으로 기대되었다.

다. 거미, 반딧불이 및 전갈 유래 살충성 유전자의 선발

1) 신경 살충성 유전자들의 재조합 바이러스 제작

AvT, PrT 및 AaIT의 유전자들이 각각 발현하는 재조합 베쿨로바이러스를 생산하기 위해 전이벡터들을 제작하고 염기서열을 통하여 클로닝을 확인하였다 (그림 11). 이렇게 제작한 각각의 전이벡터를 bApGOZA DNA와 함께 Sf9 세포에 co-transfection하여 재조합 베쿨로바이러스 ApAvT, ApPrT 및 ApAaIT를 각각 제작하였다. 제작된 재조합 베쿨로바이러스들에 대해 PCR과 현미경 관찰을 통해 재조합 여부를 확인하였다 (그림 12, 13).

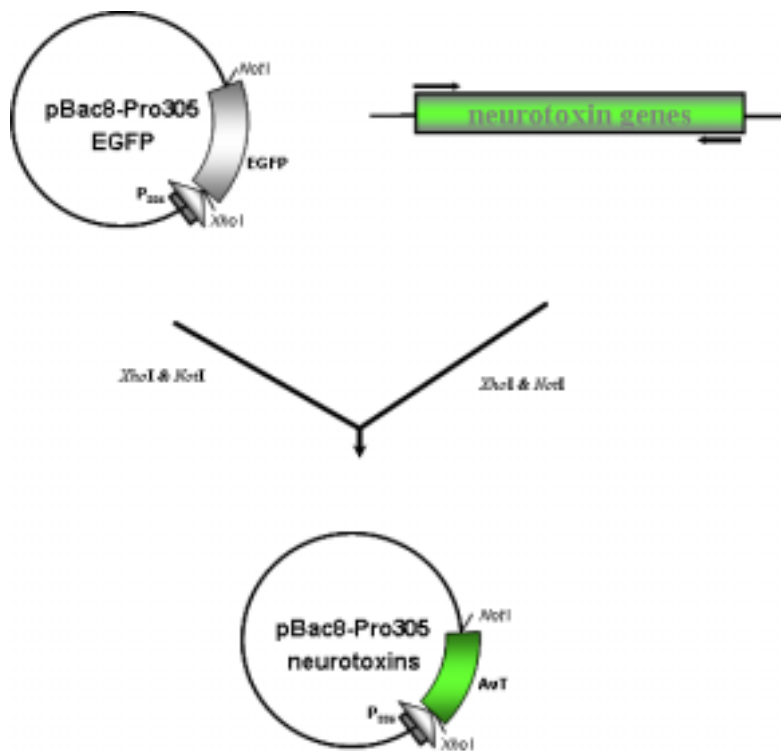


Fig. 11. Construction map of transfer vectors expressing neurotoxin genes under the control of the ORF305 promoter from *Cotesia plutellae* bracovirus.

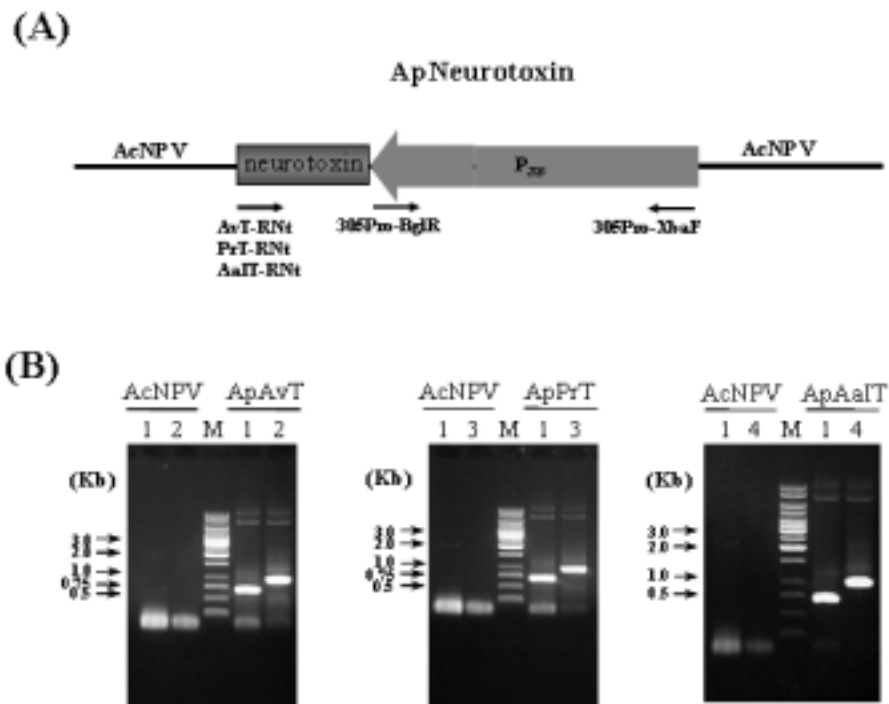


Fig. 12. Verification of the genome structure of the recombinant viruses, ApAvT, ApPrT and ApAaIT, by PCR using specific primer set. Introduction of neurotoxin genes under the control of the ORF305 promoter from *Cotesia plutellae* bracovirus in ApAvT, ApPrT and ApAaIT (A) were analyzed by PCR (B). (A) Solid arrows indicate primer positions used in PCR analysis. (B) Lanes: M, 1 kb ladder; 1, primers 305Pro-XbaF and 305Pro-BglR; 2, primers 305Pro-XbaF and AvT-RNt; 3, primers 305Pro-XbaF and PrT-RNt; 4, primers 305Pro-XbaF and AaIT-RNt.

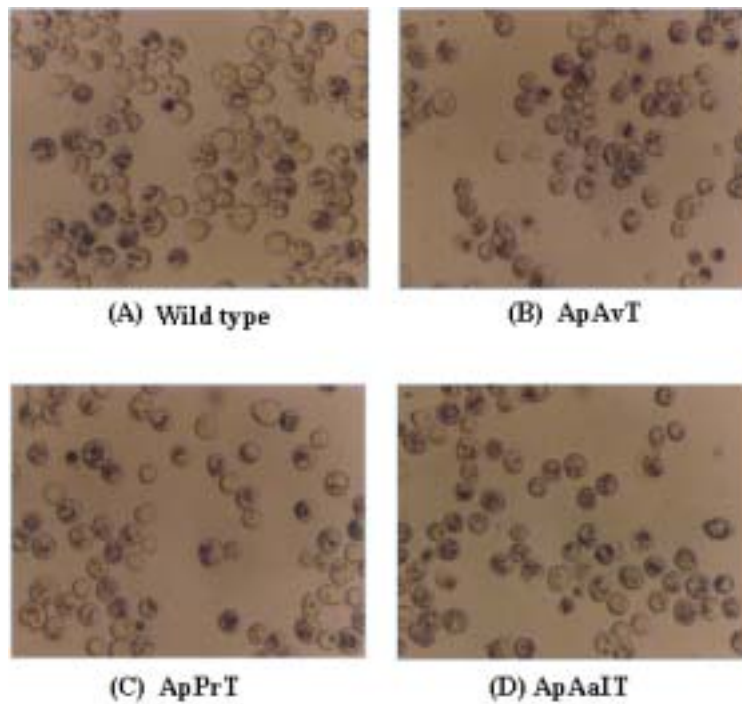


Fig. 13. Phase-contrast microscopy of Sf9 cells infected with wild-type AcNPV (A) and recombinant baculoviruses, ApAvT (B), ApPrT (C) and ApAaIT (D), expressing neurotoxin genes under the control of the ORF305 promoter from *Cotesia plutellae* bracovirus.

2) 재조합 베쿨로바이러스의 살충성 검정

ApAvT, ApPrT 및 ApAaIT 재조합 바이러스의 파밤나방 2령 유충에 대한 살충성을 AcNPV를 대조구로 하여 조사한 결과 접종 5일후 1×10^7 PIBs/ml의 농도에서 ApAaIT가 다른 두 재조합 바이러스에 비하여 가장 살충력이 높은 것으로 확인되었다 (그림 14). 이로부터 파밤나방에 가장 높은 살충력을 가지는 AaIT 유전자를 이용하여 재조합 바이러스를 제작하기로 하였다.

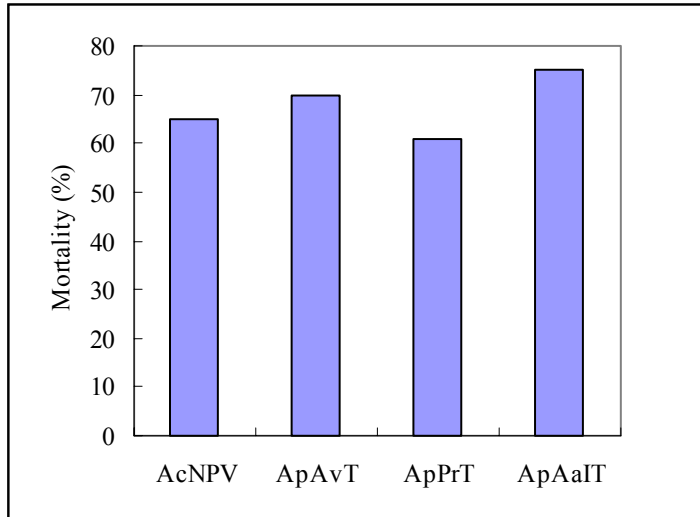


Fig. 14. Insecticidal activities of wild-type AcNPV and recombinant baculoviruses, ApAvT, ApPrT and ApAaIT, expressing neurotoxin genes under the control of the ORF305 promoter from *Cotesia plutellae* bracovirus at the concentration of 1×10^7 PIBs/ml against *Spodoptera exigua* larvae.

라. 살충성 Bt 유전자와 신경 살충성 유전자를 발현하는 재조합 바이러스, AcB5B-AaIT의 제작 및 특성 검정

1) 재조합 바이러스 제작

앞선 실험을 통하여 Bt 내독소단백질은 Bt *cry1-5* 유전자를, 그리고 곤충 유래 살충성 독소는 AaIT 유전자를 이용하여 발현시키기로 하고 최종적인 고효율의 재조합 바이러스 제작을 실시하였다. Bt 내독소단백질 유전자와 신경 독소

유전자를 동시에 발현하는 재조합 바이러스를 제작하기 위하여 pB5B-AaIT dual 전이벡터를 제작하고 제한효소 패턴과 염기서열을 통하여 클로닝을 확인하였다 (그림 15, 16, 17). 전이벡터와 bAcGOZA를 co-transfection하여 재조합 배칼로바이러스 AcB5B-AaIT를 제작하고, PCR과 현미경 관찰을 통해 재조합 여부를 확인하였다 (그림 18, 19).

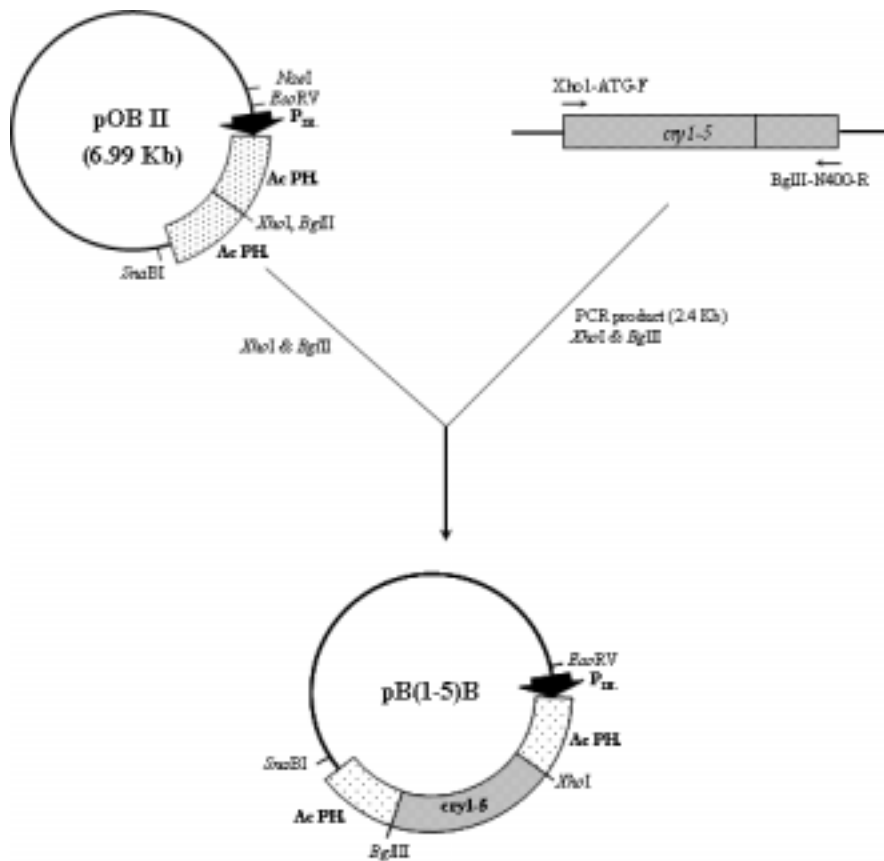


Fig. 15. Construction map of the transfer vector, pB(1-5)B.

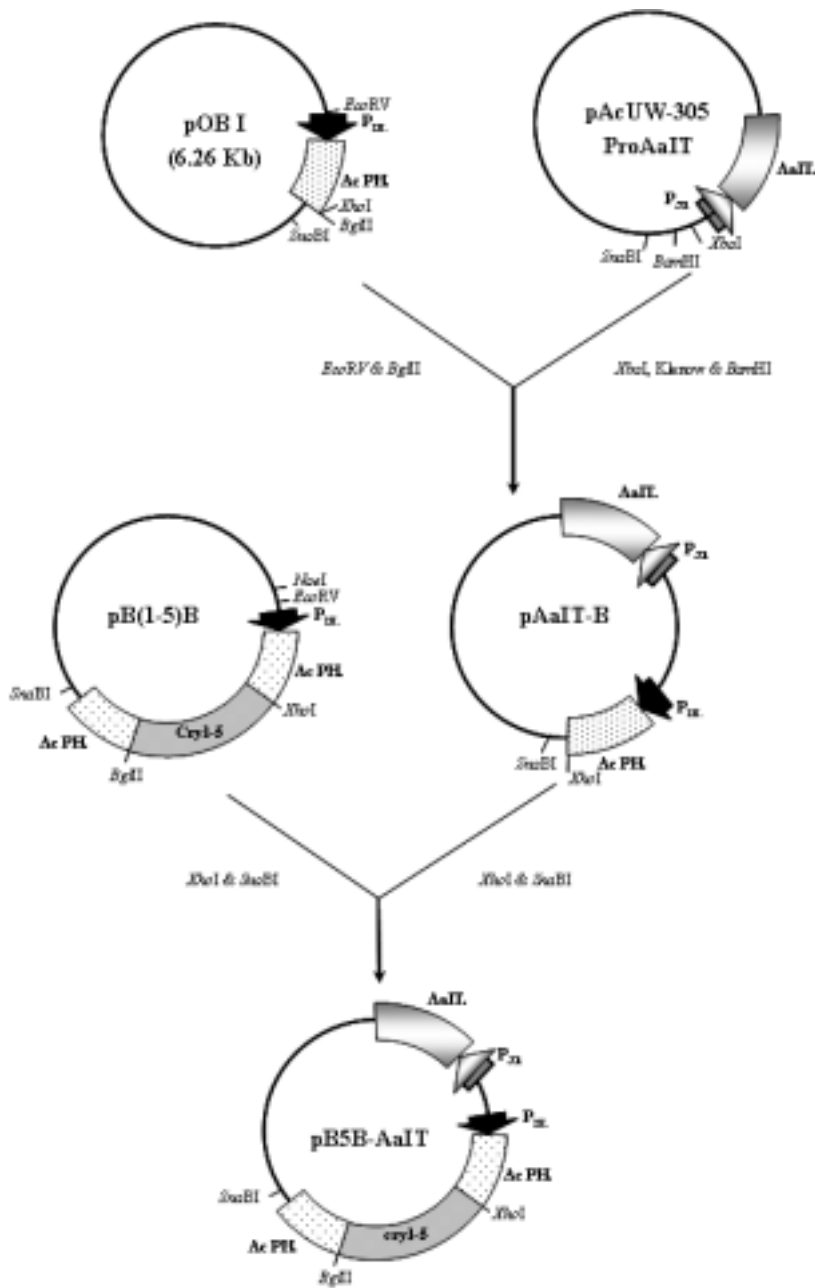


Fig. 16. Construction map of the transfer vector, pB5B-AaIT.

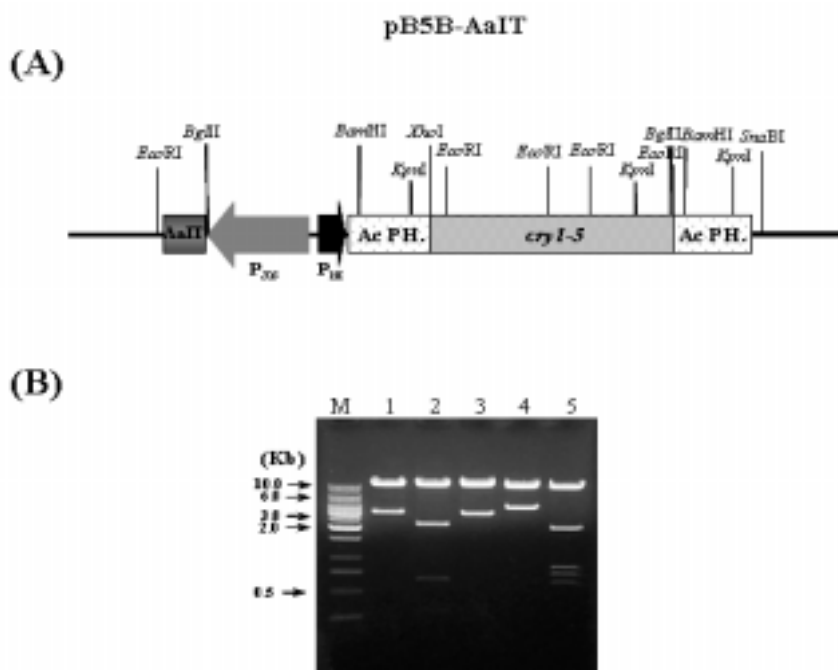


Fig. 17. Schematic diagram (A) and restriction endonuclease digestion pattern of the transfer vector, pB5B-AaIT (B). (B) Lanes: M, 1 kb ladder; 1, *Xho* I and *Sna*B I; 2, *Kpn* I; 3, *Bam*H I; 4, *Bgl*II; 5, *Eco*R I.

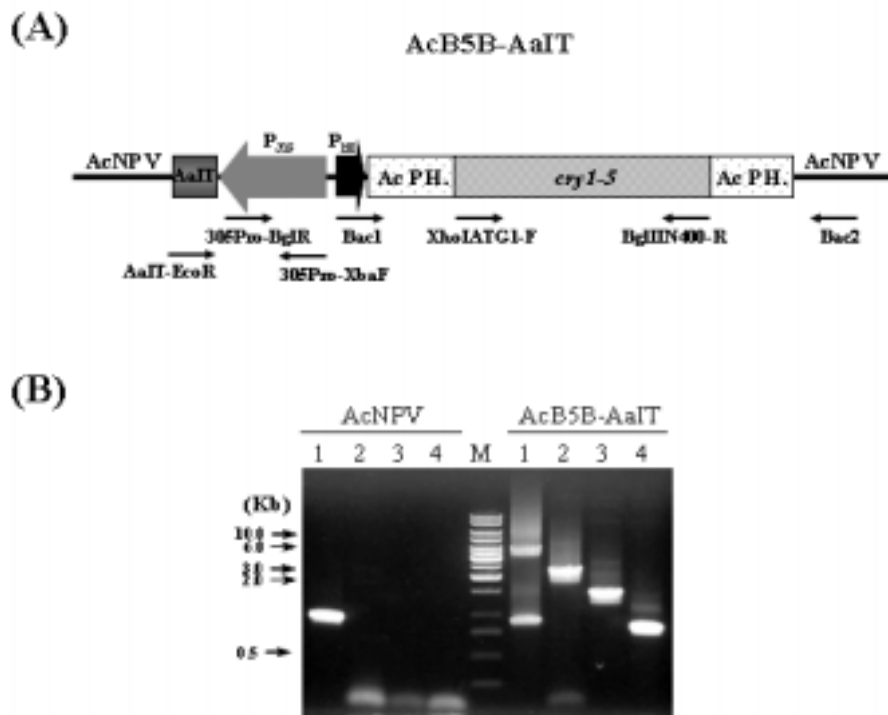


Fig. 18. Verification of the genome structure of the recombinant virus, AcB5B-AaIT by PCR using specific primer set. Introduction of neurotoxin genes under the control of the ORF305 promoter from *Cotesia plutellae* bracovirus and polyhedrin-*cryI-5*-polyhedrin fusion gene under the control of polyhedrin promoter of AcNPV in AcB5B-AaIT (A) were analyzed by PCR (B). (A) Solid arrows indicate primer positions used in PCR analysis. (B) Lanes: M, 1 kb ladder; 1, primers Bac1 and Bac2; 2, primers XhoIATG1-F and BglIIN400R; 3, primers 305Pro-XbaF and 305Pro-BglR; 4, primers 305Pro-XbaF and AaIT-EcoR.

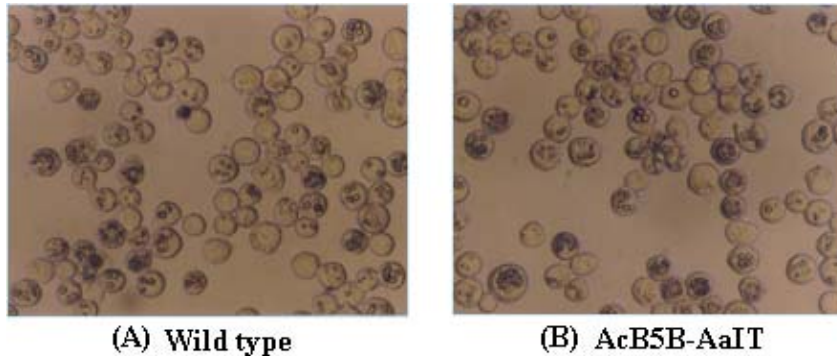


Fig. 19. Phase-contrast microscopy of Sf9 cells infected with wild-type AcNPV (A) and recombinant baculovirus, AcB5B-AaIT (B), expressing neurotoxin genes under the control of the ORF305 promoter from *Cotesia plutellae* bracovirus and polyhedrin-Cry1-5-polyhedrin fusion protein under the control of polyhedrin promoter of AcNPV.

AcB5B-AaIT 다각체의 단백질 전기영동을 통해 약 150 kDa의 polyhedrin-Cry1-5-polyhedrin 융합단백질이 발현되어 다각체에 매립되어 있음을 확인할 수 있었다 (그림 20). 융합단백질 외에 AcB5B-AaIT에서는 발현되지 않는 약 30 kDa의 polyhedrin 단백질 또한 관찰할 수 있었는데, 이는 의도했던 대로 융합단백질 유전자에서 두 polyhedrin 유전자간의 재조합에 의하여 야생주화 된 결과인 것으로 판단되었다 (그림 20). 한편, 융합단백질의 형태로 발현되어 다각체 내에 매립된 Bt 내독소단백질이 곤충 체내에서 activation 되는지의 여부를 확인하기 위해 누에 소화액을 처리하고 전기영동한 결과, Bt에서 발현된 Cry1Ac, Ap1Ac의 Cry1Ac나 Ap1C의 Cry1C가 65 kDa으로 activation된 것과 마찬가지로 융합단백질 내의 Cry1-5가 activation되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 21).

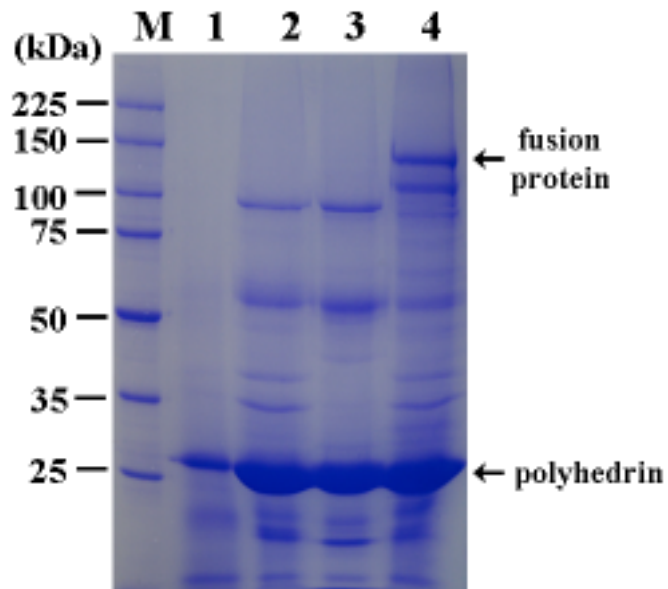


Fig. 20. SDS-PAGE analysis of the recombinant virus, AcB5B-AaIT, containing polyhedrin-Cry1-5-polyhedrin fusion protein. Lanes: M, protein molecular weight marker; 1, AcNPV; 2, Ap1Ac; 3, Ap1C; 4, AcB5B-AaIT.

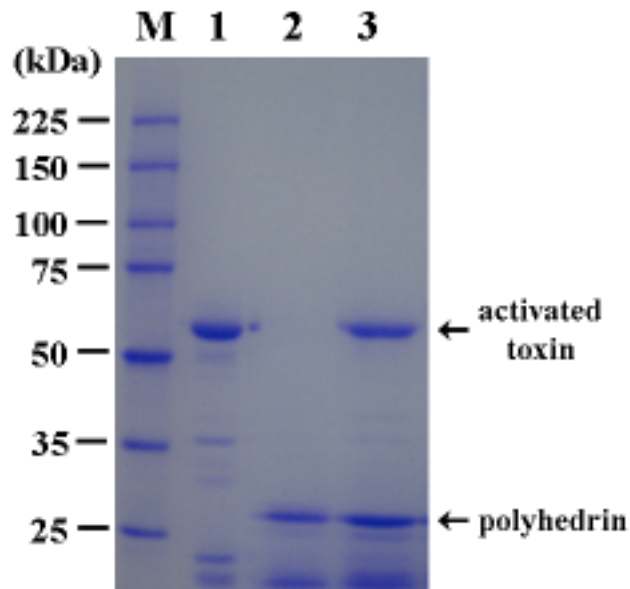


Fig. 21. Activation (B) analysis of the polyhedrin-Cry1-5-polyhedrin fusion protein contained in the polyhedra of the recombinant virus, AcB5B-AaIT. Lanes: M, protein molecular weight marker; 1, *B. thuringiensis* HD73; 2, wild-type AcNPV; 3, AcB5B-AaIT.

2) 재조합 베칼로바이러스의 살충성 검정

배추좀나방 3령 유충에 대한 AcB5B-AaIT의 병원성을 AcNPV와 Ap1Ac 및 Ap1C를 대조구로 하여 조사한 결과, AcB5B-AaIT의 LD₅₀은 Ap1Ac와 유사한 높은 병원성을 보임을 확인할 수 있었다 (표 7). 이에 반해 Ap1C의 경우에는 Ap1Ac나 AcB5B-AaIT에 비해 상대적으로 낮은 병원성을 보였으며, 야생주 AcNPV는 배추좀나방 유충에 병원성을 나타내지 않았다.

Table 7. Median lethal dose (LD₅₀) of the recombinant virus, AcB5B-AaIT, against 2nd instar larvae of *P. xylostella*.

Virus	LD ₅₀ (×10 ³ PIBs/larva)	95% FL (×10 ³ PIBs/larva)
wt AcNPV	> 100	-
Ap1Ac	1.48	0.82~1.85
Ap1C	4.03	2.17~8.27
AcB5B-AaIT	1.23	0.74~1.57

또한, 이들 바이러스의 배추좀나방 유충에 대한 병원성을 반수치사시간 (LT₅₀)의 측면에서 조사한 결과, AcB5B-AaIT는 Ap1Ac에 비해 약 50% 정도 감소한 LT₅₀ 값을 보임으로써 신경독소인 AaIT의 조기발현에 의해 Cry1Ac만을 발현하는 Ap1Ac에 비해 병원성이 크게 향상되었음을 확인할 수 있었다 (표 8).

Table 8. Median lethal time (LT₅₀) of the recombinant virus, AcB5B-AaIT, against 2nd instar larvae of *P. xylostella*.

Virus	LT ₅₀ ^a (Hours)	95% FL (Hours)
wt AcNPV	NC ^b	-
Ap1Ac	93.1	84.8~103.2
Ap1C	142.5	122.4~201.5
AcB5B-AaIT	45.2	26.0~59.5

^a LT₅₀ values were calculated at 8×10³ PIB/larva.

^b non-calculable

파밤나방에 대한 병원성을 검증하기 위하여, 재조합 베쿨로바이러스 AcB5B-AaIT에 의한 파밤나방 유충의 섭식 거부에 의한 배춧잎의 섭식량 감소를 조사하였다. 1×10^4 PIBs/larva와 1×10^5 PIBs/larva 농도의 다각체 현탁액을 도말한 배춧잎을 2령 유충에 섭식시켜 48 시간 후 그 면적을 측정하고 섭식량을 계산하였다. 그 결과, AcB5B-AaIT 처리구는 야생주 AcNPV 처리구에 비해서는 약 9배, Ap1Ac 및 Ap1C 처리구들에 비해서는 약 4배 정도의 섭식 거부 효과를 나타내었다 (표 9). 이러한 결과는 재조합 바이러스들이 형성하는 다각체 내의 내독소단백질들이 파밤나방에 독성 효과를 나타내어 섭식을 거부하기 때문인 것으로 판단되었으며, AcB5B-AaIT의 경우에는 바이러스 감염 초기에 발현되는 신경독소인 AaIT의 영향으로 내독소단백질만을 가진 Ap1Ac나 Ap1C에 비해 섭식거부 효과가 증대된 것으로 추정되었다.

Table 9. Refusing diet of *Spodoptera exigua* larvae by the recombinant baculovirus, AcB5B-AaIT, against 2nd instar larvae of *S. exigua*.

Virus	Refused diet (%)	
	1×10^4 PIBs/larva	1×10^5 PIBs/larva
Mock-infected	0	0
wt AcNPV	5.1	10.4
Ap1Ac	10.9	19.5
Ap1C	13.6	25.8
AcB5B-AaIT	48.2	97.6

이상의 결과, 재조합 바이러스 AcB5B-AaIT는 야생주 AcNPV나 내독소단백질만을 발현하는 Ap1Ac 및 Ap1C에 비해서 배추좀나방 유충과 파밤나방 유충에

대해 양독성을 갖는 장점을 보였으며 AcNPV의 좁은 숙주 범위와 지효성을 극복할 수 있을 것으로 기대되었다.

3) 재조합 베콜로바이러스의 야생주 베콜로바이러스로의 전환

본 연구에서 제작된 AcB5B-AaIT는 바이러스의 복제가 거듭될수록 polyhedrin-Cry1-5-polyhedrin 융합단백질 유전자의 두 polyhedrin 유전자간의 재조합에 의해 그 사이에 존재하는 *cry1-5* 내독소단백질 유전자가 탈락되고 야생주 AcNPV와 동일하게 polyhedrin 유전자만 남게 됨으로써 야생주화가 되는 바이러스이다. 따라서, 계대배양에 따른 융합단백질의 발현량을 조사하기 위하여 AcB5B-AaIT를 10 MOI로 계대배양하고 각 계대배양 횟수에서의 다각체 내에 매립된 융합단백질에 대해 SDS-PAGE 분석을 수행하였다.

그 결과, 계대배양이 거듭될수록 다각체에 포함된 융합단백질의 양은 감소하는 경향을 보였으며 11회 계대배양에서는 융합단백질이 거의 관찰되지 않았다 (그림 22). 이러한 결과는 AcB5B-AaIT를 미생물 살충제로 야외에 적용할 시 살포된 바이러스가 빠르게 야생주화 하여 GMO의 사용에 의한 환경에 대한 위험성을 차단할 수 있을 것으로 판단되었다.

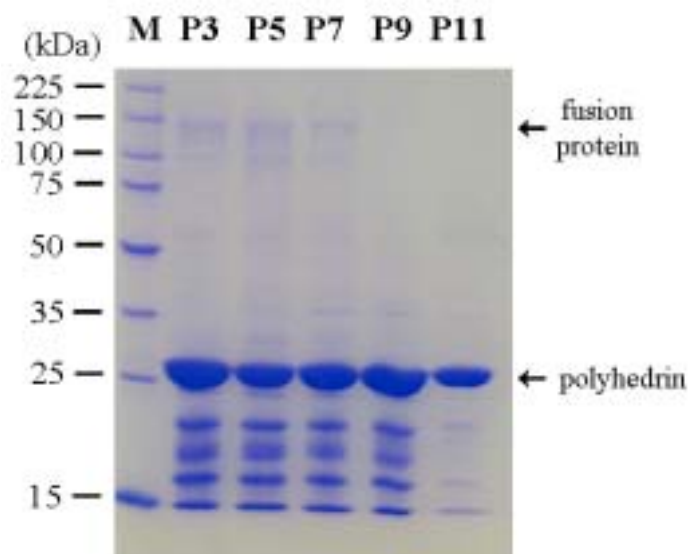


Fig. 22. SDS-PAGE analysis of the polyhedra produced by AcB5B-AaIT at 10 MOI along serial passage. Passage numbers are indicated as 'pn', p for passage and n for number. Lanes; M, protein molecular weight marker; P3~11, AcB5B-AaIT with different passage number.

3. 결론

국내에서 배추나 파와 같은 십자화과 작물의 대표적인 주요해충인 배추좀나방과 파밤나방의 효과적이며 환경친화적인 방제를 위하여 재조합 벡로바이러스를 이용한 새로운 바이러스 살충제를 개발하기 위하여, 신규 Bt 내독소단백질 유전자 및 재조합 내독소단백질 유전자를 선발하고자 하였다. 우선, 나비목 해충에 높은 살충성을 가지며 새로운 내독소단백질 유전자를 다수 포함하고 있을 것으로 예상되는 Bt K1 균주 및 Bt 2385-1 균주를 대상으로 내독소단백질 유전자에 대한 PCR-RFLP 분석을 수행하였다. 그 결과, 두 균주로부터 5종의 새로운 내독소단백질 유전자를 클로닝 하였으며, 이들 신규 내독소단백질을 발현하는 재조합 벡로바이러스를 제작하여 배추좀나방과 파밤나방에 대한 병원성을 검정하였다. 5종의 신규 내독소단백질은 모두 배추좀나방에 대하여 높은 살충성을 보였으며, Cry1-1과 Cry1-5의 경우에는 파밤나방에도 높은 병원성을 가진 것으로 확인되었다.

*cryIac*와 *cryIC* 내독소단백질 유전자간의 재조합에 의한 재조합 내독소단백질을 발현하기 위하여 *cryIac*와 EGFP 및 *cryIC* 유전자들이 융합된 새로운 Bt 내독소 단백질을 발현하는 재조합 벡로바이러스, ApPAC-F를 제작하였다. ApPAC-F가 발현하는 약 190 kDa의 Cry1Ac-EGFP-Cry1C 융합단백질은 이 바이러스가 형성하는 다각체 내에 매립되었으며, 다각체 내에 매립된 내독소단백질의 융합단백질은 나비목 곤충 중장소화액에 의하여 약 65 kDa의 내독소단백질로 활성화되었다. ApPAC-F는 배추좀나방에 대하여 기존에 이 나방에 대하여 높은 살충성을 가진 것으로 보고된 Cry1Ac를 발현하는 재조합 벡로바이러스 Ap1Ac에 비해 약 1.7배 높은 병원성을 보였으며, 파밤나방에 대해서도 섭식거부 효과를 보임으로써 야생주 벡로바이러스가 갖는 좁은 숙주범위와 지효성의 단점을 극복할 수 있는 새로운 재조합 벡로바이러스인 것으로 판단되었다.

한편 Bt 내독소단백질과는 다른 살충기작을 가지는 신경독소를 동시에

발현함으로써 난방제 해충 및 저항성 해충에 대하여 살충효과가 뛰어난 재조합 베쿨로바이러스 살충제를 개발하기 위하여, 국내산 거미 및 반딧불이와 전갈 유래 살충성 유전자들인 AvT, PrT 및 AaIT 유전자를 각각 발현하는 재조합 베쿨로바이러스, ApAvT, ApPrT 및 ApAaIT를 제작하였다. 이들 바이러스의 과밤나방에 대한 병원성을 조사한 결과, 전갈 신경독소인 AaIT가 가장 우수한 살충효과를 보이는 것으로 확인되었다.

이상의 결과를 바탕으로 배추좀나방과 과밤나방 모두에 높은 살충성을 가지는 것으로 확인된 새로운 Bt 내독소단백질 Cry1-5와 과밤나방에 우수한 살충력을 보인 전갈 신경독소 AaIT를 동시에 발현하는 재조합 베쿨로바이러스를 제작하고자 하였다. 이를 위하여, polyhedrin 유전자 프로모터의 조절 하에서는 두 개의 polyhedrin과 그 사이에 위치하는 내독소단백질, Cry1-5의 융합단백질을 발현하고, 조기에 발현되는 CpBV의 ORF305 프로모터의 조절 하에서는 AaIT를 발현하는 새로운 재조합 베쿨로바이러스, AcB5B-AaIT를 제작하였다. 이렇게 제작된 AcB5B-AaIT가 생성하는 다각체에는 약 150 kDa의 polyhedrin-Cry1-5-polyhedrin의 융합단백질이 매립되어 있었으며, 이 융합단백질은 누에의 중장소화액에 의하여 약 65 kDa의 내독소단백질로 활성화되었다. Cry1-5 내독소단백질이 포함된 다각체를 생성하고 신경독소 AaIT를 바이러스 감염 초기에 발현하는 새로운 재조합 베쿨로바이러스, AcB5B-AaIT의 병원성을 배추좀나방과 과밤나방 유충에 대하여 조사한 결과, 배추좀나방에 대해서는 Cry1Ac만을 발현하는 Ap1Ac에 비해 2배 정도 감소한 LT₅₀ 값을 보였으며, 과밤나방에 대해서는 Cry1C만을 발현하는 Ap1C에 비해 약 4배 정도의 섭식거부 효과를 보임으로써 야생주 AcNPV의 단점인 좁은 숙주 범위와 지효성을 극복할 수 있는 새로운 재조합 베쿨로바이러스 미생물 살충제로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단되었다.

재조합 베쿨로바이러스 AcB5B-AaIT는 계대배양이 거듭될수록 융합단백질 유전자 내의 두 polyhedrin 유전자간의 재조합에 의해 cry1-5 내독소단백질

유전자가 탈락됨으로써 다각체에 포함된 내독소단백질의 융합단백질이 점점 감소하고 궁극적으로는 야생주 벡쿨로바이러스로 전환되었다. 이를 통하여 GMO가 가지고 있는 환경에의 위해성을 차단할 수 있는 새로운 유전자조작 바이러스 살충제로서의 AcB5B-AaIT의 유용성을 확인할 수 있었다.

제 2 절 곤충·거미 유래 살충성 유전자 선발

1. 재료 및 방법

가. 곤충 (반딧불이 유충과 호박벌) 및 거미류 시료 채집

곤충 및 거미로부터 곤충·거미 유래 살충성 유전자 확보 및 선발을 위하여 육서 달팽이를 먹이로 하는 늦반딧불이 (*Pyrocoelia rufa*) 유충과 호박벌 (*Bombus ignitus*)을 경남, 밀양 등지에서 채집하였으며, 거미류는 산왕거미 (*Araneus ventricosus*)가 많이 서식하는 고성 그리고 진주에서 각각을 채집하였다. 채집된 시료들은 유전자 확보를 위한 cDNA 유전자은행 제작에 사용하였다.

나. 늦반딧불이, 호박벌, 거미등의 cDNA 유전자은행 제작

본 연구에 사용된 곤충 및 거미는 cDNA 유전자은행을 제작하기 위하여 유발에 마쇄하여 SV total RNA Isolation System (Promega Co.)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. total RNA의 농도를 측정하여 500 μ g 정도를 모으고 poly(A) Quick mRNA Isolation Kit (Stratagene Co.)를 이용하여 oligo(dT)-셀룰로오스 크로마토그래피에 의해 mRNA를 분리한 후 역시 농도를 측정하여 5 μ g의 mRNA를 cDNA 유전자은행 제작에 사용하였다. cDNA 유전자은행 제작을 위해 Stratagene사 (CA, U.S.A)의 Uni-ZAP XR Vector Kit와 Packaging Extract를 사용하였는데, 먼저 poly A+ RNA로부터 *Xho* I linker primer와 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 평탄말단으로 만들었다. 그리고 제한효소 *Eco*R I adaptor를 부착시킨 후 제한효소 *Xho* I 으로 절단하고 size fractionation을 거쳐 적당한 크기의 단편만을 취하였다. 이러한 cDNA를 Uni-ZAP XR vector에 삽입시켜 bacteriophage 상태가 되도록 coat protein으로

packaging하여 cDNA 유전자은행을 제작하고 기주세포 (XL1-blue MFR ' strain) 내에 감염시킨 후 cDNA 농도를 적정하고 이를 적당한 농도로 증폭하여 본 실험에 사용하였다. 이렇게 제작한 cDNA 유전자은행을 *in vivo* excision 방법을 이용하여 플라스미드화 한 후, 임의의 클론을 선발하여 5말단 또는 3말단 중 한쪽 방향으로 부분 염기서열을 분석하고 기존 데이터베이스를 통한 상동성 분석에 의한 유전자들의 잠정적인 기능을 추정하는 방법인 발현 유전자 꼬리표 (expressed sequence tags: ESTs) 분석 방법을 수행하였다. 먼저 임의로 선발한 클론으로부터 Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System을 이용하여 분리한 DNA (0.2 μ g)를 T3 혹은 T7 primer와 혼합한 후 BigDye Cycle Sequencing kit와 혼합한 후 PCR (polymerase chain reaction) 반응을 수행하였다. PCR 산물은 1 capillary 방식인 310 Genetic Analyzer (ABI PRISM)에 의해 분석하여 염기서열을 결정하고 얻어진 염기서열은 GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)를 통하여 상동성을 분석하여 기존에 알려진 살충성 유전자 및 두 종류의 키틴아제 유전자와 상동성을 보이는 유전자를 확보하였다.

다. cDNA 유전자은행 탐색을 통한 살충성 유전자 확보

제작된 cDNA 유전자은행을 *in vivo* excision 방법을 이용하여 플라스미드화 한 후, 임의의 클론을 선발하여 5말단 또는 3말단 중 한쪽 방향으로 부분 염기서열을 분석하고 기존 데이터베이스를 통한 상동성 분석에 의한 유전자들의 잠정적인 기능을 추정하는 방법인 발현 유전자 꼬리표 (expressed sequence tags: ESTs) 분석 방법을 수행하였다. 먼저 임의로 선발한 클론으로부터 Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega Co.)을 이용하여 분리한 DNA(0.2 μ g)를 T3 혹은 T7 primer와 혼합한 후 BigDye Cycle Sequencing kit와 혼합한 후, 94°C에서 10초, 50°C에서 10초 그리고 60°C에서 4분씩 25회 PCR (polymerase chain reaction) 반응을 수행하였다. PCR 산물은 1 capillary 방식인

310 Genetic Analyzer (ABI PRISM)에 의해 분석하여 염기서열을 결정하고 얻어진 염기서열은 GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)를 통하여 상동성을 분석하여 기존에 알려진 살충성 유전자들 상동성을 보이는 유전자를 확보하였는데, 반딧불이로부터 강력한 protease의 하나인 serine protease (*PrSP*) 유전자 1개, 호박벌로부터 독샘 특이적으로 발현되는 lipase (*BiLP*) 유전자 1개와 venom protease (*BiVP*) 유전자 1개 그리고 산왕거미로부터 역시 독샘 특이적으로 발현되는 2개의 독소 유전자 *AvTox1* (kaliclude toxin) 과 *AvTox2* (potassium-channel blocking toxin)를 선별하여 본 연구에 사용하였다.

라. 곤충유래 살충성 독소가 포함된 다각체를 생산하는 베칼로바이러스 제작

다각체를 생산하는 재조합 베칼로바이러스를 제작하기 위하여 발현 유전자 코리표 분석 방법을 이용하여 찾은 5개의 살충성 독소 유전자들을 전이벡터인 pBacPAK9 (BD Biosciences Clontech, CA)에 클로닝하였다. 클로닝하기 위하여 사용된 제한 효소는 반딧불이 *PrSP*의 경우 *Sac* I 과 *Kpn* I 을, 호박벌 *BiLP*의 경우 *Bam*HI 과 *Xho* I 을, *BiVP*의 경우 *Sac* I 과 *Xho* I 을, 그리고 거미에서 찾은 2개의 *AvTox1*과 *AvTox2*는 각각 *Sac* I 과 *Kpn* I 을 처리하여 전이벡터인 pBacPAK9에 클로닝하여 모두 5개의 살충성 독소 유전자를 포함한 전이벡터를 완성하였다. 재조합 베칼로바이러스를 제작하기 위해 6-well plate에 $1.0-1.5 \times 10^6$ 개의 *Spodoptera frugiperda* IPLB clone 9 (Sf9) 곤충세포를 준비하여 plate에 불도록 27°C에서 한 시간 동안 방치하였다. bApGOZA viral DNA (Je *et al.*, 2001) 1 μ g과 5개의 독소 유전자를 함유한 전이 벡터 플라스미드 DNA 5 μ g을 20 mM HEPES buffer에 50 μ l에 혼합하고 여기에 50 μ l의 Lipofectin™ (100 μ g/ml, GIBCO BRL LIFE Technologies, Gaithersburg, MD)을 DNA 혼합액에 넣어 잘 섞어 실온에 30분간 방치하여 살충성 독소 유전자가 viral DNA에 삽입되도록 방치하였다. 이 Lipofectin-DNA 혼합액을 6-well plate의 세포 배양액에 넣기 전에 Sf9 세포를 serum-free TC100 배양액으로 2회 씻어낸 후, 배양액에 넣어

27°C에서 5시간 동안 배양한 후, 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO)를 함유한 TC100 배지를 새로이 갈아 넣어 5일간 27°C에서 배양하였다. 5일간 배양 후, 배양액을 수거하여 2000 rpm에서 5분간 원심분리를 실시하여 상등액을 수거하여 plaque assay를 실시할 때까지 4°C에 보관하였다. 6-well plate에 1.5×10^6 개의 Sf9 세포를 준비하고 plaque assay를 실시하여 재조합 베클로바이러스를 선별하여 재조합 베클로바이러스의 증식에 사용하였으며 5개의 살충성 유전자를 포함하는지 여부를 PCR 방법을 통하여 확인하였다. PCR에 사용된 primer의 염기서열은 표 1과 같다.

Table 1. Profile of gene-specific primers

gene	primer name	primer sequence	PCR product size (bp)
PrSP	PrSP-F	5'-ATGTTCAAAATTGTGCTTATTGCT-3'	774
	PrSP-R	5'-TTATTTTCTACTATGCACTTTTAC-3'	
BiVP	BiVP-F	5'-CAATGACGGGCTCCAAGATGCTG-3'	1083
	BiVP-R	5'-GTATTATTGCATCGCTGGGA-3'	
BiLP	BiLP-F	5'-CACGATGACGGCCATGGTAAATG-3'	962
	BiLP-R	5'-GATTTTAACTGCTAGTTTTGAAG-3'	
AvTox1	AvTox1-F	5'-ATGCCTTTCCACTACTTTCC-3'	237
	AvTox1-R	5'-TTAGTGATCCGTGCAGGCAAA-3'	
AvTox2	AvTox2-F	5'-ATGGCACTTGCACTGCTGGG-3'	195
	AvTox2-R	5'-TCAAGAAGGTTTTACGCATACG-3'	

마. 독소 유전자들의 특성 분석

1) 늦반딧불이 serine protease 유전자의 구조 분석과 발현 및 효소활성 측정

가) 게놈 DNA 추출, *PrSP* 유전자의 PCR 그리고 Southern blot 분석

늦반딧불이로부터 게놈 DNA를 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)를 이용하여 분리하고 genomic DNA PCR을 위하여 *PrSP* 특이적인 primer를 제작하였다. 전사 개시코돈을 포함한 PrSP-F (5'-ATGTTCAAAATTGTGCTTATTGCAGCT-3')와 3' 말단에서 제작한 PrSP-R (5'-TTATTTTCTACTATGCACTTTTAC-3')을 이용하여 Pre-Mix (Bioneer사)에 늦반딧불이 게놈 DNA와 각 primer 0.1-0.5 μ M을 넣은 다음 DNA Thermal Cycler (Bioneer사)로 94°C에서 30초, 48°C에서 40초 그리고 72°C에서 2분씩 35회 반복조건을 설정하여 수행하였다. PCR 산물은 알코올 침전시켜 10,000 \times g로 15분간 원심분리를 실시하고 70% 에탄올로 세척하였다. 이렇게 준비된 PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 분석하고 염기서열 분석을 위하여 pGemT vector (Promega)에 클로닝하고 BigDyeTerminator cycle sequencing kit을 이용하여 염기서열을 분석하였다.

Southern blot 분석을 위하여 늦반딧불이 중장으로부터 게놈 DNA를 분리하여 제한효소 *Bam*H I, *Pst* I, *Sal* I 그리고 *Xho* I 을 처리하여 단편화 시키고 1% agarose gel에 전기영동하였다. 이 gel을 nylon blotting membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)에 침착시켜 hybridization buffer (5 \times SSC, 5 \times Denhard's solution, 0.5% SDS 그리고 100 μ g denatured salmon sperm DNA/ml)에 probe와 함께 42°C에서 hybridization을 실시하였다. probe는 771 bp *PrSP* cDNA를 [α -³²P] dCTP (Amersham, Arlington Heights, IL)와 Prime-It II Random Primer Labelling Kit (Stratagene)을 이용하여 labelling 하였다. Hybridization 후, membrane은 65°C에서 washing buffer (0.1% SDS, 0.2 \times SSC)에 30분씩 3회 washing 하고 X-ray film에 노출시켰다.

나) 재조합 베칼로바이러스를 이용한 발현 및 SDS-PAGE

재조합된 베칼로바이러스를 O'Reilly 등 (1992)의 방법에 따라 1.5×10^5 개의 Sf9 세포에 mock-, wtAcNPV 그리고 재조합 AcNPV를 5 plaque forming unit (p.f.u.)씩 감염시키고 1일, 2일 그리고 3일째 수거하였다. SDS-PAGE (Laemmli 1970)를 위하여 mock-, wtAcNPV 그리고 재조합 AcNPV를 감염시킨 세포를 PBS buffer로 2회 washing하고 cell lysates를 10% SDS-PAGE에 전기영동하였다. 전기영동 후, gel은 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하였다.

다) Polyclonal antibody 제작 및 Western blot 분석

PrSP 항체 제작을 위하여 SDS-PAGE gel로부터 단백질 밴드를 같은 양의 Freund's complete adjuvant ($200 \mu\text{l}$, Sigma)와 혼합하여 쥐에 주사하였다. 그리고 1주일 후, antigens과 Freund's incomplete adjuvant ($200 \mu\text{l}$, Sigma)를 혼합하여 3회 1주일 간격으로 주사하고 마지막 주사 후, 3일 뒤에 쥐로부터 피를 뽑고 $10,000 \times g$ 에서 5분간 원심분리하여 혈장을 추출하여 Western blot에 사용하였다.

Western blot을 위하여 단백질을 10% SDS-PAGE에 전기영동하고 단백질을 nitrocellulose membrane ($0.45 \mu\text{m}$ pore size)에 blotting하였다. Blotting한 후, membrane은 1% (v/v) BSA에 실온에서 2시간 동안 침지시키고 다시 제작한 PrSP 항체 (1:1000 v/v)에 실온에서 1시간 동안 침지시켰다. 그리고 membrane을 TBST (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 washing하고 anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP) conjugate와 HRP-streptavidin 혼합물에 침지시켰다. Membrane을 반복하여 TBST buffer에 washing한 후, ECL detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech)와 반응시키고 X-ray film에 노출시켰다.

라) 단백질 분해 활성 측정

PrSP의 효소 활성 측정을 위하여 Kim 등 (1998)의 방법에 따라 SDS-PAGE로부터 측정하였다. 먼저 0.1% (w/v) gelatin, 12% (w/v) acrylamide, 0.32% (w/v) bisacrylamide 그리고 375 mM Tris/HCl (pH 8.8)를 혼합하여 running gel을 만들고 4% (w/v) acrylamide, 0.11% (w/v) bisacrylamide 그리고 330 mM Tris/HCl (pH 6.8)을 혼합하여 stacking gel을 만들었다. 단백질 sample은 베쿨로바이러스를 감염시킨 Sf9 곤충세포와 *P. rufa* 유충 조직의 lysates를 zymogram sample buffer (0.5 M Tris/HCl, pH 6.8, 10% (v/v) SDS, 20% (v/v) glycerol 그리고 0.5% Bromophenol Blue)와 혼합하여 전기영동에 사용하였다. 전기영동 후, gel은 2.5% Triton X-100을 함유한 50 mM Tris/HCl (pH 7.4)에 침지시켜 실온에서 30분간 shaking을 실시한 다음, zymogram reaction buffer (30 mM Tris/HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ 그리고 0.02% Brij-35)에 37°C에서 12시간 반응시켰다. 12시간 후, Gel은 Coomassie Brilliant Blue (0.5%)에 30분간 염색시키고 탈색용액 (10% methanol과 5% acetic acid)에서 탈색하여 lytic band를 확인 및 촬영하였다.

2) 호박벌유래 lipase와 venom protease 유전자의 구조 및 특성 분석

BiVP 및 BiLP: 기존에 보고된 곤충유래 venom protease 및 lipase와 MacVector (ver. 6.5)를 이용하여 비교하고 호박벌의 조직을 해부현미경 (Zeiss, Jena, Germany)을 이용하여 여왕벌, 일벌 그리고 수벌의 지방체, 중장, 표피, 근육 그리고 독샘을 해부하였다. 각각의 조직을 PBS로 2회 washing 후, total RNA를 분리하고 denaturing formaldehyde agarose gel (McMaster and Carmichael, 1977)에 전기영동하여 nylon membrane에 blotting 하였다. 이 membrane을 42°C에서 본 연구에서 발견한 cDNA를 probe로 하여 hybridization을 실시하고 washing을 하여 X-ray film에 노출시켰다.

3) 거미유래 독소 유전자, *AvTox1*과 *AvTox2*의 특성 분석

거미 독소 유전자들의 염기서열을 밝히고 NCBI에서 제공되는 DNASIS와

BLAST program을 이용하여 기존에 알려진 유전자와 비교하였다. BLAST algorithm program을 이용하여 GenBank, EMBL 그리고 SwissProt database에서 유사 유전자와 비교 분석하였다. 이 거미유래 독소 유전자 역시 위와 같이 Northern blot 분석을 통하여 특성을 조사하였다.

바. 새로운 재조합 베쿨로바이러스의 목적해충에 대한 생물검정

각각의 재조합 베쿨로바이러스의 다각체의 숫자를 counting하고 인공사료를 일정한 크기(0.25×0.25×0.15 cm, 0.05 g)로 자르고 일정한 농도로 희석한 다각체를 5 μ l씩 (1×10^6 개) 인공사료위에 뿌리고 인공사료에 다각체가 스며들도록 방치한 후, 파밤나방 (*Spodoptera exigua*) 한 마리가 다 섭식한 후, 다각체를 처리하지 않은 신선한 인공사료를 먹이고 매일 관찰하였으며, 대조구로서 야생형 베쿨로바이러스를 같은 조건으로 처리하여 비교 조사하였다.

사. 살충제로의 이용가능성 분석

파밤나방을 대상으로 같은 양의 제작한 재조합 베쿨로바이러스와 야생형 베쿨로바이러스의 다각체를 먹여서 먹이에 살포하여 각각의 독소 관련 유전자들의 살충성 검정을 수행하여 LT_{50} 및 최종 mortality를 비교, 분석하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 늦반딧불이, 호박벌, 거미등의 cDNA 유전자은행 제작

제작한 cDNA library의 titer를 측정된 결과, 약 1.3×10^6 개 이상의 plaque이 존재하였으며, cDNA의 재조합 비율을 알아보기 위하여 이 phage를 *E. coli*에 감염시킨 후 X-Gal과 IPTG가 첨가된 NZY 배지에서 배양한 결과 98% 이상의 plaque이 cDNA가 도입된 재조합 phage plaque로 확인되었다. 고등생물의 경우 약 10만여 개의 유전자가 있고 이중 약 15%만이 세포 개체들에서 공통적으로 발현되고, 한 세포내에서도 abundant 그룹과 rare 그룹이 존재한다. 초파리의 유전자는 사람의 1/5에 해당하며, 이 비율을 본 실험 각각의 개체에 적용할 때 제작된 cDNA library는 세포내에 적은 양으로 존재하는 poly A+ RNA종을 모두 포함하는 것으로 생각되었다. 제작된 cDNA library에서 벡터 내에 삽입된 cDNA 크기를 확인하기 위하여 무작위로 선발한 phage를 *in vivo* excision하여 pBluescript SK 전환하였다.

나. cDNA 유전자은행 탐색을 통한 살충성 유전자 확보

P. rufa, *B. ignitus* 그리고 *A. ventricosus* 등의 cDNA 유전자은행에서 무작위로 *in vivo* excision을 이용하여 얻은 박테리아 콜로니로부터 DNA 염기서열 결정을 위해 플라스미드 DNA를 분리하였다. 염기서열 분석을 위한 primer는 삽입 cDNA에 근접해 있는 T3 primer를 사용하였고 one capillary 방식의 310 Genetic Analyzer를 사용하여 cDNA 염기서열을 결정하였다. 늦반딧불이의 경우에는 모두 54개, 호박벌에서는 144개 그리고 산왕거미의 경우에는 385개의 클론에서 발현 유전자 꼬리표 (ESTs)를 생산할 수 있었다. 클론마다 평균 250 bp 이상의 염기서열을 판독할 수 있었는데 판독한 염기서열은 GenBank database에서 기존에 알려진 유전자와의 상동성 검색을 통하여 살충성 유전자를 선발하였다.

표 2는 *P. rufa* cDNA 유전자은행으로부터 얻은 cDNA 클론의 발현 유전자 꼬리표를 나타낸다. 54개의 cDNA 클론 중, 24개가 다른 곤충 관련 유전자와 상동성을 보였으나 기존에 알려진 다른 종의 반딧불이와는 상동성을 보이지 않았다. 그리고 이 24개의 곤충관련 유전자 중, 약 46%가 초파리와 상동성을 보였다. 반딧불이 ESTs 중, serine protease 유전자를 선별하여 본 실험을 수행하였다.

호박벌 cDNA 유전자은행에서 모두 144개의 클론을 확보하여 염기서열을 밝히고 발현 유전자 꼬리표를 생산하였다 (표 3). GenBank database에 보고된 다른 벌의 독샘 관련 유전자로 알려진 lipase와 venom protease 유전자를 확보하여 본 연구를 수행하고 있다. 앞으로도 더 많은 발현 유전자 꼬리표를 생산하여 찾을 수 있을 것으로 기대된다.

표 4는 *A. ventricosus* cDNA 유전자은행로부터 얻은 cDNA 클론의 발현유전자 꼬리표를 나타내는데, 총 385개의 클론으로부터 염기서열을 결정하고 GenBank database의 등록된 다른 유전자와 아미노산으로 번역하여 상동성을 검색하였다. 385개의 클론 중, 383개가 등록된 유전자와 상동성을 보였으며 특히 241개의 클론 (62.6%)은 높은 상동성을 보였다. 385개의 클론 중 68개의 클론은 곤충과 상동성을 보였고 약 82.4%가 초파리에서 밝혀진 유전자와 유사한 것으로 생각되어졌다. 그리고 발현유전자 꼬리표에서 반복해서 나타나는 유전자 중, 특히 번역 관련 유전자와 ribosomal protein이 많이 확인되었으며, 분석한 클론 중 반복해서 나타나는 정도를 조사해본 결과 약 53개의 클론, 즉 13.8%가 다른 클론과 유사성을 보였다 (그림 1). 이 *A. ventricosus* cDNA 유전자은행의 발현 유전자 꼬리표 중에서 2개의 살충성관련 유전자인 *AvTox1*과 *AvTox2*를 지속적인 실험을 위한 살충성 유전자로 선발하였다.

Table 2. Summary of the expressed sequence tags isolated from the cDNA library of the firefly, *Pyrocoelia rufa*

Clone	Putative identification	Species	Overlength (bp)	Homology (%)	Acc. No.
PR1-10	CoA-Ddehydrogenase	<i>Homo Sapiens</i>	572	63	AT003771
PR1-15	Troponin T	<i>Drosophila melanogaster</i>	476	81	AT003772
PR1-27	ATPase synthase 6	<i>Limulus polyphemus</i>	103	88	AT003773
PR1-36	CG3981	<i>Drosophila melanogaster</i>	443	51	AT003774
PR1-38	Integral membrane transport protein	<i>Homo sapiens</i>	101	84	AT003775
PR1-43	ATPase subunit E	<i>Manduca sexta</i>	542	63	AT003776
PR1-82	RNase L inhibitor	<i>Homo sapiens</i>	278	88	AT003777
PR2-19	Unconventional myosin-15	<i>Mus musculus</i>	323	37	AT003778
PR2-21	CG3981	<i>Drosophila melanogaster</i>	257	53	AT003779
PR2-60	Sodium channel alpha subunit	<i>Homo sapiens</i>	308	41	AT003780
PR2-79	Chitinase	<i>Aeromonas hydrophila</i>	113	60	AT003781
PRX-1	Core 1 UDP-galactose	<i>Mus musculus</i>	326	51	AT003782
PRX-17	Helicase-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	131	54	AT003783
PRX-19	Non-functional subunit binding protein	<i>Homo sapiens</i>	389	42	AT003784
PRX-20	Integral membrane subunit	<i>Aedes aegypti</i>	125	80	AT003785
PRX-21	Annexin	<i>Bombyx mori</i>	374	64	AT003786
PRX-29	Carboxypeptide	<i>Astacus astacus</i>	221	60	AT003787
PRB-1	CG3884	<i>Drosophila melanogaster</i>	413	67	AT003788
PRB-6	Myophilin	<i>Echinococcus multilocularis</i>	293	74	AT003789
PRB-17	Male specific serum polypeptide beta	<i>Ceratitis capitata</i>	254	49	AT003790
PRB-26	Serine protease inhibitor	<i>Schistocerca gregaria</i>	89	56	AT003791
PRB-32	Alpha L1 nicotinic acetyl choline receptor	<i>Acheta domesticus</i>	74	72	AT003792
PRB-37	Histone H3	<i>Drosophila melanogaster</i>	320	99	AT003793
PRB-61	Phospholipase A2 inhibitor	<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	227	44	AT003794
PRB-73	Sodium/Potassium exchanging ATPase alpha subunit	<i>Ctenocephalides felis</i>	524	92	AT003795
PRB-74	Ribosomal protein L27	<i>Mus musculus</i>	404	72	AT003796
PRB-76	Endothelin-converting enzyme	<i>Bos taurus</i>	380	68	AT003797
PRB-81	Myophilin	<i>Echinococcus multilocularis</i>	293	74	AT003798
PRB-85	Phermone binding protein	<i>Choristoneura murinara</i>	173	55	AT003799
PRB-90	Isopenicillin Nsynthase	<i>Streptomyces cattleya</i>	170	48	AT003800
PRB-92	Serpin	<i>Oryza sativa</i>	203	57	AT003801
PRB-94	Nucleolar protein p40	<i>Homo sapiens</i>	95	84	AT003802
PRB-99	Elongation factor 1-alpha	<i>Nanexila gracilis</i>	227	94	AT003803
PR13	CG3950	<i>Drosophila melanogaster</i>	137	65	AT003804
PR65	Tropomyosin I	<i>Drosophila melanogaster</i>	164	54	AT003805
PR113	Reverse transcriptase	<i>Caenorhabditis elegans</i>	93	49	AT003806
PR126	Easily shocked protein	<i>Caenorhabditis elegans</i>	227	74	AT003807
PR241	Ubiquitin	<i>Sus scrofa</i>	203	85	AT003808

Table 2. Continued

Clone	Putative identification	Species	Overlength (bp)	Homology (%)	Acc. No.
PR242	Myosin II essential light chain	<i>Caenorhabditis elegans</i>	440	80	AT003809
PR768	40S ribosomal protein	<i>Xenopus laevis</i>	581	89	AT003810
PR770	Glycophorin-binding protein	<i>Caenorhabditis elegans</i>	239	48	AT003811
PR824	40S ribosomal protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	425	85	AT003812
PR826	Mitochondrial outer membrane protein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	62	AT003813
PR884	Peritrophin-95 precursor	<i>Lucilia cupriona</i>	113	60	AT003814
PR951	Cytochrome p450-like protein	<i>Bacillus subtilis</i>	143	39	AT003815
PR972	Z83216	<i>Caenorhabditis elegans</i>	239	47	AT003816
PR1183	RNA helicase	<i>Drosophila melanogaster</i>	287	95	AT003817
PR1310	Endothelin converting enzyme	<i>Rattus norvegicus</i>	188	49	AT003818
PR1421	60S ribosomal protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	323	46	AT003819
PR1429	60S ribosomal protein L15	<i>Chironomus tentans</i>	257	48	AT003820
PR1439	Phermone binding protein	<i>Popillia japonica</i>	188	53	AT003821
PR1441	Myosin light chain II	<i>Drosophila melanogaster</i>	407	74	AT003822
PR1505	40S ribosomal protein S19	<i>Gillichthys mirabilis</i>	143	64	AT003823
PR1512	Cytochrome b	<i>Rhytidoponera</i> sp.	140	89	AT003824

Table 3. Summary of the expressed sequence tags isolated from the cDNA library of the bumblebee, *Bombus ignitus*

Clone	Putative identification	Species	Overlength (length)	Homology (%)
72	carboxylesterase isoenzyme	<i>Rattus norvegicus</i>	108	44
73	similar to zinc finger protein 91	<i>Homo sapiens</i>	135	38
74	cytochrome b	<i>Apis mellifera ligustica</i>	216	45
75	VAB-10A protein	<i>Caenorhabditis elegans</i>	105	45
76	cytochrome oxidase subunit I	<i>Physarum polycephalum</i>	117	35
78	elastin like protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	63	76
80	cellulase celA	<i>Polyplastron multivesiculatum</i>	48	81
81	frizzled homolog 1	<i>Mus musculus</i>	123	36
82	hypothetical protein	<i>Enterococcus faecium</i>	120	37
85	ferritin I	<i>Apriona germari</i>	126	54
86	glucose oxidase	<i>Apis mellifera</i>	330	43
89	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	<i>Caenorhabditis elegans</i>	195	50
123	ATP-binding cassette protein unknown	<i>Mus musculus</i>	168	48
124	CG17572-PA	<i>Bacteroides uniformis</i>	153	31
731	Trypsin	<i>Drosophila melanogaster</i>	171	40
732	Vacuolar ATP synthase subunit E	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	159	57
736	Alpha crystallin B chain	<i>Manduca sexta</i>	180	59
737	Hypothetical protein	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	96	56
739	Elastin like protein	<i>Ralstonia metallidurans</i>	102	38
744	Heat shock protein 90	<i>Drosophila melanogaster</i>	54	83
746	ATPase C subunit	<i>Sarcophaga crassipalpis</i>	117	87
749	Similar to golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4	<i>Drosophila melanogaster</i>	170	40
751	Putative cytoplasmic protein	<i>Mus musculus</i>	159	27
753	Lachesin	<i>Salmonella typhimurium LT2</i>	135	28
765	Ubiquitin activating enzyme	<i>Schistocerca Americana</i>	129	74
767	Phosphatidylethanolamine-binding protein precursor	<i>Drosophila melanogaster</i>	66	68
778	Abaecin	<i>Caenorhabditis elegans</i>	117	30
780	Solute carrier family 21 member 14	<i>Bombus pascuorum</i>	93	61
790	Delayed Anaerobic Gene; Dan4p	<i>Mus musculus</i>	144	37
797	Similar to proline-rich peptides 673K precursor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	170	18
802	3-demethylubiquinone-93-methyltransferase	<i>Mus musculus</i>	170	24
803	Protease P27	<i>Leptospira interrogans serovar lai str.56601</i>	171	29
805	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>Trichoderma harzianum</i>	81	48
806	Mucin-like glycoprotein	<i>Drosophila melanogaster</i>	177	67
808	Hypothetical protein	<i>Cryptosporidium parvum</i>	180	17
809	Expressed protein	<i>Homo sapiens</i>	57	57
813	Defensin	<i>Arabidopsis thaliana</i>	174	28
815	Hypothetical protein R10D12.8	<i>Bombus pascuorum</i>	126	52
816	Putative enzyme	<i>Caenorhabditis elegans</i>	123	29
817	Nonclathrin coat protein zeta 1-COP	<i>Shigella flexneri 2a str.301</i>	180	52
818	Hypothetical protein	<i>Danio rerio</i>	102	58
819	Elongation factor 1 delta	<i>Plasmodium falciparum 3D7</i>	123	27
821	Cytochrome oxidase I	<i>Bombyx mori</i>	180	73
822	Cytochrome oxidase I	<i>Bombus hypocrita hypocrita</i>	180	73
823	Maternal-Effect Sterile 3/grandchildless protein	<i>Bombus ignitus</i>	171	45
825	Serine protease 14D2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	129	35
826	Activating transcription factor	<i>Anopheles gambiae</i>	171	31
827	Hypothetical membrane protein	<i>Bombyx mori</i>	108	50
		<i>Thermoplasma acidophilum</i>	102	41

Table 3. Continued

Clone	Putative identification	Specics	Overlength (length)	Homology (%)
828	Putative outer membrane protein	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar <i>Typhi</i>	177	69
830	Predicted protein	<i>Neurospora crassa</i>	120	40
831	Phosphoribosylaminoimidazolesuccinocar boxamide synthase	<i>Candida maltosa</i>	150	36
832	Signal peptide precursor	<i>Caenorhabditis elegans</i>	138	52
833	Similar to Hypothetical protein CGI-99	<i>Rattus norvegicus</i>	180	31
834	Ecdysteroid regulated 16 Kda protein precursor	<i>Manduca sexta</i>	135	41
835	Hypothetical protein	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>PA01</i>	159	37
837	Protein-tyrosine kinase	<i>Drosophila melanogaster</i>	84	50
839	Filamin-1	<i>Bos taurus</i>	145	30
840	Putative aliphatic sulfonates transport ATP-binding protein ssuB	<i>Escherichia coli</i> <i>CFT073</i>	138	95
841	Alternative oxidase	<i>Crocus sativus</i>	33	100
842	Protein BYJ6	<i>Nicotiana tabacum</i>	48	87
844	Probable cyclindependent kinases regulatory subunit	<i>Physarum polycephalum</i>	153	58
845	Putative transport protein	<i>Escherichia coli</i> <i>k 12</i>	87	62
849	Probable TonB-dependent receptor	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>PA01</i>	93	41
851	Antifreeze glycopeptide AFGP polyprotein precursor	<i>Boreogadus saida</i>	177	16
853	Hypothetical protein	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	168	24
854	Neprilysin	<i>Caenorhabditis elegans</i>	177	62
862	Salivary glue protein sgs-3 precursor	<i>Drosophila erscta</i>	180	24
892	Hypothetical protein	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	555	20
893	Glycoprotein gp2	<i>Equine herpesvirus 1</i>	180	21
898	Salivary glue protein SGS-3 precursor	<i>Drosophila yakuba</i>	180	22
909	Ejaculatory bulb protein III	<i>Drosophila melanogaster</i>	156	46
924	Breast basic conserved protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	165	39
930	Similar to Epstein-Barr virus genome	<i>Oryza sativa</i>	330	28
970	Hypothetical protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	171	52
971	Vector			
972	Protein BYJ15	<i>Nicotiana tabacum</i>	102	61
974	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	<i>Shewanella oneidensis MR-1</i>	177	27
975	Hypothetical protein	<i>Mus musculus</i>	180	43
976	Histone acetyltransferase	<i>Homo sapiens</i>	180	64
978	Putative transport protein	<i>Escherichia coil</i> <i>K12</i>	180	56
979	Elongation factor-1 alpha	<i>Papilio indra</i>	180	44
980	Thiamine biosynthesis oxidoreductase	<i>Mesorhizobium loti</i>	144	33
981	Antennal-enriched UDP- glycosyltransferase	<i>Drosophila melanogaster</i>	138	40
983	Beta-glucosidase	<i>Clostridium scetobutylicum</i>	134	25
984	Prolidase	<i>Caenorhabditis elegans</i>	180	45
985	Ribosomal protein S7	<i>Spodoptera frugiperda</i>	180	65
987	Superoxide dismutase precursor	<i>Xylella fastidiosa</i>	105	45
988	ABC transported MDR-type, ATPase component	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	165	30
991	Sulfate ABC transporter	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	123	43
996	Phopholipase A1	<i>Eastern yellowjacket</i>	135	37
999	Expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	171	30
1000	Outer membrane receptor prha signal peptide protein	<i>Ralstonia solanacearum</i>	143	31

Table 3. Continued

clone	Putative identification	species	Overlength (length)	Homology (%)
1001	Cops7b protein	<i>Mus musculus</i>	150	36
1003	Ankyrin repeat acidic protein cactus	<i>Drosophila melanogaster</i>	135	42
1004	Predicted protein	<i>Necurospora crassa</i>	159	33
1006	Hypothetical membrane protein P43	<i>Shigella flexneri 2a str. 2457T</i>	78	61
1007	Vector			
1008	prolyl-tRNA synthetase	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	126	37
1009	Hypothetical protein ychO	<i>Escherichia coli CFT073</i>	180	70
1012	Trysin	<i>Blomia tropicalis</i>	180	51
1013	Epidermal growth factor receptor precursor	<i>Homo sapiens</i>	126	35
1016	Trypsin precursor	<i>Simulium vittatum</i>	156	34
1017	Unnamed protein product	<i>Mus musculus</i>	120	35
1018	Cervical cancer oncogene 10 protein	<i>Homo sapiens</i>	58	159
1020	ATP citrate lyase	<i>Drosophila melanogaster</i>	180	56
1021	Protein of unknown function	<i>Sireptococcus agalactiae 2603V/R</i>	147	28
1023	Probable light induced protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	180	38
1024	polysialyltransferase	<i>Mesocricetus auratus</i>	129	34
1030	Vector			
1031	Metastasis associated 1-like protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	63	71
1032	Putative LACI-type transcriptional regulator	<i>Escherichia coli K21</i>	180	48
1033	Replication origin activator 2-related	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	135	33
1034	Cytochrome P450	<i>Trichogramma cacoeciae</i>	252	71
1035	Cytochrome C	<i>Trypanosome buucei</i>	239	93
1039	extensin	<i>Lycopersicon esculentum</i>	165	25
1040	Hypothetical protein	<i>Magnetococcus sp. MC-1</i>	150	31
1043	Putative dTDP-glucose enzyme	<i>Shigella flexneri 2a str.2457T</i>	102	88
1045	Prion protein	<i>Sigmodon fulviventer</i>	171	31
1050	Ribosomal protein L18	<i>Spodoptera frugiperda</i>	180	81
1051	Sp7 transcription factor(osterix)	<i>Rattus norvegicus</i>	117	39
1056	Cytochrome P450-4g15	<i>Drosophila melanogaster</i>	114	52
1057	Vector			
1061	Hypothetical protein	<i>Neurospora crassa</i>	96	40
1063	L-lactate 2-monoxygenase	<i>Caulobacter crescentus CB15</i>	105	37
1065	vitellogenin	<i>Pimpla nipponica</i>	90	53
1068	Hypothetical protein	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	177	27
1070	Elastin like protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	72	57
1072	Vector			
1076	Integrase protein, degenerate	<i>Neisseria meningitidis MC58</i>	98	36
1077	Putative periplasmic protein	<i>Campylobacter jejuni</i>	177	28
1149	Putative coiled-coil protein	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	144	35
1150	Hypothetical protein, conserved	<i>Plasmodium falciparum 3D7</i>	53	30
1154	Iron regulatory protein 1A	<i>Drosophila melanogaster</i>	135	68
1159	Protease P27	<i>Hypocrea lixii</i>	93	48
1163	Ubiquitin-53aa extension protein	<i>Spodoptera exigua</i>	180	61
1165	60S acidic ribosomal protein P2	<i>Spodoptera frugiperda</i>	174	77
1171				
1175	Transcription- repair coupling factor	<i>Shigella flexneri 2a str.2457T</i>	177	91
1176	Trypsin	<i>Drosophila heteroneura</i>	150	56
1177	Alanine recemase	<i>Escherichia coli</i>	178	58
1180	Malate dehydrogenase	<i>Drosophila melanogaster</i>	180	36
1187	asparagine tRNA synthetase	<i>Shigella flexneri 2a str.301</i>	177	58
1193	Exoribonuclase II	<i>Escherichia coli CFT073</i>	66	100

Table 4. Summary of the expressed sequence tags isolated from the cDNA library of the spider, *Araneus ventricosus*

Clone	Putative identification	Species	Overlength (bp)	Homology (%)
323	Ribosomal protein S11	<i>Plasmodium falciparum</i>	267	47
337	Cleavage stage histone H2B	<i>Psammechinus miliaris</i>	198	92
531	AMV 219	<i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i>	153	54
832	Cytochrome C oxidase subunit VIc	<i>Homo sapiens</i>	196	70
673	R26529_2	<i>Fomo sapiens</i>	258	74
132	Histone H2B	<i>Psammechinus miliaris</i>	237	93
1386	NADH dehydrogenase subunit 4	<i>Hypsiglena torquata</i>	247	38
1417	Astacin like metalloendopeptidase	<i>Coturnix japonica</i>	204	57
1482	Tissue factor pathway inhibitor 2	<i>Homo sapiens</i>	110	62
710	AE006141	<i>Pasteurella multocida</i>	162	51
1395	Saxphilin precursor	<i>Rana catesbeiana</i>	237	44
1401	Orf265_2	<i>Paramecium aurelia</i>	99	65
1424	Bv8 variant 3 precursor	<i>Mus musculus</i>	123	40
1	F16M14.8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	183	38
8	LORF9	<i>Gallid herpesvirus 2</i>	105	57
9	CG3604	<i>Drosophila melanogaster</i>	72	91
44	RAD23 homolog B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	108	46
54	MAL3P2.2	<i>Plasmodium falciparum</i>	135	55
93	Transforming growth factor beta 1 precursor	<i>Xenopus laevis</i>	132	58
75	CG10031	<i>Drosophila melanogaster</i>	132	68
79	Trypsin inhibitor	<i>Indian cobra</i>	153	46
86	Tissue factor pathway inhibitor 2	<i>Homo sapiens</i>	129	60
90	Tissue factor pathway inhibitor 2	<i>Mus musculus</i>	63	67
102	Proteinase inhibitor	<i>Sarcophaga bullata</i>	162	66
107	CG13748	<i>Drosophila melanogaster</i>	105	51
98	6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase	<i>Rattus norvegicus</i>	288	75
113	Cytochrome b	<i>Cryptotermes brevis</i>	284	80
115	Apoprotein A2	<i>Porphyra purpurea</i>	144	49
118	Proteinase inhibitor	<i>Sarcophaga bullata</i>	81	59
119	40S ribosomal protein S23	<i>Brugia malayi</i>	245	88
125	Ribosomal protein S4	<i>Plasmodium falciparum</i>	297	44
147	ADP/ATP translocase	<i>Drosophila melanogaster</i>	208	78
148	Catechol 1,2-dioxygenase	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	138	38
163	Insulin-like growth factor-binding protein 1 precursor	<i>Rattus norvegicus</i>	96	57
130	BG:DS00180.8	<i>Drosophila melanogaster</i>	153	45
245	Muscle LIM protein	<i>Epiblema scudderiana</i>	247	87
243	Phosphoglycerate dehydrogenase	<i>Oryza sativa</i>	108	60
251	LEK1	<i>Mus musculus</i>	351	52
270	Vng1894c	<i>Halobacterium sp.</i>	117	53
271	Defender against cell death 1	<i>Xenopus laevis</i>	180	59
272	F46H5.7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	99	54
261	Vir B11	<i>Aeropyrum pernix</i>	168	49
287	Alpha-N-acetylglucosaminidase	<i>Mus musculus</i>	171	66
197	Gamma-interferon inducible lysosomal thiol reductase	<i>Himo sapiens</i>	180	51
201	Xeroderma pigmentosum gene	<i>Mus musculus</i>	204	46

Table 4. Continued

Clone	Putative identification	Species	Overlength (bp)	Homology (%)
205	Cytochrome p450 2P1	<i>Fundulus heteroclitus</i>	310	47
214	UDP-glucuronyltransferase-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	84	70
218	P-type cation translocating ATPase	<i>Plasmodium falciparum</i>	267	50
221	Pectinesterase	<i>Citrus sinensis</i>	300	44
225	Nucleoside diphosphate kinase A	<i>Cavia porcellus</i>	321	60
234	CG11955 gene product	<i>Drosophila melanogaster</i>	135	55
236	Cas54_1 precursor	<i>Ranid herpesvirus</i>	123	51
329	CG8338	<i>Drosophila melanogaster</i>	159	65
439	Astacin precursor	<i>Astacus astacus</i>	282	42
431	Merpin 1 beta	<i>Rattus norvegicus</i>	159	59
432	Contains similarity to Pfam domain	<i>Caenorhabditis elegans</i>	255	54
435	Progesteron-binding protein-like	<i>Arabidopsis thaliana</i>	135	55
436	Variant-specific surface protein	<i>Giardia intestinalis</i>	90	46
426	Actin isoform A	<i>Mimosa pudica</i>	198	76
422	Gp5	<i>Lactococcus lactis</i>	156	58
409	AE006141	<i>Pasteurella multocida</i>	81	58
462	Protein kinase	<i>Mus musculus</i>	108	49
467	Transposon protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	117	51
469	Cos54_1 precursor	<i>Ranid herpesvirus</i>	183	51
479	Tissue factor pathway inhibitor 2	<i>Mus musculus</i>	224	56
498	Kynurenine 3-manooxygenase	<i>Homo sapiens</i>	113	52
483	Protease	<i>Oryzias latipes</i>	87	43
484	Hypothetical protein, PFC0905C	<i>Plasmodium falciparum</i>	203	48
489	Proteasome subunit C10-11	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	213	86
485	CG14028	<i>Drosophila melanogaster</i>	99	84
1405	Yjr070cp	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	255	68
1418	Heat-labile hemolysin	<i>Virrio mimicus</i>	108	54
1423	CG6763	<i>Drosophila melanogaster</i>	201	68
1465	High choriolytic enzyme 2 precursor	<i>Oryzias latipes</i>	186	56
1476	CG18810	<i>Drosophila melanogaster</i>	153	52
529	Choriolysin H	<i>Oryzias latipes</i>	197	68
516	CAAX BOX 1	<i>Homo sapiens</i>	346	57
522	Tissue factor pathway inhibitor 2	<i>Mus musculus</i>	65	63
528	Metalloproteinase 1	<i>Hydra vulgaris</i>	122	58
1047	Hypothetical protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	107	64
1004	Unnamed proteinproduct	<i>Homo sapiens</i>	278	48
1137	Cell cycle protein p55CDC	<i>Rattus norvegicus</i>	389	76
1715	Cuticle protein	<i>Bombyx mori</i>	246	48
1713	IgG Fc binding protein	<i>Homo sapiens</i>	131	57
1707	Selectin, Platelet	<i>Rttus norvegicus</i>	147	51
1692	Voltage-gated sodium channel	<i>Takifuge pardalis</i>	128	57
1571	Heat shock factor 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	234	50
1642	3-hydroxyacyl-coA dehydrogenase precursor	<i>Sus scrofa</i>	363	63
1544	CG5184 gene product	<i>Drosophila melanogaster</i>	177	63
1566	CG16781 gene product	<i>Drosophila melanogaster</i>	336	73
1854	Glycoprotein hormone receptor II	<i>Drosophila melanogaster</i>	137	58

Table 4. Continued

Clone	Putative identification	Species	Overlength (bp)	Homology (%)
4188	Hypothetical protein yoaS	<i>Bacillus subtilis</i>	156	47
4195	Translatory controlled tumor protein	<i>Lumbricus rubellus</i>	66	81
4240	CG8237	<i>Drosophila melanogaster</i>	159	70
4253	Metalloproteinase	<i>Hydra vulgaris</i>	306	62
1556	PBR113	<i>Rat cytomegalovirus</i>	66	67
4293	Alpha2-macroglobulin protein	<i>Limulus</i> sp.	269	53
4286	LD21719	<i>Drosophila melanogaster</i>	219	62
4313	F28F9.1 protein	<i>Caenorhabditis elegans</i>	216	49
4301	CG5715	<i>Drosophila melanogaster</i>	366	42
4398	TEP2 protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	213	62
2679	Putative secreted effector protein	<i>Escherichia coli</i>	162	53
4391	CG9686	<i>Drosophila melanogaster</i>	273	53
4416	Fibroin-1	<i>Araneus diadematus</i>	182	56
4511	Alpha-2 macroglobulin	<i>Limulus</i> sp.	384	52
4476	Ribosomal protein S11	<i>Plasmodium falciparum</i>	246	47
4649	Odorant receptor S50	<i>Mus musculus</i>	132	52
4656	CG15786	<i>Drosophila melanogaster</i>	246	47
4665	Proteasome subunit	<i>Rattus norvegicus</i>	225	94
4499	DJ54B20.4	<i>Homo sapiens</i>	309	65
4543	Homocyanin subunit	<i>Eurypelma californicum</i>	210	84
4487	Major tail protein	<i>Escherichia coli</i>	329	84
4527	Ribosomal protein	<i>Plasmodium falciparum</i>	204	48
4636	Mucin glycoprotein	<i>Mus musculus</i>	171	44
4496	E-selectin precursor	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	264	38
4503	Hypothetical protein, PFC0905C	<i>Plasmodium falciparum</i>	204	48
4659	60S ribosomal protein L7A	<i>Gallus gallus</i>	303	87
4665	Ribosomal protein S11	<i>Plasmodium falciparum</i>	246	47
4694	CG1534	<i>Drosophila melanogaster</i>	348	86
4769	Metalloproteinase 1	<i>Hydra vulgaris</i>	189	66
4768	Putative auxin efflux carrier protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	119	57
4762	DNA-directed RNA polymerase	<i>Plasmodium falciparum</i>	213	49
4872	thyroglobulin	<i>Mus musculus</i>	243	45
4941	CO9G12.4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	174	49
4855	PcsB protein	<i>Vaccinia virus</i>	171	55
4726	Tyrosine kinase C receptor	<i>Gallus gallus</i>	246	49
4727	Hypothetical protein F08A8.4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	93	70
4867	Gilbulin-1	<i>Zea mays</i>	198	42
4832	DNA polymerase alpha 1	<i>Mus musculus</i>	57	84
4831	Thiolase	<i>Rattus norvegicus</i>	357	76
4817	GST	<i>Nematosprioides dubius</i>	255	48
4714	Predicted membrane protein	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	144	53
4704	Polypeptide deformylase	<i>Thermotoga maritima</i>	129	57
4807	NADH dehydrogenase subunit	<i>Albinaria caerulea</i>	252	59
4806	Hypothetical protein Pfc0905C	<i>Plasmodium falciparum</i>	204	48
4825	Protein-tyrosine phosphatase	<i>Homo sapiens</i>	231	60
4812	Alanine dehydrogenase	<i>Synechocystis</i> sp.	111	66

Table 4. Continued

Clone	Putative identification	Species	Overlength (bp)	Homology (%)
4994	Actin	<i>Aplysia californica</i>	216	97
4926	Bv8 protein	<i>Bombina variegata</i>	174	46
4900	Cystatin C precursor	<i>Mus musculus</i>	279	48
4880	Alternative oxidase precursor	<i>Sauromatum guttatum</i>	384	37
4963	CG6696	<i>Drosophila melanogaster</i>	246	52
4964	Putative nucleic acid binding protein	<i>Aryza sativa</i>	181	48
4893	Homoglobin alpha-3 chain	<i>Silurana tropicalis</i>	255	43
4898	L-cystatin	<i>Tachyphila trimesurus</i>	288	41
4930	Tat	<i>Human immunodeficiency virus</i>	78	60
4977	Fibriogen-binding protein	<i>Staphylococcus aureus</i>	195	55
4959	Testican-3 protein	<i>Mus musculus</i>	174	46
4935	Peptide transport protein	<i>Candida albicans</i>	138	46
5013	Esterase/lipase Vb1F	<i>Vibrio cholerae</i>	147	69
5114	CG14823	<i>Drosophila melanogaster</i>	174	52
5107	Hypothetical protein 20kDa	<i>Gallus gallus</i>	171	48
5035	Proteinase inhibitor	<i>Sarcophaga bullata</i>	96	78
5086	Span protein precursor	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	216	60
5081	Hypothetical protein V37E3.4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	93	77
5117	Decidual prolactin-related protein	<i>Rattus norvegicus</i>	171	54
5068	Cystatin precursor	<i>Tachypleus trimesurus</i>	267	50
5146	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	<i>Pyrococcus abyssi</i>	165	49
5151	CG6550	<i>Drosophila melanogaster</i>	270	73
5165	Preprosomatostatin 28	<i>Carassius auratus</i>	90	69
5168	Collagen protein	<i>Suberites domuncula</i>	141	51
5172	Hypothetical protein C43H8.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	111	80
5200	Hypothetical protein PFC0240c	<i>Plasmodium falciparum</i>	204	50
5195	Conserved hypothetical protein	<i>Chlamydia muridarum</i>	111	66
5216	Flagelliform silk protein	<i>Nephila madascariensis</i>	174	36
5161	nucleolin	<i>Xenopus laevis</i>	276	56
5158	Reticulocyte-binding protein 2	<i>Plasmodium vivax</i>	99	60
5198	Hypothetical protein T22G5.6	<i>Caenorhabditis elegans</i>	141	71
5218	Tu translation elongation factor	<i>Homo sapiens</i>	456	62
5219	Short-chain dehydrogenase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93	73
5228	Putative histone	<i>Agaricus bisporus</i>	159	59
5229	Amylo-1,6-glycosidase	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	147	81
5233	40S ribosomal protein S20	<i>Ictalurus punctatus</i>	233	88
5236	Blastula protease-10	<i>Paracentrotus lividus</i>	96	77
5242	Putative RNA binding protein	<i>Rattus norvegicus</i>	158	59
5255	Ymf77	<i>Tetrahymena thermophila</i>	192	53
5271	ATP synthase A subunit	<i>Pemphigus spyrothecae</i>	317	73
5283	Major merozoite surface antigen- malaria parasite	<i>Plasmodium falciparum</i>	111	63
5286	Ribosomal protein S2	<i>Plasmodium falciparum</i>	210	52
5289	N-type calcium channel alpha 1	<i>Mus musculus</i>	144	52
5297	Cytochrome P450 monooxygenase	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	117	71
5320	DNA-directed RNA polymerase II largest chain	<i>Norsema locustae</i>	159	52
5312	Awaiting functional assignment	<i>Arabidopsis thaliana</i>	153	58

Table 4. Continued

Clone	Putative identification	Species	Overlength (bp)	Homology (%)
5325	Hypothetical protein PH1825	<i>Pyrococcus horrikoshii</i>	120	62
5334	MHC class II-associated invariant chain	<i>Gallus gallus</i>	174	59
5372	30S ribosomal protein S12	<i>Aeropyrum pernix</i>	126	80
5340	Filament-interacting protein	<i>Dictyostelium discoideum</i>	201	45
5342	Collagen	<i>Ascaris suum</i>	117	56
5348	Olfactory receptor	<i>Rana esculenta</i>	276	44
5400	Ribosomal protein S23	<i>Spodoptera frugiperda</i>	174	96
1739	AGP-C-3630p	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99	51
1560	DNA binding protein	<i>Metanthermobacter thermautotrophicus</i>	111	61
1860	Hypothetical protein PFC0905C	<i>Plasmodium falciparum</i>	204	48
1914	Heme oxygenase-2 non-reducing isoform	<i>Rattus norvegicus</i>	171	47
1906	DNA-dependent RNA polymerase II	<i>Trichophyton rubrum</i>	230	41
2184	Putative delta-7-sterol reductase	<i>Castanea sativa</i>	132	54
2066	DNA polymerase II subunit gamma	<i>Streptomyces coelicolor</i>	159	38
2308	Gamete-specific hydroxyproline-rich glycoprotein a2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	213	32
2600	Unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	96	58
2715	Predicted coding region	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	240	48
2725	Zinc carboxypeptidase A	<i>Anopheles gambiae</i>	169	73
2760	Hypothetical protein 1	<i>Equine herpesvirus 4</i>	144	51
2809	Utrophin	<i>Rattus norvegicus</i>	126	58
2897	Immunoglobulin A1 protease precursor	<i>Haemphilus influenzae</i>	81	59
2930	Hypothetical protein PFC0905C	<i>Plasmodium falciparum</i>	204	48
2800	Cell division protein	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	204	46
3035	Voltage-gated sodium channel homolog BdNaI	<i>Bdellooura candida</i>	165	41
3049	Acyltransferase	<i>Mesorhizobium loti</i>	231	39
3076	FliV-like protein	<i>Aeromonas punctata</i>	144	58
3062	Putative maturase	<i>Asterella tenella</i>	117	58
3114	Hypothetical protein F08A8.4	<i>Caenorhaditis elegans</i>	93	70
3230	Hypothetical protein PFC0905C	<i>Plasmodium falciparum</i>	294	48
5153	Unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	159	54
95	Kalichludine 1	<i>Anemonia sulcata</i>	167	68
129	Potassium channel blocking toxin	<i>Centruroides limpidus</i>	85	56
1882	Sligene product	<i>Drosophila melanogaster</i>	285	51
1888	Exportin	<i>Homo sapiens</i>	189	78
1955	IgG Fe protein	<i>Homo sapiens</i>	141	57
1882	Sligene product	<i>Drosophila melanogaster</i>	285	51
2776	Cystein precursor	<i>Tachypleus trimesurus</i>	267	50
2917	Metalloproteinase I	<i>Hydra vulgaris</i>	312	61
2920	Exonuclease ABC subunit B	<i>Mycobacterium leprae</i>	132	49
2932	Cell division protein	<i>Streptococcus pyogenes</i>	183	48
2975	Myosin heavy chain	<i>Rattus sp.</i>	110	70
2957	Cytochrome B	<i>Blackburnia kauwa</i>	315	63
3510	Hypothetical protein:15173-12677	<i>Arabidopsis thaliana</i>	119	61

Table 4. Continued

Clone	Putative identification	Species	Overlength (bp)	Homology (%)
4568	Serum/glucocorticoid regulated kinase	<i>Squalus acanthias</i>	396	67
4488	CG10280	<i>Drosophila melanogaster</i>	81	65
4561	CG6763	<i>Drosophila melanogaster</i>	237	51
4565	Endosialin	<i>Mus musculus</i>	156	45
4567	Chitinase	<i>Streptomyces coelicolor</i>	114	51
5185	DNA binding protein Gt-2	<i>Oryza sativa</i>	126	47
5186	Cytolethal distending toxin subunit A precursor	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	156	59
5214	Hypothetical protein PFC0875W	<i>Plasmodium falciparum</i>	120	49
5207	AMV 219	<i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i>	153	54
5203	Developmental protein tolkin	<i>Drosophila melanogaster</i>	126	57
3248	Hypothetical protein F32D8.3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	184	60
3289	Tenascin	<i>Homo sapiens</i>	87	58
3305	AMV 219	<i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i>	153	54
3262	Crystallin, alpha binding protein	<i>Mus musculus</i>	108	55
3311	Hypothetical protein F59E11.6	<i>Caenorhabditis elegans</i>	204	40
3376	Ribosomal protein S11	<i>Plasmodium falciparum</i>	246	47
2588	Defensin B	<i>Ornithodoros moubata</i>	153	43
2654	Metalloproteinase I	<i>Hydro vulgaris</i>	207	69
3290	Elastin like protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	42	100
4199	Slit protein	<i>Drosophila melanogaster</i>	225	47
4130	AMV 219	<i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i>	153	54
3638	Chordin	<i>Danio rerio</i>	246	42
3584	CG6696	<i>Drosophila melanogaster</i>	144	54
4559	Tryptophanyl-Trna synthase	<i>Carsonella ruddii</i>	165	47

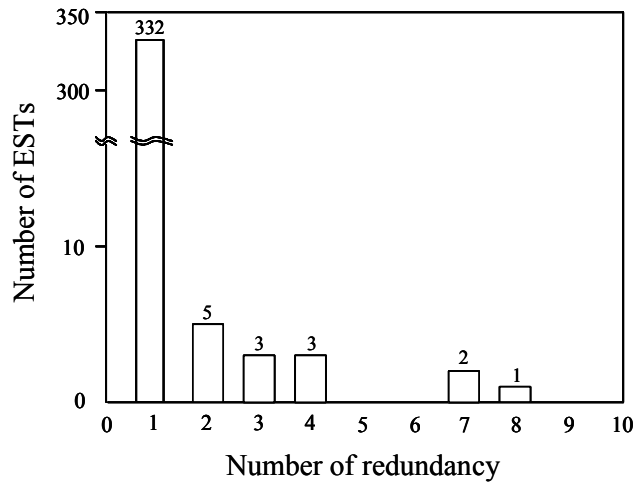


Fig. 1. Frequency distribution of ESTs showing redundancy in 385 clones. The number of the EST clones is given above each bar.

다. 곤충유래 살충성 독소가 포함된 다각체를 생산하는 베쿨로바이러스 제작

cDNA 유전자은행 탐색을 통해 확보한 5개의 유전자를 전이벡터인 pBacPAK9에 클로닝하여 pBacPAK9-PrSP, pBacPAK9-BiLP, pBacPAK9-BiVP, pBacPAK9-AvTox1과 pBacPAK9-AvTox2를 제작하고 재조합 베쿨로바이러스 제작에 사용하여 pApNPV-PrSP, pApNPV-BiLP, pApNPV-BiVP, pApNPV-AvTox1 및 pApNPV-AvTox2를 만들었다 (그림 2). 5개의 살충성 유전자를 포함하는지 여부를 유전자 특이 primer로 PCR 수행하여 각각의 유전자들이 포함되어 있음을 확인하였다 (그림 3).

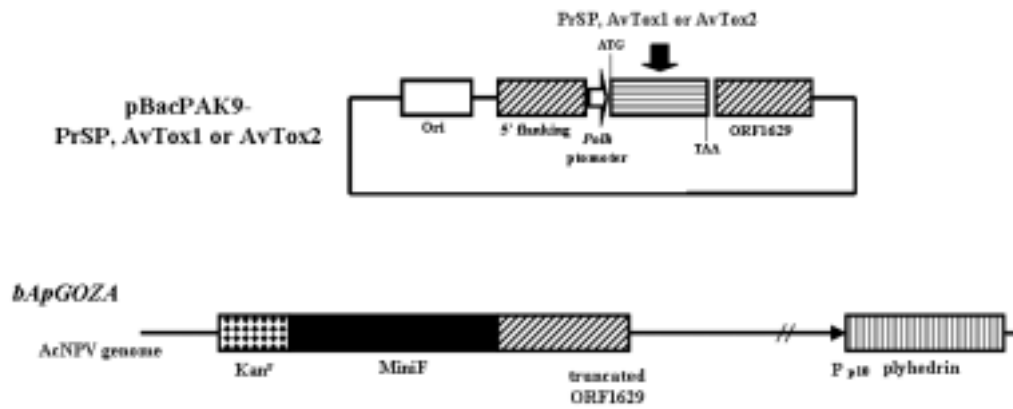


Fig. 2. Construction of transfer vector and recombinant AcNPV.

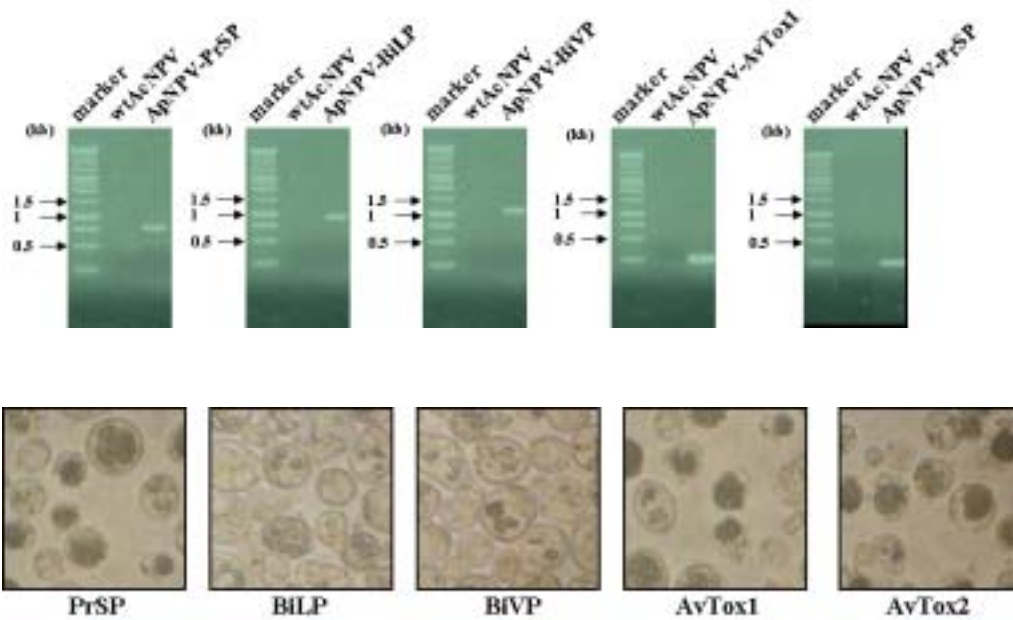


Fig. 3. PCR analysis of genomic DNA of recombinant AcNPVs and Photograph of cells infected with recombinant AcNPVs.

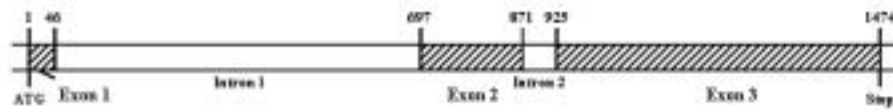
라. 독소 유전자들의 특성 분석

1) 늦반딧불이 serine protease 유전자의 구조 분석과 발현 및 효소활성 측정

가) 게놈 DNA 추출, *PrSP* 유전자의 PCR 그리고 Southern blot 분석

PrSP 유전자의 genomic structure를 알아보기 위하여 *PrSP* 특이적인 primer를 제작하고 PCR을 수행하여 하나의 band를 확보하고 염기서열을 밝혔다. 그 결과, cDNA 상의 coding 영역을 100% 확인할 수 있었으며 그 genomic 구조는 그림 3에 나타내었다. Genomic DNA는 개시코돈에서 종결코돈까지 1,474 bp의 염기서열로 2개의 intron과 3개의 exon으로 구성되어 있으며 (그림 4a), exon-intron의 경계영역에는 모든 진핵생물에서 변화 없이 나타나는 intron 5'의 GT 그리고 intron 3'의 AT가 있음을 확인하였다 (그림 4b). 무척추동물에서 보이는 세 개의 촉매영역인 Asp/His/Ser와 여섯 개의 Cys 잔기도 exon 2와 3에 잘 보존되어 있었다 (Kraut 1977, Lehane *et al.*, 1988, Yan *et al.*, 2001).

(A)



(B)

Exon	Length of exon (bp)	Position in gene	Sequence of exon-intron junction
1	46	1-46	AATGTCGAAATTT.....CTTCCCTCTCgTaaqTtgaacCAT M F K I L A V D
2	175	697-871	tttcaaatcttagtctccacgcttcc.....TCCGCGCCTTgTaaqTtgaacg A R P L C T H L
3	550	925-1474	tttggttatagtccttccacgcttcc.....CATGCTGAAATca R S A S I H S R E Stop

Fig. 4. Genomic organization of *PrSP*. (a) Schematic drawing of genomic structure of *PrSP*. Solid and open boxes represent exons and introns, respectively. Numbers indicate the nucleotide position in the genomic sequences. The GenBank Accession Number of the genomic sequences of *PrSP* is AY927992. (b) Length of exons and exon-intron boundaries.

P. rufa 게놈 DNA 상에 *PrSP* 유전자의 copy number를 알아보기 위하여 *PrSP* 유전자를 자르지 않는 제한효소를 처리하여 Southern blot을 실시하였다. 그 결과, 그림 5에서 보는 바와 같이 4개의 제한효소에 대하여 각각 single band로 나타났으며 이는 *PrSP* 유전자가 single copy로 존재함을 나타낸다.

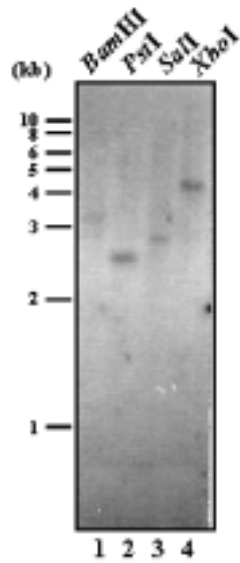


Fig. 5. Southern blot analysis of *P. rufa* genomic DNA for *PrSP* gene. Genomic DNAs were digested with four restriction enzymes, *Bam*HI (lane 1), *Pst*I (lane 2), *Sal*I (lane 3) and *Xho*I (lane 4), respectively, and hybridized with radiolabeled *PrSP* cDNA. Size markers are shown on the left.

나) 재조합 베콜로바이러스를 이용한 발현 및 SDS-PAGE

PrSP cDNA를 발현시키기 위하여, 771 bp의 *PrSP*를 전이벡터인 pBacPAK9의 polyhedrin promoter 하에 클로닝하고 재조합 베콜로바이러스인 AcNPV-*PrSP*를 제작하였다. 이 재조합 베콜로바이러스 AcNPV-*PrSP*를 곤충세포 Sf9에 감염시키고 SDS-PAGE (그림 6a)와 Western blot 분석 (그림 6b)을 실시하였다. 재조합 단백질 PrSP는 mock- 그리고 wtAcNPV를 감염시킨 곤충세포에서는 나타나지 않고 AcNPV-*PrSP*를 감염시킨 곤충세포에서만 약 31 kDa으로 나타났다. 0.1% gelatin을 함유한 SDS-polyacrylamide gel에서 역시 약 31 kDa 부위에서 lytic zone (그림 6c)을 확인할 수 있는데 이는 재조합

베쿨로바이러스에서 발현된 재조합 단백질 PrSP가 protease 기능을 가지고 있음을 알 수 있다.

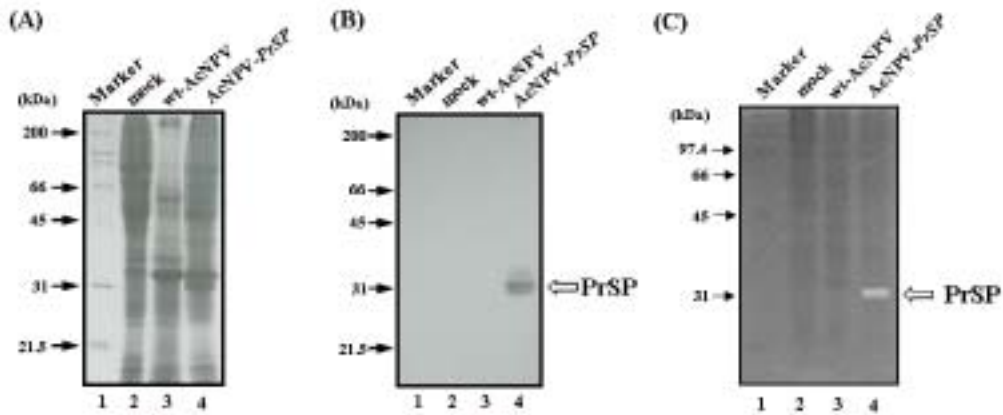


Fig. 6. SDS-PAGE, Western blot analysis and proteolytic activity assay of the recombinant PrSP expressed in the baculovirus-infected insect cells. Sf9 cells were mock-infected (lane 2) or infected with wild-type AcNPV (lane 3) and recombinant AcNPV (lane 4) at a MOI of 5 p.f.u. per cell. Cells were collected at 3 days p.i. Total cellular lysates were subjected to 10% SDS-PAGE (a), electroblotted and incubated with recombinant PrSP antibody (b). The same cellular lysates as in panel (a) were separated by 10% SDS-PAGE containing 0.1% gelatin. The proteins with proteolytic activity are identified as lytic zones (c). The recombinant PrSP in indicated by arrow on the right side of the panel. Molecular weight standards were used as size marker (lane 1).

다) PrSP의 조직 특이적 발현

PrSP가 조직 특이적으로 발현되는지 알아보기 위하여 *P. rufa*의 표피, 지방체,

혈림프, 발광기 그리고 중장을 해부하여 각각의 단백질 sample을 10% (v/v) SDS-PAGE (그림 7a)를 실시하고 Western blot 분석 (그림 7b)을 하였다. 그 결과, 다른 조직에서는 없고 오직 중장조직에서만 약 31 kDa의 signal band가 확인되었는데 이는 PrSP가 중장 특이적으로 발현되는 유전자임을 나타낸다. 효소활성을 위한 proteolytic assay에서도 역시 약 31 kDa에서 lytic zone (그림 7c)이 나타났는데 이는 중장이 PrSP 발현에 있어 주요 조직임을 나타낸다. 그러나 중장 proteolytic activity에서 31 kDa과 24 kDa의 2개의 band가 나타나는데 이는 *P. rufa*의 중장에서 발현되는 다른 종류 protease의 하나인 것으로 사료되어진다. 그리고 결론적으로 Western blot 분석과 proteolytic activity 조사에서 본 연구에서 찾은 PrSP는 중장에서 조직 특이적으로 발현되고 소화효소의 하나로 추측되어지는데 베클로바이러스를 이용한 잠재적 해충 방제제로 유용하리라 사료되었다.

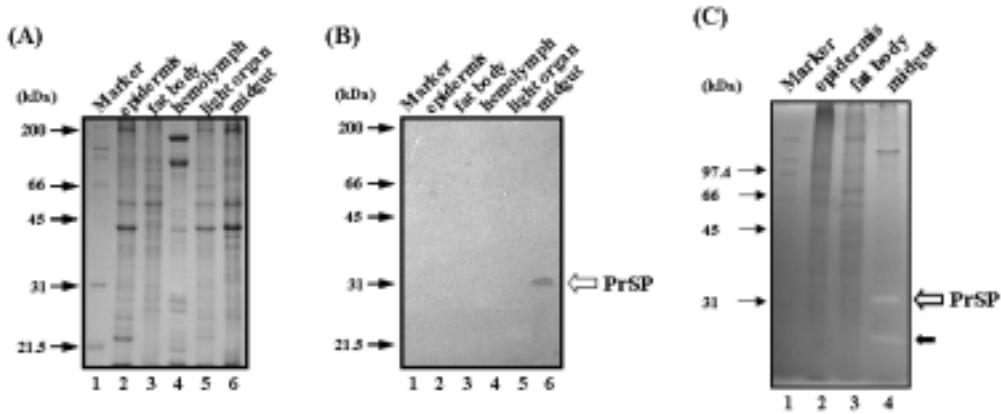


Fig. 7. Tissue-specific expression of PrSP. The protein samples were collected from epidermis (lane 2), fat body (lane 3), hemolymph (lane 4), light organ (lane 5), and midgut (lane 6) of *P. rufa* larvae. The protein samples were subjected to 10% SDS-PAGE (a), electroblotted and incubated with recombinant PrSP antibody (b). The epidermid (lane 2), fat body (lane 3) and midgut (lane 4) among the protein samples of panel (a) were separated by 10% SDS-PAGE containing 0.1% gelatin. The proteins with proteolytic activity are indicated as lytic zones (c). The PrSP (open arrow) and signal bands showing proteolytic activity (solid arrow) are indicated on the right side of the panel. Molecular weight standards were used as size marker (lane 1).

2) 호박벌유래 lipase와 venom protease 유전자의 구조 및 특성 분석

가) Lipase

B. ignitus cDNA 유전자은행에서 찾은 lipase 유전자인 *BiLP* cDNA의 전체 염기서열을 밝힌 결과, 총 954 bp이고 317개의 아미노산으로 구성되어 있는데

기존에 GenBank에 보고된 다른 곤충유래 lipase와 비교하였다 (그림 8). 그림 9와 같이 lipase family의 활성영역인 GX SXG가 잘 보존되어 있으며 *B. ignitus* lipase 역시 잘 보존되어 있다.

*BiLP*가 어느 조직에서 특이적으로 발현되는 지를 알아보기 위하여 지방체, 중장, 표피, 근육 그리고 독샘 조직을 해부하고 total RNA를 분리하여 Northern Blot을 실시하였다. 그 결과, 그림 10a에서와 같이 지방체에서만 특이적으로 발현되었으며 암벌, 수벌 그리고 여왕벌의 몸 전체 total RNA로부터 Northern blot 분석을 실시하였을 때 특이하게도 암벌과 여왕벌에서만 발현되었다 (그림 10b). 이러한 결과는 이 암벌과 여왕벌만이 독샘을 가지며 즉, *BiLP*가 독샘에서만 특이적으로 분비된다는 것을 유추할 수 있는데, 개미유래 lipase 유전자의 경우처럼, 특히 병정개미의 독샘 특이적으로 분비 (Kutsukake *et al.*, 2004)되는 것과 같은 원리로 이해되어진다. 이 유전자의 살충제로의 검정은 연구 중에 있으나 독샘 특이적으로 분비되는 단백질의 특성상 연구의 가치가 있다고 사료되었다.

```

-103                                     cggccgccccgggcaggta
-121 gcgggccgctgaattctagaaagcagattcatcagtgcgagtcggccatcattcatcagg
-61 agcggtaaagaaaggaagctgagaagtcgatctatacccggtgctatagcgaatcacg
  1 ATGACGGCCATGGTAAATGCATCATTAGTGCTATTTTATCCTACGCTGCTCTCGACGTTG
  1 M T A M V N A S L V L F Y P T L L S T L
  61 AGAGAAGCCAATTATACGATTCTACCGACCAAAGAAGGAAACCCGCTCTCTGGTTAAACTC
  21 R E A N Y T I L P T K E G N P S L V K L
  121 GATAATACCATACTAAGTGAACAGACTTGATTCTTTTCGGTGCCAATGTGGATACGATC
  41 D N T I L S E T D L I L F G A N V D T I
  181 AGTTTCACGCTTTACACGCAAAAAACAGTAAAAATGGCGACGCTTAAAGATTAATGAC
  61 S F T L Y T Q K N S K N G D V L R L N D
  241 ATAAACTCAGTTCGAAAGAGTAATTGGAACGCAACAGACAAACCATCGTGGTCACTCAC
  81 I N S V R K S N W N A N R Q T I V V T H
  301 GGTGGAATAGCAACGGACAATCTGAATCATGTACGCTCGTACGCGATGCTTTCCTTAAA
  101 G W N S N G Q S E S C T L V R D A F L K
  361 GTCGCGACTGCAACGTCATTGTGGTCGATTGGAGTCAAATAGCAGATCACAAGGATTAC
  121 V R D C N V I V V D W S Q I A D H K D Y
  421 ATCGCTGTGCAAAGAACGTACCACGCGTAGCTAGCCGCGTAGCTAGTTTCATAAATTTTC
  141 I A V A K N V P R V A S R V A S F I N F
  481 TTGCGAACTAGCGCCGGTTTGACACGTCCTCAACTTGAAAATTATTGGACACTCTCTCGGT
  161 L R T S A G L H T S N L K I I G H S L G
  541 GCCCATGTCGCCGGCTTGAGCGCGGAGAGGTAGGCAAATTGAGCCGAGTGGCGGAAGTT
  181 A H V A G L S A R E V G K L S R V A E V
  601 ATCGCGCTCGACCCTGCCAAGCCATTGTTTGAACACAAAGGAACCCGTTGAAAGAGTTGAT
  201 I A L D P A K P L F E H K G T G E R V D
  661 AAATCGGACGCACAAAATGTTCAAGTTATTACACATGCGCCGATATTTGGGTCTGGAT
  221 K S D A Q N V Q V I H T C A G Y L G L D
  721 ATCTCTGTGGTACTTCCGATTTCTTTGCCAATGATGGAAGACATCAACCAGGATCGCGG
  241 I S V G T S D F F A N D G R H Q P G C G
  781 GATGATTTGTTAGGATCTTGCGCGCATGGACGCAGTTACGAGTACTTCAGTCAATCTATT
  261 D D L L G S C A H G R S Y E Y F S Q S I
  841 ACGAATCCAAAAGCTTACCGCGGTGTAACGACAGTGGTGCAGCAGCATACATGGGTGGT
  281 T N P K A Y R G V T D S G A A A Y M G G
  901 GCTAACCTCGATCCGAAAGCTAGGGGAACCTACCACTTCAAACTAGCAGTTAAaatcct
  301 A N L D P K A R G T Y H F K T S S *
  961 tacgctcttgatggatgaaattattcgtttgagtatttaatttcgaatgtatttcaata
  1021 attgtaaggtacttgtaaaattaagaaataaattaagaagtaaatagcattcgcgatctta
  1081 ctatggcttgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Fig. 8. The nucleotide and deduced protein sequence of the *B. ignitus* lipase cDNA. The start codon is boxed and the termination codon is shown by asterisk. In the cDNA sequence, the polyadenylation sequence is underlined.

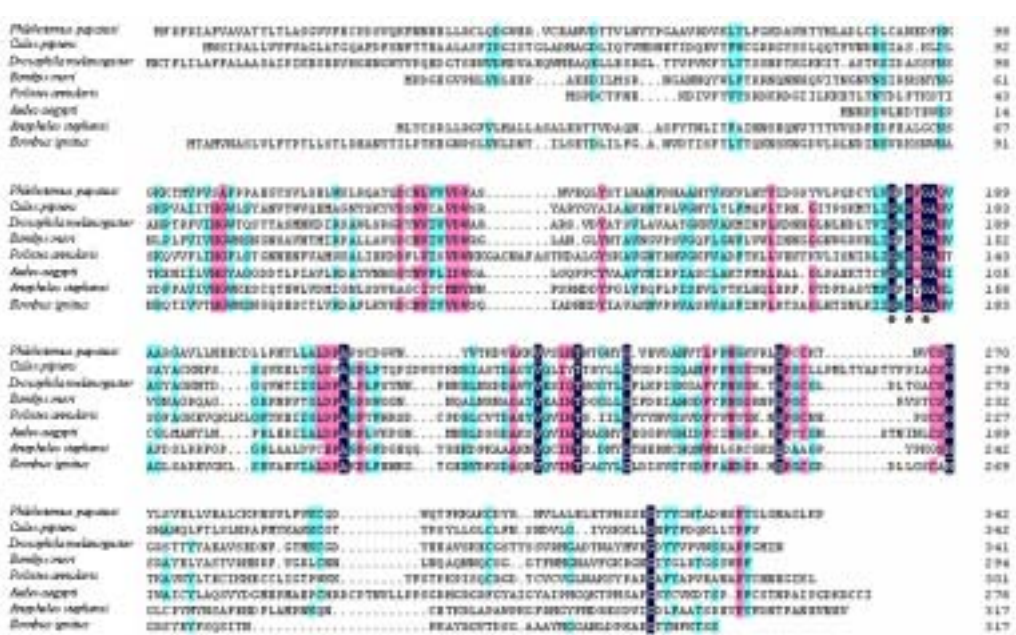


Fig. 9. Alignment of the amino acid sequence of *BiLP* with known insect lipases. The active site of the lipase family (GXSXG) is shown with asterisk. The insect lipase sequences were taken from the following sources: *B. ignitus* lipase (this study), *P. papatasi* (AY179968), *C. pipiens* (AY388560), *D. melanogaster* (AAF56653), *B. mori* (AB076385), *P. annularis* (AF174527), *A. aegypti* (AF303984), and *A. stephensi* (AY162249).

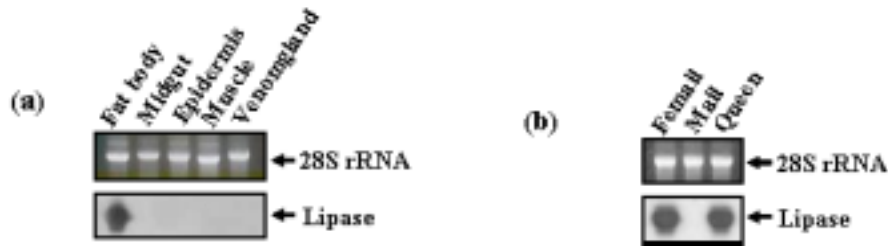


Fig. 10. Northern blot analysis of the *B. ignitus* lipase gene. Total RNAs were isolated from the fat body (lane 1), midgut (lane 2), epidermis (lane 3), muscle (lane 4), and venom gland (lane 6), respectively (a). Total RNAs were isolated from the whole body of female, male and queen (b). The RNAs were separated by 1.0% formaldehyde agarose gel electrophoresis (upper panel), transferred on to a nylon membrane, and hybridized with the radiolabelled 954 bp *B. ignitus* lipase gene (BiLP). Transcripts are indicated on the right panel by an arrow.

나) Venom protease

B. ignitus cDNA 유전자은행에서 찾은 venom protease 유전자인 *BiVP* cDNA의 전체 염기서열을 밝힌 결과, 총 1,083 bp이고 360개의 아미노산으로 구성되어 있는데 (그림 11) 기존에 GenBank에 보고된 다른 종의 호박벌과 꿀벌 유래 venom protease와 비교하였다. 그림 12와 같이 protease 관련 유전자에서만 보이는 특징을 잘 보여주고 있으며 효소 촉매 영역인 His/Asp/Ser site가 잘 보존되어 있다. 아미노산 비교에서 *B. pennsylvanicus* venom protease와 *A. mellifera* venom protease는 *BiVP*와 높은 상동성을 나타냈는데, 각각 52%와 38%의 상동성을 나타냈다.

```

110          cgcccgggcaggttgaagcaccactgtcgaagcattacaaaatattcgtaa
-61 aagtgagcatcggtgactggatctctcagttagtcgtaagtgtaagtagaagaaca
1  ATGACGGGCTCCAAGATGCTGTTTCGCATGTTGGCGTTAATGCTTTCCTGCATCCATTA
1  M T G S K M L F A C L A L I A F L H P L
61 GTTCACGTGGCGTCAGCTCAAGAATGTACCACACCGAACAAATAAAGCAGGCAAGTGTCTC
21 V H V A S A Q E C T T P N N K A G K C L
121 GGCATCAGAGTATGTAAACCGCTGCTGAAATGCTGCAGACTCAGGGCCATGCAGCTGCC
41 G I R V C K P L L E M L Q T Q G H A A A
181 GATTTCTGAGGCAATCAGTGTGTAATAACGAGAATAATAATCCGATCGTTTGTGTCGG
61 D F L R Q S V C K Y E N N N P I V C C P
241 AACGAAGAAAGCAGGGAGGACAGAGGAATTTTGGTAGGAAACGAGTATGAGCCTTTGCGT
81 N E E S R E D R G I L V G N E Y E P L R
301 CCACCACACTGTGGTTTTAGCAACGTCTCTCACACCAGGGTGGTCGGTGGTAACCCAGCT
101 P P H C G F S N V S H T R V V G G N P A
361 GTACTTGGTGCTTGGCCATGGATTGCTGCATTAGGTTTTCTGTTATCCCCGAAACCCAGCT
121 V L G A W P W I A A L G F R Y P R N P A
421 CTTGAACCACTATGGAAGTGCAGGTTCCCTGATATCGTCTAGGCATGTTTAACTGCA
141 L E P L W K C G G S L I S S R H V L T A
481 GCACATGTGCAGAAATCAATGAATTGTACGTGGTTCGTATCGGTGACTTAAATCTAGTA
161 A H C A E I N E L Y V V R I G D L N L V
541 CGAAATGACGACGGAGCACATCCTGTTCAAATAGAAATCGAATCTAAAATAATACATCCT
181 R N D D G A H P V Q I E I E S K I I H P
601 GATTATATTTCCGGAGTAACCAACATGATATCGCCATTCTTAAATTGGTGGAGGAGTG
201 D Y I S G V T K H D I A I L K L V E E V
661 CCATTTTCGGAGTACGTATATCCCATTTGTCTTCCCGTAGAGGATAACCTTCGAAATAAC
221 P F S E Y V Y P I C L P V E D N L R N N
721 AATTTTCGAGCGCTATTACCCCTTCGTTGCTGGATGGGGATCACTAGCACATCATGGACCA
241 N F E R Y Y P F V A G W G S L A H H G P
781 GGTAGTGACGATTTAATGGAAGTACAAGTGCCAGTGATTAGCAACACCGAATGCAAGAAC
261 G S D D L M E V Q V P V I S N T E C K N
841 TCTTATGCCAGATTTGCTGCTGCACATGTTACCGATACTGTATTATGCGCCGGATACTACT
281 S Y A R F A A A H V T D T V L C A G Y T
901 CAAGGCGGAAAGGATGCTTGTCAAGGTGACAGCGGAGGACCACTGATGCTACCAAAGAAA
301 Q G G K D A C Q G D S G G P L M L P K K
961 TTCACCTTCTATCAAATAGGTGTTGTGCTTATGGTCATAAGTGCGCCGAGCTGGATAT
321 F T F Y Q I G V V S Y G H K C A A A G Y
1021 CCCGGCGTTTACTAGGGTACGTCGTACCTCGACGACTTATTCTCCAGCGATGCAA
341 P G V Y T R V T S Y L D D F I L P A M Q
1081 TAAtacgattattaatgttatataaaatcatcttttcgtatccgaaaagtaaagttaaat
361 *
      ttcttattgtgggaaataaaagatagctaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Fig. 11. The nucleotide and deduced protein sequence of the *B. ignitus* venom protease cDNA. The start codon is boxed and the termination codon is shown by asterisk. In the cDNA sequence, the polyadenylation sequence is underlined.

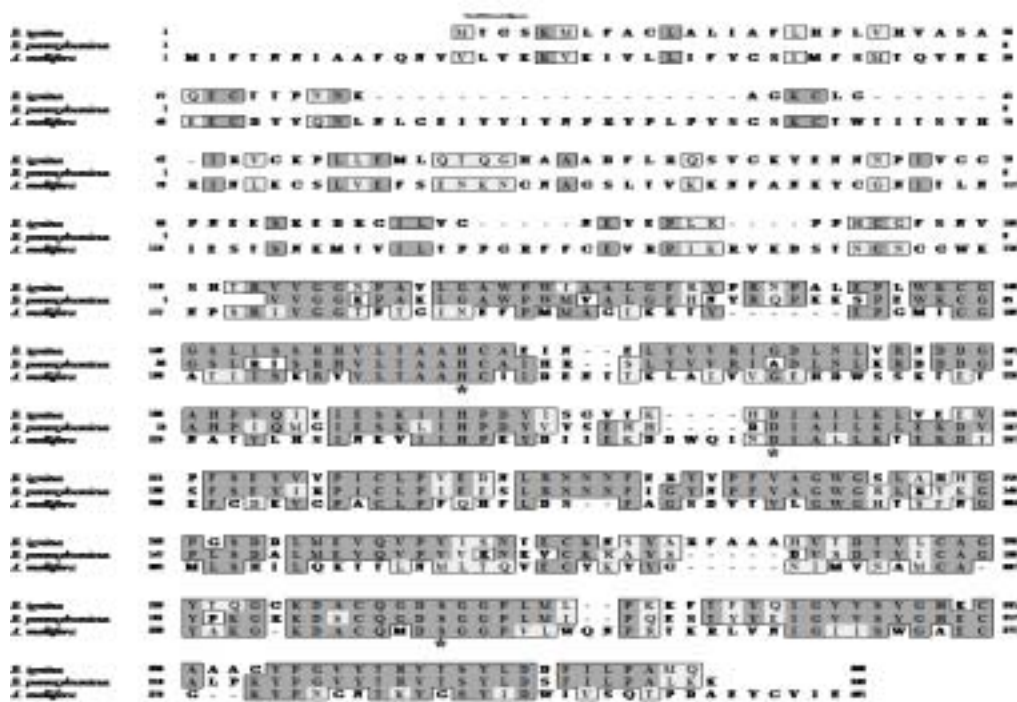


Fig. 12. Alignment of the amino acid sequence of *BiVP* with known bee venom protease. The residues of the catalytic triad (H, D, S) are indicated by asterisk. The bee venom protease sequences were taken from the following sources: *B. ignitus* venom protease (this study), *B. pennsylvanicus* (A56338) and *A. mellifera* (AY127579).

*BiVP*가 어느 조직에서 특이적으로 발현되는 지를 알아보기 위하여 지방체, 중장, 표피, 근육 그리고 독샘 조직을 해부하고 total RNA를 분리하여 Northern Blot을 실시하였다. 그 결과, 그림 13a에서와 같이 지방체에서만 특이적으로 발현되었으며 암벌, 수벌 그리고 여왕벌의 몸 전체 total RNA로부터 Northern blot 분석을 실시하였을 때 특이하게도 암벌과 여왕벌에서만 발현되었다 (그림 13b). 이러한 결과는 이 암벌과 여왕벌만이 독샘을 가지며 즉, *BiVP*가 독샘에서만 특이적으로 분비된다는 것을 유추할 수 있는데, 기존에 보고된 venom

protease 유전자가 지방체에서 발현되어 독샘으로 분비된다는 내용과 일치되리라 사료된다.

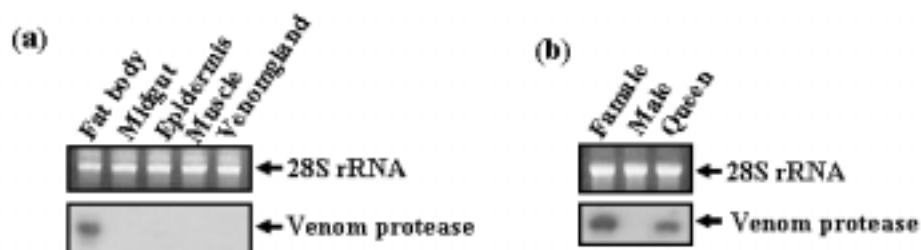


Fig. 13. Northern blot analysis of the *B. ignitus* venom protease gene. Total RNAs were isolated from the fat body (lane 1), midgut (lane 2), epidermis (lane 3), muscle (lane 4), and venom gland (lane 6), respectively (a). Total RNAs were isolated from the whole body of female, male and queen (b). The RNAs were separated by 1.0% formaldehyde agarose gel electrophoresis (upper panel), transferred on to a nylon membrane, and hybridized with the radiolabelled 1,083 bp *B. ignitus* venom protease gene (*BiVP*). Transcripts are indicated on the right panel by an arrow.

3) 거미유래 독소 유전자, *AvTox1*과 *AvTox2*의 특성 분석

A. ventricosus cDNA 유전자은행에서 발현 유전자 꼬리표 (ESTs)를 생산하여 이 중 기존에 보고된 독관련 유전자와 상동성을 보이는 2개의 유전자를 확보하고 전체염기서열을 밝힌 결과 *AvTox1*은 *Anemonia sulcata* kalicludine toxin 유전자 (Schweitz et al., 1995)와 *AvTox2*는 *Centruroides limpidus limpidus* potassium-channel blocking toxin (Martin et al., 1994)과 높은 상동성을 나타냈다. *AvTox1* 유전자는 Kalicludine toxin과 상동성을 보였는데 염기서열을

분석한 결과, 240개의 뉴클레오티드와 80개의 아미노산으로 구성되어 있었다 (그림 14a). *AvTox1*의 아미노산서열과 관련 toxin의 multi-align을 그림 14b에 나타내었다. 이것은 뱀, *Anemonica sulcata*의 Kaliccludin 유전자와 비교해 볼 때 6개의 cysteine 잔기가 잘 보존되어 있으며 *AvTox1*의 mature protein은 60개의 아미노산으로 약 6.6 kDa의 분자량일 것으로 예상된다. *AvTox2* 유전자의 경우 192개의 뉴클레오티드와 64개의 아미노산으로 구성되어 있었으며 (그림 15a), 전갈의 한 종인 *Centruroides limpidus limpidus*의 potassium-channel blocking toxin 유전자와 56%의 상동성을 보였다 (그림 15b). 이 독소 유전자는 6개의 cysteine 잔기가 있는데 *AvTox2*에서도 잘 보존되어 있었다. 이 유전자는 mature protein이 41개로 예상된다.

(A)

```
1 ATGCCTTCCACTACTTTCCCAAACCTGAATCCTATAACCTGGATCCCTGGATGGATTCCT
1 M P F H Y F P K L N P I T W I P G W I P
61 G G T T G G G T A A A G A T A G A T G C C T T C T T C C G A A G G T A A C A G G A C C T T G C A A A G C T A G T C T G
21 G L G K D R C L L P K V T G P C K A S L
121 A C C C G T T A C T A T T A T G A C A A G G A C A C C A A A G C A T G C G T G G A A T T C A T C T A C G G T G G C T G C
41 T R Y Y Y D K D T K A C V E F I Y G G C
181 A G A G G A A A C A G G A A C A A T T T C A A A C G G A A A G A T G A G T G C G A A A A A G C C T G C A C G G A T C A C
61 R G N R N N F K R K D E C E K A C T D H
241 TAA
*
```

(B)

```
AvTox1 1 M P F H Y F P K L N P I T W I P G W I P G L G K D R C L L P K V T G P C K A S L T R Y Y Y D K D T K 50
AsKC1 1 I N K D - C L L P M D V G R C R A S H P R Y Y Y N S S S K 28
AsKC2 1 I N K D - C L L P M D V G R C R A R H P Y Y Y N S S S R 28
AsKC3 1 I N G D - C E L P K V V G R C R A R F P R Y Y Y N L S S R 28
AvTox1 31 A C V E F I Y G G C R G N R N N F K R K D E C E K A C T D H 80
AsKC1 29 R C E K F I Y G G C R G N A N N F H T L E E C E K V C G V R 58
AsKC2 29 R C E K F I Y G G C R G N A N N F I I T K K E C E K V C G V R 58
AsKC3 29 R C E K F I Y G G C G I G N A N N F H T L E E C E K V C G V R S 59
```

Fig. 14. (A) The nucleotide and deduced amino acid sequences of *A. ventricosus* toxin homologue gene (*AvTox1*). The start codon of ATG is boxed and the termination codon is underlined. The deduced amino acid sequences of *A. ventricosus* toxin homologue gene (*AvTox1*) is aligned with *A. sulcata* toxin gene (B). The six conserved cysteine residues are marked by solid circles. The GenBank accession number is AY091482.

(A)

```

1  ATG|GCACTT|GCACTGCTGGGATTA|ACTATTA|AACCCGAACATGTACCGGAAGGCACCGGG
1  M A L A L L G L T I K P E H V P E G T G
61  AAAGCTGTTG|CAGATGTGGAGGCGCTGGCATGCGATCCGGCCCAATGTATGAGGTCCTGT
21  K A V A D V E A L A C D P A Q C M R S C
121 CCCTTCAATCCCTTCTTAAATCAGTACGGAGGAATTTGTAAAAACGGCCAATGCGTATGC
41  P F N P F L N Q Y G G I C K N G Q C V C
181 GTAAAACCTTCTTGA
61  V K P S *

```

(B)

```

AvTox2  1  M A L A L L G L T I K P E H V P E G T G K A V A D V E A L A C - D P A Q C M R S 39
C.limpidus 1  I T I N V K C T S P Q Q C L R P 16
● ●

AvTox2  40  C P F N P F L N Q Y G G I C K N G Q C V C V K P S 64
C.limpidus 17  C K D - R F G Q H A G G K C I N G K C K C 36
● ● ● ●

```

Fig. 15. (A) The nucleotide and deduced amino acid sequences of *A. ventricosus* toxin homologue gene (*AvTox2*). The start codon of ATG is boxed and the termination codon is underlined. The deduced amino acid sequences of *A. ventricosus* toxin homologue gene (*AvTox2*) is aligned with *C. limpidus limpidus* toxin gene (B). The six conserved cysteine residues are marked by solid circles. The GenBank accession number is AY091483.

마. 재조합 베쿨로바이러스의 목적해충에 대한 생물검정 및 살충제로의 이용가능성 분석

각각의 재조합 베쿨로바이러스의 다각체의 숫자를 counting하고 인공사료를 일정한 크기 (0.25×0.25×0.15 cm, 0.05 g)로 자르고 최적 살충농도인 1×10⁶ PFU를 인공사료 위에 뿌리고 인공사료에 다각체가 스며들도록 방치한 후, 파밤나방 한 마리가 다 섭식한 후, 다각체를 처리하지 않은 신선한 인공사료를 먹이고 매일 관찰하였으며, 대조구로서 야생형 베쿨로바이러스를 같은 조건으로 처리하여 비교

조사하였다. 생물검정 결과들은 3회 반복 실험하여 얻은 결과이다.

먼저, *P. rufa* serine protease 유전자를 베쿨로바이러스에 삽입하여 *PrSP*가 포함된 다각체를 생산하는 재조합 베쿨로바이러스의 다각체를 확보하여 과밤나방 5령 유충을 대상으로 살충성을 검정하였다. 그 결과, 그림 16에서 보는 바와 같이 과밤나방에 5일째 그리고 6일째 높은 살충력을 보였으며, 최종 살충력은 90.3%로 야생형 바이러스와 비교하여 높았다. 그리고 야생형과의 LT_{50} 을 보면 표 5에서 보는 바와 같이 130.72 시간으로 야생형과 비교하였을 때, 살충력이 빠름을 알 수 있다.

재조합 베쿨로바이러스 ApNPV-AvTox1의 과밤나방에 대한 살충력 (그림 17)은 5일째 그리고 6일째 높은 살충력을 보였으며, 최종 살충력은 97.87%로 야생형 베쿨로바이러스와 비교하였을 때, 약 20.77%가 높았다. 그리고 야생형과의 LT_{50} 을 보면 표 6에서 보는 바와 같이 124.53 시간으로 야생형에 비하여 살충력이 빠름을 알 수 있었다.

전갈의 potassium-channel blocking toxin 유전자와 유사한 구조를 가지는 *AvTox2*도 같은 방법으로 재조합 베쿨로바이러스를 제작하고 다각체를 확보하여 과밤나방을 대상으로 살충성 검정에서 5일째 그리고 6일째 높은 살충력을 보였으며, 최종 살충력은 95.8%로 야생형에 비하여 높았다 (그림 17). 그리고 야생형과의 LT_{50} 을 보면 표 7에서 보는 바와 같이 124.53 시간으로 야생형에 비하여 살충력이 높았다.

이상의 결과들과 *S. exigua*의 심각한 피해 및 생태적 특성을 고려해 볼 때, 재조합 베쿨로바이러스 ApNPV-PrSP의 경우, 야생형 베쿨로바이러스와 차이가 있었지만 AvTox1과 AvTox2 보다 효율성이 떨어졌다. 그러므로 거미유래 살충성 유전자인 AvTox1과 AvTox2는 살충제로서 유용하리라 사료되어 진다.

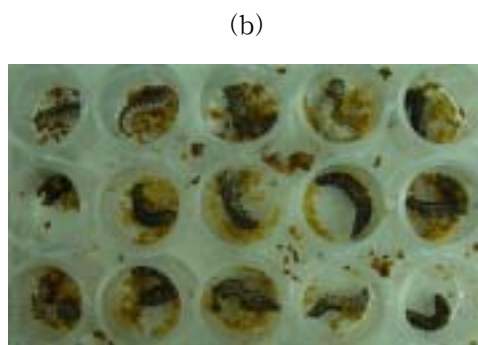
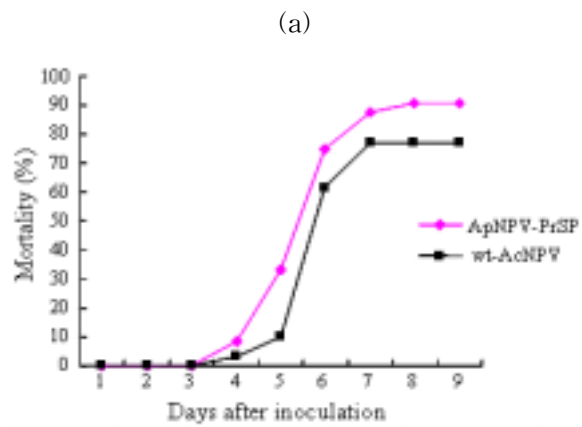
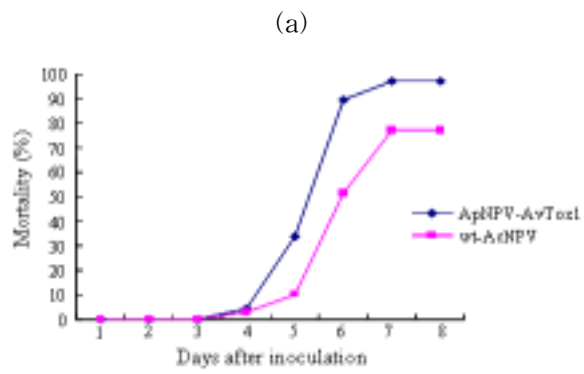


Fig. 16. Insecticidal effect of recombinant ApNPV-PrSP and wt-AcNPV baculoviruses were assayed against fifth instar larvae of *S. exigua* (a). *S. exigua* larvae treated with recombinant ApNPV-PrSP baculovirus were photographed (b).

Table 5. Lethal time and death response of fifth instar *S. exigua* larvae with recombinant baculovirus ApNPV-PrSP and wild type baculoviruse

Virus	Time to death and/or death response		
	LT ₅₀	Lower	Upper
ApNPV-PrSP	130.72	125.82	135.55
wtAcNPV	143.02	138.29	148.20



(b)

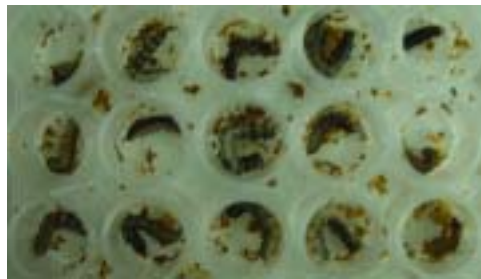


Fig. 16. Insecticidal effect of recombinant ApNPV-AvTox1 and wt-AcNPV baculoviruses were assayed against fifth instar larvae of *S. exigua* (a). *S. exigua* larvae treated with recombinant ApNPV-AvTox1 baculovirus were photographed (b).

Table 6. Lethal time and death response of fifth instar *S. exigua* larvae with recombinant baculovirus ApNPV-AvTox1 and wild type baculoviruse

Virus	Time to death and/or death response		
	LT ₅₀	Lower	Upper
ApNPV-AvTox1	124.53	120.02	128.95
wtAcNPV	143.02	138.29	148.20

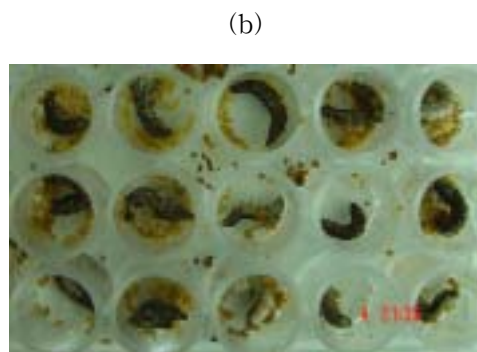
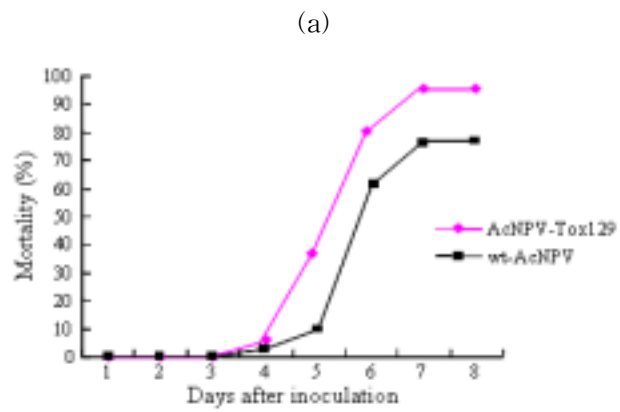


Fig. 17. Insecticidal effect of recombinant ApNPV-AvTox2 and wt-AcNPV baculoviruses were assayed against fifth instar larvae of *S. exigua* (a). *S. exigua* larvae treated with recombinant ApNPV-AvTox2 baculovirus were photographed (b).

Table 7. Lethal time and death response of fifth instar *S. exigua* larvae with recombinant baculovirus ApNPV-AvTox2 and wild type baculoviruse

Virus	Time to death and/or death response		
	LT ₅₀	Lower	Upper
ApNPV-AvTox2	125.72	121.75	129.65
wtAcNPV	143.02	138.29	148.20

3. 결론

곤충 (*P. rufa*, *B. ignitus*)과 거미 (*A. ventricosus*)로부터 cDNA 유전자은행을 제작하고 무작위로 선별한 cDNA 염기서열 결정하였다. *P. rufa*의 경우에는 모두 54개 그리고 *A. ventricosus*의 경우에는 385개의 클론에서 발현 유전자 꼬리표 (ESTs)를 생산할 수 있었다. *P. rufa* cDNA 유전자은행에서 serine protease 유전자 (*PrSP*)를, *B. ignitus*로부터 독샘 특이적인 lipase (*BiLP*) 및 venom protease (*BiVP*) 유전자를 그리고 *A. ventricosus*의 cDNA 유전자은행으로부터 2개의 독소 유전자 (*AvTox1*, *AvTox2*)를 선발하였다.

*P. rufa*로부터 찾은 serine protease 유전자의 genomic DNA구조, 발현 및 효소활성의 특성을 조사한 결과, *PrSP* 유전자는 총 1,474 bp이고 257개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 3개의 exon과 2개의 intron을 가진다. Southern blot 분석에서 *PrSP* 유전자는 single copy로 존재하였으며, Western blot 분석과 효소 활성 측정 결과 중장 조직 특이적으로 합성되어 섭취물을 소화시키는 역할을 하는 것으로 추측되었다. *PrSP* 유전자는 베칼로바이러스를 감염시킨 Sf9 세포주에서 31 kDa의 분자량으로 나타났으며, gelatin을 기질로한 효소 활성 측정에서 활성을 나타냈다.

호박벌 *B. ignitus*의 유전자은행으로부터 새로운 독샘 특이적으로 발현되는 lipase 유전자를 확보하였다. *BiLP* 유전자는 954 bp이고 317개 아미노산으로 이루어져 있는데, lipase 유전자에서 특이적으로 보이는 촉매영역인 GXSXG 잔지를 확인할 수 있었다. *BiLP* 유전자의 예상되는 아미노산 서열과 기존에 보고된 lipase와 비교했을 때, 곤충 lipase와 높은 상동성을 가졌다. Northern blot 분석에서 *BiLP*는 여왕벌과 암벌의 지방체에서만 발현되었고 이는 지방체에서 발현되어 독샘으로 분비되리라 추측되었다.

Venom protease, *BiVP*는 1,080 bp이고 360개의 아미노산으로 구성되어 있었다. 기존에 보고된 protease와의 상동성 비교에서 *BiVP*는 *Apis mellifera*의 venom protease와 61%로 높게 나타났다. *B. ignitus* *BiVP*는 촉매영역과 14개의

cysteine 잔기가 잘 보존되어 있었다. Northern blot 분석 결과, *BiVP*는 여왕벌과 암벌의 지방체에서만 발현이 일어났으며, 수벌에서는 발현이 되지 않았다.

제 3 절 새로운 재조합 베쿨로바이러스의 대량생산 체계 확립 및 제제화

1. 재료 및 방법

가. 곤충 세포를 이용한 재조합 베쿨로바이러스 대량생산 연구

1) Sf-9 곤충 세포의 액체배양을 통한 재조합 베쿨로바이러스 생산조건 기초연구

베쿨로바이러스 생산 연구에 기초적으로 많이 사용되는 Sf-9 곤충세포를 기본세포로 선정하였으며, 야생주 베쿨로바이러스 (AcNPV)와 재조합 베쿨로바이러스 Btrus-p101Ac (Bt cry1Ac 독소 유전자가 삽입된 베쿨로바이러스)를 사용하여 생산조건에 대한 기초연구를 수행하였다.

가) Spinner flask 조건에서의 Sf-9 곤충 세포 seeding량별 growth 조사

T75 culture bottle에서 증식된 Sf-9 곤충 세포를 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 cell down을 한 후 FBS (fetal bovine serum, USA)가 첨가된 TC-100 배지 (Gibco, USA)로 교체 후 spinner flask에 초기밀도가 1, 2, 3, 4×10^5 cells/ml이 되도록 접종하여 최종 working volume을 250 ml로 배양하였다. 24시간 간격으로 샘플링하여 0.4% Trypan blue로 viable cell count를 하였다.

나) Spinner flask 조건에서 Sf-9 곤충세포 seeding량별 베쿨로바이러스 생산

T75 bottle에서 증식된 Sf-9 곤충세포를 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 cell down을 한 후 FBS가 첨가된 TC-100 배지 (Gibco, USA)로 교체 후 spinner flask에 초기밀도가 1, 2, 3, 4×10^5 cells/ml이 되도록 접종하여

최종 working volume을 250 ml로 배양하였다. 접종 후 cell 밀도가 6.0×10^5 cells/ml에 도달하였을 때 야생주 배큘로바이러스를 10 MOI (multiplicity of infection)로 접종하였다. 배양 완료 후 membrane sonicator를 이용하여 다각체 (polyhedra)를 cell에서 분리 및 분산시킨 후 hemacytometer를 이용하여 다각체수를 조사하였다.

다) 5L Bioreactor 조건에서 Sf-9 곤충세포 액체배양

기존의 paddle type impeller가 장착된 bioreactor (koBioTech, Korea)와 marine type impeller가 장착된 구조 변경된 bioreactor에서의 곤충세포 증식여부를 조사하였다. 250 ml spinner flask를 이용하여 Sf-9 곤충세포를 증식 후 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 cell down을 한 후 FBS가 첨가된 TC-100 배지 (Gibco, USA)로 교체 후 5 L bioreactor에 2.0×10^5 cells/ml의 초기밀도로 접종 후 working volume을 2.0 L로 하여 배양하였다. 접종 후 24시간 간격으로 0.4% trypan blue로 viable count를 하여 cell growth를 조사하였다 (표 1).

Table 1. Culture condition of Sf-9 insect cells in 5L Bioreactor

Main culture (5 L bioreactor)		Sub culture (spinner flask)	
Working volume	2 L	Volume	250 ml
RPM	30	RPM	40
VVM	0.02	VVM	-
DO control	-	DO control	-
Temp.(°C)	27	Temp.(°C)	27
Feeding	-	Feeding	-
Seeding volume	4%	Seeding volume	10%

라) 5L Bioreactor를 이용한 야생주 및 재조합 베쿨로바이러스 Btrus-p101Ac 생산

250 ml spinner flask를 이용하여 Sf-9 곤충세포를 증식 후 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 cell down을 한 후 FBS가 첨가된 TC-100 배지로 교체 후 marine type impeller가 장착된 구조 변경된 5L bioreactor에 2.0×10^5 cells/ml의 밀도로 seeding한 후 working volume을 2.0 L로 하여 배양하였다. 곤충세포의 밀도가 6.0×10^5 cells/ml에 도달하였을 때 야생주 및 재조합 베쿨로바이러스 Btrus-p101Ac를 10 MOI로 접종하였다. 배양 완료 후 다각체를 수거하여 membrane sonicator를 사용하여 cell에서 다각체를 분리 및 분산 후 hemacytometer를 이용하여 다각체수를 조사하였다.

2) 재조합 베쿨로바이러스의 생산성 향상을 위한 대량생산용 세포주 탐색

야생주 베쿨로바이러스 및 초기 재조합 베쿨로바이러스 Btrus-p101Ac를 사용한 이전 실험 결과를 바탕으로 대량생산 방식에 적합하고 재조합 베쿨로바이러스 Bactrus (Bt cry1Ac 유전자가 삽입된 야생주화 되는 베쿨로바이러스)의 생산성 향상을 확보할 수 있는 곤충 세포주를 탐색하였다.

가) 단층배양조건에서의 곤충 세포주별 성장량 비교

T75 bottle에서 증식된 5종류의 곤충세포, Sf-9, Sf-21, Tn5, Se301, High Five 곤충세포를 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 cell down하여 fresh media로 교체 후 T25 bottle에 초기밀도가 2.0×10^5 cells/ml이 되도록 접종하였다. Sf-9, Sf-21, Tn5 곤충세포는 TC-100 (supplemented with 10% FBS), Se301 곤충세포는 IPL-41 (supplemented with 10% FBS), High-Five 곤충세포는 Express-Five Serum free media를 사용하였다. 27°C Incubator에서 배양하면서 24시간 간격으로 haemacytometer를 이용하여 viable cell count (0.4% trypan blue staining)를 하였다.

나) 단층배양조건에서의 곤충 세포주별 재조합 베쿨로바이러스 생산량 비교

T75 bottle에서 증식된 5종류의 곤충 세포, Sf-9, Sf-21, Tn5, Se301, High Five를 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 cell down하여 fresh media로 교체 후 T25 bottle에 초기밀도가 5.0×10^5 cells/ml이 되도록 접종하였다. Sf-9, Sf-21, Tn5 곤충 세포는 TC-100 (supplemented with 10% FBS), Se301 곤충 세포는 IPL-41 (supplemented with 10% FBS), High-Five 곤충 세포는 Express-Five Serum free media를 사용하였다. 곤충 세포 접종 후 Bactrus budded virus (BV)를 10 MOI로 접종하였다. 27°C Incubator에서 6일간 배양 후 곤충세포를 membrane sonicator로 30초간 3회 분쇄하여 다각체를 유출시킨 후 haemocytometer를 이용하여 다각체수를 조사하였다. 생산된 다각체내의 재조합 단백질 발현량을 비교하기 위해 각 시료의 동일량을 취하여 SDS-PAGE를 수행하였다.

다) 액체배양조건에서의 곤충 세포주별 성장량 비교

T75 bottle에서 증식된 5종류의 곤충 세포, Sf-9, Sf-21, Tn5, Se301, High Five 곤충세포를 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 cell down하여 fresh media로 교체 후 100ml spinner flask에 초기밀도가 2.0×10^5 cells/ml이 되도록 접종하였다. Sf-9, Sf-21, Tn5 곤충 세포는 TC-100 (supplemented with 10% FBS), Se301 곤충 세포는 IPL-41 (supplemented with 10% FBS), High-Five 곤충 세포는 Express-Five Serum free media를 사용하였다. 27°C Incubator에서 40 rpm으로 교반하면서 24시간 간격으로 haemocytometer를 이용하여 viable cell count (0.4% tryphan blue staining)를 하였다.

라) 액체배양조건에서의 곤충 세포주별 재조합 베쿨로바이러스 생산량 비교

액체배양에서 양호한 생육을 보인 High-Five, Sf-9, Se301 곤충 세포주를 T75

bottle에서 증식 후 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 cell down하여 fresh media로 교체 후 100ml spinner flask에 초기밀도가 5.0×10^5 cells/ml이 되도록 접종하였다. Sf-9 곤충 세포는 TC-100 (supplemented with 10% FBS), Se301 곤충 세포는 IPL-41 (supplemented with 10% FBS), High-Five 곤충 세포는 Express-Five Serum free media를 사용하였다. 곤충 세포 접종 후 Bactrus BV를 10 MOI로 접종하였다. 27°C Incubator에서 6일간 배양 후 곤충 세포를 membrane sonicator로 30초간 3회 분쇄하여 다각체를 유출시킨 후 haemocytometer를 이용하여 다각체수를 조사하였다. 생산된 다각체내의 재조합 단백질 발현량을 비교하기 위해 각 시료의 동일량을 취하여 SDS-PAGE를 수행하였다.

3) 선발된 High-Five 곤충 세포를 이용한 재조합 베칼로바이러스 생산조건 연구

대량생산 방식에 적합한 액체배양조건에서 선발된 High-Five 곤충 세포를 이용하여 바이러스 접종농도 및 세포농도에 따른 재조합 베칼로바이러스 Bactrus의 생산성을 검토하였다.

가) 액체배양조건에서의 재조합 베칼로바이러스 접종 농도별 다각체 생산량 비교

액체배양에서 높은 베칼로바이러스 생산성을 보인 High-Five 곤충 세포를 이용하여 바이러스 접종농도별 다각체 생산량을 비교하였다. T75 bottle에서 증식한 High-Five 곤충 세포를 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 cell down하여 fresh media로 교체 후 100ml spinner flask에 초기밀도가 5.0×10^5 cells/ml이 되도록 접종하였다. High-Five 곤충 세포는 Express-Five serum free media를 사용하였다. 곤충 세포 접종 후 Bactrus BV를 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 MOI로 접종하였다. 27°C Incubator에서 6일간 배양 후 곤충 세포를 membrane sonicator로 30초간 3회 분쇄하여 다각체를 유출시킨 후 haemocytometer를

이용하여 다각체수를 조사하였다. 생산된 다각체내의 재조합 단백질 발현량을 비교하기 위해 각 시료의 동일량을 취하여 SDS-PAGE를 수행하였다.

나) 액체배양조건에서의 곤충 세포 밀도에 따른 다각체 생산량 비교

액체배양에서 높은 벡쿨로바이러스 생산성을 보인 High-Five 곤충 세포를 이용하여 바이러스 접종 시 곤충 세포 밀도에 따른 다각체 생산량을 비교하였다. T75 bottle에서 증식한 High-Five 곤충세포를 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 cell down하여 fresh media로 교체 후 100ml spinner flask에 초기밀도가 1, 3, 5, 7, 9×10^5 cells/ml이 되도록 접종하였다. High-Five 곤충 세포는 Express-Five serum free media를 사용하였다. 곤충세포 접종 후 Bactrus BV를 5.0 MOI로 접종하였다. 27°C Incubator에서 배양하면서 24시간 별로 배양액을 수거하여 곤충 세포를 membrane sonicator로 30초간 3회 분쇄하여 다각체를 유출시킨 후 haemocytometer를 이용하여 다각체수를 조사하였다.

4) 저가용 곤충 세포 배양배지 탐색

지금까지의 곤충 세포를 이용한 재조합 벡쿨로바이러스의 생산조건 확립 연구는 모두 상용화된 고가의 곤충 세포 배양 배지를 사용하였다. 하지만 이러한 상업용 배지는 저가의 농업용 미생물 살충제의 원료 생산에는 경제성이 낮아 추가적으로 저가용 배지의 개발이 필요한 실정이다. 따라서 기존의 고가 배지를 대체할 수 있는 저가용 인공배지를 Sf-9 곤충 세포와 High-Five 곤충 세포를 대상으로 검토하였다.

가) Sf-9 곤충 세포 배양용 저가 인공배지 검토

기존의 고가의 상용 배지 TC-100 + FBS에서 증식되는 Sf-9 곤충 세포를 자체적으로 검토한 저렴한 새로운 인공배지로의 순화 (adaptation)를 위해, 기존배지와 인공배지를 각각 1:1, 1:3, 1:7, 1:9 (v/v)로 점차 인공배지의 양을 늘리면서 Sf-9 곤충 세포의 생육량을 조사하였다. 기존배지와 인공배지의

혼합배지 4 ml을 T25 culture bottle에 넣은 후 Sf-9 곤충 세포 1.0 ml을 seeding하는 계대방법으로 순화과정을 진행하였다.

나) 인공배지 조건에서의 High-Five 곤충세포의 생육

기존의 Sf-9 곤충 세포를 기반으로 저가용 인공배지 연구를 진행하였으나 추가적으로 생산성 및 대량생산 조건에 적용 가능성이 높은 High-Five 곤충 세포를 선발함에 따라 High-Five 곤충 세포를 대상으로 기존에 연구된 저가배지 적용시험을 진행하였다.

우선 High-Five 곤충 세포를 기 선발된 인공배지에 적용하기 위해 High-Five 곤충 세포 배양용 상용 배지인 Express-Five 배지와 기 선발된 인공배지의 혼합비율을 1:1, 1:3, 1:7, 1:9 (v.v)의 비율로 점차 인공배지의 양을 늘리면서 High-five 곤충 세포의 순화를 진행하였다. 순화 이후 High-five 곤충 세포를 인공배지만을 사용하여 T25 bottle에서 초기 접종밀도 2.0×10^5 cells/ml로 계대배양을 하여 기존 배지 (Express Five serum free media)와의 세포 성장량을 비교하였다. 세포 수 조사는 0.4% tryphan blue를 사용하여 viable count를 하였다.

다) 인공배지 조건에서 재조합 벡로로바이러스의 생산량 비교

High-Five 곤충 세포를 기 선발된 인공배지를 이용하여 T25 bottle에서 초기 접종밀도 5.0×10^5 cells/ml로 접종한 후 Bactrus BV를 5 MOI로 접종하였다. 27°C Incubator에서 6일간 배양 후 곤충 세포를 membrane sonicator로 30초간 3회 분쇄하여 다각체를 유출시킨 후 haemocytometer를 이용하여 다각체수를 조사하였다. 생산된 다각체내의 재조합 단백질 발현량을 비교하기 위해 각 시료의 동일량을 취하여 SDS-PAGE를 수행하였다.

나. 곤충 유충을 이용한 재조합 베컬로바이러스 대량생산 연구

1) 파밤나방 사육조건 연구

가) 파밤나방 인공사료 선별

인공사료의 조제는 증류수와 Agar를 먼저 용기에 같이 넣고 끓인 후, 80℃의 온도에서 Wheat germ powder, Yeast, Casein, MPH를 넣고 혼합한 다음 55℃이하로 식힌 후 Vitamin mixture, Sorbic acid, L-ascorbic acid, Mineral Mix.을 넣고 고루 혼합하였다. 마지막으로 Linseed Oil을 넣고 잘 혼합된 사료를 NaOCl (74.4%) 100배 희석액에 소독 후 건조한 플라스틱 사각용기에 넣고 실온에서 굳혔으며, 조제된 인공사료를 냉장고에 보관하며 사용하고, 7일 지나면 폐기하였다. 사육용기 (petri dish)는 1회 사용 후 폐기하였으며, 사료 보관용기 및 사육에 사용되는 도구는 NaOCl (74.4%) 100배로 12시간 소독하고, 핀셋과 붓은 에탄올 (70%)로 사용전후 소독 및 건조하여 사용하였다. 조제된 사료를 잘라서 소형 플라스틱 사육컵 (직경 4 cm, 높이 4 cm)에 넣고 용기 당 1마리씩을 넣어 개체사육 하였고 처리 당 개체수는 각 50마리씩 하였다. 사육실의 온도 조건은 25±1℃, 습도는 60-70 RH, 광주기는 16L:8D였으며, 유충 생존율, 유충기간, 용화율, 용무게, 용기간, 우화율, 성충 생존기간 등을 조사하였다. 시험에 사용된 인공사료의 조성은 표 2와 같다.

나) 파밤나방 사육용기의 선별

개체사육용기를 이용하는 것은 효율성면에서 대량사육에 적합하지 못하기 때문에 집단사육을 위한 용기 선택을 위해 개체사육 용기를 대조로 플라스틱 용기, petri dish로 집단 사육을 하였다. 플라스틱 용기 (13×21×7 cm)에 키친타올을 깔고 인공사료를 넣은 후 1령 유충 30, 50마리를 각각 접종하였고, petri dish (∅8.5×1.4 cm)에는 filter paper를 깔고 인공사료를 넣은 후 1령 유충 5마리를 접종하였다. 각 처리마다 1령 유충 총 150개체를 사육하였으며

24시간마다 유충발육 상태, 생존율을 조사하였다.

Table 2. Artificial diet for rearing of *Spodoptera exigua*

Component	unit	Diet I	Diet II
D.W.	mℓ	500	560
Agar	g	10	16
Wheat germ powder	g	54	120
Kidney bean powder	g	54	-
Yeast	g	29	16
Casein	g	-	16
MPH	g	2	2.4
Vitamin Mix.	g	1	4
Sorbic acid	g	1	1.2
L-ascorbic acid	g	6	7.2
Wesson salt	g	4	6
Linseed oil	mℓ	-	2
Formalin	mℓ	2	-

2) 실험실 조건에서의 과밤나방 유충을 이용한 재조합 베컬로바이러스 생산연구

재조합 베컬로바이러스의 실험실 조건에서의 접종량별 생산성과 동시에 생산성 향상을 확보할 수 있는 방법을 검토하였다.

가) 재조합 베콜로바이러스 접종량 별 생산량 비교 I

재조합 베콜로바이러스의 생산 기초연구를 위해 인공사료에 바이러스 접종원을 pipette로 접종하는 방법으로 실험을 진행하였다. 과밤나방 인공사료 (Diet I) block (2.0×2.0×0.2 cm)을 diet cup (지름 9 cm)에 넣은 후 재조합 베콜로바이러스 Btrus-p101Ac (Bt cry1Ac 유전자 삽입), Btrus-p101C (Bt cry1C 유전자 삽입)와 모 바이러스인 야생주 베콜로바이러스의 다각체 (polyhedra)를 인공사료 1 block당 각각 10^3 , 10^4 , 10^5 개씩 pipette으로 접종하였다. 접종 후 1-2시간 정도 인공사료를 건조 후 실내에서 누대 사육한 과밤나방 3령 유충을 인공사료 1 block당 한 마리씩 넣은 후 25℃에서 바이러스 생산성을 조사하였다. 실험은 3반복으로 진행하였으며, 반복 당 20마리씩 접종하였다. 1일 간격으로 사충수를 조사하며, 모든 사충이 치사된 9일 후 사체를 수거하여 거즈로 사체 불순물을 제거 후, 생성된 다각체수를 hemacytometer를 이용하여 현미경으로 조사하였다.

나) 재조합 베콜로바이러스 접종량 별 생산량 비교 II

기존 바이러스 접종방법 (pipette 이용)의 실용성을 높이기 위해 분무 접종방법으로 접종방법을 변경하여 실험을 진행하였다. 본 실험에는 대량생산 균주로 선발된 야생주화 재조합 베콜로바이러스 Bactrus를 사용하였다. 과밤나방 인공사료 block (2.0×2.0×0.2 cm) 1개를 diet cup (지름 9 cm)에 넣은 후 재조합 베콜로바이러스 Bactrus 다각체 현탁액을 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 PIBs/ml로 각각 조제한 후 소형 스프레이를 이용하여 분무하였다. 접종 후 1-2시간 정도 인공사료를 건조 후 실내에서 누대사육한 과밤나방 3령 유충을 인공사료 1 block당 10 마리씩 넣은 후 25℃에서 바이러스 생산성을 조사하였다. 실험은 3반복으로 진행하였으며, 반복 당 30마리씩 접종하였다. 1일 간격으로 사충수를 조사하며, 모든 사충이 치사된 7일 후, 사체를 수거하여 거즈로 사체 불순물을 제거 후, 생산된 다각체수를 hemacytometer를 이용하여 현미경으로 조사하였다.

다) 사료첨가제 첨가를 통한 베쿨로바이러스 생산성 향상방법 검토

과밤나방 인공사료 block (2.0×2.0×0.2 cm)를 diet cup (지름 9 cm)에 넣은 후 야생주 베쿨로바이러스 다각체 10^5 개와 사료 첨가제로서 boric acid 1% 또는 stilbene 1%를 혼합하여 인공사료에 pipette로 접종하였다. 접종 후 1-2시간 정도 인공사료를 건조 후 실내에서 누대사육한 과밤나방 3령 유충을 인공사료 1 block 당 한 마리씩 넣은 후 25℃에서 바이러스 생산을 진행하였다. 실험은 3반복으로 진행하였으며, 반복 당 20마리씩 접종하였다. 1일 간격으로 사충수를 조사하며, 모든 사충이 치사된 9일 후 사체를 수거하여 거즈로 사체 불순물을 제거 후, 생성된 다각체수를 hemacytometer를 이용하여 현미경으로 조사하였다.

라) 사료첨가제 Boric acid 함량에 따른 재조합 베쿨로바이러스 생산량 비교

과밤나방 인공사료 block (2.0×2.0×0.2 cm) 1개를 diet cup (지름 9 cm)에 넣은 후 10^4 PIBs/ml로 조제한 재조합 베쿨로바이러스 Bactrus 다각체 현탁액에 boric acid를 1, 2, 5%로 각각 넣은 최종 접종액을 소형 스프레이를 이용하여 분무하였다. 접종 후 1-2시간 정도 인공사료를 건조 후 실내에서 누대사육한 과밤나방 3령 유충을 인공사료 1 block당 10 마리씩 넣은 후 25℃에서 바이러스 생산성을 조사하였다. 실험은 3반복으로 진행하였으며, 반복 당 30마리씩 접종하였다. 1일 간격으로 사충수를 조사하였으며, 모든 사충이 치사된 7일 후, 사체를 수거하여 거즈로 사체 불순물을 제거 후, 생산된 다각체수를 hemacytometer를 이용하여 현미경으로 조사하였다.

3) Pilot 조건에서의 과밤나방을 이용한 재조합 베쿨로바이러스 생산연구

실내조건에서 선발된 생산조건을 바탕으로 pilot 조건에서의 생산시험은 (주)킨섹트의 협력을 받아 진행하였으며, pilot 조건에서의 적용시험과 동시에 문제발생 요인을 검토하여 최종 생산조건을 확립시험을 수행하였다.

가) 접종농도별 재조합 베칼로바이러스의 생산성 비교 I

대량 곤충사육 시스템을 통하여 확보된 파밤나방 3령 유충을 사용하여 바이러스 생산성을 접종농도별로 비교하였다. 접종농도를 제외한 나머지 조건은 실내시험을 통하여 선발된 조건을 1차적으로 적용하였다. 인공사료 (Diet I) 일정한 크기 (밀집사육조건: 3×3×0.5 cm)의 disc 형태로 자른 후 재조합 베칼로바이러스 Bactrus 다각체 현탁액을 1×10^5 PIBs/ml, 1×10^6 PIBs/ml, 1×10^7 PIBs/ml의 농도로 각각 조제하여 인공사료 disc에 분무접종 하였다. 바이러스 접종액에는 바이러스의 침투를 용이하게 하기 위하여 boric acid 2%를 첨가하였다. 접종이 끝난 인공사료 disc를 밀집사육 용기 (petridish, 지름 18 cm)에 각각 넣은 후 30분가량 음건하여 과습조건이 되지 않도록 하였다. 인공사료 치상 후 파밤나방 3령 유충을 밀집사육 용기 (10마리/petridish)에 넣고 25℃에서 감염을 유도하였다. 접종 후 8일 후에 감염충을 수거하여 바이러스 생산성을 haemocytometer를 사용하여 조사하였다.

나) 접종농도별 재조합 베칼로바이러스의 생산성 비교 II

기존 바이러스 접종량 대비 생산 효율성을 저농도에서 추가로 검토하기 위해 바이러스 접종량을 낮춰서 pilot 시험을 진행하였다. 인공사료 (Diet I) 일정한 크기 (밀집사육조건: 3×3×0.5 cm)의 disc 형태로 자른 후 재조합 베칼로바이러스 Bactrus 다각체 현탁액을 1×10^3 PIBs/ml, 1×10^4 PIBs/ml, 1×10^5 PIBs/ml의 농도로 각각 조제하여 인공사료 disc에 분무 접종하였다. 바이러스 접종액에는 바이러스의 침투를 용이하게 하기 위하여 boric acid 2%를 첨가하였다. 접종이 끝난 인공사료 disc를 밀집사육 용기 (petridish, 지름 18 cm)에 각각 넣은 후 30분가량 음건하여 과습조건이 되지 않도록 하였다. 인공사료 치상 후 파밤나방 3령 유충을 밀집사육 용기 (10마리/petridish)에 넣고 25℃에서 감염을 유도하였다. 접종 후 8일 후에 감염충을 수거하여 바이러스 생산성을 haemocytometer를 사용하여 조사하였다.

다) 대형 사육용기조건에서의 재조합 베쿨로바이러스 생산성

인공사료 B (천연사료)를 일정한 크기 (3×3×0.5 cm)의 disc 형태로 자른 후 재조합 베쿨로바이러스 Bactrus 다각체 현탁액을 1×10³ PIBs/ml 농도로 조제하여 인공사료 disc에 분무접종 하였다. 바이러스 접종액에는 바이러스의 침투를 용이하게 하기 위하여 boric acid 2%를 첨가하였다. 접종이 끝난 인공사료 disc를 대형 사육용기 (15×25×5 cm)에 3개씩 넣은 후 30분가량 음건하여 과습조건이 되지 않도록 하였다. 인공사료 치상 후 파밤나방 3령 유충을 밀집사육 용기에 200마리를 넣고 25℃에서 감염을 유도하였다. 접종 후 7일 후에 감염충을 수거하여 바이러스 생산성을 haemocytometer를 사용하여 조사하였다.

다. 실내조건에서의 재조합 베쿨로바이러스의 살충효과 검정

1) Bt독소 함유 재조합 베쿨로바이러스의 살충효과 검정

실내 살충효과 검정을 위해 사용된 재조합 베쿨로바이러스 Btrus-p101Ac, Btrus-p101C, 야생주 베쿨로바이러스는 파밤나방 3령 유충을 이용하여 생산하였다.

가) 재조합 베쿨로바이러스의 배추좀나방에 대한 살충효과 확인시험

재조합 베쿨로바이러스 Btrus-p101Ac 다각체를 saline solution (NaCl 8.5 g, K₂HPO₄ 6.0 g, KH₂PO₄ 3.0 g, Tween80 0.02%, H₂O 1 L)으로 각각 10⁶, 10⁵, 10⁴ PIB/ml로 희석한 용액에 지름 7 cm로 자른 어린 배추잎을 30초간 침지 후 상온에서 건조하였다. 건조된 배추잎을 filter paper가 깔려있는 petri-dish에 넣고 실내에서 누대사육한 배추좀나방 2-3령 유충을 15마리/반복씩 3반복으로 접종하였다. 접종 2, 3일차 생충수를 조사하여 살충효과를 판단하였다.

나) 재조합 베쿨로바이러스의 파밤나방에 대한 살충효과 확인시험

재조합 베쿨로바이러스 Btrus-p101Ac, Btrus-p101C 다각체를 saline solution (NaCl 8.5 g, K₂HPO₄ 6.0 g, KH₂PO₄ 3.0 g, Tween80 0.02%, H₂O 1 L)으로 각각 10⁶, 10⁵, 10⁴ PIBs/ml로 희석한 용액에 지름 7 cm로 자른 어린 배추잎을 30초간 침지 후 상온에서 건조하였다. 건조된 배추잎을 filter paper가 깔려있는 petri-dish에 넣고 실내에서 누대사육한 과밤나방 2령 유충을 15마리/반복씩 3반복으로 접종하였다. 접종 후 1, 2, 3, 4일차에 생충수를 조사하여 살충효과를 판단하였다.

다) 재조합 베쿨로바이러스의 목화바둑명나방에 대한 살충효과 확인시험

재조합 베쿨로바이러스 Btrus-p101Ac, Btrus-p101C 다각체를 saline solution (NaCl 8.5 g, K₂HPO₄ 6.0 g, KH₂PO₄ 3.0 g, Tween80 0.02%, H₂O 1 L)으로 각각 10⁶, 10⁵, 10⁴ PIBs/ml로 희석한 용액에 지름 7 cm로 자른 어린 오이잎을 30초간 침지 후 상온에서 건조하였다. 건조된 오이잎을 filter paper가 깔려있는 petri-dish에 넣고 실내에서 누대사육한 목화바둑명나방 2-3령 유충을 15마리/반복씩 3반복으로 접종하였다. 접종 후 2, 3, 4, 5일차에 생충수를 조사하여 살충효과를 판단하였다.

라) 재조합 베쿨로바이러스의 거세미나방에 대한 살충효과 확인시험

재조합 베쿨로바이러스 Btrus-p101Ac, Btrus-p101C 다각체를 거세미나방 인공사료에 각각 10⁶, 10⁵, 10⁴ PIBs/diet (2.5×2.5×0.5 cm)로 처리한 후 filter paper가 깔려있는 petri-dish에 넣고 거세미나방 2령 유충을 15마리/diet/반복씩 3반복으로 접종하였다. 3, 4, 5, 8일 후에 생충수를 조사하여 살충효과를 판단하였다.

2) Bt독소를 함유하는 야생주화 재조합 베쿨로바이러스의 살충효과 검정

실내 살충효과 검정을 위해 사용된 야생주화 재조합 베쿨로바이러스 Bactrus, 야생주 베쿨로바이러스는 과밤나방 3령 유충을 이용하여 생산하였다. Bactrus

생산을 위해 사용한 BV는 바이러스 분리 정제 후 3 세대를 거친 바이러스를 접종원으로 사용하였다.

가) 야생주화 되는 재조합 베쿨로바이러스 (Bactrus)의 배추좀나방에 대한 살충효과

재조합 베쿨로바이러스 Bactrus를 saline solution (NaCl 8.5 g, K₂HPO₄ 6.0 g, KH₂PO₄ 3.0 g, Tween80 0.02%, H₂O 1 L)으로 각각 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ PIBs/ml로 희석한 용액에 지름 7 cm로 자른 어린 배추잎을 30초간 침지 후 상온에서 건조하였다. 건조된 배추잎을 filter paper가 깔려있는 petri-dish에 넣고 실내에서 누대사육한 배추좀나방 2-3령 유충을 15마리/반복씩 3반복으로 접종하였다. 접종 2, 3, 4 일차 생충수를 조사하여 살충효과를 판단하였다.

나) 야생주화 되는 재조합 베쿨로바이러스 (Bactrus)의 과밤나방에 대한 살충효과

재조합 베쿨로바이러스 Bactrus를 saline solution (NaCl 8.5 g, K₂HPO₄ 6.0 g, KH₂PO₄ 3.0 g, Tween80 0.02%, H₂O 1 L)으로 각각 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ PIBs/ml로 희석한 용액에 지름 7 cm로 자른 어린 배추잎을 30초간 침지 후 상온에서 건조하였다. 건조된 배추잎을 filter paper가 깔려있는 petri-dish에 넣고 실내에서 누대사육한 과밤나방 2령 유충을 15마리/반복씩 3반복으로 접종하였다. 접종 2, 3, 4 일차 생충수를 조사하여 살충효과를 판단하였다.

다) 야생주화 되는 재조합 베쿨로바이러스 (Bactrus)의 계대수에 따른 야생주화 확인

야생주화 재조합 베쿨로바이러스 Bactrus의 야생주화 정도를 확인하기 위해 Sf-9 곤충세포에서의 계대 횟수에 따른 재조합 단백질 (recombinant fusion protein)의 발현량 변화와 이에 따른 배추좀나방에 대한 살충효과 변화를 검토하였다. Bactrus 분리정제과정으로부터 순수 분리한 BV (Passage No. 2)를

Sf-9 6×10^5 ccells/ml 농도의 곤충 세포에 접종한 후, 4일 후에 BV를 수확하여 end-point dilution method (O'Reilly *et al.* 1992)를 이용하여 BV를 계수한 후 각각 1, 10 MOI로 독립적으로 계대를 진행하여 총 11세대까지 진행하였다. 각각의 계대단계에서 수확한 다각체를 이용하여 SDS-PAGE를 수행하였으며 동시에 배추좀나방에 대한 살충효과를 확인하기 위해 10^5 PIBs/larva를 처리한 후 2일차에 생충수를 조사하여 살충효과 변화를 판단하였다.

3) 전갈독소 함유 재조합 베쿨로바이러스의 살충효과 검정

실내 살충효과 검정을 위해 사용된 전갈독 함유 재조합 베쿨로바이러스 Ac307ProAaIT는 High-Five 곤충 세포를 이용하여 액체배양으로 생산한 시료를 시험에 사용하였다.

가) 전갈독 함유 재조합 베쿨로바이러스의 배추좀나방에 대한 살충효과

전갈독 함유 재조합 베쿨로바이러스 Ac307ProAaIT를 saline solution (NaCl 8.5 g, K_2HPO_4 6.0 g, KH_2PO_4 3.0 g, Tween80 0.02%, H_2O 1 L)으로 1×10^6 PIBs/ml로 조제한 시험약제에 지름 7 cm로 자른 어린 배추잎을 30초간 침지 후 상온에서 건조하였다. 건조된 배추잎을 filter paper가 깔려있는 petri-dish에 넣고 실내에서 누대사육한 배추좀나방 2-3령 유충을 15마리/반복씩 3반복으로 접종하였다. 접종 2, 3 일차 생충수를 조사하여 살충효과를 판단하였다.

나) 전갈독 함유 재조합 베쿨로바이러스의 과밤나방에 대한 살충효과

전갈독 함유 재조합 베쿨로바이러스 Ac307ProAaIT를 saline solution (NaCl 8.5 g, K_2HPO_4 6.0 g, KH_2PO_4 3.0 g, Tween80 0.02%, H_2O 1 L)으로 1×10^6 PIBs/ml로 조제한 시험약제에 지름 7 cm로 자른 어린 배추잎을 30초간 침지 후 상온에서 건조하였다. 건조된 배추잎을 filter paper가 깔려있는 petri-dish에 넣고 실내에서 누대사육한 과밤나방 2령 유충을 15마리/반복씩 3반복으로 접종하였다. 접종 2, 3 일차 생충수를 조사하여 살충효과를 판단하였다.

라. 제형화 연구

1) 제형화 기초 연구 및 최적 시제품 선발

야생주화 재조합 벡톨로바이러스 Bactrus의 사충 슬러지를 수확하여 동결건조 과정을 통해 분말 원제 (1×10^{10} PIBs/g)를 확보한 후 수화제와 액상수화제의 처방을 구체적으로 검토하였다.

가) 실내조건에서 UV protectant별 살충효과에 대한 안정성 비교

벡톨로바이러스 분말원제 (1×10^{10} PIBs/g)와 UV protectant를 혼합 (tank-mix)하여 배추에 각각 1×10^6 PIBs/ml + 100ppm 농도로 분무처리한 후 50 cm 높이에서 300W sun lamp (ULTRA-VITALUX) 4개를 40시간 동안 비추어졌다. UV 처리가 끝난 배추잎을 지름 7 cm로 자른 후 filter paper가 깔려있는 petri-dish에 넣고 실내에서 누대사육한 파밤나방 2령 유충을 15마리/반복씩 3반복으로 접종하였다. 접종 5, 7 일차 생충수를 조사하여 살충효과를 판단하였다.

나) 수화제 최적 시제품 선발

대량생산 시스템을 통하여 생산된 원제 (1×10^{10} PIBs/g)를 사용하여 수화제를 제제하였다. 증량제로 ammonium sulfate를 사용하였으며, 제제의 물리성 확보를 위해 분산제, 습윤제, 보조제를 사용하였다. 위 성분들을 혼합하여 air milling을 하여 적합한 입도를 확보하였다.

다) 액상수화제 최적 시제품 선발

대량생산 시스템을 통하여 생산된 원제 (1×10^{10} PIBs/g)를 사용하여 액상수화제를 제제하였다. 증량제로 물을 사용하였으며, 제제의 물리성 확보 및 오염방지를 위해 계면활성제, 증점제, 방부제를 사용하였다. 위 성분들을 혼합하여

ball milling을 통해 적합한 입도를 확보하였다.

2) 최적 시제품의 경시변화 안정성 확인

최종 선발된 제제를 상온조건 (25℃)에 보관하면서 3달 간격으로 시료를 분리하여 다각체수를 조사하였다. 특히 액상수화제의 경시변화 안정성에 사용된 분말원제는 동결건조와 풍건의 각기 다른 방법으로 제조되었으며 각각의 원제를 사용하여 pH 3, 5, 7의 3가지 다른 조건으로 제제하여 상호간의 안정성을 비교하였다.

마. 최적화된 제제품의 야외조건에서의 실증연구

1) 야외 살충효과 검토

가) 파밤나방에 대한 야외 실증시험

최종 선발된 수화제와 액상수화제를 이용하여 포장조건에서 파밤나방에 대한 방제효과를 검토하였다. 시험포장은 경기도 평택의 배추재배단지에서 시설재배로 관리되는 배추 (품종: 한여름)를 대상으로 진행하였다. 시험 전 포장내의 사전밀도를 조사 (9/15)한 후 각각의 제제를 500배로 희석하여 동력분무기를 사용하여 정식 20일 내외의 배추에 200 L/10a의 물량으로 경엽에 1회 처리하였다. 경엽처리 후 5 (9/20), 10 (9/25)일 후에 구획 당 파밤나방 생충 유충수를 조사하여 시험약제의 방제효과를 검토하였다.

나) 배추좀나방에 대한 야외 실증시험

최종 선발된 수화제와 액상수화제를 이용하여 포장조건에서 배추좀나방에 대한 방제효과를 검토하였다. 시험포장은 경기도 화성의 배추재배 (품종: 흑진주) 시설포장에서 진행하였다. 시험 전 포장내의 사전밀도를 조사한 (7/6) 후 각각의 제제를 500배로 희석하여 동력분무기를 사용하여 정식 20일 내외의 배추에 200

L/10a의 물량으로 경엽에 1회 처리하였다. 경엽처리 후 3일 후 (7/9) 구획 당 배추좀나방 생충 유충수를 조사하여 시험약제의 방제효과를 검토하였다.

2) 야외조건에서의 약효 안정성 연구

재조합베쿨로바이러스 수화제와 액상수화제에 기 선발된 UV protectant (SLS; sodium ligno sulfate)를 사입하여 제조한 제제를 유리온실에서 재배되고 있는 배추에 분무처리한 후 0일, 3일, 7일, 10일후에 배추잎을 잘라내어 실내조건에서 petridish를 이용하여 파밤나방 2령 유충에 대한 방제효과를 검토하였다. 살충효과는 파밤나방 유충접종 5일 후 생충수를 조사하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 곤충 세포를 이용한 재조합 벡탈로바이러스 대량생산 연구

1) Sf-9 곤충세포의 액체배양을 통한 재조합 벡탈로바이러스의 생산조건 기초연구

가) Spinner flask 조건에서의 Sf-9 곤충세포 seeding량별 growth 조사

Sf-9 cell의 seeding량을 각각 $1, 2, 3, 4 \times 10^5$ cells/ml로 하여 액체배양을 한 결과 1×10^5 cells/ml로 접종한 경우에는 7일후에 최고 밀도인 1.0×10^6 cells/ml에 도달한 반면, seeding량이 4×10^5 cells/ml인 경우에는 3일 만에 최고밀도에 도달하여, 접종량이 많을수록 배양기간이 단축되는 경향을 보였다 (그림 1). 그러나 seeding량이 많을수록 사용되는 seed cell의 배양기간 및 배지소요량이 많아지는 것으로 판단된다. 실험실 조건에서는 20% 내외가 적절한 seeding량으로 판단되나 scale-up될 경우 그 규모에 따라 조건의 보완이 필요할 것이다.

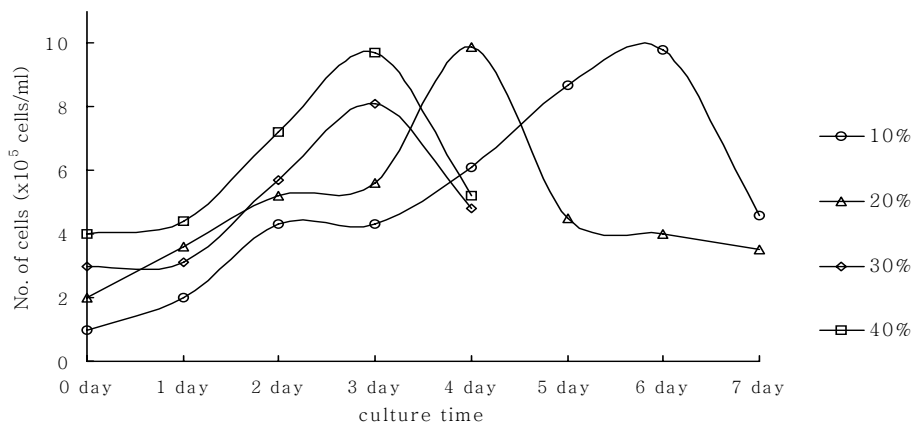


Fig. 1. Sf-9 cell growth in different seeding volume in spinner flask

나) Spinner flask 조건에서 Sf-9 곤충 세포 seeding량별 베칼로바이러스 생산

Sf-9 곤충 세포 접종량에 상관없이 세포밀도가 동일한 시기에 야생즈 베칼로바이러스가 접종되었기 때문에 비슷한 수준의 다각체가 생성된 것으로 판단되나 접종량이 많을수록 배양기간이 점점 단축되는 경향을 보였다 (표 3). 한편 seeding량과 seed cell 배양시간 및 배지소요량의 상관관계를 고려해 볼 때 적정한 초기밀도는 약 $1.0\text{-}2.0\times 10^5$ cells/ml로 판단된다.

Table 3. Production of wild-type polyhedra in different seeding volume in spinner flask

Seeding volume of Sf-9 cell (cells/ml)	Cell density in time's of viral infection (cells/ml)	Dose of infected virus (MOI)	Culture time (day)	Productivity (PIBs/ml)
1.0×10^5	6.2×10^5	10	7	2.1×10^6
2.0×10^5	6.3×10^5	10	5	3.5×10^6
3.0×10^5	6.4×10^5	10	4	2.4×10^6
4.0×10^5	6.1×10^5	10	3	2.5×10^6

다) 5 L Bioreactor 조건에서 Sf-9 곤충 세포 액체배양

기존 paddle type impeller보다 구조 변경한 marine type impeller를 이용한 bioreactor에서 곤충세포가 안정적으로 증식되었다. paddle type impeller에서는 곤충세포에 물리적인 충격을 주지 않는 낮은 rpm 조건에서 곤충세포를 배양액내에 부유시키지 못하는 특성으로 인해 곤충세포가 바닥면에서 붙어

자라는 특성을 보여주었다. 따라서 액체배양을 위한 bioreactor에서는 paddle type impeller는 부적합한 것으로 판단되었다. 그래서 낮은 rpm 조건에서도 곤충세포가 부유될 수 있도록, impeller 날개 면이 상대적으로 크고 배양액을 아래 부분에서 위 부분으로 밀어 올릴 수 있도록 날개가 45도로 휜 자체 제작한 marine type impeller를 사용하였다. marine type을 사용할 경우 곤충세포가 배양액 전체에 골고루 부유되는 현상을 보였으며, 또한 안정적인 세포 증식을 보였다. 추후 곤충세포 대량배양을 위해서는 marine type impeller를 사용할 필요가 있는 것으로 판단되었다 (그림 2, 3, 4).

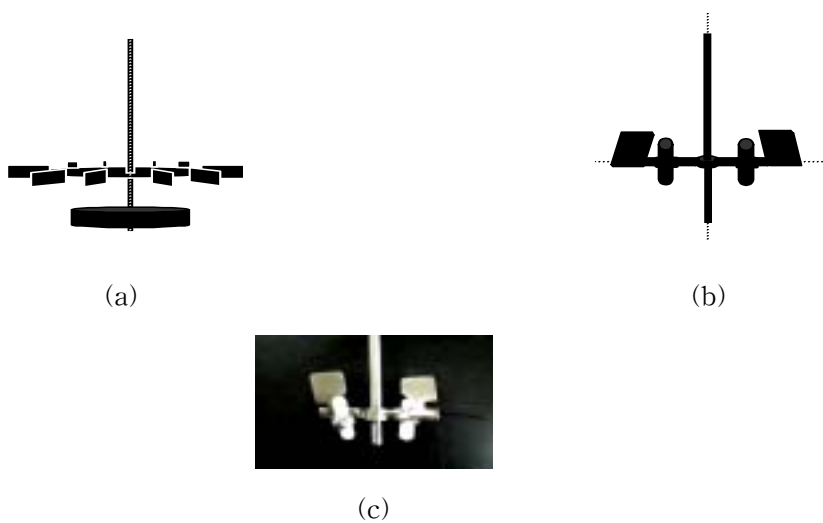


Fig 2. Paddle type impeller (a) and modified marine type impeller (b, c) of 5 L bioreactor.

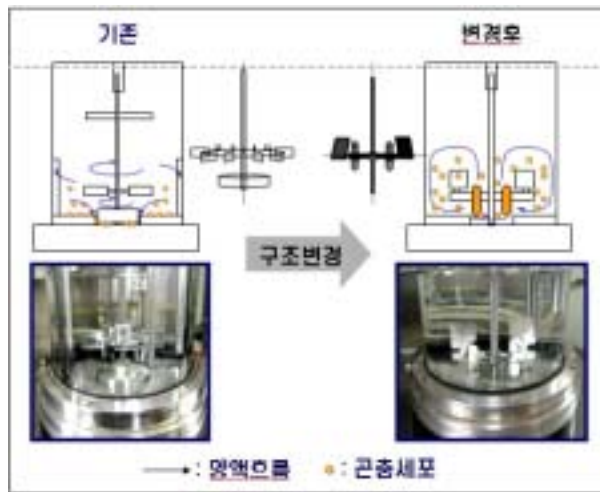


Fig. 3. Circulation of insect cells in current bioreactor (left) and modified bioreactor (right).

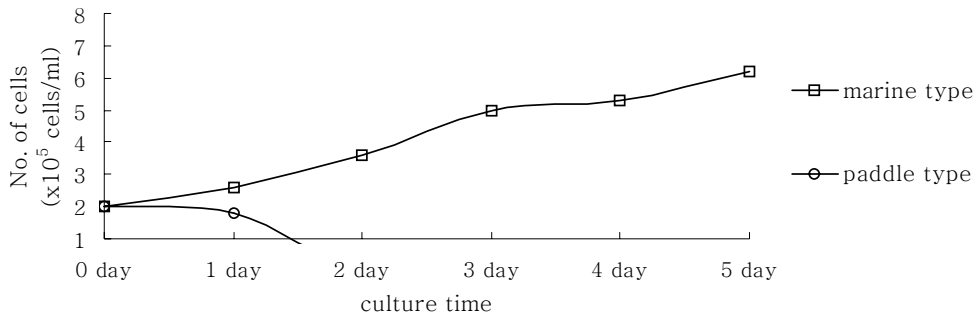


Fig 4. Sf-9 cell growth in modified 5 L bioreactor.

라) 5L Bioreactor를 이용한 야생주 및 재조합 벡로로바이러스 Btrus-p101Ac 생산

AcNPV와 Btrus-p101Ac간의 다각체 생산량 차이는 유의성을 보이지 않았다. 전체적으로 바이러스의 생산량은 약 $1.5-2.3 \times 10^6$ PIB/ml로서 spinner flask 조건과 큰 차이를 보이지 않았다 (표 4, 그림 5).

Table 4. Production of recombinant polyhedra in modified 5 L bioreactor

Virus	Productivity (PIBs/ml)
Wt AcNPV	2.3×10^6
Btrus-p101Ac	1.5×10^6

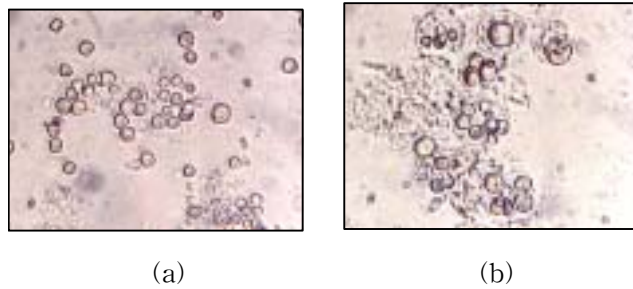


Fig. 5. Wild-type AcNPV polyhedra (a) and recombinant baculovirus, Btrus-p101Ac polyhedra (b) produced in 5L bioreactor.

2) 재조합 베컬로바이러스의 생산성 향상을 위한 대량생산용 세포주 탐색

가) 단층배양조건에서의 곤충 세포주별 성장량 비교

단층배양조건에서는 High-Five 곤충세포의 생육이 가장 우수하였으며, Sf-9, Se301, Sf-21, Tn5순으로 생육속도 차이를 보였다 (그림 6). 세포증식을 위한

초기단계인 단층배양조건에서는 High-Five 세포가 적합할 것으로 판단되나, 바이러스 생산량과 비교검토를 통해 선발을 진행할 예정이다.

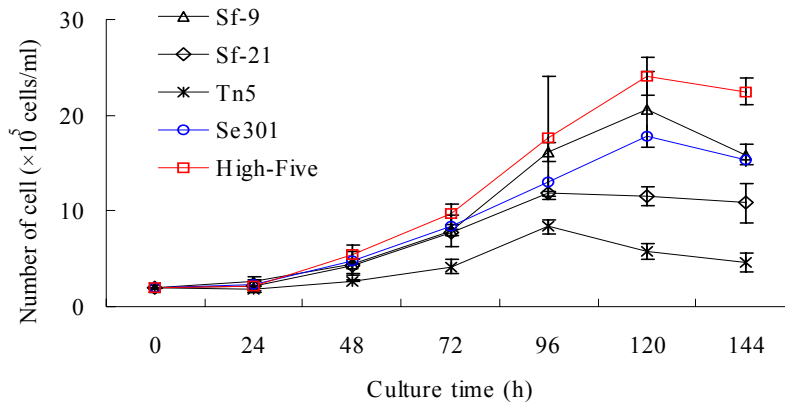


Fig. 6. Cell growth of different insect cell line in monolayer culture.

나) 단층배양조건에서의 곤충 세포주별 벡룰로바이러스 생산량 비교

세포주별 다각체 생산량을 비교한 결과 High-Five 곤충세포에서의 다각체 생산량이 가장 높았으며, 다각체의 크기도 상대적으로 큰 것으로 나타났다 (그림 7, 8). SDS-PAGE 결과에서도 이러한 경향을 보였으며, 재조합 단백질의 발현량도 다른 세포주에 비해 높게 나타났다 (그림 9). 단층배양을 통해 접종원을 확보할 경우 High-Five 곤충세포를 이용하는 것이 적합한 것으로 판단되었다.

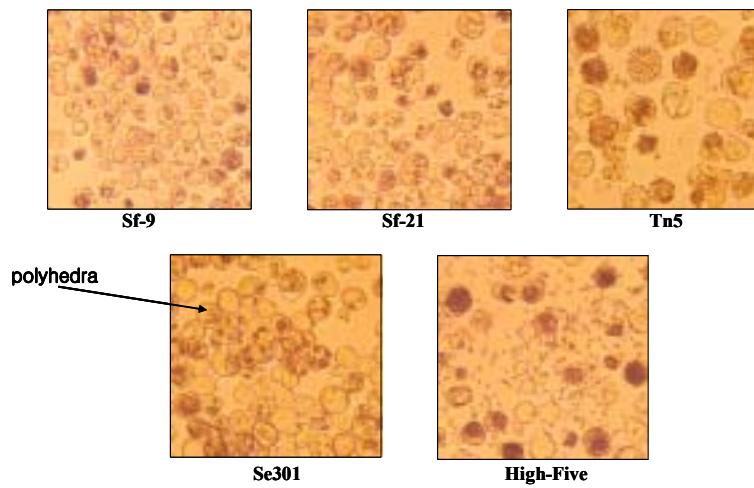


Fig. 7. Microscopy of recombinant polyhedra in 5 kind of insect cells in monolayer culture (optical microscope, 400x).

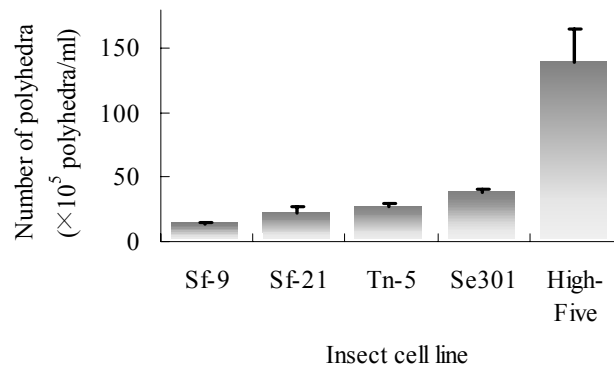


Fig. 8. Production of recombinant polyhedra in different insect cells in monolayer culture .

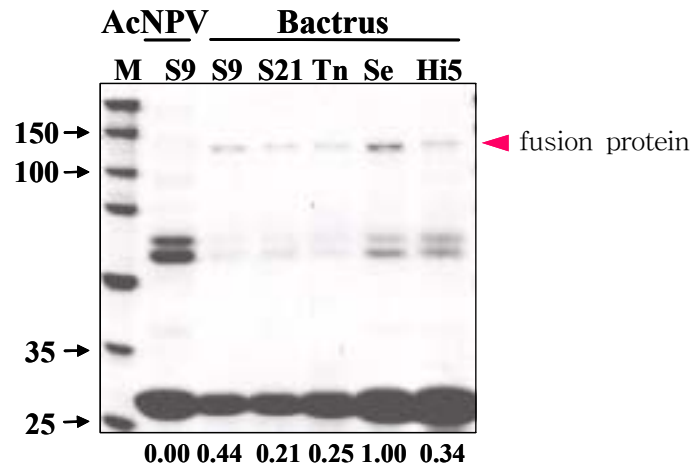


Fig. 9. Production of recombinant fusion protein in different insect cells in monolayer culture

다) 액체배양조건에서의 곤충 세포주별 성장량 비교

액체배양조건에서도 High-Five 곤충세포의 생육이 가장 우수하였으며, Sf-9, Se301, Sf-21순으로 생육속도 차이를 보였다 (그림 10). 하지만, Tn5 곤충세포는 접종 24시간 후 사멸하는 결과를 보여, 액체배양에는 적합하지 않은 것으로 나타났다. 대량배양 시스템에 적합한 액체배양 조건에서의 세포생육 결과를 토대로 바이러스 생산량을 검토하여 최적의 곤충 세포주를 선발하고자 하였다.

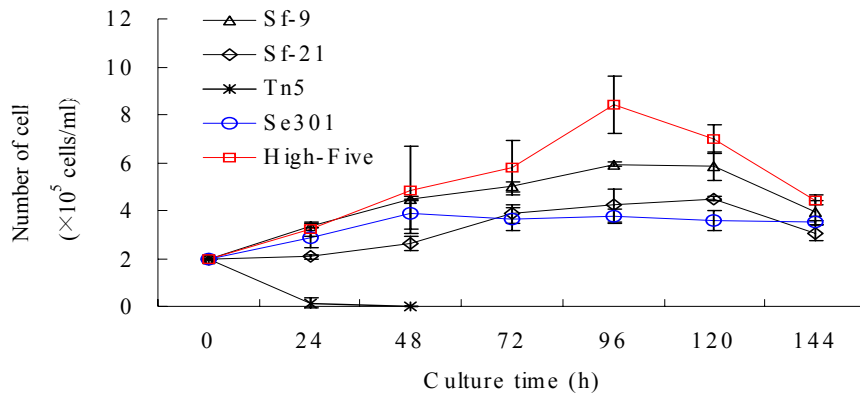


Fig. 10. Cell growth of different insect cell line in suspension culture.

라) 액체배양조건에서의 곤충 세포주별 벡로로바이러스 생산량 비교
 세포주별 다각체 생산량을 비교한 결과 High-Five 곤충세포에서의 다각체
 생산량이 가장 높았으며, 다각체의 크기도 상대적으로 큰 것으로 나타났다 (그림
 11). SDS-PAGE 결과에서도 이러한 경향을 보였으며, 재조합 단백질의 발현량도
 다른 세포주에 비해 높게 나타났다 (그림 12).

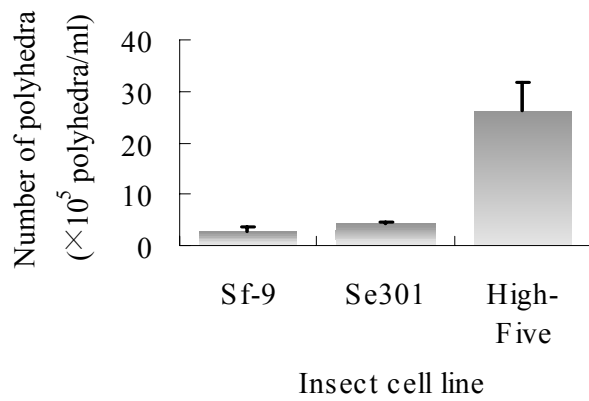


Fig. 11. Production of recombinant polyhedra in different insect cells in suspension culture.

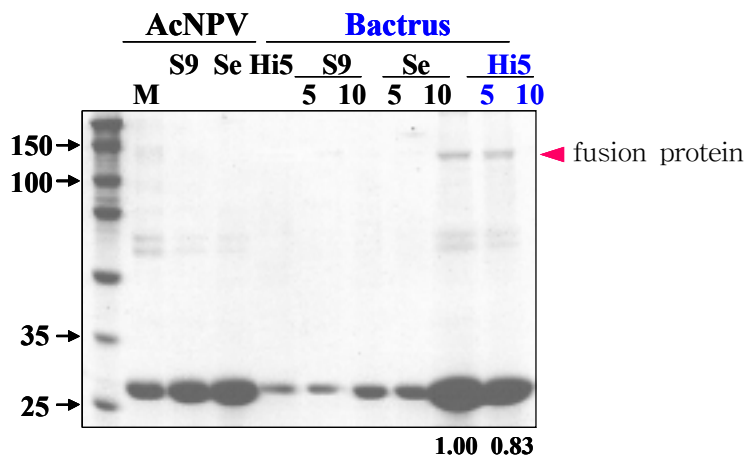


Fig. 12. Production of recombinant fusion protein in different insect cells in suspension culture.

3) 선발된 High-Five 곤충세포를 이용한 재조합 베콜로바이러스 생산조건 연구

가) 액체배양조건에서의 베콜로바이러스 접종농도별 다각체 생산량 비교

바이러스 접종농도별 다각체 생산량을 비교한 결과 5.0 MOI에서 가장 많은 양의 다각체가 생산되었다 (그림 13). SDS-PAGE 결과에서도 이러한 경향을 보였으며, 재조합 단백질의 발현량도 5MOI에서 높게 나타났다 (그림 14). 바이러스 접종농도가 낮을 경우에는 BV 증식에 많은 에너지가 소모되며, 반면에 접종농도가 높을 경우에는 바이러스 생산에 필요한 곤충세포의 대사가 급속히 저하되어 적합한 생산 기주체로서의 역할을 하지 못하는 것으로 판단된다. 따라서 최적 접종농도를 5.0 MOI로 선택하였다.

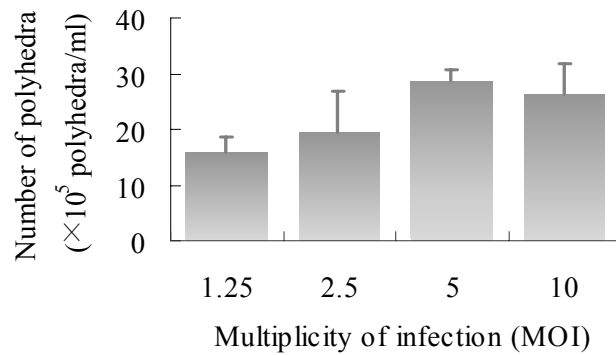


Fig. 13. Production of recombinant polyhedra in different MOI in suspension culture.

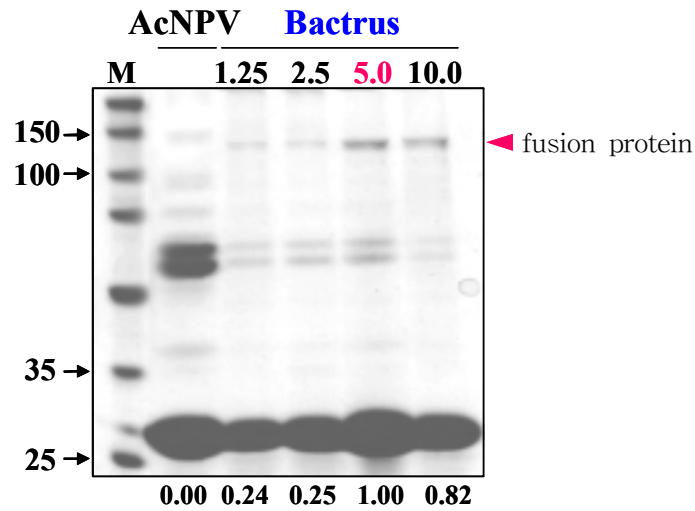


Fig. 14. Production of recombinant fusion protein in different MOI in suspension culture.

나) 액체배양조건에서의 곤충세포 밀도에 따른 다각체 생산량 비교

바이러스 접종 시 세포밀도에 따른 생산성 비교결과 3×10^5 cells/ml 조건에서 가장 많은 양의 다각체가 생산되었다 (그림 15). 바이러스 접종 시 곤충세포 밀도가 높을 경우에는 세포가 life cycle의 후반기에 급속히 들어감으로 인해서 적합한 바이러스 생산을 위한 기주체로서의 역할을 하지 못하는 것으로 판단되었다.

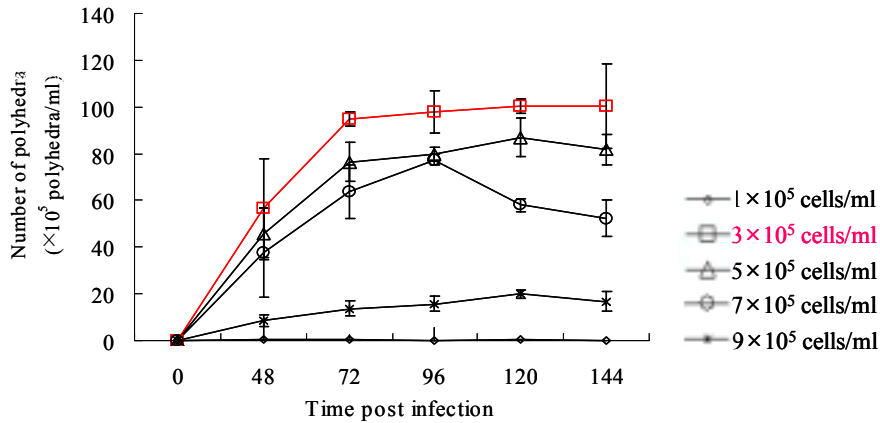


Fig. 15. Production of recombinant polyhedra in different cell density in suspension culture.

4) 저가용 곤충세포 배양배지 탐색

가) Sf-9 곤충세포 배양용 저가 인공배지 검토 시험

자체적으로 검토한 인공배지들 중 6-10, 11, 12번 배지에서 세포생장이 정상적으로 이루어 졌으나 이 중에서도 6-11번 배지가 초기 적용에서 가장 우수하였다 (표 5, 그림 16). 6-11번 배지는 3회 이상의 계대순화과정에서 다른 배지들에서보다 안정적으로 진행되는 결과를 보였고, 세포 모양이 기형화되는 증상도 관찰되지 않았다 (그림 17). 6-11번 배지에서의 전체적인 생육은 기존 상용배지인 TC-100+FBS와 비슷한 양상을 보였다. 추후 6-11번 배지를 사용하여 각 단계별 10회 이상의 계대배양을 통해 완전히 6-11배지로의 순화를 시도하고자 하였다. 또한 이 과정에서 별도로 6-11번 배지의 보완이 더 진행되어야 할 것으로 판단되었다.

Table 5. Artificial cell culture media for Sf-9 insect cell

Component	Dosage (g/L)		
	6-10	6-11	6-12
Glucose	1.1	1.1	1.1
Inorganic salt	5.0	5.0	5.0
Vitamine	0.2	0.2	0.2
Amino acid mixture	13.0	13.0	13.0
Protein hydrolysate	5.0	5.0	5.0
X	5.0	5.0	3.0
Y	5.0	8.0	8.0

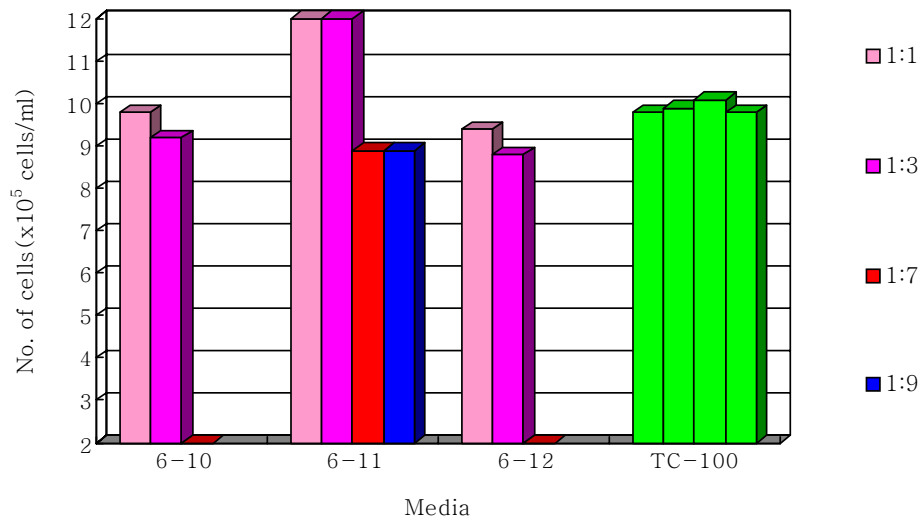


Fig. 16. Adaptation of Sf-9 insect cells to artificial media. 1:1, 1:3, 1:7, 1:9 (TC-100:artificial media, v/v).

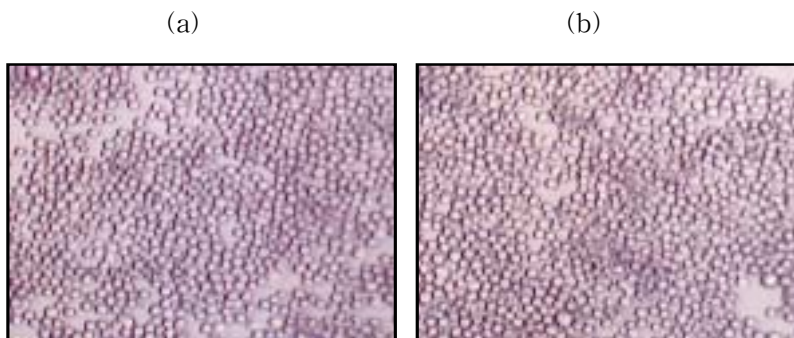


Fig. 17. Microscopy of Sf-9 insect cells in current TC-100 media (a) and in artificial media 6-11 (1:9) (b).

나) 인공배지 조건에서의 High-Five 곤충 세포의 생육

기존배지에서의 High-Five 세포의 성장량 (1.0×10^6 cells/ml)과 비교하였을 경우 인공배지에서의 세포생장은 26세대까지는 비슷한 결과를 보였으나, 이후 급속히 생육이 저하되는 결과를 보였다 (그림 18). 따라서 인공배지를 보완하거나 계대할 경우 기존 상업용 배지와 인공배지를 교대로 사용하는 것이 좋을 것으로 판단되었다.

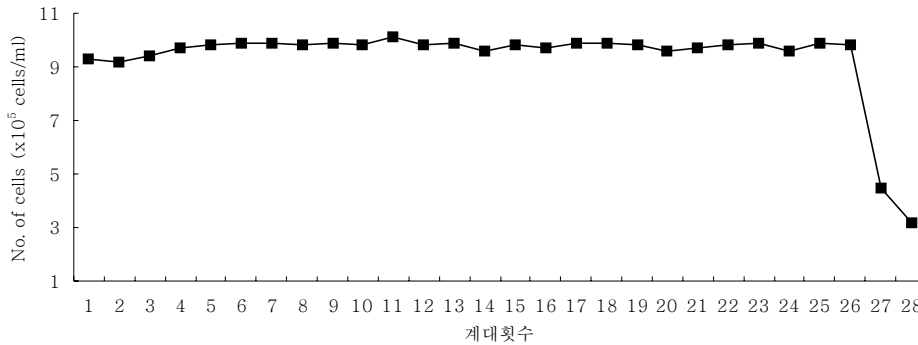


Fig. 18. Stability of High-Five cells in the full artificial media in continuous generation times.

다) 인공배지 조건에서 재조합 베쿨로바이러스의 생산량 비교

베쿨로바이러스 생산성을 기존배지와 비교할 경우 인공배지에서의 바이러스 생산량은 약 16배 정도 감소하는 결과를 보였다 (그림 19, 20). 곤충세포의 초기 계대는 양호하였지만, 세포 자체의 특성변화로 인해 바이러스 생산에는 부적합한 형태로 전환된 것으로 판단되었다. 가격 대비 생산성에 있어서도 인공배지에서의 생산성은 떨어지는 것으로 나타났다 (표 6).

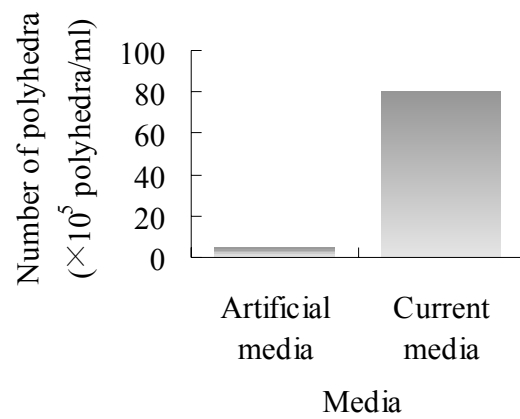


Fig. 19. Production of recombinant polyhedra in High-Five cells using artificial media.

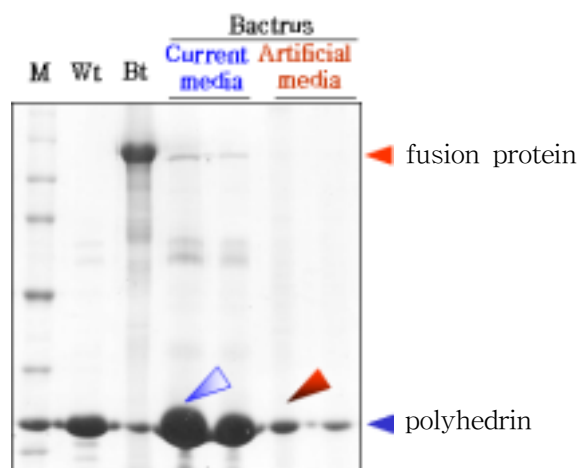


Fig. 20. Production of recombinant polyhedra and fusion protein in artificial media.

Table 6. Economical efficiency of current media and artificial media in monolayer culture

	Price of media (won/L)	Productivity (PIBs/10,000 won)	Remark
Artificial media	10,000-15,000	5×10^5	except manufacturing cost
Current media	40,000-50,000	2×10^6	GIBCO

나. 곤충 유충을 이용한 재조합 벡셀로바이러스 대량생산 연구

1) 파밤나방 사육조건 연구

가) 파밤나방 인공사료 선발

파밤나방의 인공사료 조성에 따른 개체사육 결과는 표 7과 같다. 유충기간은 인공사료가 배추에 비해 다소 길었으며, 유충생존율도 20%정도 높은 것으로 조사되었다. 용화율도 배추보다는 인공사료에서의 생육이 10%이상 높았으며 Diet II가 66%로 가장 높은 용화율을 보였다. 용무게는 사료간의 큰 차이를 보이지 않았으나 인공사료를 공급한 개체의 무게가 다소 작은 경향이였다. 우화율은 배추의 경우 44%, Diet I, II는 각각 56%, 62%로 유충기간부터 성충이 되기까지 생사료보다 인공사료의 생존율이 높았다. Diet I과 Diet II간의 생육은 두 인공사료 모두 양호하였으나, 용화율과 우화율에서 Diet I이 더 높은 결과를 보여, Diet I을 파밤나방 대량사육의 인공사료로 1차 선발하였으며 추후 시험에서 Diet용 사료로 계속 적용하였다 (표 7).

Table 7. Insect rearing parameter of *Spodoptera exigua* in different diet

Content	Chinese cabbage	Diet I	Diet II
larval stage (day)	14.7±1.0	17.3±1.0	16.3±0.6
Larval survival rate (%)	54.0	72.0	78.0
Pupal rate (%)	48.0	58.0	66.0
Weight of pupae (mg)	86.7±2.8	83.4±4.0	84.7±4.8
Pupal stage (day)	6.5±0.7	7.1±0.6	6.7±0.6
Eclosion rate (%)	44.0	56.0	62.0
Adult (day)	5.2±0.8	4.7±0.6	5.0±0.5

나) 파밤나방 사육용기의 선발

개체사육과 집단사육의 파밤나방 발육 조사결과 용 무계에 있어서 큰 차이를 보이지 않았으나 용화율과 우화율은 개체사육이 가장 높았으며, Petri dish, 플라스틱 용기 순이었다. 플라스틱 용기의 사육 시 초기 접종 개체수에 따른 생존율은 carnivalism에 의해 30개체를 접종한 경우와 50개체를 접종하였을 경우 간의 차이가 뚜렷하게 나타났다. 30개체를 접종한 경우 용화율과 우화율이 각각 52%, 42%였으나 50마리를 접종하였을 경우에는 37.3%, 25.3%로 30마리 이상 집단사육 하는 것은 생존율 면에서 효율성이 낮았다. Petri dish로 사육하였을 경우 생존율은 개체사육과 대등한 수준으로 높았으나 플라스틱 용기에 비해 작업시간이 많이 소요되어 대량사육에는 적합하지 않은 것으로 판단된다. 본 시험결과에 따라 대량사육을 위해 적절한 크기의 플라스틱 용기 (13×21×7 cm)를 사용하는 것이 생력화 및 효율성 증대에 좋을 것으로 판단된다. 또한 상기 플라스틱 용기 1개당 사육 개체수는 30마리 정도가 유지되도록 관리해 주는 것이

좋을 것으로 판단되었다 (표 8).

한편, 선발된 Diet I과 플라스틱 용기를 이용하여 10세대 이상 장기 사육을 진행하고 있으며 이 과정에서 발견되는 문제를 검토하여 사료 및 용기의 개선을 진행할 예정이다. 또한 현재의 인공사료 Diet I에 베쿨로바이러스를 접종하여 파밤나방 유충에 공급함으로써 유충을 이용한 베쿨로바이러스의 생산성시험을 진행하였다.

Table 8. Insect rearing parameter of *Spodoptera exigua* in different rearing container

Content	Individual rearing cup (∅4×4 cm)	Plastic container (13×21×7 cm)	Plastic container (13×21×7 cm)	petri dish (∅8.5×1.4 cm)
Initial larva/container	1	30	50	5
Total larva	150	150	150	150
Pupal rate (%)	64.0	52.0	37.3	60.7
Eclosion rate (%)	56.7	42.0	25.3	52.0
Weight of pupae (mg)	82.4±4.6	84.9±6.6	82.7±5.0	82.9±7.0

2) 실험실 조건에서의 파밤나방 유충을 이용한 재조합 베쿨로바이러스 생산연구

가) 재조합 베쿨로바이러스 접종량별 생산량 비교 I

베쿨로바이러스 접종량이 증가할수록 생성되는 다각체수는 증가하는 양상을 보였으나, 재조합 베쿨로바이러스 (Btrus-p101Ac, Btrus-p101C)의 경우 야생주

바이러스에 비해 접종량이 증가할수록 생성되는 다각체수는 증가하는 양상을 보였으나, 재조합 베쿨로바이러스의 경우 야생주바이러스에 비해 1/3-1/8 정도 떨어지는 생산량을 보였다 (표 9). 이러한 결과는 바이러스의 증식을 위해 사용된 과밤나방 유충이 일정시간 이상 활력을 유지하고 있어야 하나, 재조합 베쿨로바이러스의 경우 다각체내에 포함된 Bt 독소 단백질에 의해 숙주가 더 빨리 치사되기 때문인 것으로 판단되었다 (그림 21).

Table 9. Production of recombinant polyhedra in different infection rate using *S. exigua* larva

Virus	Infection rate (PIBs/diet)	Productivity (PIBs/diet)
Wt AcNPV	10^5	6.3×10^8
	10^4	4.2×10^8
	10^3	3.6×10^8
Btrus-p101Ac	10^5	2.7×10^8
	10^4	4.2×10^7
	10^3	2.5×10^7
Btrus-p101C	10^5	8.3×10^7
	10^4	$< 1.0 \times 10^7$
	10^3	$< 1.0 \times 10^7$



Fig. 21. *S. exigua* larvae infected with recombinant baculovirus in 9 days after infection.

나) 재조합 베칼로바이러스 접종량별 생산량 비교 II

베칼로바이러스 분무 접종농도가 높을수록 높은 다각체 생산성을 보였다 (그림 22). 투입대비 산출량의 비를 검토한 결과 1×10^4 PIBs/ml로 접종하는 것이 적합하나, 추후 접종농도를 줄여서 적합한 바이러스 접종농도를 확립하고자 하였다 (표 10).

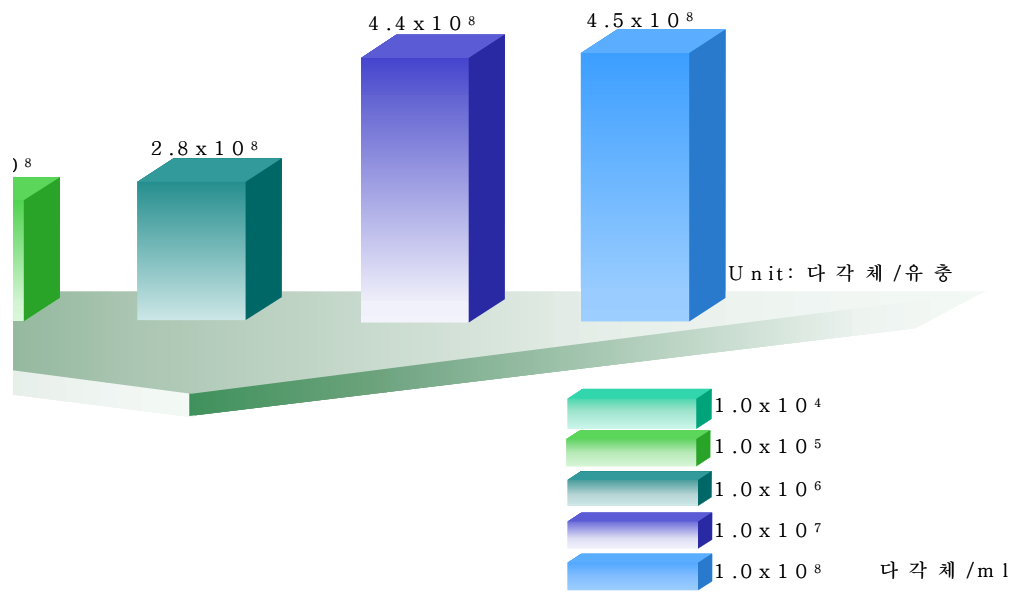


Fig. 22. Production of recombinant polyhedra in different infection rate using spray infection method.

Table 10. Productivity of recombinant polyhedra in different infection rate

Infection rate (PIBs/ml)	Productivity (PIBs/1 PIB infected)
1×10^4	1.2×10^4
1×10^5	2.3×10^3
1×10^6	2.8×10^2
1×10^7	4.4×10^1
1×10^8	4.5×10^0

다) 사료첨가제 첨가를 통한 베쿨로바이러스 생산성 향상방법 검토

바이러스 생산량을 높이기 위해 사용된 물질 중에서, boric acid의 경우 생산량 향상의 결과를 보였으나 (표 11), stilbene은 오히려 생산량 감소의 결과를 보였다. boric acid의 경우 세포내에서의 바이러스 증식을 유도하는 특성을 갖는 것으로 최근 보고되어 있다 (Cisneros *et al.*, 2001). 반면에 stilbene은 유충의 중장세포에서의 바이러스 침입력을 높여주어 (Shapiro, 2000) 오히려 과밤나방의 치사율을 높여 줌으로써 바이러스 생산량이 감소된 것으로 판단되었다.

Table 11. Enhancement of polyhedra productivity using inorganic substances in larva

Virus	Additives	Infection rate (PIBs/diet)	Productivity (PIBs/diet)
	-	10 ⁵	1.0×10 ⁹ b
Wt AcNPV	boric acid 1%	10 ⁵	1.8×10 ⁹ a
	stilbene 1%	10 ⁵	6.0×10 ⁸ bc

* stilbene : optical brightener

라) 사료첨가제 Boric acid 함량에 따른 재조합 베쿨로바이러스 생산량 비교

Bactrus의 생산성은 큰 차이를 보이지는 않았으나, boric acid의 농도가 높을수록 감염기간 (생산기간)이 단축되는 결과를 보였다 (그림 23). 하지만, 5%이상의 농도에서는 saturation되는 경향을 보였다. 따라서 boric acid를 사용함으로써 베쿨로바이러스 생산기간을 단축할 수 있으며, 적합한 사용농도는 2%로 판단되었다.

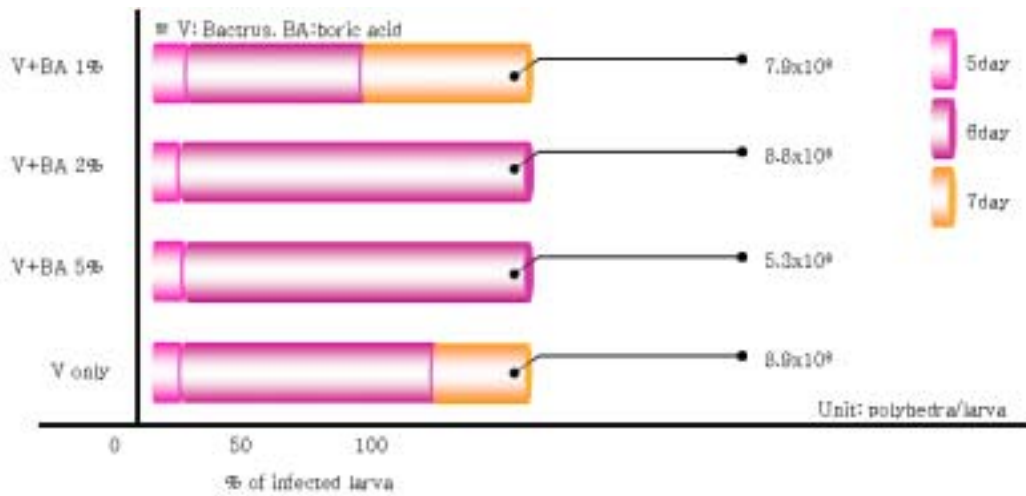


Fig. 23. Enhancement of recombinant polyhedra productivity using different dosage of boric acid in spray infection method.

3) Pilot 조건에서의 파밤나방을 이용한 재조합 베쿨로바이러스 생산연구

가) 접종농도별 재조합 베쿨로바이러스의 생산성 비교 I

재조합 베쿨로바이러스의 접종 8일차에서의 사충율은 모든 처리구에서 98% 이상으로 양호한 수준을 보였다 (표 12, 그림 24). 하지만 재조합 베쿨로바이러스 생산성은 시험 농도인 $10^5 \sim 10^7$ PIBs/ml 농도 범위 내에서 큰 차이 없이 약 $5 \sim 6 \times 10^8$ PIBs/larva의 생산성을 보였다. 따라서 추가적인 접종원 농도의 절감에 따른 생산성 검토가 필요한 것으로 판단되었다.

Table 12. Production of recombinant polyhedra in different infection rate in entire larval rearing system

Virus	Infection rate (PIBs/ml)	Additive(%)	% of dead larva (8 days)	No. of polyhedra (PIBs/larva)
Wild-type	1×10^5	Boric acid 2%	98.0	8.7×10^8
	1×10^6		100.0	1.2×10^9
	1×10^7		100.0	6.1×10^8
Recombinant (Bactrus)	1×10^5		98.0	5.9×10^8
	1×10^6		100.0	5.8×10^8
	1×10^7		100.0	6.1×10^8



Fig. 24. Artificial diet I sliced for production of recombinant polyhedra in pilot scale.

나) 접종농도별 재조합 베쿨로바이러스의 생산성 비교 II

야생주 베쿨로바이러스의 경우 접종원의 농도가 $10^3 \sim 10^5$ PIBs/ml 범위에서는 생산성 차이가 크지 않은 것으로 확인되었으나, 재조합 바이러스의 경우 접종원 농도가 감소될수록 다각체 생산성은 증가하는 경향을 보였다 (표 13). 따라서 재조합 바이러스의 바이러스 접종농도는 낮은 수준의 농도 (10^3 PIBs/ml 내외)로 접근하는 것이 용이할 것으로 판단되었다.

Table 13. Production of recombinant polyhedra in another different infection rate in entire larval rearing system

Virus	Infection rate (PIBs/ml)	Additive (%)	% of dead larva	No. of polyhedra
			8days	(PIBs/larva)
Wild-type	1×10^3	Boric acid 2%	100.0	7.9×10^3
	1×10^4		98.0	8.2×10^8
	1×10^5		100.0	7.8×10^8
Recombinant (Bactrus)	1×10^3		100.0	1.1×10^9
	1×10^4		100.0	7.5×10^8
	1×10^5		97.0	3.8×10^8

다) 대형 사육용기조건에서의 재조합 베쿨로바이러스 생산성
 재조합 베쿨로바이러스의 생산성은 3.3×10^8 PIBs/ml로 야생주 바이러스의 약 50% 수준인 것으로 확인되었다 (표 14, 그림 25).

Table 14. Production of recombinant polyhedra in large size container

Virus	Infection rate (PIBs/ml)	Additive (%)	% of dead larva	No. of polyhedra (PIBs/larva)
			8 days	
Wild-type	1×10^3	Boric acid 1%	98.0	7.0×10^3
Recombinant (Bactrus)	1×10^3		97.0	3.3×10^3



Fig. 25. Large size container used in the production of recombinant polyhedra.

다. 실내조건에서의 재조합 베큘로바이러스의 살충효과 검증

1) Bt독소 함유 재조합 베큘로바이러스의 살충효과 검증

가) 재조합 베큘로바이러스의 배추좀나방에 대한 살충효과 확인시험

Btrus-p101Ac는 야생주바이러스 (AcNPV)에 비해 상당히 높은 살충활성을 보였다 (그림 26). 이러한 원인은 Btrus-p101Ac에 cloning된 배추좀나방에 살충성을 띄는 Bt cry1Ac 유전자의 발현에 의해 나타난 결과로 판단되며, 추후 적용 시에는 10^6 PIBs/ml 이상으로 처리되어야 할 것으로 판단되었다.

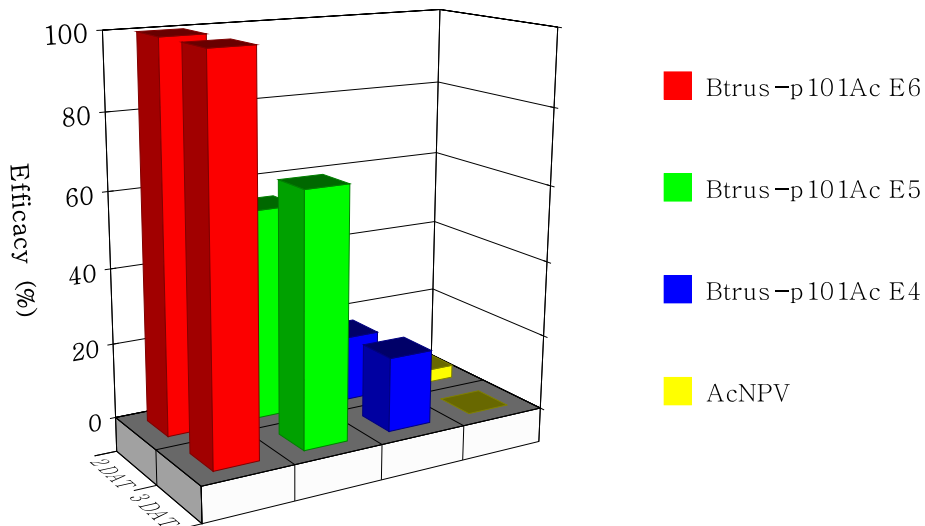


Fig. 26. Insecticidal activity of recombinant baculovirus, Btrus against *Plutella xylostella* larva.

나) 재조합 베큘로바이러스의 과밤나방에 대한 살충효과 확인시험

Btrus-p101Ac와 Btrus-p101C 모두 과밤나방에 대한 우수한 살충효과를 보였으나, 초기효과에 있어서는 Btrus-p101C가 다소 높은 경향을 보였다 (그림 27). 이러한 원인은 재조합 베큘로바이러스에 cloning된 Bt 유전자인 cry1C가 cry1Ac보다 과밤나방에 대해 높은 살충성을 갖고 있기 때문인 것으로 판단되었다.

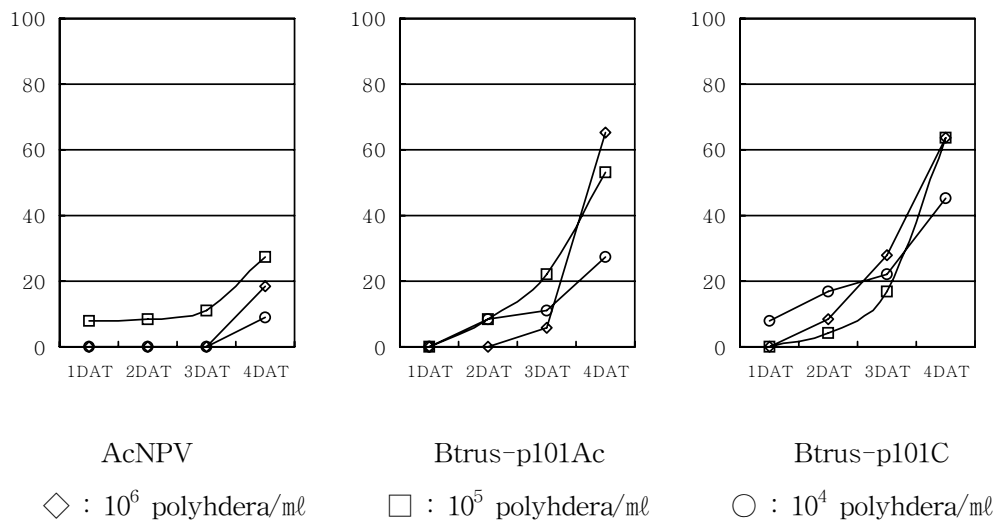


Fig. 27. Insecticidal activity of recombinant baculovirus, Btrus against *Spodoptera exigua* larva (efficacy, %).

다) 재조합 베큘로바이러스의 목화바둑명나방에 대한 살충효과 확인시험

Btrus-p101Ac보다 Btrus-p101C가 목화바둑명나방에 우수한 방제효과를 보였다 (그림 28).

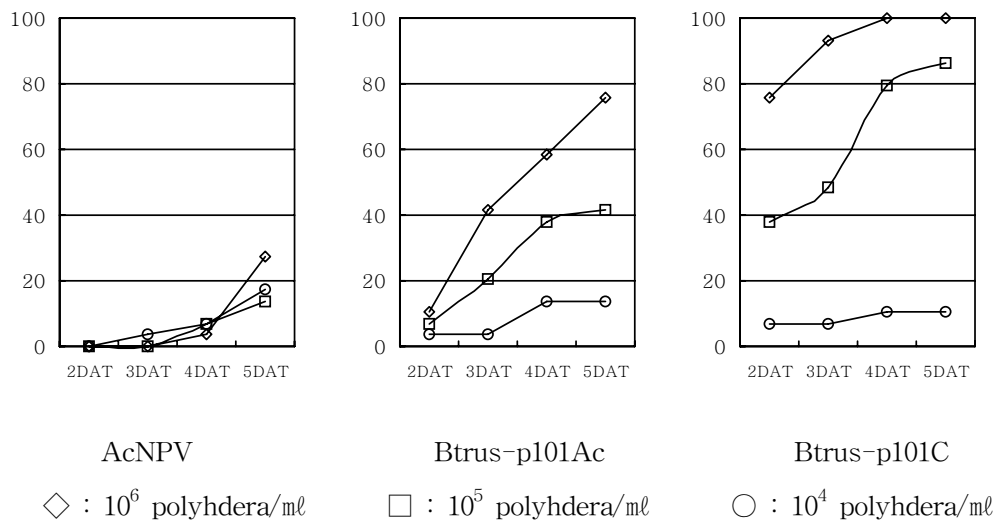


Fig. 28. Insecticidal activity of recombinant baculovirus, Btrus against *Palpita indica* larva (Efficacy, %).

라) 재조합 베쿨로바이러스의 거세미나방에 대한 살충효과 확인시험
 AcNPV, Btrus-p101Ac, Btrus-p101C 모두 거세미나방에 대해 저조한 살충효과를 보여, 실용성은 떨어지는 것으로 판단되었다 (그림 29).

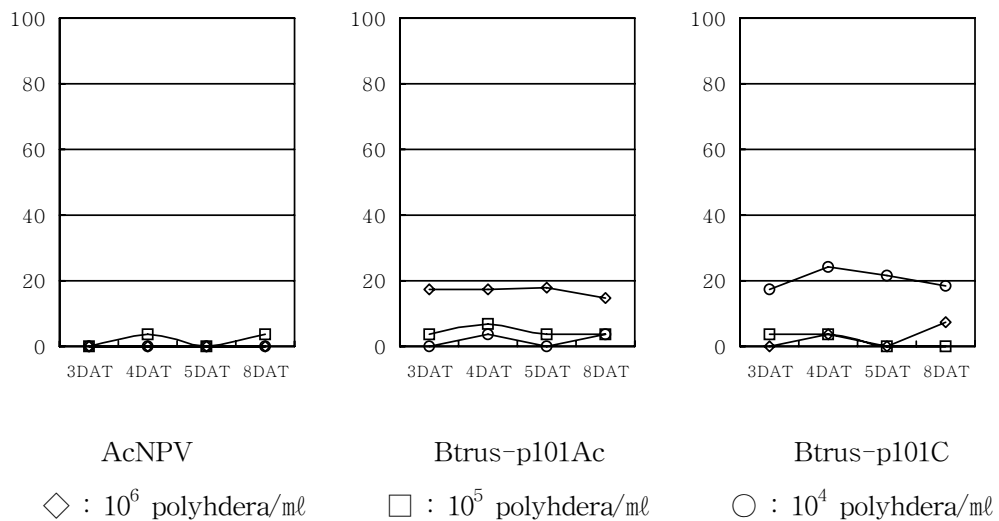


Fig. 29. Insecticidal activity of recombinant baculovirus, Btrus against *Agrotis segetum* larva (Efficacy, %).

2) Bt독소를 함유하는 야생주화 재조합 베쿨로바이러스의 살충효과 검정

가) 야생주화 되는 재조합 베쿨로바이러스 (Bactrus)의 배추좀나방에 대한 살충효과

Bactrus는 야생주 AcNPV에 비해 상당히 높은 살충활성을 보였다 (표 15). 이러한 원인은 Bactrus에 cloning된 배추좀나방에 살충성을 띄는 Bt cry1Ac 유전자의 발현에 의해 나타난 결과로 판단되며, 추후 적용 시에는 10^6 PIBs/ml 이상으로 처리되어야 할 것으로 판단되었다.

표 15. Insecticidal activity of recombinant baculovirus, Bactrus against *Plutella xylostella* larva

Virus	LD ₅₀		ST ₅₀ ^a	
	×10 ³ PIBs/larva	95% CI ^c	Hours	95% CI
Wt AcNPV	>100	NC ^b	233.5	178.8-435
Bactrus	1.1	0.4 - 2.6	22.1	12.7-29

^a applicated dosage was 1×10⁵ PIBs/larva

^b non-calculable

^c confidence interval

나) 야생주화 되는 재조합 베쿨로바이러스 (Bactrus)의 파밤나방에 대한 살충효과

Bactrus는 AcNPV와 대등하게 높은 살충활성을 보였다 (표 16). 따라서 Bt cry1Ac 유전자가 cloning된 재조합 베쿨로바이러스가 기존의 파밤나방에 대한 살충활성을 그대로 보유하고 있는 정상적인 재조합 바이러스로 판단되었다.

표 16. Insecticidal activity of recombinant baculovirus, Bactrus against *Spodoptera exigua* larva.

Virus	LD ₅₀		ST ₅₀ ^a	
	×10 ³ PIBs/larva	95% CI	Hours	95% CI
Wt AcNPV	5.5	1.2 - 33.0	74.4	64.9 - 83.7
Bactrus	0.8	0.2 -2.1	61.5	54.1- 68.9

^a applicated dosage was 1×10⁵ PIBs/larva.

3) 야생주화 되는 재조합 베쿨로바이러스 (Bactrus)의 계대에 따른
야생주화 확인

야생주화되는 재조합 베쿨로바이러스 Bactrus는 계대가 진행됨에 따라 점차 재조합 단백질의 발현량이 감소하는 경향을 보이고 있으며, 특히 BV 접종농도가 낮은 1 MOI에서의 재조합 단백질의 발현량이 더 빨리 감소하는 경향을 보였다 (그림 30). 이러한 원인은 접종농도가 낮음으로 인해 Sf-9 곤충 세포 내에서의 증식 횟수가 더 많기 때문인 것으로 판단된다. 그리고 계대가 진행됨에 따라 배추좀나방에 대한 살충효과 또한 감소하는 경향을 보이고 있으며 살충효과 감소율은 1 MOI로 계대하는 재조합 베쿨로바이러스에서 더 높았다 (그림 31). 재조합 단백질의 발현량 감소는 Bt cry1Ac 독소단백질의 감소를 의미하는 것이므로 살충효과 또한 이러한 의미에서 해석이 가능하다. 결론적으로 재조합 단백질 발현량과 살충효과 감소측면에서 재조합 베쿨로바이러스 Bactrus는 계대과정에서 점차 야생주화 되는 것으로 특성을 가지는 것으로 판단되었다.

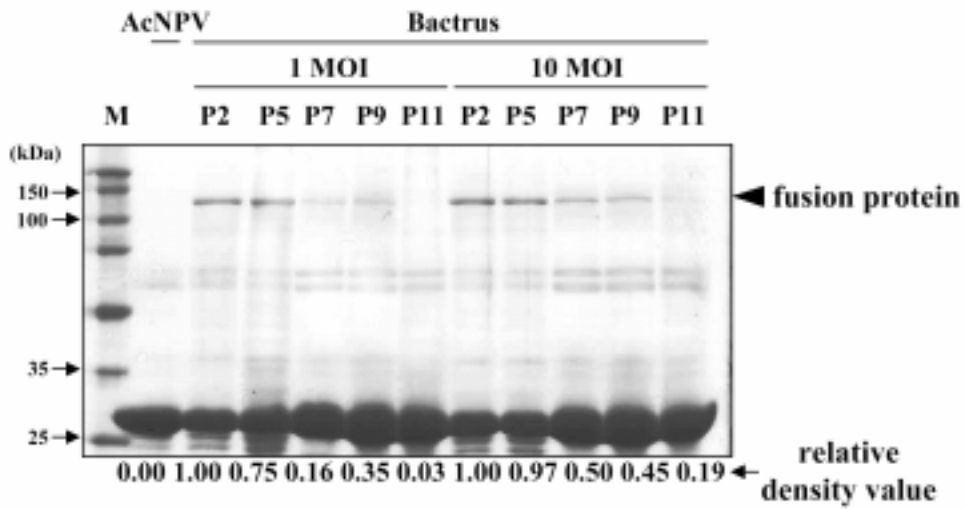


Fig. 30. SDS-PAGE analysis of the polyhedra produced by Bactrus at 1 and 10 MOI along serial passage. Passage numbers are indicated as 'pn', p for passage and n for number. Lane M: protein molecular weight marker; Ac: AcNPV; p2 - p11: Bactrus with different passage number. The samples containing same number of polyhedra, 2×10^6 polyhedra, were loaded into each well. The relative density value at the bottom of the lanes were determined by densitometry scanning of the gel.

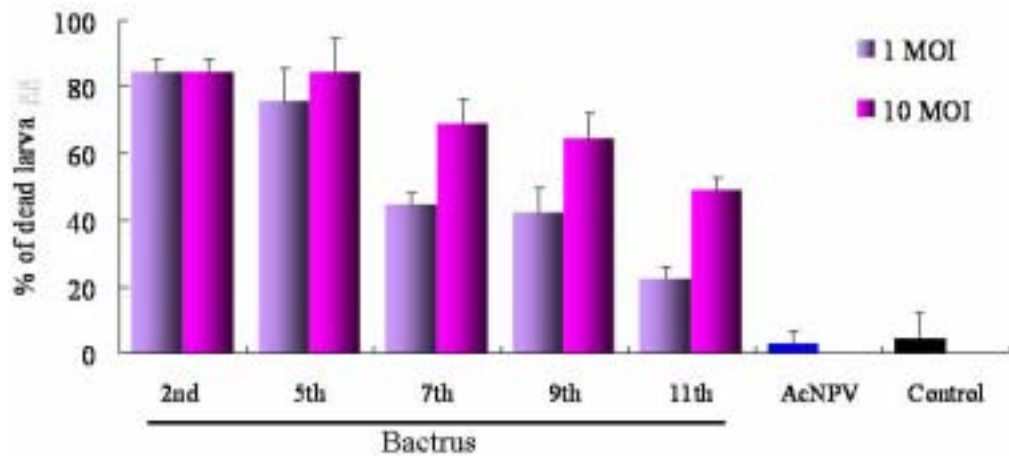


Fig. 31. Insecticidal activity of Bactrus polyhedra produced with different passage (P2-P11) and MOIs (1 and 10) of recombinant baculovirus against second instar larvae of *P. xylostella*. 1×10^5 PIBs/larva was applied with diet method. Black and gray columns indicate 1 and 10 MOI, respectively.

라) 전갈독 함유 재조합 베쿨로바이러스의 배추좀나방에 대한 살충효과
 전갈독 함유 재조합 베쿨로바이러스는 배추좀나방에 대한 살충효과가 미흡한 것으로 확인되었다 (그림 32).

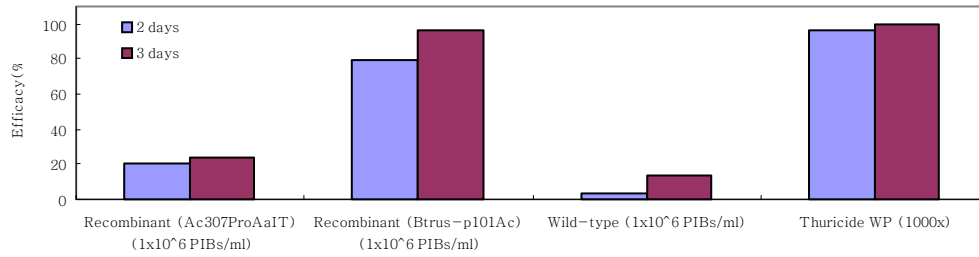


Fig. 32.. Insecticidal activity of recombinant baculovirus, Ac307ProAaIT against *Plutella xylostella* larvae.

마) 전갈독 함유 재조합 베컬로바이러스의 과밤나방에 대한 살충효과
 전갈독 함유 재조합 베컬로바이러스는 야생주 바이러스와 유사한 살충효과를 보였으며 Bt 독소유전자가 함유된 재조합 베컬로바이러스 (Btrus-p101Ac)보다는 다소 떨어지는 살충효과를 보였다 (그림 33).

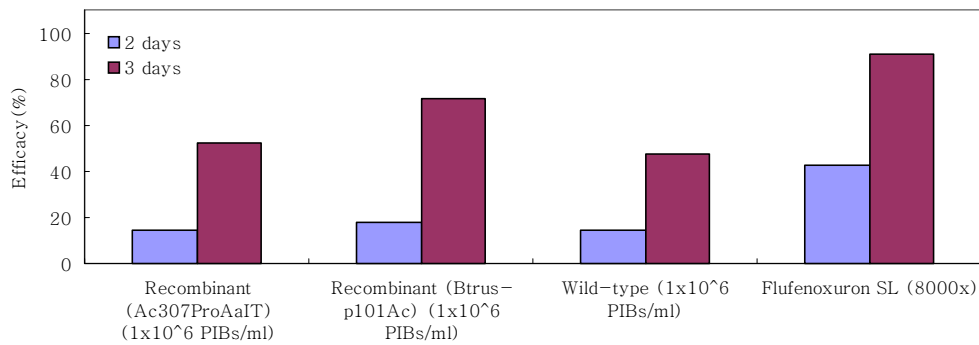


Fig. 33. Insecticidal activity of recombinant baculovirus, Ac307ProAaIT against *Spodoptera exigua* larvae.

라. 제형화 연구

1) 제형화 기초 연구 및 최적 시제품 선발

가) 실내조건에서 UV protectant별 안정성 비교

SLS (sodium ligno sulfate), Congo Red의 UV 차단효과가 우수하였으며, 이 중에서 제제에 SLS를 사입하여 살충효과를 유지시킬 수 있는 보조제로 검토하였다 (표 17).

Table 17. Effect of different UV protectants on the polyhedral insecticidal activity

Virus	Application dosage	UV protectant		Treatment of UV	Efficacy (%)
		Content	ppm		
Bactrus	10 ⁶ PIBs/ml	SLS	100	O	97.7
		Flourescent brightener 28	100	O	76.7
		Congo Red	100	O	90.7
		Tixolex 25	100	O	79.1
		-	-	O	81.4
		-	-	X	95.3

나) 수화제 최적 시제품 선발

재조합 베칼로바이러스 분말원제 1%와 증량제로 ammonium sulfate를 기본으로 하여 UV protectant SLS, 협력제 Stilbene, 습윤제 S9 및 기타

계면활성 보조제를 pre-mix 조건에서 선발한 후 최종적으로 시제품 처방을 확립하였다 (표 18, 19, 20, 21). 최종 처방으로 air milling으로 제제된 제제의 물리성 검토결과 수화성 2분 30초, 현수율 80% 이상, 평균입경 11.3 μm , pH 6.7의 양호한 물리성을 확인하였다.

Table 18. Physical parameter of wettable powder formulation inserted of different humectants in pre-mixed condition

Role	content (%)	Composition				
Active ingredient	1.0	Recombinant baculovirus(Bactrus)				
Carrier	rest	Ammonium sulfate (rest)				
UV protectant	5.0	Sodium ligno sulfate (SLS)				
Humectant	3.0	S9	T1	E	D	G
Rest	10.0	Dispersant and other surfactant				
Wettability (time)	-	6'00''	8'30''	13'22''	8'41''	9'15''
Particle size (μm)	-	12.3	13.0	13.0	31.2	28.8

Table 19. Physical parameter of wettable powder formulation inserted of different content of humectants, S9 in pre-mixed condition

Role	content (%)	Composition	
Active ingredient	1.0	Recombinant baculovirus(Bactrus)	
Carrier	rest	Ammonium sulfate (rest)	
UV protectant	5.0	Sodium ligno sulfate (SLS)	
Humectant	-	S9 (2%)	S9 (3%)
Rest	10.0	Dispersant and other surfactant	
Wettability (time)	-	6'00''	5'42''
Particle size (μm)	-	12.3	18.1

Table 20. Physical parameter of wettable powder formulation inserted of cooperator, stilbene in pre-mixed condition

Role	content (%)	Composition	
Active ingredient	1.0	Recombinant baculovirus(Bactrus)	
Carrier	rest	Ammonium sulfate (rest)	
UV protectant	5.0	Sodium ligno sulfate (SLS)	
Humectant	2.0	S9	
Synergist	-	-	Stilbene
Rest	10.0	Dispersant and other surfactant	
Wettability (time)	-	5'57''	4'49''
Particle size (μm)	-	13.1	19.7

Table 21. Physical parameter of established wettable powder formulation (air milling)

Role	content (%)	Composition
Active ingredient	1.0	Recombinant baculovirus(Bactrus)
Carrier	rest	Ammonium sulfate (rest)
UV protectant	5.0	Sodium ligno sulfate (SLS)
Humectant	2.0	S9
Synergist	-	Stilbene
Rest	10.0	Dispersant and other surfactant
Wettability (time)	-	2'30''
Particle size (μm)	-	11.3
suspensibility (%)	-	80.0 \uparrow
pH	-	6.7

다) 액상수화제 최적 시제품 선발

재조합 베쿨로바이러스 분말원제와 증량제를 기본으로 하여 계면활성제 EP와 증점제 Xanthan gum을 선발하였다 (표 22, 23). Ball milling으로 제제화된 최종

제제의 물리성을 검토한 결과 평균입경 8.3 μm , 분말도 99% 이상, 현수율 90% 이상, pH 6.5의 양호한 물리성을 확인하였다 (표 24).

Table 22. Physical parameter of suspension concentrate formulation inserted of different surface active agent in pre-mixed condition

Role	content (%)	Composition		
Active ingredient	1.0	Recombinant baculovirus (Bactrus)		
Carrier	rest	Water		
UV protectant	5.0	Sodium ligno sulfate (SLS)		
Antiseptic agent	0.1	Proxcel GXL		
Surface active agent (S.A.A.)	10.0	EP	D	S
Suspensibility (%)	-	93.7	89.4	84.3

Table 23. Physical parameter of suspension concentrate formulation inserted of different content of diluent, Xanthan gum(XG) in pre-mixed condition

Role	content (%)	Composition		
Active ingredient	1.0	Recombinant baculovirus (Bactrus)		
Carrier	rest	Water		
UV protectant	5.0	Sodium ligno sulfate (SLS)		
Antiseptic agent	0.1	Proxcel GXL		
Surface active agent (S.A.A.)	10.0	EP		
Diluent	-	XG (0.12%)	XG (0.20%)	XG (0.25%)
Suspensibility (%)		94.3	93.7	94.4
Viscosity (12rpm, SPDL#2)		190	382	590

Table 24. Physical parameter of established suspension concentrate formulation (ball milling)

Role	content (%)	Composition
Active ingredient	1.0	Recombinant baculovirus (Bactrus)
Carrier	rest	Water
UV protectant	5.0	Sodium ligno sulfate (SLS)
Antiseptic agent	0.1	Proxcel GXL
Surface active agent (S.A.A.)	10.0	EP
Diluent	0.20	Xanthan gum
Suspensibility (%)		95.1
Viscosity (12rpm, SPDL#2)		190
Particle size (μm)		8.3
Wet seive test		99% 이상
pH		6.5

2) 최적 시제품의 경시변화 안정성 확인

재조합 벡탈로바이러스 수화제는 실온조건에서 6개월 현재까지 다각체수가 일정하게 유지되었다 (그림 34). 반면에 액상수화제는 제제에 사용하는 원제의 후처리공정에 큰 영향을 받는 것으로 확인되었다 (그림 35). 과밤나방 사체를 수거한 후 바로 건조한 원제를 이용하여 제제한 액상수화제는 원제 건조방법 (동결건조, 풍건)과 제제의 pH와 상관없이 보관기간이 길어짐에 따라 다각체수가 감소하는 경향을 보였다 (그림 36). 하지만 수거 사체를 1차 세척하여 건조한 원제를 이용하여 제제한 액상수화제는 분말제제와 유사한 경시변화 안정성을 보였다. 따라서 액상수화제의 경우 원제 후처리공정을 통하여 제제 안정성을 높일 수 있는 것으로 판단되었다.

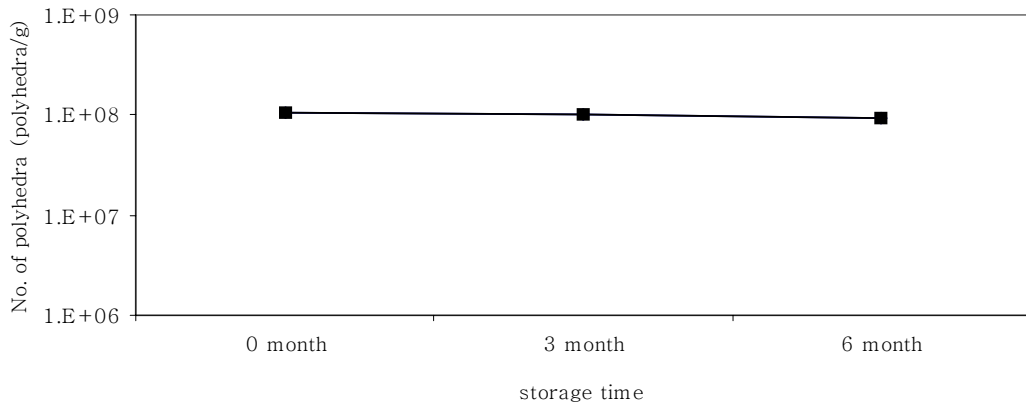


Fig. 34. Stability of wettable powder formulation in room temperature.

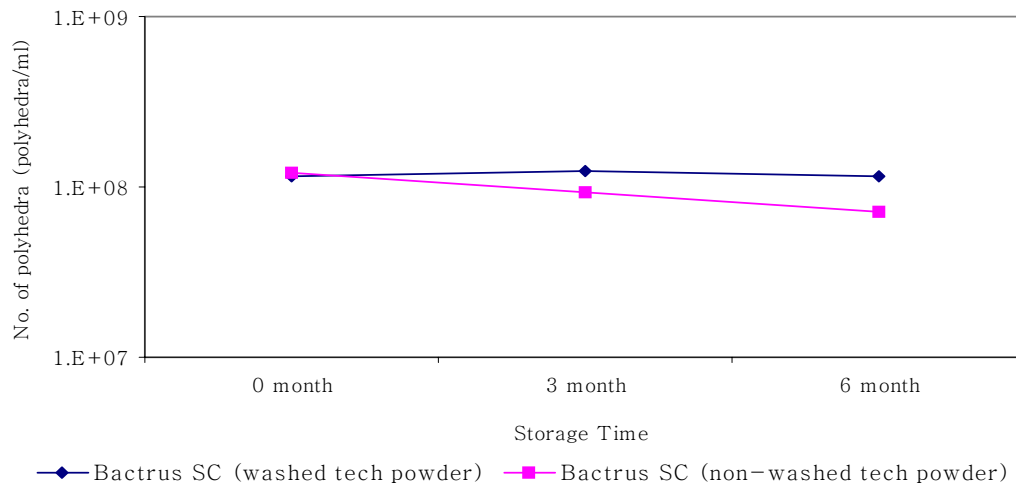


Fig. 35. Stability of suspension concentrate formulation made by different tech powder in room temperature.

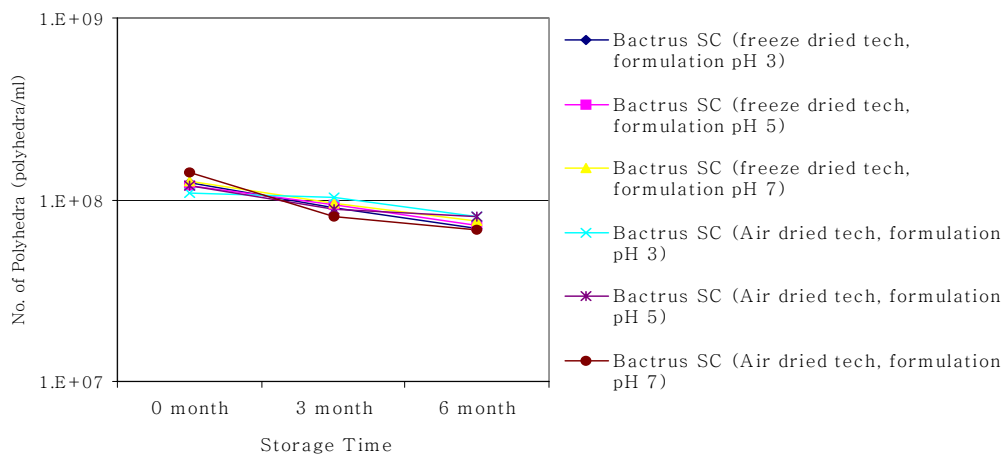


Fig. 36. Stability of suspension concentrate formulation made by different tech powder and different pH of formulation in room temperature.

마. 최적화된 제제품의 야외조건에서의 실증연구

1) 야외 살충효과 검토

가) 과밤나방에 대한 야외 실증시험

재조합 베쿨로바이러스 수화제와 액상 수화제 모두 야생주바이러스에 비해 20% 정도 높은 초기 살충효과를 보였으며, 대조로 처리된 *Bt aizawai* NT0423 수화제에 비해 높은 방제효과를 보였다 (그림 37).

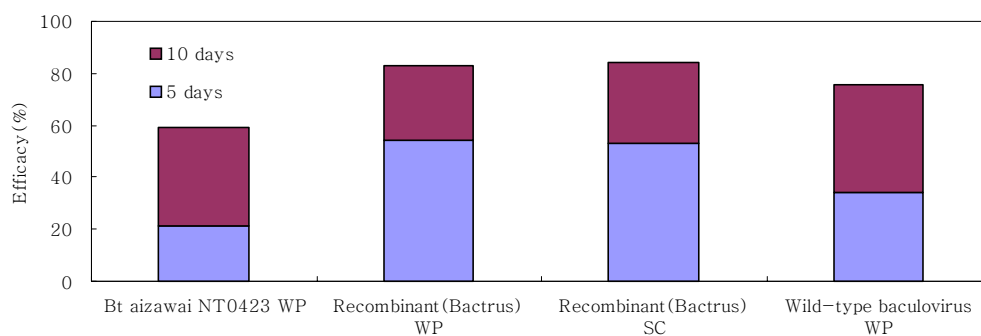


Fig. 37. Insecticidal activity of wettable powder and suspension concentrate formulation against *Spodoptera exigua* in the field.

나) 배추좀나방에 대한 야외 실증시험

재조합 베쿨로바이러스 수화제와 액상수화제 모두 단제로 처리된 *Bt aizawai* NT0423 WP에 비해 약 8-10% 낮은 88-90%의 방제효과를 보였으나, 실용성은 높은 것으로 판단되었다 (그림 38). 야생주 바이러스 수화제는 실내 시험결과와 마찬가지로 매우 낮은 효과를 보였다.

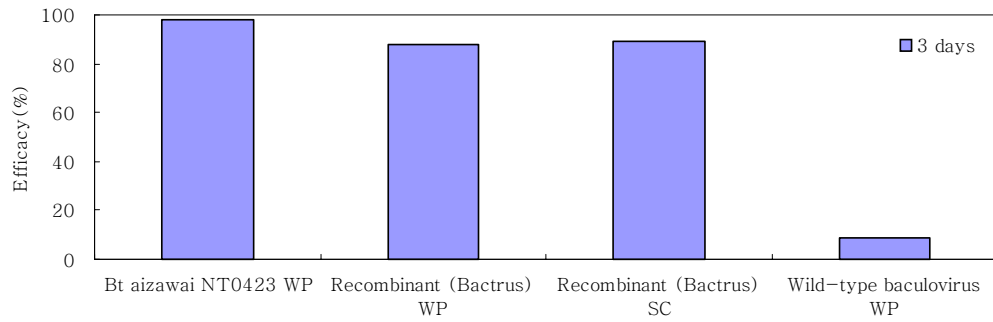


Fig. 38. Insecticidal activity of wettable powder and suspension concentrate formulation against *Plutella xylostella* in the field.

2) 야외조건에서의 안정성 연구

재조합 베쿨로바이러스 수화제와 액상수화제의 야외 안정성은 분무처리 후 10일 후부터 감소하는 것으로 확인되었다 (그림 39). 따라서 과밤나방의 밀도증감 및 유입상황에 따라 활성 유지 측면에서 7-10일 간격으로 반복 처리하는 것이 효과적일 것으로 판단되었다.

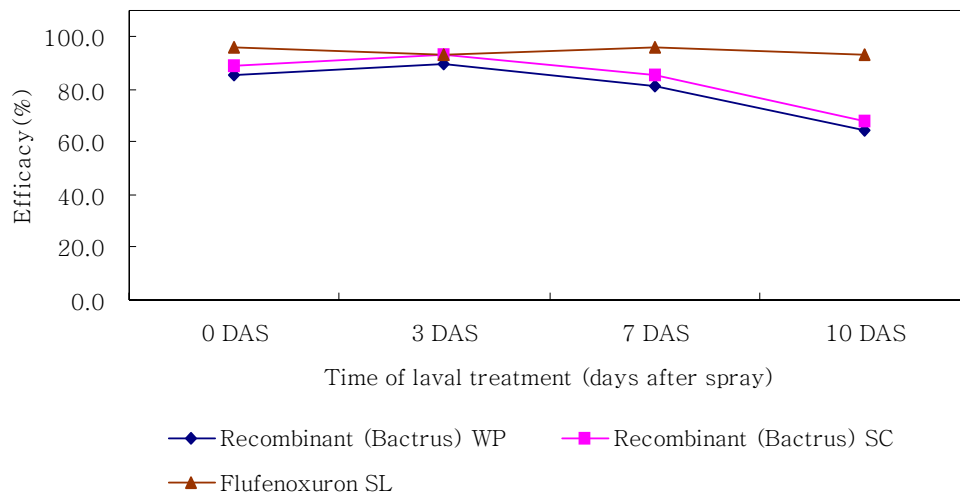


Fig. 39. Duration period of insecticidal activity in the field.

3. 결론

곤충세포를 이용한 재조합 베쿨로바이러스 대량생산 체계를 확립하기 위하여 세포 생육 및 바이러스 생산성 높은 High-Five 곤충세포를 선발하였으며 적합한 생산조건을 확립하였으며, 소규모 Bioreactor 조건에서 세포생육 및 바이러스 생산성을 높이기 위해 배양액 유동방식을 변경 (paddle type→marine type)하여 생산효율을 높였다. 기존 생산 배지의 경제성을 높이기 위해 저가용 인공배지 검토를 진행하여 26세대까지 계대를 유지하였으나 지속적인 활력 유지가 어렵고 바이러스 생산성이 낮았다. 또한, 곤충세포를 이용한 생산방법은 장기간의 배양기간, 생산 효율성 및 경제성 부족으로 미생물 살충제의 원료 생산으로는 부적합한 것으로 판단되었다.

곤충유충을 이용한 재조합 베쿨로바이러스 대량생산의 경우 과밤나방 대량사육을 위한 환경 및 시설조건과 경제성 있는 배지를 선발하였다. 과밤나방 유충을 이용한 대량생산 조건은 인공사료 (diet I)에서 사육된 3령 유충을 이용하여 바이러스 접종액 (1×10^3 PIBs/ml)을 인공사료에 분무처리 한 후 25-27°C 조건에서 7일 내외로 바이러스의 생산을 유도한 후 사체를 수거하여 세척 및 동결건조를 진행하여 최종 미생물농약 원제분말을 확보하였으며, 생산성 향상을 위해 Boric acid (1-2%)를 접종액에 첨가하였다. 이는 곤충세포를 이용하는 방법에 비해 생산성과 경제성이 높은 것으로 판단되었다.

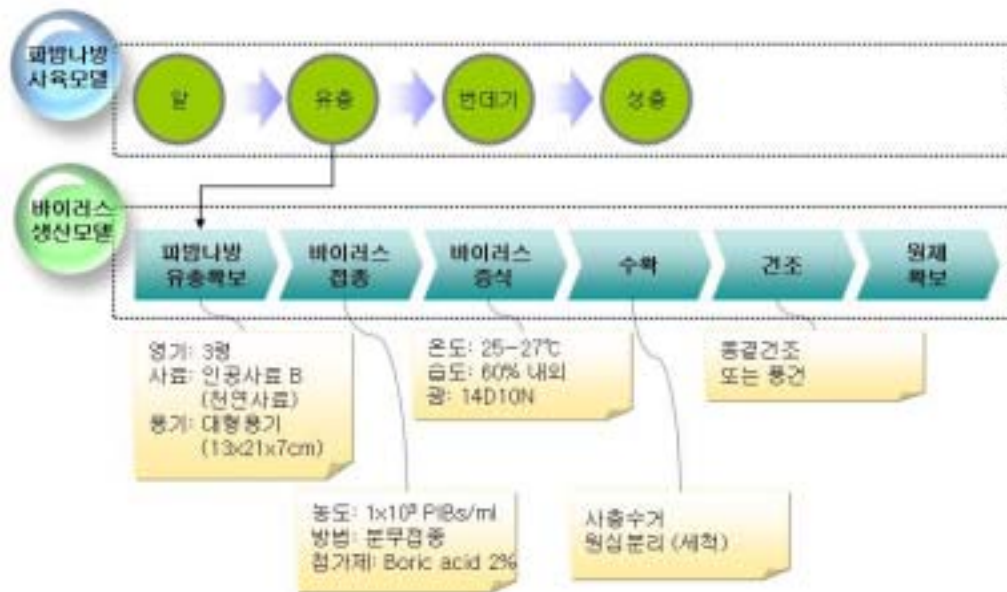
<재조합베쿨로바이러스 생산방법간의 경제성 비교>

구분	과밤나방을 이용한 생산	곤충세포를 이용한 생산
바이러스 생산성	500,000,000원/kg (5×10^{10} 다각체/g) (10원/ 10^9 다각체/유충)	2,500,000,000원/kg (5×10^{10} 다각체/g) (5만원/ 10^9 다각체/1000 ml)

※ 참고) 중국제품의 베쿨로바이러스 원제 가격: 7만원/kg (1×10^{10} 다각체/g)

<재조합베쿨로바이러스 생산방법간의 장단점 비교>

구분	파밤나방을 이용한 생산	곤충세포를 이용한 생산
장점	<ul style="list-style-type: none"> ○상대적인 고수율 확보가능 ○생산기간 짧음 ○후처리 과정 간단 	<ul style="list-style-type: none"> ○살충성 유전자가 cloning된 재조합 바이러스 생산에 적합 ○오염관리 및 고순도물질 생산에 적합
단점	<ul style="list-style-type: none"> ○초기 치사효과로 야생주에 비해 수율 감소 (1/10) ○파밤나방 유지관리 필요 ○인건비 증가요인 발생 	<ul style="list-style-type: none"> ○배지가격 고가 <ul style="list-style-type: none"> -상업용: 4-5만원/L -자체개발배지 : 1-1.5만원/L ○생산단계 복잡 및 장기간 배양으로인한 오염방지 필요 ○시설확보의 어려움 <ul style="list-style-type: none"> - 외국: 배양설비 500L 이하 - 국내: 100L 이내 - 톤단위 생산이 어려움



<재조합베쿨로바이러스 생산 모델>

재조합 베쿨로바이러스 제제의 물리성 및 제제 안정성을 검토하여 최적 수화제 및 액상수화제 처방을 확립하였으며, 특히 액상제형에서는 제제 pH와 원제 분말 건조방법보다는 원제의 후처리공정 (세척)이 제제의 경시안정성과 밀접하게 연관되어 있음을 확인하였다.

최종적으로 처방된 제제의 살충효과를 검정한 결과, Bt 독소 유전자가 함유된 재조합 베쿨로바이러스는 실내조건에서 야생주 바이러스가 갖는 target인 과밤나방뿐만 아니라 배추좀나방과 목화바둑명나방에도 높은 살충력을 보였으며, 거세미나방에는 낮은 효과를 보였다. 포장조건에서 최적화된 수화제와 액상수화제를 분무살포한 결과 배추좀나방과 과밤나방에 80-90%의 실용성 있는 살충효과를 확인하였다.

야외조건에서의 안정성을 검정한 결과, 재조합 베쿨로바이러스는 야외조건에서 분무살포 된지 10일 이후부터 활성감소가 관찰되어 해충의 밀도증감 및 유입상황에 따라 활성 유지 측면에서 7-10일 간격으로 반복 처리하는 것이 효과적일 것으로 판단되었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표와 평가의 착안점

1. 연구개발 목표

가. 1차년도 연구개발 목표

- 새로운 Bt 내독소단백질 유전자와 재조합 유전자의 확보 및 선발
- 곤충·거미 유래 살충성 유전자의 확보 및 선발
- 재조합 베쿨로바이러스의 대량생산 기초연구

나. 2차년도 연구개발 목표

- 곤충·거미 유래 살충독소와 Bt 재조합 다각체를 생산하는 베쿨로바이러스의 제작 및 특성 구명
- 곤충·거미 유래 살충성 유전자의 선발 및 재조합 베쿨로바이러스의 생물검정
- 새로운 재조합 베쿨로바이러스의 대량생산 체계확립

다. 3차년도 연구개발 목표

- 새로운 재조합 베쿨로바이러스의 대량생산 및 제제화
- 새로운 재조합 베쿨로바이러스 제제의 실증 시험
- 새로운 재조합 베쿨로바이러스의 안정성 검정
- 새로운 재조합 베쿨로바이러스 농약 등록 시험

2. 연구평가의 착안점

가. 1차년도 착안점

- 새로운 Bt 내독소단백질 유전자의 확보 및 재조합 유전자의 제작
- 곤충·거미 유래 살충성 유전자의 확보
- 각 유전자들의 발현과 생물검정을 통한 살충성 유전자 선발
- 재조합 베쿨로바이러스의 대량생산을 위한 기초 연구

나. 2차년도 착안점

- 곤충·거미 유래 살충성 유전자의 확보
- 선발한 살충성 유전자가 도입된 재조합 베쿨로바이러스의 제작
- 재조합 베쿨로바이러스의 특성 조사
- 목적해충에 대한 생물검정
- 재조합 베쿨로바이러스 대량생산 체계 확립

다. 3차년도 착안점

- 재조합 베쿨로바이러스의 대량생산
- 제제 기술의 개발 및 제제화
- 제제의 실내 및 야외 실증 시험
- 처리 후 야생주로 전환 조사
- 제제의 안정성 검정

라. 최종평가 착안점

- 새로운 Bt 내독소단백질 유전자와 곤충유래 살충성 유전자의 확보 및 선발
- 곤충·거미 유래 살충독소를 발현하며 Bt 재조합 다각체를 생산하는 새로운 베쿨로바이러스의 제작 및 특성 조사
- 처리 후 야생주로 전환 여부
- 새로운 재조합 베쿨로바이러스의 대량 생산, 제제화 및 실증시험
- 농약 등록시험

제 2 절 연구개발목표의 달성도

1. 새로운 재조합 베쿨로바이러스 개발

가. 새로운 Bt 내독소단백질 유전자의 확보

Bt *cryI*-type의 toxic fragment를 detection할 수 있는 primer set (ATG1-F와 N400-R)를 이용하여 Bt K1과 Bt 2385-1 균주로부터 8종의 유전자를 분리하였다. 염기서열 분석을 통하여 8종의 Bt 유전자 중에서 5종의 새로운 유전자를 확인하였고, 배추좀나방과 과밤나방에 대한 살충성 검정을 통하여 새로운 미생물 살충제로의 이용가능성을 알아보았다.

나. Bt 내독소 단백질 재조합 유전자의 선발

Cry1Ac와 Cry1Ca의 N-말단 유전자가 연결된 새로운 Bt 내독소 유전자를 제작하였다. 이 유전자에 의해 발현되는 새로운 Bt 단백질과 함께 표지인자로서 형광단백질 EGFP를 발현하는 새로운 재조합 베쿨로바이러스를 제작하고 그 특성을 조사하였다.

다. 곤충·거미 유래 살충성 유전자의 선발

동아대의 제 1 협동과제 연구팀으로부터 얻은 3종의 곤충 유래 유전자 즉 거미 유래 살충성 유전자 (AvT), 반딧불이 유래 유전자 (PrT)와 전갈 유래 유전자 (AaIT)를 Baculovirus expression vector system (BEVS)를 이용하여 발현한 다음, 과밤나방에 대한 살충성 검정 실험을 실시하였다. 그 중 AaIT가 발현하는 살충성 단백질은 야생주에 비하여 가장 높은 살충성이 있음을 확인하였다.

라. 곤충·거미 살충성 단백질과 Bt 재조합 다각체를 생산하는 베쿨로바이러스

제작 및 특성 검정

Cotesia plutellae bracovirus에서 유래한 조기 발현 프로모터인 ORF305 프로모터의 조절 하에 AaIT 유전자가 발현되고, polyhedrin 유전자 프로모터의 조절 하에 Bt *cry1-5* 유전자가 발현되는 베칼로바이러스 AcB5B-AaIT를 제작하고 그 특성을 조사하였다.

마. 곤충·거미 살충성 단백질과 Bt 재조합 다각체를 생산하는 베칼로바이러스의 병원성 검정

전갈 신경독소인 AaIT와 Bt 내독소단백질 Cry1-5를 동시에 발현하는 재조합 베칼로바이러스 AcB5B-AaIT의 배추좀나방과 과밤나방에 대한 병원성을 조사하였다. AcB5B-AaIT는 배추좀나방과 과밤나방에 모두 높은 병원성을 보임으로써 새로운 재조합 베칼로바이러스 미생물 살충제로 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

바. 새로운 재조합 베칼로바이러스의 사용 후 야생주로 전환 검정

계대배양에 따른 AcB5B-AaIT의 야생주 베칼로바이러스로의 전환을 검정한 결과, AcB5B-AaIT는 바이러스의 복제가 거듭될수록 야생주화가 진행됨으로써 GMO의 사용에 의한 환경에 대한 위험성을 제거할 수 있음을 확인하였다.

2. 곤충·거미 유래 살충성 유전자 선별

가. 곤충·거미 유래 살충성 유전자의 확보

한국 종인 늦반딧불이를, 거미는 먹왕산 거미를 그리고 호박벌을 채집하여 본 연구에 사용하였으며 충분한 양의 total RNA와 poly A+ RNA를 확보하고 각각의 cDNA library를 제작하였다. 제작한 cDNA library의 titer를 측정하여 세포내에 적은 양으로 존재하는 polyA+ RNA종을 모두 포함하는 것으로 생각, 즉

cDNA library가 잘 만들어 졌음을 확인하였다.

각각의 cDNA library로부터 살충성 유전자 확보를 위해 무작위로 선별한 클론의 염기서열을 분석하여 GenBank database에서 기존에 알려진 유전자와 상동성 검색을 통하여 살충성 유전자를 확보하고자 하였다. 반딧불이 cDNA library로부터 독소 유전자, 거미 cDNA library로부터 2개의 독소 유전자를 찾아서 유전자적 구조분석을 실시하고 본 실험에 사용할 살충성 유전자로서 사용하였다.

나. 각 유전자들의 발현과 생물검정을 통한 살충성 유전자 선발

cDNA library 탐색을 통한 살충성 유전자 확보 및 이 살충성 단백질이 포함된 다각체를 생산하는 베쿨로바이러스의 살충성을 검정하였으며, 기존에 제작한 늦반딧불이, 거미 그리고 호박벌에서 제작한 cDNA library의 EST 작업을 통하여 계속 새로운 살충성 유전자를 GenBank database와 비교 및 탐색하고 유전자원을 확보하였다. 또한, 확보한 살충성 유전자의 전체 염기서열을 밝히고 이 유전자들을 전이벡터에 클로닝하고 재조합 베쿨로바이러스를 제작하여 배추좀나방과 과밤나방을 대상으로 살충성 검정을 수행하였다.

다. 새로운 재조합 베쿨로바이러스의 목적해충에 대한 생물검정

살충성 단백질이 포함된 다각체를 생산하는 베쿨로바이러스의 살충성 검정을 위하여 배추좀나방 및 과밤나방을 대상으로 생물검정을 실시하였다. 배추좀나방, 과밤나방을 대상으로 제작한 베쿨로바이러스와 야생주 베쿨로바이러스의 다각체를 섭식시키고 살충성 검정을 수행하여 그 살충성 정도를 비교·분석하였다.

3. 새로운 재조합 베쿨로바이러스의 대량생산 체계 확립 및 제제화

가. 재조합 베쿨로바이러스의 대량생산 기초연구

인공사료를 이용한 파밤나방 대량사육법 기초 연구를 수행하였으며, Sf-9 곤충 세포를 이용한 배양조건 및 저가 배지 기초연구를 수행하였다. 곤충 생체로서의 파밤나방과 곤충 세포로서 Sf-9 세포를 이용하여 기 제작된 재조합 베쿨로바이러스 (Bactrus) 생산의 기초연구를 수행하였다.

나. 재조합 베쿨로바이러스 대량생산 체계 확립

곤충 세포의 단층/액체배양 조건을 확립하고, 파밤나방의 사육조건 확립 및 대량생산 체계를 확립하여 외부업체에서 생산시스템을 구축하였다.

다. 재조합 베쿨로바이러스의 대량 생산 및 제제화

곤충 생체인 파밤나방을 이용하여 확립된 대량생산 체계를 바탕으로 기 제작된 재조합 베쿨로바이러스 Bactrus를 대량생산 하였다.

라. 제제 기술의 개발 및 제제화

물리성 및 제제 안정성을 검토하여 최적 수화제 및 액상수화제 처방을 확립하였으며, 수화제와 액상수화제 제형 및 자외선 차단제의 효과를 검토하였다.

마. 제제의 실내 및 야외 실증 시험

Bt 내독소 단백질을 발현하는 재조합 베쿨로바이러스의 대상 해충에 대한 실내 조건에서의 병원성을 조사하였으며, 포장조건에서 최적화된 수화제와 액상수화제를 분무살포하여 배추좀나방과 파밤나방에 대한 살충효과를 확인하였다. 또한 재조합 베쿨로바이러스의 야외 조건에서의 안정성을 검증하였다.

제 3 절 연구개발의 관련분야 기여도

1. 기술적 측면

○ 새로운 형태의 재조합 벡탈로바이러스의 제작

Bt 재조합 다각체와 함께 다른 기작의 살충성 단백질을 생산하는 새로운 형태의 재조합 벡탈로바이러스를 제작함으로써 고효성, 저독성 미생물 살충제 개발을 가능하게 할 것으로 판단된다.

○ 벡탈로바이러스의 미생물 살충제 제작기술의 확립

대량 배양, 제제화 기술 연구를 통하여 국내에서는 미흡한 벡탈로바이러스 살충제의 제작기술을 체계화할 수 있을 것으로 기대된다.

○ 다양한 살충성 유전자의 확보

새로운 강독성 Bt 유전자의 분리 및 재조합과 함께 곤충과 거미로부터 살충성 유전자를 분리함으로써 다양한 살충성 유전자를 확보할 수 있으며, 이를 다른 생물농약 개발 및 형질전환작물 개발 등에 응용할 수 있다.

2. 경제·산업적 측면

○ 미생물살충제 시장의 증대

미생물 살충제인 Bt 제제의 세계시장은 1980년도에는 2,400만 불에 불과하던 규모였으나, 1989년도에는 4천만 불, 2000년도에는 약 1억2천만 불로 매년 10% 이상씩 증가하고 있는 실정으로 2005년에는 2억 불을 초과할 것으로 전망된다. 국내 미생물 농약은 Bt 제제가 주를 이루고 있으며 대부분 수입에 의존하고 있는 실정이다. 국내 미생물 농약 시장은 IMF 이후 급속히 위축되었으나 차츰 회복되고

있으며, 2010년에는 약 600억 원대의 시장을 형성할 것으로 예상된다. 이러한 시장 전망에 비추어 안정한 미생물 재조합 벡큘로바이러스 살충제의 개발은 생물농약 및 미생물 살충제에 대한 전반적인 인식을 재고시켜 상당한 수요 및 수입대체 효과를 기대할 수 있다.

○ 국내 생물농약 산업의 발전

세계적인 추세에 따라 화학농약 중심의 농약 시장은 생물농약 등의 무공해 작물보호제로 전환해가고 있으며, 본 연구 기대성과도 생물농약 개발 기술 축적 등을 통하여 국내 생물 농약 발전에 기여할 수 있을 것이다.

○ 유기합성 살충제의 사용 폭 제한

강력한 살충력을 가지는 재조합 미생물 살충제의 개발로 생물농약의 사용 폭이 확대되면 유기합성살충제의 사용량을 상당부분 줄일 수 있어 유기합성 농약의 오용과 남용에 의한 피해를 감소시킬 수 있을 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 본 연구를 통해 획득하는 재조합 베쿨로바이러스 개발 기술은 현재 밝혀지고 있는 새로운 Bt 내독소 단백질 유전자와 다른 베쿨로바이러스 등에도 접목이 가능한 기술로, 다양한 해충에 대한 미생물 살충제 개발에 활용할 수 있다.
- 순수 국내자원으로부터 분리한 생물과 Bt, 곤충·거미 유래 살충성 유전자를 분리함으로써 이후의 실제 생산 및 산업화에 있어 제한이 되는 특허의 제약을 극복할 수 있으며, 아울러 다양한 균주 및 유전자의 특성조사를 통하여 새로운 특허를 창출할 수 있다.
- 제제화가 완료된 재조합 베쿨로바이러스 살충제는 생물 농약으로의 등록시험을 추진하며 국내 기업을 통해 제품화 및 실용화가 가능할 것이다.

제 6 장 참고문헌

1. Bedard, C., R. Tom and A. Kamen. 1993. Growth, nutrient consumption and end-product accumulation in Sf-9 and BTI-EAA unsect cell cultures: insights into growth limitation and metabolism. *Biotechnol. Prog.* 9: 615-624.
2. Bonning, B. C. and B. D. Hammock. 1996. Development of recombinant baculoviruses for insect control. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 191-210.
3. Caron, A. W., L. Archambault and B. Massie. 1990. High level recombinant protein production in bioreactors using the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 1133-1140.
4. Chalmers, J. J. 1994. Cells and bubbles in sparged bioreactors. *Cytotechnology* 15: 311-320.
5. Cisneros, J., J. A. Perez, D. I. Penagos, J. R. V., D. Goulson, P. Caballero, R. D. Cave and T. Williams. 2002. Formulation of a nucleopolyhedrovirus with boric acid for control of *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera: noctuidae) in maize. *Biol. Control.* 23: 87-95.
6. Cory, J. S., M. L. Hirst, T. Williams, R. S. Hails and D. Goulson. 1994. Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. *Nature* 370: 138-140.
7. Donaldson, M. S. and M. L. Shuler. 1998. Low-cost serum-free medium for the BTI-Tn5N1-4 insect cell line. *Biotechnol. Prog.* 14: 573-579.

8. Drews, M. T. Paalme and R. Vilu. 1995. The growth and nutrient utilization of the insect cell line *Spodoptera frugiperda* Sf9 in batch and continuous culture. J. Biotechnol. 40: 187-198.
9. Hammock, B. D., B. C. Bonning, R. D. Possee, T. N. Hanzlik and S. Maeda. 1990. Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. Nature 344: 458-461.
10. Hofte, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255.
11. Hughes, P. R., H. A. Wood, J. P. Breen, S. F. Simpson, A. J. Duggan and J. A. Dybas. 1997. Enhanced bioactivity of recombinant baculovirus expressing insect-specific spider toxins in lepidoptera crop pests. J. Invertebr. Pathol. 69: 112-118.
12. Ikonomou, L., G. Bastin, Y. J. Schneider and S. N. Agathos. 2001. Design of an efficient medium for insect cell growth and recombinant protein production. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 37: 549-559.
13. Ikonomou, L., Y. J. Schneider and S. N. Agathos. 2003. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61: 1-20.
14. Je, Y. H., B. R. Jin, H. W. Park, J. Y. Roh, J. H. Chang, S. J. Seo, J. A. Olszewski, D. R. O'Reilly and S. K. Kang. 2003. Baculovirus expression vectors that incorporate the foreign protein into viral occlusion bodies.

BioTechniques 34: 81-87.

15. Je, Y. H., B. R. Jin, J. Y. Roh, J. H. Chang and S. K. Kang. 1999. Construction of a novel recombinant baculovirus producing polyhedra with a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac crystal protein. J. Kor. Soc. Virol. 29: 145-53.
16. Je, Y. H., B. R. Jin, J. Y. Roh, J. H. Chang and S. K. Kang. 2000. Construction of a novel baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus producing the fluorescent polyhedra Int. J. Indust. Entomol. 1:19-23.
17. Je, Y. H., J. H. Chang, M. H. Kim, J. Y. Roh, B. R. Jin and D. R. O'Reilly. 2001. The use of detective *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus genomes maintained in *Escherchia coli* for the rapid generation of occlusion-positive and occlusion-negative expression vectors. Biotech. Lett. 23: 1809-1817.
18. Kamen, A. A. R. L. Tom, A. W. Caron, C. Chavarie, B. Massie and J. Archambault. 1991. Culture of insect cells in a helical ribbon impeller bioreactor. Biotechnol. Bioeng. 38: 619-628.
19. Kim, S. H., N. S. Choi and W. Y. Lee. 1998. Fibrin zymography: a direct analysis of fibrinolytic enzymes on gels. Anal. Biochem. 263: 115-116.
20. Kraut, L. 1977. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. Annu. Rev. Biochem. 46: 331-358.
21. Kutsukake, M., H. Shibao, N. Nikoh, M. Morioka, T. Tamura, T. Hoshino, S. Ohgiya and T. Fukatsu. 2004. Venomous protease of aphid soldier for colony

- defense. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 11338-11343.
22. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
23. Lee, K. S., S. R. Kim, H. D. Sohn and B. R. Jin. 2002. cDNA sequence and mRNA expression of a novel serine protease from the firefly, *Pyrocoelia rufa*. Int. J. Indust. Entomol. 5: 103-108.
24. Lehane, S. M., S. J. Assinder and M. J. Lehane. 1998. Cloning, sequencing, temporal expression and tissue-specificity of two serine proteases from the midgut of the blood-feeding fly *Stomoxys calcitrans*. Eur. J. Biochem. 245: 290-296.
25. Maeda, S. 1989. Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1177-1183.
26. Martin, B. M., A. N. Ramirez, G. B. Gurola, M. Nobile, G. Prestipino and L. D. Possani. 1994. Novel K(+)-channel-blocking toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. Biochem. J. 304: 51-56.
27. McMaster, G. K. and G. G. Carmichael. 1977. Analysis of single- and double-stranded nuclei acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 4835-4838.
28. Merryweather, A. T., U. Weyer, M. P. G. Harris, M. Hirst, T. Booth and R.

- D. Possee. 1990. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-73 delta endotoxin. *J. Gen. Virol.* 71: 1534-1544.
29. O'Reilly, D. R. and L. K. Miller. 1989. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *Science* 245: 1110-1112.
30. O'Reilly, D. R., L. K. Miller and V. A. Luckow. 1992. *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*. W. H. Freeman & Co., New York.
31. Pistillo, D., A. Manzi, A. Tino, P. P. Boyl, F. Graziani and C. Malva. 1998. The *Drosophila melanogaster* lipase homologs: a gene family with tissue and developmental specific expression. *J. Mol. Biol.* 276: 877-885.
32. Rhiel, M., C. M. Mitchell-Logean and D. W. Murhammer. 1997. Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High-Five TM) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 55: 909-920.
33. Schweitz, H., T. Bruhn, E. Guillemare, D. Moinier, J. M. Lancelin, L. Beress and M. Lazdunski. 1995. Kaliclutidines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 270: 25121-25126.
34. Stewart, L. M. D., M. Hirst, M. L. Ferber, A. T. Merryweather, P. J. Cayley and R. D. Possee. 1991. Construction of a improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. *Nature* 352: 85-88.

35. Taticek, R. A., C. Choi, S. E. Phan, L. A. Palomares and M. L. Shuler. 2001. Comparison of growth and recombinant protein expression in two different insect cell lines in attached and suspension culture. *Biotechnol. Prog.* 17: 676-684.
36. Tomalski, M. D. and L. K. Miller. 1991. Insect paralysis by baculovirus mediated expression of a mite neurotoxin gene. *Nature* 352: 82-85.
37. Wong, K. T. K., C. H. Peter, P. F. Greenfield, S. Reid and L. K. Nielsen. 1996. Low multiplicity infection of insect cells with a recombinant baculovirus: the cell yield concept. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 659-666.
38. Yan, J., Q. Cheng, B. Li and S. Aksoy. 2001. Molecular characterization of two serine proteases expressed in gut tissue of the African trypanosome vector, *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Nol. Biol.* 10: 47-56.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.