

## 파밤나방 핵다각체병 바이러스의 생화학적 특성\*

### Biochemical Characteristics of *Spodoptera exigua* Nuclear Polyhedrosis Virus

진 병 래<sup>1</sup> · 박 범 석<sup>2</sup> · 제 연 호<sup>1</sup> · 강 석 권<sup>1</sup>

Byung Rae Jin<sup>1</sup>, Beom Seok Park<sup>2</sup>, Yeon Ho Je<sup>1</sup>, and Seok Kwon Kang<sup>1</sup>

**ABSTRACT** Biochemical characteristics of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus (SeNPV) isolated in Jinju were studied. SeNPV contained a number of nucleocapsids within a viral envelope embedded in polyhedra. The polyhedral protein of SeNPV was composed of a single polypeptide with a M. W. of 30kd. Double-immunodiffusion test showed that the polyhedral protein of SeNPV had common antigenic determinants with SINPV and BmNPV. Virion proteins of SeNPV were resolved into 49 polypeptides by silver staining after SDS-PAGE. The approximate genome size of SeNPV by restriction endonuclease analysis was 110kb.

**KEY WORDS** *Spodoptera exigua*, nuclear polyhedrosis virus, viral protein, DNA

**초 록** 국내에서 분리된 파밤나방 핵다각체병바이러스(*Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus : SeNPV)의 생화학적인 특성을 규명하기 위하여 몇가지 실험을 행하였다. SeNPV는 하나의 envelope내에 다수의 nucleocapsid가 존재하는 MNPV(multiple embeded NPV)형태였다. 다각체단백질은 분자량 30 kb의 단일 band로 나타났으며, *Spodoptera litura* NPV와 *Bombyx mori* NPV의 다각체단백질 항체에 반응하여 뚜렷한 침강선을 형성하였다. 비리온 단백질은 은염색한 결과, 많은 수의 minor band들이 포함된 49개의 band로 나타났으며, 바이러스 DNA를 분리하여 여러종의 제한효소에 의한 대략적인 genome size는 약 110 kb였다.

**검 색 어** 파밤나방, 핵다각체병바이러스, 바이러스 단백질, 핵산

Baculovirus subgroup A에 속하는 파밤나방 핵다각체병바이러스(*Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus : SeNPV)는 circular double-stranded DNA를 갖는 봉상의 바이러스, 다각체 단백질 내에 바이러스 입자가 매립되어 있다(Hamm & Styer 1985, Smith & Summers 1978, Gelernter & Federici 1986). 한편 Smith 등(1988)은 SeNPV를 미생물 살충제로 개발하

기 위한 여러가지 연구와 더불어, *Spodoptera frugiperda* 배양 세포에 대한 감수성에 관하여 보고한 바 있다(Knudson 1979).

파밤나방은 채소, 화훼, 과수 등 기주범위가 넓어 최근에는 국내에서도 파, 배추, 수박등에 다발생하여 피해가 심하며(안 등 1990), 3령 이후에는 농약감수성이 매우 낮아 방제가 어렵다. 인공사료에 의한 파밤나방 대량사육법이 연구되었다(고 등 1990). 따라서 본고에서는 국내에서 분리된 SeMPV를 미생물 살충제 또는 expression vector로의 개발 가능성을 검토하고자 우선 기본적인 생화학적 특성을 규명하여 보고한다.

1 서울대학교 농과대학 (College of Agriculture, Seoul National University, Suwon, Korea)

2 농업기술연구소 곤충과(Entomology Division, Agricultural Sciences Institute, RAD, Suwon, Korea)

\* 본 연구는 과학재단 연구비 지원에 의해 수행되었음.

## 자료 및 방법

### 바이러스

SeNPV는 1989년 경남 진주 지방에서 파밤 나방 사충으로부터 분리하였다. 파밤나방 유충을 인공사료(임 등 1988)로 제대사육하면서 바이러스 증식에 사용하였다.

### 다각체 분리

SeNPV감염 사충을 마쇄하여 거즈로 여과한 후, 원심분리(3,000 rpm, 5분)를 3~4회 반복하여 부분정제된 다각체를 0.01% SDS용액에 부유시키고 sonication하여, 40~65% (W/W) sucrose density gradient, 24,000 rpm (Hitachi, SRP-28SA)에서 30분간 원심분리하여 다각체를 분리하였다.

### 전자현미경 관찰

다각체의 내부구조 관찰은 정제된 다각체를 3% glutaraldehyde로 고정하고, 0.5% sodium cacodylate 완충액으로 충분히 씻은 후, osmium tetroxide를 함유한 등 완충액에서 2차 고정하였다. 그 후 50, 70, 90, 100%의 ethanol과 100% acetone으로 탈수하고, Epon수지 (Epon812)에 포매한 뒤, LKB-Ultratome(MT-5000)으로 초박절편을 작성하여 전자현미경 (HU-12A형과 JEOL-1200EX형)으로 관찰하였다.

### 다각체 단백질의 전기영동

생체 증식된 다각체에 혼재되어 있는 alkaline protease를 불활화시키기 위하여 정제된 다각체를 100°C에서 20분간 가열한 후(Wood 1980), 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 다각체 침전물을 얻었다. 이 침전물을 알칼리용액(0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.17M NaCl, 0.01M EDTA, pH10.9)에 부유시켜, 37°C에서 15분간 용해시킨 후, 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 용해되지 않은 다각체를 제거하고, 다시 상청액

을 55,000으로 40분간 원심분리하여 virion을 제거하고 다각체단백질 용액을 얻었다. 이 용액에 2배 농도의 Laemmli용액(0.062M Tris-HCl, pH6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.001% bromophenylblue)을 동량 혼합하고, 100°C에 10분간 가열한 뒤, Laemmli (1970)방법에 따라 15% 농도로 SDS-polyacrylamide gel에 의한 전기영동을 행하고 Coomassie brilliant blue로 염색하였다.

### 이중면역 확산법

이중면역 확산법 Oucheterloney(1968)방법으로 행하였으며, 담배거세미나방과 누에 핵다각체병바이러스(SINPV와 BmNPV)의 다각체 단백질에 대한 항체(박 등 1988)를 이용하여 SeNPV 다각체단백질과의 상동성을 조사하였다. 직경 5cm의 petridish에 0.02M phosphate buffer, 0.15M NaCl, pH7.4에 녹여 만든 1% agarose를 부어 3mm 두께로 균한 다음 직경 3mm의 항원 well을 만들고, 그것으로부터 간격을 5mm로 하여 항체 well을 만들어 시험용기로 사용하였으며, well당 20  $\mu$ l의 항원 및 항체를 넣은 다음 25°C로 고정된 항원·항체기에서 24시간 정치하여 침강선을 형성시켰다.

### Virion 단백질의 전기영동

정제된 다각체를 알칼리 용액(0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.01M EDTA, 0.17M NaCl, pH10.9)에 부유시켜 37°C, 30분간 처리한 후 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 용해되지 않는 침전물을 제거하고, 상청액을 30~60% sucrose density gradient에서 25,000 rpm(Hitachi, SRP-28SA)에 90분간 원심분리하여 virion을 정제하였다.

정제된 virion에 Laemmli용액을 혼합하고, 100°C에서 10분간 가열한 후, 12% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동하여 non-kit 은염색 (silver staining)방법 (Oakly 등 1980)으로 methanol과 acetic acid, 10% galuteraldehyde로 고정시키고, AgNO<sub>3</sub>용액으로 10분간 염색하여 developer로 0.05% citric acid ml당 37% for-

maldehyde 5  $\mu$ l를 사용하였으며, 3차 증류수로 반응을 정지시켜 virion 단백질 band를 확인하였다.

#### 바이러스 DNA분리 및 제한효소 분석

정제된 다각체를 알칼리용액(pH10.9)에 부유시켜 37°C에서 1시간 가온하고, microcentrifuge 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후, 1% SDS, proteinaseK 0.5 mg/ml가 되도록 각각 첨가하여 37°C에서 1시간 가온하였다. 여기에 TE buffer(pH7.5)로 포화된 phenol을 동량 첨가하여 완전히 혼합시킨 다음 microcentrifuge 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상부의 물층을 취하여 동일한 방법으로 phenol추출을 반복하였다. 채취된 물층에 phenol : chloroform / isoamyl - alcohol(24/1) 이 1 : 1로 혼합된 용액을 같은 양으로 넣어 혼합한 후 상기조건과 같이 원심분리하여 상부의 물층을 채취하였다. 여기에 chloroform/isoamyl alcohol(24/1)용액을 동량첨가 혼합하여 같은 방법으로 원심분리하여 DNA가 함유된 물층을 2회 반복하여 채취하였다. 채취된 물층에 2배의 냉 ethanol을 첨가하고 혼합하여 -70°C에서 30분정도 보관하였다가 microcentrifuge 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA 침전을 얻었다. 이 DNA 침전을 70% ethanol로 3회 이상 세척한 뒤 evaporator로 ethanol을 완전히 제거하고 TE buffer로 100  $\mu$ g/ml의 농도로 만들어 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

제한효소(NEB Co, U. S. A.) 처리는 100  $\mu$ g/ml 농도의 DNA 용액 18  $\mu$ l(약 1.8  $\mu$ g)과 10x digestion buffer 2  $\mu$ l에 각 제한효소를 15~20unit를 각각 첨가한 후, 37°C에서 4시간 정도 처리하여 mini-gel을 이용하여 digestion을 확인하고 stop buffer(0.1M EDTA, 50% glycerol, 0.5% bromophenol blue) 3  $\mu$ l를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 처리된 DNA는 60°C에서 15분간 가온한 후 빙냉시켜 0.7% agarose gel에서 전기영동을 행하고 EtBr로 염색하여; U. V transilluminator로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

#### 다각체의 내부구조

SeNPV의 다각체의 내부구조를 전자현미경으로 관찰한 결과, 많은 수의 바이러스 입자가 다각체단백질에 포매되어 있으며, 그 바이러스 입자는 다수의 봉상 nucleocapsid가 하나의 envelope내에 매립된 형태의 MNPV(multiple embedded nuclear polyhedrosis virus)였다(그림 1).

그림 1의 화살표( $\Delta$ )로 표시된 작은 구멍들은 Adams 등(1982)의 보고에서와 같이 다각체가 감염세포내에서 미완성된 상태일 때 분리되었거나, 분리과정 중에 표면에 가까이 위치해 있던 봉입체의 이탈로 인해 생긴 것으로 추측되며, Gelernter와 Federici(1986)가 SeNPV는 대체적으로 한 envelope당 2~4개의 nucleocapsid를 함유하고 있는 MNPV로 부정형의 다각체는 지름이 약  $1.52 \pm 0.11 \mu$ m라고 보고한 결과와 유사하였다.

#### 다각체단백질의 전기영동 및 이중면역 확산법에 의한 비교

SeNPV와 *Bombyx mori* NPV, *Hyphantria cunea* NPV 및 *Spodoptera litura* NPV들의 다각체단백질 전기영동상을 비교하기 위하여, 숙주곤충의 증장 소화액으로부터 유래되는 것으로 알려져 있는 alkaline protease를 열처리에 의해 불화시키킨 후, 다각체단백질을 분리하여 SDS

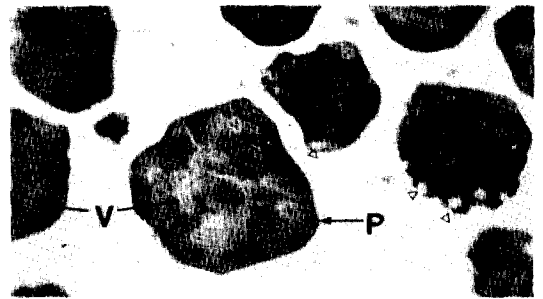


Fig. 1. Electron micrograph of transected polyhedra of SeNPV. V : virus particles, P : polyhedron

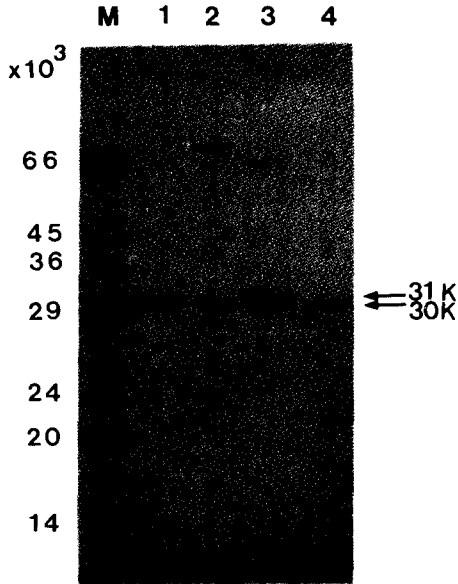


Fig. 2. SDS-PAGE of polyhedral proteins. M : standard molecular weight markers(dalton), 1 : SINPV, 2 : BmNPV, 3 : HcNPV, 4 : SeNPV.

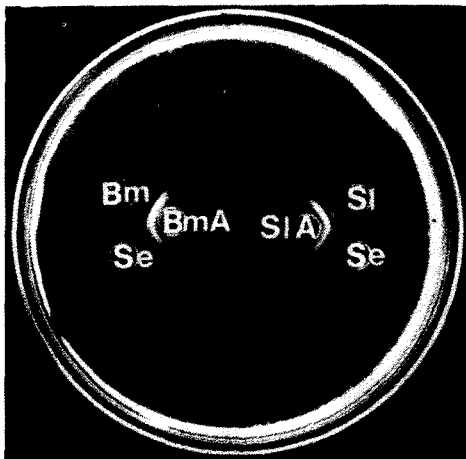


Fig. 3. Immundiffusion of polyhedral proteins. BmA : BmNPV polyhedral protein antiserum, SIA : SINPV polyhedral protein antiserum, Bm : BmNPV polyhedral protein, SI : SINPV polyhedral protein, Se : SeNPV polyhedral protein.

-PAGE한 결과, SeNPV와 BmNPV는 분자량이 30 kd이었고, 단백질 밴드와 그 중합체로 생각되는 밴드를 관찰할 수 있었다(그림 2).

다각체단백질은 일반적으로 전기영동상에서 28~33 kd의 주단백질(polyhedrin)과 그외 다

각체 단백질의 중합체(polymer)와 alkaline protease에 의해 저분자화된 단백질들로 나타나는데(박 등 1988, Summers & Smith 1978), 본 실험에서는 열처리에 의해 alkaline protease를 불활화 시켰기 때문에 저분자화된 단백질들은 관찰할 수 없었다.

또한 BmNPV와 SeNPV의 다각체단백질 항체를 이용해 SeNPV 다각체단백질과의 이중면역 확산법을 행한 결과, SeNPV 다각체단백질은 BmNPV와 SINPV 다각체단백질 항체와 반응하여 뚜렷한 침강선을 형성하였다(그림 3).

이는 Smith와 Summers(1981) 및 Knell 등(1983)이 보고한 혈청학적으로 관계있는 baculovirus group의 공통 antigenic determinants의 존재에 기인하는 것으로 생각된다. 아울러 그림 3의 결과는 강 등(1990)에 의해 클로닝된 SINPV와 BmNPV 다각체단백질 유전자를 probe로 하여 SeNPV 다각체단백질 유전자를 탐색할 수 있음을 시사한다.

**비리온 단백질 전기영동**

순수정제된 virion 단백질은 SDS-PAGE한 후 은염색하여 virion 단백질 band를 관찰한 결과, SeNPV의 virion 단백질은 분자량 약 9 kb의 저분자에서 약 110 kb의 고분자 범위의 49개의 band로 구성되어 있었다(그림 4).

이는 김 등(1989)과 임 등(1989)에 의해 이미 보고된 BmNPV, HcNPV 및 SINPV의 비리온 단백질 은염색 패턴과 유사한 결과로서 일반적으로 Coomassie brilliant blue염색으로는 관찰할 수 있었던 다수의 minor band들을 확인할 수 있었다. 비리온 단백질의 SDS-PAGE 분석은 바이러스의 분류 동정의 수단으로 사용되어, Summers & Smith(1978)는 8종의 baculovirus의 구조단백질을 전기영동으로 비교분석하여 15~160 kd의 15~25개의 band로 구성되어 있다고 보고했으며, Singh 등(1983)은 2차원 전기영동으로 AcNPV와 LdNPV를 분석한 결과, enveloped virus는 95개, unclencapsid는 64개의 polypeptide가 관찰되었

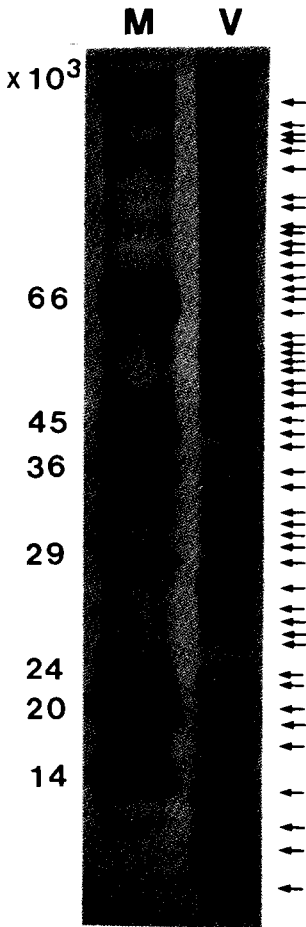


Fig. 4. SDS-PAGE of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus virion polypeptides stained with silver nitrate.

음을 보고하였으며, 바이러스에 따라 그 양과 질에서 차이가 보인다고 하였다. 또한 Reinganum(1984)은 10종 NPV의 다각체단백질을 SDS-PAGE한 후 은염색으로 이들의 minor band들을 비교함으로써 바이러스를 분류·동정할 수 있었다고 보고하였다.

이상의 결과들로 볼때 비리온 단백질의 SDS-PAGE에 의한 은염색 방법은 많은 수의 minor band들을 관찰할 수 있기 때문에 바이러스간의 분류·동정의 한 수단으로서 이용될 수 있으리라 생각된다.

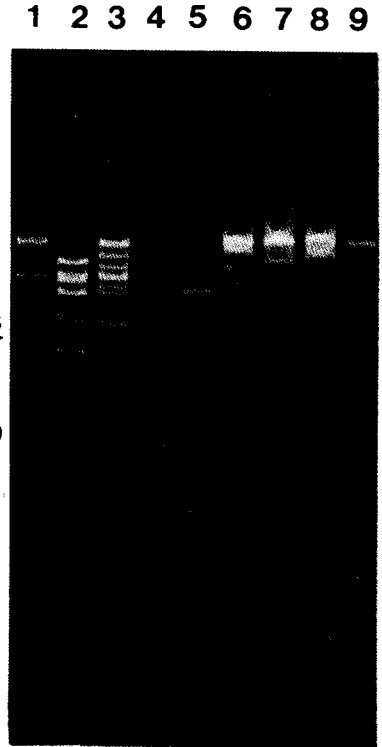


Fig. 5. Restriction patterns of SeNPV DNA. 2 : EcoRI, 3 : PstI, 4 : SalI, 5 : ClaI, 6 : PvuII, 7 : HindIII, 8 : BamHI, 1 and 9 : Lambda DNA digested with HindIII served as standard marker (Kb)

#### DNA의 제한효소 분석

SeNPV의 DNA를 분리하고, 수종의 제한효소를 처리하여 agarose gel 전기영동으로 분석한 결과(그림 5), EcoRI으로 절단한 경우 29개의 절편, PstI으로 절단한 경우는 15개의 절편으로 관찰되었으며, SalI과 ClaI으로 절단한 경우 많은 수의 저분자 절편으로 나타나 제한효소 site가 많은 반면, PvuII, HindIII 및 BamHI의 제한효소 site는 적은 것으로 나타났다.

또한 대략적인 genome size는 Smith & Summers(1978)와 Gelernter & Federici(1986)가 SeNPV DNA를 EcoRI으로 절단하여, genome size가 약 100 kb정도라고 보고한 결과와 거의 일치하는 것으로 나타났지만, 특히하게 다른점은 이들이 보고한 EcoRI band 패턴에서는 볼

수 없었던 약 0.8 kb의 band가 본실험 결과에서는 존재하였다. 이는 DNA의 분리방법과 전기영동 조건변화에서도 계속 반복되어 나타난 결과로서, 지역적인 variation에 의한 variant인지는 차후 배양세포의 도입에 의한 plaque assay 등으로 연구하고자 하며, 한편 다각체단백질 유전자의 탐색 및 클로닝에 의한 expression vector로서의 개발 가능성을 연구하고자 한다.

### 인 용 문 헌

- Adams, J. K. & T. A. Wilcox. 1982. Scanning electron microscopical comparisons of insect virus occlusion bodies prepared by several techniques. *J. Invertebr. Pathol.* 40 : 12~20.
- 안성복, 김인수, 조왕수, 이문홍, 최귀문. 1990. 1988년 해충발생 상황(민원증심). *한용곤지.* 28 : 246~253.
- Gelernter, W. D. & B. A. Federici. 1986. Isolation, identification and determination of virulence of a nuclear polyhedrosis virus from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera : Noctuidae). *Environ. Entomol.* 15 : 240~245.
- Hamm, J. J. & E. L. Styer. 1985. Comparative pathology of isolates of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus in *S. frugiperda* and *S. exigua*. *J. Gen. Virol.* 66 : 1249~1261.
- 임대준, 박범석, 진병래, 최귀문, 강석권. 1988. 담배거세미나방 핵다각체병바이러스의 병원성. *한용곤지.* 27 : 219~224.
- 임대준, 박범석, 최귀문, 강석권, D. K. Reed. 1989. 담배거세미나방 핵다각체병바이러스의 생화학적 특성. *한곤지.* 19 : 113~122.
- 김현옥, 박범석, 진병래, 임대준, 강석권. 1989. 누에와 흰불나방 핵다각체병바이러스의 생화학적 특성. *한용곤지.* 28 : 105~112.
- Knell, J. D., M. D. Summers & G. E. Smith. 1983. Serological analysis of 17 baculoviruses from subgroup A and B using protein blot immunoassay. *Virol.* 125 : 381~392.
- 고현관, 이상계, 이비과, 최현문, 김정화. 1990. 인공사료에 의한 파밤나방의 대량사육법. *한용곤지.* 29 : 180~183.
- Kundson, D. L. 1979. Plaque assay of baculoviruses employing on agarose-nutrient overlay, *Intervirol.* 11 : 40~46.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London).* 227 : 680~685.
- Lee, H. H. & L. K. Miller. 1978. Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 27 : 754~767.
- Maeda, S. 1989. Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Ann. Rev. Entomol.* 34 : 351~372.
- Miller, L. K., A. J. Lingg & L. A. Bulla, Jr. 1983. Bacterial, viral and fungal insecticides. *Science* 219 : 715~721.
- Oakly, B. R., D. R. Kirsch & N. R. Morris. 1980. A Simplified ultrasensitive silver staining for detection proteins in polyacrylamide gels. *Ann. Biochem.* 105 : 361~363.
- Ouchterloney, O. 1986. Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis, Amm. Arbor Science Publications, Michigan.
- 박범석, 김현옥, 진병래, 임대준, 강석권. 1988. 수종 나비목 핵다각체병바이러스 다각체단백질 특성과 그에 대한 alkaline protease의 영향. *한용곤지.* 27 : 211~218.
- Reinganum, C. 1984. PAGE of baculovirus protein : A simplified and sensitive modification for differentiation between isolates. *J. Invertebr. Pathol.* 44 : 134~139.
- Singh, S. P., R. T. Gudauskas & J. D. Harper. 1983. High resolution two-dimensional gel electrophoresis of structural proteins of baculovirus of *Autographa californica* and *Porthetria* (Lymantria) dispar. *Virol.* 125 : 370~380.
- Smith, G. E. & M. D. Summers. 1981. Application of a novel radioimmunoassay to identify baculovirus structural protein that share interspecies antigenic determinants. *J. Virol.* 39 : 125~137.
- Smith, G. E., M. J. Fraser & M. D. Summers. 1983. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome : deletion mutations within the polyhedron gene. *J. Virol.* 46 : 584~593.
- Smith, G. E. & M. D. Summers. 1978. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virol.* 89 : 517~527.
- Smits, P. H., I. P. Rietstra & J. M. Vlak. 1988. Influence of application techniques on the control of beet armywormlarvae (Lepidoptera : Noctuidae) with nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* 81(2) : 470~475.
- Summers, M. D. & G. E. Smith. 1978. Baculovirus structural polypeptides. *Virol.* 84 : 390~402.
- Wood, H. A. 1980. Protease degradation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus protein. *Virol.* 103 : 392~399.