

Hyphantria cunea Nuclear Polyhedrosis Virus 봉입형의 핵다면체에 대한 단일클론 항체의 생산과 인식항원의 결정

장성호 · 홍순복 · 이형환 · 김종배¹ · 조명환*
건국대학교 이과대학 생물학과, ¹축산대학 축산가공학과

The Production and Characterization of Monoclonal Antibodies to the Major Polyhedra Inclusion Body of the Occluded Form of *Hyphantria cunea* Nuclear Polyhedrosis Virus

Chang, Sung-Ho, Soon-Bok Hong, Hyung-Hwan Lee,
Jong-Bae Kim¹ and Myung-Hwan Cho*

Department of Biology,

¹Department of Animal Product Processing,
KonKuk University, Seoul 133-701, Korea

Abstract — This study was performed to produce monoclonal antibodies to the major polyhedral inclusion body (PIB) antigen of the occluded form of *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus (HcNPV). PIB proteins were purified from the *Spodoptera frugiperda* cell infected with HcNPVs. Using the purified PIB proteins, BALB/C mice were immunized 3 times with 2 weeks intervals. The spleen were removed and fused with Sp2/0-Ag14, mouse myeloma cells. Two clones of hybridoma, Hhc-1 and Hhc-2, were developed and the subtypes of monoclonal antibodies secreted by hybridomas were IgM both. SDS-PAGE of detergent-solubilized PIB protein revealed a profile of protein ranging in molecular weight from 21.9 kilodalton(Kd) to 85.9 Kd. A total of 7 bands was detected and a 31.5 Kd band was dominant. Western blot indicated that the two monoclonal antibodies are specific for the 31.5 Kd antigen. It was suggested that a 31.5 Kd antigen be the major protein of PIB.

Baculovirus는 인시류(Lepidoptera)의 곤충에서 분리되었으며(1), Baculoviridae의 유일속(Genus)으로 비리온을 둘러싸는 구조의 성상에 따라 nuclear polyhedrosis viruses(NPVs), granulosis viruses(GVs), nonoccluded viruses(NOVs)의 3가지 아형으로 나뉜다(2-4). 이 중 NPVs는 감염 후, 숙주의 중장에서 용해되어 비리온을 방출하며 이후 형성된 뉴클레오캡시드는 원형질막을 통과하면서 봉입체에 싸여 budded viruses(BV)로 되고, 복제 후기단계라 불리는 감염 후 18~48시간 뒤에는 핵다면체 단백질(polyhedral inclusion body :

PIB)로 둘러 싸이게 된다(5). 한편, 핵내에 증식된 바이러스 중 봉입되지 않은 일부 미봉입 바이러스(nonoccluded viruses, NOVs)는 세포막을 달고 나와 외투막을 형성한다.

이들 봉입 바이러스(OVs)와 미봉입 바이러스(NOVs)가 형성되는 과정은 NPVs의 감염과정 연구에 있어 대단히 중요하다(5,6). 핵다면체에 싸여진 봉입 바이러스는 숙주에서 숙주로의 감염에 관여하며, 미봉입 바이러스는 *in vivo* 또는 *in vitro*에서 세포와 세포 사이의 감염에 관계하는 것으로 알려져 있다(7,8). 봉입형 바이러스를 싸고 있는 핵다면체(PIB)는 직경이 650~900 nm 정도인 결정형 격자(crytalline lattices)로 이루어져 있으며, 화학적 요인에 매우 안정해서 변형되지 않지만, Na₂CO₃나 NaOH에는 쉽게 용해되는 알

Key words: *Hyphantria cunea* NPV, polyhedrosis virus, occluded form, polyhedral inclusion body, monoclonal antibody, western blotting

*Corresponding author

칼리 투과성을 갖고 있고 30 Kd 정도의 주 단백질로 구성되어 있다고 알려져 있다(1).

본 연구에서는 미국 흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury) 유충에서 분리된 *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus(HcNPV)의 봉입 바이러스를 둘러 싸고 있는 핵다면체를 분리하여 단일클론 항체를 생산하고 봉입 바이러스형의 핵다면체 단백질의 인식 항원을 결정하였다.

재료 및 방법

세포배양배지의 제조

실험에 사용한 배지는 Hink's TNM-FH 배지(JRH Biosciences, Lenexa, KS, U.S.A.)를 3차 증류수에 녹인 후 2N KOH를 사용하여 pH를 6.2로 맞추고 미세공여과지(0.2 μ m)로 여과하여 4°C에 보관하며 기본배지로 사용하였고, 세포배양배지(TNM-FH-T media)는 기본배지 90 ml에 fetal bovine serum(Gibco, Grand Island, N.Y., U.S.A.) 10 ml, 26% tryptose broth(Difco, Detroit, MI, U.S.A.) 1 ml, 그리고 penicillin-streptomycin(5,000 unit/ml, 5,000 μ g/ml, Gibco) 1 ml을 첨가하여 사용하였다.

세포 및 바이러스 배양

흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury)에 기생하는 흰불나방 핵다면체 바이러스 *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus L-2 클론과 숙주세포인 *Spodoptera frugiperda* 계대세포(IPLB-SF-21)는 건국대학교 생물학과 분자 미생물학 연구실에 보관 중인 것을 사용하였다. 세포배양용 플라스크에 배양되어 있는 *S. frugiperda* 세포의 상태를 inverted contrast microscope로 매일 관찰하면서 세포가 단층을 이루면 멸균된 고무스크레이퍼를 이용하여 세포를 조심스럽게 플라스크 바닥에서 떼어낸 후 5배로 희석하여 4개의 새로운 플라스크에 분배한 다음 배지 5 ml을 넣고 28°C에서 배양하였다. 실험에 사용할 다량의 세포를 얻기 위하여 250 ml의 듀란병에 회전자석을 넣고 15분간 가압흡윤 멸균한 후 100 ml의 세포배양배지를 넣은 다음 *S. frugiperda* 세포를 1×10^6 개 접종하고 이것을 28°C CO₂ 배양기에 설치된 회전판 위에서 분당 40~50 rpm으로 회전시키면서 배양한 후 hematocytometer를 이용하여 세포 수를 측정하였으며 실험에는 대수기의 세포를 사용하였다.

Hyphantria cunea NPV의 배양

세포배양 접시에 *S. frugiperda* 세포가 2×10^6 개/ml로 증식된 세포배양액 5 ml을 넣고 세포가 고루 퍼지도록 전후좌우로 흔들어 준 후 세포가 부착되도록 28°C 배양기에서 2시간 정치시켜 70% 단층이 되도록 하였다. 세포가 부착되면 각각의 세포배양접시에서 배양액을 제거하고 HcNPVs를 2 m.o.i(multiplicity of infection)되도록 감염시킨 후 10 ml의 세포배양배지를 첨가하여 28°C 배양기에서 핵다면체 단백질이 완전히 성숙되도록 4~5일간 배양하면서 inverted contrast microscope를 통해 바이러스가 복제되는 과정을 조사하였다.

핵다면체 단백질의 정제

핵다면체 단백질이 성숙되도록 배양된 세포가 있는 세포배양 접시에서 세포를 떼어내 16,000×g로 10분간 원심분리한 후 pellet을 모아 증류수로 현탁하여 2% sodium dodecyl sulfate(SDS) 용액으로 최종농도가 0.4%되게 처리한 후 37°C 배양기에서 1시간 방치하고 다시 16,000×g로 원심분리한 후 pellet에 10 ml의 증류수와 1 ml의 5M NaCl을 첨가하여 현탁시키고 다시 16,000×g로 원심분리하여 pellet을 수거하고 5 ml의 증류수에 현탁하였다. 30~60%의 설탕 밀도구배(sucrose gradient)를 만들어 상기 용액을 올려 놓고 16,000×g로 60분간 원심분리하고 50% 부근의 핵다면체를 모아 증류수에 현탁한 후 다시 16,000×g로 원심분리하여 pellet을 수거하고 여기에 1M Na₂CO₃를 최종농도가 0.05M 되도록 처리하고 37°C에 1시간 방치한 후 초원심분리기(Beckman Lk-2, SW41 Rotor)를 이용 100,000×g로 2시간 원심분리하여 상층액을 모으고 dialysis bag에 넣어 12시간마다 증류수를 갈아 주면서 3일간 투석을 하여 핵다면체 단백질을 정제하였다(3). 분리한 핵다면체 단백질의 농도를 알기 위하여 Pierce사의 micro BCA protein assay reagent(Pierce, 23255 Rockford, IL, U.S.A.)에 의한 단백질 정량을 실시하였다.

단일클론 항체 생산을 위한 생쥐의 면역처리

본 연구에 사용한 BALB/C 생쥐는 국립 보건원에서 분양 받은 것을 사용하였다. 정량된 핵다면체 단백질을 동량의 Freund's complete adjuvant(Gibco)와 혼합한 후 5주된 생쥐의 복강을 통하여 총 핵다면체 단백질 50 μ g/0.5 ml을 주사하였다. 2주 후 다시 동량의 핵다면체 단백질을 Freund's incomplete adjuvant(Gibco)와

혼합하여 복강으로 면역시켰다. 7일 뒤 생쥐의 꼬리에서 채혈하여 ELISA방법으로 항체형성 정도를 확인하였다. 면역화된 생쥐 중에서 가장 좋은 면역반응을 보이는 생쥐를 선택하여 약 6주 후 핵다면체 단백질 50 µg/0.5 ml을 복강을 통하여 주사한 후 다음날 생쥐의 꼬리 정맥을 통하여 50 µg/0.5 ml의 항원을 주사하였다.

세포융합

선택된 생쥐에 정맥주사를 한 후 3일 뒤에 생쥐를 희생시켜 비장을 제거하고 세포융합을 위한 B림프구 세포원으로 사용하였다. 제거한 비장을 조심스럽게 미세한 mesh를 이용하여 균질화한 후 기본배지에 희석하여 37°C 항온기에서 20분간 정치시킨 뒤 1,000×g에서 5분간 원심분리를 하여 상층액을 버리고 기본배지에 다시 현탁시키고 세포수를 측정하였다. 그리고 비장세포를 항온기에서 정치시키는 동안 골수종세포(Sp2/0-Ag14)를 준비하여 비장세포와 골수종세포를 10 : 1 비율이 되도록 혼합하고 다시 1,000×g에서 5분간 원심분리를 하였다. 상층액을 버리고 시험관을 가볍게 흔들면서 잘 혼합한 후 polyethylene glycol(PEG) 4000 용액(Boeringer Mannheim, Germany)을 1분간 천천히 흔들면서 첨가하고, 기본배지를 처음에는 1분간에 걸쳐 1 ml을 3회 첨가한 후, 다시 1분간에 걸쳐 3 ml을 4회 천천히 흔들면서 가하였다. PEG와 기본배지의 첨가가 끝난 후 신속히 1,000 rpm으로 5분간 원심분리를 하고 상층액을 버린 후 hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) 배지(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)로 현탁하고 96 well plate의 각 well에 100 µl씩 첨가한 후 다시 HAT 배지를 100 µl씩 더 첨가하고 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

단일클론 항체를 분비하는 clone의 screening과 cloning

세포융합 후 약 1주일 후 골수종세포 비교구가 완전히 선택되면 배지를 Hypoxanthine-Thymidine(HT) 배지(Sigma)로 갈아주고 성장한 융합된 세포들을 현미경으로 확인하고 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) 방법을 이용하여 항체생성여부를 확인하였다. 항원 부착을 위해서 부착완충용액(0.05 M Na₂CO₃, 0.05 M NaHCO₃)으로 항원을 10 µg/ml이 되도록 희석한 후 각 well당 100 µl씩 분주하고 4°C 에서 하룻밤 정치시킨 후 세척완충용액(Phosphate buffered saline, PBS ; 8 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄, 2.9 g Na₂HPO₄·12H₂O, 0.2 g KCl, 0.01% Thimerosal, 0.5 ml Tween 20, pH 7.4)

으로 3회 세척하고 항원이 부착되지 않은 표면에 단일클론 항체가 결합함으로써 유발되는 비특이적 반응을 제거하기 위하여 1% BSA/PBS 용액을 각 well당 100 µl씩 분주하여 37°C 항온기에서 15분간 반응시켰다. 이것을 다시 세척완충용액으로 3회 세척하고 각 well에서 분리한 하이브리도마 상층액을 각 well에 100 µl씩 분주하여 37°C 항온기에서 1시간 동안 반응시킨 다음에 세척완충용액으로 3회 세척한 후 horserperoxidase conjugated anti-goat mouse IgG+IgM(Jackson Immuno-Research Lab. Inc., West Grove, PA. U.S.A.)을 1 : 10,000으로 희석하여 각 well에 100 µl씩 분주하고 37°C 항온기에서 1시간 동안 반응시킨 후 각 well을 3회 세척하고 기질인 O-phenylenediamine dehydrochloride를 phosphate-citrate buffer에 녹이고 30% H₂O₂를 첨가하여 각 well에 100 µl씩 분주하였다. 그리고 37°C 항온기에서 30분간 반응시킨 후 반응정지용액인 2.5 M H₂SO₄를 각 well에 50 µl씩 분주하여 반응을 정지시킨 후 ELISA 소형 판독기(BIO-TEK 311 automatic ELISA reader, U.S.A.)로 490 nm에서 판독하였다. ELISA 결과 항체를 분비하는 clone을 선택하여 한계희석법(9)으로 cloning하였다. 일정기간 배양 후에 colony가 형성된 well은 다시 ELISA 방법으로 screenig 및 cloning을 하여 효율이 95%에 이를 때까지 실시하였다.

Hybridoma 세포의 분리와 동결보존

한계희석법으로 효율이 95% 이상인 well을 선택하여 24 well plate에 옮기고 HT배지를 첨가하여 배양하였다. 세포가 단층을 형성하면 25 mm² flask에 옮기고 다시 단층이 형성되면 100 mm² flask에 옮겨서 배양한 후 세포가 1×10⁵ cell/ml 정도로 자라도록 하여 원심분리 시험관으로 옮겨서 10분간 1,000 rpm으로 원심분리하고 동결배지(cryomedia ; 10% DMSO in FBS)에 현탁하여 1×10⁷ cell/ml로 냉동용 작용병(Nunc, Denmark)에 분주하여 -70°C 에서 1일간 저장한 후 -185°C 액체질소에 넣어 보관하였다(10).

단일클론 항체의 subtype 결정

생성된 hybridoma 세포의 subtype은 ELISA sandwich method를 이용한 Hyclone사의 subisotyping kit (Hyclone 98055, Utah. U.S.A.)를 이용하여 결정하였다. Coating 용액에 goat anti-mouse immunoglobulin을 잘 섞어 각 well당 100 µl씩 분주하여 4°C 에서 하룻동안 정치시키고 PBS-surfactant로 3회 세척 후 다시 50 µl의

PBS-surfactant와 각각 50 μ l의 hybridoma 배양액을 해당 well에 넣은 다음 상온에서 1시간 동안 반응시키고, PBS로 3회 세척 후 peroxidase를 처리한 IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA를 각각 시험할 hybridoma well에 넣고 비특이적 반응을 보기 위한 well에는 PBS-surfactant를 100 μ l를 넣어 상온에서 1시간 반응시킨 뒤, PBS로 3회 세척 후 goat anti-rabbit-IgG peroxidase conjugates를 PBS-surfactant에 1/4,000로 희석하여 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 상온에서 1시간 반응시키고, 다시 PBS로 3회 세척한 후 substrate-chromophore 100 μ l씩을 각 well에 넣고 색의 변화를 관찰하였다.

SDS-PAGE에 의한 핵다면체 단백질의 분석

SDS-PAGE 전기영동은 Laemmli(11)의 방법에 의하여 수행하였다. Sample buffer와 핵다면체 단백질을 혼합하여 5분간 100°C에서 5분간 반응시킨 후 5%의 stacking gel과 10%의 separating gel로 구성된 불연속 전기영동 시스템(SE250-Might small II slab gel electrophoresis unit, Hoefer, U.S.A.)을 이용하여 저분자 표준분자량표지(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A.; phosphorylase b, bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, soybean trypsin inhibitor, lysozyme)과 함께 30 mA로 전개시켰다. 전개 후 gel을 coomassie brilliant blue R250(Bio-Rad)으로 염색하여 핵다면체 단백질의 band의 위치와 각 분자량을 확인하였다.

단백질의 전이와 확인

SDS-PAGE로 전개한 gel을 Towbin(12)이 서술한 방법에 따라 Hoefer사의 western blotting kit를 사용하여 transfer buffer(15.6 mM Tris-Base, 120 mM Glycine, pH 8.3)로 100 V, 30 mA에서 1시간 30분 동안 nitrocellulose paper(Hoefer, U.S.A.)에 전이시켰다. 전이된 nitrocellulose paper를 amido black 염색액(0.1% amido black/25% isopropanol/10% acetic acid)에 1분간 염색한 후 25% isopropanol/10% acetic acid로 탈색시키고 단백질 전이를 확인하였다.

Western blotting

전이된 nitrocellulose paper를 Seal-A-Meal bag에 넣어 3% BSA/Tris-buffered saline(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl; TBS) 용액에 넣어 교반시키면서 하룻 동안 반응시키고 TBS로 3회 세척한 후

분리한 hybridoma 배양 상층액을 0.5% BSA/TBS에 10:1로 희석하여 37°C에서 1시간 동안 흔들면서 반응시키고 다시 TBS로 3회 세척 후 0.5% BSA/TBS로 1/5,000로 희석한 horserperoxidase conjugated anti-goat mouse IgG+IgM(Jackson Immuno-REsearch Lab. Inc., West Grove, PA. U.S.A.)를 37°C에서 1시간 동안 흔들면서 반응시킨 후 TBS로 3회 세척하고 발색용액(30 mg chloronaphthol, 11 ml methanol, 5 ml TBS, 30 μ l 30% H₂O₂)을 가하였다. 발색과정을 계속 관찰하면서 침전물이 생기기 시작하면 발색용액을 버리고 증류수로 세척하여 반응을 종결시켰다.

복수(Ascites)의 생산

선택된 단일 세포군을 대량생산하기 위해서 생쥐의 복강 내에 복수를 유발하였다. 복강내 암 유발 물질로는 pristane(Sigma)을 생쥐 당 0.5 ml를 주사하고, 1주일 뒤 생쥐당 10⁷개의 hybridoma 세포를 복강내에 주사한 후 약 1주일 뒤 생성된 복수를 21-G needle을 이용하여 분리하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 -20°C에 보관하였다.

결 과

세포융합 효율

PEG를 사용하여 융합한 세포를 총 1248의 culture plate well에 분주하여 배양한 결과 943개의 well에서 hybridoma colony가 형성되어 75%의 융합효율을 보였으며 이 중에서 강한 양성반응을 보인 8개의 positive clone을 얻었다. 이중에서 2차 cloning까지 실시하여 항체생산능력이 우수한 Hhc-1과 Hhc-2를 얻었다.

항체의 subtype의 결정

분리한 hybridoma clone의 subtype을 Hyclone사의 subtyping kit을 이용하여 실험한 결과 Hhc-1은 IgM으로 나타났으며, Hhc-2도 IgM으로 나타났다.

SDS-PAGE에 의한 핵다면체 단백질의 분석

핵다면체 단백질을 불연속 SDS-PAGE 방법으로 분석한 결과 모두 7개의 밴드가 나타났으며 각각 85.9, 79, 59.1, 31.5, 28.7, 25, 21.9 Kd의 분자량을 갖고 있는 것으로 판명되었다(Fig. 1). 또한 이들 중 31.5 Kd의 단백질이 가장 진하게 나타났다.

핵다면체의 기본 단백질 분자량은 종류에 따라서 약간씩 달라 *A. californica* MNPV의 경우는 30 Kd이고

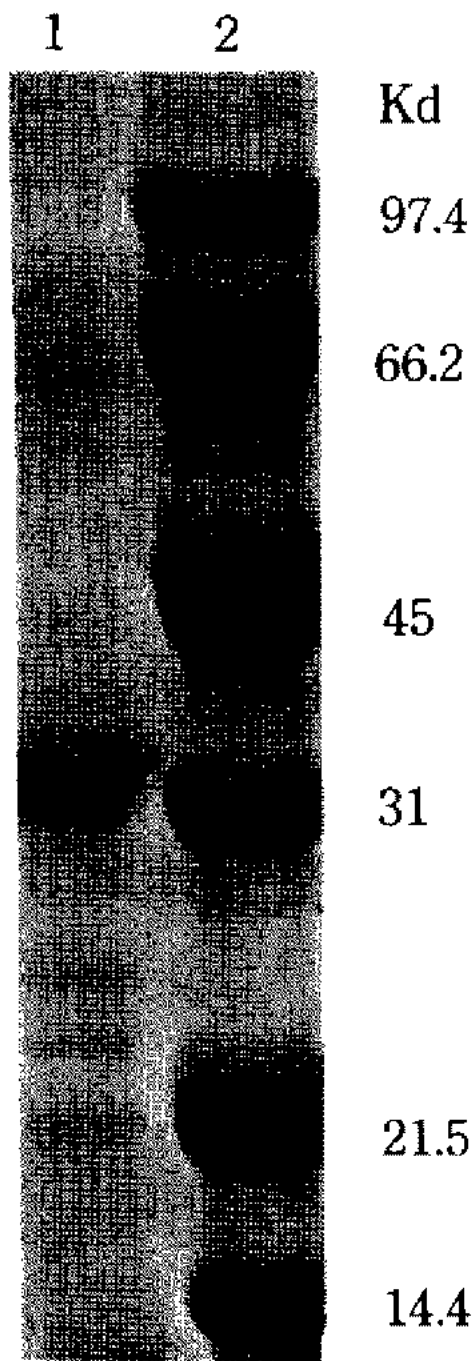


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of PIBs. PIB antigens were electrophoresed in discontinuous gel system consisting of 4% stacking gel and 10% separating gel. The 30 mA of constant current was applied. The gel was stained for band with coomassie brilliant blue R-250 for 20 minutes. The standard proteins are shown in the lane 2 and molecular weights are indicated on the right.

Rachiplusia ou MNPV는 30 Kd, *Heliothis armigera* SNPV는 28 Kd, *Trichoplusia ni* SNPV의 경우는 31 Kd, *Aanticarsa gemmatalis* MNPV가 29 Kd으로 되어 있다고 보고된(1) 점을 감안 할 때, 본 실험에서 분석한 핵다면체단백질의 분자량도 이들과 비교적 유사한 결과를 보였다.

Western blotting에 의한 단일클론 항체의 인식 항원의 결정

전이된 nitrocellulose paper를 Amido black으로 염색한 결과(Fig. 2) 단백질의 전이가 성공적이었음을 확인하였다. 또한 생산된 하이브리도마의 배양 상층액을 이용하여 Western blotting을 시행한 결과 Hhc-1 항체와 Hhc-2의 항체 모두가 31.5 Kd의 단백질과 강한 반응을 보여주었다(Fig. 3). 특히 Hhc-2 항체의 경우, 31.5 Kd 이외에 79 Kd, 59.1 Kd의 단백질들과도 미세한 반응을 보였다.

Ascites의 역가 결정

생산된 ascites의 역가를 ELISA의 방법으로 결정한 결과, 1/50,000의 희석배수에서도 O.D. 1 이상의 높은

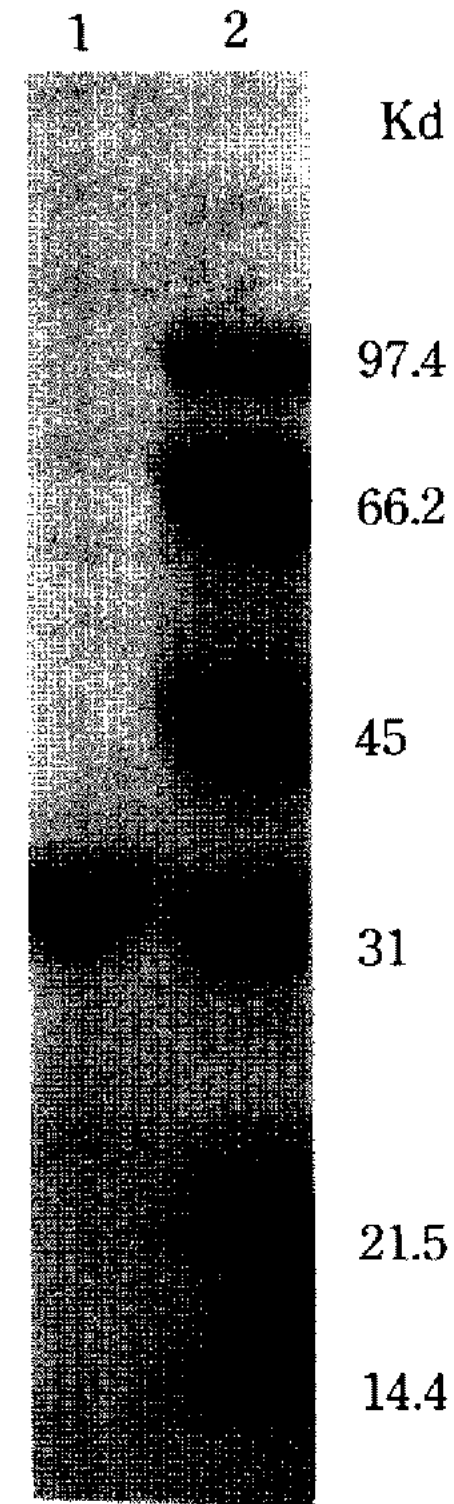


Fig. 2. Amido black staining of PIB antigens. PIB proteins in the gel was transferred to a nitrocellulose paper for 1 hour, stained in 0.1% amido black 10B for 1 minute, and destained for 30 minutes in 25% isopropanol/10% acetic acid (Lane 2: molecular wight standards).

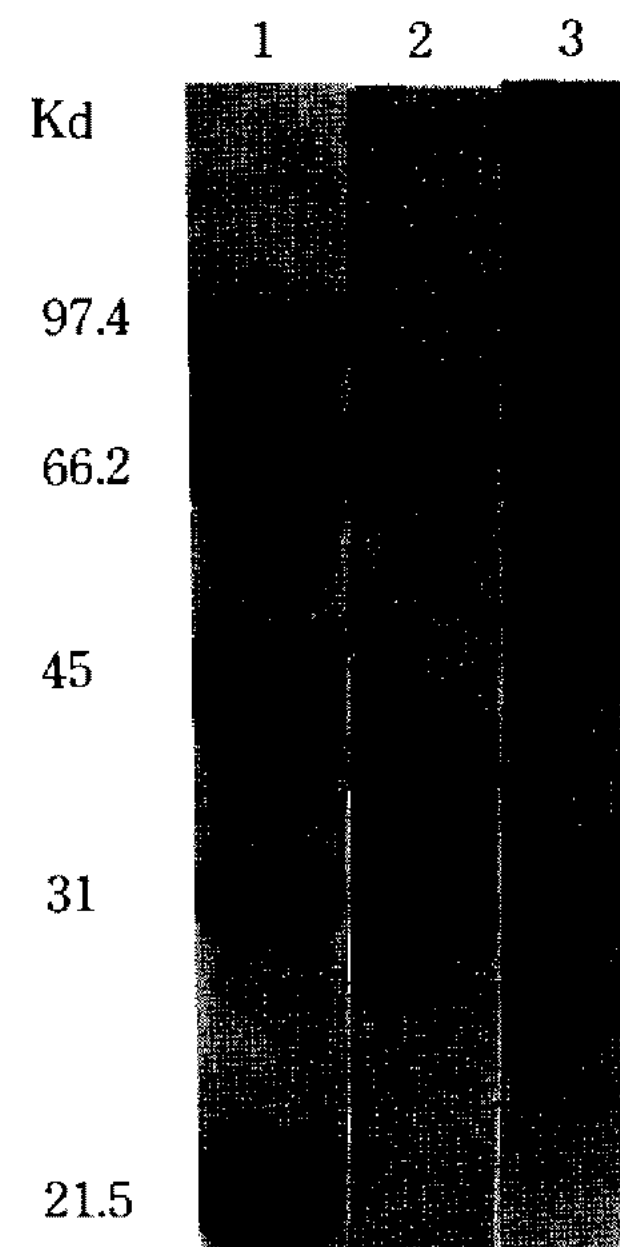


Fig. 3. Western blot analysis of PIBs. PIB antigens were electrophoresed, transferred to nitrocellulose paper, and individually immunostained with a 1/10 dilution of respective monoclonal antibodies Hhc-1 (lane 2) and Hhc-2 (lane 3) in hybridoma culture supernatant. The strips were developed with HRP-conjugated mouse immunoglobulin G+M and 4-chloro-1-naphthol substrate. Lane 1 is low molecular weight standards.

항원 항체 반응을 나타내었다.

고 찰

일반적으로 baculovirus의 감염 후 핵다면체는 곤충 유충에 흡수되어 중장의 alkali 상태에서 용해되고 virion을 유리함으로써 1차 감염을 유발하고 10~12시간이 지난 후에는 바이러스가 중장 세포 표면에서 발아하여 2차 감염이 발생한다(5, 13). 핵다면체는 화학적 요인에 매우 안정하지만, Na_2CO_3 나 NaOH 에는 용해되는 알칼리 투과성이 있고, 직경이 650~900 nm이며 결정형 격자(cryatlline lattices)로 구성되어 있다고 알려져 있다(14).

현재까지 사용되왔던 항혈청을 이용한 바이러스 구조와 항원성의 관계를 분석하는 방법은 단지 핵다면체 단백질의 항원성의 연관성을 밝히는데에 국한되어 있고(15) 다른 바이러스 종사이의 핵다면체 단백질과 바이러스 단백질의 미묘한 항원성의 차이를 구별해 내기가 불가능하였다. 더욱이 바이러스 종들 사이에 발생하는 공통항원의 존재 때문에 항혈청을 이용한 방법은 많은 교차반응(cross reaction)을 일으키므로(16) 종들 사이의 항원성의 다양성을 분석해 낼 수 없었다. 또한 항혈청을 이용하는 방법은 같은 종의 숙주를 감염하는 핵다면체 바이러스의 핵봉입체와 과립 바이러스(Granulosis viruses)의 과립체(granulin)와의 매우 큰 연관 작용을 유발하여 이를 이용한 바이러스의 동정이 거의 불가능하였다. 일례로 나비목내에서 증식시킨 핵다면체 바이러스에서 얻은 핵봉입체에 대한 항혈청은 같은 인시류에서 증식된 과립바이러스의 과립체와 모두 연관작용을 일으켰으나 다른 숙주인 벌목에서 증식된 핵다면체의 핵봉입체에 대한 항혈청은 인시류의 과립체와 핵봉입체에 대해 연관작용을 나타내지 않은 것으로 알려졌다(17). Mazzone과 Tigner(18)의 실험에 의하면, 항혈청을 이용한 방법은 immunodiffusion, complementation fixation, radioimmunoassay (RIA) 등에 의해 핵다면체와 과립체를 단지 부분적으로만 구별할 수 있었다. 상기한 항혈청에 비해 단일 클론 항체를 이용한 방법은 ELISA나 RIA를 이용하여 다른 종 사이의 핵다면체 단백질과 비리온 단백질 사이의 미묘한 차이를 구분해 낼 수 있을 뿐만 아니라, 연관작용을 거의 유발하지 않기 때문에 baculoviruses 사이의 공통 항원과 특정 항원을 구별하여 항원의 다양성을 분석해 낼 수 있는 장점을 지니고 있다(15, 19).

더욱이 단일클론 항체는 분자유전학적인 측면에서도 매우 유용한데, Smith 등(20)의 연구에 의하면 핵다면체 유전자는 바이러스 복제에 필수적이지 않음이 알려져 근래에 이 핵다면체 유전자 부위에 외래 DNA를 도입시켜 발현시키려는 연구가 진행되었으며(21) 강력한 핵다면체 촉진 유전자를 이용한 진행세포 발현 운반체가 개발되기도 하였다(20). 이런 이유로 유전자 구조와 유전자 산물사이의 연관성을 찾으려는 연구가 활발하였는데(3), 세포내에서 유전자와 그 산물을 확인하는 데는 단일클론 항체를 이용한 면역학적인 방법이 매우 유용하다. Hohmann과 Faulkner(17)는 *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis virus(AcNPV)의 핵봉입체에 대해 단일클론 항체를 만들어 *Choristoneura fumiferana*(Cf) NPV, *Neodiprion lecontei*(Nl) NPV, *Euxoa messora*(Em) NPV, *Pieris rapae*(Pr) GV, *Laspyresia pomonella*(Lp) NPV 등과의 연관 관계를 연구하여 단일클론 항체가 핵봉입체와 과립체에 매우 특이적으로 반응하고 서로 다른 종의 baculoviruses 사이의 공통항원과 특이항원을 특이하게 구별해 낼 수 있음을 보여 주었다. 또한 이들은 주요 핵다면체 단백질인 33 Kd의 단일 클론 항체를 생산하여 이 항체가 AcNPV 뿐만 아니라 *Trichoplusia ni*(Tn) NPV, *Em-NPV*, *CjNPV* 핵다면체에도 공통적으로 작용함을 밝혔다.

본 연구에서 생산된 핵다면체의 31.5 Kd의 주단백질을 인식하는 단일클론 항체들 또한 이와 유사한 것으로 생각되며, Hhc-1 항체는 주단백질만을 인식하였는데 비해 Hhc-2 항체의 경우 31.5 Kd의 주단백질 이외의 단백질들과도 미세한 반응을 보였는데 Hhc-2 항체가 31.5 Kd의 주단백질과 함께 79 Kd과 59.1 Kd의 단백질 항원을 인식한 것은 이들이 공통항원 결정기를 갖고 있기 때문이라고 여겨진다. 항체는 3~5개의 아미노산으로 이루어진 항원 결정기를 인식하기 때문에 이들 단백질들이 같은 결정기를 갖고 있다면 항체와 반응을 일으킬 것이다. 그리고 또 다른 해석으로는 주단백질 이외의 다른 단백질들은 폴리펩티드 단위체(monomer)가 응집된 것으로, 숙주 단백질 분해효소(Protease)존재 여하에 무관하게 염기성 용액에서 봉입 바이러스를 유리시킬 때 발생하는 것으로 보고된(22) 핵다면체의 폴리펩티드들이므로 여겨진다. Summers와 Smith(1)는 여러 Baculovirus의 핵다면체의 SDS-PAGE분석 실험에서 위와 같은 폴리펩티드 단위체의 응집을 관찰하고 mercaptoethanol을 이용한 2차 분해를 통하여 이들이 핵다면체와 동일한 분자량을

지닌 단백질들의 응집임을 확인하였다. 이들 폴리펩타드의 존재와 분포정도는, SDS-PAGE후 은염색을 통하여 주요 밴드들을 비교함으로써 분리된 Baculovirus의 동정에도 이용될 수 있음이 알려져 있다(23). 또한 Chang과 Tanaka(24)는 baculovirus의 핵다면체의 항체를 이용, 유사 바이러스 항원과 면역확산법을 통하여 바이러스를 동정하는데 이용하기도 하였다.

이상의 결과로 볼때 HcNPV의 핵다면체는 31.5 Kd의 주단백질로 구성되어 있음을 알 수 있다. 이는 기존의 다른 nuclear polyhedrosis virus의 핵다면체의 분석 결과(1)와 일치하며, 이번에 생산된 핵다면체 주단백질에 대한 단일클론 항체 뿐 아니라 앞으로 미봉입 바이러스에 특이적인 항원을 인식하는 단일클론 항체가 생산된다면 이들을 이용하여 과립 바이러스와 핵다면체 바이러스의 정확한 동정 뿐만 아니라, 봉입형 바이러스의 형성을 억제함으로써 발생하는 HcNPV의 생활사의 변화를 통하여 두가지 형태의 생활사를 결정짓는 요인의 연구, 지금까지 연구되지 않았던 HcNPV의 핵다면체와, AcNPV를 비롯한 종래의 핵다면체 바이러스의 핵다면체와의 비교를 통하여 각 바이러스 사이의 진화상의 연관정도와 숙주 특이성의 기인에 관한 연구도 진행될 수 있을 것이다. 또한, 이 단일클론 항체는 숙주내에서의 봉입형 바이러스의 분포와 형성 과정연구 등과 더불어 숙주감염시 핵다면체의 역할규명에도 이용될 수 있을 것이다. 이상과 같이 Baculovirus 사이의 종들의 연관관계와 구조의 특이성과 공통성 등을 알아내는데 뿐만 아니라, 세포내에서 혹은 생체외 세포 배양에서 얻은 유전자 산물을 확인하기 위한 일련의 면역학적 탐침자는 매우 유용할 것이다.

참고문헌

- Summers, M.D. and G.E. Smith. 1978. Baculovirus structural polypeptides. *Virology*. **84**: 390-402.
- Carstens, E.B., S.T. Tjia and W. Doerfler. 1979. Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Synthesis of intracellular proteins after virus infection. *Virology*. **99**: 386.
- Dobos, P. and M.A. Cochran. 1980. Protein synthesis in cells infected by *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus(Ac-NPV): The effect of Cytosine Arabinoside. *Virology*. **103**: 446-464.
- Eppstein, D.A., J.A. Tma and S.Y. Toung. 1975. Degradation of matrix protein from a nuclear polyhedrosis virus of *Trichoplusia ni* by an endogeneous protease. *Virology*. **67**: 591-594.
- Harrap, K.A. and Robertson. 1968. A possible infection pathway in the development of a nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* **3**: 221-225.
- Harrap, K.A. 1972b. The structure of nuclear polyhedrosis virus. II: the virus particle. *Virology*. **50**: 124-132.
- Dougherth, E.M., C.F. Reichelderfer and J.S. Vaughn. 1975. Characteristics of the nonoccluded form of a nuclear polyhedrosis virus. *Interviol.* **5**: 109-121.
- Volkman L., M.D. Summers and C.H. Hsieh. 1976. Occluded and Nonoccluded nuclear polyhedrosis virus grown in *Trichoplusia ni*: Comparative neutralization, Comparative infectivity, and *In vitro* growth studies. *J. virol.* **19**(3): 820-832.
- Goding, J.W. 1986. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2nd edition. Academic Press.
- Kennet, R.H. 1978. Cell fusion. *Methods Enzymol.* **58**: 345-359.
- Laemmli, E.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Towbin, H. and J. Gordon. 1984. Immunoblotting and dot immunobinding-Current status and outlook. *J. Immunol. Methods*. **72**: 313-340.
- Hawkes, R., E. Niday and J. Gordon. 1982. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.* **119**: 142.
- Choe, Y.K., D.H.L. Bishop, S.Y. Matura and M.H. Choe. 1987. secretion of particles of hepatitis B-surface antigen from insect cells using a baculovirus vector. *J. Gen. Virol.* **68**: 2607-2613.
- Crawford, A.M., P. Faulkner and J. Kalmakoff. 1978. Comparison of solid-phase radioimmunoassays for baculoviruses. *Appl. Environ. Mico.* **36**(1): 18-24.
- Harrap, K.A. and C.C. Payne. 1979. The structural properties and identification of insect virus. *Adv. Virus. Res.* **25**: 273-355.
- Hohmann, A.W. and P. Faulkner. 1983. Monoclonal antibodies to Baculovirus Structural proteins: Determination of Specificities by Western Blot analysis. *Virology* **125**: 432-444.
- Mazzone, H.M. and G.H. Tigner. 1976. Insect viruses. Serological relationship. *Advan. Virus. Res.* **20**: 237-270.
- Smith, G.E. and M.D. Summers. 1981. Application of a novel radioimmunoassay to identify baculovirus structural proteins that share interspecies antigenic determinants. *J. Virol.* **39**: 125-137.
- Smith, G.E., M.J. Fraser and M.D. Summers. 1983. Molecular engineering of the *Authgrapha californica* nuclear polyhedrosis virus genome: Deletion muta-

- tions within the polyhedrin gene. *J. Virol.* **46**: 584-593.
21. Matsuhara, Y., R.D. Possee and D.H.L. Bishop. 1986. Expression of the S-coded genes of lymphocytic choriomeningitis arenavirus using a baculovirus vector. *J. Gen. Virol.* **67**: 1515-1529.
 22. Maskos, C.B. and H.G. Miltenburger. 1981. SDS-PAGE comparative studies on the polyhedral and viral polypeptides of the NPV of *M. brassicae*, *A. californica*, *L. dispar*. *J. Insect. Pathol.* **37**: 174-180.
 23. Reinganum, C. 1984. Polyacrylamide gel electrophoresis of baculovirus protein: A simplified and sensitive modification for differentiating between isolates. *J. Invert. Pathol.* **44**: 134-139.
 24. Harrap, K.A. 1972a. The structure of nuclear polyhedrosis virus. I: the inclusion body. *Virology.* **50**: 114-123.
 25. Talbot, P.J., R.L. Knobler and M.J. Buchmeier. 1984. Western and dot blotting analysis of viral antigens and antibodies: application to murine hepatitis virus. *J. Immunol. Methods.* **73**: 177.
 26. Vaughn, J. N., R.H. Goodwin, G.J. Tomkins and P. McCawley. 1977. The establishment of two cell lines from insect *Spodoptera frugiperda*. *In Vitro.* **13**: 213.
 27. Volkman, L., A. Phyllis, Goldsmith, Roberta, P. Faulkmer. 1984. Neutralization of Budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibodies; Identification of the Target Antigens. *Virology.* **133**: 354-362.
 28. Adams, R.L.P. 1990. Cell Culture for Biochemists, Laboratory technique in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier Science Publishing Company, Inc.
 29. Burnette, W.N. 1981. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiolabeled protein A. *Anal Biochem.* **112**: 195-203.
 30. Chang, P.M. and Y. Tanaka. 1978. Serological study on the transmission of a granulosis virus of the armyworm, *pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) to other Lepidopterous species. *J. Invest. Pathol.* **31**: 106-117.
 31. Gershoni, J.M. and G.E. Palade. 1983. Protein blotting: Principles and applications. *Anal. Biochem.* **131**: 1-15.
 32. Harlow and D.Lane, 1988. Antibodies a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y..
 33. Hink, W.F., E.M. Strauss and W.A. Ramoska. 1977. Propagation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in cell culture: Methods for infecting cells. *J. Invertebr. Pathol.* **30**: 185-191.
 34. Kohler, G and C. Milstein. 1976. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* **6**: 511-579.

(Received August 28, 1993)