

Baculovirus 발현벡터계를 이용한 단백질 생산

다카라코리아바이오메디칼(주) 연구개발센터 / 충북대 농생명학과 우 수동

Baculovirus 발현벡터계 (Baculovirus Expression Vector System: BEVS)는 가장 강력한 진핵발현계 중의 하나로써 다양한 응용이 가능한 유용한 발현계이다. BEVS는 아데노바이러스 발현계나 레트로바이러스 발현계와는 달리 helper-independent 바이러스 시스템으로써 보다 간편하며, 동물, 식물, 곰팡이, 세균, 바이러스 등 매우 다양한 이종 유전자의 발현에 현재 널리 이용되고 있다. 1980년대 초 처음 개발된 이래 다양한 형태의 벡터들이 개발되고 많은 연구자들이 이용하게 되면서 이제는 발현시스템을 대표하는 한 자리를 차지하고 있다. 최근에는 유전자의 단순한 발현을 넘어서 유전자 치료를 목적으로한 의학분야에서의 응용 등 그 이용분야가 더욱 확대되고 있으며 그에 따른 연구개발이 매우 활발히 이루어지고 있다. 이러한 BEVS에 대해서 기본적인 baculovirus의 특성과 이를 이용한 발현계의 제작과 이용법에 대한 기초적인 내용과 더불어 그와 관련된 서비스현황에 대해서 간략히 알아보고자 한다.

1. Baculovirus의 특성

유전자의 발현을 위한 벡터계로 더욱 잘 알려져 있는 baculovirus는 사람이나 척추동물에는 병원성이 없으며 오로지 곤충에만 병원성을 가지고 있는 곤충 병원성 바이러스이다. Baculovirus는 크게 핵다각체병 바이러스 (Nucleopolyhedrovirus: NPV)와 과립병바이러스 (Granulovirus: GV)로 분류되며 현재까지 약 600여종 이상의 곤충에서 분리되고 있는 대표적인 곤충 바이러스이다. 흔히 BEVS에 말하는 baculovirus는 이 중 NPV만을 일컫는 것이다. NPV는 병원성을 가지고 있는 바이러스 입자 (virion)가 다각체 (polyhedra)라는 거대한 결정성 단백질의 봉입체 (occlusion body)내에 매립되어 있는 특이한 형태의 바이러스로써 광학현미경하에서도 쉽게 관찰이 가능하여 1900년대 초부터 일찍이 그 연구가 활발히 이루어져 왔다 (그림 1). NPV는 보통 곤충의 섭식에 의한 장내 침입부터 시작하여 충체의 거의 모든 조직에서 증식하는 강력한 병원성을 가지는 곤충 병원성 바이러스이니 만큼 초기의 연구는 주로 농작물에 발생하는 해충을 방제하는 살충제의 개발을 위해서였으나, 생명공학의 발달과 함께 다양한 유전자 재조합 기술이 개발됨으로써 근래에는 살충제로써 보다는 유전공학적 측면에서 더욱 관심의 대상이 되고 있다.

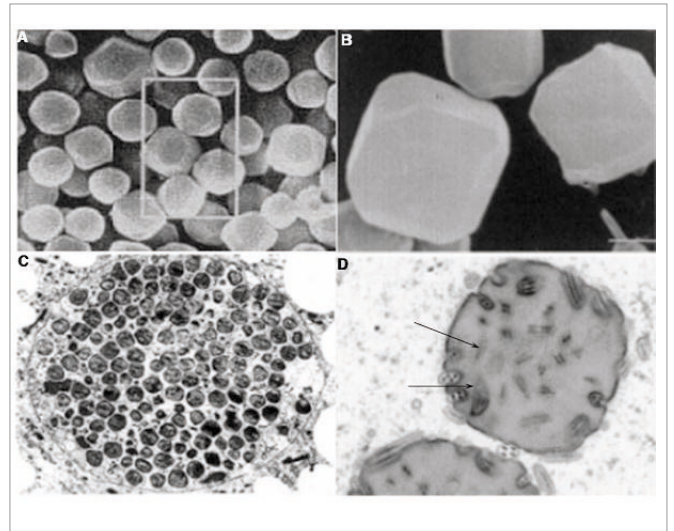


그림 1. NPV 다각체의 전자현미경 관찰에 의한 내외부 형태. A와 B, 다각체의 외부형태 C, 하나의 세포내에 형성된 다각체의 내부 형태 D, 다각체의 내부 형태. 화살표는 바이러스 입자들

NPV의 구조는 약 88-153 Kb 크기의 이중나선형 DNA (double-stranded circular supercoiled DNA)가 11~25 종의 구조 단백질과 함께 막대형의 뉴클레오캡시드 (nucleocapsid)를 구성하고, 이 뉴클레오캡시드는 다시 막에 둘러싸여 직경 20~50 nm, 길이 200~400 nm의 바이러스 입자를 형성하고 있다. 바이러스 입자는 다시 분자량 약 28~33 kDa의 격자 구조의 결정성 단일 단백질인 다각체 단백질 (polyhedrin)에 매립되어 하나의 바이러스 다각체를 형성하는데 그 크기는 0.5 μm에서 15 μm에 이른다 (그림 2). 다각체는 야외 환경에서 바이러스 입자의 활성을 보호하고 유지하는 기능을 하며, 그를 구성하는 다각체 단백질은 바이러스 감염 말기에는 세포내 단백질의 약 30~50% 정도까지 다량 합성되어지는 특성을 가지고 있다.

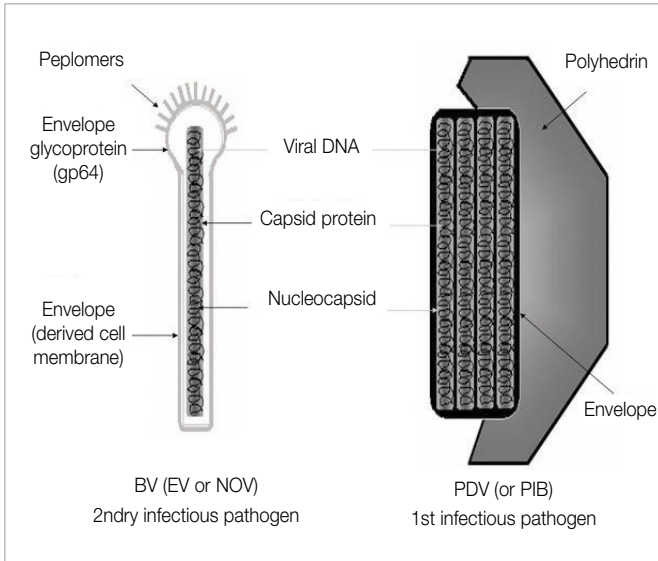


그림 2. 바이러스의 두 가지 형태 비교

NPV의 증식과정은 그 감염원에 따라 크게 두 가지형태로 분류될 수 있다. 먼저 야의 환경에서 식물잎의 표면이나 토양에 존재할 때의 형태인, 다각체내에 존재하는 바이러스를 1차 감염원으로써 PDV (polyhedra-derived virus)라 부르며, 1차 감염원의 곤충에 대한 침입 후 충체내에서 만들어지는 바이러스를 BV (budded virus) 또는 NOV (non-occluded virus)라 하여 2차 감염원으로 구분 한다 (그림 2).

이러한 바이러스의 침입 과정은 우선 야의 환경으로부터 다각체 상태의 바이러스가 곤충의 먹이와 함께 섭식 되면, 곤충 유충의 중장내로 다각체가 이동하게 되고 중장의 pH10 정도의 강알칼리 조건과 단백질 분해효소 (protease)에 의하여 다각체가 용해되면서 PDV가 방출된다. 방출된 PDV는 중장의 미세융모 (microvilli)와 융합 (fusion)에 의하여 상피세포 (epithelial cell)에 침입하게 되고 세포내에 들어간 뉴클레오캡시드는 핵막 (nuclear membrane)으로 이동하여 endocytosis에 의해 DNA만 핵내로 들어가게 된다. 핵내에 들어간 DNA는 숙주세포의 대사산물을 이용하여 DNA 복제 과정을 거치게 되며, 이 과정을 통해 다시 뉴클레오캡시드를 형성하여 핵막과 세포질막 (cytoplasmic membrane)을 통하여 체강내로 출아 (budding) 하면서 2차 감염원인 BV를 형성한다 (그림 3).

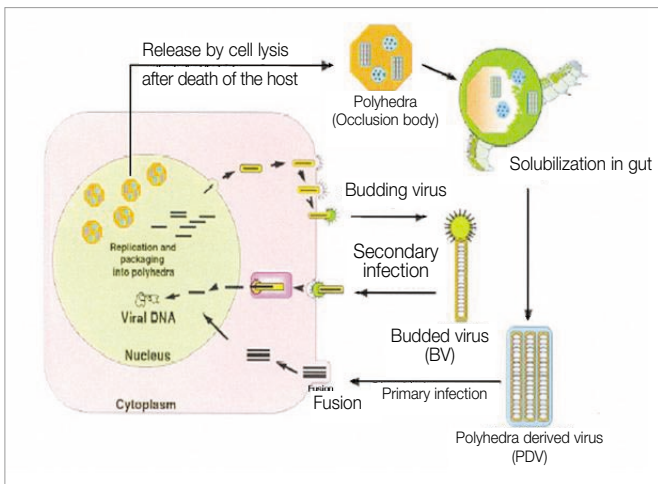


그림 3. 바이러스의 증식과정

2차 감염원인 BV는 다시 다른 세포 또는 다른 기관의 조직 등에 대해 부착성 (adsorptive) endocytosis에 의해 세포내로 침입하고, 핵내에 이르러 DNA 복제 과정을 거친다. 이러한 감염 과정이 진행됨에 따라 핵내에서는 바이러스에 의해 다시 막 단백질과 다각체 단백질이 생성되고 바이러스 입자가 다각체에 매립되어지며, 결국에는 cell lysis에 의해 다각체가 방출되고 곤충은 죽게 된다. 이러한 복제 과정은 바이러스 침입 직후부터 시작되어 감염 후 24 시간이면 다각체가 처음으로 생성되고 감염후 5-6 일이면 곤충은 치사에 이르게 된다 (그림 3). NPV의 DNA 복제는 바이러스 유전자의 발현과 DNA 복제가 순차적 반응으로 일어나는 cascade 모델에 의해 수행된다. NPV의 유전자는 그 발현시기에 따라 immediate early gene, early gene, late gene 및 very late gene으로 구분된다. Immediate early gene은 발현되는데 있어서 바이러스에 의한 다른 생성물이 불필요한 유전자로서 숙주세포를 이용하여 발현되는 유전자이며, early gene은 비교적 감염 초기에 발현되나 바이러스에 의한 생성물이 있어야 발현되는 유전자이다. 그리고 late gene은 DNA 복제 후 풍부하게 mRNA가 합성되는 유전자이며, very late gene은 DNA 복제 후부터 감염 과정 전기간에 걸쳐 계속해서 매우 높은 수준으로 mRNA와 단백질을 축적하는 유전자이다. 다각체를 형성하는 다각체 단백질 유전자 (polyhedrin gene)는 이러한 very late gene의 대표적인 유전자이며 그 외에도 이들 유전자를 이용한 다양한 BEVS가 개발되어 있다.

2. Baculovirus 발현벡터계

(1) BEVS의 개발

Baculovirus의 다각체 단백질이 감염세포내에서 세포내 전체 단백질의 30-50% 수준까지 대량으로 합성되며, 그 유전자가 배양세포에서 바이러스의 증식에는 불필요하고 이를 조절하는 것이 그 유전자의 강력한 프로모터 (promoter)에 의해 일어난다는 것이 밝혀짐으로써 그 프로모터를 이용한 외래유전자의 발현이 가능한 BEVS가 탄생되었다. Baculovirus 발현 벡터계에 대한 연구는 Smith 등 (1983)이 처음으로 Spodoptera frugiperda (Sf) 배양세포계와 Autographa californica NPV (AcNPV)를 조합하여 발현벡터계를 제작하여 human β -interferon의 발현을 보고한 이후, 1985년에 Maeda 등이 누에핵다각체병 바이러스 (Bombyx mori NPV: BmNPV)와 누에 유충을 이용한 발현벡터계를 개발하여 human α -interferon을 발현시킴으로써 현재까지 이 두 가지 발현벡터계가 BEVS의 주종을 이루고 있다.

(2) BEVS를 이용한 단백질 발현의 우수성

Baculovirus 발현벡터계의 개발이 많은 연구자의 관심을 끌 수 있었던 이유는 지금까지 개발된 발현벡터계가 가지는 단점을 보완하면서 장점을 그대로 지니고 있었기 때문이다. 원핵세포계를 이용할 경우 발현된 단백질이 원래의 단백질과 다른 특성을 지니는 경우가 종종 있으나, BEVS는 진핵세포계를 이용함으로써 발현된 단백질이 원래의 단백질과 거의 비슷한 특성을 지니고 있으며, 또한 같은 진핵세포인 동물 세포를 이용한 다른 발현벡터계에 비해 그 생산성이나 속도면에서 월등히 우수함으로써 이에 대한 관심을 더욱 집중시켰다 (그림 4).

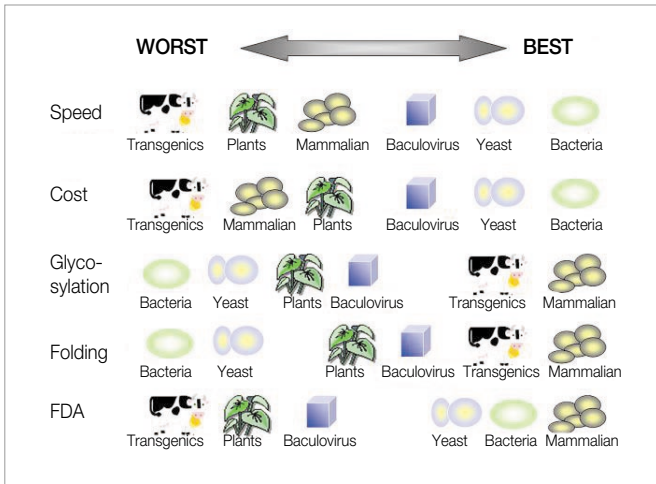


그림 4. 다양한 발현계의 장단점 비교

단백질의 이행 (localization) 과 절단

Baculovirus 발현벡터계에 의한 단백질의 발현 특성은 세포내에서 생산된, 목적 단백질이 본래 국재하고 있는 바로 그 세포 소기관까지 이행함으로써, 이후 단백질의 수정이나 안정성을 높여 준다는 것이다. 또한, 합성된 단백질들 가운데에는 세포 밖에서 효소로서의 기능을 갖거나, 개체의 구조에 관련하는 것들 또는 세포나 기관에 정보를 보내는 분비 단백질들은 합성과 동시에 소포체를 통과하면서 분비 신호가 즉시 절단되어야 한다. 이러한 분비 단백질에 대해 BEVS에 의한 발현은 분비 신호가 정확하게 인식, 절단되면서 목적 산물이 배지 안으로 분비되어짐이 확인되었으며, 또한 누에에서도 이와 같은 과정이 정확하게 수행되어 체액 안으로 단백질이 분비되어, 체액내 단백질 분해효소 억제제 (protease inhibitor)의 작용에 의해 분해 되지 않고 안정적으로 축적된다고 보고되고 있다.

전사 후 수정 (post-translational modifications)

분비 단백질 또는 세포막에 주재하는 단백질 어느 경우든 이들 단백질은 당사슬의 부가 (glycosylation)가 그 활성에 중요한 역할을 담당하는 경우가 있다. 이러한 당사슬의 부가에 대해서, BEVS는 곤충 세포를 숙주로 이용함으로써 사람의 유전자 산물과 유사한 당사슬이 부가되고 있음이 밝혀졌으나, 이러한 당사슬의 부가가 척추동물 세포에 의한 것에 비해서는 당사슬이 짧은 것으로 알려져 있다. 그러나 당사슬의 부가가 일어나지 않는 대장균이나 당사슬의 부가가 일어나더라도 매우 긴 사슬이 결합되는 효모, 그리고 척추동물에는 없는 당이 부가되거나 하는 식물 세포 등을 이용하는 경우에 비해서는 매우 뛰어난 장점으로 인정되고 있다. 최근까지 이러한 BEVS를 이용한 당단백질의 불완전한 발현에 대한 문제점을 해결하고자 다양한 시도가 이루어져 왔다. 그 결과 곤충과 척추동물사이에 있어서 당사슬의 부가에 대한 가장 근본적인 차이가 그들의 glycosyltransferase의 근본적인 차이 때문임이 밝혀지고, 이후 이를 극복하기 위해 BEVS를 이용한 단백질 생산시 척추동물의 glycosyltransferase를 첨가하는 방법에서부터 이를 동시에 BEVS를 이용하여 발현시키는 방법 등이 도입되어 어느 정도 그 해결 가능성을 보여주고 있다. 특히, 최근에는 몇 가지 종류의 척추동물 glycosyltransferase를 직접 곤충세포주에 형질 전환시킨 형질전환 세포주를 제작하여 거의 모든 종류의 당사슬 부가가 이상 없이 일어나는 것이 확인되어, 이제 더 이상 당사슬의 불완전한 부

가가 BEVS에서 문제시 되지 않을 것으로 기대되고 있다.

아미드화 (amidation)가 필요한 펩타이드 (peptide)의 경우, 아미드화는 생물활성이나 펩타이드의 안정성에 깊이 관련되나 배양 세포계에서는 척추동물 세포이든 곤충 세포이든 이러한 아미드화가 제대로 일어나지 않는 것으로 보고 되었다. 그러나 곤충 유충을 이용한 baculovirus 발현계의 경우 이러한 아미드화가 완벽하게 일어나는 것으로 보고 되고 있다. 더욱이 baculovirus 발현계는 단백질의 고차구조 (folding) 형성이나 항원성에 있어서도 우수한 것으로 알려져 있으며, 이와 같은 다양한 특징 등으로 인하여 현재 BEVS에서는 진핵 및 원핵생물의 다양한 유전자의 발현이 이루어지고 있다.

발현효율

Baculovirus 발현계가 다른 진핵세포 발현계와 비교할 때 가장 큰 장점으로 인정되는 것중의 하나가 높은 발현효율이다. 가장 높은 발현효율을 보이는 단백질의 경우 세포내 총 단백질의 50% 수준까지 목적단백질이 합성되며, 이것은 1×10^9 cells 당 약 1g 정도의 높은 단백질 생산 수준이다. 그러나 대부분의 이종 단백질은 이러한 수준까지 발현되기를 기대하기는 어려운 것이 사실이다. 또한 원래 다량체 단백질의 발현량 만큼 이종 단백질의 발현을 기대하기도 어려운 것이 사실이며, 현재 까지 이러한 발현 효율을 높이기 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 이러한 이종 목적단백질의 발현 효율을 최상으로 높이기 위해서는 적합한 전이벡터의 선택을 비롯한 발현조건의 최적화가 가장 최선의 길이다.

외래유전자의 수용력

바이러스의 genomic DNA내에 목적 유전자를 삽입하고 이것이 뉴클레오펙시드내에 packaging 되어 목적 단백질을 생산할 수 있는 BEVS는 바이러스의 특성상 현재까지 시도된 바로는 그 한계가 불분명할 만큼 외래유전자의 수용능력이 매우 뛰어나 목적유전자의 크기에는 거의 제한을 받지 않는 장점을 가지고 있다.

Unspliced 유전자의 발현능력

곤충세포는 intron/exon splicing 능력을 가지고 있으나 이러한 splicing이 곤충세포에는 존재하지 않는 다른 인자를 필요할 경우에는 splicing이 불가능하다. 따라서 가급적 유전자의 발현을 위해서는 cDNA 상태의 유전자를 발현하는 것이 바람직하다.

복수 유전자의 동시발현

BEVS는 하나의 세포내에서 두 가지 이상의 유전자를 동시에 발현시킬 수 있다. 이러한 동시발현이 가능한 두개 이상의 프로모터를 가진 다양한 전이벡터 역시 개발되어 있으며, 이러한 동시발현은 바이러스의 구조 단백질 발현이나 항체 발현 등에서 매우 효율적으로 이용될 수 있다.

편리성

다른 여러 가지 발현계와 마찬가지로 BEVS 역시 매우 다양한 종류의 정제용 tag를 가진 시스템이 개발되어 있으며 이들을 이용하여 매우 손쉽게 목적 단백질을 정제할 수 있다. 또한 다른 진핵발현 세포계에 비해 목적 유전자를 발현할 수 있는 재조합 바이러스의 제작에 소요되는 시간이 시스템에 따라 다소 차이는 있지만 짧게는 2주에서 4주정도로 목적단백질

의 발현을 확인할 수 있는 소요 시간의 최소화라는 장점을 지니고 있다.

(3) 다각체 단백질 유전자 이외의 BEVS

BEVS에서 흔히 이용되는 다각체 단백질 유전자의 프로모터는 NPV의 유전자 중 가장 강력한 프로모터이긴 하나, 감염 말기가 아니면 프로모터의 활성을 보이지 않는 특성을 가지고 있다. 따라서 목적하는 단백질의 경우에 따라 그 발현시기의 조절이 필요할 경우를 위하여 이를 대신할 수 있는 여러 가지 유전자의 프로모터를 이용한 벡터 개발이 시도되어 왔다. 그 예로, 초기 발현 단백질 유전자인 early gene 프로모터의 경우 그 발현은 비교적 감염 초기에 이루어지며, 발현 수준 역시 그다지 높지 않고 시간의 경과와 함께 그 수준도 감소하는 약한 발현계이긴 하나, 단순한 목적 유전자의 발현 여부의 확인만을 위해서는 매우 빠른 시간내에 그것이 가능하기 때문에 transient 발현의 목적으로 종종 이용되고 있다. 또한 재조합 바이러스의 선발을 위한 표지 (marker) 유전자의 발현에 자주 이용되어 바이러스의 빠른 선발을 가능하게 하고 있다. 이러한 목적에 이용되는 early gene으로는 PCNA, IE-0 그리고 기초 단백질 (basic protein) 유전자 등이 있다. 한편, 바이러스의 late gene 중 다각체 단백질 유전자 다음으로 다량으로 단백질을 발현하는 것으로 p10 유전자가 있다. P10 유전자 역시 바이러스의 증식과는 직접적인 관계가 없기 때문에 발현벡터로 개발되었다. p10 유전자의 이용은 그 단독으로 외래 유전자를 발현시키거나 또는 다각체 단백질 유전자와 함께 사용하여 두 종류의 외래 유전자를 동시에 발현시키고 있다. 특히 p10 유전자가 제거될 경우 p10 유전자의 한 기능으로 알려진 바이러스 감염에 의한 cell lysis가 억제되어 발현된 단백질들이 세포내에 비교적 안정적으로 존재할 수 있는 특징을 가지고 있어 이러한 목적에 맞는 유전자의 발현에 널리 이용되고 있다.

(4) 곤충 생체를 이용한 단백질 생산

현재 가장 대중적으로 널리 이용되고 있는 AcNPV와 함께 비교적 오랜 연구가 되어온 BmNPV 발현벡터계의 가장 큰 장점은, 유전육종 및 생리대사 그리고 대량 인공 사료육 체계가 확립되어진 누에 유충 생체를 직접 이용하여 유용 물질을 대량 생산 할 수 있다는 것이다. 누에의 유충 시기는 다른 곤충과 같이 번데기시기에 필요로 하는 모든 것들을 준비하는 시기로 먹이를 효율적으로 소화하여 필요한 영양소를 거둬들이고 있으며, 몸 전체로 볼 때는 단백질 합성 능력이 대단히 높은 시기이다. 특히, 종령 누에는 저장 단백질을 비롯한 2~3 종의 특이한 단백질을 다량 합성한다. 이러한 유충의 체액은 무균상태이며, 단백질 분해효소 저해제를 상당히 함유하고 있어 단백질 분해가 잘 일어나지 않음으로, BEVS에 의해 발현된 물질이 안정적으로 존재할 수 있다. 누에는 또한 오랫동안 사람들에 의해 사육되고 길들여져 야의 환경에서는 생존 능력을 가지지 못하게 됨으로써, 재조합 유전자 실험의 숙주로는 매우 적합한 곤충이다. 특히 BmNPV는 체강안의 증장을 제외한 대부분의 조직에서 증식이 가능하기 때문에 충체내의 거의 모든 세포에서 외래 유전자의 발현이 가능하며, 배양세포주에 비해 재조합 단백질의 생산성이 훨씬 높게 나타난다. 또한 누에 체액내에 분비된 목적 단백질은 일반적으로 쓰여지고 있는 생화학적 정제법에 의해 비교적 간단하게 회수가 가능하며, 따라서 FBS를 함유하고 있는 세포 배양액으로 부터의 단백질 정제 보다 훨씬 수월한 것으로 알려져 있다.

(5) Baculovirus 발현벡터계의 제작 과정 (그림 5)

전이벡터의 제작

다각체 단백질의 구조 유전자 상류 약 100 bp (경우에 따라 50~60 bp 정도도 충분)정도가 프로모터 부위에 해당되는 부위로, 이들 염기서열이 다각체 단백질의 강력한 발현에 필수적인 존재이다. 따라서 BEVS의 제작은 이 상류부위는 그대로 둔 상태에서 다각체 단백질의 구조 유전자 부위만을 제거하고 여기에 유용한 유전자를 넣어 발현 시키는 것이다. 그럼 어떻게 유용한 유전자를 약 130 Kb나 되는 거대한 DNA 속에 정확하게 넣을 수 있을까? 이 문제를 해결하기 위해서 전이벡터 (transfer vector)가 고안되었다. 일반적으로 baculovirus 발현벡터라고 하는 것은 이 전이벡터를 일컫는 말이다. 전이벡터의 크기는 그 목적에 따라 다르지만 일반적으로 약 5 kb 전 후의 크기로 제작된다. 따라서 유전자 조작에 있어 매우 간편하게 조작이 가능한 것이다. 전이벡터의 역할은 다각체 단백질 대신 유용 유전자가 삽입된 DNA 단편을 바이러스의 DNA내로 옮겨 주는 역할을 한다. 전이벡터의 구조는 다각체 단백질 유전자를 가진 DNA 단편과 작업을 편하게 하기 위해 *E. coli* 에서 작업이 가능하도록 해주는 플라스미드 벡터의 두 부분으로 구성된다. 전이벡터는 바이러스의 다각체 단백질 유전자 부위를 포함한 바이러스 DNA 단편으로부터 제작된다. 즉, 다각체 단백질 유전자를 포함한 DNA 단편을 플라스미드 벡터에 cloning하고 이로부터 다각체 단백질 유전자를 제거한 후 이 위치에 유용유전자를 넣을 수 있는 cloning site를 만들게 되면 전이벡터의 제작이 끝나게 된다. 물론 이러한 기초적인 과정 외에 발현효율의 증대를 위해서 프로모터 부위를 포함한 non-coding region에 대해 약간의 수정을 가할 수도 있으며 목적 단백질의 용이한 정제를 위해서는 다양한 형태의 tag 수식을 달기도 한다.

재조합 전이벡터의 제작

일반적으로 BEVS를 이용하려는 연구자가 처음 접하게 되는 단계로 단순히 다각체 단백질 유전자의 프로모터 뒤에 위치하는 cloning site에 목적 유전자를 cloning 함으로써 완성된다. 물론 올바른 발현과 발현효율의 극

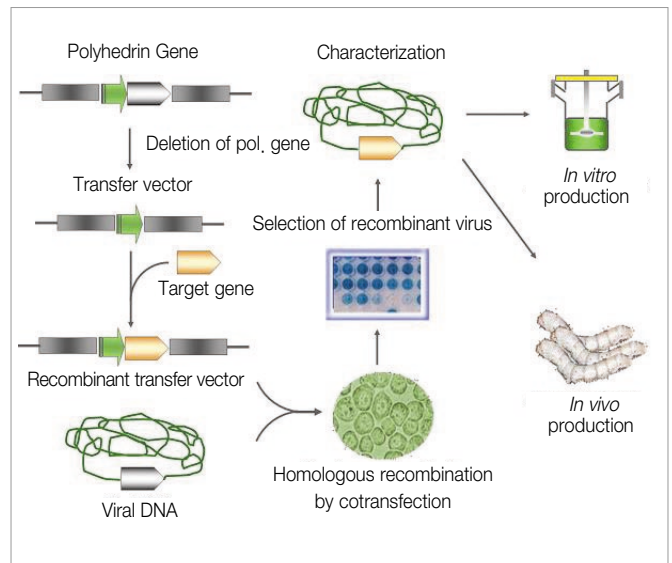


그림 5. BEVS의 제작 과정

대화를 위해서는 cloning 전에 전이벡터의 선택에서부터 목적유전자의 최적화 단계 등 실제로 발현을 위해서는 가장 많은 고려를 해야 하는 단계이다. 전이벡터로의 목적유전자의 cloning은 일반적인 기법에 의해 수행하며 그 후 염기서열 분석을 통하여 최종적으로 올바른 cloning 여부를 확인하면 재조합 전이벡터가 완성되게 된다.

재조합 바이러스의 제작

다각체 단백질 유전자 대신 발현 시키고자 하는 목적 유전자를 가진 재조합 전이벡터가 완성되면, 전이벡터와 바이러스의 전체 genomic DNA를 세포내로 동시전입 (cotransfection) 시키게 된다. 그렇게 되면 전이벡터의 목적 유전자 양 옆에 존재하는 원래 바이러스 DNA의 단편부위와 전체 바이러스 DNA내에서 이 단편 부위에 해당되는 부위가 같은 구조로 이루어져 있기 때문에, 이들 간의 유전자 치환에 의한 상동 재조합 (homologous recombination)이 일어나게 되어 바이러스 DNA 상에서 다각체 단백질 유전자는 제거되고 그 부위에 목적 유전자가 위치할 수 있게 된다. 동시전입은 최근에는 거의 모든 BEVS가 리포솜 (liposome)을 이용한 전이방법을 사용하고 있다. 그 방법에 있어서는 현재 상품화되어 있는 키트마다 조금씩 차이가 있으나 기본적으로는 잘 정제된 재조합 전이벡터와 바이러스 genomic DNA를 리포솜과 섞어서 배양세포에 처리하고 3~5일 후에 재조합 바이러스의 생성여부를 확인하게 된다.

재조합 바이러스의 순화

BEVS에서 목적 유전자를 가진 재조합 바이러스의 생성 비율은 약 0.1~0.3% 수준으로 매우 낮기 때문에, 목적 유전자를 가진 재조합 바이러스만을 순화하는 작업을 수행하게 된다. 순화방법은 일단, 다각체를 형성하는 야생주 바이러스에 비해 재조합 바이러스는 다각체 단백질이 제거되었기 때문에 다각체를 형성하지 않는다는 점에서 다각체를 형성하지 않는 바이러스를 목표로 순화를 수행한다 (그림 6). 순화방법은 plaque assay 또는 end-point dilution 방법 등을 이용한다.

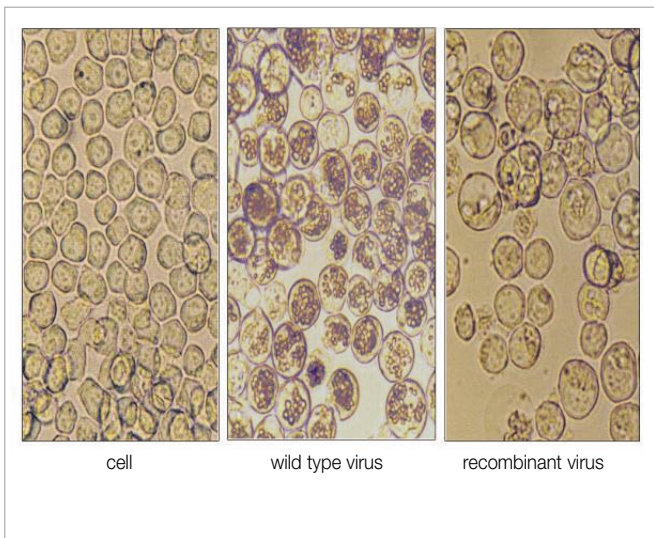


그림 6. 바이러스에 감염된 곤충 배양세포

그러나, 현재 이용되는 BEVS에서는 다각체 생성 여부를 지표로 삼지 않으며, 재조합 바이러스의 식별이 쉽게 가능하도록 표지 유전자를 전이벡

터상에 위치시켜 목적 유전자와 함께 발현시키고, 이것을 이용하여 재조합 바이러스를 쉽게 순화할 수 있게 하고 있다. 특히, 낮은 재조합율로 인한 바이러스 순화의 어려움을 극복하고자 바이러스 genomic DNA를 선형화시키고 바이러스의 증식에 필수적인 유전자가 결여된 형태로 바이러스 genomic DNA를 제작하여 재조합 시킴으로써, 목적유전자와의 재조합이 일어나지 않은 경우 바이러스의 증식이 불가능하게 함으로써 재조합율을 높이는 방법이 고안되었으며, 현재 시판중인 거의 모든 BEVS가 이러한 방법을 도입하고 있다. 비록 재조합 바이러스의 생성율이 바이러스의 선형화에 의해 거의 100% 수준에까지 이르지만 유전자의 재조합 과정에서 생길 수 있는 여러 가지 사항을 고려하여 일반적으로 1~2회의 순화과정은 거치는 것이 안전한 방법이다. 그 외에도 역시 편리성을 도모하기 위해 transposon element 등을 이용한 바이러스 genomic DNA 상의 직접적인 cloning 방법, 대장균 등에서 바이러스 DNA의 복제만을 가능하게 하여 직접 cloning 및 재조합 바이러스의 분리를 시도하는 방법 등 매우 다양한 방법이 고안되어 있어 연구자의 목적에 따라 선택하여 이용할 수 있도록 되어 있다. 따라서 이러한 편리성의 개선 결과 기존에 재조합 바이러스의 제작을 위해서는 바이러스의 순화에만 5~10주정도 소요되던 것이 이제는 2~3주내에 가능하게 되어 있다.

목적 단백질의 발현 및 정제

순화과정을 통해 순수하게 분리된 재조합 바이러스는 일차적인 소규모의 증식을 통해 목적단백질의 생성 여부 및 목적 유전자의 바이러스 genomic 상의 존재 여부를 일반적인 SDS-PAGE 및 Western blot 분석이나 PCR 방법 등으로 확인하게 되며 그 결과에 따라 재조합 바이러스를 증식하게 된다. 바이러스의 증식 이후에는 바이러스의 농도 (titer)를 측정하고, 측정된 농도를 기준으로 바이러스에 의한 목적단백질의 발현을 위한 최적 생산 조건을 결정하게 된다. 최적생산을 위한 적정 세포농도, 바이러스 접종 농도, 목적단백질의 최적 수거시기 및 방법 등에 대하여 여러 가지 실험조건하에 검정하게 되며, 그 결과를 바탕으로 최적의 조건을 결정하고 바이러스의 대량증식에 의한 단백질의 대량 생산을 수행하고 정제를 하게 된다. 한편, 목적단백질을 곤충의 생체를 통하여 생산하고자 할 경우에는 누에에서 유래된 세포주를 이용하여 재조합 바이러스의 제작, 선별 기본적인 특성 분석을 완료한 후 누에 유충에서의 최적 생산조건을 배양세포를 이용할 경우와 마찬가지로 설정하게 된다.

3. BEVS 이용시 고려 사항

BEVS를 이용하여 유전자를 발현시키고자 할 경우 연구자들이 사전에 고려할 사항에 대해 간단히 살펴보기로 한다.

(1) 전이벡터의 선택

목적유전자를 발현시키고자 하는 전이벡터의 선택에 있어서는 제일 먼저 목적 유전자를 원래의 단백질 상태 그대로 발현 시킬 것인지, 아니면 정제용 tag와 함께 융합단백질 상태로 발현시킬 것인지를 결정하여야 한다. 목적단백질의 항체를 보유하고 있거나 또는 목적단백질의 정제가 필요치 않은 경우에는 굳이 tag를 달 이유가 없을 것을 잘 알고 있을 것이다. 따라서 목적에 따라서 tag가 필요한지 그리고 어떤 tag를 이용할 것인지를 우선적으로 선택하여야 한다. 경우에 따라서는 정제용 tag가 아닌 다각체 단백질의 일부를 융합시켜 발현시키는 경우도 있는데, 이러한 경우는 목적 단백질의 발현량을 좀 더 높이기 위한 시도로 그 이유는 아직까지 불분명

하나 그럴 경우 그렇지 않은 경우 보다 좀 더 높은 발현효율을 보이는 것으로 보고 되고 있다. 전이벡터의 선택에 있어서 다음으로 중요한 것은 어떤 프로모터를 이용하여 목적유전자를 발현시킬 것인지를 고려하여야 한다. 앞서의 baculovirus의 유전자에서 보았듯이 baculovirus는 그 발현 시기에 따라 유전자가 나누어질 수 있으며 이들 유전자의 프로모터를 이용한 다양한 벡터가 개발되어 있다. 따라서 목적으로 하는 단백질의 성상에 따라 바이러스 감염초기에 발현을 확인할 필요가 있거나 또는 목적단백질이 세포에 독성을 가지는 경우 등 그 성상에 따라 어떠한 프로모터를 이용하여 발현시킬 것인가를 결정하여야 한다. 물론 가장 보편적으로 이용되는 것은 무엇보다도 높은 발현효율과 안정성을 자랑하는 다각체 단백질 유전자 및 p10 유전자의 프로모터를 이용하는 경우이다. 마지막으로 전이벡터의 선택시 고려할 사항은 단일 유전자를 발현할 것인지 또는 동시에 두 가지 이상의 유전자를 발현시킬 것인지 이다. 물론 이것 역시 목적으로 하는 단백질의 성상에 따라 선택하여야 할 부분이다.

(2) 목적 유전자의 최적화

전이벡터가 선택되면 다음으로는 목적 유전자를 어떤 상태로 전이벡터에 cloning 할 것인가를 결정하여야 한다. 프로모터로부터 첫 번째 “ATG” 코돈에서 부터 발현을 시작하기 때문에 당연히 목적유전자의 “ATG”와 바이러스의 프로모터사이에는 이러한 “ATG” 코돈이 존재하지 말아야 하며 프로모터와 “ATG” 사이의 거리 역시 최소로 하여야 한다. 이러한 거리 차이는 그 발현효율에 매우 많은 영향을 미치는 인자로서 일반적으로 50 bases 이하로 하는 것이 최적이며 짧을수록 좀 더 좋은 결과를 기대할 수 있다. 물론 유전자에 따라서는 그 거리가 150 bases 정도까지는 무난히 발현시킬 수도 있으나 최적의 결과를 위해서는 그 거리를 최소로 하는 것이 바람직하다.

(3) 세포주의 선택 및 재조합 바이러스의 제작

현재 BEVS에 있어 가장 대중적으로 이용되고 있는 곤충세포주는 AcNPV를 이용한 벡터계에 대해서는 Sf 계열 (Sf9과 Sf21)과 Trichoplusia ni 에서 유래된 Hi5 세포주가 있다. 일반적으로는 Sf 계열을 이용한 발현이 가장 많으며 좀 더 발현효율을 높이기 위한 수단으로 Hi5 세포주를 이용하고 있다. 그러나 어떠한 세포주를 이용하든 자신이 제작한 재조합 바이러스의 성상에 맞게 세포상태를 최적화 시켰을 경우에만 최상의 발현 효율을 기대할 수 있다. 바이러스의 대량증식을 위해서는 크게 두 가지 방법이 이용될 수 있다. 역시 목적단백질의 성상에 따라 결정하여야 할 부분으로 단층배양 (monolayer culture)세포를 이용할 것인지 부유배양 (suspension culture)세포를 이용할 것인지를 결정하여야 한다. 일반적으로 곤충세포의 경우 이 두 가지 배양이 다 가능하며 양쪽 방법으로도 적응화도 쉽게 가능하다. 목적단백질의 소량 생산을 위해서는 일반적으로 단층배양에 의한 방법을 이용하고 있으며, 대량으로 생산할 경우에는 부유배양방법을 사용하고 있다. 부유배양 방법을 사용할 경우에는 단층배양방법에 비해 사전에 검정하고 고려되어야 할 부분이 더욱 많고 복잡하지만 생산속도나 비용면에서는 좀 더 경제적인 이점이 있다.

4. BEVS 제품 및 서비스 현황

BEVS를 제품화하여 시판중인 생명공학관련 회사로는 Invitrogen, Clontech, Novagen, 그리고 Stratagene 등의 규모가 비교적 큰 회사를 중심으로 제품이 시판되고 있다. 시판중인 벡터들은 회사별로 조금씩 프

로모터의 종류나 재조합 바이러스의 선발법 등에서 약간의 차이를 보이는 하지만, 근본적으로는 큰 차이를 가지고 있지는 않다. BEVS를 이용한 단백질 발현 서비스는 이러한 업체들보다는 조금은 규모가 작거나 단백질 발현을 전문으로 하는 곳에서 서비스를 수행 중으로, 미국과 영국을 중심으로 여러 나라의 많은 곳에서 서비스를 실시중에 있다. 서비스 수준은 기본적으로는 유전자의 클로닝에서부터 시작하여 BEVS 전과정에서 서비스를 실시중이며, 업체의 여건에 따라 각 과정에서 약간씩 차별화된 서비스를 실시 중에 있다. 한 예로써 단백질에 관련된 여러 가지 서비스를 실시하는 전문회사인 Protein Sciences의 경우에는 기본적인 BEVS 서비스와 더불어 단백질의 정제 부분에 중점을 둔 서비스를 실시중으로, 특히 단백질 의약품 생산을 목적으로 BEVS에 생산된 단백질의 정제에 많은 비중을 두고 높은 서비스 단가를 책정하고 있다. 그 밖의 대부분의 곳에서는 BEVS 그 자체에 좀 더 무게를 둔 서비스를 실시 중에 있다. 서비스의 첫 번째 단계는 다른 서비스와 마찬가지로 1차적으로 고객과의 상담을 통하여 실험설계를 실시하게 된다. 이 과정에서 목적으로 하는 유전자가 BEVS에 의한 발현에 적합할지 그리고 어떤 상태로 발현시킬 것인지 등 의뢰자와 실험자의 충분한 정보공유가 필수적인 매우 중요한 단계이다. 따라서 유전자를 발현시키고자하는 연구자는 적어도 목적 유전자의 구조에 대해서는 정보를 보유하고 있어야 하며, 가능하면 목적 단백질의 기본적인 성상에 대해서도 사전에 정보를 제공하여야 목적단백질 발현의 실패율이 낮아질 수 있다. 잘못된 정보는 발현효율의 저하를 비롯하여 결국에는 발현의 실패로 이어지게 된다. 실험설계가 이루어지면 앞서 언급된 것과 같은 순서에 의하여 실험을 수행하게 된다. 서비스 수준은 크게 다음의 몇 가지 단계로 나뉘어져 서비스 업체마다 내용과 수준을 조금씩 달리하고 있다.

- 1) 목적 유전자를 이용한 재조합 전이벡터의 제작: 여기에는 기본적인 클로닝에서부터 염기서열의 확인과 플라스미드의 정제 등이 모두 포함된다. 통상 1~2주 소요된다.
- 2) 재조합 바이러스의 제작: 이 과정은 재조합 전이벡터와 바이러스 genomic DNA의 동시 전이에 의한 재조합 바이러스의 제작과정으로 곤충 세포주를 이용하는 첫 번째 단계이며 약 1주의 시간이 소요된다.
- 3) 재조합 바이러스의 분리: 제작된 재조합 바이러스를 순수하게 순화하는 과정으로, 경우에 따라서는 1회의 순화로 완료될 수 있으나 통상 2회 이상의 순화 과정을 거치게 된다. 순화를 수행하면서 동시에 목적산물의 발현여부 및 목적 유전자의 바이러스 genome 내 존재 등에 대한 기본적인 확인 과정을 거치게 된다. 따라서 고객은 이 단계에서 원하는 목적산물의 발현가능성 여부를 확인할 수 있게 된다. 이 과정에서 잘못된 순화나 확인은 대량 발현시 결국 목적 단백질의 낮은 발현율이나 잘못된 발현과 직결되기 때문에 상당히 조심스럽게 수행된다. 약 2~3주의 시간이 소요된다.
- 4) 바이러스의 대량생산: 대량생산의 의미는 일반적으로 크게 두 가지로 설명된다. 배양부피 500 ml 이하의 수준으로 어느 정도 목적산물의 생산과 정제를 통한 단백질 특성 분석이 가능한 수준의 작은 규모의 대량생산과, 그 이상 수 리터 정도의 규모로 목적단백질을 분석수준이 아닌 실제 이용이 가능한 수준으로의 생산으로 나눌 수 있다. 어느 경우이든 대량생산 이전에 목적단백질 생산을 위한 적정 세포 농도 및 부피, 바이러스의 접종 농도, 접종 시기, 단백질의 회수시기 및 방법 등에 대한 여러 가지 사전 검정을 실시한다. 그 결과에 따라 바이러스를 대

량으로 집중하고 목적단백질을 생산하여 정제를 수행하게 된다. 기본적으로는 대부분의 서비스 업체가 소규모의 대량생산을 서비스하고 있기 때문에 어디를 통하든 분석이 가능한 수준의 목적 단백질은 얻을 수 있으며, 그 기간은 일반적으로 약 2-3주가 역시 소요된다. 그러나 대부분의 경우 목적 단백질이 정제가 되지 않은 상태의 바이러스 감염 세포를 그대로 공급하고 있으며 정제는 의뢰자의 몫으로 남겨두는 곳이 많다. 단백질을 전문적으로 다루는 일정 규모 이상의 업체에서는 정제 서비스까지 실시하고 있으나 그럴 경우 그 비용이 만만치 않은 단점이 있다. 보통은 목적 단백질에 정제를 위한 tag를 단 상태로 발현시키기 때문에 시중에 나와 있는 정제용 키트를 이용하더라도 어느 수준 이상의 정제는 손쉽게 가능하다.

위와 같은 기본적인 서비스를 중심으로 의뢰자의 요구에 따라 유전자의 클로닝에서부터 또는 곤충 세포주를 이용하는 바이러스의 제작단계에서부터 서비스를 실시중이며, 최종적인 수준 역시 단순한 바이러스의 제작이나, 대량생산을 위한 고농도의 바이러스 증식, 바이러스의 대량 배양 또는 정제까지의 여러 단계별로 서비스를 실시 중에 있다. BEVS가 많은 장점을 지니고 있음에도 더욱 많은 연구자가 손쉽게 접근하기 힘든 이유로는, 기존의 대장균 발현계와는 달리 어느 정도 숙련된 세포배양기술이 필요하고 그에 따른 설비의 추가 구비가 필요하기 때문에 그러한 여건이 형성되지 않은 연구자들이 쉽게 이용할 수 없는 제약이 있다. 따라서 목적단백질의 분석을 위한 1회성 발현을 목적으로 하거나 또는 대량생산을 목적으로 BEVS의 적합성을 검증하는 경우의 어느 경우이든 1차적으로는 전문서비스 업체를 통해 발현서비스를 받는 것이 시간적으로나 경제적으로 손실을 최소화 시킬 수 있는 방법으로 여겨지며 그에 따라 많은 서비스업체가 BEVS 서비스를 실시중인 것이다.

5. 전망

최근 baculovirus 발현계는 단순한 유전자의 대량발현 보다는 다른 쪽으로의 응용성에 대한 연구가 더 많이 이루어지고 있다. 대표적인 것이 인간의 질병치료를 목적으로한 유전자치료 (gene therapy)에의 이용으로써, 놀랍게도 baculovirus가 거의 모든 동물세포내로의 침입이 가능하다는 사실과 더불어 인간에게는 매우 안전한 바이러스라는 점 때문에 baculovirus를 인간 체내로의 유전자 전달자로서 이용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있으며 최근에는 그와 관련된 임상시험도 진행중인 것으로 알려져 있다. 또한 단순한 발현계와 다른 peptide library나 cDNA library 등의 제작이 가능한 표면발현계 (surface expression system)로의 가능성 또한 인정되어 그에 대한 연구 역시 활발히 이루어지고 있기에 앞으로 이를 이용한 연구나 응용의 폭이 더욱 확대될 것으로 여겨진다. 한편 BEVS를 이용한 실제적인 의약품과 같은 제품 개발이 거의 마지막 단계까지 진행되고 있는 것으로 알려지고 있어 조만간 그리고 향후에 BEVS에 대한 이용과 수요는 점차 확대될 것으로 조심스럽게 기대한다.

6. 인용문헌

1. Ayres, M.D., S.C. Howard, J. Kuzio, M. Lopez-Ferber, and R.D. Possee. 1994. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, **202** : 586-605.
2. Blissard, G.W., and G.F. Rohmann. 1990. Baculovirus diversity and

- molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.*, **35** : 127-155.
3. Brown, M., and P. Faulkner. 1978. Plaque assay of nuclear polyhedrosis viruses in cell culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36** : 31-35.
4. Fraser, M.J., 1992. The baculovirus-infected insect cell as a eukaryotic gene expression system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **158**, 131-141.
5. Friesen, P.D., and L.K. Miller. 1986. The regulation of baculovirus gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **131** : 31-49.
6. Ghosh, S., M.K. Parvez, K. Banerjee, S.K. Sarin, S.E. 2002. Hasnain. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: an emerging strategy. *Mol. Ther.* **6** : 5-1.
7. Grabherr, R., and W. Ernst. 2001. The baculovirus expression system as a tool for generating diversity by viral surface display. *Comb. Chem. High. Throughput Screen.* **4** : 185-9
8. Grabherr, R., W. Ernst, C. Oker-Blom, I. Jones. 2001. Developments in the use of baculoviruses for the surface display of complex eukaryotic proteins. *Trends Biotechnol.* **19** : 231-236.
9. Higashihashi, N., Y. Arai, T. Enjo, T. Horiuchi, Y. Saeki, K. Sakano, Y. Sato, K. Takeda, S. Takashina, and T. Takahashi. 1991. High-level expression and characterization of hepatitis B virus surface antigen in silkworm using a baculovirus vector. *J. Virol. Methods*, **35** : 159-163.
10. Hill-Perkins, M.S., and R.D. Possee. 1990. A baculovirus expression vector derived from the basic protein promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.*, **71** : 971-976.
11. Hooft van Iddekinge, B.J.L., G.E. Smith, and M.D. Summers. 1983. Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* , **131** : 5561-565.
12. Huser, A., and C. Hofmann. 2003. Baculovirus vectors: novel mammalian cell gene-delivery vehicles and their applications. *Am. J. Pharmacogenomics*. **3** : 53-63.
13. Iatrou, K., K. Ito, and H. Witkiewicz. 1985. Polyhedrin gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*, **54** : 436-445.
14. Ikononou, L., Y.J. Schneider, and S.N. Agathos. 2003. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62** : 1-20.
15. Jarvis, D.L. 2003. Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. *Virology*. **310** : 1-7.
16. Jarvis, D.L., J.G.W. Flemming, G.R. Kovacs, M.D. Summers, and L.A. Guarino. 1990. Use of early baculovirus promoters for continuous expression and efficient processing of foreign gene products in stably transformed lepidopteran cells. *Bio/Technology*, **8** : 950-955.
17. Jarvis, D.L., and M.D. Summers. 1989. Glycosylation and secretion of human tissue plasminogen activator in recombinant baculovirus-infected insect cells. *Mol. Cell. Biol.*, **9** : 214-223.
18. Jeang, K.T., M. Holmgren-Konig, and G. Khoury. 1987. A

- baculovirus vector can express intron-containing genes, *J. Virol.*, **61** : 1761-1764.
19. Kost, T.A., and J.P. Condey. 1999. Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10** : 428-433.
 20. Lebacqz-Verheyden, A.M., P.G. Kasprzyk, M.G. Raum, K. van Wyke coelingh, J.A. Lebacqz, and J.F. Battey. 1988. Posttranslational processing of endogenous and of baculovirus-expressed human gastrin-releasing peptide precursor, *Mol. Cell. Biol.*, **8** : 3129-3135.
 21. Luckow, V.A., and M.D. Summers. 1988. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology*, **6** : 47-55.
 22. Luckow, V.A., and M.D. Summers. 1989. High level expression nonfused foreign genes with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology*, **170** : 31-39.
 23. Maeda, S.T, Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Soto, and M. Furusawa. 1985. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, **315** : 592-594.
 24. Maeda, S. 1989. Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Ann. Rev. Entomol.*, **34** : 351-372.
 25. Miller, L.K., 1993. Baculoviruses : high-level expression in insect cells, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **3** : 97-101.
 26. O' Reilly, D.R., L.K. Miller, and V.A. Luckow. 1992. Baculovirus Expression Vectors - A laboratory manual. W. H. Freeman and Company, New York.
 27. Patel, G., K. Nasmyth, and N. Jones. 1992. A new method for the isolation of recombinant baculovirus, *Nucleic Acid. Res.*, **20** : 97-104.
 28. Pieroni, L., N. La Monica. 2001. Towards the use of baculovirus as a gene therapy vector. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **3** : 464-467.
 29. Possee, R.D. 1997. Baculoviruses as expression vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8** : 569-72.
 30. Rohrmann, G.F., 1992. Baculovirus structural proteins, *J. Gen. Virol.*, **73** : 749-761.
 31. Smith, G.E., M.D. Summers, and M.J. Fraser. 1983. Production of human β -interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.*, **3** : 2156-2165.
 32. Summers, M.D., and G.E. Smith. 1987. A methods for baculovirus vector and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555.
 33. Thiem, S.J., and L.K. Miller. 1990. Differential gene expression mediated by late very late and hybrid baculovirus promoters. *Gene*, **91** : 87-94.
 34. Tomiya, N., M.J. Betenbaugh, and Y.C. Lee. 2003. Humanization of lepidopteran insect-cell-produced glycoproteins. *Acc. Chem. Res.*, **36** : 613-620.
 35. Ulrich, R., B. Blum, B.U. von Specht, H. Domdey, and J. Collins. 1992. Antibody production in silkworm cells and silkworm larvae infected with a dual recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Bio/Technology*, **10** : 910-912.
 36. Vlak, J.M., F.A. Klinkenberg, K.J. Zaal, M. Usmany, E.C. Klinge-Roode, J.B. Geervliet, J. Roosien, and J.W. van Lent. 1988. Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10- β -galactosidase fusion gene, *J. Gen. Virol.*, **69** : 765-776.
 37. Weyer, U., and R.D. Possee. 1991. A baculovirus dual expression vector derived from the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin and p10 promoters: co-expression of two influenza virus genes in insect cells. *J. Gen. Virol.*, **72** : 2967-2974.