

꿀벌 병원성 바이러스 Deformed Wing Virus의 4종 특이 단백질들의 대량 생산

이주성 · 루옹티홍장 · 윤병수*
경기대학교 자연과학대학 생명과학과

Mass-production of Four Specific Proteins Originated from Deformed Wing Virus, Honeybee-viral Pathogen

Joo-seong Lee, Giang Thi Huong Luong and Byoung-Su Yoon*

Department of Life Science, College of Natural Science, Kyonggi University, Suwon 16227, Korea

(Received 20 November 2015; Revised 27 November 2015; Accepted 27 November 2015)

Abstract

Deformed Wing Virus (DWV) is one of viral pathogens in honeybee and caused a wing deformity and a premature death of honeybee. In this study, capsid protein VP1, capsid protein VP1-VP3 complex, RNA dependent RNA Polymerase (RdRP) and C3G peptidase (C3G) originated from DWV were successfully over-expressed using *E. coli* expression system, respectively. Each recombinant proteins using pET32a(+) or pMAL-C2 system was purified using affinity-column chromatography under optimum expression conditions, Four specific proteins in this study would be use as antigens to generate specific antibodies against DWV. Especially, recombinant RdRP and recombinant C3G might be useful materials to studies on enzymatic analysis and inhibitory assay of DWV.

Key words: Deformed wing virus, DWV, RdRP, C3G Peptidase, VP1, VP3

서론

Deformed Wing Virus(DWV)는 꿀벌(*Apis mellifera* L.)의 다양한 병원성 바이러스 중 꿀벌의 날개를 변형시킨다는, 형태적으로 분명한 병징을 보이며, 꿀벌 응애 (*Varroa destructor*)의 매개에 의하여 감염이 증폭되는 병원체로 알려져 있다(Anderson, D.L. and J.W.H. Trueman, 2002; Bailey, L. and B.V. Ball, 1991; Ball, B.V. and M.F. Allen, 1989; Ball *et al.*, 1988).

DWV를 포함하여, 알려진 꿀벌의 모든 병원성 바이

러스들은, 양성의 단일가닥 RNA(positive single strand RNA)를 유전체로 가지고 있으며, 다른 Retrovirus들의 경우와 달리, 꿀벌의 유전체(DNA)에 삽입되어 DNA로 변형되지 아니하고("no DNA-stage"), 꿀벌에 감염 이후, 스스로 바이러스의 복제형인 음성 단일가닥 RNA (negative single strand RNA)를 만들고, 이를 주형으로 대량의 바이러스 유전체(양성 단일가닥 RNA)를 생산하는 것으로 추측되고 있다.

RNA의존 RNA 중합효소(RdRP; RNA dependent RNA Polymerase)는 많은 RNA 바이러스 중 "no DNA-

*Corresponding author. E-mail: bsyoon@kyonggi.ac.kr

stage"의 바이러스에서만 발견되는 효소로서, DWV에서는 양성가닥 RNA로부터 음성가닥 RNA를, 그리고 음성가닥 RNA로부터 다시 양성가닥 RNA(유전체)를 생산하는 기능을 담당한다. 그러나 DNA의존 DNA 중합효소(복제), DNA의존 RNA 중합효소(전사), 그리고 RNA의존 DNA 중합효소(역전사효소)의 경우와 달리, RdRP의 기능에 대한 분자적 기작은 어느 하나 분명한 것이 밝혀지지 못하고 있다.

한편, C3G Peptidase는 바이러스의 양성가닥 RNA 유전체가, 꿀벌의 mRNA처럼 기능하여 만들어 낸 거대 polypeptide의 특정 아미노산 서열 부분들을 인식하고, 절단하는 효소이다. 이후 절단된 작은 polypeptide들은 각기 바이러스의 구조 단백질(VP1, VP3 등), 비구조 단백질(Non-structural proteins; RdRP, C3G)의 개별 단백질로 기능하게 되나, 이 C3G의 특이 인식/절단 부위는 현재 여러 가설만 제기된 수준이며, 거대 polypeptide가 최소 6개 이상의 개별 polypeptide로 각기 절단되어 각기 특이 단백질로 기능하게 하는데 그 절단부위의 보존 서열 등 많은 의문점들이 아직 미해결로 남아 있다.

현재까지 DWV에 대항하기 위한 연구들은 주로 DWV 특이 유전자 검출과 검량에 집중되어 왔으며, Ultra-rapid Real-time PCR(Lim *et al.*, 2013), Ultra-Fast High-Performance PCR(Lim, 2013), Real Time PCR(Lee *et al.*, 2005), Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP; No *et al.*, 2010) 등이 그것들 이라 할 것이다. 이들 방법들은 모두 유전자 기반의 분자진단법으로 실험실 환경에서 매우 민감한 결과를 보이고 있으나, 양봉 현장에서 즉석 진단에 사용하기에는 어려움이 많은 수준이다. 현재의 기술수준에서 현장진단에 가장 근접한 방법은 Immunochromatography법이라 생각되며, 이를 위한 개별 바이러스에 대한 특이 항원/항체의 개발은 또한 시급한 요구라 판단된다.

따라서 본 연구에서는 대장균 발현시스템을 이용하여 DWV의 특이 단백질들 가운데 구조 단백질 2종(VP1과 VP3)과 비구조 단백질 2종(RdRP와 C3G)의 대량생산을 목표로 하였다. 이들 4종의 특이 단백질들은 각기 특이 항체 생산을 위한 항원들로 사용될 수 있을 뿐 아니라, DWV의 생존 및 감염기작을 밝힐 수

있는 연구재료로서 중요하다. 또한 대상으로 한 2종의 효소들은 효소기능 및 그 저해에 대한 연구를 통하여, 꿀벌에 대한 DWV 감염을 저해시킬 수 있는 항바이러스 저해제 개발에서 주요 역할을 할 것으로 기대하였다.

재료 및 방법

시료의 확보 및 RNA의 순수분리

DWV에 감염되었다고 의심되는 꿀벌(*Apis mellifera* L.) 시료를 경기대학교 양봉장에서 확보를 하였으며, DWV 감염사실은 추후 특이 RT-PCR의 방법으로 확인하였다. RNA 순수분리는 꿀벌 시료 3수에 Total RNA Extraction kit(Intron Bio Inc., Korea)의 1ml lysis buffer와 200µl Chloroform (Daejung Inc., Korea)를 첨가 후, MagNA Lyser Green Beads (Roche, Switzerland)를 사용하여 6,000RPM에서 60초의 조건으로 파쇄를 수행함으로 시작하였다. 이 후 과정은 Total RNA Extraction kit(Intron bio, Korea)를 사용하여 제작자의 지시에 따라 수행하였고, 추출된 전체 RNA는 OD 260nm에서 농도를 측정하고, Reverse Transcription 과정에 사용하였으며, 잔여 RNA는 초저온냉동고(70°C 이하)에 보관하였다.

Reverse Transcription

추출된 전체 RNA중 3,000ng을 사용하여 cDNA를 합성하였다. 3,000ng의 전체 RNA가 포함된 용액에 100pmol oligo-dT를 첨가하여 65°C에서 10분간 정치하였다. 정치 후, 즉시 ice로 옮겨 5분간 정치하였고, 이 반응액에 100mM DDT, 10mM dNTP(각 2.5mM), RNase inhibitor, Rocket Script Reverse Transcriptase (10,000U), 5X reaction buffer를 첨가하여 42°C에서 60분간 정치하여 역전사반응을 수행하였다.

Molecular cloning of each protein gene from DWV

GenBank에 등록된 DWV의 유전체 서열(Accession

Table 1. Information of deformed wing virus (DWV) specific protein primer set

Target	Primer name	Sequence	Reference
DWV	DWV VP1 F	GGGGGATCCTTAATAGTAGGTTATGTGCCT	This study
	DWV VP1 R	GGGGTCGACATTCAAAATCTTGAACATGCG	
	DWV VP1 vp3 F	GCGGGATCCGGATCTGYTTCCGAYCAAAT	
	DWV VP1 vp3 R	AGAGTCGACCGCAATAGGGCCCTCAGGCA	
	DWV RdRp F	GGGGGATCCCAGTTAATGAGGAAAAAGGG	
	DWV RdRp R	TCGGTCGACTGAGTCCAATTCGTCGTTCC	
	DWV polyC3G F	GCGGGATCCACTAAGCCTCAGGGATCAA	
	DWV polyC3G R	AGAGTCGACAGCTAGCTTTGCATCCACT	

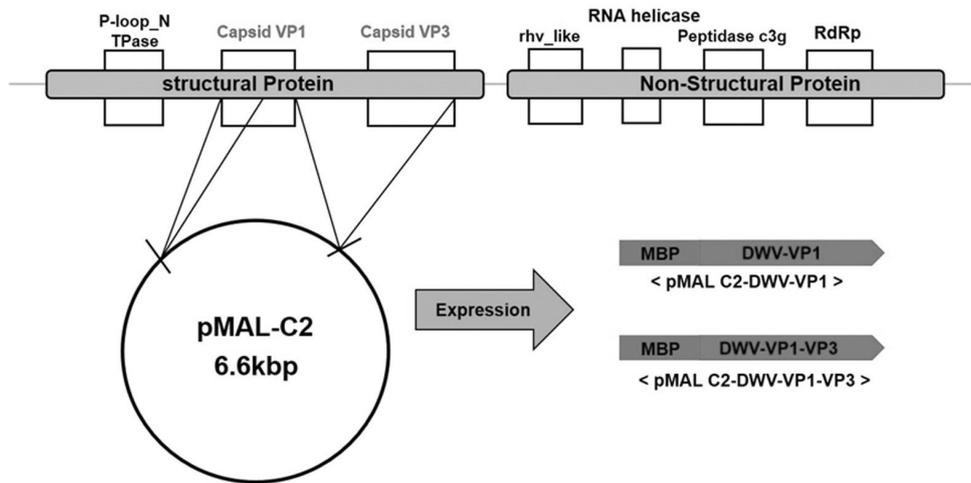


Fig. 1. The genetic map of Deformed Wing Virus and basic strategy of molecular cloning for DWV VP1 / DWV VP1 VP3 using pMAL C2 vector.

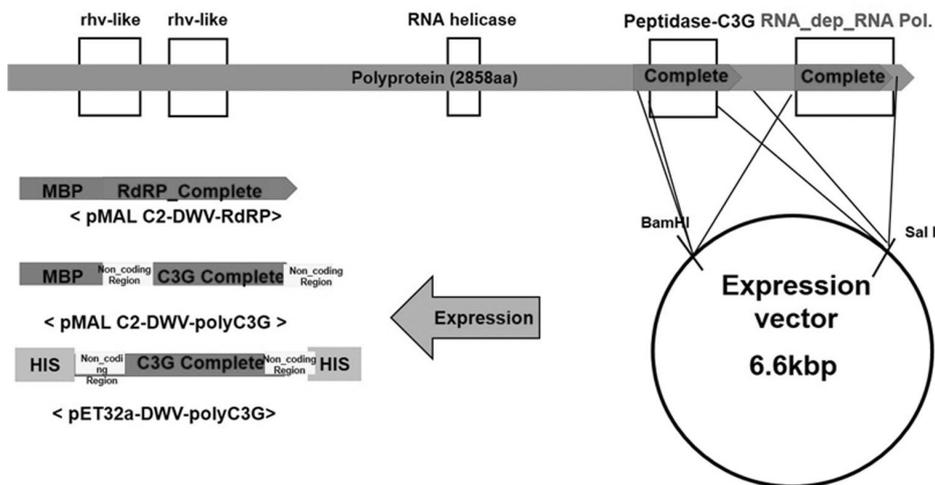


Fig. 2. The genetic map of DWV and strategy of molecular cloning for DWV Peptidase C3G / RdRP using pET32a or pMAL vectors.

No. JX878305.1)을 바탕으로 각 단백질 부분의 유전자가 증폭되도록 특이 프라이머를 설계하였고, BLAST

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 통하여 특이성 및 다른 염기서열과의 상동성을 비교하였다. 각

oligonucleotide의 제작은 바이오닉스(Bionics, Korea)에 의뢰하였다(Table 1).

역전사반응을 통해 제작된 cDNA를 주형으로, 이들 primer쌍을 사용하여 DWV의 각 유전자들을 PCR 증폭하였다. 이때 각 PCR의 조성은, 2.5U Taq DNA Polymerase(GeneClone, Korea), 2.5mM dNTPs, 10×PCR buffer(25mM MgCl₂), 각 10pmol primer set로 하였고, 각 PCR의 조성은 94°C에서 5분간 pre-denaturation 후, 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분을 1cycle로 하여, 총 35cycle 반복수행하고, 마지막으로 72°C에서 10분간 post-extension을 수행하였다.

증폭된 각 유전자들은 아가로오스 젤 전기영동을 통하여 그 PCR 산물의 크기를 확인하였으며, 크기가 확인된 PCR산물들은 각기 pBlueXcm I vector(Gene Clone, Korea)에 삽입하여 T-vector cloning을 수행하였다. 선별된 재조합 DNA들은 DNA 염기 서열 분석을 의뢰하였으며(SolGent, Korea), 염기서열이 확인된 재조합 DNA들은, 제한효소로 절단하여, 각기 발현 vector인 pET32a(+)(Novagen, Germany) 그리고 pMAL-C2(NEB, UK) Expression vector에 삽입시켰다(Fig. 1, Fig. 2).

재조합 DWV 단백질들의 발현

재조합된 DWV의 각 유전자 DNA 염기서열과 추론된 아미노산 서열들을 GenBank에 보고된 DWV의 유전체 서열(Accession No. JX878305.1)과 비교 검토한 후, DWV-VP1, DWV-VP1-VP3, DWV-polyC3G, DWV-RdRP라 명명하였다. 이들 유전자들은 각기 pMAL-c2 vector와 pET32a vector에, 제한효소 절단 및 연결을 통하여 재조합시켰으며 기본 발현조건으로 재조합 단백질 발현을 유도하였다.

각 재조합 단백질들의 발현용 대장균 숙주는 *Escherichia coli* BL21(DE3)을 사용하였다. 해당 재조합 단백질의 발현 유도는 정체기에 들어선 각 대장균 배양액(5ml)을 새로운 배지와 1/25의 배율로 희석한 후 Sub-culture를 통하여 OD-600값이 0.6에 도달하였을 때 발현 유도체인 isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG)을 최종농도 0.6mM이 되도록 첨가하였

다. 이후 37°C에서 150RPM의 진탕조건으로 6시간 호기 상태에서 유도 배양하였다.

유도 배양된 각 대장균 배양액은 50ml 원심분리관에 분주하여, 3,000RPM에서 15min, 4°C의 조건에서, S750-4B rotor를 사용하여 원심 분리하였으며(Union 32R, Hanil Inc., Korea), 각 tube당 40ml PBS를 사용하여 2회의 washing 과정을 거친 후, 상층액을 완전히 제거하고, 최종적으로 10ml PBS로 부유시켰다. 이 부유액은 초음파 분쇄기인 VCX 500 (Sonic & Materials Inc., USA)에 S&M 1000 rode를 장착하고, 40% Amplitude, pulse on 0.5 sec, pulse off 0.5 sec, running time 1min 30sec의 조건으로 세포를 분쇄하였으며, 이 조건에서 세포 부유액이 맑아진 것을 확인하였다.

세포 분쇄액은 4°C의 조건에서 3,000RPM에서 15분간 S750-4B rotor를 사용하여 재차 원심 분리하였으며(Union 32R, Hanil Inc., Korea), 이 중 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 단백질 정제에 사용하였다. 이 중 일부는 발현 여부 확인을 위하여, 5× probe buffer를 가한 후, 99°C에서 10분간 열처리하고, 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 사용하여 전기영동 분석을 수행하였다.

DWV 재조합 단백질의 정제

SDS-PAGE에서 과발현이 확인된 재조합 단백질(pMAL-DWV-VP1, pMAL-DWV-VP1-VP3, pMAL-DWV-polyC3G, pMAL-DWV-RdRP, pET32a-DWV-polyC3G)들은 각기 대량생산 및 단백질 순수분리를 수행하였다.

pET32a-DWV-polyC3G의 경우, 재조합 단백질의 N-말단 및 C-말단에 His tagging이 되어 있기에, Ni⁺ column(His trap HP, 1ml, GE Healthcare, USA)을 사용하여 정제를 진행을 하였다.

먼저 His trap HP를 AKTA Start system(GE Healthcare, USA)에 장착하고, 20ml His-washing solution(20mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 40mM imidazole, pH 7.4)을 flow rate 0.5ml/min의 속도로 system내에 주입하였으며, His trap HP를 통과하여 나온 His-washing solution이 UV-detector의 관찰하에 평형에 이르게 됨을 확인

하였다. 이후 10ml 세포 분쇄액을 flow rate 0.5ml/min의 속도로 system내에 주입하였으며(His trap HP를 통과하여 나온 여과액은 수집하고 재사용), 이어 동량 10ml의 His-washing solution으로 세척하였다. 이후 동량 10ml의 His-Elution solution(20mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 500mM imidazole, pH 7.4)을 투입하였으며, 추출되는 단백질들은 UV detector의 관찰 하에, 각 1ml씩 fraction collector로 수집하였다. 각 fraction의 단백질 양은 UV detector로 관찰할 때, 일반적으로 3ml(3번 fraction)에서 5ml(5번 fraction)까지 급히 증가하였으나, 이후 급히 감소하였다.

pMAL-DWV-VP1, pMAL-DWV-VP1-VP3, pMAL-DWV-polyC3G, pMAL-DWV-RdRP의 경우, 발현된 재조합 단백질의 N-말단 부위에 Maltose binding protein(MBP)이 있고, 재조합체는 이와 융합단백질의 형태로 연결되기에, Maltose 및 MBP Column(MBP trap HP, 1ml, GE Healthcare, USA)을 사용하여 정제를 진행하였다.

먼저 MBP trap HP를 AKTA Start system(GE Healthcare, USA)에 장착하고, 20ml MBP-washing solution(20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7.4)을 flow rate 0.5ml/min의 속도로 system내에 주입하였으며, MBP trap HP를 통과하여 나온 MBP-washing solution이 UV-detector의 관찰하에 평형에 이르게 됨을 확인하였다. 이후 10ml 세포분쇄액을 flow rate 0.5ml/min의 속도로 system내에 주입하였으며(MBP trap HP를 통과하여 나온 여과액은 수집하고 재사용), 이어 동량 10ml의 MBP-washing solution으로 세척하였다. 이후 동량 10ml의 MBP-Elution solution(20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM maltose, pH 7.4)을 투입하였으며, 추출되는 단백질들은 UV detector의 관찰하에, 각 1ml씩 fraction collector로 수집하였다. MBP-trap의 경우도 각 fraction의 단백질 양은 UV detector로 관찰할 때, 일반적으로 3ml(3번 fraction)에서 5ml(5번 fraction)까지 급히 증가하였으나, 이후 급히 감소하였다.

결과 및 고찰

DWV 유전자들에서 유래된 재조합 단백질의 염기서열 분석

DWV의 각 유전자들은 cDNA 주형 및 해당 특이 primer쌍(Table 1)을 사용하여 PCR 증폭함으로써 얻을 수 있었다. 이들 PCR산물은 각기 T-vector cloning하여 유전자를 확보하였으며, 각기 pBX-DWV라 명명하고, 각기 염기서열 결정의 의뢰하였다.

pBX-DWV clone들의 염기서열은 각기 primer 제작 시 사용했던 DWV Complete sequence(Accession No. JX878305.1)와 비교 분석을 수행하였으며, 그 결과 확보된 DWV 구조단백질인 Capsid protein VP1의 염기서열(GenBank accession No. KP739938.1)은 GB-JX878305.1의 그것과 97%(791/818)의 상동성을 보였으며, 이 염기서열을 근거로 추론된 아미노산 서열의 비교 분석에서는 100%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 3, Fig. 7).

확보된 Capsid protein VP1+VP3 (GenBank accession No. KP751410.1)의 경우, GB-JX878305.1의 그것과 98%(1145/1167)의 염기서열 상동성을 보였으며, 이 염기서열을 근거로 추론된 아미노산 서열의 비교 분석에서는 99%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 4, Fig. 8).

한편, 확보된 DWV 비구조단백질인 RdRP (RNA dependent RNA polymerase)의 염기서열 (GenBank accession No. KP739937.1)은 GB-JX878305.1의 그것과 96%(832/863)의 상동성을 보였으며, 이 염기서열을 근거로 추론된 아미노산 서열의 비교 분석에서는 99%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 5, Fig. 9).

또한, 확보된 DWV 비구조단백질인 C3G(C3G peptidase)의 경우, GB-JX878305.1의 그것과 100%(828/828)의 염기서열 상동성을 보였으며, 이 염기서열을 근거로 추론된 아미노산 서열의 비교 분석에서는 99%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 6, Fig. 10).

Deformed wing virus strain Korea-2, complete genome
 Sequence ID: [gbJX878305.1](#) Length: 10114 Number of Matches: 1

Range 1: 2993 to 3810 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1362 bits(737)	0.0	791/818(97%)	0/818(0%)	Plus/Plus
Query 1	TTAATAGTAGGTTATGTGCTGGTTTGACAGCATCTTTGCAACAGCAAAATGGACTATATG			60
Sbjct 2993	TTAATGTAGGTTATGTGCTGGTTTGACAGCATCTTTGCAACAGCAAAATGGACTATATG			3052
Query 61	AAATTGAAGTCATCAAGTTATGTAGTATTTGATTTACAAGAAAGTAATAGCTTTACTTTT			120
Sbjct 3053	AAGTTGAAGTCATCAAGTTATGTAGTATTCGATTTACAAGAAAGTAATAGCTTTACTTTT			3112
Query 121	GAGGTACCATATGTTTCATATAGACCATGGTGGGTGCGTAAGTATGGTGGCAATTATTTA			180
Sbjct 3113	GAGGTACCATATGTTTCATACAGACCATGGTGGGTGCGTAAGTATGGTGGCAAAATTTTA			3172
Query 181	CCCTCGTCAACTGACGCTCCTAGTACATTTTATGTATGTGCAGGTTCCGTTGATACCT			240
Sbjct 3173	CCCTCGTCAACTGACGCTCCTAGCACATTTTATGTATGTGCAGGTTACCGTTGATACCT			3232
Query 241	ATGGAAGCTGTTTCAGATACTATTGATATCAATGTGTACGTGCGGGGCGGTAGTTCATTT			300
Sbjct 3233	ATGGAAGCTGTTTCAGATACTATTGATATCAATGTGTACGTACGGGGCGGTAGTTCGTTT			3292
Query 301	GAAGTTTGTGTTCCAGTCCAACCTAGTTTAGGTTTGAATTGGAATACAGACTTTATCTTA			360
Sbjct 3293	GAAGTTTGTGTTCCAGTCCAACCTAGTTTAGGTTTGAATTGGAATACAGACTTTATTTTG			3352
Query 361	CGTAATGACGAAGAATATAGGGCTAAGACAGGTTATGCACCATAATTATGCTGGAGTGTGG			420
Sbjct 3353	CGTAATGACGAAGAATATAGGGCTAAGACAGGTTATGCACCATAATTATGCAGGAGTGTGG			3412
Query 421	CATAGCTTCAATAAATAGTAATCTCTGTTTTTAGGTGGGGATCTGCTTCTGATCAAATT			480
Sbjct 3413	CATAGCTTCAATAAATAGTAATCTCTCGTTTTTAGGTGGGGATCTGCTTCTGATCAAATT			3472
Query 481	GCCAGTGGCCGACAATTCAGTACCAAGGGGTGAGCTAGCTTTCTTACGAATTAGGGAT			540
Sbjct 3473	GCTCAGTGGCCGACAATTCAGTGCCAAGAGGTGAGCTAGCTTTCTTACGAATTAGGGAT			3532
Query 541	GGAAAGCAAGCTGCTGTAGGAACTCAACCTTGGCGTACGATGGTTGTTTGGCCTTCTGGT			600
Sbjct 3533	GGAAAGCAAGCTGCTGTAGGAACTCAACCTTGGCGTACAATGGTTGTTTGGCCTTCTGGT			3592
Query 601	CATGGTTATAAATTTGGTATACCTACGTATAATGCTGAACGAGCTCGCCAGCTTGACAG			660
Sbjct 3593	CATGGTTATAAATTTGGCATACCTACGTATAATGCTGAACGAGCTCGCCAGCTTGACAAA			3652
Query 661	CATTTATATGGTGGTGGATCATTAAACCGATGAGAAGGCCAAACAATTATTTGTTCTGCT			720
Sbjct 3653	CACCTATATGGTGGCGGGTCAATTAACGTATGAGAAGGCCAAACAATTATTTGTTCTGCT			3712
Query 721	AATCAACAAGGACCTGGTAAGGTAAGTAATGGAATCCGGTATGGGAAGTTATGCGTGCA			780
Sbjct 3713	AATCAACAAGGACCTGGTAAGGTAAGCAATGGGAATCCAGTATGGGAAGTTATGCGCGCG			3772
Query 781	CCATTGGCAACACAGCGTGCGCATGTTCAAGATTTTGA 818			
Sbjct 3773	CCATTGGCAACACAGCGTGCGCATGTTCAAGATTTTGA 3810			

Fig. 3. DNA sequence homology between JX878305.1 and pBX DWV VP1. JX878305.1 is complete nucleotides of DWV deposited in GenBank. Alignment analysis was revealed 97% (791/818) homology between nucleotide sequences of pBX DWV VP1 (GenBank accession No. KP739938.1) and 2993-3810 of JX878305.1.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2034 bits(1101)	0.0	1145/1167(98%)	0/1167(0%)	Plus/Plus
Query 3452	GGATCTGCTTCTGATCAAATTTGCTCAGTGGCCGACAATTTTCAGTGCCAAAGAGGTGAGCTA			3511
Sbjct 10	GGATCTGCTTCCGATCAAATTTGCTCAGTGGCCGACAATTTTCAGTGCCAAAGAGGTGAGCTA			69
Query 3512	GCTTTCTTACGAATTAGGGATGGAAAGCAAGCTGCTGTAGGAACCAACCTTGGGTACA			3571
Sbjct 70	GCTTTCTTACGAATTAGGGAGCGAAAGCAAGCTGCTGTAGGAACCAACCTTGGGTACA			129
Query 3572	ATGGTTGTTTGGCCCTTCTGGTCAATGGTTATAATATTGGCATAOCTACGTATAATGCTGAA			3631
Sbjct 130	ATGGTTGTTTGGCCCTTCTGGTCAATGGTTATAATATTGGCATAOCTACGTATAATGCTGAA			189
Query 3632	CGAGCTGCGCAGCTTGCACAACTTATATGTTGGCGGGTCATTAACCTGATGAGAAAGGCC			3691
Sbjct 190	CGAGCTGCGCAGCTTGCACAACTTATATGTTGGCGGGTCATTAACCTGATGAGAAAGGCC			249
Query 3692	AAACAATTATTTGTTCTGCTAATCAACAAGGACCTGGTAAGGTAAGCAATGGGAATCCA			3751
Sbjct 250	AAACAATTATTTGTTCTGCTAATCAACAAGGACCTGGTAAGGTAAGCAATGGGAATCCA			309
Query 3752	GTATGGGAAGTTATCGCGCGCCATTGGCAACACAGCGTGGCGATGTTCAAGATTTTGAG			3811
Sbjct 310	GTCTGGGAAGTCAATCGCGCAOCTTGGCAACACAGCGTGGCGATGTTCAAGATTTTGAA			369
Query 3812	TTTATTGAAGCTATTCAGAAAGGAGAGGAGTCTCGTAATACTACAATCTTGGACACGACC			3871
Sbjct 370	TTTATTGAAGCTATTCAGAAAGGAGAGGAGTCTCGTAATACTACAATCTTGGATAOAGACC			429
Query 3872	ACTACTTTACAGTGGAGCGGATTTGGTGGCGCATTCTTTGGAGAAAGCTTTTAAATGACCTT			3931
Sbjct 430	ACTACTTTACAGTCAAGCGGATTTGGTGGCGCATTCTTTGGAGAAAGCTTTTAAATGACCTT			489
Query 3932	AAAAAGTTAATGCGACGATATCAATTATATGTTCAATTTATTATTGTCGGTACTAAGGAT			3991
Sbjct 490	AAAAAGTTAATGCGACGATATCAATTATATGTTCAATTTATTATTGTCGGTACTAAGGAT			549
Query 3992	AAGGATATTGATCATTGTATGTTTACCTTCCCTGTTTACCACAAGGGTTGGCGTTAGAT			4051
Sbjct 550	AAGGATATTGATCATTGTATGTTTACCTTCCCTGTTTACCACAAGGGTTAGOGTTAGAC			609
Query 4052	ATTGGTTCTGCTGGCTCTCCACATGAAATCTTTAATAGATGTGTGATGGCATTATAOCA			4111
Sbjct 610	ATTGGTTCAGCTGGCTCCACATGAAATCTTTAATAGATGTGTGATGGTATTATAOCA			669
Query 4112	TTAATTCATCTGGATATAGATTTTATAGAGGAGATTTGGGTTATAAGATTGTTTTTCCA			4171
Sbjct 670	TTAATTCATCTGGATATAGATTTTATAGAGGAGATTTGGGTTATAAGATTGTTTTTCCA			729
Query 4172	AGTAATGTTAACAGCAACATTTGGGTACAACATCGAACGGATCGTAGATTGGAAAGGATGG			4231
Sbjct 730	AGTAATGTTAATAGCAACATTTGGGTACAACATCGAACGGATCGTAGACTGGAAGGATGG			789
Query 4232	TCTGCGGCTAAGATTGTAATTTGCGATGCTGTGTCTACTGGTCAAGGGGTGTATAATCAT			4291
Sbjct 790	TCTGCGGCTAAGATTGTAATTTGCGATGCTGTGTCTACTGGTCAAGGGGTGTATAATCAT			849
Query 4292	GGTTATGCTAGTCACATTCAAATCACGGGTGTAATAATGTTATAGAATTGGAAGTTCCA			4351
Sbjct 850	GGTTATGCTAGTCACATTCAAATCACGGGTGTAATAATGTTATAGAATTGGAAGTTCCA			909
Query 4352	TTTTATAATGCTACTTGTATAAATTTTACAGGGGTTTAAATGCGTCTAGCGCTGCATCT			4411
Sbjct 910	TTTTATAATGCTACTTGTATAAATTTTACAGGGGTTTAAATGCGTCTAGCGCTGCATCT			969
Query 4412	AGTTATGCAATATCTTTAGGAGAAATATCGGTTGGTTTTCAAGCTACAAGTGATGATATT			4471
Sbjct 970	AGTTATGCAATATCTTTAGGAGAAATATCGGTTGGTTTTCAAGCTACAAGTGATGATATT			1029
Query 4472	GCATCTATTGTTAATAAACCTGTTACTATTTATTATAGTATAGGAGATGGTATGCAATTT			4531
Sbjct 1030	GCATCTATTGTTAATAAACCTGTTACTATTTATTATAGTATAGGAGATGGTATGCAATTT			1089
Query 4532	TCTCAGTGGGTTGGATATCAACCGATGATGATCTAGACCAGCTTCTGCAACCAGTAGTA			4591
Sbjct 1090	TCTCAGTGGGTTGGATATCAACCGATGATGATCTAGACCAGCTTCTGCAACCAGTAGTA			1149
Query 4592	AGGGCCGTGCTGAGGGCCCTATTGCG			4618
Sbjct 1150	AGGGCCGTGCTGAGGGCCCTATTGCG			1178

Fig. 4. DNA sequence homology between JX878305.1 and pBX DWV VP1 VP3. JX878305.1 is complete nucleotides of DWV deposited in GenBank. Alignment analysis was revealed 98% (1145/1167) homology between nucleotide sequences of pBX DWV VP1 VP3 (GenBank accession No. KP751410.1) and 5420 4618 of JX878305.1.

Deformed wing virus strain Korea-2, complete genome

Sequence ID: [gb|JX878305.1](#) Length: 10114 Number of Matches: 1

Range 1: 8756 to 9618		GenBank	Graphics	Next Match	Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1423 bits(770)	0.0	832/863(96%)	0/863(0%)	Plus/Plus	
Query 1	CAGTTAATGAGGAAAAAGGGAATAAAACCTCACACTATATTACGGGATTGTTTGAAGAT	60			
Sbjct 8756	CAGTTAATGAGGAAAAAGGGAATAAAACCTCACACTATATTACGGGATTGCTTGAAGAT	8815			
Query 61	ACTTGTTTGCCTGTGGAAAAATGTAGAATACCTGGTAAGACTAGAATATTTAGTATAAGT	120			
Sbjct 8816	ACTTGTTTGCCTGTGGAAAAATGTAGAATACCTGGTAAGACTAGAATATTTAGTATAAGT	8875			
Query 121	CCGGTACAGTTTACTATAACCGTTTAGACAGTATTACTTAGATTTTTATGGCATCCTATCGA	180			
Sbjct 8876	CCGGTACAGTTTACTATAACCGTTTAGACAGTATTACTTAGATTTTTATGGCATCCTATCGA	8935			
Query 181	GCTGCACGACTTAATGCTGAGCATGGCATTGGTATTGATGTTAACAGCTTAGAGTGGACA	240			
Sbjct 8936	GCTGCACGACTTAATGCTGAGCATGGTATTGGTATTGATGTTAACAGCTTAGAATGGACA	8995			
Query 241	AATTTGGCAACAAGTTTGTCTAAGTATGGCACTCACATCGTGACAGGAGACTATAAGAAAT	300			
Sbjct 8996	AATTTGGCAACAAGTTTGTCAAAGTACGGTACTCATATCGTGACGGGTGACTATAAGAAAT	9055			
Query 301	TTTGGTCTGGTTAGATTCTGATGTTGCAGCTTCAGCGTTCCGAAATTATTATCGACTGG	360			
Sbjct 9056	TTTGGTCTGGATTAGATTCTGATGTTGCAGCTTCGGCGTTCAAATTATTATCGACTGG	9115			
Query 361	GTATTACATTACACCGAAGAGATAATAAAGACGAAATGAAGCGAGTAATGTGGACCATG	420			
Sbjct 9116	GTATTACATTACTGAAGAGATAATAAAGACGAAATGAAGCGAGTAATGTGGACCATG	9175			
Query 421	GCOCAGAGATCTTAGCGCCTAGTCATCTGTGTGCGGATTTGGTGTACCGAGTACCTTGT	480			
Sbjct 9176	GCOCAGAGATCTTAGCGCCTAGTCATCTATGTGCGGATTTGGTGTACCGAGTACCTTGT	9235			
Query 481	GGAAATCCATCAGGTTCTCCGATAACGGACATTTTGAATACAATTTCAAATTGTCTGCTA	540			
Sbjct 9236	GGAAATCCATCAGGTTCTCCAATAACGGACATATTGAACACAATTTCAAATTGTTTGTTA	9295			
Query 541	ATTAGGTTAGCTTGGTTAGGTATTACTGATTTGCCGTTATCCGAGTTCTCTCAAATGTT	600			
Sbjct 9296	ATTAGGTTAGCTTGGTTAGGTATTACTGACTTGCCCTTTGTCCGAGTTCTCTCAAATGTT	9355			
Query 601	GTTCTTGTTTGGTTATGGTGATGATCTTATCATGAATGTTAGTGATAACATGATTGATAAA	660			
Sbjct 9356	GTTCTTGTTTGGTTATGGTGATGATCTTATCATGAATGTTAGTGATAACATGATTGATAAA	9415			
Query 661	TTTAATGCTGTGACAAATAGGAAAATTCTTTTCACAAATATAAGATGGAAATTTACGGATCAG	720			
Sbjct 9416	TTTAATGCTGTGACAAATAGGAAAATTCTTTTCACAAATATAAGATGGAAATTTACGGATCAG	9475			
Query 721	GACAAATCAGGAAATACTGTGAAGTGGCGGACOTTACAGACTGCTACTTTCTTAAAGCAT	780			
Sbjct 9476	GACAAATCAGGAAATACTGTGAAGTGGCGAAGCTTACAGACTGCTACTTTCTTGAAGCAT	9535			
Query 781	GGGTTTTTAAACATCCAACCTAGAACCTGTGTTTCTGGCTAACCTAGACAAGGTTTCGGTG	840			
Sbjct 9536	GGGTTTTTAAACATCCAACCTAGAACCTGTGTTTCTGGCTAACCTAGACAAGGTTTCGGTA	9595			
Query 841	GAAGGGACGACGAATTGGACTCA	863			
Sbjct 9596	GAAGGAACGACGAATTGGACTCA	9618			

Fig. 5. DNA sequence homology between JX878305.1 and pBX DWV RdRP. JX878305.1 is complete nucleotides of DWV deposited in GenBank. Alignment analysis was revealed 96% (832/863) homology between nucleotide sequences of pBX DWV RdRP (GenBank accession No. KP739937.1) and 8756 9618 of JX878305.1.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1530 bits(828)	0.0	828/828(100%)	0/828(0%)	Plus/Plus
Query 7472	ACTAAGCCTCAGGGATCAACACAACAAGTAGACGCTGCTGTGAATAAAATTTACAGAAAT	7531		
Sbjct 1	ACTAAGCCTCAGGGATCAACACAACAAGTAGACGCTGCTGTGAATAAAATTTACAGAAAT	60		
Query 7532	ATGGTCTACATTGGTGTGTTTTCCAAAAAGTGCTGGTAGTAAGTGCCGAGATATTAAT	7591		
Sbjct 61	ATGGTCTACATTGGTGTGTTTTCCAAAAAGTGCTGGTAGTAAGTGCCGAGATATTAAT	120		
Query 7592	TTTCGGTGTCTTATGCTCCATAAATAGGCAATGTTTGATGTTGAGGCATTATATTGAGTCA	7651		
Sbjct 121	TTTCGGTGTCTTATGCTCCATAAATAGGCAATGTTTGATGTTGAGGCATTATATTGAGTCA	180		
Query 7652	ACTGCTGCCTTTCCCGAGGGAAACCAAGTACTATTTTAAGTATATTCATAAATCAAGAGACT	7711		
Sbjct 181	ACTGCTGCCTTTCCCGAGGGAAACCAAGTACTATTTTAAGTATATTCATAAATCAAGAGACT	240		
Query 7712	AGAATGTCCGGTGATATTTCTGGTATTGAAATTGATTTGTTGAATTTACCTAGATTGTAT	7771		
Sbjct 241	AGAATGTCCGGTGATATTTCTGGTATTGAAATTGATTTGTTGAATTTACCTAGATTGTAT	300		
Query 7772	TATGGTGGTCTCGCGGGAGAGGAGTCAATTTGATAGCAATATCGTGCTTGTGACTATGCCT	7831		
Sbjct 301	TATGGTGGTCTCGCGGGAGAGGAGTCAATTTGATAGCAATATCGTGCTTGTGACTATGCCT	360		
Query 7832	AATCGTATTCCTGAGTGTAAAGAGCATTATTAATTTATAGCGTCACATAATGAACATATG	7891		
Sbjct 361	AATCGTATTCCTGAGTGTAAAGAGCATTATTAATTTATAGCGTCACATAATGAACATATG	420		
Query 7892	CGTGCTCAGAAATGATGGAGTGTTAGTAACTGGCGACCATACTCAGCTATTGGGTTTTGAG	7951		
Sbjct 421	CGTGCTCAGAAATGATGGAGTGTTAGTAACTGGCGACCATACTCAGCTATTGGGTTTTGAG	480		
Query 7952	AATAATAATAAACTCCAATAAGCATCAACGCTGATGGTTTGTATGAGGTTAACTTCAA	8011		
Sbjct 481	AATAATAATAAACTCCAATAAGCATCAACGCTGATGGTTTGTATGAGGTTAACTTCAA	540		
Query 8012	GGAGTATATACTTACCCATACCATGGCGATGGTGTGTTGTTGGTTCGATATTGTTGCTCCGG	8071		
Sbjct 541	GGAGTATATACTTACCCATACCATGGCGATGGTGTGTTGTTGGTTCGATATTGTTGCTCCGG	600		
Query 8072	AATTTGCAACGGCCAATTATAGGTATCCATGTTGCTGGTCTGAAGGATTGCATGGCTTT	8131		
Sbjct 601	AATTTGCAACGGCCAATTATAGGTATCCATGTTGCTGGTCTGAAGGATTGCATGGCTTT	660		
Query 8132	GGAGTTGCCGAACCACCTGTACATGAAATGTTCACTGGTAAAGCAATCGAGAGTGAAAGA	8191		
Sbjct 661	GGAGTTGCCGAACCACCTGTACATGAAATGTTCACTGGTAAAGCAATCGAGAGTGAAAGA	720		
Query 8192	GAGCCGATGACCGTGTGTATGAACTCCCGTTGCGTGAATTAGATGAATCTGATATTGGT	8251		
Sbjct 721	GAGCCGATGACCGTGTGTATGAACTCCCGTTGCGTGAATTAGATGAATCTGATATTGGT	780		
Query 8252	TTAGATACCGATTTATATCCGATTGGTAAAGTGGATGCAAAGCTAGCT	8299		
Sbjct 781	TTAGATACCGATTTATATCCGATTGGTAAAGTGGATGCAAAGCTAGCT	828		

Fig. 6. DNA sequence homology between JX878305.1 and pBX DWV polyC3G. JX878305.1 is complete nucleotides of DWV deposited in GenBank. Alignment analysis was revealed 100% (828/828) homology between nucleotide sequences of pBX DWV polyC3G and 7472-8299 of JX878305.1.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
577 bits(1487)	0.0	Compositional matrix adjust.	273/273(100%)	273/273(100%)	0/273(0%)
Query 622	LIVGYVPGLTASLQQQMDYMKLKSSSYVFDLQESNSFTFEVPVYSYRPWWWVKYGGNYL			681	
Sbjct 1	LIVGYVPGLTASLQQQMDYMKLKSSSYVFDLQESNSFTFEVPVYSYRPWWWVKYGGNYL			60	
Query 682	PSSTDAPSTLFMYVQVPLIPMEAVSDTIDINVVYRGGSSFEVCPVQPSLGLMINTDFIL			741	
Sbjct 61	PSSTDAPSTLFMYVQVPLIPMEAVSDTIDINVVYRGGSSFEVCPVQPSLGLMINTDFIL			120	
Query 742	RNDEEYRAKTGYAPYYAGVWHSFNNSNSLVFRWGSASDQIAQWPTISVPRGELAFRLIRD			801	
Sbjct 121	RNDEEYRAKTGYAPYYAGVWHSFNNSNSLVFRWGSASDQIAQWPTISVPRGELAFRLIRD			180	
Query 802	GKQAAVGTQFWRTMYYVWPSGHGYNIGIPTYNAERARQLAQHLVGGGSLTDEKAKQLFVPA			861	
Sbjct 181	GKQAAVGTQFWRTMYYVWPSGHGYNIGIPTYNAERARQLAQHLVGGGSLTDEKAKQLFVPA			240	
Query 862	NQQGGPKVSNGNPVWEVMRAPLATQRAHVQDFE			894	
Sbjct 241	NQQGGPKVSNGNPVWEVMRAPLATQRAHVQDFE			273	

Fig. 7. Amino acid sequence homology between JX878305.1 and pBX DWV VP1. The deduced amino acid sequences based on pBX DWV VP1 (GenBank accession No. KP739938.1) was aligned with the deduced amino acid sequences on 2993 3810 of JX878305.1 The homology between both amino acid sequences was calculated as 100% (273/273).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
816 bits(2108)	0.0	Compositional matrix adjust.	388/389(99%)	388/389(99%)	0/389(0%)
Query 775	GSASDQIAQWPTISVPRGELAFRLIRDGKQAAVGTQFWRTMYYVWPSGHGYNIGIPTYNAE			834	
Sbjct 4	GSASDQIAQWPTISVPRGELAFRLIRDGKQAAVGTQFWRTMYYVWPSGHGYNIGIPTYNAE			63	
Query 835	RARQLAQHLVGGGSLTDEKAKQLFVPAHQGGPKVSNGNPVWEVMRAPLATQRAHVQDFE			894	
Sbjct 64	RARQLAQHLVGGGSLTDEKAKQLFVPAHQGGPKVSNGNPVWEVMRAPLATQRAHVQDFE			123	
Query 895	FIEAIPGEEESRNTTILDTTTTLQSSGFGRAFFGEAFNDLKTLMRRYQLYGQLLSVTTD			954	
Sbjct 124	FIEAIPGEEESRNTTILDTTTTLQSSGFGRAFFGEAFNDLKTLMRRYQLYGQLLSVTTD			183	
Query 955	KIDHCFMFTFPCLPQGLALDIGSAGSPHEIFNRCRDGIPLIASGYRFYRGDLRYKIVFP			1014	
Sbjct 184	KIDHCFMFTFPCLPQGLALDIGSAGSPHEIFNRCRDGIPLIASGYRFYRGDLRYKIVFP			243	
Query 1015	SNVNSNIWQHRPDRRLEGWSAAKIVNCDAVSTGGQWYNHGYASHIQITRVNNVIELEVP			1074	
Sbjct 244	SNVNSNIWQHRPDRRLEGWSAAKIVNCDAVSTGGQWYNHGYASHIQITRVNNVIELEVP			303	
Query 1075	FYNATCYNVLQAFNASSAASSYAVSLGEISVGFQATSDDIASIVNKPVTIYYSIGDGMQF			1134	
Sbjct 304	FYNATCYNVLQAFNASSAASSYAVSLGEISVGFQATSDDIASIVNKPVTIYYSIGDGMQF			363	
Query 1135	SQWVGYQPMILDQLPAPVVRAYPEGPIA			1163	
Sbjct 364	SQWVGYQPMILDQLPAPVVRAYPEGPIA			392	

Fig. 8. Amino acid sequence homology between JX878305.1 and pBX DWV VP1 VP3. The deduced amino acid sequences based on pBX DWV VP1 VP3 (GenBank accession No. KP751410.1) was aligned with the deduced amino acid sequences on 5420 4618 of JX878305.1 The homology between both amino acid sequences was calculated as 99% (388/389).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
603 bits(1554)	0.0	Compositional matrix adjust.	286/287(99%)	287/287(100%)	0/287(0%)
Query 2543	QLMRKKGIKPHTIFDCLKDOTCLPVEKCRIPGKTRIFSISPVQFTIPFRQVYLDVFMSYR			2602	
Sbjct 1	QLMRKKGIKPHTIFDCLKDOTCLPVEKCRIPGKTRIFSISPVQFTIPFRQVYLDVFMSYR			60	
Query 2603	AARLNAEHGIGIDVNSLEWITNLATSLSKYVGTHTVTDGVKNFGPGLDSDVAASAFKIIIDW			2662	
Sbjct 61	AARLNAEHGIGIDVNSLEWITNLATSLSKYVGTHTVTDGVKNFGPGLDSDVAASAF+IIIDW			120	
Query 2663	VLHYTEEDNKDEMRYMWTMAQEILAPSHLCRDLVYRVPCGIPSGSPI TDILNTISNCLL			2722	
Sbjct 121	VLHYTEEDNKDEMRYMWTMAQEILAPSHLCRDLVYRVPCGIPSGSPI TDILNTISNCLL			180	
Query 2723	IRLAWLGI TDLPSEFSQNVYLVYVGGDLIMNVSDNMI DKFNAVYIGKFFSQVKMEFTDQ			2782	
Sbjct 181	IRLAWLGI TDLPSEFSQNVYLVYVGGDLIMNVSDNMI DKFNAVYIGKFFSQVKMEFTDQ			240	
Query 2783	DKSGNTYKWRITLQATFLKHGFLKHPTRPVFLANLDKYSVEGTTNWT		2829		
Sbjct 241	DKSGNTYKWRITLQATFLKHGFLKHPTRPVFLANLDKYSVEGTTNWT		287		

Fig. 9. Amino acid sequence homology between JX878305.1 and pBX DWV RdRP clone. The deduced amino acid sequences based on pBX DWV RdRP (GenBank accession No. KP739937.1) was aligned with the deduced amino acid sequences on 8756 9618 of JX878305.1. The homology between both amino acid sequences was calculated as 99% (286/287).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
574 bits(1479)	0.0	Compositional matrix adjust.	273/276(99%)	274/276(99%)	0/276(0%)
Query 2115	TKPQGSTQQVDAAYNKILQNMVYIGVVFPKVPVGSKWFDINFRCLMLHNRQCLMLRHYIES			2174	
Sbjct 1	TKPQGSTQQVDAAYNKILQNMVYIGVVFPKVPVGS+WDINFRCLMLHNRQCLMLRHYIES			60	
Query 2175	TAAFPEGTKYVFKYIHNQETRMSSGDISGIEIDLLNLPRLVYGGLAGEESEFDSNIVLVTMP			2234	
Sbjct 61	TAAFPEGTKYVFKYIHNQETRMSSGDISGIEIDLLNLPRLVYGGLAGEESEFDSNIVLVTMP			120	
Query 2235	NRIPPECKSIKFIASHNEHMRAQNDGVLVYTGHTQLLGFENNKTPISINADGLVEYILQ			2294	
Sbjct 121	NRIPPECKSIKFIASHNEHMRAQNDGVLVYTGHTQLLGFENNKTPISINADGLVEYILQ			180	
Query 2295	GYYTYPYHGDGVCVGSILLSRNLQRP IIGIHVAGPEGLHGFVGAEPVHEMFTGKAIESER			2354	
Sbjct 181	GYYTYPYHGDGVCVGSILLSRNLQRP IIGIHVAG EQLHGFVGAEPVHEMFTGKAIESER			240	
Query 2355	EPYDRVVELPLRELDSDIGLDTDLYPIGKVDKLA		2390		
Sbjct 241	EPYDRVVELPLRELDSDIGLDTDLYPIGKVDKLA		276		

Fig. 10. Amino acid sequence homology between JX878305.1 and pBX DWV polyC3G clone. The deduced amino acid sequences based on pBX DWV polyC3G was aligned with the deduced amino acid sequences on 7472 8299 of JX878305.1. The homology between both amino acid sequences was calculated as 99% (273/276).

DWV 재조합 단백질들의 발현 확인

재조합 DNA의 염기서열들과 DWV의 각 유전자간 상동성 여부를 확인 한 후, 4개 유전자들을 각기 발현

vector system인 pET32a(+) 및 pMAL-C2에 subcloning을 하여 각 재조합 단백질들을 대장균 내에서 과발현시키고자 하였다. 과발현이 확인된 재조합체는 5종이었으며, 이들은 각기 DNA 재조합 프로그램 (pDRAW32)을 사용하여 예측한 재조합 단백질의 예

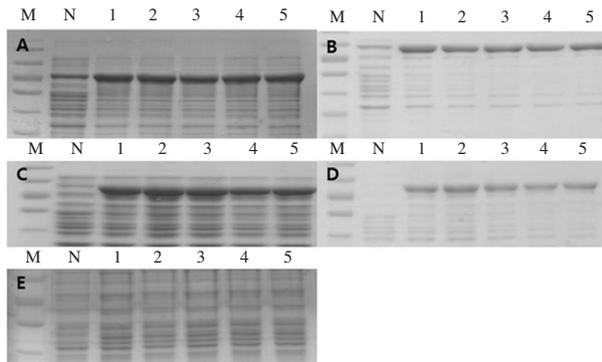


Fig. 11. Expression of DWV proteins depends on IPTG concentration. All recombinant DNA in *E. coli* BL21 was cultured until OD600 reach to 0.6 and induced by IPTG to express recombinant DWV proteins. Bacterial cell was collected at 6 hours after induction, respectively. Panel A. pMAL DWV VP1, Panel B. pMAL DWV VP1 VP3, Panel C. pMAL DWV RdRp, Panel D. pMAL DWV polyC3G, and Panel E. pET32a DWV polyC3G. Lane M was protein size marker (T&I). Lane N were cultures without IPTG induction. Lanes 1 to 5 were induced culture with 0.1, 0.3, 0.6, 1.0 and 2 mM of IPTG, final concentration, respectively.

상 크기인 pMAL-DWV-VP1, 75kDa; pMAL-DWV-VP1-VP3, 93kDa; pMAL-DWV-polyC3G, 81kDa; pMAL-DWV-RdRp, 81kDa; pET32a-DWV-polyC3G, 50kDa에 근접한 과발현 단백질 밴드를 보여주었다 (Fig. 11).

발현유도를 위한 최적 IPTG농도들은 모든 발현계에서 0.1~0.3mM에 나타났으며, 본 연구에서 사용한 유전자들(DWV-VP1, -VP1-VP3, RdRp, C3G)은 거의 모든 경우에서 pMAL vector에 의한 MBP와 융합단백질을 이루어 과발현됨을 보여 주었다. 한편, pET vector에 의하여 C3G의 발현이 확인되었을 뿐 나머지 재조합체에 의한 과발현은 발견되지 않았다(Fig. 11E).

DWV 단백질의 정제

pET32a-DWV-polyC3G은 Ni²⁺ column을 사용하여 정제를 진행하였으며, pMAL-DWV-VP1, pMAL-DWV-VP1-VP3, pMAL-DWV-RdRp pMAL-DWV-polyC3G의 경우에는 MBP column을 사용하여 재조합 단백질을 각기 순수분리하였다. 재조합 단백질의 순수분리 후 정제된 단백질은 12% SDS-PAGE를 사용하여 결과

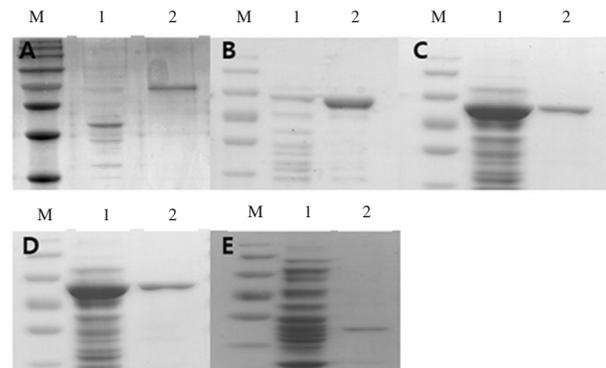


Fig. 12. The purifications of recombinant DWV proteins. Panel A. pMAL DWV VP1, Panel B. pMAL DWV VP1 VP3, Panel C. pMAL DWV RdRp, Panel D. pMAL DWV polyC3G, Panel E. pET32a DWV polyC3G. Lane M in each panel was protein size marker (T&I). Lane 1 of each panel were total proteins from each culture induced IPTG, lane 2 of each panel were affinity column purified recombinant proteins from each culture.

를 재확인하였다(Fig. 12).

이후 Bradford assay를 통하여 각 정제된 단백질들을 정량하였으며, 그 결과 pMAL-DWV-VP1, pMAL-DWV-VP1-VP3, pMAL-DWV-polyC3G, pMAL-DWV-RdRp, pET32a-DWV-polyC3G의 단백질량은 각각 2.71mg/ml(total 8.13mg of recombinant protein/125ml culture), 4.71mg/ml(total 14.13mg of recombinant protein/125ml culture), 2.07mg/ml(total 6.21mg of recombinant protein/125ml culture), 2.57mg/ml(total 7.71mg of recombinant protein/125ml culture), 1.04mg/ml(total 3.12mg of recombinant protein/125ml culture)로 나타났다.

DWV(Deformed Wing Virus)는 날개불구병이라는 이름으로 국내에도 널리 알려진 바이러스이며, 2013년 꿀벌질병관리센터(Center for Honeybee disease control)의 조사에 의하면 국내 꿀벌의 바이러스 질병 중 3번째로 많이 발견되는 바이러스이다(Yoo *et al.*, 2014).

국내의 꿀벌 질병 중 DWV를 포함한 꿀벌 바이러스에 관한 연구는, 병원체의 분자적 검출에 크게 집중되어 있고, 그것도 실험실적 유전자 진단에 초점이 맞추어져 있다고 판단된다. 바이러스 질병을 보다 근본적으로 극복하기 위하여 바이러스에 관한 연구, 즉 바이러스의 특정 단백질들의 특성연구 또는 바이러스

의 감염 및 전파에서 바이러스의 각 단백질들의 기능 등에 대한 연구는 불가결할 것이라 생각되나, 국내에서는 이러한 연구들이 미진하다.

본 연구는 DWV의 각 개별 단백질에 대한 연구를 위하여, 대표적 구조단백질인 VP1, VP3와 대표적 비구조단백질이며, 바이러스의 생존에 불가결한 RdRP, C3G를 재조합 DNA방법을 통한 재조합 단백질들로 생산하고자 하였으며, 이는 바로 개별 단백질의 연구를 위하여 연구재료를 생산하고자 하는 것이었다.

본 연구를 통하여 재조합 단백질로 생산된 RdRP(RNA dependent RNA polymerase)는 DWV 유전체를 복제하는 기능의 중요 단백질 효소이나, 이 단백질의 기능에 대한 납득할 만한 가설, 즉 어떻게, 어디서부터, positive-RNA(유전체)를 주형으로 negative RNA(복제형)를 만들고, 또한 negative RNA(복제형)로부터 positive RNA(유전체)를 대량 생산할 수 있는가는 성립되지도 않고 있다.

근래 RdRP는 식물체에서도 발견되어, 식물체의 바이러스 침입 등에 대한 방어 작용인 RNA 간섭(interference; RNAi) 현상에 관여하는 것으로 관심을 모으고 있으며, 국내에 큰 영향을 미친 바 있는 구제역 바이러스(FMDV; Foot-and-Mouth Disease Virus)와 메르스를 유발하는 코로나 바이러스(MERS-CoV; Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) 등도 동일 기능의 RdRP유전자를 가지고 있어, 이 기능에 의하여 바이러스의 자체 복제가 진행된다. 이런 바이러스의 생존에 불가결한 효소들은 항 바이러스제 발굴을 위한 효소저해제 개발에 매우 좋은 대상이 된다. 따라서 본 연구에서 개발된 DWV-RdRP의 생산법은 이 효소를 이용한 저해제 발굴 및 항바이러스제의 개발과 인체에 무해한 꿀벌바이러스에서 유래한 이 RdRP 단백질은 바이러스 연구에 있어서 많은 장점을 보여줄 것으로 기대한다. 또한, 본 연구를 통하여 재조합 단백질로 생산된 C3G(C3G peptidase)는 polyprotein의 형태로 1차 생산된 DWV의 단백질체를 개별 단백질들로 절단, 분리, 활성화시키는 단백질 절단효소이다. 이 역시 DWV의 생존에 불가결한 기능을 수행하여야 하며, 그 절단부위 및 특성에 관한 연구는 새로운 항바이러스제 개발을 위한 신약개발과

정에서 시급히 요구된다.

한편, 본 연구를 통하여 재조합 단백질로 생산된 구조단백질 VP1 및 VP3은 바이러스의 외피를 구성하는 주요 단백질들로, 고등동물의 방어기작인 항원/항체반응에서, 일반적으로 우수한 항원결정기(epitope)로 기능한다. 현재의 꿀벌바이러스의 연구에서 꿀벌 바이러스의 보다 쉬운 현장 검사를 위한 immunochromatography법의 개발은 매우 시급히 요구되는 것이며, 이를 위한 우수한 항원과 항체의 개발은 선결과제라 판단된다. 본 연구에서 개발된 구조단백질 VP1 및 VP3의 대량생산법은 이런 기대에 부응하는 것이라 판단되며, 이들을 이용한 특이항체의 개발이 바로 이어지기를 기대한다.

감사의 글

본 연구는 2014학년도 경기대학교 학술연구비(일반연구과제) 지원에 의하여 수행되었음.

인용문헌

- Anderson, D. L. and J. W. H. Trueman. 2002. *Varroa jacobsoni* (Acari:Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.* 24: 165-189.
- Bailey, L. and B. V. Ball. 1991. *Honey bee pathology*, 2nd ed. Academic Press, London, England.
- Ball, B. V. and M. F. Allen. 1988. The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Ann. Appl. Biol.* 113: 237-244.
- Ball, B. V. 1989. *Varroa jacobsoni* as a virus vector. In: Cavalloro, R. (Ed.), *Present Status of Varroa tosis in Europe and Progress in the Varroa Mite Control*. OYce for OYcial Publications of the European Communities, Luxembourg pp. 241-244.
- Lee, H. M., D. B. Lee, S. H. Han, M. L. Lee, Y. K. Lim, B. S. Yoon. 2005. Identification of Deformed Wing Virus from the Honeybee in Korea and Establishment of PCR Detection Method. *J. Apicul.* 20: 85-94.
- Lim, H. Y. 2013. Development of Novel Rapid Detection Method for Deformed Wing Virus (DWV) using Ultra Fast High Performance PCR (UF HP PCR). *J. Apicul.* 28: 237-244.
- Lim, H. Y., B. S. Yoon. 2013. Rapid and Sensitive detection of

Deformed Wing Virus (DWV) in Honeybee using Ultra rapid Real time PCR. J. Apicul 28: 121-129.

No, J. N., Nguyen Van Phu, M. S. Yoo, Y. H. Park, B. S. Yoon. 2010. Simple and Rapid Method for Detection of Deformed Wing Virus (DWV) by Loop mediated Isothermal Amplification (LAMP). J. Apicul. 25: 211-216.

Yoo, M. S., Y. H. Kim, N. H. Kim, H. N. Jung, Thi B., Reddy K., S. C. Jung, S. W. Kang. 2014. Molecular Detection of Honeybee Disease in *Apis mellifera* and *Apis cerana* in Korean apiaries, 2013. The 29th Conference of the Apicultural Society of Korea, 2013, page 66.