

초파리 S2 세포 시스템에서 녹색형광단백질 생산을 위한 재조합 배큘로바이러스의 감염조건들의 영향

조혜숙 · 김연규 · 김경로 · 차형준[†]

포항공과대학교 화학공학과, 분자생명과학부
790-784 경북 포항시 남구 효자동 산31
(2005년 11월 21일 접수, 2005년 12월 23일 채택)

Effects of Recombinant Baculovirus Infection Conditions on Production of Green Fluorescent Protein in *Drosophila* S2 Cells

Hye Sook Cho, Yeon Kyu Kim, Kyoung Ro Kim and Hyung Joon Cha[†]

Division of Molecular and Life Sciences & Department of Chemical Engineering, Pohang University of Science and Technology,
San 31, Hyoja-dong, Nam-gu, Pohang 790-784, Korea
(Received 21 November 2005; accepted 23 December 2005)

요 약

원하는 유전자를 배큘로바이러스의 감염에 의하여 초파리 *Drosophila melanogaster* S2 세포에 도입하는 배큘로바이러스/S2 세포 발현 시스템은 강력하고 안전한 배큘로바이러스의 장점과 세포가 파괴되지 않는 S2 세포의 장점을 접목한 시스템이다. 본 연구에서는 외래 목적 단백질로 발현 모니터링이 손쉬운 녹색형광단백질(green fluorescent protein)을 발현시키는 재조합 배큘로바이러스를 이용하여 S2 세포에의 감염조건들에 대한 영향 연구를 수행하였다. 재조합 배큘로바이러스의 S2 세포에의 감염조건으로는 multiplicity of infection(MOI), 초기 세포 수, 배큘로바이러스 용액이 세포를 적시는 최소 부피, 배큘로바이러스를 첨가한 후 제거하기까지의 배양시간 그리고 배큘로바이러스 제거 후 S2 세포를 혈청이 존재하는 배지에서 키우는 배양시간을 선정하였다. MOI는 일반적으로 크게 하는 것이 높은 발현 수율을 위하여 좋은 결과를 보였으나 세포배양이 길어지는 경우 세포독성의 문제가 심각해 질 수 있고 실제적인 배양에서는 높은 MOI를 유지하는 것이 불가능하므로 사용하는 100 mm 배양접시에서 배큘로바이러스와 S2 세포가 접촉하는 동안의 변수들인 MOI를 적정의 값인 30으로, 배큘로바이러스 배양 시간을 1.5 시간으로 고정함으로써 배큘로바이러스가 숙주 세포인 S2에 대해 미치는 세포독성을 낮출 수 있었다. 또한, 배큘로바이러스 최소 부피는 배양접시에서 사용 부피의 2.4%에서 가장 좋은 결과를 보였으며 배큘로바이러스 용액을 10배 농축시킴으로써 이 부피를 맞추기 위해 첨가시키는 새로운 배지의 비율을 높임으로써 결과적으로 배큘로바이러스에 의한 세포독성을 줄일 수 있었다. 이를 통하여 세포 파쇄 및 배양접시 표면에서 탈착되는 것을 막고 높은 생장 상태를 유지해서 감염 효율도 높일 수 있었다. 배큘로바이러스의 감염이 끝난 후의 관여하는 변수들인 감염 후 배양시간은 24시간에서 최대의 녹색형광단백질의 발현을 나타내었다.

Abstract – The baculovirus-insect *Drosophila melanogaster* S2 cell system combines advantages of conventional baculovirus system and non-lytic S2 cell system because baculoviruses can infect non-permissive cells such as mammalian and *Drosophila* S2 cells but cannot replicate themselves inside the cells. In the present work, we investigated effects of infection conditions on production of green fluorescent protein (GFP) as a target protein using this baculovirus-S2 cell system. Even though higher MOI and longer baculovirus contact time showed better GFP expression yield during the shorter period, overall protein yield could be lower during the longer period due to the relatively higher cell detachment and lysis (lower cell viability). In addition, maintaining high MOI will be not practical for large-scale cell culture. Therefore, instead of maintaining high MOI, we found that high initial cell number and concentrated (10X) baculovirus volume can confer comparable protein expression even under the moderate MOI condition. Also, we found that the post-infection time that is connected to state of cells after infection was an important factor for production yield.

Key words: Baculovirus, *Drosophila* S2 Cells, Infection, Condition, Green Fluorescent Protein

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: hjcha@postech.ac.kr

1. 서 론

초파리 *Drosophila melanogaster* Schneider line 2(S2) 세포주는 플라스미드를 이용하여 숙주 세포의 파쇄를 일으키지 않고 안정적으로 형질 전환된 시스템을 구축할 수 있도록 개발되어 왔다[1-3]. 초파리 세포의 장점은 단 한 번의 형질전환으로 발현 카세트 1,000개 정도까지 이를 수 있는 능력, 높은 수준의 외래 유전자 발현을 위하여 안정적인 세포주를 구축할 때 플라스미드 증폭과 세포 클론의 선별에 오랜 시간이 걸리지 않는다는 점을 들 수 있다. 그러나 포유 동물세포와는 반대로 높은 복제 수에도 유도물질이 없을 때 낮은 수준의 기본 발현을 유지하면서 발현이 잘 조절된다는 점이 가장 중요하다[3]. 그러므로 S2 세포 시스템은 여러 가지 외래의 진핵 유전자 생산물의 효율적인 발현과 분비에 적합하다고 할 수 있다[4-6]. 그러나 S2 세포 시스템의 장점들에도, 다양한 유형의 외래 단백질들을 동시에 안정적으로 발현시키는 것은 발현백체의 크기 제한으로 인해 그리 간단한 문제는 아니다. 큰 외래 유전자를 가진 백체의 구축은 유전자적인 불안정성으로 인해 어렵기 때문이다[7]. 그리고 다중발현백체의 동시 형질전환을 사용할 수 있다고 하더라도, 이 방법은 *neo*(항생제 G418에 대한 내성 유전자)와 *hph*(Hygromycin B에 대한 내성 유전자) 같은 추가적인 선별 마커가 필요하고 이러한 마커들을 연속적으로 발현함에 따라 숙주 세포에 적지 않은 대사의 부담을 유발하게 된다[8]. 또한, 목적 단백질의 발현 조절이 안정하게 형질 전환된 세포주에서는 쉽지가 않다[9].

배콜로바이러스는 *Spodoptera frugiperda*와 *Trichoplusia ni* 같은 곤충류의 세포에서의 외래 단백질 발현에 널리 이용되어 왔다[10-12]. 재조합 배콜로바이러스들은 위와 같은 곤충 세포주를 감염시킬 수 있고 외래 단백질의 발현을 촉진할 수 있다. 또한, 동시감염 전략을 사용하여 서로 다른 수준에서의 다중 외래 단백질의 발현이 가능하고, 목적 단백질이 세 개까지도 동시 발현된 것으로 보고된 바 있다[13, 14]. 그러나 이러한 배콜로바이러스 시스템은 세포를 파괴하기 때문에 단백질 분해효소를 포함한 세포 단백질들이 목적단백질들의 심각한 오염을 가져올 수 있어서 진정한 분비 시스템이라고는 볼 수 없다.

포유세포나 초파리세포에서 배콜로바이러스 감염은 바이러스가 유전체 내에 삽입이 되더라도 바이러스 복제가 제대로 일어나지 않으므로 유전자의 발현이 제대로 이루어지지 않는다[15, 16]. 실제로 배콜로바이러스의 polyhedrin 프로모터는 초파리 세포에서 효과적으로 전사되지 않는 것으로 알려졌다[15]. 하지만, Rous 육종 바이러스의 긴 말단 반복 프로모터를 포함하는 수정된 배콜로바이러스는 chloramphenicol acetyltransferase 유전자를 발현할 수 있었다[15]. 또한, 수정된 배콜로바이러스가 포함된 초파리 세포주에서 metallothionein 혹은 heat shock 프로모터와 같이 초파리에서 유래한 프로모터에 의한 발현들은 배콜로바이러스 프로모터에 의해 발현되는 것보다 높은 것으로 보고되었다[16, 17]. 이런 접근의 장점은 배콜로바이러스 감염이 세포를 파괴하지 않아, 결과적으로 목적 단백질의 진정한 분비가 이루어진다. 게다가, 배콜로바이러스들은 다중의 외래 유전자들을 S2 세포로 전달할 수 있을 것이고, 결과적으로 감염전략들(동시, 우세 또는 연속 감염)에 따라 여러 목적 단백질들의 다중발현이 동시에 또는 연속적으로 일어날 수 있다[17]. 더욱이, 목적 단백질의 조절은 재조합 배콜로바이러스들의 감염량을 변화시킴으로써 가능하다.

본 연구에서는 재조합 플라스미드를 이용하여 초파리 S2 세포에서 외래 단백질을 발현하기 위한 여러 가지의 감염조건들의 영향에 대하여 조사하였다. 감염 유도된 외래 단백질은 해파리 *Aequorea victoria*에서 유래한 녹색형광단백질(green fluorescent protein; GFP)이었다. 이 녹색형광단백질은 실시간으로 살아 있는 세포에서 어떤 기질이나 보조 인자, 효소 등이 필요 없이 자체적으로 손쉽게 관찰이 가능하므로 발현 측정에 널리 사용되고 있다[11, 12].

2. 실험 및 방법

2-1. 재조합 배콜로바이러스

황산구리(copper sulfate)에 의해 활성이 유도되는 metallothionein 프로모터를 이용하여 녹색형광단백질을 S2 세포에서 발현시킬 수 있는 재조합 배콜로바이러스 vMT-GFP[18]를 사용하였으며 이 배콜로바이러스의 titer는 3.57×10^8 pfu ml⁻¹ 이었다.

2-2. 세포배양 및 재조합 배콜로바이러스 감염

S2 세포들은 vMT-GFP 재조합 배콜로바이러스로 감염하여 녹색형광단백질의 발현을 시도하였다. 세포배양은 6-well plate, 60 mm 배양접시 또는 100 mm 배양접시에서 수행하였으며 10% IMS와 300 µg ml⁻¹ hygromycin B(Sigma)를 포함한 4 ml M3 배지에서 세포를 $1.6 \sim 18 \times 10^6$ cells ml⁻¹이 될 때까지 키웠다. 배양 배지는 MOI 실험 동안 1~2,000의 MOI를 가지는 vMT-GFP 바이러스 용액의 부피를 포함하는 새로운 배지로 후에 대체한 후 27 °C에서 흔들며 주면서 1~24시간 동안 배양하였다. 배콜로바이러스를 포함하는 배지는 후에 새로운 배지로 대체하였다. 감염된 S2 세포들로부터 녹색형광단백질을 생산하기 위하여 최종 농도가 500 µM가 되게 황산구리로 유도하였다.

2-3. 세포 수, 세포활성 및 녹색형광단백질 정량 방법

각 샘플로부터 hemacytometer(Fisher Scientific)를 사용하여 세포 수를 세었고, 세포 생존도는 trypan blue(Sigma)를 부피비 0.4% 정도로 염색하여 결정하였다. 녹색형광단백질의 양은 대장균으로부터 분리정제한 재조합 녹색형광단백질(Clontech)을 Western blots을 측정 기준으로 삼아 결정하였다.

녹색형광단백질은 세포 배지 외부로 분비되기 때문에, 배양 샘플들을 5,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 세포 부분과 배지 부분을 분리한다. 배지 부분을 SDS sample buffer(10% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% β-mercaptanol, 0.3 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.05% bromophenol blue, 50% glycerol)과 섞어서, 5분 동안 끓이고 12.5% SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동(SDS-PAGE)을 통하여 분리하였고, 이어서 전기영동적으로 Hybond™-PVDF 막(Amersham Pharmacia)으로 옮겼다. 5% 탈지분유를 포함한 TBS buffer(20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5)에서 1시간 동안 반응을 중지한 후, 이 막을 토끼 유래의 항-녹색형광단백질 항체(1:1000 부피비; Santa Cruz Biotechnology)와 표식자로 alkaline phosphatase가 결합한 염소 유래의 항-토끼 단일 클론 항체(1:1000 부피비; Sigma)를 포함하는 항체 용액(1% 탈지분유를 TTBS (TBS with 0.05% Tween-20)에 녹인 용액)에 넣어 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. TTBS와 TBS로 연속적인 세척을 한 후, 검출하기 위해 alkaline

phosphatase의 기질(fast red tr/naphthol as-mx tablet sets; Sigma)을 첨가하였고 증류수로 반응을 중지하였다. 검출된 막은 스캔을 한 후, 디지털 사진을 찍어 보관하였으며, Gel-Pro Analyzer 소프트웨어(Media Cybernetics)로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. MOI가 녹색형광단백질 발현에 미치는 영향

배콜로바이러스를 이용한 발현시스템에서 MOI는 제약을 주는 대표적인 인자이다. 배콜로바이러스/곤충세포(Sf9 또는 Hi-five) 시스템은 본질적으로 불연속적인 1회 적인 생산 시스템이기 때문에, 일반적으로 효율적인 감염을 위해 적절한 MOI를 갖는 재조합 배콜로바이러스를 첨가하기 전에 곤충세포들은 최적의 세포 농도까지 자라야 한다. 그러나 알 수 없는 이유로 인해 너무 높은 세포 농도는 감염 효율에 부정적인 영향을 미치기 때문에, 세포 농도는 대개 세포 농도의 최대 가능 값보다는 낮아야 한다[19]. Sf-9과 같은 복제허용 곤충세포에서 일반적으로 배콜로바이러스 MOI는 0.01~50의 범위를 갖는데 일반적으로 3~10을 선택한 MOI에서 재조합 단백질의 좋은 발현이 보고되고 있다. 그러나 초파리 S2 세포나 포유류 세포들과 같은 배콜로바이러스 복제불허 세포들은 높은 MOI를 사용해야 한다. 이는 이러한 세포들에 배콜로바이러스를 감염시키는 것이 복제허용 세포들보다 낮은 감염 효율을 보이기 때문이다[20]. 세포주, 배지, 세포 농도(또는 감염 시간), MOI 그리고 최종 단백질의 발현 수율과 질 사이에는 밀접한 상호관계가 있는 것처럼 보여서 때때로 다른 조건들이 유사한 결과들을 도출할 수도 있다[21].

본 연구에서는 더욱 큰 값의 MOI를 조사하였고 Western blot 분석을 통하여 이러한 결과를 확인하였다(Fig. 1). 6-well plate에서 MOI를 2,000까지 증가시킬 때까지도 녹색형광단백질의 발현은 포화되지 않았다. 발현의 포화가 되지 않은 결과는 *Drosophila* S2 세포에 의한 배콜로바이러스 입자들의 비특이적인 유입을 강하게 연상시키는 반증이라고 볼 수 있다. 이런 현상은 또한 포유류 세포에서도 관찰되었는데, 감염속도를 8시간 동안 살펴 본 결과, 형질 도입 속도는 800까지 불포화였다[22]. 또한, 바이러스의 양을 증가시키면서 포유류 세포들을 감염시킨 경우 β -galactosidase가 더 많이 생산되었다.

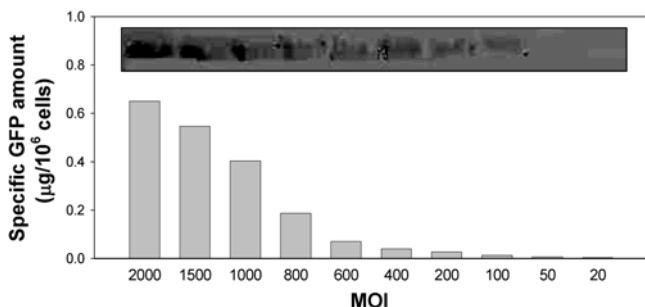


Fig. 1. Effects of MOI on GFP production in vMT-GFP baculovirus/S2 cells. Inner picture is GFP bands from Western blot analysis. Initial cell number was 0.03×10^6 cells mL^{-1} in 6-well plate, baculovirus incubation time was 1.5 h, post-infection time was 24 h, and post-induction time was 42 h.

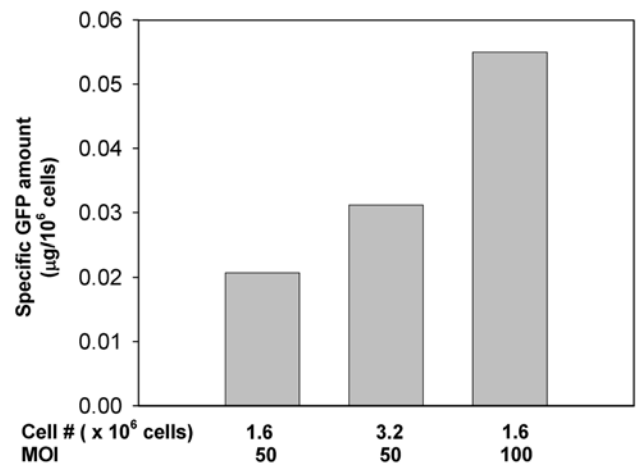


Fig. 2. Effects of MOI and initial cell number on GFP production in vMT-GFP baculovirus/S2 cells. Incubation time was 1.5 h, post-infection time was 24 h, and post-induction time was 42 h. Comparison of specific GFP expression for 60 mm dish culture.

3-2. MOI와 초기 세포 수와의 관계

커다란 MOI에 의하여 목적 단백질의 발현을 증대시킬 수 있겠지만 더욱 큰 규모의 배양에서는 더욱 큰 부피의 배콜로바이러스가 필요하며 이는 실제 배양에서의 커다란 제한점이 될 수 있다. 그러므로 MOI와 초기 세포 수와의 관계들을 알고 난 후에 적절한 배콜로바이러스 첨가 부피 양을 고려하는 것이 타당하다. 목적 단백질의 발현은 초기 세포 수의 증가시 1.7~2배 정도 더 많은 단백질 발현을 보인다는 것을 Western blot 분석을 통하여 알아볼 수 있었다(Fig. 2). 이런 패턴은 세포 배양 규모가 60 mm 또는 100 mm 배양 접시의 규모에 상관없다는 결과를 보여주었다(data not shown). 즉, MOI가 낮더라도 높은 세포 수에서는 목적 단백질의 많은 발현이 가능할 수 있다.

앞의 Fig. 1에서 알 수 있듯이, 단백질 발현은 세포 수와 관계없이 MOI에 포화되지 않았다. 그럼에도, MOI와 세포 수는 외래 단백질 생산의 중요한 변수들이며, 제한 없는 MOI의 증가는 세포 독성에 심각한 문제를 야기할 수 있다. 그러므로 특히 세포 생존도를 고려하여 적절한 MOI 조건을 조사하여야 한다.

3-3. 배콜로바이러스 용액 첨가 부피 비가 녹색형광단백질 생산에 미치는 영향

전체 배양접시 부피에서 바이러스가 차지하는 부피의 퍼센트 정의는 전체 배양접시의 절반인 반응 부피에 대한 배지와 혼합된 바이러스 부피의 비율이다. 즉, 이 비율은 얼마나 많은 바이러스가 배양접시 표면에 결합하는지를 보여 줄 수 있다. 이것은 같은 MOI 일지라도 농축된 배콜로바이러스를 소량으로 사용하여 생산에 더욱 좋은 영향을 준다는 것을 보여주었다(Fig. 3(a)). 세포 수와 생존도 또한 원래의 배콜로바이러스를 사용하는 것보다 농축된 배콜로바이러스를 사용하는 것이 더 높았다(Fig. 3(b)). 배콜로바이러스들은 본질적으로 세포를 파괴하는 감염 시스템이다. Sf9 세포에서 배콜로바이러스를 회수할 때, 큰 비율의 숙주 세포들이 용해되어 분해 효소들을 방출한다. 세포 독성은 이런 효소들에 의해 야기된다고 볼 수 있다. 앞의 연구결과에서는 100 mm 세포 배양접시의 반응 부피

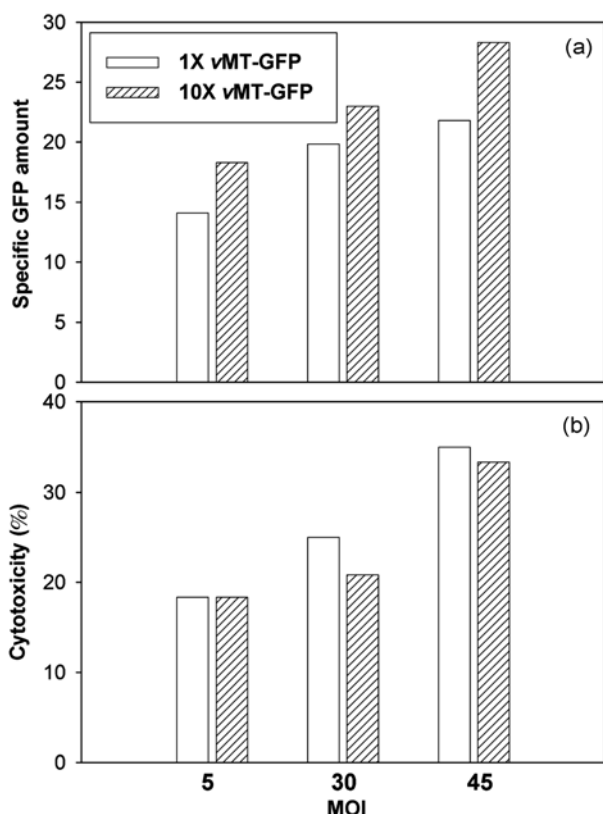


Fig. 3. Comparison of 10X concentrated and original vMT-GFP baculovirus stocks in wild type *Drosophila* S2 cells. (a) Specific GFP amount and (b) cytotoxicity. Incubation time was 1.5 h, post-infection time was 24 h, and post-induction time was 42 h for 100 mm dish culture.

에서 전체 바이러스 부피가 2.4%인 경우에 최적의 배콜로바이러스 감염 조건들을 얻었다. 100 mm 세포 배양접시에서의 2.4% 반응 부피는 감염에 필요한 배콜로바이러스를 새로운 배지에 포함한 1.2 ml이며 이는 세포의 표면을 완전히 적시는 최소 부피를 의미한다. 그러므로 전체 바이러스 부피를 1.2 ml까지 농축한 재조합 배콜로바이러스를 사용하여 부피를 최소화함으로써 세포에 대한 피해를 최소화할 수 있었다. 또한, 농축된 배콜로바이러스는 새로운 배지를 첨가함으로써 희석시킬 수 있고 본래의 배콜로바이러스가 가지고 있는 세포독성을 줄일 수 있다. vMT-GFP 재조합 배콜로바이러스의 경우, 농축된 배콜로바이러스의 MOI가 30인 감염 조건을 선택하였을 때 향상된 녹색형광단백질의 발현과 20%의 세포 독성을 보였다(Fig. 3).

3-4. 배콜로바이러스 배양시간이 녹색형광단백질 생산에 미치는 영향

배콜로바이러스 배양시간은 배콜로바이러스와 세포 간의 접촉 시간으로 정의된다. 선행 실험으로부터 더욱 긴 배콜로바이러스 배양 시간에서 더 좋은 목적단백질 발현 결과를 보임을 알 수 있었다 (data not shown). Fig. 4는 다양한 MOI에서 배양시간에 따른 녹색형광단백질 발현 수율과 세포 독성을 보여준다. 이로부터 긴 배콜로바이러스 배양시간이 향상된 녹색형광단백질 발현 수율을 보임을 알 수 있었으나(Fig. 4(a)) 이는 또한 낮은 세포 생존도를 야기함을 보여주었다(Fig. 4(b)). 세포 독성은 세포 파쇄를 야기하므로 감염된

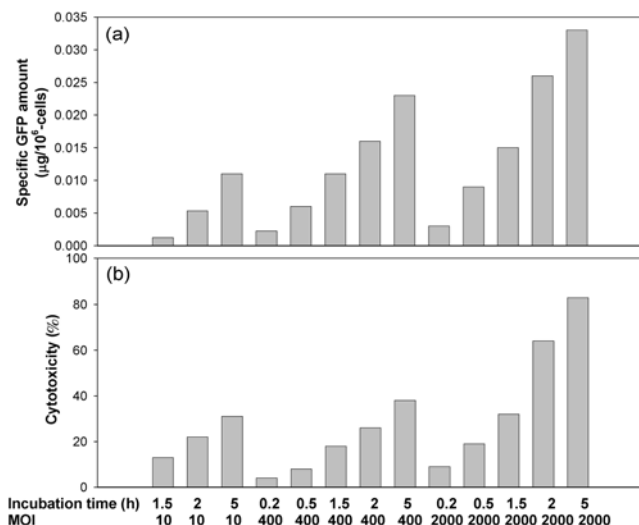


Fig. 4. The effect of MOI and incubation time with 10X concentrated vMT-GFP baculovirus on (a) specific GFP production and (b) cytotoxicity in wild type *Drosophila* S2 cells. Initial cell number was 1.6×10^6 cells ml^{-1} , post-infection was 24 h, and post-induction was 42 h.

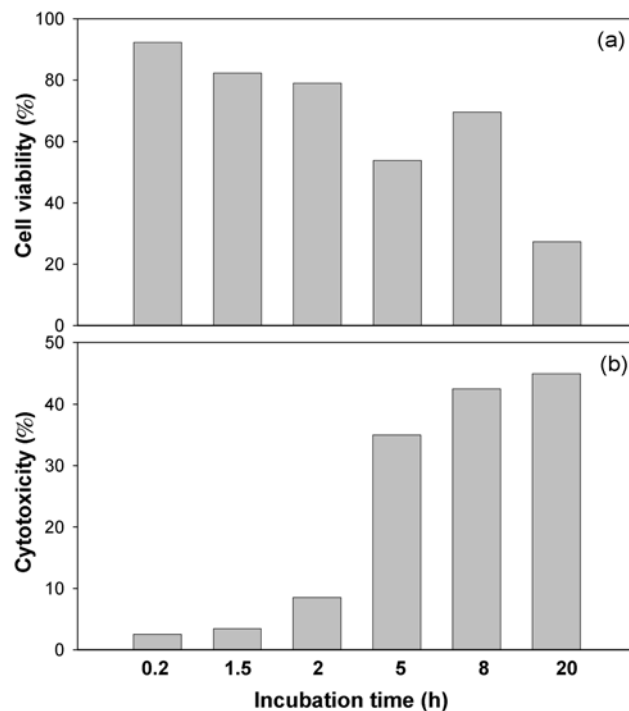


Fig. 5. Effects of incubation time with 10X concentrated vMT-GFP baculovirus on (a) cell viability and (b) cytotoxicity. MOI was 30, initial cell number was 9×10^6 cells ml^{-1} , post-infection was 24 h, and post-induction was 42 h.

세포들의 안정성에 대한 문제가 발생한다. Fig. 5는 선행연구에서 선정한 감염 조건인 MOI 30에서 1시간 반까지의 배양 시간 동안 세포 생존도가 80%라는 것을 보여주고 있다. 그러므로 우리는 다음에 일어나는 유도 단계들을 고려할 때, 1시간 반을 최적의 배콜로바이러스 배양 시간으로 선정하였다. 배콜로바이러스 감염 후의 세포 수 감소의 원인은 배콜로바이러스 감염이 포유

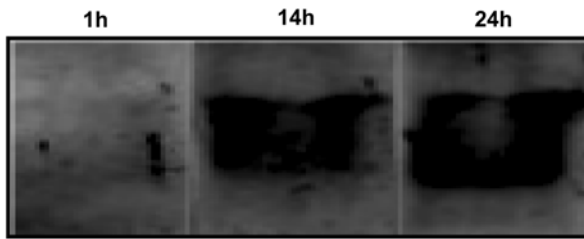


Fig. 6. Effect of incubation time after baculovirus infection on GFP expression in vMT-GFP/*Drosophila* S2 cells. Western blot analysis was performed to detect GFP production.

류 실험과 같이 비 감염 세포들에 비교할 때 매우 낮은 속도가지만, 결과적으로 연속적인 세포 분열을 일으킨다는 사실로 설명될 수 있다[35].

3-5. 배콜로바이러스 감염 후 배양시간이 녹색형광단백질 생산에 미치는 영향

감염 후 배양시간의 정의는 배콜로바이러스로 감염 후에 혈청을 배제하고 급격한 감염에서 벗어나 안정한 상태의 배양기간을 의미한다. 배콜로바이러스 감염은 뚜렷한 세포 성장 저지를 나타내지는 않았고, 이런 이유로 비 감염세포들과 비교하여 매우 낮은 속도임에도 세포들은 분열을 계속하였다(data not shown). 더욱이, 배콜로바이러스는 복제불허 세포에서는 자연적으로 복제되지 않는다. 감염 충격으로부터 긴 감염 후 배양시간이 세포의 안정화에 기여할 수 있음에도, 복제불허 세포에서의 이러한 배콜로바이러스의 비복제 특성은 생산 수율에 제약이 될 수도 있다. CMV-IE 프로모터의 조절하에 있는 녹색형광단백질 유전자를 가진 감염된 세포의 분열은 결과적으로 감염 후 24시간 후에 녹색형광단백질 세포의 퍼센트가 감소했다고 보고된바 있다[20]. 24시간이 최적의 감염 후 배양시간임을 실험을 통하여 알게 되었고(data not shown) 이는 Western blot 분석을 통하여 확인할 수 있었다(Fig. 6).

4. 결 론

MOI는 일반적으로 크게 하는 것이 높은 발현 수율을 위하여 좋은 결과를 보였다. 그러나 실제 배양을 고려하여 배콜로바이러스와 S2 세포가 접촉하는 동안의 중요한 변수들인 MOI는 30으로, 배콜로바이러스와의 배양 시간은 1.5시간으로 고정함으로써 배콜로바이러스가 S2 세포에 대해 미치는 세포독성을 최소화할 수 있었다. 또한, 배콜로바이러스 용액을 10배 농축시킴으로써 최소부피를 맞추기 위해 첨가시키는 새로운 배지의 비율을 높임으로써 배콜로바이러스에 의한 세포독성을 줄일 수 있었다. 배콜로바이러스의 감염이 끝난 후의 관여하는 변수들인 감염 후 배양시간은 24시간에서 녹색형광단백질의 발현이 가장 좋음을 확인하였다.

감 사

본 연구는 학술진흥재단의 선도연구자지원사업(KRF-2004-D00181)과 한국두뇌사업(Brain Korea) 21의 일환으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Schneider, I., "Cell Lines Derived from Late Embryonic Stages of *Drosophila melanogaster*," *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **27**, 353-365(1972).
- van der Straten, A., Johansen, H., Rosenberg, M. and Sweet, R. W., "Introduction and Constitutive Expression of Gene Products in Cultured *Drosophila* Cells Using Hygromycin B Selection," *Curr. Methods Mol. Cell Biol.*, **1**, 1-8(1989).
- Johansen, H., van der Straten, A., Sweet, R., Otto, E., Maroni, G. and Rosenberg, M., "Regulated Expression at High Copy Number Allows Production of a Growth-inhibitory Oncogene Product in *Drosophila* Schneider Cells," *Genes Dev.*, **3**, 882-889(1989).
- Kirkpatrick, R. B., Ganguly, S., Angelichio, M., Griego, S., Shatzman, A., Silverman, C. and Rosenberg, M., "Heavy Chain Dimers as well as Complete Antibodies are Efficiently Formed and Secreted from *Drosophila* via a BiP-mediated Pathway," *J Biol Chem.*, **270**, 19800-19805(1995).
- Li, B., Tsing, S., Kosaka, A. H., Nguyen, B., Osen, E. G., Bach, C., Chan, H. and Barnett, J., "Expression of Human Dopamine Beta-hydroxylase in *Drosophila* Schneider 2 Cells," *Biochem J.*, **313**, 57-64(1996).
- Lehr, R. V., Elefante, L. C., Kikly, K. K., O'Brien, S. P. and Kirkpatrick, R. B., "A Modified Metal-ion Affinity Chromatography Procedure for the Purification of Histidine-tagged Recombinant Proteins Expressed in *Drosophila* S2 Cells," *Protein Expr Purif.*, **19**, 362-368(2000).
- Corchero, J. L. and Villaverde, A., "Plasmid Maintenance in *Escherichia coli* Recombinant Cultures is Dramatically, Steadily, and Specifically Influenced by Features of the Encoded Proteins," *Biotechnol Bioeng.*, **58**, 625-632(1998).
- Dobrosotskaya, I. Y., Goldstein, J. L., Brown, M. A. and Rawson, R. B., "Reconstitution of Sterol-regulated Endoplasmic Reticulum-to-Golgi Transport of SREBP-2 in Insect Cells by Co-expression of Mammalian SCAP and Insigs," *J Biol Chem.*, **278**, 35837-35843(2003).
- Liu, X., Constantinescu, S. N., Sun, Y., Bogan, J. S., Hirsch, D., Weinberg, R. A. and Lodish, H. F., "Generation of Mammalian Cells Stably Expressing Multiple Genes at Predetermined Levels," *Anal Biochem.*, **280**, 20-28(2000).
- Miller, M. K., "Baculoviruses as Gene Expression Vectors," *Ann Rev Microbiol.*, **42**, 177-199(1988).
- Cha, H. J., Pham, M. Q., Rao, G. and Bentley, W. E., "Expression of Green Fluorescent Protein in Insect Larvae and its Application for Foreign Protein Production," *Biotechnol Bioeng.*, **56**, 239-247(1997).
- Cha, H. J., Dalal, N. G., Vakharia, V. N. and Bentley, W. E., "Expression and Purification of Human Interleukin-2 Simplified as a Fusion with Green Fluorescent Protein in Suspended Insect Sf-9 Cells," *J Biotechnol.*, **69**, 9-17(1999).
- O'Reilly, D. R. and Miller, L. K., "Expression and Complex Formation of Simian Virus 40 Large T Antigen and Mouse p53 in Insect Cells," *J Virol.*, **62**, 3109-3119(1988).
- Hu, Y. C. and Bentley, W. E., "Effect of MOI Ratio on the Composition and Yield of Chimeric Infectious Bursal Disease Virus-like Particles by Baculovirus Co-infection: Deterministic Predictions and Experimental Results," *Biotechnol Bioeng.*, **75**, 104-119(2001).

15. Carbonell, L. F., Klowden, M. J. and Miller, L. K., "Baculovirus-mediated Expression of Bacterial Genes in Dipteran and Mammalian Cells," *J Virol.*, **56**, 153-160(1985).
16. Morris, T. D. and Miller, L. K., "Promoter Influence on Baculovirus-mediated Gene Expression in Permissive and Nonpermissive Insect Cell Lines," *J Virol.*, **66**, 7397-7405(1992).
17. Lee, D. F., Chen, C. C., Hsu, T. A. and Juang, J. L., "A Baculovirus Superinfection System: Efficient Vehicle for Gene Transfer into *Drosophila* S2 Cells," *J Virol.*, **74**, 11873-11880(2000).
18. Cho, H. S., Kim, Y. K. and Cha, H. J., "Expression of Double Foreign Protein Types Following Recombinant Baculovirus Infection of Stably Transfected *Drosophila* S2 Cells," *Enzyme and Microbial Technology.*, **35**, 525-531(2004).
19. Joseph, M., "Gene Expression System," *Academic press.*, 331-372(1999).
20. Hu, Y. C., Tsai, C. T., Chang, Y. J. and Huang, J.U., "Enhancement and Prolongation of Baculovirus-mediated Expression in Mammalian Cells: Focuses on Strategic Infection and Feeding," *Biotechnol. Prog.*, **19**, 373-379(2003).
21. Friedrich, A., Erika, S., Iain, B. H. W. and Leopold, M., "Insect Cells as Hosts for the Expression of Recombinant Glycoproteins," *Glycoconjugate journal.*, **16**, 109-123(1999).
22. Duisit, S., Saleun, S., Douthe, S., Barsoum, J., Chadeuf, G. and Moullier, P., "Baculovirus Vector Requires Electrostatic Interactions Including Heparin Sulfate for Efficient Gene Transfer in Mammalian Cells," *The J. of gene medicine.*, **1**, 93-102(1999).