

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

建立及最佳化荳莢螟核多角體病毒和其細胞株之體外增殖系統以作為量產病毒、基因組解序和表現載體系統的構築
研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2317-B-002-013-
執行期間：95年01月01日至95年12月31日
執行單位：國立臺灣大學昆蟲學系暨研究所

計畫主持人：王重雄

計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理：王智源
碩士班研究生-兼任助理：乃育昕

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96年05月31日

■ 成果報告

□ 期中進度報告

建立及最佳化荳莢螟核多角體病毒和其細胞株之體外增殖系統以作為量產病毒、基因組解序、和表現載體系統的
構築

計畫類別：■ 個別型計畫 □ 整合型計畫

計畫編號：NSC 95N-1302

執行期間： 95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

計畫主持人：王重雄

共同主持人：

計畫參與人員：王智源、乃育昕

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：■ 精簡報告 □ 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

□ 涉及專利或其他智慧財產權，□ 一年 □ 二年後可公開查詢

執行單位： 台灣大學昆蟲學研究所

研究計畫之背景及目的

豇莢螟 (*Maruca vitrata*) 屬鱗翅目 (Lepidoptera) 螟蛾科 (Lepidoptera: Pyralidae), 其寄主植物共有 20 屬 40 種, 此蟲分佈於亞洲、非洲及太平洋諸島, 在台灣終年皆發生, 影響作物產量及品質甚鉅。台灣中部地區, 豇莢螟對豇科植物造成的損失達 30% 以上。近年來政府推廣休耕農田種植田菁、太陽麻或大豆等綠肥作物, 這些作物鮮少噴藥, 且皆為豇莢螟的寄主植物, 漸成此蟲大肆繁殖的溫床, 因此豇莢螟危害豇科經濟作物之程度, 正逐年加深。此外, 豇莢螟在非洲造成該地區長豇豆減產的主要因素。因此, 豇莢螟的重要性, 在國際間已是長年受到重視的問題。在台灣首次發現具有典型核多角體病毒病徵之豇莢螟罹病幼蟲, 經形態及基因的偵測, 證實此病原體是核多角體病毒, 而命名為豇莢螟核多角體病毒 (*Maruca vitrata* multiple nucleopolyhedrovirus 簡稱 MaviMNPV)。此病毒對豇莢螟二齡幼蟲有高達 98 % 的致死率, 極具有發展成生物農藥之潛力。此外, 豇莢螟細胞株 (NTU-MV cell) 也初步建立成功, 對 MaviMNPV 感受性非常高, 多角體的產量極高, 顯示 MaviMNPV 除了具有很強的啟動子外, 極可能在基因體上具有某些特殊的基因, 或其基因的表現具有獨特的機制。再者豇莢螟細胞株是少見高核多角體病毒接受性及高多角體產量的細胞株。具有挑戰以苜蓿夜蛾核多角體病毒 (*Autographa californica* MNPV 簡稱 AcMNPV) 與秋行軍蟲細胞為主之表現載體系統的潛力。因為豇莢螟細胞株及 MaviMNPV, 皆是國內特有的資材, 具有國際競爭力之本土性材料, 亦極具基礎研究及研發成應用的潛力。

前人研究概況

(一) 昆蟲桿狀病毒研發之肇始 (王等, 1996; 王和黃, 2001; 吳等, 2002; Steinhaus, 1947; Benz, 1986)

昆蟲微生物病原體之研發歷史可追溯至西元前 2700 年, 中國對家蠶疾病的描述是為最原始的昆蟲疾病記錄, 尤其冬蟲夏草之醫學用途, 直到目前還受到重視。西方則首於西元前 322-384 年亞里斯多德記錄蜜蜂疾病。昆蟲病毒之研究以桿狀病毒為最早, 1527 年義大利詩人 Vida, 在他的詩詞內, 描述一種家蠶 (*Bombyx mori*) 疾病, 罹病家蠶腫脹, 表皮泛金色, 易破而釋出膿汁, 此病是因水、尤其海水所引起。至 150 年後, 1679 年 Merian 以黃疸病 (jaundice disease) 描述於其書 “The Miraculous Metamorphosis of Caterpillars And Their Unique Flower Nutrition” 內, 報導當時所相信、因打雷引發的病之 “打雷說”。最早之科學描述可能是 1808 年 Nysten 在巴黎發表的文章。1856 年 Maestri 和同年之 Cornelia 首以顯微鏡觀察到罹病家蠶之血液和組織內有結晶狀囊。前者發現結晶狀囊位在核內, 後者認為含結晶狀囊的水化體液是因血液的某種程度的變化。16 年後 Haberlandt 論及多角體既是結晶物。1873 年 Boll 任奧地利 農業化學實驗站 (Agronomical-Chemical Experiment station

in Görz 是前 Imperial Sericultural Experiment station in Görz 於 1896 年更名) 確認多角體是結晶物，本質可能是蛋白質而命名為多角體粒子 (polyhedral granules)，並認定是可溶於鹼液和強酸是接觸感染且細菌非主因。1892 年 von Tubeuf 在模毒蛾 (nun moth, *Lymantria monacha* (L.)) 之萎凋病蟲體內發現多角體粒子，但未將多角體粒子與感染串聯一起。1893 年 Wachtl 和 Kornauth 則明確指出二者的關聯性，但他們認為多角體粒子是孢子蟲的發育期之一。一年後 Bolle 也有相同的認定。1896 年家蠶黃疸病 (jaundice) 病原體還有被描述為微球菌 (*Micrococcus lardarius*)，二至十年後(1898-1908) Bolle 描述病原體為孢子蟲 (sporozoan, *Microsporidium polyedricum*)，同時、1907 年 Von Prowazek 及 1908 年 Marzocchi 和 Bolle 認為是原生動物 (protozoan, *Chlamydozoa bombycis*)，而多角體是該原蟲感染的副產品。同年 Conte 在法國提議黃疸病可經卵傳播。另 Bolle 認為家蠶黃疸病可傳染模毒蛾幼蟲而引發萎凋病(後來證實是錯誤)。1909 年 Wahl 首先以 “polyeder” (= polyhedron) 和 “Polyederkrankheit” (= polyhedral disease) 名詞來形容家蠶黃疸病和模毒蛾幼蟲的萎凋病。他以模毒蛾幼蟲為材料作有系統的感染和病理試驗，指出多角體只在核內產生，在表皮、脂肪體、氣管和血球皆可見，但在血球之胞質可見多角體是因吞噬作用所致。1909 年 Conte 和 Levrata 亦作相同結論。1910 年 Wolff 將 *Bupalus piniarius* 之多角體病亦沿用其屬名 (*Chlamydozoa prowazeki*)。1911 年 Escherich 和 Miyajima 首用 virus 名詞來形容，但當時 virus 只是代表病原 (germ 或 causal agent) 而非病毒。但他們發現經 Berkefeld 和 Chamberland filters 濾過的罹萎凋病模毒蛾幼蟲的體液不能經口感染模毒蛾幼蟲，但多角體則可。此結果為後來研究的 von Prowazek 所反駁，因素是前者所用的是已老化的病毒液，而者採用新鮮的病毒液。1912 年 Knoche 還維持微孢子蟲論。同年 Glaser 和 Chapman 還堅持是 “Gyrococcus”，另外當時 von Prowazek 開始懷疑他的 *Chlamydozoa* 理論。直到次年、1913 年 Hayashi 和 Sako 肯定 Escherich 和 Miyajima 之多角體內帶有病原的理論。同年亦是桿狀病毒歷史上的里程碑，Glaser 和 Chapman 修正他們的結論，而認為是可濾過的感染物 (病毒) (a filterable virus)。1914 年第一次世界大戰開始。1916 年 Glaser 和 Chapman 發表多角體內帶有蛋白質和磷酸成份而認為多角體應有核蛋白質鞘 (nucleocapsid)，而堅持多角體是在核內形成，而非因病降解所形成。1917 年 Glaser 再次從天幕蛾 (tent caterpillar, *Malacosoma americanum*) 和舞毒蛾 (gypsy moth) 之病毒濾液得到相同的結論。他並嘗試感染體外培養的血球細胞。1918 年 Glaser 發表他的第三篇論文，指出病毒濾液繼代感染舞毒蛾幼蟲，而認為繼代增殖之病毒濾液的病原性有增強的現象。

後第一次世界大戰時代：1918-1919 年 Acqua 肯定病原體是可經 Berkefeld and Chamberland filters 濾過的感染物 (病毒)。此後 10 年可濾過性病毒理論 (filterable-virus theory) 是為人所接受。1921 年 Aoki 和 Chigasaki 首次以免疫法證實多角體內帶有病毒。1924 年 Bohemian 等人仍據

Chlamydozoa 理論，但他們的重要貢獻是證實多角體在腸液內溶解而感染，指明了經口傳播機制。1924, 1926 及 1928 年 Glaser 比較分離自各種鱗翅目昆蟲多角體之大小，多角體感染有種的專一性。1926 年 Paillot 肯定黃疸病是病毒感染所導至，而將病毒命名為 *Borrellina bombycis*；另外他自紋白蝶 (*Pieris brassicae* L.) 分離到新桿狀病毒，即 Steinhaus 稱之“顆粒體”。有趣的是在超過 20 年後 Steinhaus 才在法國境外之西半球發現昆蟲的“顆粒體病”。但是迄此對多角體尚有未了解，1929 年 Pospelov 和 Noreiko 認為黃疸病病毒是被封埋在酵母菌 (*Debaryomyces tyrocola*) 內。

1933 年磁鐵式電子鏡發明，1938-1939 年發明電磁式電子鏡，於是研究此病毒的方法、逐漸進入超微構造。此期間亦是第二次世界大戰發生。有關之重要著作如下敘述。1934 年 Glaser 和 Lacaille 多角體經 23 次水洗後不會耗損病毒粒子，此外二人還進行溫度及化物對病毒感染力的影響，證實並不能消除其感染力，而作出病毒存在多角體內。1943 年 Glaser 和 Stanley 發現病毒在 pH 5 和約 pH 9 穩定，多角體內之病毒在 pH 2 還具感染力。1947 年 Bergold 指出多角體是桿狀病毒的特性。另則、從昆蟲病毒分類史即可了解桿狀病毒之重要性。

(二) 昆蟲桿狀病毒之分類 (王等, 1996; Francki *et al.*, 1991; Murphy *et al.*, 1995; Tanada and Kaya, 1993; van Regenmortel *et al.*, 2000; Hernious *et al.*, 2003; Theilmann *et al.*, 2005)

1948 年 Holmes 首次企圖建立昆蟲病毒分類的體系，當時他將昆蟲病毒分類為病毒目 (Order Virales)，動噬亞目 (Suborder Zoophagineae)，包含體病毒科 (Family Borrelinaceae)，包含體病毒屬 (*Borrelina*) 和非包含體病毒屬 (*Morator*)。前一屬是會引起昆蟲多角體病 (polyhedrosis)，萎凋 (wilt) 病，和其他鱗翅目種類之病毒病。而後一屬則只含有一種病毒即是蜜蜂囊腫病毒。由此可見桿狀病毒研究已有相當歷史。近十年桿狀病毒分類之沿革，國際病毒分類委員會 (International Committee on Taxonomy of Virus, ICTV) 將桿狀病毒科 (Baculoviridae) 區分成 A、B 及 C 群，其中 A 群病毒即為核多角體病毒 (nuclear polyhedrosis virus, NPV)，B 群為顆粒體病毒 (granulosis virus, GV)，及 C 群為無包涵體病毒 (nonoccluded baculovirus; NOV)；1991 年將 A 和 B 群放入真桿狀病毒亞科 (Eubaculovirinae) 而 C 群歸屬於裸桿狀病毒亞科 (Nudibaculovirinae)；其後 1995 年將 C 群排除在桿狀病毒科內，而暫屬未歸屬病毒 (unassignment virus)，因此桿狀病毒科只含二屬即核多角體病毒屬 (更名為 *Nucleopolyhedrovirus*, NPV) 和顆粒體病毒屬 (更名為 *Granulovirus*, GV)。桿狀病毒科 (Baculoviridae) 自 1999 年至現今仍維持兩個屬：核多角體病毒和顆粒體病毒，桿狀病毒已知可以感染超過 500 種以上的昆蟲，然而真正被列入種名者只有 28 種。利用 63 個基因所構築的親緣關係，NPVs 可分成兩群：(1) 以 AcMNPV 為代表，內含 BmNPV (家蠶 NPV)，

EppoMNPV (*Epiphya postvittana* MNPV) 和 OpMNPV (*Orgyia pseudotsugata* MNPV); (2) 以 LdMNPV (吉普賽舞蛾 MNPV) 為代表，內含 SeMNPV 和 SpltNPV (甜菜夜蛾和斜紋夜蛾 NPVs)，及 HzSNPV 和 HearNPV (菸草夜蛾和蕃茄夜蛾 NPVs)。為何多數分離株未能納入分類體系內，主要因素其一是分離株之基本生物學之缺乏；其二是分離株之量產不易；其三是基因組的結構及組成不明。歸納所用因素則可綜合為一，即是體外增殖未能建立，若有細胞株可供增殖，則不會有供試病毒缺乏的現象發生，在不慮病毒短缺之下，即可進行深入的探討。因此 MaviMNPV 基因組 DNA 的解序及分析亦是本計畫的重點之一，除可作其分類上之定位外，並可供基因表現、互動、以及特殊基因之研究及應用。

(三) 昆蟲桿狀病毒之體外增殖 (Weiss *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1996; Shih *et al.*, 1997; Mitsuhashi, 2002)

病毒研究之最重要的要件是體外增殖的建立，於 (2) 段已論及，因此病毒高接受力的細胞株是研究病毒不可或缺的充要條件。昆蟲組織和細胞體外培養起步較脊椎動物組織和細胞體外培養發展慢，1915 年 Goldschmidt 首先嘗試利用脊椎動物組織和細胞體外培養法培養昆蟲組織和細胞。1935 年 Trager 發展一種組織培養液可維持家蠶卵巢活力和細胞增殖二至三週，此期間足可繼代黃疸病病毒。1958 年 Grace 成功地以桿狀病毒感染天蠶蛾 (emperor gum moth, *Antheraea eucaryptic*) 卵巢組織。1959 年 Aizowa 和 Vago 肯定 Trager 的成就。1959 年 Gam 等人成功地以桿狀病毒感染家蠶卵巢單層細胞株。此後受限於未有適宜的培養液，以致於桿狀病毒體外增殖之利用價值並未受到重視。1962-1967 年 Grace 在澳洲首次成功獲得天蠶蛾細胞株。直到 2002 年至少已有 400 昆蟲細胞株被建立。1970 及 1973 年 Goodwin 等人發展出一種可生產高接受桿狀病毒細胞之組織培養液系統後才受到重視。1973 年 Hink 和 Vail 建立以苜宿夜蛾 (alfalfa looper) 核多角體病毒 (*A. californica* multiple NPV, AcMNPV) 感染擬尺蠖 (*Trichoplusia ni*, IPLB-TN 368 cell line) 細胞株之病毒斑法 (plaque assay)。常用於桿狀病毒表現載體的昆蟲細胞株是 1977 年 Vaughn 等人從秋行軍蟲 (*Spodoptera frugiperda*) 的蛹卵巢組織所建立，經後人多次選株後，IPLB-SF 21AE 及 SF9 被廣泛地用於表現外源蛋白。雖然有許多昆蟲細胞株被建立，然能用於桿狀病毒增殖的昆蟲細胞株有限，本系建立的榕樹透翅毒蛾 (*Perina nuda*) 細胞株 (PN-HH 和 -HF) 可接受同源的病毒：榕樹透翅毒蛾核多角體病毒 (*P. nuda* NPV, PenuNPV) 和小 RNA 病毒 (*P. nuda* picorna-like virus, PnV)；黑角舞蛾 (*Lymantria xyliana*) 細胞株 (LY1-4) 可接受同源的病毒：黑角舞蛾核多角體病毒 (*L. xyliana* NPV, LyxyNPV) 是成功例子。另則、黑角舞蛾核多角體病毒之體外增殖系統，已可利用近緣細胞株-舞毒蛾細胞株 (IPLB-LD 652Y) 增殖，能呈典型桿狀病毒細胞病變的細胞約佔 70-80%。然而另從斜紋夜蛾 (*S.*

litura) 的蛹卵巢組織所建立細胞株 (SL-7B 和 -1A), 卻未能接受同源的病毒: 斜紋夜蛾核多角體病毒 (*S. litura* NPV, SpltNPV), 但對 AcMNPV 卻呈高接受性。目前除斜紋夜蛾核多角體病毒外, 另一重要害蟲核多角體病毒: 甜菜夜蛾核多角體病毒 (*S. exigua* NPV, SpeiNPV), 亦尚未有高接受力細胞株被建立。豇豆螟 (*Maruca vitrata*) 細胞株之建立, 並對同源的病毒: 豇豆螟核多角體病毒 (*M. vitrata* NPV, MaviMNPV), 呈高接受力且是多角體高產量 (初估 2 瓶 25T 培養瓶之產量相當一幼蟲之產量), 此表現皆高於已知的細胞株 (如附圖所示)。

另值得一提的是無血清培養液 (serum-free media) 的開發, 增進細胞和外源蛋白的產量外, 消除血清內含物的干擾, 提昇下游步驟的效率, 因此可降低純化最終產物的成本。已開發並商業化的無血清培養液有 SF-900 SFM, SFM-900 II SFM, 和 ExCell 400 等, 皆可適用於鱗翅目昆蟲組織和細胞株培養。最大細胞生產量可達 1.5×10^7 cells/ml, 但這並非未表示無血清培養液內的營養份足以有效地生產多角體和外源蛋白, 因在感染的過程中, 會消耗一些營養, 所以適當饋料的補充是有必要。無血清培養液是建立在基本培養液的基礎下, 如適當緩衝液, 無機和有機鹽及酸, 醣份, 金屬離子, 胺基酸, 和維生素外, 需要添加有機酸、抗氧化劑 (antioxidants)、維生素 (尤其水溶性維生素)、固醇類 (如類固醇, cholesterol)、質膜前驅物 (membrane precursor, 如 monothioglycerol 和 selected detergent-like molecules) 以及非離子化聚合體分子 (nonionic polymer molecules, 如 Tween 80, Pluronic polyols 等)。無血清培養液已廣泛用於表現載體系統以量產外源蛋白, 但不可忽略的是成份內脂肪對氧的游離基 (oxygen radicals) 的敏感, 而易使培養液變質, 避免方法包括常替換培養液, 攪拌培養液以及以氮氣添充培養液上的空間。無血清培養液也適用於豇豆螟細胞株, 但其經濟效益有待評估。

(四) 昆蟲桿狀病毒之基本生物學 (King and Possee, 1992; O'Reilly *et al.*, 1992; Richardson, 1995; Theilmann *et al.*, 2005)

I. 桿狀病毒之構造

桿狀病毒含有環狀、雙股螺旋 DNA 的基因體, 其大小約為 80-200 kb, DNA 與軸心蛋白 (core protein) 形成長桿狀的核蛋白鞘 (nucleocapsid)。核蛋白鞘外圍被覆上雙層構造, 內層為蛋白質鞘 (capsid), 外層為脂蛋白被膜 (lipoprotein envelope) 而形成病毒粒子 (virus particle 或 virion)。桿狀病毒 DNA 與鹼性蛋白 p6.9 (類魚精蛋白, a protamine-like protein) 緊密結合, 在核蛋白鞘內最多的蛋白質是主要鞘蛋白 (a major capsid protein, p39), 與次要鞘蛋白 (a minor capsid protein, p24) 位在相同部位, 相反地 p78/83 是富脯氨酸之磷酸蛋白 (a proline-rich phosphoprotein) 位在核蛋白鞘之末端, 而 p87 在核蛋白鞘之確實位置尚未明確。至於核蛋白鞘之組合序是病毒 DNA 先與鹼

性蛋白 p6.9 結合，而後濃縮形成軸心，鞘之組合是與其他蛋白質各自參與。另一磷酸蛋白，p31 與 DNA 是非特異性結合，位在病毒形成團 (virogenic stroma) 內，與核質關係緊密，可能扮演濃縮的角色，亦或病毒轉錄或複製的角色 (viral transcription and/or replication)。

被感染的細胞核內形成核多角體內的病毒粒子 (封埋體病毒: occluded virus, OV)，其被膜是內生性 (endogeneous)，病毒顆子之外是由多角體蛋白 (polyhedrin) 包裹而形成多角體 (polyhedra)。根據病毒內包含的核蛋白質鞘數目，再將 NPV 分成兩類：若一個病毒粒子內只有一個核蛋白質鞘 (single)，稱 SNPV，代表種為家蠶核多角體病毒 (*Bombyx mori* Single NPV; BmSNPV)；若含有多個 (multiple) 核蛋白質鞘的病毒粒子，則稱 MNPV，代表種為苜蓿尺蠖蛾多角體病毒 (AcMNPV)；而顆粒體病毒屬 (*Granulovirus*; GV) 則是單一病毒顆粒被包埋在顆粒蛋白 (granulin) 內，形成顆粒體 (granules)，即一個顆粒體只含一個病毒顆粒、只有一核蛋白質鞘。

II. 桿狀病毒之生活史

桿狀病毒具雙相複製環 (biphasic replication cycle) 的生活史，亦即在桿狀病毒的複製循環中，會產生兩種不同型式的病毒粒子：(1) 胞外病毒 (extracellular virus, ECVs；亦又名 Budded virus: BV)，ECVs 通過核膜時，被上一層暫時性被膜，此被膜含有病毒轉錄的 p16 蛋白，在通過胞質，頂著胞膜出芽時消失，ECVs 頂著胞膜端有病毒轉錄的被膜醣蛋白 gp64，此蛋白以類頂刺 (peplomer-like structures) 位在 ECVs 之前端，為病毒感染所必須。(2) 被包裹在結晶狀的封埋體 (occlusion body, OB，又稱多角體) 的病毒粒子，稱之為封埋體病毒 (occluded virus, OV；亦又名 polyhedral derived virus: PDV)。封埋體病毒之被膜是內生性 (*de novo* envelope)，來源不明。此被膜含至少含三個 ECV 沒有的蛋白，其中之二是 p25 和 gp41 與 OVs 被膜關係緊密。另一蛋白 p74 在細胞培養中病毒複製時，並非是必要的蛋白質，但 OBs 經蟲體食入而感染時是必要的蛋白質，其確切的位置不明。

病毒感染細胞後，會先以出芽方式將病毒釋出，形成胞外病毒，之後數目不定的病毒粒子 (封埋體病毒, OVs) 會成群地在細胞核內被封入被膜中，形成典型的封埋體堆積於細胞核內，而成群封有外套的病毒粒子再被病毒所產生的多角體蛋白 (polyhedrin) 包埋而形成。此兩種病毒型式對核多角體病毒之複製週期有其不同的重要性，兩者在形態上也各有差異。胞外病毒被膜上的 gp64 醣蛋白可能與胞外病毒進入細胞有關，而封埋體病毒的被膜則缺乏此種醣蛋白；封埋體病毒則具有一個以上的蛋白質鞘及緊密包裹的被膜。兩者感染的對象及感染方式也各異，胞外病毒感染血腔內之細胞與組織以及體外培養之細胞株，主要是以胞食方式 (endocytosis) 進入細胞，而包埋體病毒為昆蟲個體間的水平感染 (horizontal transmission)，以中腸上皮細胞為感染之宿主細胞，病毒主要以被膜與中腸上皮細胞微絨毛的細胞膜癒合而進入細胞。

多角體 (OBs) 之主要蛋白是多角體蛋白，形成結晶之後，外覆蓋一層被膜，稱之多角體被膜 (polyhedral envelope, PE 或 calyx)，此被膜富含醣類外，亦含 p34 蛋白 (亦稱 PE protein)，此膜有穩定多角體作用，若去除 p34 基因，則 OBs 對弱鹼很敏感。另一基因 *FP 25* 是正常 OV 之覆被和形態所需，與寡多角體 (FP) 形成有關，當細胞 DNA 插入而阻擾此基因表現則會造成 FP，但不明的是此基因是否是直接或間接地參與多角體的形成。另外若將 *FP25* 突變會產生若干影響，如增加 ECVs 的產量，阻斷因感染死亡之幼蟲組織的液化，改變一些病毒基因的表現與累積，如多角體合成量減少和構造性蛋白的增加 (gp 67, ECV/OV-E26 和 p39 等)。根據 2001 年的報導，*FP25* 會在轉錄後之層次 (a posttranscriptional level) 影響 OV 之被膜蛋白 E66 表現，可能的機制是影響 E66 的轉譯 (translation)。由於 *FP25* 突變株之 E66 傳送至核內膜 (inner nuclear envelope) 的機制被阻斷，而認為 E66 傳送至核內膜和核內微泡 (intranuclear microvesicles) 是受特別的機制調控，而與另一 OV 被膜蛋白 (E25) 調控機制不同。另一高表現的基因是 *P10*，此基因在感染的細胞之胞核及胞質會形成纖維網構造 (fibrous networks)，這些含 p10 構造是構成感染細胞之胞核內之電子緻密層 (electron-dense spacers) 的主要成份。此層內含 pp34 與 PE 形成有關。p10 與微小管 (microtubules) 有關，若去除 *p10*，則造成 OBs 之多形性。有者 PE 之覆蓋偏差，而導至 OBs 對機械壓力 (mechanical stress) 敏感。有者與細胞之崩解有關，因核膜降解不完全，導至 OBs 不能從感染細胞釋出。另一蛋白 gp37 (SLP) 可能與蛋白降解活性有關。

(五) 桿狀病毒基因表現 (王和羅, 1990; 羅等人, 1990; King and Possee, 1992; O'Reilly *et al.*, 1992; Richardson, 1995; Theilmann *et al.*, 2005)

有些桿狀病毒基因組之完整序列已被解序如 AcMNPV、BmSNPV、SeMNPV 等十五種 NPVs、共二十序列 (其五對是來自相同寄主昆蟲之不同分離株)。另值得一提的是國內只有“類桿狀病毒”：蝦白點症病毒 (WSSV; 台灣大學動物研究所 羅竹芳教授) 和 HZ-1 病毒 (成功大學陳虹華教授) 之完整基因組被解序，雖然 WSSV 和 HZ-1 病毒已不屬桿狀病毒科，但是二者之完整序列有助於進一步釐清桿狀病毒之分類。桿狀病毒基因組可轉錄出約 100 到 180 蛋白質。鱗翅目桿狀病毒基因組內主要基因群中，約共具有 30-60 相似基因，這些保守的基因參與 DNA 複製、晚期基因轉錄、病毒構造和其他功能。

病毒基因的表現，具有階段性轉錄的特性，至少可區分為三個時期：

I. 初期基因的表現 (early phase)

基因的表現依賴寄主細胞之 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II) 進行。在感染 0-6 小時後，主要是病毒 DNA 的複製 (DNA replication)，一系列的初期

基因被表現，可分為早初期 (immediate early phase; 0-6 hr) 和遲早期 (delayed early phase; 5-6 hr)。在病毒 DNA 合成之前，早初期基因即已啟動，此時期所表現的基因產為轉錄作用之調節蛋白質 (transcriptional regulatory proteins)，如 IE-0、IE-1、IE-2、IE-N、和 PE-38 以及阻止寄主細胞自殺基因 (如 P35)。其中 IE-0、IE-N、和 PE38 只在感染初期表現，IE-1 (a 66.9 kDa polypeptide) 是一個多功能的基因轉錄調節性蛋白質，可同時活化啟動子 (promoter) 及促進子 (enhancer)，能轉活化 (transactivating) 短暫表現 (transient expression) 之許多早期及晚期啟動子，IE-1 誘導活化作用 (IE-1-mediated activation) 需要 *hr* 因子的存在，經結合後才能賦予活化的能力，若在順位 (*cis*) 的基因上有相似的區域 (homologous regions: *hr1*、*hr2*、*hr3*、*hr4*、*hr5*、*hr6*、*hr7*)，IE-1 基因產物可使這些基因表現增加 1000 倍以上，因此推論 IE-1 基因產物及 *hrs* 有控制 AcMNPV 初期基因表現的能力。IE-0 基因是替換接合 (alternative splicing) 的產物，是利用一 5' 端-外顯子 (an exon 5') 結合到 IE-1 啟動子，結果是 54 胺基酸加入 IE-1 的 N-端。IE-0 基因有自已的啟動子，調控上不同於 IE-1 基因。IE-0 之轉活化功能 (transacting functions) 亦不同於 IE-1，例如 IE-1 除活化許多基因外，對 IE-0 的轉錄是負調控。與 IE-0 刺激 IE-1 表現不同的是，IE-N (或 IE-2) 只有中度增強 “IE-1 誘導活化作用”，呈現自調控活性、和受 IE-1 之下游調控 (downregulated)。IE-N 含有一些轉錄子 (transcription factors) 與 DNA 結合的一鋅指組裝 (a Zinc finger motif) 和一白胺酸鍊組裝 (a leucine-zipper motif)。另外 *pe38* 和 *p143* 亦能轉錄此二組裝。PE38 有刺激 IE-N 和 *p143* (解螺旋酶，*helicase*) 的轉錄作用。

有些後早期基因 (delayed early gene, DE genes) 產物參與 DNA 複製過程，如 PCNA 基因 (ETL gene, 28 kDa) 之產物參與複製與晚期基因轉錄。

II. 晚期基因表現 (late phase, L)

晚期基因的轉錄和 DNA 的複製，至少受到約 19 病毒轉錄的蛋白質，即晚期基因促進因子 (late expression factor, *lef*) 的調控，其中 9-10 *lefs* 與 DNA 複製有關。其中 *deapol*、*p143* 及 *lef-8* 分別與 DNA 聚合酶 (DNA polymerase)、DNA 解螺旋酶 (DNA *helicase*) 及 RNA 聚合酶 (RNA polymerase) 的合成有關。DNA 複製起點在桿狀病毒基因組內有許多位置具有重覆序列 (repeated sequences)，稱之同源重覆區 (homologous repeat regions, *hr*)，此在桿狀病毒間並非高保守性。

感染 6-18 小時後，此時段特徵為病毒 DNA 大量合成及胞外病毒 (ECV) 開始形成。晚期基因在病毒 DNA 合成之後才開始進行轉錄作用 (transcription)，所啟動的基因大多與合成病毒之結構性蛋白質 (structural proteins) 有關，如病毒蛋白質鞘上的主要蛋白質基因 *Vp39* 及病毒軸心蛋白質 (core protein) 的基因；在胞外病毒被膜上的 *gp64* 醣蛋白亦在此時期合成。晚期基因的啟動子具有 5'-A/G TAAG-3' 的保守序列 (consensus

sequence)，這一小段序列也是 mRNA 轉譯的起始位置。BmNPV 和 AcMNPV 之 *gp64* 的啟動子分別位在其 ORF 5'端之 437 和 439 bp 位置，皆具早、晚期基因的啟動子 CAGT 和 A/G TAAG 的保守序列。BmNPV *hr3* 除有病毒 DNA 起始和增強作用外，亦具有與病毒其他因子共活化 *gp64* 的重要角色。LdNPV, SeMNPV 及 HaSNPV 缺 *gp64* 而分別由 LD130, F 蛋白及 Haorf 133 取代。此群與 *gp64* 無關，如 LD130 則與舞毒蛾群之昆蟲類反轉錄病毒跳躍子 (insect retrovirus-like transposable elements of the gypsy class) 的被膜蛋白 (envelope proteins) 具高的相似度。另具類 LD130 者有 *Plutella xylostella* GV (PxGV) 和 *Xestia c-nigrum* GV (XcGV)

III. 最晚期基因的表現 (very late phase, VL)

感染 18-72 小時後，此為基因表現之最後時期，又可稱為封埋體期 (occlusion phase)，主要是多角體蛋白基因 *Polh*、與核多角體結構穩定有關之 *p10* 基因及與病毒 FP (Few polyhedra) 變異種有關的 *fp25* 等基因之表現。

核多角體基因與其他晚期基因的共同特徵為轉錄起始點 (the transcriptional start site) 均位於 5'端的引導序列 (leader sequence) 中的 ATTAAG 保守序列 (conserved sequence) 中之 A 的位置；以接連子掃描突變法 (Linker scan mutation) 分析 AcMNPV 多角體基因之啟動子發現多角體基因的表現主要控制在一段包含轉錄起點在內的八個鹼基序列 TAAGTATT (A 為起始點)，若將這段序列破壞則無法轉錄。此外，若改變前述之保守序列可能導致桿狀病毒聚合酶 (virus-induced RNA polymerase) 對此序列結合力減弱而造成多角體蛋白表現率降低，進而發生核多角體數目減少之現象。L 與 VL 期所利用的病毒 RNA 聚合酶異於寄主細胞 RNA II 聚合酶，而 L 與 VL 期基因的啟動子並不含有多數真核細胞的基因啟動子之片斷，如 TATA box。在所有 L 與 VL 期基因的啟動子皆含一保守的軸心序列 (a consensus core sequence)，TAAG，此序列含有轉錄起始點 (如前述)、且對基因活力很重要。對 VL 期高表現基因的啟動子如同一高度保守序列，是 TAATAAGT/AATT。此序列位在 TAAG 和轉錄起始點編碼 (the start codon) 間之前導序列 (leader sequence) 內，而影響轉錄功能。

(六) 昆蟲桿狀表現載體系統 (王和羅，1990; 羅等人，1990; 吳等人，2002; Smith *et al.*, 1983; Maeda *et al.*, 1985; King and Possee, 1992; O'Reilly *et al.*, 1992; Richardson, 1995; Wu *et al.*, 2000; Lo, *et al.*, 2002; Viswanathan *et al.*, 2004)

桿狀病毒表現載體系統 (baculovirus expression vector system, BEVS) 是基於桿狀病毒生物學的充分了解而成功開發的真核表現載體系統。桿狀病毒具有如下的優勢：(1) 基因體是環狀、雙股螺旋 DNA，可利用市售之限制酶及連接酶，從事基因之改造；(2) 病毒複製期是雙相複製環，後期基因在細

胞感染 (體外增殖)下，是屬非必要基因 (nonessential genes，如多角體蛋白基因和 p10 基因)，且具強力啟動子 (promoter)，可茲利用；(3) 桿狀病毒結構為長橢圓型，可嵌入相當長的外源基因；(4) 桿狀病毒寄主域不及脊椎動物，安全無慮。自 1983 年 Smith 等人成功地利用加州目蓿夜蛾核多角體病毒 (AcMNPV) 作為外源蛋白之真核表現系統起，此桿狀病毒表現載體已成功地以重組 AcMNPV 病毒在 SF-21AE 或 SF-9 等昆蟲細胞、生產出相當多的外源蛋白。另則、1985 年 Maeda 等人亦成功地開發出，以家蠶桿狀病毒和細胞為主之 BmNPV/BM-K 桿狀病毒表現載體。桿狀病毒載體表現載體系統被發展成一廣被接受且具高產量的重組蛋白生產系統，目前此系統 (AcMNPV/SF cell) 已有商品化的組套出售，並易於操作。桿狀病毒載體表現載體系統於 1988 年首次引入台灣科學界，由國立台灣大學動物系羅竹芳教授邀請發明人 Dr. Summers, M.D. 和他的兩位同仁 Dr. Fraser, M.J.和 Dr. Valk, J.M. 於台灣大學漁業科學館 205 室舉辦研討會。此會議亦是將生物科技引入昆蟲微生物病原體研究之開端。可惜的是 1998 年桿狀病毒載體表現載體系統界折損一大將-Dr. Maeda 的巨星隕落，也使 BmNPV/BM-K 桿狀病毒表現載體的發展停滯。

桿狀病毒載體表現載體系統除具高重組蛋白產量外 (可高達細胞蛋白質之 30%)，表現的蛋白質可進行摺疊 (folding)、轉譯後修飾 (post-translation modification)、和寡聚合作用 (oligomerization)，此三項作用常如同於哺乳類細胞內所進行的作用，因此表現的蛋白質會有正確的蛋白分解 (proteolysis)、N- 和 O- 端醣化作用 (N- and O-glycosylation)、醯化作用 (acylation)、醯胺化作用 (amidation)、羧甲基化作用 (carboxymethylation)、磷酸化作用 (phosphorylation)、和 異戊烯化作用 (prenylation)。生產的蛋白質可從細胞內釋出，或送至不同的次細胞位 (subcellular locations)。單鏈 polypeptide、雙聚體、和三聚體蛋白質皆可表現。然而此系統亦有一些需要克服的缺點，轉譯後修飾作用和表現因每一外源蛋白基因構築而定。表現的外源蛋白質與實際的蛋白質 (哺乳類細胞內進行的產物) 有差異。不易從昆蟲細胞釋出，若將外源蛋白基因銜接昆蟲分泌信息序列 (insect secretion signals) 即可獲得改善。

此系統早期是架構在 VL 期高表現且非必要之基因啟動子下，如 *polyh* 和 *p10*，是屬於胞裂性的桿狀病毒載體表現系統 (lytic baculovirus expression vector system, L-BEVS)，因感染末期時，經常發生蛋白質的不當摺疊和蛋白質在胞內聚集或堆積的現象。再則感染末期時、感染的細胞會崩裂而釋出內含物，此現象是造成許多蛋白質之轉譯後修飾不完全，甚至激烈的蛋白質斷裂降解等，而導至純化上的困擾。

為了解決這些困境，可收集感染早期的細胞，但還是仍有產量上和部份蛋白質轉譯後修飾不完全的問題發生。因此建立非胞裂性桿狀病毒載體表現系統 (N-BEVS) 是有必要性。N-BEVS 的產量並不亞於 L-BEVS，而且外源蛋白質的摺疊和轉譯後修飾也較適當和完整。N-BEVS 已有商品化的組套出

售，如穩定轉染昆蟲細胞法 (stable transfected insect cells)，控制外源蛋白基因的啟動子以 IE gene 的啟動子代替晚期基因的啟動子，所以被轉染的昆蟲細胞內之 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II) 即可啟動 IE gene 啟動子，而不需要病毒的產物來驅動，經 IE gene 啟動子構築的載體所轉染的昆蟲細胞能還維持正常的活力，可以執行外源蛋白質的轉譯後修飾工作，生產優質的蛋白質。此外、利用其他基因的啟動子以構築 N-BEVS 的研究亦具有相當發展的潛力，既然 N-BEVS 能夠生產優質的外源蛋白質，並可減少純化上的困擾。由此可見 N-BEVS 之未來願景，它的發展將應能使 BEVS 邁向更廣泛、更實用的境界。

國內 BEVS 的研究以中央研究院分子生物研究所趙裕展博士所領導的研究團隊為主，成果可觀。除水母的綠螢光蛋白 (green fluorescence protein) 基因轉殖至桿狀病毒 AcMNPV，可使感染的小菜蛾幼蟲在長波 UV 光 (365nm) 的激發下、呈現明顯的綠螢光，可區分出幼蟲是否受感染外。其他如 N-BEVS 研究; HZ-1 病毒之持續性感染基因 (PAT 1 基因-*pag1*, persistency-associated gene 1) 之應用; 嘗試建立可調式桿狀病毒載體表現系統，係將四環黴素基因可調性啟動子 (tetracycline repressible promoter) 應用在 BEVS 上; 以及並進行啟動子的選汰及改造，以增強效益。榕樹透翅毒蛾軟化症小 RNA 病毒之 5'端 UTR 區序列，證實具有 IRES 的功能，稱之 PnV IRES (*P.nuda* Iflavirus internal ribosome entry site)，已被利用並進而開發出 bi-cistronic 桿狀病毒表現系統，此方面的努力、已呈現成果，正申請專利中。另外，桿狀病毒已被用在微生物防治及嘗試用於人類基因治療上，此雖皆非本計畫之重點，但也由此可窺見桿狀病毒的重要性。

豇莢螟 (*Maruca vitrata*) 屬鱗翅目 (Lepidoptera) 螟蛾科 (Lepidoptera: Pyralidae)，其寄主植物遍及荳科、胡麻科、含羞草科、蘇木科及錦葵科等5科，有報導的寄主作物共有20屬40種 (Liao and Chen, 1998; 黃啟鐘，2004)。此蟲分佈於亞洲、非洲及太平洋諸島 (Booker, 1963; Barrion *et al.*, 1987)，在台灣終年皆發生。在台灣以往文獻中如 Chang and Chen (1989) 及 Liao and Lin (2000) 均使用同種異名 (synonym) 之 *M. testulalis* (Geyer, 1832)。Heppner and Inoue (1992) 認為分佈於台灣之豇莢螟應為 *M. vitrata* (Fabricius, 1787)。

由於幼蟲喜咬食嫩葉及嫩芽，並蛀食花器及荳莢，影響作物產量及品質甚鉅。台灣中部地區，豇莢螟對荳科植物造成的損失可達 30% 以上。近年來政府推廣休耕農田種植田菁、太陽麻或大荳等綠肥作物以培養地力之措施。這些綠肥作物皆為豇莢螟的寄主植物 (黃啟鐘，2004)，由於農民在種植期間鮮少噴藥，這些綠肥作物因此變成豇莢螟大肆繁殖的溫床，因此此蟲的族群亦隨之大增，也提昇了豇莢螟對荳科經濟作物之危害程度，危害正逐年嚴重中。此外，在非洲豇莢螟經年危害長豇荳等荳科植物，而造成該地區長豇荳生產的主要因素。甚至肯亞西部地區，豇莢螟常常造成長豇荳產量之 4/5 的

損失。因此，豇莢螟的重要性，在國際間已是長年受到重視的問題。

從罹病的豇莢螟幼蟲上，發現有核多角體病毒感染之典型病徵，經電子顯微鏡的觀察及核多角體蛋白基因之PCR增幅和定序確證此病源體是核多角體病毒，而命名為豇莢螟核多角體病毒 (*M. vitrata* multiple nucleopolyhedrovirus 簡稱 MaviMNPV)。此病毒對豇莢螟二齡幼蟲的致死率可高達98%，極具發展成生物農藥之潛力。此外，豇莢螟細胞株 (NTU-MV cell) 也初步成功建立，對 MaviMNPV 感受性非常高，封埋體的產量極高，顯示 MaviMNPV 除了具有很強的啟動子外，極可能在基因體上具有某些特殊的基因，或其基因的表現具有獨特的機制。因此，豇莢螟細胞株及 MaviMNPV，亦極具開發成外源蛋白的表現系統的潛力與探討 NPV 基因互動和調控的優良材料。豇莢螟細胞株是少見高核多角體病毒接受性及高多角體產量的細胞株，具有挑戰以苜蓿夜蛾核多角體病毒 (AcMNPV) 與秋行軍蟲細胞為表現載體系統的潛力。

參考文獻

- 王重雄和黃偉峰。2001。生物技術應用於昆蟲病原體研究。台灣大學農業陳列館: 181-200。
- 王重雄、蔡璧妃、蔡恕仁。1996。昆蟲桿狀病毒殺蟲劑之研究: 生物技術之應用。台灣省農試所特刊, 57: 193-202。
- 王重雄和羅竹芳。1990。利用昆蟲細胞及幼蟲生產外源蛋白。中華昆蟲特刊, 5: 153-161。
- 吳治宇、陳盈妤、江敬皓、王重雄。2002。台灣蜜蜂小 RNA 病毒。台灣昆蟲特刊, 4: 79-92。
- 黃啟鐘。2004。田菁植物上主要害蟲之季節性消長。植保會刊, 46: 81-91。
- 黃啟鐘、彭武康、Talekar, N.S.。2002。台南亞蔬農場田菁上豇莢螟 (*Maruca vitrata* (Fabricius)) (鱗翅目: 螟蛾科) 幼蟲之族群變動。台灣昆蟲, 22: 271-278。
- 羅竹芳、郭光雄、王重雄、石正人。1990。昆蟲桿狀病毒表現載體系統之研究。科學發展, 18: 565-574。
- Anderson, W.F. 1998. Human gene therapy. *Nature*. 392: 25-30.
- Barrion, A.T., Bandong, C.G., Cruz, De La, aposts, R.F., and Litsinger, J.A. 1987. Natural enemies of the bean pod borer *Maruca vitrata* in the Philippines. *Trop. Grain Legume Bull.* 34: 21-22.
- Benz, G.A. 1986. Historical perspective in *The Biology of Baculoviruses*, Vol.1 (ed. by Granado and Federici). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida :1-36.

- Booker, R.H. 1963. Notes on the pest complex of cowpea in Northern Nigeria. Proc. Ist. Nigerian Grain Legume Conf., Inst. Agri. Res., Samaru, Zaria, Nigeria, pp. 9-12.
- Chang, T. C. and Chen, C. C. 1989. Observation of three lepidopterous pests attacking leguminous vegetables in Taiwan. Bull. Taichung District Agri. Impr. Stat. 24: 21-29 (in Chinese).
- Chou, C. M., C. J. Huang, C. F. Lo, G. H. Kou, and C. H. Wang. 1997. Molecular cloning and nucleotide of the *Perina nuda* nucleopolyhedrovirus (PenuNPV) p10 gene. Zool. Stud. 36: 48-57.
- Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., and Brown, F. 1991. Classification and Nomenclature of Viruses: Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. Arch. Virol. 2, 117-123.
- Heppner, J. B., and Inoue, H. 1992. Lepidoptera of Taiwan. Vol. I, Part 2: Checklist. Association for Tropical Lepidoptera. Gaineville.
- Herniou, E.A., Olszewski, J.A. Cory, J.S. and O'Reilly, D.R. 2003. The genome sequence and evolution of baculoviruses. Ann. Rev. Ento., 48, 211-234.
- King L.A. and Possee, R.D. 1992. The baculovirus expression system: a laboratory guide. Chapman & Hall, London, pp. 229.
- Liao, C. T., and Lin, C. S. 2000. Occurrence of the legume pod borer, *Maruca testulalis* Geyer (Lepidoptera: Pralidae) on cowpea (*Vigna unguiculata* Walp) and insecticides application trial. Plant Prot. Bull. 42: 213-222.
- Liao, C.T. and Chen, C.C. 1998. Distribution of *Maruca testulalis* Geyer (Lepidoptera: Pyralidae) eggs and larvae on Sesbania. Bull. Taichung DAIS 59: 47-52.
- Lo, J.R., Chou, C.C., Wu, T.Y., Yuen, J.P.Y., and Chao, Y.C. 2002. Novel baculovirus DNA elements strongly stimulate activities of exogenous and endogenous promoter. J. Biol. Chemistry 277: 5256-5264.
- Lois M. K.. 1997. Regulation of baculovirus late and very late gene expression. pp. 193-216. In: The Baculoviruses. Plenum Press. New York and London.
- Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y. and Furusawa, M. 1985. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. Nature 315: 592-594.
- Mitsuhashi J. 2002. Invertebrate tissue culture methods. Springer, pp446
- O' Reilly D.R., Miller L.K., and Luckow V.A. 1992. Baculovirus expression

- vectors: a laboratory manual. W.H. Freeman and Company. pp.347.
- Richardson C.D. 1995. Baculovirus expression protocols. Humana Press. pp. 418.
- Shih, C.J., Lin, R.w., and Wang C.H. 1997. Establishment of a cell line from *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and replication of *S. litura* nuclear polyhedrosis virus *in vitro*. J. Invertebr. Pathol. 69: 1-6.
- Smith, G.E., Summers, M.D., and Fraser, M.J. 1983. Production of human beta-interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell. Biol. 3: 156-165.
- Steinhaus, E.A. 1947. Insect Microbiology. Comstock Publishing Company, Inc. 763 pp.
- Summers, M.D. and Smith, G.E. 1988. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedure. Texa A&M University, College Station, Texas. 59pp.
- Tanada, Y. and Kaya, H.K. 1993. Insect Pathology. Academic Press, New York. 666pp.
- Theilmann, D.A., Blissard, G.W., Bonning, B., Jehle, J., O'Reilly, D.R., Rohrmann, G.F., Thiem, S. and Vlak, J.M. 2005. Family Baculoviridae in "Classification and Nomenclature of Viruses: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus" ed. By Fauquet et al. Elsevier Academic Press, 117-185.
- Viswanathan, K., Chao, Y.C. Hsum J.T.A. and Betenbaush, M. 2004. In "Protein expression Technologies: Current Status and Future Trends". Chapter VIII, Insect Cell Expression Systems, p387-426. Caister Academia Press, Norfolk, UK.
- Wang, C.H., Chou, C.M., Liu, H.C., Kau, S.L., and Lo, C.F. 1996. Continuous cell line from pupal ovary of *Perina nuda* (Lepidoptera: Lymantriidae) that is permissive to nuclear polyhedrosis virus from *P. nuda*. J. Invertebr. Pathol. 67: 199-204.
- Weiss, S.A., Godwin G.P., Gorfien S.F., and Whitford W.G. 1993. Serum-free media in Insect cell culture engineering (Ed. by M.F. A. Goosen, A.J. Daugis, and P. Faulkner). Marcel Dekker, Inc. P. 179-194.
- Wu, C.Y. and Wang C.H. 2005. Characterization and polyhedron gene cloning of *Lymantria xyliana* multiple nucleopolyhedrovirus. J. Invertebr. Pathol. 88: 238-246.

- Wu, C.Y., Lo, C.F., Huang, C.J., Yu, H.T., and Wang C.H. 2002. The complete genome sequence of *Perina nuda* picorna-like virus, an insect-infecting RNA virus with a genome organization similar to that of the mammalian picornaviruses. *Virology*, 294: 312-323.
- Wu, T.Y., Chen S.L., Chen C.Y. and Chao Y.C. 2000. Expression of highly controllable genes in insect cells using a modified tetracycline-regulated gene expression system. *J. Biotechnol.* 80, 75-83.
- Yang, S., and L. K. Miller. 1999. Activation of baculovirus very late promoters by interaction with very late factor 1. *J. Virol.* 73:3404-3409.
- Zhao, Y., A. G. C. David, and I. M. Jones. 2003. Improving baculovirus recombination. *Nucleic Acids Res.* 31: 2.

材料與方法

一、供試昆蟲及病毒來源

莖葉螟 (*Maruca vitrata*) 及罹核多角體病幼蟲係由南台科技大學生物技術暨研究所李松泰教授所提供。

二、培養液

利用 TNM-FH 培養液並添加不同胎牛血清 (0, 4, 8, 和 16%)、抗生素 [50IU 青黴素 (Penicillin)、50 µg/ml 鏈黴素 (Streptomycin)] 及 1.25 µg/ml 抗黴素 (Fungizone)。若作初級培養則添加物皆為正常之 2 倍。

無血清培養液係購自 Invitrogen 公司代理的 SF-900II SFM 培養液 (美國 Invitrogen 公司產品)。

三、初級培養

依照以往發表的方法 (Wang *et al.*, 1996; Shih *et al.*, 1997)，略加修改，簡述如下：將蛹化後，1~2 日齡的蛹體先經 70% 乙醇浸泡 5 分鐘，以作表面滅菌，再放入無菌操作台內，吹乾。將 70% 乙醇滅菌的蛹體以昆蟲針固定於操作台上，再利用碘酒擦拭表面 3 次，再次滅菌。待碘酒乾後，利用眼科剪，剪開腹部背表皮，再利用微量吸管吸取蟲體內含物，並確定蛹體內消化道的完整性，以免腸內菌的污染。將吸取物直接注入 25T 培養皿內 5 毫升之含有 2× 血清、抗生素、及抗黴素的培養液中，並靜置於 28°C 恆溫箱內，並每二日觀察種殖之組織變化及細胞移行的情況。

四、繼代培養

將有細胞移行的培養皿以號碼登記，每星期取出 1/3 量 (約 1.5 ml) 的培養液，並加入等量的新鮮 2X 培養液，並靜置之，待細胞長滿培養後進行繼代培養。利用輕搖方法加入 1:1 之條件與新鮮培養液的混合培養液。條件培養液係取自對數期之行軍蟲細胞株 (Sf-9 cell line) 之培養液，並經離心及 0.45 µm 孔徑的丟棄式無菌過濾頭過濾。經繼代培養成功的細胞株，每 3~5 日觀察細胞株生長狀況，依細胞情況再進行繼代培養，至 20~25 代數後，細胞增殖加快，則可逐漸減少抗生 (黴) 素及血清含量，至 1× 抗生 (黴) 素、8% 的胎牛血清。

五、連續細胞株 (Continuous cell line) 之建立

增殖之細胞株達到繼代培養 50 代亦或一年以上增殖及繼代 (依照脊椎動物細胞株之定義)，可認為已建立連續細胞株。將部份細胞及培養液以相同的體積之含 20% DMSO 培養液混合後，先於 -20°C 下 1 小時，再於 -80°C 冰箱內 12 小時後，存於液態氮桶內，以作永久保存。

六、無血清培養液之培養

利用市售之 SF-900II SFM 培養液培養細胞，求出其生長曲線及倍增時間，

並與含血清培養液比較 (與第九項含血清培養之細胞特性: 生長曲線、病毒接受力等作比較)。

七、病毒的來源

將確定罹核多角體病毒的蟲體，加入 5 倍體積之培養液，並經 Vortex 之劇烈震動，並已水化的幼蟲體進一步液化，將此液體先經不繡鋼密網過濾後的液體，經 3500 rpm/min 離心 15~20 分鐘，取出上清液，再經 0.45 μm 孔徑的丟棄式無菌過濾頭過濾，此過濾即可為感染細胞之病毒液。

八、病毒體外增殖系統之建立

將細胞 3×10^6 cells/flask 種於 25T 培養皿內，待細胞貼附於約 80% 的培養皿面積，將培養液吸走，加入 1 毫升之病毒液 (由第七項製作)，經吸附 1 小時後，吸走病毒液加入 4.5 毫升的培養液，放於 28°C 恆溫培養箱內，每 3~4 天觀察一次。首次感染則依細胞毒素而引發的細胞病變狀況，作病毒繼代感染。重複上述的感染方式。若無明顯的細胞病變，可在繼代感染 5~10 代 (約每 7 天 1 代) 之間，進行核多角體病毒之 PCR 檢測 (Wang *et al.*, 2000)。若已呈現典型核多角體細胞病變，再作繼代感染，直到呈現的核多角體細胞病變穩定後，測定病毒力價 (Summers and Smith, 1988)。

九、荳莢螟細胞株特性之建立

本方法採用 Summers and Smith (1988) 之方法:

(一) 生長條件之確立：基本的方法如 (二) 所述

I、種殖細胞濃度之效益 (plating efficiency): 十倍稀釋的細胞濃度，種殖後形成細胞群落數。

II、細胞培養溫度 (8、20、28、和 37°C) 及血清濃度 (0、4、8、和 16%)

III、繼代培養的時間間隔：由 I 和 II 結果預估繼代培養間隔的時間。

(二) 細胞特性

I、細胞之外表形態：將生長於對數生長期的細胞，放置於位相差顯微鏡下觀察其大小、形狀及比例。

II、生長曲線之建立：與培養溫度及血清濃度之關係

1. 不同胎牛血清濃度之生長曲線

將細胞自培養皿 (flask) 上拍下，以血球計數器求得細胞總數。將每一個 25T 的培養皿 (flask) 種入 6×10^6 個細胞，放置於水平台上使其貼附於培養皿內，待貼附完全，則將舊的培養液倒出，個別換入 0%、4%、8%、和 16% 血清濃度和完全不含血清之 SPF-900 培養液 5ml，之後靜置於 28°C 定溫箱內每隔 24 小時以 Olympus CWHK 10x/18L 之目鏡計算細胞數目。每個培養皿內以隨機之方式

取出五個地點作為五個重複，最後刪去最大及最小值再作平均推算出培養皿內之所有細胞數，總共計算八天。

2. 不同溫度下之生長曲線

將細胞自培養皿 (flask) 上拍下，以血球計數器求得細胞總數。將每一個 25T 的培養皿 (flask) 加入 6×10^6 個細胞，放置於水平台上使其貼附於培養皿內，待貼附完全，則將舊的培養液倒出，加入 8% 血清濃度之培養液 5ml，之後分別靜置於 8°C、20°C、28°C、和 37°C 之定溫箱內每隔 24 小時以 Olympus CWHK 10x/18L 之目鏡計算細胞數目。每個培養皿內以隨機之方式取出五個地點作為五個重複，最後刪去最大及最小值再作平均推算出培養皿內之所有細胞數，總共計算八天。

III、細胞倍增時間之確定

由 II 的結果，取出對數期之資料，計算出細胞倍增時間與培養溫度及血清濃度之關係。

IV、細胞染色體數目分佈圖之建立

取對數生長期之細胞，加入濃度為 $1.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 之秋水仙素約 1200 μl 於 75T 之培養皿內，放置於 28°C 定溫箱內 4 小時後，拍下細胞倒入 15ml 離心管內，剩餘沒被拍下之細胞，以細胞刮勺將細胞刮下倒入離心管內，以 800 rpm (Hettich Universal 30F/RF) 離心 10 分鐘，僅留 2ml 之上清液，其於倒掉，加入 4 倍體積的水使細胞膨脹，每隔 20 分鐘，至相位差顯微鏡下觀察細胞是否有脹大。若細胞已脹大，則加入醋酸：酒精 = 1：3 之固定液 10ml，放於 4°C 冰上 10 分中，再以 800 rpm (Hettich Universal 30F/RF) 離心 10 分鐘，離心完後到掉上清液，再加入新的固定液，且重複上述步驟 5 次。最後一次離心，留下 1.5 ml 之上清液不要倒掉，並把細胞沉澱沖散之，之後從高處將細胞液滴在乾淨之玻片上。以 Giemsa 染劑染 5 分鐘，再以水將多餘的染料沖掉，之後依次以 70%、80%、95%、100% 之酒精脫水，再以封片膠封片之。將做好的玻片於光學顯微鏡下觀察，並計算其染色體之數目。

V、同功異構酶之圖譜

將對數生長期之細胞以細胞刮勺刮下，放至於 15ml 離心管內，利用血球計數器計算細胞數目再以 900 rpm (Hettich Universal 30F/RF)，4°C 離心 10 分鐘，倒去上清液，加入適量的二次去離子水，使細胞濃度為 1.5×10^8 cells / ml。將細胞放入液態氮內 30 秒，再放入 37°C 水浴槽內解凍，重覆此步驟五次，確定已把細胞脹破，再以 14000 rpm 離心 5 分鐘，取出 10 μl ，置入 5% 的 polyacrylamide 膠內，以 5 mA 的電流跑 3 小時，測試 esterase, lactate dehydrogenase (LDH) 和 malate dehydrogenase (MDH) 三種酵素，比較不同細胞之圖譜。

VI、細胞 DNA 標誌

rDNA (尤其 ITS1-5.8S-ITS2) 之定序以與蟲體 DNA 比較證實其來源。或以 RAPD- PCR 增殖，實驗室已有的細胞，以區別，並防細胞污染。方法如下：自培養皿中取適量之細胞及蟲體，以商業套組 (Genemark[®] Tissue & Cell Genomic DNA Purification Kit) 萃取細胞中的 DNA。取適量 DNA，利用引子對：ITS1 區段 ITS1-1: 5' CCCCCA TAAAC GAGGA ATTCC 3'/ ITS1-2: 5' GCAGT TCACA CTATG ACGCG C 3'; ITS2 區段 ITS2-1: 5'GCGCG TCATA GTGTG AACTG C 3'/ ITS2-2: 5' TCCTC CGCTT ATTGA TATGC 3'，以 PCR 增幅出 ITS1 和 ITS2 基因片段，定序後比較序列，以確定來源。

自培養皿中取適量之細胞 (MV, SF, 及 SL 細胞)，以商業套組 (QIAamp DNA Mini Kit[®] (QIAGEN)) 萃取 DNA，取適量 DNA，加入逢機引子及反應液 (dNTP、buffer、Taq、ddH₂O)，進行 PCR 增幅。試驗所使用的逢機引子為商品化的試劑組 OPU-A 和 OPU-BD (Operon)，每組含有 20 種引子。PCR 增幅後之產物，進行電泳分析。

(三) 病毒感受性

利用已有的具不同的種的病毒株，如 AcMNPV、PenuNPV、LyxyNPV、Ld-likeNPV 及同源的 MvNPV 感染，並觀察細胞病變。並以增殖後的病毒與來自蟲體病毒之 DNA 限制酶圖譜之比較，以證實二者來自同源 (見十之 4、5 & 6)。

十、荳莢螟核多角體病毒特性

(1) 病毒之形態

電顯觀察：將感染病毒之細胞用細胞刮勺刮下，倒入一 15ml 之離心管內，以 900 rpm (Hettich Universal 30F/RF)，4°C 離心 10 分鐘，將上清液倒去，加入 5% 的 glutaraldehyde 固定 4 小時，再換以 1% 的鐵酸鉀固定 3 小時，以二次去離子水沖洗三次，每次 10 分鐘，再將 0.2% 的醋酸鉀加入後靜置於 4°C 冰箱內，隔夜之後再以序列濃度的酒精 (70%-100%) 進行脫水，脫水完後封埋於樹脂內。包埋好之樣品，以 Reichert OMU 3 ultramicrotome 切片，再用醋酸鉀和檸檬酸鉛染色。以 Hitachi H7100 之電顯觀察所切下之切片。

(2) 病毒效價之測定 TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose)

將已建立之病毒液做 10 倍連續稀釋，取每孔 0.1ml 感染已培養有荳莢螟細胞株之 96 孔盤 (6.0×10^4 cells/well)，每排孔加入相同稀釋度之病毒液 (從 10^{-1} 至 10^{-10})，置於 28°C 之培養箱內，約 10 日後觀察細胞病變並記錄，TCID₅₀ / ml 的結果以 Reed 及 Muench 的方法計算。

(3) 不同血清濃度下之細胞所能產生之核多角體的數量

將 6×10^6 個對數生長期細胞貼入 25T 之培養皿內，再分別加入 0.025 ml 和 0.05 ml (m.o.i. 約 5-10) 之病毒液於 5 ml 之 4% 和 8% 血清濃度和完全不含血

清之 SPF-900II SFM 培養液之培養基內，(每一處理五重複) 放置於 28°C 下 20 天，將培養皿內之培養液倒入 15 ml 離心管中，加入 lysis buffer 4ml 於培養皿內約 20-30 分鐘，待細胞被分解後，在將液體到入離心管內，並以 3,500 rpm (Hettich Universal 30F/RF) 於 4°C 下離心 10 分鐘將含有多角體的細胞沈澱，並倒除上清液。以 PBS 將沉澱沖洗，且用震盪器均勻震盪之，3,500 rpm (Hettich Universal 30F/RF) 於 4°C 下離心 10 分鐘，倒去上清液，加入 3ml 之無菌水回溶沉澱物，用震盪器均勻震盪後，以血球計數器計算各處理下 PIB 之產量。

(4) 多角體 (OBs) 之純化

以上述方法將多角體自細胞內釋放出，懸浮於無菌水內。再將此懸浮液加在 40% ~ 65% (W/W) 的蔗糖連續密度梯度 (sucrose gradient) 上，使用超高速離心機，在 4°C 下以 24,000 rpm 離心 30 分鐘，即可發現包涵體聚集的白色環帶，吸出後再加入二次蒸餾水稀釋三倍後，以 4,500 rpm (Hettich Universal 30F/RF) 於 4°C 下離心 30 分鐘後，倒除上清液，即可得到純化之多角體，將其存於 4°C 或 -20°C 備用 (Wang *et al.*, 1996)。

(5) 病毒 DNA 之萃取

取經蔗糖連續密度梯度離心純化的多角體，加入以 TE 緩衝液稀釋 3X DAS (diluted alkaline solution) 溶液，成一倍使用，經劇烈振盪 5-10 分鐘後，於顯微鏡下鏡檢，直至多角體完全溶解後。再用 40% ~ 65% (W/W) 的蔗糖連續密度梯度以 4°C 24,000 rpm 離心 1 小時，離心後可見數條白色之核多角體病毒聚集帶，將其收集後再以 3 倍體積的二次去離子水稀釋，再於 4°C 24,000 rpm 離心 1 小時將病毒粒子 (virion) 沈澱，倒去上清液後，以少量的 1X TE 緩衝液使病毒粒子再懸浮，加入 1/10 體積的 10% SLS 及 1/10 體積的 1M KCl 和 1/10 體積的 proteinase K (10 mg/ml)，於 65°C 水浴作用 3 小時以上，再加入等體積的酚 (phenol) 與 DNA 充份混合，以 14,000 rpm (KUBOTA 1300) 在 4°C 下離心 5 分鐘，將上層液吸出放入一新的微量離心管內，再加入 2 倍體積的氯仿 (chloroform)，充份混合後以 14,000 rpm (KUBOTA 1300) 於 4°C 下離心 10 分鐘，吸取上層液到另一微量離心管中，加入 1/10 體積的 3M NaOAc (sodium acetate) 和 2 倍體積的絕對酒精，充份混勻後放入 -70°C 沈澱 30 分鐘，取出後以 14,000 rpm (KUBOTA 1300) 在 4°C 下離心 30 分鐘，將 DNA 沈澱下來，倒去上清液，並於加入 70% 酒精浸潤後隨即倒去，放入烘箱內烘乾後加入適量的二次去離子水放入 65°C 水浴處理 15 分鐘，最後置於 -20°C 備用。

(6) 病毒 DNA 之限制酵素圖譜分析

為確定所建立之病毒株與野生之病毒株系出同門。將兩者病毒株之基因組 DNA 萃取出，分別以不同限制酶 (*Bgl*II、*Eco*RI、*Hind*III、*Pst*I、) 於 37°C 下作用 2 小時，將產物置於 1% 的瓊脂膠片進行電泳分析，確定經過限制酶處理後之片段，是否有無不同。

(7) 聚合酶鏈反應 (PCR)

進行聚合酶鏈反應 (PCR) 時，取適量之樣品，分別加入 dNTP 混合液至最終濃度為 0.25mM、正負向引子各 1 μ l (0.5mg/ μ l)、5 μ l 10X reaction buffer (Promega) 及 0.5 μ l Taq DNA polymerase (5unit/ μ l, Promega)，再加二次滅菌水至總體積為 50 μ l，進行 PCR (AG-9600 Thermal Station, Biotronics Corp. Lowell, Mass. USA) 反應。本實驗所使用的 PCR 反應共包括 7 個步驟：(1) 初變性 (initial denaturation) -- 95 $^{\circ}$ C 2-3 分鐘；(2) 黏合 (annealing) -- ITS1 區段 60 $^{\circ}$ C，ITS2 區段 56 $^{\circ}$ C 30 秒；(3) 延伸 (extension) -- 72 $^{\circ}$ C 0.5 - 2 分鐘；(4) 變性 (denaturing) -- 95 $^{\circ}$ C 30 秒；(5) 重複步驟 (1) 至 (4) 共 25 個循環；(6) 最終延長 (final extension) -- 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘；(7) 最後保存於 15 $^{\circ}$ C。取 10 μ l PCR 產物以含溴化乙錠 (EtBr) 之 1X TAE 緩衝溶液用 1% 的瓊脂膠片進行電泳分析。

十一、荳莢螟核多角體病毒體外增殖最佳化條件之建立：

MvNPV 感染的 M.O.I. 及細胞生長條件確立後，以得最佳感染效果，兩項單株化工作需同時進行。

(1) 荳莢螟細胞單株化

由於荳莢螟細胞株內含有 3 種以上不同形態的細胞，在細胞的生長及病毒的感受性亦呈不同的差異，雖然目所建立的細胞株之荳莢螟核多角體病毒的多角體產量已達每個細胞 20 粒以上，然而細胞株內能呈核多角體病毒的典型細胞病變 (細胞變圓、細胞核脹大、核內充滿多角體、感染末期細胞分解、多角體充斥培養瓶中) 只達 60~70% 的感染細胞，若能挑選出高接受力的細胞所形成的細胞株系，則相信每細胞可達 40 顆以上的產量。

(2) 細胞株之單株化工作依據

將以每培養皿約 100 顆細胞的量接種於 3cm 直徑的培養皿，待細胞群落形成 (10~20 天)，取出單一群落分列培養於 24 孔培養皿，待細胞長滿後，將 1:1 的方式再接種於另一新 24 孔培養皿，其中一培養皿作病毒接受力的試驗，每一單孔加入 0.2 毫升的病毒液，以典型細胞病毒及多角體之產量的依據。挑選出高接受力的孔，並將孔內的細胞移殖出，種於 25T 培養皿，長滿後作繼代培養，並作病毒感染試驗，選出其中高病毒接受力的細胞株。再將此細胞株作特性的鑑定以多爾後，專利及鑑定的依據。

(3) 荳莢螟核多角體病毒之單株化

新建立的荳莢螟細胞株對同源的核多角體病毒呈高度接受性。在第一次嘗試建立核多角體病毒體外培養系統，於感染後第三至四天即可見有典型的核多角體病毒細胞病毒，相較於 PenuNPV/PN-HH Cells (透翅毒蛾核多角體病毒體外增殖系統) 需繼代感染 20 代，LyxyNPV/LY cells (黑角舞蛾核多角體病毒體外增殖系統) 之 8~10 代來得快速，相信此病毒株已是具高感染力的病毒株，但為爾後研究的準確性，病毒之單株化工作必需進行。

病毒單株化的方法，採用限數稀釋法 (limiting-dilution method)，將病毒懸浮

液作連續之 10 倍稀釋，將稀釋 10^7 和 10^8 的病毒液，接種於種有細胞的 96 孔培養皿中，每稀釋濃度各作 4 盤，1 至 2 週後，排選出有明顯細胞病變的孔，再放大接種於 24 孔已有細胞的培養皿，再次確定病毒的感染力後，選出符合爾後研究的病毒。挑選的標準：(1) 具有典型的細胞病變，(2) 高感染力，至少 90% 感染細胞具典型細胞病變，(3) 細胞病變需在感染後 18~24 小時呈現，(4) 病毒液具高病毒力價 (10^8 TCID₅₀ 以上)。

(4) 培養液血清濃度對核多角體量產的影響

以含 4% 及 8% 胎牛血清及市售 SF-900II SFM 無血清之培養液培養下的細胞，接種相同 M.O.I. 的病毒液，比較核多角體之產量，並評估經濟效益。

十二、荳莢螟細胞株及荳莢螟核多角體病毒之量產

(1) 荳莢螟細胞利用搖瓶方式及攪拌培養可作 3D 的培養，以多生物反應器之量產時的前驅試驗。方法依據 Summers & Smith (1988) 的方法進行之。並試驗出最佳接種細胞數、血清濃度、生長曲線、搖盪及攪拌的速度，以及饋料補充的時機。評估指標以細胞生長之速率，並比較無血清培養液下，二者速率之差別。

(2) 核多角體之量產：利用已建立量產細胞法，在細胞對數接種病毒，找出最佳的每細胞感染有效之病毒粒子量 (M.O.I.)，以及回收多角體之時機。評估指標是以每細胞多角體產量為準，比較有否血清之培養液下多角體產量之差別。

十三、表現載體之建立 (Chou et al., 1997; Lois, 1997; Yang and Miller, 1999; Zhao et al., 2003; Wu and Wang, 2005)

昆蟲多角體病毒非常晚期基因 (very late expression gene), p10 基因及核多角體蛋白 (polyhedrin) 基因 為非必要的結構性蛋白基因，因此多角體病毒缺乏這些基因，並不會影響多角體病毒在昆蟲細胞及幼蟲體內的複製與增殖 (Lois, 1997); 又因其具有強啟動子，可大量表現蛋白質，因此可利用限制酵素切割此結構性基因後，再接入目標外源基因，在該強勢啟動子的驅動下大量表現外源蛋白。本實驗即利用荳莢螟核多角體病毒之多角體蛋白基因及 p10 基因之啟動子，構築傳送載體 (transfer vector)，以建立新的表現載體系統。

方法略述如下：

(1) 病毒 DNA 轉染細胞條件的測試

萃取的病毒 DNA 以兩種轉染方法進行：(a) 磷酸鈣沈澱法：依據 Summers and Smith (1988) 方法行之；(b) 脂球法 (liposome)：依據供應廠商所提供方法進行 (Cellfectin, 美國 Invitrogen 公司產品)。

(2) 重要基因之選殖及傳送載體之建立：

表現載體常用之啟動子，多角體蛋白基因、P10 基因及立即早期基因之選殖，可利用高保守性片段所設的引子，先經 PCR 增幅，再將增幅片段定序確定後，此片段作為探針，以南氏轉印法，選殖出含有這些基因的限制酶切割片段，並轉

移入質體 (pUC 18) 內，此確定功能之基因片段作為探針，進行南方墨點法，選殖出含有這些基因的限制酶切割片段，並轉移入質體 (pUC 18) 內，並再加以定序，以得到該基因前後之序列。另以 5' RACE (5'-rapid amplification of cDNA ends) 和 3' RACE (3'-rapid amplification of cDNA ends) 以確認轉錄起始位置。將多選殖基因片段殖入啟動子之後，再將基因之開放譯讀區 (ORF) 剔除，保留子基因 ORF 之 5' 及 3' 片段以為傳送載體。構築含有報導基因：綠色螢光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 基因的傳送載體，再將病毒 DNA 與含有 啟動子及 GFP 的傳送載體共轉染於蒼蠅細胞。利用限數稀釋法 (limiting-dilution method) 接種於 96-well 盤，以螢光作重組病毒的選殖並檢測啟動子之功能。

(3) 重組病毒感染試驗

3×10^6 NTU-MV 細胞和 Sf9 細胞分別種在 25T，以 10 M.O.I. eGFP 重組之 MaviMNPV 和 AcMNPV 進行搖晃感染一小時後更換新的培養液，將細胞在 28°C 下培養，五天後利用流式細胞儀進行細胞螢光訊號計量。

(4) eGFP 重組之 MaviMNPV 感染試驗

4×10^5 個 Sf9 細胞與 MV 細胞種在 4 wells 細胞培養盤內，以 10 M.O.I. eGFP 重組之 MaviMNPV 搖晃感染一小時後更換新的培養液，將細胞在 28°C 下培養，每天觀察細胞病變狀況，在感染七天之後計算感染之細胞數。

結果與討論

一、初級培養與繼代培養

新建立之永久連續細胞株是從豆莢螟 (*Maruca vitrata*) 的蛹體組織培養成功 (圖一 A)，在進行初級培養期間，可觀察到由豆莢螟蛹體組織增生之 MV 細胞 (A) 自行移行出 (圖一 A)。再經過 50 次以上之累代飼育後，可知此細胞株是於一連續細胞株 (continuous cell lines)，且將其命名為 NTU-MV (圖一 B)，此 NTU-MV 細胞株除可培養於 TNM-FH 培養液和無血清培養基 Sf900 (Invitrogen, USA)。將此 NTU-MV 細胞株進行再選殖 (subclone) 後，可得兩株次細胞株：NTU-MV-1 (圖一 C) 與 NTU-MV-56 (圖一 D)。此三株豆莢螟細胞株已繼代一年餘並以超過 100 代，顯示該細胞株已是連續細胞株。分別將該三株豆莢螟細胞株 NTU-MV、NTU-MV-1 以及 NTU-MV-56，置於位相差顯微鏡 (Olympus IX-71)，觀察其細胞形態，並根據標準放大倍數 (calibrated magnification factor) 分別於該三株豆莢螟細胞株中各測得 30 個細胞之大小，並取其平均測量值，其結果如表一所示。

由圖一可知，此三株豆莢螟細胞株 NTU-MV (B)、NTU-MV-1 (C) 以及 NTU-MV-56 (D) 皆由四種不同形態之細胞所組成，其包含：圓形細胞 (round cell, R)、梭狀細胞 (spindle-shaped cell, SP)、多棘形細胞 (polymorphic cell, P) 以及逗號細胞 (comma cell, C)；而各豆莢螟細胞株中所含之主要細胞形態以及各形態細胞之分布量，皆不盡相同，其中，NTU-MV 與 NTU-MV-1 細胞株中以多棘形細胞佔最大比例 (分別佔 35% 和 36.5%)；而 NTU-MV-56 則是以圓形細胞為其主要組成細胞之形態 (佔 82%)。

二、MV 細胞生長曲線

使用 0%、4%、8%、16% 血清濃度的 TNM-FH 培養液來培養 MV 細胞，MV 細胞複製一次所需的時間分別為 46.53、33.29、27.76 和 27.24 小時 (圖二)，而使用不含血清的 Sf900 培養液下，MV 細胞複製一次所需的時間為 37.47 小時。所以若需構築表現載體而需使用無血清的培養液來培養細胞時，則可使用 Sf900 培養液，來取代完全不含血清的 TNM-FH 培養液，這樣 MV 細胞可以生長的較快速。MV 細胞在血清濃度為 4% 和 8% 下複製一次所需的時間不具顯著差異，所以在培養細胞時即可使用 4% 血清濃度的培養液，以減少生產成本。

三、細胞染色體數目分佈圖

MV 細胞的染色體和一般常見的鱗翅目染色體一樣成圓點狀 (圖三 A)，其染色體數目介於 16 到 268 之間，平均值是 68 條，以 42 條染色體者為最多 (圖三 B)。

四、同功異構酶之圖譜

培養於 TNM-FH 之三株豆莢螟細胞株 NTU-MV、NTU-MV-1 與 NTU-MV-56，與其他昆蟲細胞株：吉普賽舞蛾細胞株、榕樹透翅毒蛾細胞株，培養於無血清培養液 Sf900 之 NTU-MV 細胞株與秋行軍蟲細胞株之同功異構酶電泳圖譜。由圖中可知，三株豆莢螟細胞株：NTU-MV、NTU-MV-1 與 NTU-MV-56 之酯酶、蘋果酸去氫酶與乳酸去氫酶的酵素圖譜，所顯現之條紋數目及泳動距離皆相同 (圖四)，此表示該些細胞株皆從於同一群，且經次培養所得之豆莢螟細胞株：NTU-MV-1 與 NTU-MV-56 確實係源自 NTU-MV；而相較於同為鱗翅目但不同科之吉普賽舞蛾細胞株、榕樹透翅毒蛾細胞株與秋行軍蟲細胞株的酵素圖譜樣式則完全無相似之處，此顯示所建立之三株豆莢螟細胞株 NTU-MV、NTU-MV-1 與

NTU-MV-56 為前所未見之新細胞株。此外，當豆莢螟細胞株 NTU-MV 培養於無血清培養基 Sf900 時，其所呈現之酵素圖譜樣式與培養於含血清之 TNM-FH 培養基所示電泳條帶分佈形態相似，意即以無血清培養基所增殖之豆莢螟細胞株 NTU-MV，其細胞特徵與種源仍維持不變，不會因為血清的缺乏而培養出不同特徵的細胞株。

五、豆莢螟細胞株之內轉錄間隔區 (internal transcribed spacer, ITS) 分析

豆莢螟細胞株 NTU-MV 以及秋行軍蟲細胞株 (Sf9) 所含內轉錄間隔區 (ITS) DNA 序列圖譜之比對結果。豆莢螟細胞株 NTU-MV 與豆莢螟幼蟲體之內轉錄間隔區 (ITS) 的 DNA 序列相似度高達 98%，而豆莢螟細胞株 NTU-MV 與秋行軍蟲細胞株 (Sf9) 之內轉錄間隔區 (ITS) 的 DNA 序列相似度僅有 60%，因此可證明豆莢螟細胞株 NTU-MV 確實係自豆莢螟幼蟲體分離而建立之細胞株。

六、豆莢螟細胞株之病毒感受性分析

1. 病毒型態

新建立豆莢螟細胞株 NTU-MV 及其再選殖的 NTU-MV-1 和 NTU-MV-56，在接種豆莢螟核多角體病毒三天後，受感染細胞所含多角體病毒顆粒(圖五)。由於昆蟲細胞受感染後期，昆蟲細胞核內會出現許多增殖之病毒顆粒 (virion, V)，各病毒顆粒主要係由核蛋白質鞘 (nucleocapsid, N) 與包覆於核蛋白質鞘外之病毒外膜 (virion envelope, VE) 所組成，同時病毒之多角體蛋白基因會開始啟動，並產生多角體蛋白 (polyhedrin, Ph)，而病毒顆粒會隨機封埋於多角體蛋白 (Ph) 內，進而形成包埋體 (OB)，亦稱為核多角體 (polyhedral inclusion body, PIB)。故從第六 B 圖中可觀察到，受感染昆蟲細胞之細胞核中出現有未被多角體蛋白 (polyhedron, Ph) 包埋之病毒顆粒 (virion, V) 或成群聚集之病毒顆粒 (virogenic stroma, VS) 以及包埋有病毒顆粒之多角體蛋白 (Ph)，且細胞核內出現有染色質於細胞核膜邊緣聚集形成染色質團 (C) 之細胞凋亡前的現象；而從第六 A 圖中可進一步觀察到單一個包埋體 (OB) 之構造形態，包埋體 (OB) 係由多角體蛋白 (Ph) 包埋住一個至多個病毒顆粒 (V) 所形成，而單一個病毒顆粒 (V) 又由病毒外膜 (VE) 包覆數個核蛋白質鞘 (N) 而形成，並將病毒顆粒 (V) 層層封埋於包埋體 (OB) 內，直到被感染細胞被分解後，包埋體 (OB) 才會釋出進而造成蟲與蟲之間的感染。

2. 不同細胞株所產生核多角體及胞外病毒之數量

新建立豆莢螟細胞株 NTU-MV、NTU-MV-1 與 NTU-MV-56，以及培養於無血清培養基 Sf900 之 NTU-MV，在接種豆莢螟核多角體病毒一星期及兩星期後，各細胞平均產生之多角體病毒數量。由圖中可觀察到，在病毒感染一周時，NTU-MV-56 細胞株之每個細胞便可生產 25 個多角體病毒，而各細胞株在病毒感染二周後，平均每個細胞可生產 45 個以上的多角體病毒，僅培養於無血清培養基 Sf900 之 NTU-MV (MVSf900) 細胞株之病毒產量較低，其平均每個細胞可生產 25 個多角體病毒(圖七)。由表二中可看出四種細胞被 MaviMNPV 病毒感染一個星期後，其產生的胞外病毒的效價約為 6.3×10^6 - 1.7×10^8 ，被 MaviMNPV 病毒感染二個星期後，胞外病毒的效價約為 3.8×10^7 - 2.5×10^8 ，四種細胞所產生的胞外病毒的效價，不論被感染一或二個星期均無顯著差異。

3. 病毒的感染率

培養於 TNM-FH 培養液之新建立豆莢螟細胞株 NTU-MV、NTU-MV-1 與 NTU-MV-56，以及培養於無血清培養基 Sf900 之 NTU-MV，在接種豆莢螟核多角體病毒七天後產生多角體病毒的細胞數比例。由圖中可觀察到，無論是培養於 TNM-FH 培養液之豆莢螟細胞株 NTU-MV、NTU-MV-1 與 NTU-MV-56，或是培養於無血清培養基 (Sf900) 之 NTU-MV，於病毒感染一周後，皆有超過 88% 以上之細胞可產生多角體病毒 (圖八)。

七、豆莢螟細胞株生成之豆莢螟核多角體病毒的限制酵素圖譜分析

利用限制酵素圖譜分析豆莢螟細胞株 NTU-MV 與豆莢螟蟲個別所含豆莢螟核多角體病毒 DNA 之電泳圖。由圖中可觀察到，相對於電泳片兩側之分子標示 (M)，自豆莢螟細胞株 NTU-MV 萃取之病毒 DNA，與從豆莢螟蟲體內萃取所得之病毒 DNA，經三種限制酵素：*EcoR* I、*Hind*III 及 *Pst* I 裁切後，各限制酵素所裁切出之病毒 DNA 片段大小都相同，故屬為同一病毒，意即豆莢螟細胞株 NTU-MV 所產生之豆莢螟核多角體病毒係與感染豆莢螟蟲之豆莢螟核多角體病毒的基因組完全相同 (圖九)，此亦證明豆莢螟核多角體病毒確實可以新建立之豆莢螟細胞株 NTU-MV 於體外培養且大量增殖之。

八、表現載體之構築及報導基因表現測試

1. 表現載體之構築

利用 pUC18 所建構之表現載體命名為 pRU-polh，其限制酶切為包括 *Xba*I、*Xho*I、*Sph*I 和 *Sac*II，如圖八利用 eGFP 進行載體測試，eGFP 接入位置為 *Xho*I 與 *Sac*II 之間，經由同源交換後成功表現出綠螢光蛋白，如圖。

2. 綠螢光蛋白重組病毒感染試驗

NTU-MV 感染 eGFP 重組 MaviMNPV 5 天後，利用流細胞儀偵測有表現出綠螢光蛋白之細胞估計細胞感染率，估計感染率可達 99.48%。
Sf9 感染 eGFP 重組 AcMNPV 5 天後，利用流細胞儀偵測有表現出綠螢光蛋白之細胞估計細胞感染率，估計感染率可達 97.44%。

3. 綠螢光蛋白重組病毒寄主域感染試驗

NTU-MV 感染 eGFP 重組 MaviMNPV 7 天後，估計感染率可達 99%，但利用 Sf9 細胞感染 eGFP 重組 MaviMNPV 7 天後，感染率僅 1.5%，推測此結果顯示 Sf9 細胞對 eGFP 重組 MaviMNPV 僅具低接受力。

4. 螢光蛋白產量初步估計

利用轉綠螢光基因之 AcMNPV、LyxyMNPV 和 MaviMNPV 感染其寄主細胞 14 天後，感染轉綠螢光基因 MaviMNPV 細胞之培養液在自然光下即可明顯觀察到綠螢光蛋白之生成，代表綠螢光蛋白生成之量甚巨，此結果著實讓人振奮。

討論

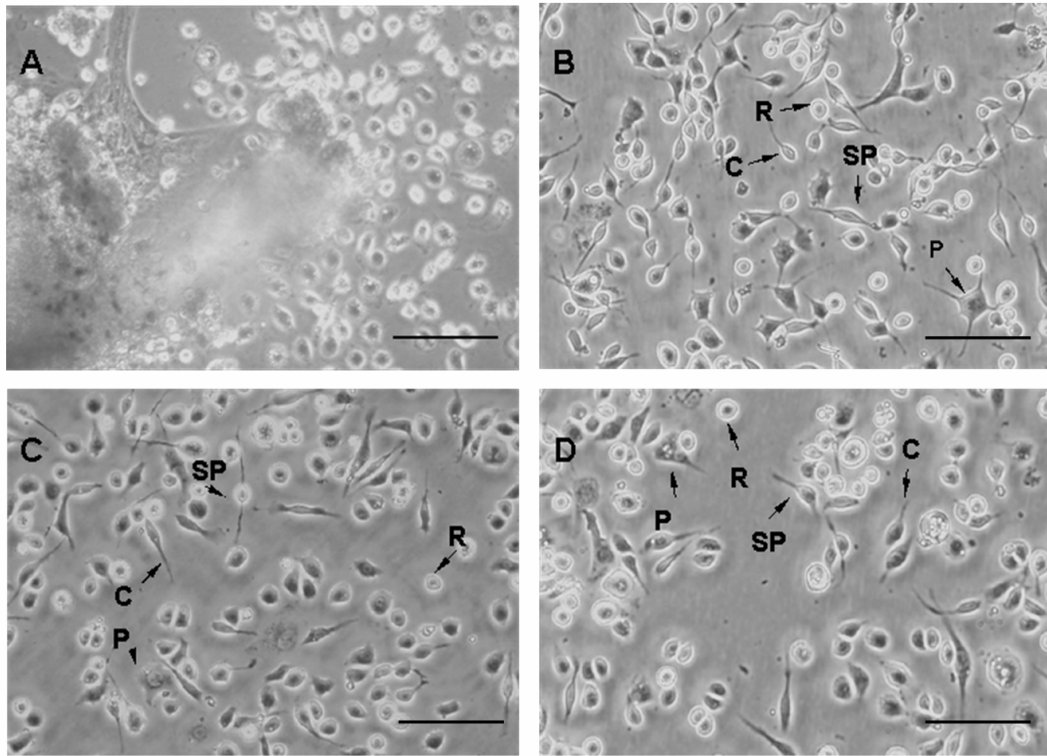
根據以上實驗結果，我們得知 NTU-MV 細胞株的確是由本實驗室首先建立出來，NTU-MV、NTU-MV1 或 NTU-MV56 三支株系均生長快速、對同源病毒 — 荳英螟核多角體病毒具有高接受性，且病毒生產快速，為良好之實驗材料；其細胞尚具有感染後易裂解的特性，對於純化病毒以及生產外源蛋白質之純化十分有利；利用荳英螟核多角體病毒非常晚期基因多角體蛋白啟動子所建構的傳送載體經由報導基因測試後，初步顯示出其啟動子所引導表現出高產量之綠螢光蛋白，此結果為前所未見，卓實讓人振奮，有此種種特性，我們相信此一新興桿狀病毒表現系統非常具有競爭力。在未來我們將繼續進行螢光蛋白產量之比較，以及其他外源蛋白產量之比較，以得知此一新建立之桿狀病毒蛋白質表現系統之發展潛力，並且發展快速表現載體，建立穩定表現系統。

表一、三種細胞株系中的四種主要形態的細胞大小及所佔比率

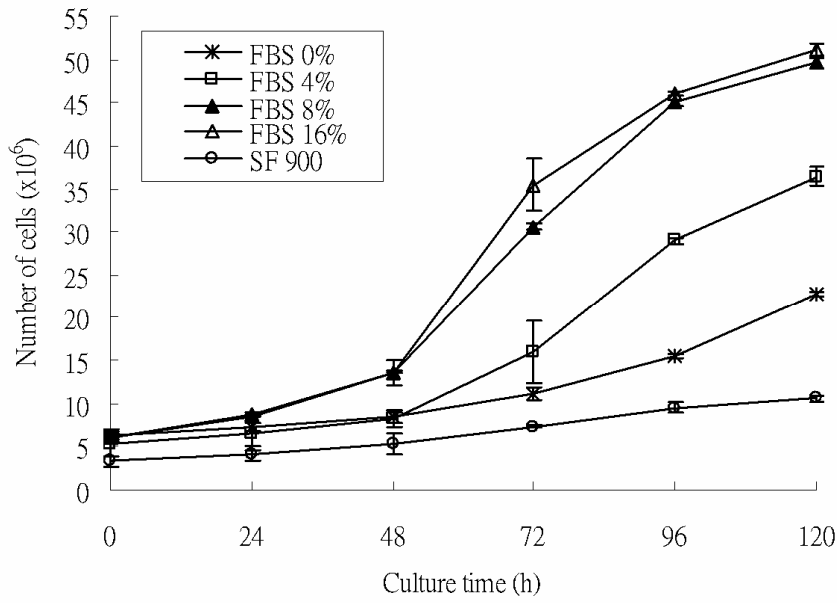
細胞形態佔用率及大小 (μm)	細胞株		
	NTU-MV	NTU-MV-1	NTU-MV-56
圓形細胞 (直徑)	30% (15.5)	23.5% (17)	82% (16.5)
梭狀細胞 (長度 \times 寬度)	20% (66.3 \times 10.4)	22% (84.9 \times 11.6)	4.6% (58.1 \times 10.4)
多棘形細胞 (長度)	35% (50.7)	36.5% (60.5)	10.7% (43)
逗號細胞 (長度 \times 寬度)	15% (39.8 \times 9.2)	18% (48.8 \times 10.7)	2.7% (43 \times 11)

表二、MaviMNPV 病毒分別感染 NTU-MV, MV-1, MV56 細胞株系培養在 TNM-FH 培養基內，及 NTU-MV 培養在無血清的培養基中，一和兩個星期後，他們產生的外泌病毒 (ECV) 的效價

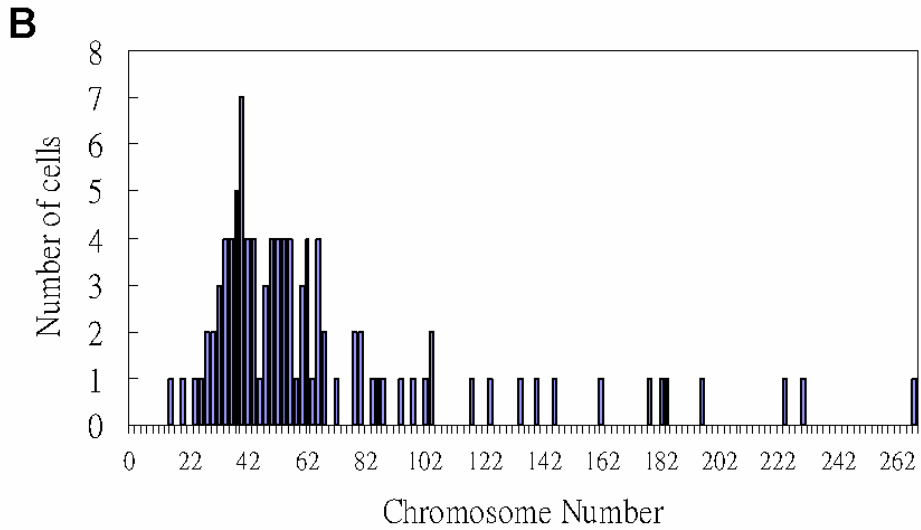
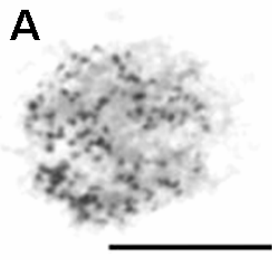
	MV	MV1	MV56	MV/Sf900
One	1.70×10^7 -	3.16×10^7 -	5.01×10^7 -	6.31×10^6 -
week	1.69×10^8	4.64×10^7	7.17×10^7	2.43×10^7
Two	3.83×10^7 -	4.70×10^7 -	7.94×10^7 -	1.70×10^8 -
weeks	2.43×10^8	2.51×10^8	1.95×10^8	2.25×10^8



圖一、三株豆莢螟細胞株 NTU-MV、NTU-MV-1 與 NTU-MV-56 於位相差顯微鏡下所觀察到之細胞形態圖。(A)圖係 NTU-MV 細胞於初代培養時，自豆莢螟蛹體組織移動至培養皿底部之細胞形態，(B)圖係 NTU-MV 之細胞形態，(C)圖係 NTU-MV-1 之細胞形態，(D)圖係 NTU-MV-56 之細胞形態，圖中各細胞株所含主要四種細胞形式之代號分別為 C：逗號細胞、R：圓形細胞、P：多棘形細胞以及 SP：梭狀細胞。所有圖示之放大倍率皆相同；橫線表示 100 μ m。

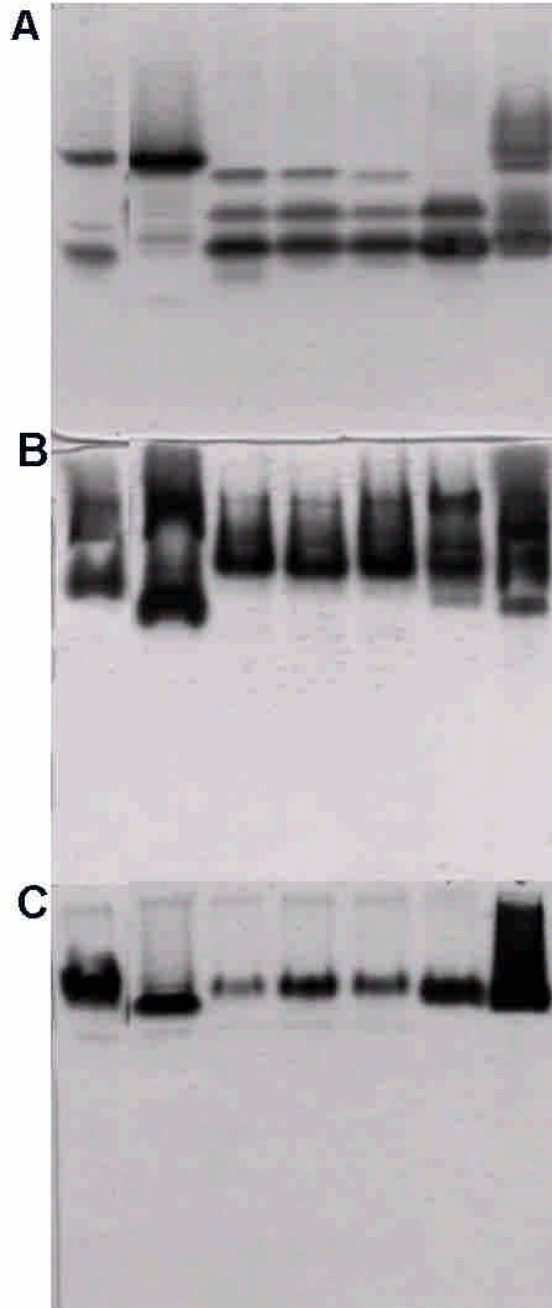


圖二、豆莢螟細胞株 NTU-MV 分別培養於含不同比例牛血清(FBS)之 TNM-FH 培養液以及無血清培養基 Sf900 中之生長曲線圖。×:0% FBS; □:4% FBS; ▲:8% FBS; △:16% FBS; ○: Sf900。

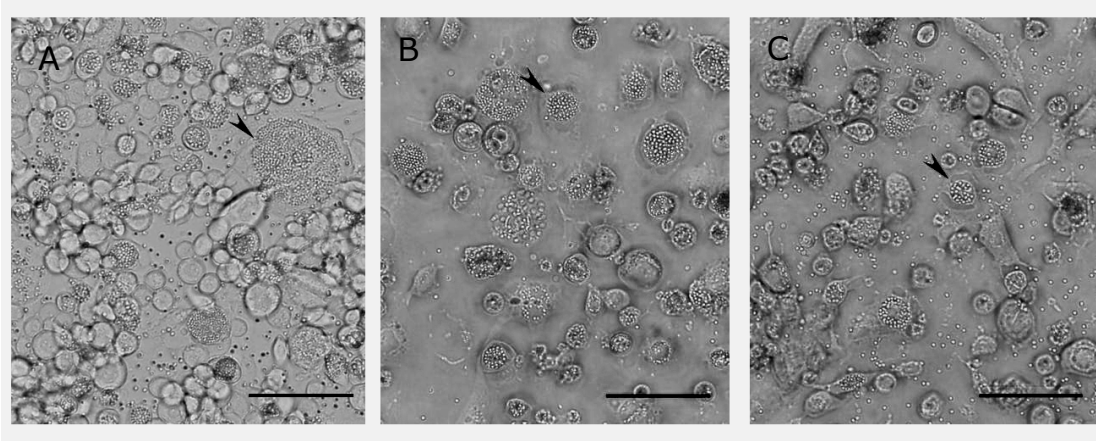


圖三、豆莢螟細胞株 NTU-MV 染色體之形態及其於細胞中之數量與分布圖。(A)圖係豆莢螟細胞株 NTU-MV 的染色體形態；橫線表示 12.5 μm 。(B)圖係在 100 個 NTU-MV 細胞中，染色體於細胞中之數量與分布狀況。

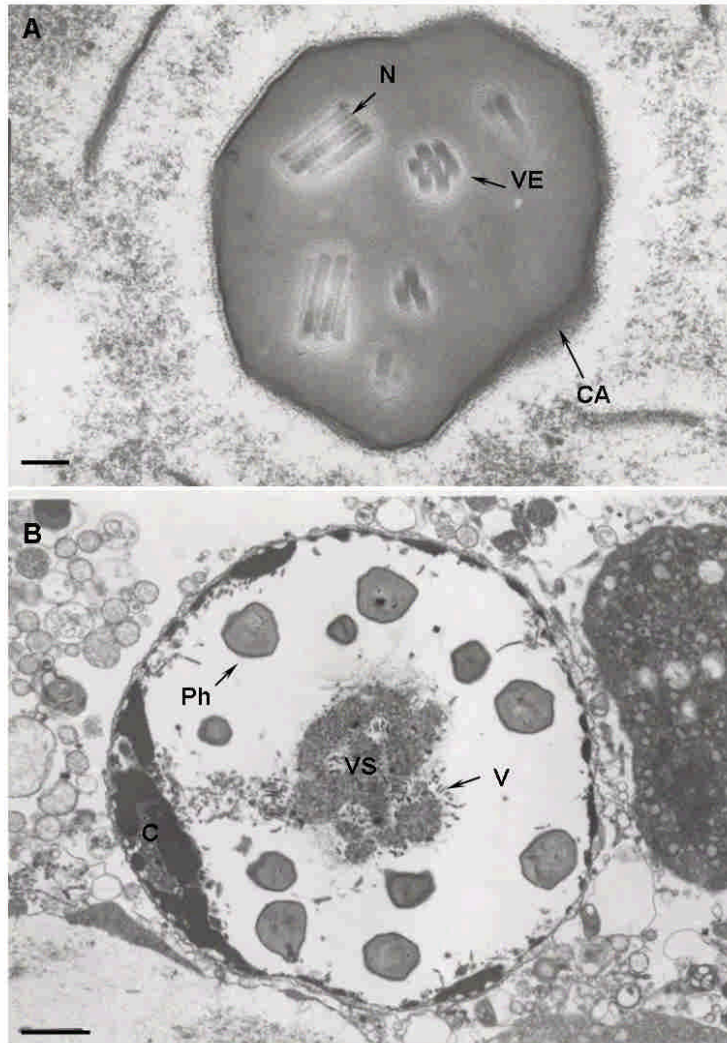
Medium	TNM-FH + 8% FBS					SF900	
Cell type	HF	LD	MV	MV1	MV56	MV	SF
Lane	1	2	3	4	5	6	7



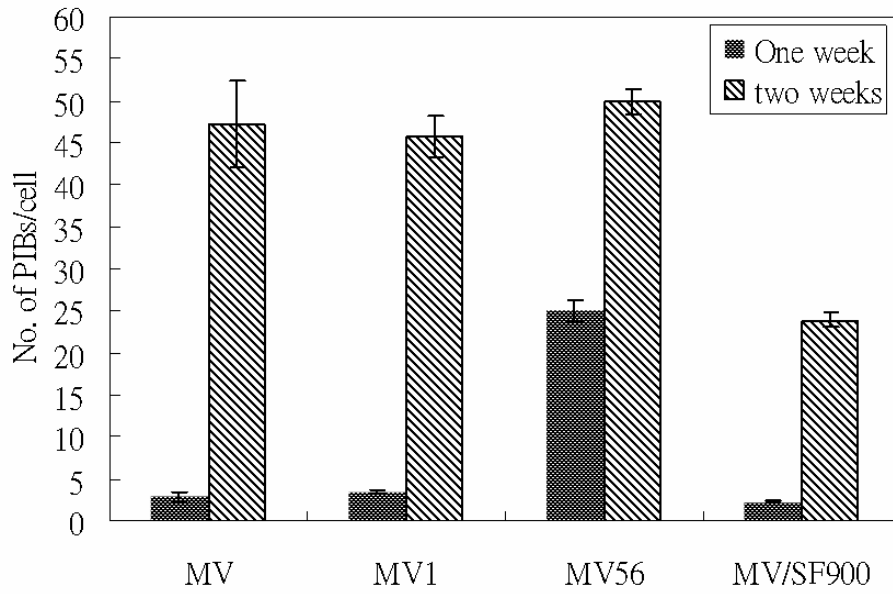
圖四、以不同培養液飼育之豆莢螟細胞株與其他細胞株之同功異構酶電泳圖譜。(A)圖係酯酶，(B)圖係蘋果酸去氫酶，(C)圖係乳酸去氫酶；各電泳道上方之標號分別為：(1)榕樹透翅毒蛾細胞株、(2)吉普賽舞蛾細胞株、(3)NTU-MV(TNM-FH)、(4)NTU-MV-1(TNM-FH)、(5)NTU-MV-56(TNM-FH)、(6)NTU-MV(Sf900)、(7)秋行軍蟲細胞株。



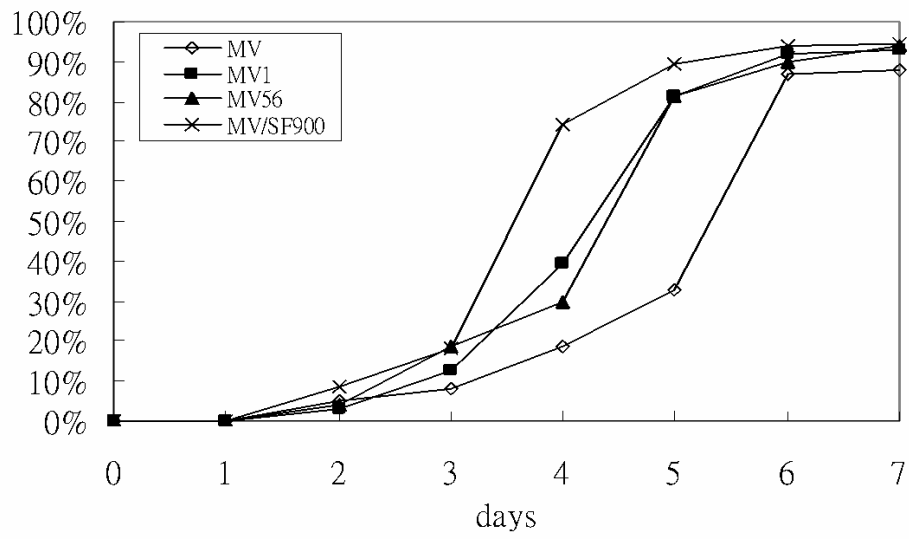
圖五、豆莢螟細胞株 NTU-MV (A)、NTU-MV-1(B)和 NTU-MV-56(C)在接種豆莢螟核多角體病毒三天後，受感染細胞所呈現之細胞病變形態。橫線表示 50 μ m。



圖六、新建立豆莢螟細胞株 NTU-MV 在接種豆莢螟核多角體病毒三天後，受感染細胞內所含之豆莢螟核多角體病毒。(A)圖係單個病毒包埋體(OB)顆粒，橫線表示 100 nm；(B)圖係 NTU-MV 細胞內之豆莢螟核多角體病毒。圖中之代號分別為 C：染色質體、CA：多角體外膜萼、VE：病毒外膜、V：病毒顆粒、VS：病毒粒子群、Ph：多角體蛋白、N：核蛋白質鞘。橫線表示 1 μ m。



圖七、豆莢螟細胞株 NTU-MV(MV)、NTU-MV-1(MV1)與 NTU-MV-56(MV2)，以及培養於無血清培養基 Sf900 之 NTU-MV(MV/SF900)，在接種豆莢螟核多角體病毒一星期及兩星期後，各細胞平均產生之多角體病毒數量。圖中■：接種豆莢螟核多角體病毒一星期後，各細胞平均產生之多角體病毒數量；▨：接種豆莢螟核多角體病毒二星期後，各細胞平均產生之多角體病毒數量。



圖八、豆莢螟細胞株 NTU-MV、NTU-MV-1 與 NTU-MV-56 在接種豆莢螟核多角體病毒七天後產生多角體病毒之細胞數比例。圖中 ◆：NTU-MV(TNM-FH)；■：NTU-MV-1(TNM-FH)；▲：NTU-MV-56(TNM-FH)；×：NTU-MV(SF900)

M1 1 2 3 4 5 6 M2

23.1k

9.4k

6.6k

4.4k

2.3k

2.0k

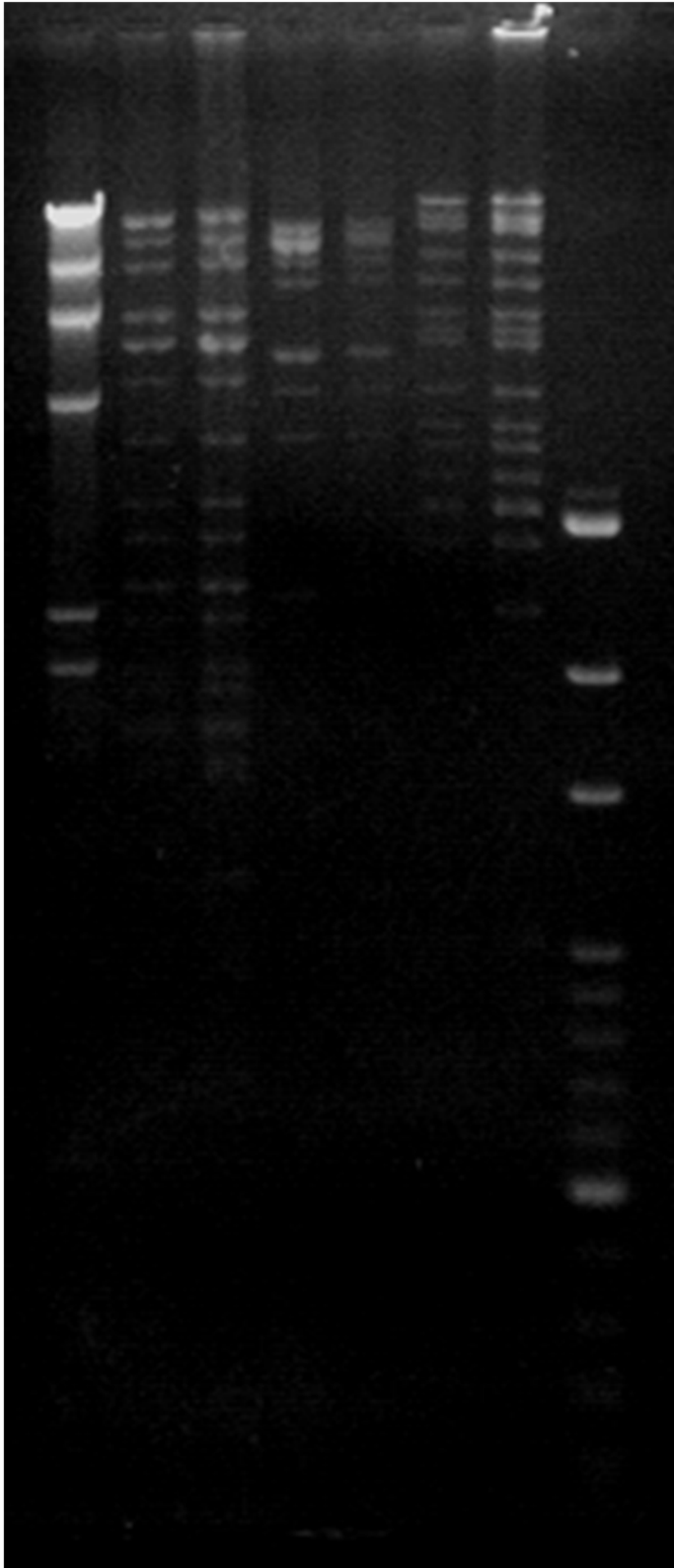
3k

2k

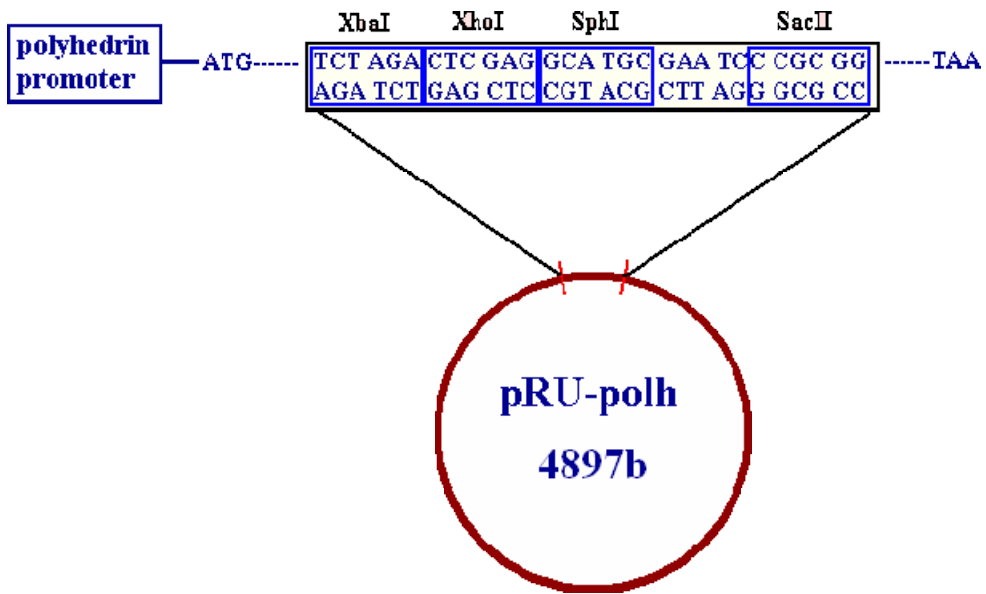
1.5k

1k

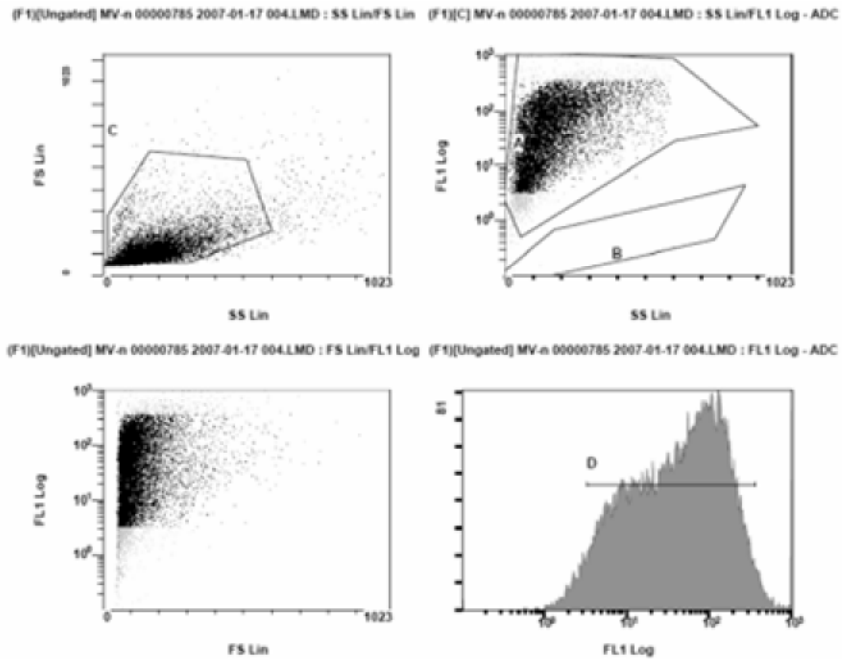
0.5k



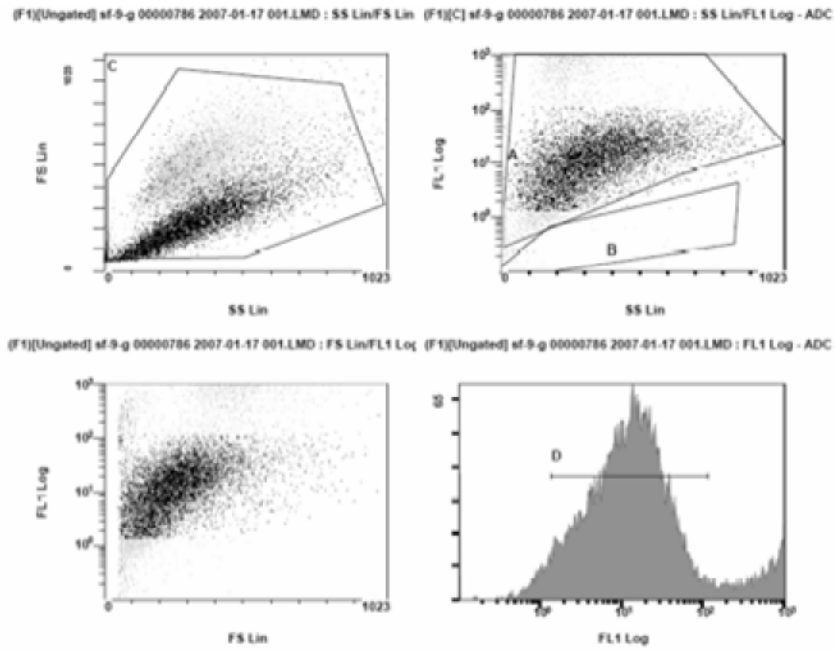
圖九、利用三種限制酵素：*EcoR* I、*Hind* III及*Pst* I分析豆莢螟細胞株NTU-MV(C)與豆莢螟蟲(L)個別所含豆莢螟核多角體病毒DNA之電泳圖。圖中，第一行： λ *Hind* III DNA marker，其分子量(Kb)標記顯示於電泳圖左側；第二行：經*EcoR* I 裁切之NTU-MV(C) DNA片段；第三行：經*EcoR* I 裁切之豆莢螟蟲(L)DNA片段；第四行：經*Hind* III 裁切之NTU-MV(C) DNA片段；第五行：經*Hind* III 裁切之豆莢螟蟲(L)DNA片段；第六行：經*Pst* I 裁切之NTU-MV(C)DNA片段經*Pst* I；第七行：經*Pst* I 裁切之豆莢螟蟲(L)DNA片段；第八行：Gen-100 DNA Ladder，其分子量(Kb)標記顯示於電泳圖右側。



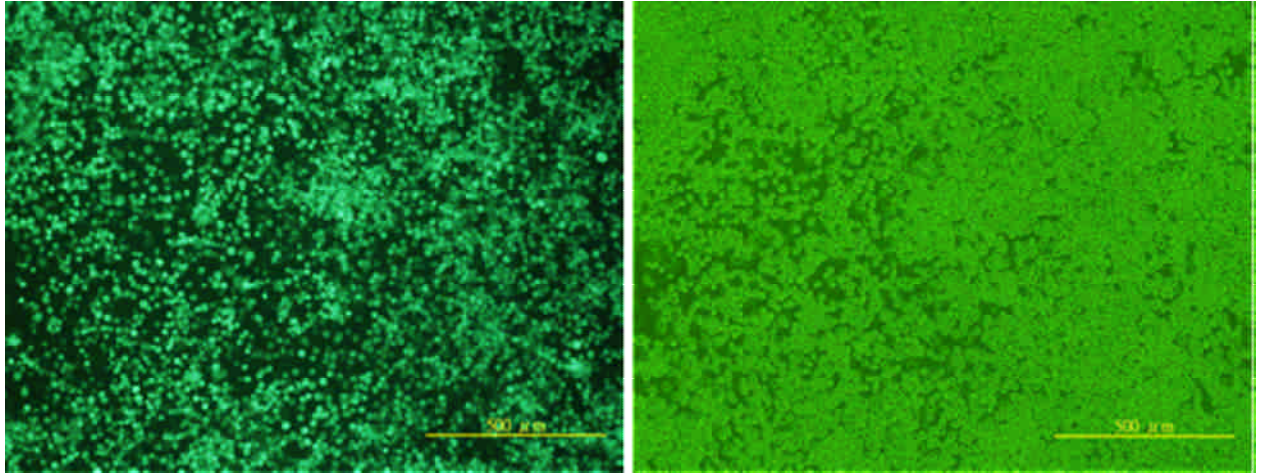
圖八、利用 pUC18 轉殖入多角體蛋白基因同源序列建構好之傳送載體，其 multiple cloning site 包含 XbaI、XhoI、SphI 及 SacII 之限制酶切位。



圖九、利用流細胞儀偵測有表現出綠螢光蛋白之估計 NTU-MV 感染 eGFP 重組 MaviMNPV 5 天後之感染率，估計感染率可達 99.48%。



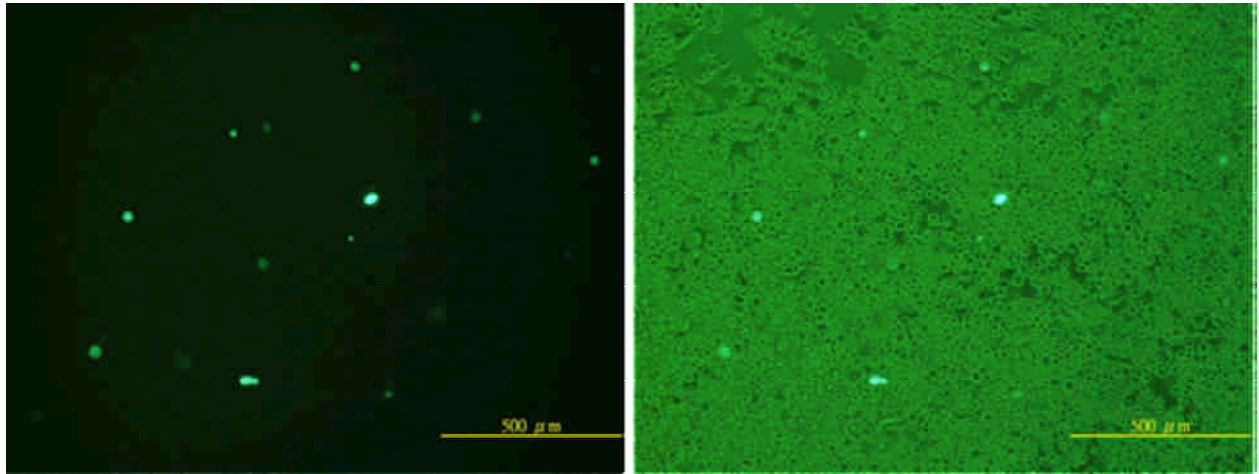
圖十、利用流細胞儀偵測有表現出綠螢光蛋白之細胞估計細胞感染率 Sf9 感染 eGFP 重組 AcMNPV 5 天後之感染率，估計感染率可達 97.44%。



A

B

圖十一、NTU-MV 細胞感染轉綠螢光蛋白基因 MaviMNPV 七天後的感染情形。(A) 以綠螢光觀察細胞感染狀況；(B) 細胞在綠色偏光鏡下觀察。黃色標線為 500 μ m



A

B

圖十二、Sf9 細胞感染轉綠螢光蛋白基因 MaviMNPV 七天後的感染情形。(A) 以綠螢光觀察細胞感染狀況；(B) 細胞在正常光和螢光結合下觀察感染細胞數。黃色標線為 500 μ m



圖十三、利用轉加強綠螢光基因之 AcMNPV、LyxyMNPV 和 MaviMNPV 感染其寄主細胞 14 天後，收集其上清液初步比較螢光蛋白之生成。Sf900 和 TNM-FH 為對照組；AcMNPV，LyxyMNPV 和 MaviMNPV 為轉加強綠螢光基因之 AcMNPV、LyxyMNPV 和 MaviMNPV 病毒感染寄主細胞。Sf9、NTU-LY1 和 NTU-MV 後之上清液。