

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

黑角舞蛾核多角體病毒之研究：最適體外增殖系統之建立，高致病力株之選殖，與重要基因 (FP 25K 及 1d-130) 之功能基因體學研究(2/3)
期中進度報告(精簡版)

計畫類別：個別型

計畫編號：NSC 95-2313-B-002-038-

執行期間：95 年 08 月 01 日至 96 年 07 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

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：期中報告不提供公開查詢

中華民國 96 年 06 月 08 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ☐ 成果報告
☒ 期中進度報告

黑角舞蛾核多角體病毒之研究：最適體外增殖系統之建立，高致病力株之選殖，與重要基因 (FP 25K 及 Id-130) 之功能基因體學研究

(2/3)

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2313-B-002-038-

執行期間：95 年 8 月 1 日至 96 年 7 月 31 日

計畫主持人：王重雄教授

計畫參與人員：

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：國立台灣大學昆蟲學研究所

中 華 民 國 95 年 5 月 31 日

前言

桿狀病毒 (baculovirus) 屬於桿狀病毒科 (Baculoviridae)，可分成核多角體病毒 (Nucleopolyhedrovirus, NPV) 及顆粒體病毒 (Granulovirus, GV) 兩屬，且均具有套膜 (envelope)。桿狀病毒的病毒粒子主要為一長桿狀的核蛋白鞘 (nucleocapsid)，大小約為 30~60 nm × 250~300 nm，其基因組 (genome) 為環狀雙股去氧核糖核酸 (circular double-stranded DNA)，大小約為 80~180 kb (Blissard *et al.*, 2000)。本實驗室已從台灣重要的害蟲-黑角舞蛾 (*Lymantria xyli*) 罹病蟲體中分離出黑角舞蛾核多角體病毒 (LyxyMNPV)，並建立此病毒之高接受性細胞株及篩選出高致病力之 LyxyMNPV 病毒株。

在桿狀病毒的體外培養系統中，連續累代感染下 (serially passage) 常呈現寡多角體 (few polyhedra, FP) 的現象 (Chakraborty and Reid, 1999)，此現象稱為繼代效應 (passage effect) (Krell, 1996)。FP 的形成與許多因素有關，包括病毒基因缺失 (Pijlman *et al.*, 2001)、轉位子 (transposon) 或寄主的 DNA 的鑲入 (Bauser *et al.*, 1996)、缺陷型干擾病毒粒子 (defective interference particles) (Huang and Baltimore, 1970) 的影響等都會造成 FP 的現象。在親緣關係的分析上顯示鱗翅目核多角體病毒可區分為 Group I 和 Group II 兩群 (Bulach *et al.*, 1999; Herniou *et al.*, 2001; Zanotto *et al.*, 1993)。將已解序完成之桿狀病毒基因組經比對，發現 Group I NPVs 之套膜上具有 GP64 蛋白，其在出芽病毒感染寄主細胞上扮演著重要的角色，其在酸性 pH 條件下促使病毒經由細胞內食體 (endosome) 的胞食作用 (endocytosis) 順利進入細胞 (Blissard and Wenz, 1992)；Group II NPVs 不具有相似於 *gp64* 之基因 (Pearson *et al.*, 2001; Westenberg *et al.*, 2002)，而另有一基因 *ld130*，其蛋白質位於細胞膜上，是出芽病毒的組成成份。利用基因轉染 (transfection) 方式表現 LD130，結果顯示此蛋白質在低 pH 值時會誘導細胞融合，推測 LD130 取代 GP64 為其出芽病毒之套膜蛋白，且其重要性相當於 GP64 的功能 (Pearson *et al.*, 2000)。此計畫將進行此兩種基因之功能性分析與探討，評估未來應用之可能性。

研究目的

黑角舞蛾 (*Lymantria xyli*) (又名木毒蛾) 是臺灣的固有種，屬鱗翅目 (Lepidoptera)、毒蛾科 (Lymantriidae)，在台灣地區，近年來黑角舞蛾大發生首在 1928 年，而後 1935、1983、1984、1995、2002、2003 和 2004 年皆有大發生的報導。

本實驗室自 1996 年即投入黑角舞蛾的研究，從台灣北部地區大發生地採集並分離出其病原體：核多角體病毒 (*L. xyli* multiple nucleopolyhedrovirus, LyxyMNPV)，並且成功地體外培養在吉普賽舞蛾細胞株 (IPLB-LD652Y) (Yu *et al.*, 1997)。然而後續的研究發現，在已報導的 IPLB-LD652Y 細胞株內的 LyxyMNPV 病毒株至少具有兩種基因型 (genotype)，目前已分離出 LyxyMNPV 和 LdMNPV-like，且大多數受 LdMNPV-like 感染的細胞呈 FP 的細胞病變 (少於 10 PIB/cell)，國外已有許多報導指出 FP 的突變與病毒的基因組特殊區域所轉錄的 25 kDa 蛋白有關 (Fraser, *et al.*, 1983)。此區域之 *fp25k* 基因的序列中發生缺失或插入外來序列時，就會影響病毒產生多角體的數目。因此擬將在本計畫中

作進一步地研究這兩株病毒的 *fp25k* 基因。

目前已從 IPLB-LD652Y 選殖出 4 株再選株，分別命名為 LD-4、LD-5、LD-6 與 LD-7 細胞株。這四株細胞株全部可以接受 LdMNPV-like 病毒株，其中以 LD-4 細胞株接受性最好；而 LD-5、LD-6 與 LD-7 細胞株對 LyxyMNPV 病毒株則有較佳的接受性，其中以 LD-7 細胞株接受性最高，感染後第 7 天的病毒效價可達 10^8 TCID₅₀/ml 以上。有趣的是，LD-5 細胞株在受到 LyxyMNPV 病毒株感染後，會呈現大規模的細胞膜融合現象，此現象亦偶而出現於受到 LyxyMNPV 病毒株感染的 LD-6 與 LD-7 細胞中。至於造成膜融合現象的成因，是否與病毒所表現的膜融合蛋白（如：LD-130 蛋白）有關，亦擬在本計畫中探討；group II NPV 所表現的 LD-130 蛋白在功能上類似於 group I NPV 所表現的 GP64 蛋白，皆可在酸性條件下引發膜融合，此膜融合現象的發生在病毒進入宿主細胞的過程中扮演相當重要的角色。至於在 group I NPV 所表現的 LD-130 蛋白則不會引發膜融合，而是病毒感染昆蟲的重要致病因子之一 (Lung *et al.*, 2003; Westenberg *et al.*, 2004)。

目前本實驗室已從黑角舞蛾蛹之組織成功分離並建立出黑角舞蛾細胞株 NTU-LY 細胞株，且已有四株分離株，分別為 NTU-LY1, NTU-LY2, NTU-LY3, 以及 NTU-LY4 (Wu and Wang, 2007)，對 LyxyMNPV 均有極佳的接受性，本次計畫將利用已建立之黑角舞蛾細胞株 NTU-LY 細胞株以及從 IPLB-LD652Y 篩選出來之 LD-4、LD-5、LD-6 與 LD-7 細胞株選殖並定序病毒的 *fp25k* 基因和 *ld-130* 基因，之後放入表現載體大量表現或製作成重組病毒，期以功能基因體學的方式分析此二基因產物的功能，以及評估未來應用之可能性。

研究方法

一、供試蟲源、病毒及細胞培養

(1) 黑角舞蛾幼蟲之飼養

黑角舞蛾幼蟲為採集自野外之幼蟲或卵塊，帶回實驗室後以楓香 (*Liquidambar formosana*) 樹葉飼育。打破卵休眠之方法則參考 Hwang *et al.* (2004) 進行：休眠卵經冷藏 (9-15℃) 三個月後，再經一段回溫期 (27℃) 後，一星期內即可順利孵化。

(2) 黑角舞蛾核多角體病毒之分離

黑角舞蛾核多角體病毒 (LyxyMNPV 及 LdMNPV-like 病毒株) 是自野外罹病之黑角舞蛾幼蟲蟲體，以及採回實驗室內經葉面污染法感染後之罹病幼蟲蟲體中分離而得，已成功地體外增殖在 IPLB-LD652Y 細胞株內。

(3) 細胞培養

所有使用的細胞株皆培養在 28 °C TNM-FH 培養液，內含 8% 胎牛血清及抗生素和抗黴素，每 3-5 天繼代培養一次。

二、病毒 DNA 之萃取

(1) 病毒多角體 (PIB) 之純化與 DNA 萃取

多角體和病毒粒子 (virion) 之純化方法簡述如下：將體外增殖系統中受到病毒感染而出現多角體的細胞刮下，置於離心管中，以 3,000 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。將沈澱物以二次蒸餾水使其再懸浮，然後以強烈震盪的方式 (vortex) 使細胞破裂。將此懸浮液滴加在 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 74,000 g 離心 30 分鐘，即可在蔗糖濃度約為 55% 處收集包涵體聚集的白色環帶，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。取經蔗糖連續密度梯度離心純化的多角體，加入適量的 3X DAS (Diluted alkaline solution) 溶液，經劇烈振盪數分鐘後，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 74,000 ×g 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 1X TE 緩衝液稀釋，再於 4 °C 74,000 g 離心 30 分鐘將病毒粒子 (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 (5 mg/ml)，於 65 °C 水浴作用 3 小時以上，再加入 1 倍體積的酚 (phenol) 與 DNA 充份混合，以 1,500 rpm (KUBOTA 1300) 在 4 °C 下離心 5 分鐘，吸掉下層液，再加入 2 倍體積的氯仿 (chloroform)，充份混合後以 2,000rpm (KUBOTA 1300) 於 4 °C 下離心 5 分鐘，吸取上層液到另一離心管中，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，再加入絕對酒精除去水份，烘乾後加入適量的 0.1X TE 緩衝液放入 65 °C 水浴處理 30 分鐘，最後置於 4 °C 或 -20 °C 備用。

三、蛋白質之大量表現與抗體製備

(1) 原核表現載體之構築

根據欲大量表現之蛋白質之基因序列設計專一性 PCR 之引子，並在引子上加入限制酶切位，經由 PCR 增幅出整段蛋白質基因。將表現載體 pET-28a(+) (Novagen) 及 PCR 產物分別以相同限制酶切割，經 phenol-chloroform-isoamyl alcohol 萃取及酒精沉澱後，進行載體與欲表現基因之接合，將欲表現基因與載體 DNA 含量調整為 3:1，加入 T4 DNA ligase 及 1 mM ATP，在適當溫度下使其反應。將構築好之表現載體，送入 BL21(DE3) *E. coli* 中，以抗生素 Kanamycin 篩選含有表現載體之菌株。將存活之菌株大量增殖之後，以 Plasmid miniprep Kit (Gene Mark) 抽取表現載體，以相同限制酶處理，藉由觀察片段大小，確定所獲得之菌株確有 DNA 片段接入，並利用 IPTG 進行誘導表現測試。在確定蛋白質有表現後，以含抗生素 Kanamycin 之培養液大量增殖並以 IPTG 進行誘導表現。菌液以 10,000 ×g 於 4 °C 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 500 µl 溶解緩衝液 (1.5 % sarcosine in PBS, pH7.2) 並以超音波震盪器 (Ultrasonic processor UP-50H, Dr. Hielscher GmbH) 均勻震盪 20 秒，在冰上使其冷卻，如此反覆 3~4 次。以 10,000 ×g 轉速離心 5 分鐘，離心後

取上清液與1/10 體積帶有二價鎳離子 (Ni^{2+}) 的 nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) 樹脂膠粒溶液 (Qiagen)，於 4°C 搖轉 12 小時進行反應。以 10,000 $\times g$ 離心 5 分鐘後倒棄上清液，再加入 500 μl 清洗緩衝液 (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8.0; 300 mM NaCl; 50 mM imidazole) 沖洗，10,000 $\times g$ 離心 5 分鐘倒棄上清液，如此反覆重複 2~3 次，最後以 200 μl 萃取緩衝液 (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8.0; 300 mM NaCl; 500 mM imidazole) 將附著於 Ni-NTA 樹脂膠粒上的重組蛋白沖洗下來，經聚丙烯醯胺膠體電泳，將蛋白質由膠體上切取下來，送昕穎生技公司施打兔子製備多源抗體。

(2) 西方轉印法

藉由西方轉印法分析病毒蛋白 (FP 25K 及 LD-130) 在受到病毒感染的細胞內 (包括不同時序) 的表現。蛋白質電泳係參照 Laemmli (1970) 的方法，簡述如下：將感染病毒後不同時序之細胞以橡皮括勺括下，在 4°C 下以 1000 rpm (Hettich 30RF 離心機) 離心 10 分鐘。將沉澱的細胞與 2 倍濃度標本緩衝液混合均勻後，置沸水中煮 5 分鐘，然後置於冰上冷卻 5 分鐘，再以 10000 $\times g$ 離心 10 分鐘，取上清液進行 16% SDS-PAGE 分析。電泳完畢後，將膠片內的蛋白質以半乾式蛋白質轉印法 (semi-dry blotting) 轉印至硝化纖維膜 (nitrocellulose membrane) 上，以 Tris-buffered saline (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, TBS, pH 7.5) 溶液沖洗，再以含 3% 脫脂奶粉之 TBS 溶液於 37°C 下作用 1 小時。隨後加入 1,000 倍稀釋之兔子抗 FP 25K 或 LD-130 蛋白之抗血清於 37°C 下作用 1 小時，作用完畢後以 TBST (TBS 含 0.05% 之 Tween 20) 溶液沖洗 3 次，每次 10 分鐘。然後換入已標定山葵過氧化氫酶之 2,500 倍稀釋的山羊抗兔子免疫球蛋白 IgG 之抗體 (Sigma)，在 37°C 下作用 1 小時。作用後以 TBST 溶液沖洗 3 次，每次 10 分鐘。最後與商品化之呈色液 Opti-4CN Substrate Kit (Bio-Rad) 於室溫下進行呈色反應。

(3) 不同 pH 對於細胞膜融合的影響

取 1.2×10^6 IPLB-LD652Y-5d 細胞種於 60 mm 培養皿，待細胞附著後吸出培養液，以 TNM-FH 培養液清洗兩次，再加入 1 ml 的病毒液感染細胞，之後將病毒液吸除，加入新鮮的培養液，於 28°C 培養 48 小時，之後將培養液吸除，各別加入 1 ml TNM-FH 培養液 (pH 3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7) 靜置 2 分鐘，之後吸除培養液並以 TNM-FH 培養液 (pH 6.2) 清洗兩次，最後加入 2 ml 新鮮的培養液再於 28°C 中培養 12 小時後觀察。

(4) 轉染作用 (transfection)

將 *ld-130* 基因構築在 OpMNPV 之 IE-2 promoter 下游 (商品化之表現載體 pIZT/V5-His Vector Kit, Invitrogen)，然後將此構築好之表現載體 DNA 藉由轉染作用送入 IPLB-LD652Y 細胞內，觀察細胞膜融合的現象。其次是將 *fp25k* 基因構築在 OpMNPV 之 IE-2 promoter 下游，然後將構築好的表現載體 DNA 藉由轉染作用送入 IPLB-LD652Y 細胞內，然後接種呈現 FP 的黑角舞蛾病毒株 (LdMNPV-like)，觀察受感染之細胞內多角體數目 (MP/FP 的比例) 是否改變。

結果

一、表現 LyxyMNPV 的 FP25K 重組蛋白

目前已利用原核表現系統建立載體表現 LyxyMNPV 的 FP25K 重組蛋白，可以發現

帶有 LyxyMNPV *fp25k* 載體的大腸桿菌表現出約 28.29 kDa 的蛋白質 (圖一)。

二、表現 LyxyMNPV 的 LD130 重組蛋白

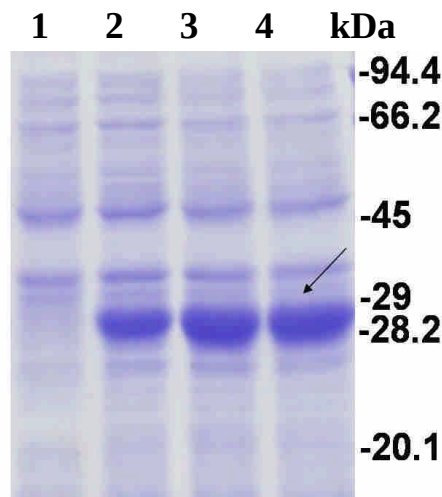
以原核表現系統 (*E. coli* expression system) 表現重組 LyxyMNPV LD130 蛋白質時，僅表現 LD130 部分區域 (基因序列為轉譯起始點到第 1,524 個核苷酸的位置)，而經電腦軟體的運算，大致估算出欲表現之重組 LyxyMNPV LD130 的分子量約為 57.9 kDa。經多次注射實驗動物紐西蘭大白兔所得之抗體，利用於西方墨漬分析 (Western blot)，結果顯示 anti-Lyxy 130 抗血清可成功辨識純化之重組蛋白 (圖二)。

三、以西方墨漬分析受感染的吉普賽舞蛾細胞之 LD130

將 IPLB-LD652Y-5d 細胞和感染病毒的細胞進行西方墨漬分析 (圖三)，結果顯示感染病毒的細胞經抗體反應後，呈現兩個片段，約為 48 kDa 和 32 kDa，而抗體不會和宿主 IPLB-LD652Y-5d 細胞所產生的蛋白質作用，顯示 anti-Lyxy 130 抗體對 LD 130 蛋白具有專一性。

討論

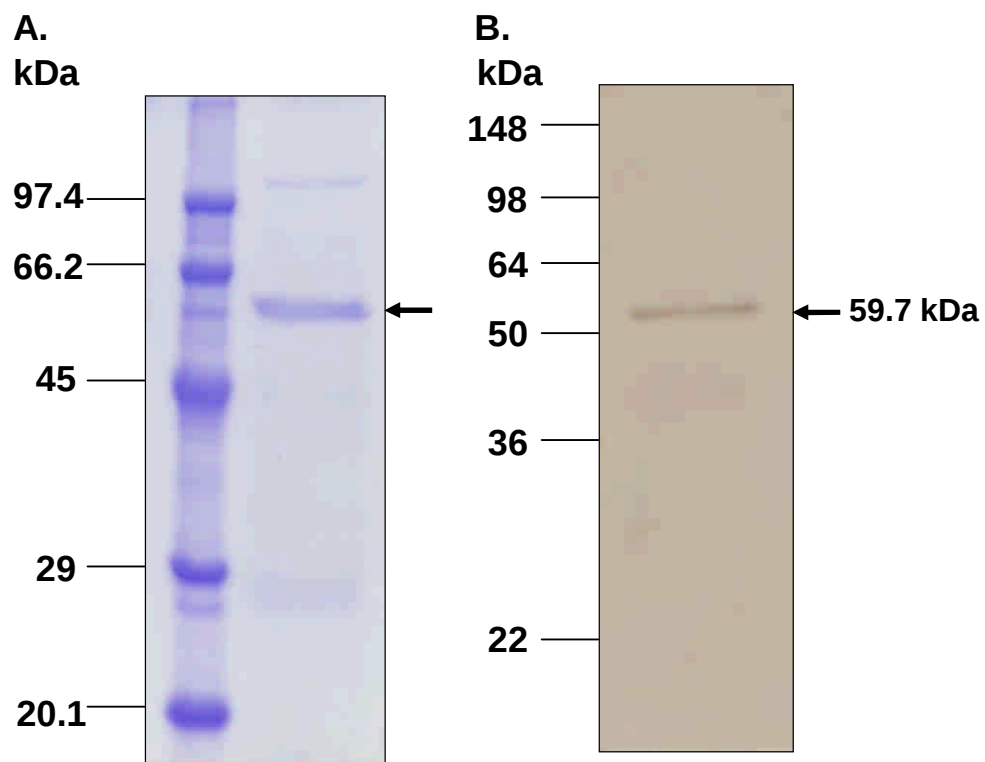
目前 LD130 蛋白質之抗體已製備完全並確認其可辨認細胞感染病毒後所產生之 LD130 蛋白，而 FP25K 蛋白之原核表現載體已建構完全，將進行大量生產重組蛋白之工作以進行抗製備，未來將繼續進行此兩種蛋白之功能分析以及探討此二基因未來可能之應用性。



圖一、利用細菌表現載體表現榕樹透翅毒蛾與黑角舞蛾核多角體病毒的 FP25K 重組蛋白。B. 黑角舞蛾核多角體 FP25K 重組蛋白之時序性表現測試，Lane 1：未誘導之細菌，Lane 2~Lane 4：分別是誘導 1、2、3 小時。箭頭位置為榕樹透翅毒蛾與黑角舞蛾核多角體病毒的 FP25K 重組蛋白。

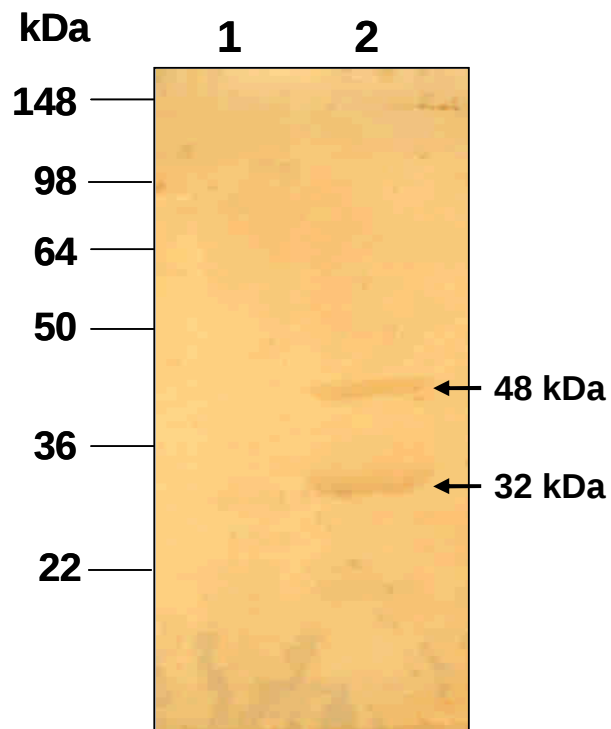
Fig. 1. PET system expressed the recombinated FP25K proteins of PenuMNPV and LyxyMNPV. B. Expression time course of recombinated FP25K protein of LyxyMNPV. Lane 1:

Non-induced , Lane 2～Lane 4: 1, 2, and 3 hours after inducing. The arrows indicate the recombined FP25K proteins.



圖二、純化後之 LD130 重組蛋白，以聚丙烯醯胺膠體電泳 (A) 和西方墨漬法偵測 (B)，分子量約 59.7 kDa (箭頭)。

Fig. 2. The detection of the recombinant LD130. A. An obvious band at 57.9 kDa (arrow) by SDS-PAGE. B. Only a band (57.9 kDa) detected by Western blot.



圖三、黑角舞蛾核多角體病毒 (Ly2) 感染吉普賽舞蛾細胞 72 小時後，以西方墨漬法偵測細胞之 LD130。Lane 1: 未感染之吉普賽舞蛾細胞；Lane 2: 感染之吉普賽舞蛾細胞，偵測到兩目標蛋白質，其分子量約為 48 kDa 和 32 kDa (箭頭)。

Fig. 3. IPLB-LD652Y-5d cells infected with LyxyMNPV 72 h p.i. and the LD130 in IPLB-LD652Y-5d cells detected by Western blot. Lane 1 : uninfected IPLB-LD652Y-5d cells; Lane 2 : LyxyMNPV infected IPLB-LD652Y-5d cells showing 2 detected bands at 48 kDa and 32 kDa (arrows)

參考文獻

- Bauser, C. A., T. A. Elick, and M. J. Fraser. 1996. Characterization of hitchhiker, a transposon insertion frequently associated with baculovirus FP mutants derived upon passage in the TN-368 cell line. *Virology* 216: 235-237.
- Blissard, G. W., and J. R. Wenz. 1992. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J. Virol.* 66: 6829-6835.
- Blissard, G., B. Black, N. Crook, B. A. Keddle, R. Possee, G. Rohrmann, D. Theilmann, and L. Volkman. 2000. Family *Baculoviridae*: taxonomic structure of the family. pp. 195-220. *In*: M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner, eds. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego.
- Bulach, D. M., C. A. Kumar, A. Zaia, B. Liang, and D. E. Tribble. 1999. Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 59-73.
- Chakraborty, S., and S. Reid. 1999. Serial passage of a *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa zea* cell cultures. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 303-308.
- Fraser, M. J., G. E. Smith, and M. D. Summers. 1983. Acquisition of host cell DNA sequences by baculovirus: relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis viruses. *J. Virol.* 47: 287-300.
- Herniou, E. A., T. Luque, X. Chen, J. M. Vlak, D. Winstanley, J. S. Cory, and D. R. O'Reilly. 2001. Use of whole-genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. *J. Virol.* 75: 8117-8126.
- Huang, A. S., and D. Baltimore. 1970. Defective viral particles and viral disease processes. *Nature* 226: 325-327.
- Hwang, S. Y., C. C. Jeng, T. C. Shen, Y. S. Shae, and C. S. Liu. 2004. Diapause termination in casuarina moth (*Lymantria xylina*) eggs. *Chinese J. Entomol.* 24: 43-52.
- Krell, P. J. 1996. Passage effect of virus infection in insect cells. *Cytotechnology* 20: 125-137.
- Lung, O. Y., M. C. Alvarez, and G. W. Blissard. 2003. Ac23, an envelope fusion protein homolog in the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, is a viral pathogenicity factor. *J. Virol.* 77: 328-339.
- Pearson, M. N., R. L. Q. Russell, and G. F. Rohrmann. 2001. Characterization of a baculovirus-encoded protein that is associated with infected-cell membranes and budded

- virions. Virology 291: 22-31.
- Pearson, M. N., R. L. Q. Russell, and G. F. Rohrmann. 2002. Functional analysis of a conserved region of the baculovirus envelope fusion protein, LD130. Virology 304: 81-88.
- Pijlman, G. P., E. V. D. Born, D. E. Marten, and J. M. Vlak. 2001. *Autographa californica* baculoviruses with large genomic deletions are rapidly generated in infected insect cells. Virology 283: 132-138.
- Westenberg, M., H. Wang, W. F. J. IJkel, R. W. Goldbach, J. M. Vlak, and D. Zuidema. 2002. Furin is involved in baculovirus envelope fusion protein activation. J. Virol. 76: 178-184.
- Westenberg, M., F. Veenman, E. C. Roode, R. W. Goldbach, J. M. Valk, and D. Zuidema. 2004. Functional analysis of the putative fusion domain of the baculovirus envelope fusion protein F. J. Virol. 78: 6946-6954.
- Wu, C. Y., and C. H. Wang. 2006. New cell line from *Lymantria xylinea* (Lepidoptera: Lymantriidae): Characterization and susceptibility to baculovirus. J. Invertebr. Pathol. 93:186-191
- Yu, C. C., H. H. Kao, J. T. Chao, S. S. Lu, and C. H. Wang. 1997. The characterization of *Lymantria xylinea* nucleopolyhedrovirus (LyxyNPV) and the establishment of in vitro multiplication of LyxyNPV. Chinese J. Entomol. 17: 23-32. (in Chinese)
- Zanotto, P. M., B. D. Kessing, and J. E. Maruniak. 1993. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. J. Invertebr. Pathol. 62: 147-164.

姓名：王智源

學號：D92632004

一、參加會議經過

我與王重雄老師及實驗室其他同學於 8 月 26 日搭乘長榮航空的班機，經由香港轉機後，直達湖北省首都武漢。因提早到達武漢一天，所以沒有接送車，一行人則搭計程車前往下榻的旅館：中南花園大酒店。所有的開會及場所都是在此間飯店所舉行的。因提早到一天，所以在武漢市區中參觀。武漢在內地是個新興的都市，很多新的高樓大廈都在興建當中，因此有個新舊參雜的不諧調感，特別是舊建築上另有新建築。另外武漢的天氣是熱氣逼人，氣溫高達 38℃ 以上，天氣的悶熱，有別於台北的氣候，更讓人覺的不舒服，險有中暑的跡象。

8 月 27 日為會員及與會者報到的時間，來自世界各地各方面的學者皆齊聚一堂，為了這個大會共襄盛舉。

8 月 28 日是大會第一天開始，開幕式是由 Ziniu Yu 及 Just M. Vlak 共同主持，之後由 Dr. Vlak 做了一個演講，特別介紹中國的病毒學之父其生平與事蹟，會場中特別感人的是其妻子也到會場之中，應該有 80~90 歲，到台上感謝大家對她丈夫的懷念與敬意，會場全部起立鼓掌，氣氛達到最高潮。接下來則是請了一些學者，分別對於中國、日本、東南亞及印度等地，描述目前利用微生物防治對於當地的害蟲所做的防治概況，利用的微生物包含 Bt、病毒、線蟲及真菌等。

接下來的會議則是開始分組，分成 Bt 組、病毒組、真菌組、細菌組及微孢子蟲組，不同領域的在不同的會議室舉行，不管是教授級的學者或是學生都會在台上發表目前的研究概況，特別是學生若是上台演說，都會參與學生的演講競賽。第一天與老師參加病毒的會議，會議中特別提到的是與對抗細胞自殺的病毒基因為主，其可在病毒感染後避免細胞的自殺 (apoptosis) 而讓病毒繼續存留在細胞內複製增殖。兩小時的會議結束後，則是海報的張貼，而我則是張貼海報講解我所做的內容，這是讓所有的人來審閱你所做的研究成果。這是一個很新奇的一個經驗，不管是外國學者或是大陸本地的學者，都會詳細的看過再提出問題或是見解，甚至是給與很好的意見，雖然我的英文程度相當差，但確還能彼此進行互動，因此交流也不再是那麼漠生。

會議的第二天上午，有微孢子蟲的會議，與會學者與學生分別對於不同研究的內容進行深入的探討，其中有提到在生態上微孢子蟲的傳播及分子上核糖體基因的排列現象，都有廣泛的討論。這天下午則是大會所安排的旅遊，是到黃鶴樓去參觀，雖然黃鶴樓氣派非凡，但近看時卻有遺憾，因為整座黃鶴樓是仿古而建造的，都是由水泥所構築而成，已喪失了其古老的韻味。但上了黃鶴樓，還能遠眺長江一橋及長江，景致還不錯。之後則到了武漢植物園，有場 SIP 每年都舉辦的 5 公里賽跑，沒有參加競賽的則在園內參觀，他們的植物園與台灣的植物園很不一樣，他們的植物園比較商業化，且植物種植的也比較混雜。所有參觀活動及競賽結束後，就在植物園內 BBQ，一邊品嚐當地的特色菜，一邊看著雜耍

團的表演。活動結束之後，就回旅館休息。

第三天下午則與王老師去聽病毒的會議，主要的內容是多種新的病毒 DNA 序列已被解序，其基因功能也逐漸被解開來，而大陸在這方面已與台灣不相上下，大陸方面的競爭力相當強。另外 NPV 的表面蛋白也是眾多研究者的對象，其對於病毒感染、細胞融合及病毒特性等方面都扮演重要的角色。而在傍晚時，則是另一階段海報張貼講解的時段，主要包含的方面有病毒、微生物控制、細菌、真菌等。我的實驗室也有另外兩張海報張貼，是有關基因組及細胞融合。在大家的熱烈討論之下，海報成果展順利的圓滿結束。

第四天也參與病毒的會議，主要是講 IRES 及 siRNA。第五天則是收拾行李，早上則去武漢大學生命科學院參觀，他們的編制與台灣相當的不同，所有與生命科學相關的系所都同在生命科學院的大樓之中，只是不同的所在不同的樓層當中，因此彼此的互動與台大這邊會相當的不同。下午則是動身前往西安旅遊。在西安的旅遊主要參觀的景點為兵馬俑、華山及碑林。西安是個古色古香的古都，還留有明朝以來的古城牆，為當地的一大特色。我們是在 9 月 4 日搭機返抵國門。

二、與會心得

這次出國開的國際會議對我來說收益良多，很感謝這次的出國補助，可以不必太擔心金錢上的問題。這次的經驗很難得可以跟國外的學者面對面的實際接

觸，除了在學術交流上獲得寶貴經驗外，在共同的相處上也讓人不再那麼的陌生。若下次還有機會，還是非常希望能再出國與國際學者進行交流。

三、建議

無

四、攜回資料名稱及內容

開會流程及微孢子蟲組摘要影印本。

五、其他

無