



Construction of Recombinant Baculovirus Containing the *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin Gene 【Research report】

構築含蘇力菌內毒素基因之重組昆蟲桿狀病毒【研究報告】

Yaochung Hu, Chu-Fan Lo, Cheng-Jen Shih
胡耀中、羅竹芳、石正人

*通訊作者E-mail:

Received: 1994/09/21 Accepted: 1994/12/01 Available online: 1994/12/01

Abstract

The δ-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* aizawai 7.29 specifically active against the tobacco cutworm *Spodoptera* spp. has been cloned to baculovirus transfer vector. Three transfer vectors were also constructed, ie., 1. pIBL-T7 : The characters used baculovirus polyhedrin promoter to drive foregin gene and the insert δ-endotoxin gene was not truncated. 2. pIBL-UW1 : This transfer vector using P10 promoter to drive δ-endotoxin gene, so the tentative recombinant virus would be expected to be a polyhedra positive virus and provide a good persistance for the recombinant virus. In addition, the 5' terminal was truncated to remove excess nucleotides between promoter and translation start site, which may reduce the influences on gene expression. 3. pIBL1393 : The cloning vector provides multiple cloning sites, and is convenient for gene cloning. The insert gene will be driven by polyhedrin promoter. The δ-endotoxin gene used for cloning was synthesized by polymerase chain reaction, which would be expected to be a high expression of the δ-endotoxin due to the exactly cloning the coding region. All of the above three transfer vectors were co-transfected with wild type DNA from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) to generate genetically engineered recombinant viruses. These recombinant viruses were purified by limiting dilution. Polymerase chain reaction and Southern blot were used to confirm that δ-endotoxin was exactly inserted into the genome of AcNPV. Three recombinant viruses, ie, Acendo-T7, Acendo-UW1 and Acendo-1393, were obtained during this experiment. The δ-endotoxin gene expression was detected by northern hybridization and western blot. Those result indicated that all of three recombinant viruses produced δ-endotoxin when infected insect cell.

摘要

將蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* aizawai 7.29) 內毒素基因剪接入昆蟲桿狀病毒傳送載體，本試驗共構築三種傳送載體，分別為pIBL-T7、pIBL-UW1及pIBL-1393。上述三種載體均經限制每切割，以確定剪接方向正確；利用DNA定序，確定選殖區之核酸序列完整；並以PCR方法，確定δ內毒素基因接入無誤後，利用此三種含蘇力菌δ內毒素基因之昆蟲桿狀病毒傳送載體DNA，分別與野生型病毒DNA進行共同轉染，將蘇力菌δ內毒素基因選殖至野生型病毒基因組中。產生之重組病毒利用終點稀釋法純化。利用聚合每聯鎖反應及南方浸漬轉印等方法鑑定重組病毒，分別定名為Acendo-T7、Acendo-UW1及Acendo-1393。抽取經重組病毒感染之細胞RNA並用dot-blot雜合法測試，可測得重組病毒轉錄之δ內毒素mRNA。利用western blot可檢測到受重組病毒感染之細胞有δ內毒素蛋白質的表現。綜合以上之結果分析，本試驗所得之重組病毒確實嵌入蘇力菌δ內毒素基因，且試驗所構築之重組病毒在細胞內可表現δ內毒素蛋白。

Key words: Baculovirus transfer vector, nuclear polyhedrosis virus, *Bacillus thuringiensis*, δ-endotoxin gene, recombinant virus.

關鍵詞: 桿狀病毒表現載體、核多角體病毒、蘇力菌、δ內毒素基因、重組病毒。

Full Text: [PDF \(16.97 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

構築含蘇力菌內毒素基因之重組昆蟲桿狀病毒

胡耀中 國立台灣大學植物病蟲害學系 台北市羅斯福路四段1號

羅竹芳 國立台灣大學動物學系 台北市羅斯福路四段1號

石正人 國立台灣大學植物病蟲害學系 台北市羅斯福路四段1號

摘要

將蘇力菌(*Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29) δ 內毒素基因剪接入昆蟲桿狀病毒傳送載體，本試驗共構築三種傳送載體，分別為 pIBL-T7、pIBL-UW1及 pIBL-1393。上述三種載體均經限制酶切割，以確定剪接方向正確；利用 DNA 定序，確定選殖區之核酸序列完整；並以 PCR 方法，確定 δ 內毒素基因接入無誤後，利用此三種含蘇力菌 δ 內毒素基因之昆蟲桿狀病毒傳送載體 DNA，分別與野生型病毒 DNA 進行共同轉染，將蘇力菌 δ 內毒素基因選殖至野生型病毒基因組中。產生之重組病毒利用終點稀釋法純化。利用聚合酶聯鎖反應及南方浸漬轉印等方法鑑定重組病毒，分別定名為 Acendo-T7、Acendo-UW1 及 Acendo-1393。抽取經重組病毒感染之細胞 RNA 並用 dot-blot 雜合法測試，可測得重組病毒轉錄之 δ 內毒素 mRNA。利用 western blot 可檢測到受重組病毒感染之細胞有 δ 內毒素蛋白質的表現。綜合以上之結果分析，本試驗所得之重組病毒確實嵌入蘇力菌 δ 內毒素基因，且試驗所構築之重組病毒在細胞內可表現 δ 內毒素蛋白。

關鍵詞：桿狀病毒表現載體、核多角體病毒、蘇力菌、 δ 內毒素基因、重組病毒。

**Construction of Recombinant Baculovirus Containing the
Bacillus thuringiensis δ -endotoxin Gene**

Yaochung Hu Department of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan University, 1 Roosevelt Road, Sec.IV, Taipei, Taiwan, R.O.C.

Chu-Fan Lo Department of Zoology, National Taiwan University, 1 Roosevelt Road, Sec. IV, Taipei, Taiwan, R.O.C.

Cheng-Jen Shih Department of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan University, 1 Roosevelt Road, Sec.IV, Taipei, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

The δ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29 specifically active against the tobacco cutworm *Spodoptera* spp. has been cloned to baculovirus transfer vector. Three transfer vectors were also constructed, ie., 1. pIBL-T7: The characters used baculovirus polyhedrin promoter to drive foregin gene and the insert δ -endotoxin gene was not truncated. 2. pIBL-UW1: This transfer vector using P10 promoter to drive δ -endotoxin gene, so the tentative recombinant virus would be expected to be a polyhedra positive virus and provide a good persistance for the recombinant virus. In addition, the 5' terminal was truncated to remove excess nucleotides between promoter and translation start site, which may reduce the influences on gene expression. 3. pIBL1393: The cloning vector provides multiple cloning sites, and is convenient for gene cloning. The insert gene will be driven by polyhedrin promoter. The δ -endotoxin gene used for cloning was synthesized by polymerase chain reaction, which would be expected to be a high expression of the δ -endotoxin due to the exactly cloning the coding region. All of the above three transfer vectors were co-transfected with wild type DNA from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) to generate genetically engineered recombinant viruses. These recombinant viruses were purified by limiting dilution. Polymerase chain reaction and Southern blot were used to confirm that δ -endotoxin was exactly inserted into the genome of AcNPV. Three recombinant viruses, ie, Acendo-T7 , Acendo-UW1 and Acendo-1393, were obtained during this experiment. The δ -endotoxin gene expression was detected by northern hybridization and western blot. Those result indicated that all of three recombinant viruses produced δ -endotoxin when infected insect cell.

Key words: Baculovirus transfer vector, nuclear polyhedrosis virus, *Bacillus thuringiensis*, δ -endotoxin gene, recombinant virus.

前　　言

植物病蟲害防治工作由於大量化學藥劑的施用，不但使得抗藥性的問題層出不窮，

也造成環境生態污染及次要害蟲再猖獗等。因此植物保護人員，不斷研究其它防治法，以取代或降低對化學防治的依賴，其中微生物防治佔重要的地位。

在衆多微生物殺蟲劑中，又以桿狀病毒(baculovirus)及蘇力菌(*Bacillus thuriensis*, Bt.)最為廣泛使用。利用病毒殺蟲劑防治害蟲，雖然有其優點，但因對標的害蟲致死時間太長，使其失去與化學藥劑競爭的能力，無法施用於經濟為害限界較低的作物。近年來由於遺傳工程技術的進步，以及各種昆蟲病原性微生物的基礎研究完備，可結合不同微生物殺蟲特性，發展病原性更強的重組微生物，提高其應用價值。(Kirschbaum, 1985; Wood and Granados, 1991)。

Smith *et al.* (1983)成功的利用苜蓿夜蛾核多角體病毒(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, AcNPV)發展出桿狀病毒表現載體系統(baculovirus expression vector system, BEVS)，可大量表現外源基因，是為強力之真核細胞表現載體(Miller, 1988; Maeda, 1989)。利用此系統可將對昆蟲具專一性的有毒基因接入野生型桿狀病毒基因組中，增強病毒的致病效果，縮短感染時間，解決蟲害防治問題(Stewart *et al.*, 1991; Tomalski and Miller, 1991; Hawtin *et al.*, 1992)。

蘇力菌依照鞭毛抗原性(flagellar H-antigen)來區分，可分為34個血清變種型(sero-vars) (de Barjac and Frachon, 1990)。蘇力菌能製造多種毒素蛋白，其中以 δ 內毒素(δ -endotoxin)因對昆蟲具有專一性且毒性強，所以廣泛被用在蟲害防治上(Gill *et al.*, 1992)。 δ 內毒素的產生主要是由Bt質體在產孢過程中製造出蛋白質結晶體；控制編碼 δ 內毒素之基因(cry gene)已從多種蘇力菌中選殖出來，依寄主範圍可區分為五類(Hofte and Whiteley, 1989)，其中cryI基因產生的結晶體主要感染鱗翅目昆蟲。本試驗選取的 δ 內毒素基因是屬於*Bt. aizawai* 7.29，最早

由Kalfon and de Barjac (1985)篩選而得。Sanchis *et al.* (1988)利用不同限制酶切割後，選殖數種不同的 δ 內毒素基因，其中pHT71基因對*Spodoptera*這一屬的昆蟲具專一致毒效果(Sanchis *et al.*, 1988; Sanchis *et al.*, 1989)。

本研究利用桿狀病毒傳送載體，將對*Spodoptera*屬昆蟲具專一毒性之蘇力菌 δ 內毒素基因，以共同轉染方式選殖到野生型核多角體病毒基因組上，產生重組病毒，使其兼具細菌性與病毒性雙重殺蟲效果，期望能縮短致死時間，提高未來利用病毒在田間防治斜紋夜盜蟲(*Spodoptera litura*)之可行性。

材料與方法

材料：

一、蘇力菌 δ 內毒素基因及抗體

蘇力菌(*Bt aizawai* 7.29) δ 內毒素基因位於質體pHT71上，包含HindIII-PstI片段部分，由法國巴斯德學院Dr. V. Sanchis所贈與。蘇力菌 δ 內毒素抗體則由農藥所段淑人小姐提供。

二、供試細胞株及病毒

供試細胞株為秋行軍蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞株SF21AE，由台大動物所羅竹芳教授贈與。培養於含有8%胎牛血清(fetal calf serum, FCS)、1.75 μ g / μ l fungizone和50 IU / μ l penicillin及streptomycine的TNM-FH培養液中，培養溫度為28°C，每隔三天進行繼代培養。苜蓿夜蛾核多角體病毒(AcNPV, E2 strain)及共同轉染用之病毒DNA購自Pharmigen公司之Baculogold kit(cat. 21200)。

三、各式質體來源

- 選殖載體：pBluescriptII SK(+), 購自Stratagene公司(cat. 212205)。

2. 病毒傳送載體：T7，包含核多角體基因啓動子(promoter)及5'與3'側翼區序列(flanking region)，由台大動物所羅竹芳教授贈與。pVL1393，包含核多角體病毒基因啓動子，及pAcUW1，包含P10基因啓動子，購自Pharmingen公司(cat. 21201D及21102D)。

四、核酸合成引子(primer)

本試驗所用的引子乃由Oligo公司與快興科技公司所合成，各種引子序列如下：

Primer 1 5' GGA TCC ATG GAG GAA
BamHI

AAT AAT CAA AA 3'

位於 δ 內毒素基因+1處之正向引子，在+1前加上一個BamHI限制酶切位，以便進行選殖工作。

Primer 2 5' GAA TTC CTG CAG GAA
EcoRI

CAA TCT AGA TC 3'

位於 δ 內毒素基因PstI site之負向引子，在PstI site之後加上一個EcoRI限制酶切位，以便進行選殖工作。

Primer 3 5' AGA TGA GTC GAA ATT
AA 3'

位於 δ 內毒素基因2476 bp以下之正向引子。

Primer 4 5' CTA TCA ATA TAT AGT
TGC TGA TAT C 3'

位於polyhedrin promoter EcoRV site之正向引子，用於檢測選殖之外源基因之核酸序列的正確性。

方法：

一、質體DNA抽取

質體DNA少量抽取法採用boiling method(Sambrook *et al.*, 1989)；大量抽取法则利用Qiagencolumn(購自Qiagen公司, cat. 12125)進行純化。

二、DNA剪接與操作

核酸限制酶與Klenow enzyme乃購自Boehringer Mannheim公司及BRL公司，T4 DNA ligase購自BRL公司，使用方法參照廠商所附之使用說明。DNA片段的純化，以瓊脂(agarose)電泳將DNA片段分離後，以手提式紫外光燈檢查欲純化的DNA片段，用刀片切下欲使用之片段。放入1.5 μ l的離心管中，利用Qiagen公司出產的elution kit(cat. 20020)將DNA純化出來，溶於TE溶液中備用。

三、質體DNA定序法

在傳送載體的構築過程中，常須利用DNA定序法，以檢測 δ 內毒素DNA經過剪接後其核酸序列的正確性。為得高純度的少量DNA，本項試驗使用Promega公司的Minipreparation kit(cat. A7100)作少量質體DNA抽取純化，再用USB公司生產的Sequenase™ ver. 2.0的DNA sequencing kit進行DNA定序，試驗步驟係依照廠商之說明書。定序法簡述如下：首先取3–5 μ g DNA，加入4 μ l 0.1 M NaOH，定溫下作用5分鐘，再加8 μ l 5 M NH4OAc與75 μ l 100% EtOH，置於-20°C，15分鐘，再以13000 rpm離心15分鐘後，沉澱物以70% EtOH沖洗並風乾。繼之以7 μ l ddH2O、1 μ l引子(10 ng/ μ l)、2 μ l reaction buffer溶解沉澱物，並放入100°C，2分鐘，冰浴冷卻1分鐘，再放入37°C水浴槽作引子黏合(annealing)15分鐘。當annealing結束後，加入1 μ l 0.1M DTT、2 μ l經過稀釋的dNTP、0.5 μ l α -p32 dATP、2 μ l經稀釋的Sequenase，室溫作用5分鐘後，分別取3.5 μ l加入已分裝的ddNTP中，37°C作用5分鐘，最後加入4 μ l stop solution存放於-20°C冰箱中。以6% acrylamide gel進行電泳分離，在進行電泳前樣品先經100°C分股(denature)5分鐘，

且膠片先以 1600 V 預跑 1 小時，當電泳結束後以 gel dryer 烘乾膠片，放入片夾中以 X-ray film 於 -70°C 下曝曬 3-12 小時。

四、共同轉染(Cotransfection)

本項試驗利用 Baculogold kit(Pharmigen)進行共同轉染，步驟如下：取 3×10^6 細胞培養於 60x15 mm 的培養皿中，經 15 分鐘後將培養液吸乾，加入 buffer A (Grace medium) 於培養皿中；此時先把病毒 DNA (0.5 μg) 和含蘇力菌內毒素基因之傳送載體(pIBL-T7, pIBL-UW1, pIBL-1393) DNA (10 μg) 置於同一離心管中，5 分鐘後再加入 buffer B (calcium phosphate)，最後將帶有病毒與傳送載體的 buffer B 加入培養皿中。四小時後將溶液吸乾，換成 10% FCS 的 TNM-FH 3 μl ，七天後將含有病毒之 TNM-FH 培養液收集、離心、過濾，進行病毒純化。

五、重組病毒純化與鑑定

重組病毒純化採用終點稀釋法(end point dilution)。將第四項所得的重組病毒培養液，稀釋成 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 後，以每孔 100 μl 病毒液混合 1×10^4 細胞接入 96 孔板培養盒中，在 28°C 生長箱中培養 7 天。觀察細胞被病毒感染後產生之細胞病變(cytopathic effect)，據以挑選單一病毒感染之處理組，進而純化病毒株。重組病毒的鑑定則以點墨雜合法(dot-blot hybridization)進行。探針製備如下項所示。

六、探針的製備、雜合與顯影

製備 δ 內毒素基因之探針，採用 BM 公司所生產的 Dig nucleic acid labeling and detection 系統，詳細操作步驟請參照廠商說明。其探針製備與呈色法簡述如下：將 0.3-3 μg 之 δ 內毒素基因 DNA (位於質體 pHT71 上，2.7 Kb) 加上 2 μl random primer、2 μl labeling mixture，加水至 19 μl ，以 100°C 煮 3 分鐘，冰浴 1 分鐘後，加 1 μl Klenow

enzyme，37°C 下作用一個晚上。將探針取出，先以 0.1 X TE buffer 補至 100 μl ，然後通過 G-50 column，存放於 -20°C 中備用。

利用點墨雜合器將 50 μl 病毒粒子吸附於 Hybond-N membrane (Amersham cat. RPN.303N) 上，並將 membrane 分別以變性與中和溶液各作用 10 分鐘，使 DNA 裸露出來。再以 2 X SSC 濃潤 10 秒，放入 UV 交互連結器進行 DNA 的固定。再將 membrane 放入夾鍊袋中，加入雜合溶液(hybridization buffer)，於 50°C 進行前雜合反應 (prehybridization) 3 小時，而後再加入以 δ 內毒素基因作的探針 (probe) 進行雜合反應，42°C，12-16 小時。最後再以 Dig 顯影，風乾後放入片夾中，以 X-ray film 在 37°C 下曝曬 15-40 分鐘。

七、重組病毒之檢測

1. 聚合酶聯鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 法：

利用 PCR 方法進行重組病毒之鑑定，方法參照 Malitschek and Scharti (1991) 及 Goswami and Glazer (1991)，簡述如下：取 10 μl 待測病毒液加入 90 μl PCR buffer A (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ gelatin, 0.45% NP-40, 0.45% Tween-20) 和 10 μg Proteinase K 於 60°C 作用 1 小時，再煮沸 10 分鐘，取 50 μl 作用過的溶液加入下列反應物：1.25 mM dNTP 18 μl 、2.5 U Taq DNA polymerase、0.5 ng Primer 1, 2 及 5 μl PCR buffer B (25 mM MgCl₂, 10X PCR buffer A)，加水至 100 μl ，並加入 50 μl mineral oil，即可進行反應，反應條件如下：94°C 1 min.; 42°C 1 min.; 72°C 5 min.; 共進行 35 cycles。將上述 PCR 作完之產物，取 10 μl 進行電泳分析，確定分子量和 δ 內毒素基因相似後，將電泳膠片以 Hybond-N membrane 作南方轉濱

(Southern blot)後，放入紫外燈連結器中，將 DNA 固定並進行雜合反應及顯影呈色。

2.RNA 萃取及雜合反應：

細胞質 mRNA 的抽取為將 1 X 10⁷ SF21AE 細胞接種於 80T 的細胞培養盒，將試驗所用病毒以 MOI=10 之劑量感染細胞，於 48 小時後，將病毒液倒去並加 1 μl RNA zolB (TIB, cat. CS-104)，把細胞溶掉，並加 100 μl chloroform，振動 15 秒後以 13000 rpm 離心 30 分鐘，取上清液，加等體積 isopropanol, 4°C 沉澱 15 分鐘，以 13000 rpm 離心 30 分鐘，倒掉上清液，用 70% EtOH 洗兩次，風乾後溶於 50 μl 經 DEPC (Diethyl pyrocarbonate) 處理過的水中，並置於 65°C 水浴槽中 15 分鐘以溶解 RNA，取 10 μl 作 dot hybridization。此時各供試病毒感染劑量及感染細胞數均相同，而 RNA 之濃度為 50 μl / 10⁷ cell。Northern blot 係依下述方法進行：取 10 μl 萃取之 RNA 加 40 μl 15X SSC 充份混合，再加 30 μl 20X SSC 和 20 μl formaldehyde，在 65°C 水浴加熱 15 分鐘後，以點墨雜合器將 RNA 轉印至 Hybond-N membrane，再以 Dig 標定探針進行北方型雜交並進行顯影。

八、蛋白質的分析

利用西方點墨法(western blot)檢測重組病毒表現之δ內毒素蛋白質。方法如下：將 SF21AE 細胞以 3x10⁵ cell / well 的密度種於 4 孔板中，並以 MOI=10 之病毒濃度感染，在特定的感染時數時，將培養液吸去，並以 PBS 洗兩次，再將細胞溶於 100 μl 1 X SDS sample buffer 中，煮沸 5 分鐘後，取 10 μl 進行電泳(SDS-PAGE)。電泳後利用 electro-blotting(電流為 100 mA，電壓 40 V，時間為 1 小時)方式，將蛋白質轉印至 NC (nitrocellulose) paper。以 1X TBS 溶液沖洗，再以 3% 脫脂奶粉於 37°C 下 blocking 1

小時，然後與 1 次抗體(rabbit anti-cryIC antibody)於 37°C 下作用 1 小時。以 1 X TBS 洗三次，每次 10 分鐘；再以 2 次抗體(peroxidase-conjugated goat-anti rabbit antibody)同樣於 37°C 下作用 1 小時，再以 1 X TBS 洗三次，每次 10 分鐘，最後與呈色液進行呈色反應。

結果與討論

一、選殖蘇力菌δ內毒素基因至桿狀病毒傳送載體

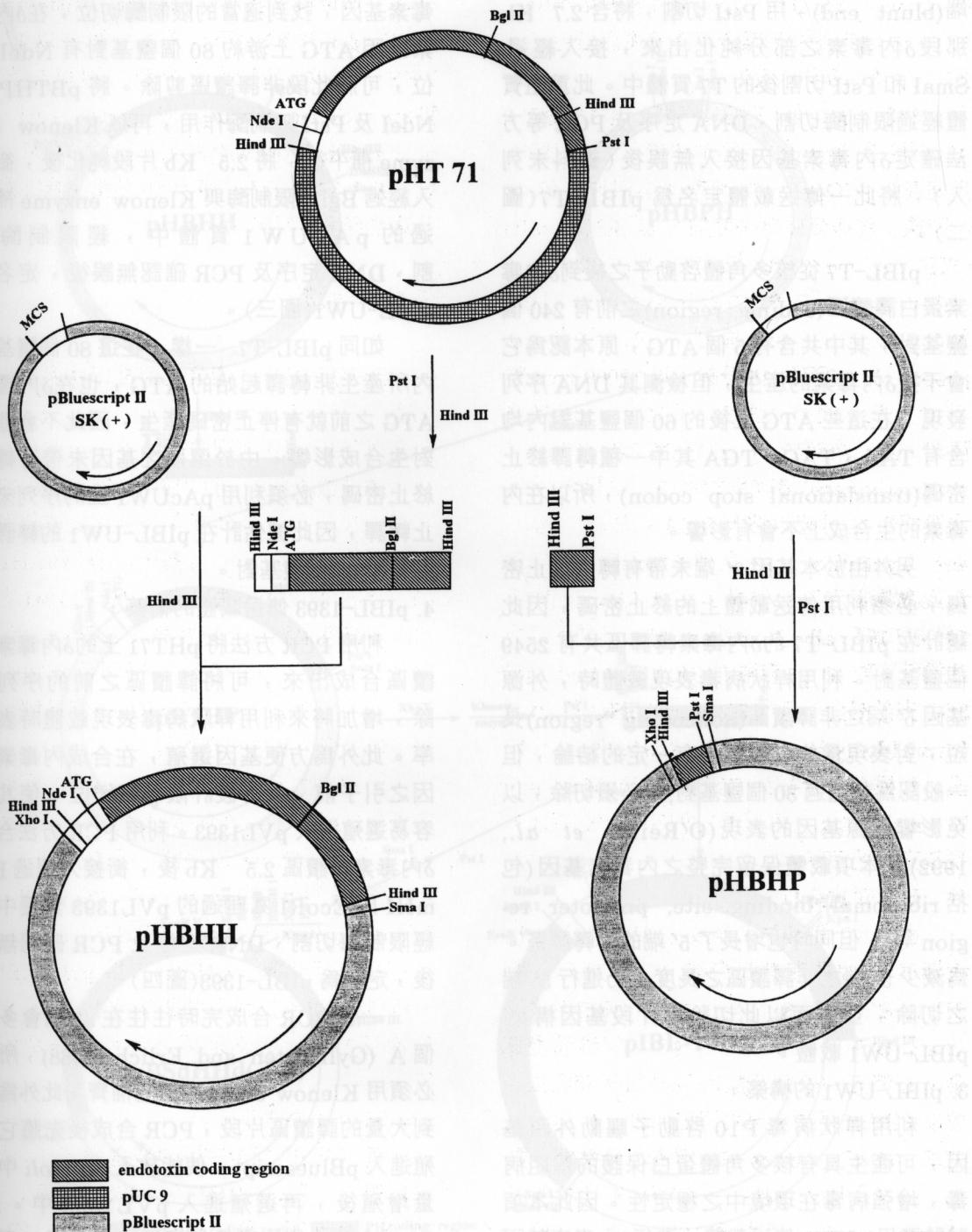
1. 蘇力菌δ內毒素基因之重組：

本試驗所使用的蘇力菌δ內毒素基因位於質體 pUC9 上，其 5' 端 HindIII 之前無適當限制酶切位可利用，且基因內有兩個 Hind III 限制酶切位，無法以 HindIII 和 PstI 直接切割得整段基因，所以在構築之初，為保留δ內毒素基因的完整性及方便利用限制酶切位，利用 pBluescript SK(+) 作為轉接載體，重組蘇力菌內毒素基因。

將 pHT71 用 HindIII 與 PstI 限制酶切成三段，分別為 2.5、2.69 及 0.2 Kb。其中 2.69 Kb 那段為來自 pUC9 捨棄，將 2.5 Kb 與 0.2 Kb 的片段接入 pBluescriptII SK(+) 中，並轉形(transform)至 *E. coli* DH5α strain，得到兩個重組質體 - pHBHH 與 pHBHP(圖一)。此二載體具有可用之限制酶切位，作為剪接蘇力菌內毒素基因入其他傳送載體之用。

2. pIBL-T7 之構築：

為了把δ內毒素基因完整選殖至 T7 的傳送載體上，將 pHBHH 及 pHBHP 用 Hind III 限制酶切開，將 pHBHH 上之 2.5 Kb 片段純化出來，銜接(ligation)入 pHBHP 產生 pBTHP。用 XhoI 切開 pBTHP 重組質體，再加 Klenow enzyme 和 δNTP 補平成鈍



圖一 重組蘇力菌內毒素基因流程圖。

Fig. 1. The flow chart of recombinant *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin gene.

端(blunt end)，用 PstI 切割，將含 2.7 Kb 那段 δ 內毒素之部分純化出來，接人經過 SmaI 和 PstI 切割後的 T7 質體中。此重組質體經過限制酶切割、DNA 定序及 PCR 等方法確定 δ 內毒素基因接入無誤後(資料未列入)，將此一傳送載體定名為 pIBL-T7(圖二)。

pIBL-T7 從核多角體啓動子之後到 δ 內毒素蛋白譯讀區(coding region)之前有 240 個鹽基對，其中共含有 5 個 ATG，原本認為它會干擾 δ 內毒素的產生，但檢測其 DNA 序列發現，在這些 ATG 之後的 60 個鹽基對內均含有 TAA、TAG、TGA 其中一種轉譯終止密碼(translational stop codon)，所以在內毒素的生合成上不會有影響。

另外由於本基因 3' 端末帶有轉譯終止密碼，必須利用傳送載體上的終止密碼，因此總計在 pIBL-T7 的 δ 內毒素轉譯區共有 2549 個鹽基對。利用桿狀病毒表現載體時，外源基因 5' 端之非譯讀區(noncoding region)長短，對表現量的影響雖沒有一定的結論，但一般認為若超過 30 個鹽基對，則必須切除，以免影響外源基因的表現(O'Reilly *et al.*, 1992)。本項載體保留完整之內毒素基因(包括 ribosomal binding site, promoter region 等)，但同時也增長了 5' 端的非譯讀區。為減少 5' 端之非譯讀區之長度，乃進行 5' 端之切除，並進而以此切除之片段基因構築 pIBL-UW1 載體。

3. pIBL-UW1 的構築：

利用桿狀病毒 P10 啓動子驅動外源基因，可產生具有核多角體蛋白保護的重組病毒，增強病毒在環境中之穩定性。因此本項試驗選用 pUW1 傳送載體，進行 δ 內毒素基因選殖。同時盡量將非譯讀區縮短，希望能提高 δ 內毒素表現量。

利用 Gene Bank 的電腦資料庫分析 δ 內

毒素基因，找到適當的限制酶切位，在 δ 內毒素基因 ATG 上游約 80 個鹽基對有 NdeI 切位，可將此段非譯讀區剪除。將 pBTHP 以 NdeI 及 PstI 限制酶作用，再以 Klenow enzyme 補平後，將 2.5 Kb 片段純化後，銜接人經過 BglIII 限制酶與 Klenow enzyme 補平過的 pAcUW1 質體中，經限制酶切割、DNA 定序及 PCR 確認無誤後，定名為 pIBL-UW1(圖三)。

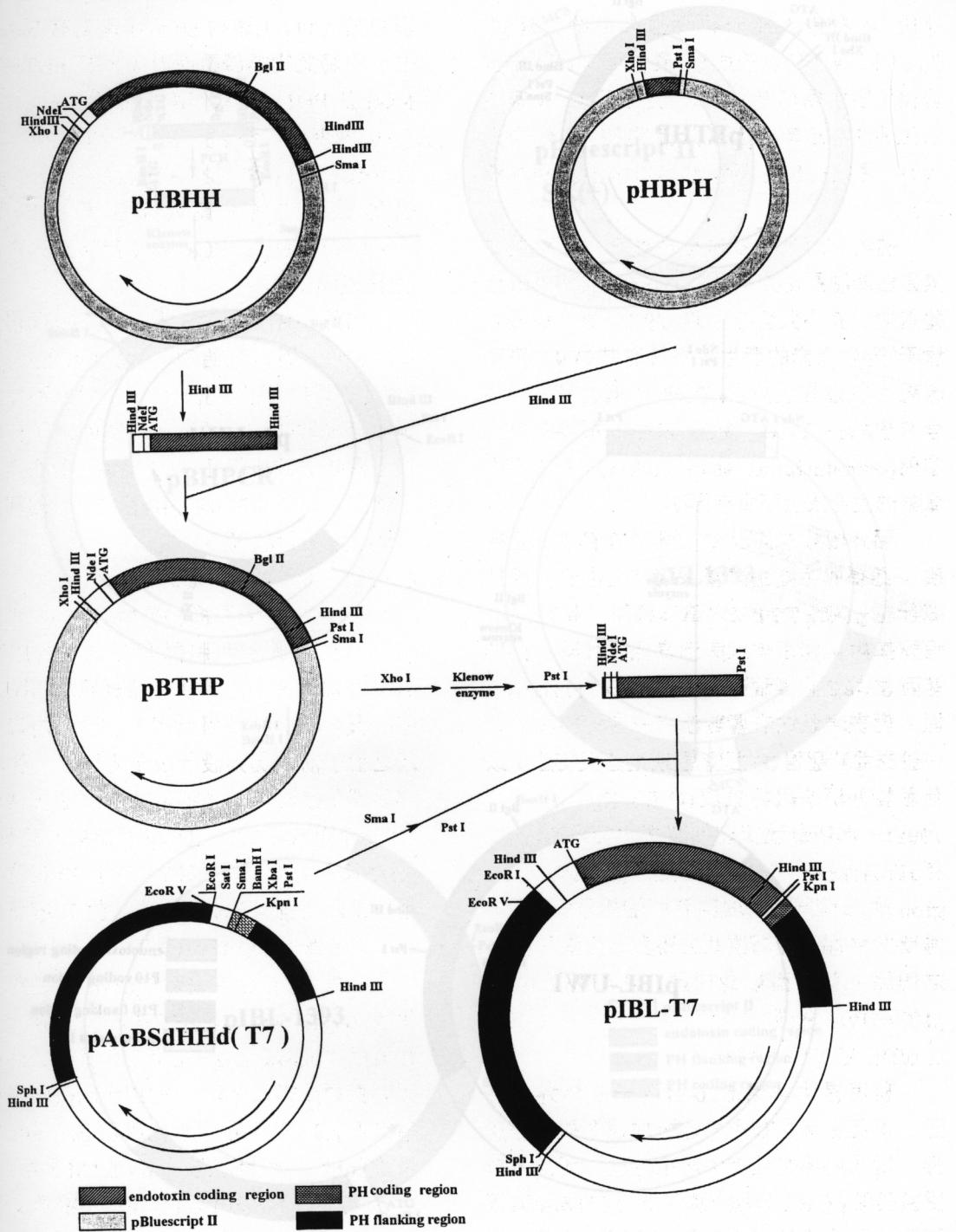
如同 pIBL-T7 一樣，在這 80 個鹽基對內所產生非轉譯起始的 ATG，也在 δ 內毒素 ATG 之前就有停止密碼產生，因此不會造成對生合成影響。由於選殖之基因未帶有轉譯終止密碼，必須利用 pAcUW1 上的序列來停止轉譯，因此據估計在 pIBL-UW1 的轉譯區共有 2601 個鹽基對。

4. pIBL-1393 傳送載體的構築：

利用 PCR 方法將 pHT71 上的 δ 內毒素譯讀區合成出來，可將譯讀區之前的序列去除，增加將來利用桿狀病毒表現載體時表現率。此外為方便基因選殖，在合成內毒素基因之引子前，另外設計限制酶切位，使其更容易選殖進入 pVL1393。利用 PCR 方法合成 δ 內毒素譯讀區 2.5 Kb 後，銜接人經過 BamHI 與 EcoRI 處理過的 pVL1393 質體中，經限制酶切割、DNA 定序及 PCR 確認無誤後，定名為 pIBL-1393(圖四)。

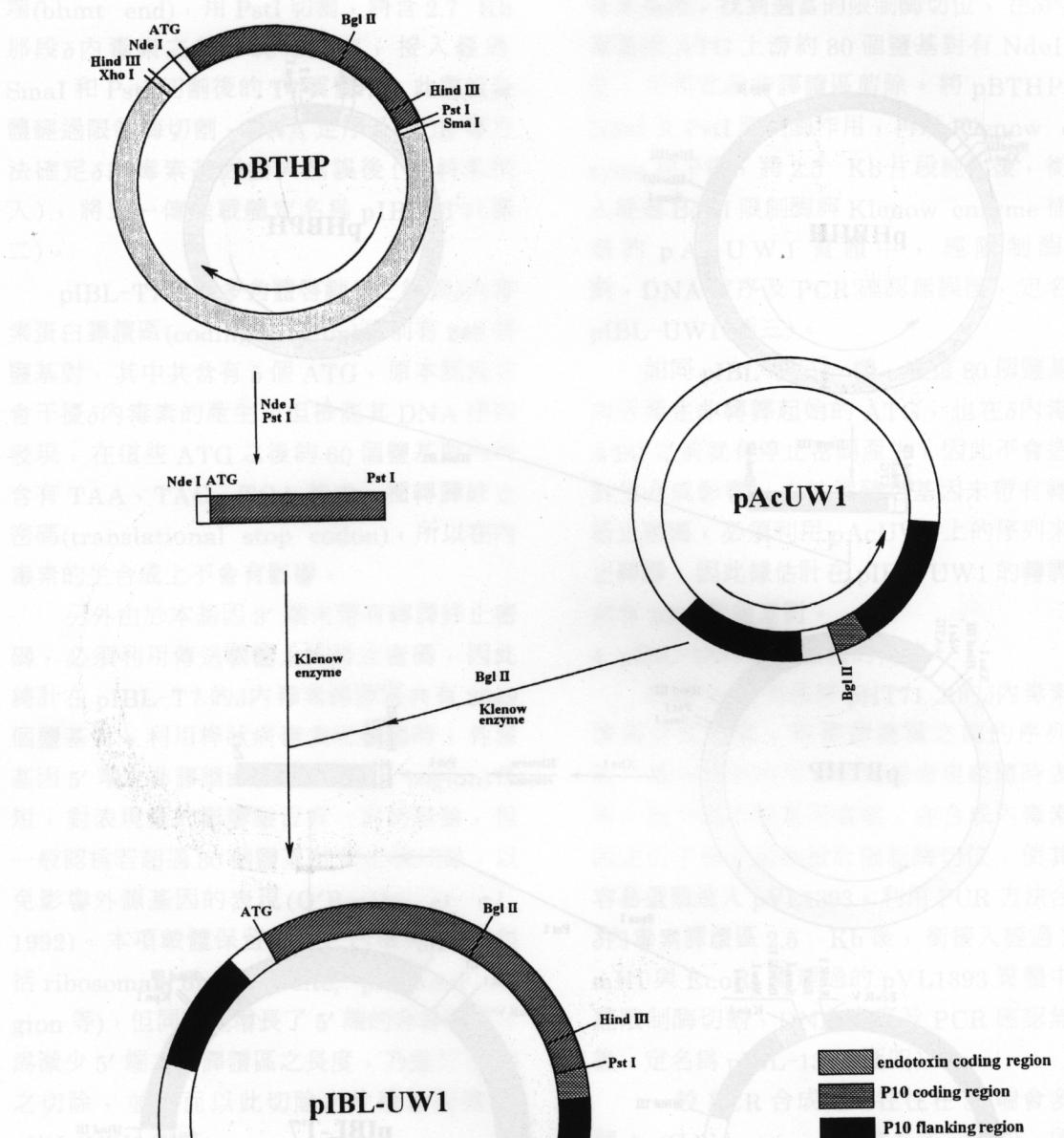
一般 PCR 合成完時往往在 3' 端會多一個 A (Gyllensten and Erlich, 1988)，所以必須用 Klenow enzyme 將它補齊。此外為得到大量的譯讀區片段，PCR 合成後先將它選殖進入 pBluescript，使能放入 *E. coli* 中大量增殖後，再選殖進入 pVL1393 中。以 PCR 合成出的片段仍無轉譯終止密碼，須用 pVL1393 上的中止密碼，所以估計 pIBL-1393 的轉譯區共有 2573 個鹽基對。

為使將來蘇力菌 δ 內毒素基因能得到高表



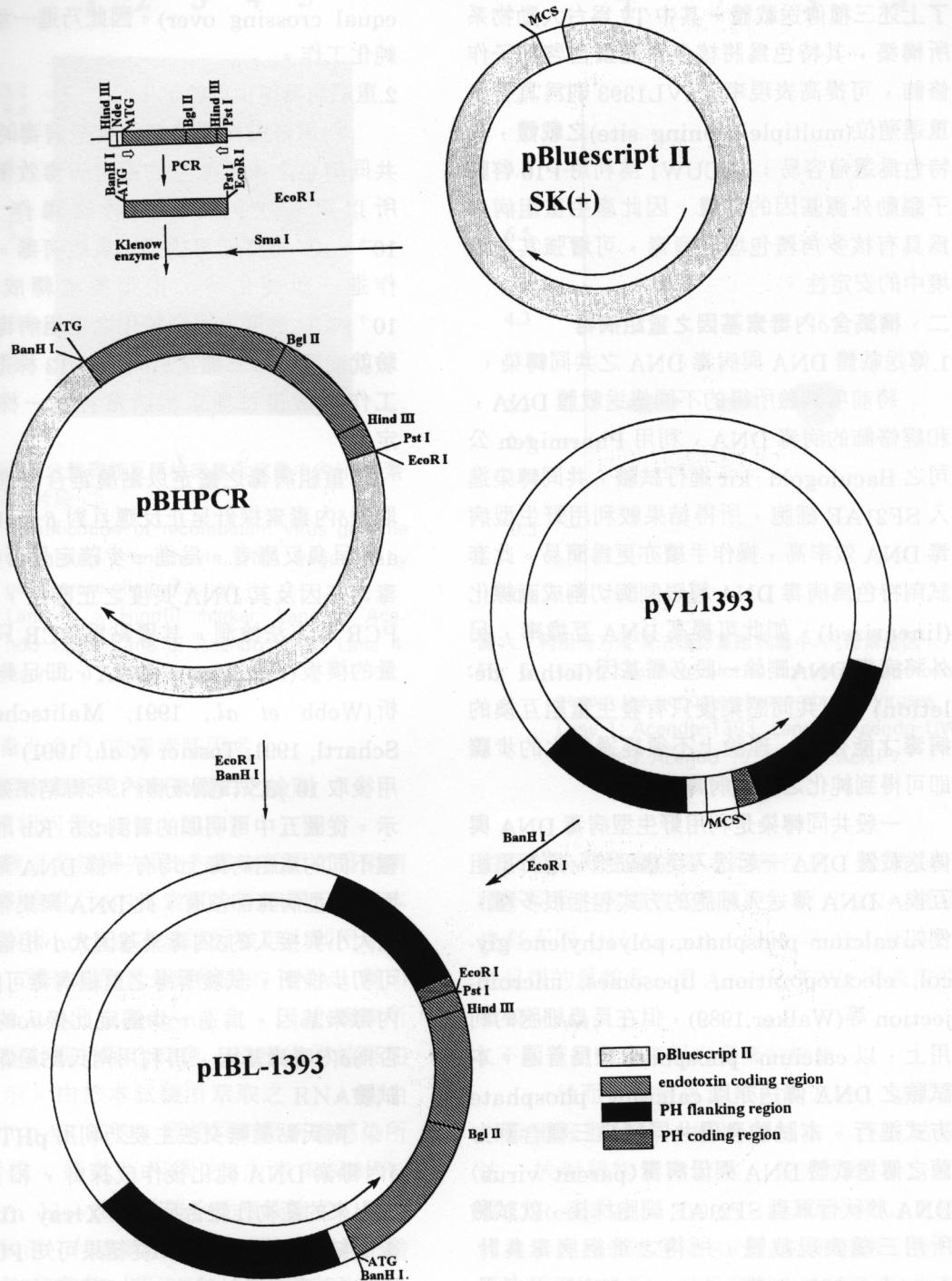
圖二 構築傳送載體 pIBL-T7 流程圖。

Fig. 2. The flow chart of construction of pIBL-T7 transfer vector.



圖三 構築傳送載體 pIBL-UW1 流程圖。

Fig. 3. The flow chart of construction of pIBL-UW1 transfer vector.



圖四 構築傳送載體 pIBL-1393 流程圖。

Fig. 4. The flow chart of construction of pIBL-1393 transfer vector.

現率，及重組後的病毒具有生物活性，選用了上述三種傳送載體。其中 T7 為台大動物系所構築，其特色為將核多角體蛋白啓動子作修飾，可提高表現率；pVL1393 則為具有多重選殖位(multiple cloning site)之載體，其特色為選殖容易；pACUW1 為利用 P10 啓動子驅動外源基因的載體，因此產生重組病毒為具有核多角體包埋之病毒，可增強其在環境中的安定性。

二、構築含 δ 內毒素基因之重組病毒

1. 傳送載體 DNA 與病毒 DNA 之共同轉染：

將前項試驗所得的不同傳送載體 DNA，和經修飾的病毒 DNA，利用 Pharmigen 公司之 Baculogold kit 進行試驗，共同轉染進入 SF21AE 細胞，所得結果較利用野生型病毒 DNA 效率高，操作手續亦更為簡易。此套試劑特色為病毒 DNA 經限制酶切割成直線化(linearized)，如此可提高 DNA 互換率，另外將病毒 DNA 刪除一段必需基因(lethal deletion)，則共同感染後只有發生重組互換的病毒才能存活，理論上不須經過純化的步驟即可得到純化之重組病毒。

一般共同轉染是利用野生型病毒 DNA 與傳送載體 DNA 一起送入昆蟲細胞，進行重組互換。DNA 傳送入細胞的方式包括很多種，例如 calcium phosphate, polyethylene glycol, electroporation, liposomes, microinjection 等(Walker, 1989)，但在昆蟲細胞的利用上，以 calcium phosphate 較為普遍。本試驗之 DNA 傳送亦以 calcium phosphate 方式進行。本試驗發現共同轉染三種含蘇力菌之傳送載體 DNA 與母病毒(parent virus) DNA 於秋行軍蟲 SF21AE 細胞株後，就試驗所用三種表現載體，所得之重組病毒共計 Acendo-1393: 4 株、Acendo-UW1: 3 株及 Acendo-T7: 6 株。檢視所得之病毒液得知並非均為重組病毒，原因可能是病毒 DNA 在同

源互換時，產生單次不完全的置換(single unequal crossing over)。因此乃進一步作病毒純化工作。

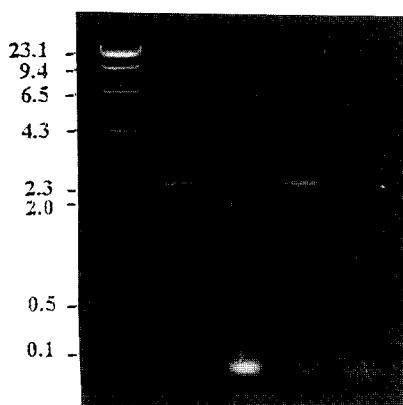
2. 重組病毒純化與鑑定：

利用終點稀釋法純化重組病毒時，由於共同轉染之後所產生的重組病毒效價較低，所以第一次純化只須將病毒作 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 稀釋即可挑選出重組病毒。若要再作進一步純化時，則須要稀釋成 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 濃度方可得純化之重組病毒。本試驗就前項所得三種重組病毒共 13 株進行純化工作，最後每種重組病毒各挑一株進行鑑定。

重組病毒之鑑定以點墨雜合法進行，選取對 δ 內毒素探針呈正反應且對 β -galactosidase 呈負反應者。為進一步確定是否嵌入 δ 內毒素基因及其 DNA 長度之正確性，乃利用 PCR 的方法檢測。其優點為 PCR 只須用微量的模板(template) DNA，即足夠用來分析(Webb *et al.*, 1991; Malitschek and Schartl, 1991; Tessier *et al.*, 1991)。PCR 作用後取 $10 \mu\text{l}$ 做電泳分析，所得結果如圖五所示。從圖五中可明顯的看到 2.5 Kb 附近，三種不同的重組病毒上均有一條 DNA 聚集帶，而野生型病毒卻沒有，此 DNA 聚集帶的分子量大小與接入的 δ 內毒素基因大小相當。由此可初步推斷，試驗所得之重組病毒可能帶有 δ 內毒素基因。為進一步鑑定此接入的基因是否為 δ 內毒素基因，再利用南氏點墨雜交法作試驗。

南氏點墨雜交法主要乃利用 pHT71 上的 δ 內毒素 DNA 純化後作成探針，和 PCR 合成出來的產物作雜合反應及 X-ray film 呈像後，結果如圖六所示。從結果可知 PCR 產物可被 δ 內毒素探針雜合，此證明重組病毒基因組中的 δ 內毒素 DNA 大小和性質，與原先在 pHT71 上的內毒素 DNA 相同，亦即所得之

1 2 3 4 5



圖五 利用聚合酶聯鎖反應檢定重組病毒中含 δ -內毒素 DNA 片段。

Fig. 5. Identification of recombinant virus genome containing δ -endotoxin DNA fragment by polymerase chain reaction

Lane 1: λ HindIII marker, Lane 2: Acendo-1393, Lane 3: Acendo-UW1, Lane 4: Acendo-T7, Lane 5: AcNPV.

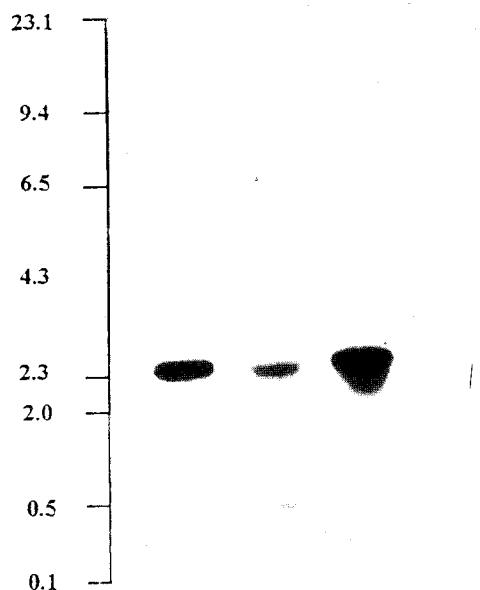
重組病毒乃含有 δ -內毒素基因者。

三、重組病毒表現內毒素蛋白之檢測

1. 不同重組病毒 mRNA 的檢測：

為確定剪接蘇力菌 δ -內毒素基因之重組病毒，是否會進行 δ -內毒素蛋白質轉譯工作，本項試驗採用 mRNA 方法進行檢定。利用點墨雜合器，將從細胞質分離所得的 RNA，轉印於 Hybond-N membrane 上。以 δ -內毒素所製成的探針進行雜合反應，反應後的結果如圖七所示。由於本試驗所萃取之 RNA 均由 10^7 個 SF21AE 細胞，經相同劑量病毒感染所轉錄而成，因此以相同之 δ -內毒素探針作 northern blot 後，若雜合反應較強者，其顯影效果較深，代表其 RNA 含量較高。本試驗就未感染病毒者、感染野生型病毒者及感染三種重組病毒者，所萃得之 RNA 各取 $10 \mu\text{l}$ 進行雜合，比較所得結果可知，未感染病毒

1 2 3 4



圖六 利用南方浸漬法確認重組病毒中 δ -內毒素基因。

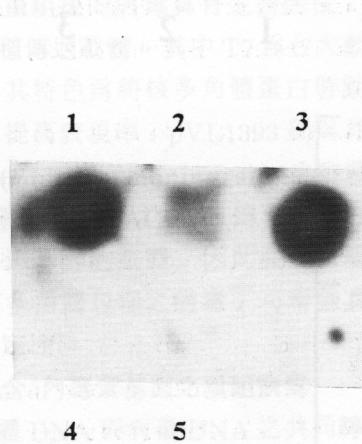
Fig. 6. Using Southern blot to confirm δ -endotoxin gene in the genome of recombinant viruses

Lane 1: Acendo-1393, Lane 2: Acendo-UW1, Lane 3: Acendo-T7, Lane 4: AcNPV.

者與感染野生型病毒者均無反應，而感染三種不同重組病毒者皆有反應，而且 RNA 總量也有不同，以 Acendo-1393 與 Acendo-T7 所呈現的量較多，而 Acendo-UW1 所表現的量較少。

2. 不同重組病毒表現內毒素的檢測：

一般而言檢定外源蛋白的方法，包括蛋白質電泳膠片的一般性染色法、西方點墨法、放射線物質標定法、螢光抗體檢定法等(O'Reilly *et al.*, 1992)。將試驗所得之重組病毒，經純化後感染 SF21AE 細胞株，並作蛋白質電泳分析，結果發現未能偵測到 δ -內毒素蛋白被表現。推測其原因可能為 δ -內毒素蛋白表現量太弱，以致於普通一般蛋白質染色



圖七 利用北方浸漬法偵測重組病毒轉錄 δ 內毒素基因。

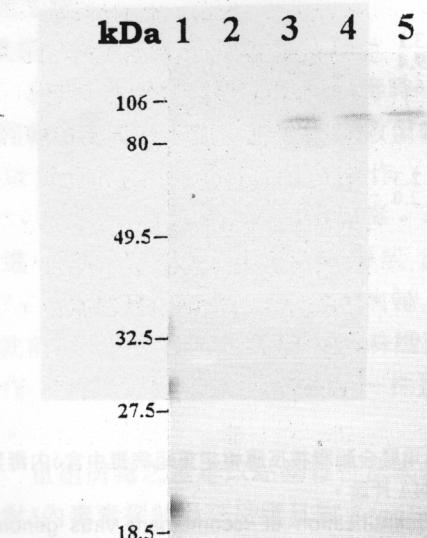
Fig. 7. Using northern blot to detect the transcription of δ -endotoxin gene in the recombinants.

Dot 1: Acendo-1393, Dot 2: Acendo-UW1,
Dot 3: Acendo-T7, Dot4: Mock, Dot 5:
AcNPV.

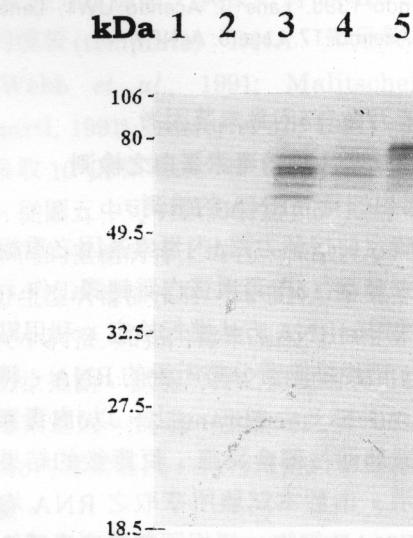
方法無法偵測到。因此本試驗採用靈敏度(sensitivity)較高的西方點墨法檢定。

利用西方點墨法檢測三種重組病毒之蛋白質表現，所得之結果如圖八。圖八A是感染重組病毒後 72 小時， δ 內毒素表現情形，三株重組病毒分別於 106–80 kDa 間有一條蛋白質帶和 δ 內毒素抗體產生結合反應。根據 Sachis *et al.* (1989)所構築之 pHT71，其上之 δ 內毒素基因所表現的蛋白質分子量為 92 kDa，而本試驗在 106–80 kDa 之間有一條蛋白質帶出現，因此就分子量而言，此蛋白質生成符合剪接之基因長度。為探討所表現之蛋白質在細胞內之穩定性，乃進行不同感染後時間之蛋白質檢測，結果在感染後 96 小時檢測 δ 內毒素產生的情形如圖八 B 所示。從圖中可以明顯看出有一些蛋白質降解現象(degradation)發生。由於 pHT71 所含的 δ 內毒素基因，是將完整的 δ 內毒素基因經過 3' 端刪

A



B



圖八 利用西方浸漬法偵測重組病毒表現 δ 內毒素蛋白。

A : 感染後 72 小時，B : 感染後 96 小時。

Fig. 8. Using western blot to show the protein production of δ -endotoxin gene in the recombinant viruses. A. 72 hours after infection, B. 96 hours after infection.

Lane 1: Mock, Lane 2: AcNPV, Lane 3: Acendo-1393, Lane 4: Acendo-UW1, Lane 5: Acendo-T7.

除，把非毒性作用區(nontoxin domain)去除，只保留毒蛋白作用區(Sanchis *et al.*, 1988; Lecadet *et al.*, 1988)；然而 δ 內毒素的3'區域不僅與結晶體的形成有關，且與mRNA的穩定度有關，所以去除3'端部分區域，不但使結晶體無法形成，而且易使 δ 內毒素蛋白呈現不穩定的現象(Hofte and Whiteley, 1989; Aronson *et al.*, 1986)。所以在感染後96小時會產生蛋白質的降解，除因細胞裂解(lysis)造成之外， δ 內毒素蛋白本身不穩定也是其中一個主因。

從以上試驗可知，利用含蘇力菌 δ 內毒素基因之桿狀病毒傳送載體，所構築之含 δ 內毒素重組病毒，可準確地將 δ 內毒素基因嵌入桿狀病毒基因組內。重組病毒感染細胞株後，利用西方浸漬雜交法，可檢測到所表現之蘇力菌 δ 內毒素蛋白質，至於其所表現之蛋白質是否具有生物活性及重組病毒對細胞或活體昆蟲之毒性如何，仍待進一步探討。

誌謝

本試驗承行政院國家科學委員會資助(計畫編號NSC 82-0409-B-002-071)及行政院農業委員會經費資助(計畫編號83-科技-1.1糧-61(14))得以完成，特此致謝。試驗期間本系王重雄教授、農藥所高穗生主任及段淑人小姐提供協助，及二位編審委員提供寶貴意見，謹此併申萬分謝忱。

參考文獻

- Aronson, A. I., W. Beckman, and P. Dunn.** 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50: 1-24.
de Barjac, H., and E. Frachon. 1990.

Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga* 35: 233-240.

- Gill, S. S., E.A. Cowles, and P. V. Pietrantonio.** 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
Goswami, B. B., and R. I. Glazer. 1991. A simplified method for the production of recombinant baculovirus. *Biotechniques* 10: 626-630.

Gyllensten, U. B., and H. A. Erlich. 1988. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7652-7656.

Hawtin, R. E., L. A. King, and R. D. Possee. 1992. Prospects for the development of genetically engineered baculovirus insecticide. *Pestic. Sci.* 34: 9-15.

Hofte, H., and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.

Kalfor, A. R., and H. de Barjac. 1985. Screening of the insecticidal activity of *B. thuringiensis* strains against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. *Entomophaga* 30: 176-185.

Kirschbaum, J. B. 1985. Potential implication of genetic engineering and other biotechnologies to insect con-

- trol. Annu. Rev. Entomol. 30: 51–70.
- Lecadet, M. M., V. Sanchis, G. Menou, P. Rabot, D. Lereclus, J. Chaufaux, and D. Martouret.** 1988. Identification of a δ -endotoxin gene product specifically active against *Spodoptera littoralis* BdV. among proteolysed fraction of the insecticidal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. 7. 29. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2689–2698.
- Maeda, S.** 1989. Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1177–1183.
- Malitschek, B., and M. Schartl.** 1991. Rapid identification of recombinant baculoviruses using PCR. Biotechniques 11: 177–178.
- Miller, L. K.** 1988. Baculoviruses as gene expression vectors. Annu. Rev. Microbiol. 42: 177–199.
- O'Reilly, D. R., L. K. Miller, and V. A. Luckow.** 1992. Baculovirus Expression Vector. W.H. Freeman and Company. New York. 347pp.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning—A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol. 1, 2, 3.
- Sanchis, V., D. Lereclus, G. Menou, J. Chaufaux, and M. M. Lecadet.** 1988. Multiplicity of δ -endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. Mol. Microbiol. 2: 393–404.
- Sanchis, V., D. Lereclus, G. Menou, J. Chaufaux, S. Guo, and M. M. Lecadet.** 1989. Nucleotide sequence and analysis of N-terminal coding region of *Spodoptera*-active δ -endotoxin gene *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. Mol. Microbiol. 3: 229–238.
- Smith, G. A., M. D. Summers, and M. J. Fraser.** 1983. Production of Human beta Interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell. Biol. 3: 2156–2165.
- Stewart, L. M. D., M. Hirst, M. L. Ferber, A. T. Merryweather, P. J. Cayley, and R. D. Possee.** 1991. Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. Nature 352: 85–88.
- Tessier, D. C., D. Y. Thomas, H. E. Khouri, F. Laliberte, and T. Vermette.** 1991. Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to honeybee melittin signal peptide. Gene 98: 177–183.
- Tomalski, M. D., and L. K. Miller.** 1991. Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. Nature 352: 82–85.
- Walker, V. K.** 1989. Gene transfer in insects. Advance Cell Culture 7: 87–124.
- Webb, A. C., M. K. Bradley, S. A. Phelau, J. Q. Wu, and L. Gehrke.** 1991. Use of polymerase chain reaction for screening and evaluation of

recombinant baculovirus clones. *Bio-technique* 11: 512-519.

Wood, A. H., and R. R. Granados. 1991.
Genetically engineered baculoviruses

as agent for pest control. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 69-87.

收件日期：1994年7月12日
接受日期：1994年9月21日