



Establishment of a Cell Line from Pupal Ovaries of Spodoptera Litura (Lepidoptera: Noctuidae) 【Research report】

斜紋夜蛾細胞株之建立【研究報告】

Shih, Cheng-Jen* and Ren-Wei Lin
石正人*、林仁偉

*通訊作者E-mail:

Received: 1995/11/24 Accepted: 1995/12/01 Available online: 1995/12/01

Abstract

A cell line was established from pupal ovaries of the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. This cell line, designated as SL7A, was grown in TNM-FH insect cell culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum. In primary cultures, small numbers of wandering connective-tissue-like cells appeared. After subculturing, cells generally became spherical rather than spindle shaped and adhered to the bottom of the culture plate, forming a monolayer of cells. The growth curve of the cells was $Y = e^{-0.6736 + 0.0323x} \cdot r^2 = 0.98$. The population doubling time during logarithmic growth at 28°C was 21.4h. The saturated population of cells was approximately 2×10^7 cells in a 25-T flask, representing a 20-fold increase over the initial population in 4 days. Karyotype analysis revealed that the nucleus of SL7A cells contained numerous microchromosomes. The number of chromosomes appeared to follow a normal distribution in the range from 63 to 382 with a mean of 215.5 ± 74.3 . Isozyme analysis revealed that the SL7A cell line was characteristically different from 4 insect cell lines.

摘要

從斜紋夜蛾蛹體卵巢建立細胞株，定名為SL7A。初級培養時細胞從組織塊呈變形蟲狀分生而出，經繼代培養六十代後，細胞株之外部型態呈圓球形。利用TNM-FH昆蟲細胞培養液添加10%胎牛血清可繼代培養本細胞株。SK2A細胞在25T培養盒培養時，其附著於培養盒底部程度較弱，比其它細胞株如SF21AE更容易進行繼代培養。SL7A細胞株在28°C定溫箱培養時，細胞生長速率呈指數型生長曲線，細胞倍增時間為21.4小時。利用25T細胞培養盒培養本細胞株時，經四天後最高培養之細胞數量可達 2×10^7 個，約為起始細胞數的20倍。本細胞株染色體呈細小點狀，染色體數量變異很大，最少為63個，最多可達382個，平均為 215.5 ± 74.3 個。同功異構分析顯示，SL7A細胞株在酯、蘋果酸去氫及乳酸去氫等之蛋白質電泳膠片之泳動速率均與其他四種供試細胞株間有顯著不同。

Key words: *Spodoptera litura*, cell line, growth curve, karyotype, isozyme.

關鍵詞: 斜紋夜蛾、細胞株、倍增時間、細胞核型、同功異構。

Full Text: [PDF \(12.94 MB\)](#)

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

斜紋夜蛾細胞株之建立

石正人* 林仁偉 國立台灣大學植物病蟲害學系 臺北市羅斯福路四段1號

摘要

從斜紋夜蛾蛹體卵巢建立細胞株，定名為SL7A。初級培養時細胞從組織塊呈變形蟲狀分生而出，經繼代培養六十代後，細胞株之外部型態呈圓球形。利用TNM-FH昆蟲細胞培養液添加10%胎牛血清可繼代培養本細胞株。SL7A細胞在25T培養盒培養時，其附著於培養盒底部程度較弱，比其它細胞株如SF21AE更容易進行繼代培養。SL7A細胞株在28°C定溫箱培養時，細胞生長速率呈指數型生長曲線，細胞倍增時間為21.4小時。利用25T細胞培養盒培養本細胞株時，經四天後最高培養之細胞數量可達 2×10^7 個，約為起始細胞數的20倍。本細胞株染色體呈細小點狀，染色體數量變異很大，最少為63個，最多可達382個，平均為 215.5 ± 74.3 個。同功異構酶分析顯示，SL7A細胞株在酯酶、蘋果酸去氫酶及乳酸去氫酶等之蛋白質電泳膠片之泳動速率均與其他四種供試細胞株間有顯著不同。

關鍵詞：斜紋夜蛾、細胞株、倍增時間、細胞核型、同功異構酶

前 言

自從天蠶蛾(*Antherea eucalypti*)之卵巢組織首先被成功地建立第一株昆蟲細胞株後(Grace, 1962)，有關之研究工作即如雨後春筍般蓬勃發展(Hink and Hall, 1989)。昆蟲細胞培養之應用範圍甚廣，包括生理生化學、組織胚胎學及病理病毒學上之研究等。近年來更利用昆蟲細胞及昆蟲桿狀病毒表現載體，構築真核細胞表現系統(eukaryotic expression system)。利用此系統可表現多種外源基因(Maeda, 1989)。由於此系統是以昆蟲細胞作為蛋白質生產之工廠，因此比原

核(prokaryotic)表現系統所生產之蛋白質具有較高之生物活性。除供基礎科學研究外，更可實際運用於生產醫藥，從此使昆蟲細胞培養之研究更為重要。

由於病毒對細胞具有專一性，細胞對病毒之感受性不同，因此篩選或建立合適之細胞株作為病毒之寄主，是為當前研究重點之一(Wickham et al., 1992)。Hink et al. (1991)比較23種昆蟲細胞株，發現各種細胞株對重組病毒之感受性不同，且生產外源蛋白量亦有很大差異。因此新細胞株的建立，不論是基礎研究或應用價值，均甚為重要。

自從Grace(1962)建立第一株昆蟲細胞株

以來，已有超過70種以上之昆蟲的細胞株被建立(Hink and Hall, 1989)，其中有很多是利用鱗翅目昆蟲所建立之細胞株，包括多種*Spodoptera*屬之昆蟲，例如*Spodoptera frugiperda*(Vaughn et al., 1977; Lynn and Oberlander, 1983)、*Spodoptera littoralis*(Knudson et al., 1980)及*Spodoptera exigua*(Gelernter and Federici, 1986)等。然而至目前為止，尚無斜紋夜蛾(*Spodoptera litura*)細胞株建立之報導。由於各種細胞株均有其特性，譬如對病毒之感受性不同或可生產外源蛋白量之差異等(Davis et al., 1993; Carter et al., 1994)，因此新細胞株的建立，不論是基礎研究或應用價值，均甚為重要。

本文乃從本省產斜紋夜蛾，建立一個新細胞株。期望將來測試其對台灣斜紋夜蛾核多角體病毒(nuclear polyhedrosis virus, SiNPV)(Shih et al., 1995)之感受性，以祈建立SiNPV之體外培養系統，進而利用此體外培養系統從事SiNPV分子生物學研究，構築斜紋夜蛾桿狀病毒傳送載體，並利用此傳送載體轉殖含毒基因於SiNPV基因組內以建立重組斜紋夜蛾桿狀病毒(Shih, 1994)，使生物技術落實於害蟲防治上。本試驗建立之斜紋夜蛾細胞株，對將來本蟲核多角體病毒之體外培養系統或分子生物學之研究，均可奠定穩固基礎。

材料與方法

一、斜紋夜蛾之飼養

斜紋夜蛾蟲源採自台大農場芋頭葉片卵塊，在實驗室利用人工飼料累代飼養。為使斜紋夜蛾幼蟲不受病原菌感染，以口徑2.5cm，高10cm之滅菌玻璃試管作單隻飼養。幼蟲化蛹後以蛹體末端之性孔區別雌雄，將雌蛹挑出後放在無菌操作檯，以10% Chloride浸泡

10分鐘消毒，並以碘酒擦拭蛹體表面後，置於無菌操作檯風乾備用。

二、細胞培養液

利用TNM-FH昆蟲細胞培養液作為初代斜紋夜蛾細胞培養液。TNM-FH乃由Grace's medium(Gibco, 11300-027)依廠商說明書調配而成，並經0.2μ孔徑之無菌過濾膜過濾。為增進細胞生長及防止微生物污染，於培養液中添加10%之胎牛血清(fetal bovine serum, FBS; Gibco, 26140-079)及0.2%之penicillin, streptomycin(Gibco, 15070-014)及fungizon(Gibco, 15295-017)等。

三、斜紋夜蛾細胞初代培養之建立

斜紋夜蛾細胞之初代培養(primary culture)時，取上述風乾之斜紋夜蛾雌蟲蛹體，再以10% Chlorax清洗並浸泡後，用碘酒擦拭體表滅菌。為防止微生物污染，所有步驟均在無菌環境下操作。以眼科剪刀從蛹體腹部背面剪開固定於臘盤上，用鑷子將卵巢取出，避免碰觸消化道及其他組織。以生理食鹽水(PBS, Gibco, 70013-016)沖洗二次，除去多餘組織及脂肪體，再放入含1ml TNM-FH 培養液之四孔培養皿內，以解剖刀將組織塊切碎，使內含之細胞分散游離出來。將含有組織塊及游離細胞之四孔培養皿，置於28°C之恆溫細胞培養箱內，每天以倒立式顯微鏡觀察，記錄細胞生長情形。每隔一星期將舊培養液吸出一半並添加一半之新鮮培養液。

四、斜紋夜蛾細胞株繼代培養

斜紋夜蛾細胞株之繼代培養(subculture)乃取上述初代培養成功之細胞，待四孔培養皿上細胞長滿後，以吸管將附著於底部之細胞小心沖散懸浮後，吸出細胞液並移入25T細胞培養盒(tissue culture flask, Corning cat. 2100)內，靜置1小時，待細胞附著於新培養盒後，倒去舊培養液並加入新鮮TNM-FH 培養液5ml繼續培養，直至細胞長滿培養

盒底部形成單層化(monolayer)後，以橡皮刮起器(rubber policeman)將細胞刮下，並以1:10之分殖比率(split ratio)，進行繼代培養工作。

五、斜紋夜蛾細胞株生長曲線測定

細胞株生長曲線之測定，取已建立成功之斜紋夜蛾細胞株SL7A繼代培養60代以上者，進行生長速率測定。每培養盒內接種 5×10^5 個細胞，並添加5ml含10%胎牛血清之TNM-FH細胞培養液，於28°C之定溫細胞培養箱中培養。試驗前每一供試細胞均接種30個培養盒，每隔12小時各取出三個培養盒觀察細胞生長情形。觀察時以橡皮刮起器將細胞刮下，以血球計數板(hemocytometer)在倒立式顯微鏡下計數細胞數量。

六、細胞核型分析

取一盒25T細胞培養盒，內約含 1×10^6 個對數生長期(log phase)之細胞，以 $0.06\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度之Demecolcine(Sigma, D-6279)處理2小時。以1000xg離心10分鐘，去除上清液，再以5ml高張培養液(hypotonic medium; growth medium: water=1:2)懸浮沉澱之細胞，靜置10分鐘使細胞脹大。離心沉澱細胞，倒去上清液並加入四倍體積之固定液(methanol: glacial acetic acid=3:1)，靜置20分鐘固定細胞組織，離心沉澱並更換新鮮固定液，重複三次。取一片載玻片以冰冷之40%甲醇濕潤後，將上述已固定之細胞液滴在玻片上，使其自然散開。風乾後染色(3% Giemsa)3-5分鐘，以蓋玻片封膠保存，以顯微鏡觀察染色體形狀並計算數目。

七、同功異構酶分析

本項試驗供試細胞共有五種，其中一株為新建立之斜紋夜蛾細胞株SL7A，另外四種細胞株名稱及來源分述如下：秋行軍蟲(*Sphodoptera frugiperda*)細胞株SF21AE及SF9由台大動物所羅竹芳教授提供；透翅毒蛾(*Per-*

nia nuda)細胞株PN-HH及甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)細胞株SE-1為台大植病系王重雄教授贈予。

上述五種細胞株各取一盒25T對數生長期(log phase)之細胞，將細胞拍下，1000xg，離心10分鐘，去除細胞培養液。沉澱之細胞以 $200\mu\text{l}$ 之樣品緩衝液(0.5M Tris-HCl, pH6.8, 1% glycerol, 0.05% bromophenol blue)再懸浮，充份混合後移至1.5ml微量離心管，以冷熱破裂法(freeze and thaw, liquid nitrogen and 65°C water bath)反復三次，將細胞脹破釋出異構酶。以13,000xg，10分鐘，將細胞碎片沉澱，取上清液 $10\mu\text{l}$ 進行電泳。本試驗使用BioRad垂直電泳槽，內裝電泳緩衝液(25mM Tris, 200 mM glycine)300 ml，以10%不連續聚丙烯醯胺膠片(SDS discontinuous polyacrylamide gel)為分離膠片，7.5%為聚集膠片，電流20mA，電壓100 V，在4°C環境下進行電泳，直至追蹤染劑到達膠片底部時切斷電源，取出膠片進行染色。染色方法參照Tabachnick and Knu-dson(1980)方法進行，依異構酶種類不同，分為酯酶(esterase, EST)、蘋果酸去氫酶(malate dehydrogenase, MDH)及乳酸去氫酶(lactate dehydrogenase, LDH)等三種進行染色。

結 果

一、斜紋夜蛾細胞株之建立

斜紋夜蛾雌蟲蛹體取出之卵巢組織塊，經培養於四孔培養皿，在所做的1355個蛹體中，有14組試驗長出分生細胞，成功率約為1%。而14組初級培養之組織中，有5組細胞在未移入25T細胞培養盒前，受微生物污染而捨棄。剩下之細胞繼續生長，最後長滿四孔培養皿底部，經繼代培養於25T培養盒後，其

中有些相繼停止生長，最後有一株繼續生長並成功的培養100代以上。此細胞株定名為SL7A(圖一)。

斜紋夜蛾細胞株SL7A在培養初期，可見少數組織塊及游離細胞散佈於培養皿中，其後(約8—20天)在組織塊四周漸有細胞分生(圖一A)。初期分生出來之細胞呈變形蟲狀伸出細胞質絲，有些細胞固著於培養皿底部，有些飄浮於培養液上。最後細胞逐漸擴張，佈滿整個培養皿底部，此時細胞呈形態多樣化，有呈紡錘形、有呈圓形亦有呈不規則者(圖一B)。斜紋夜蛾初代培養成功之細胞，在繼代培養過程中，相繼有細胞陸續死亡，無法繼續培養。其中SL7A細胞經2—3個月繼代培養後，細胞生長速度變快，繼代培養時間縮短，而且細胞形狀大部份變成圓球形，此時以1:10比率作繼代培養時，約3天即可長滿培養盒底部(圖一C)。

二、斜紋夜蛾細胞株生長速率測定

斜紋夜蛾SL7A細胞株在28°C定溫箱培養時之生長情形如圖二所示。利用指數曲線迴歸(exponential regression)可求得細胞之指數生長曲線迴歸方程式為： $Y = e^{-0.6736 + 0.0323X}$ ； $r^2 = 0.98$ 。

根據Patterson(1979)方法計算細胞倍增時間為21.4小時。從細胞之生長曲線看，其生長模式符合單細胞生物之指數型生長曲線。當細胞數到達 20×10^6 個時，因培養盒底部已達飽合，因此細胞增長速率下降。

三、斜紋夜蛾細胞株核型分析

斜紋夜蛾SL7A細胞株之核型，利用高倍光學顯微鏡觀察，可知細胞之染色體形狀呈細小點狀(圖三A)，密佈於細胞核內。而在細胞族群中，檢視不同細胞之染色體數目，發現細胞間之染色體數目差異頗大，最大之細胞染色體數可達382個，最小者則僅有63個染色體，染色體數目平均為 215.5 ± 74.3 。就所

觀察細胞中之染色體數目分佈而言，呈現常態分佈現象(圖三B)。

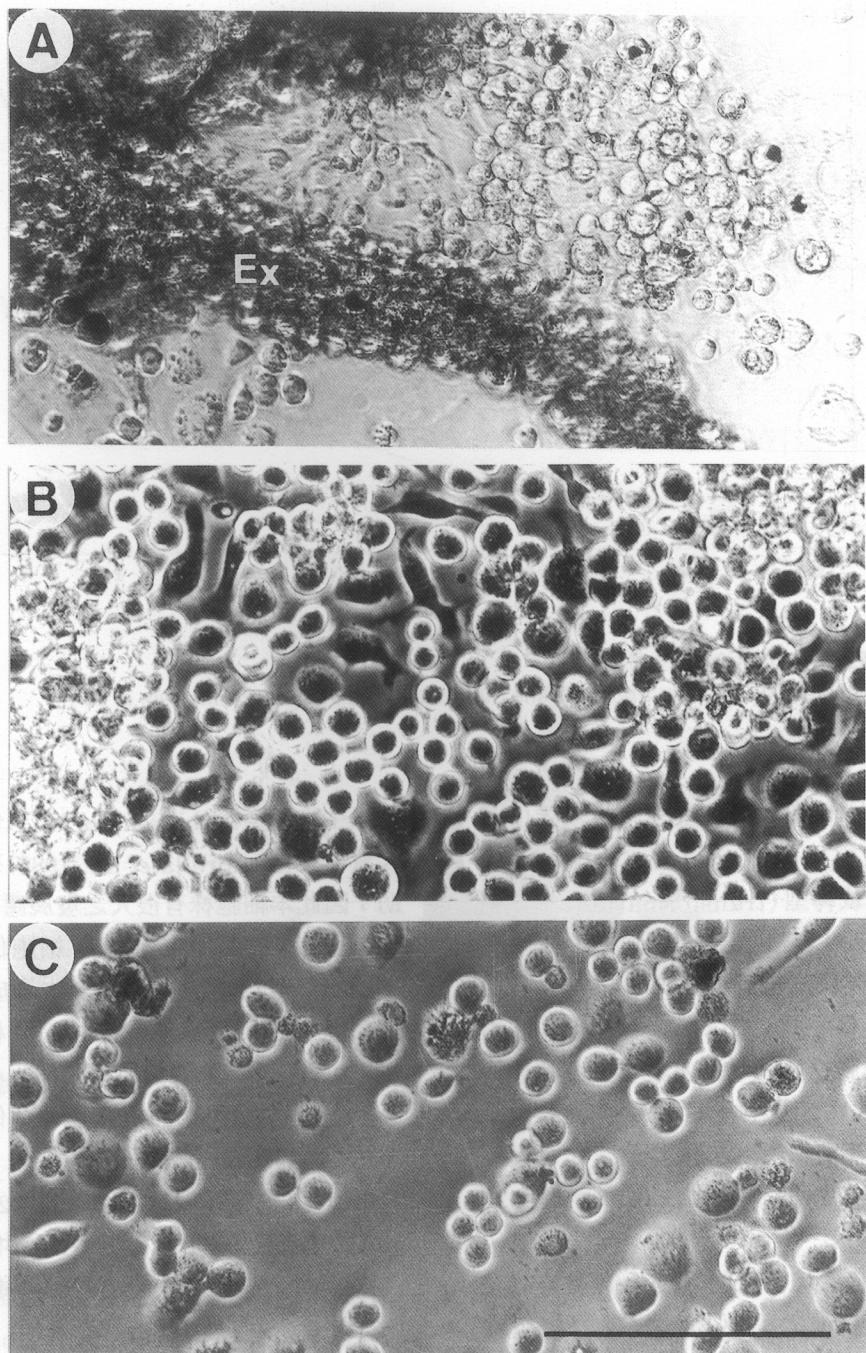
四、同功異構酶分析

斜紋夜蛾細胞株SL7A與其它鱗翅目昆蟲包括秋行軍蟲細胞株二株(SF21AE, SF9)、透翅毒蛾細胞株(PN-HH)及甜菜夜蛾細胞株(SE-1)等五種細胞株之同功異構分析酶，經蛋白質電泳結果，在膠片上均呈現顯著不同之泳動速率(圖四)。其中酯酶蛋白質片段分佈之差異性比較可知，五種供試細胞株間呈現多個基因座(loci)之不同。蘋果酸去氫酶及乳酸去氫酶之電泳圖譜又得類似結果。三種異構酶蛋白質電泳圖譜顯示，就供試之五種細胞株中，本試驗所測試的三種異構酶之電泳圖譜差異很大，顯示各細胞株之間呈現高的種特異性。

討 論

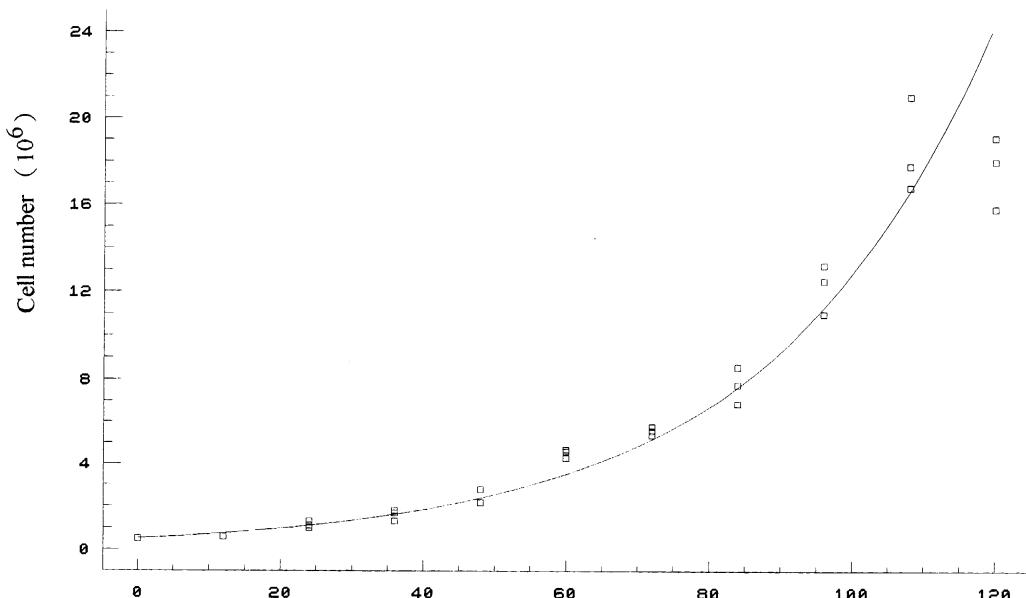
昆蟲細胞株之研究已有悠久歷史，由於各種細胞株均有其特性，譬如對病毒之感受性不同或可生產外源蛋白量之差異等(Davis et al., 1993)，因此新細胞株的建立，不論是在基礎研究或應用價值均甚為重要。本試驗建立之斜紋夜蛾細胞株，對將來本蟲核多角體病毒(SINPV)之體外培養(*in vitro*)或分子生物學研究，均甚為重要。

一般而言，細胞培養初期，各種形態之細胞均會出現，但經過數日後，大部份細胞相繼死亡，最後留存者大多為紡錘形(spinde)細胞或圓形之真皮細胞(epithelial cell)，這些細胞逐漸分生並佔滿整個培養盒底部，必需進行繼代培養，此時稱為初代培養。本試驗初期從斜紋夜蛾卵巢建立初代培養細胞，此時期細胞生長緩慢，約2—3週才能長滿整個培養皿底部，開始進行第一次繼代培養。



圖一 斜紋夜蛾細胞株SL7A培養過程

Fig. 1. Primary culture of tissues from *Spodoptera litura* and the subculture of the SL7A cell line. A. Cell migration from the explanted fragment of ovaries after 16 days incubation at 28°C. B. Confluent monolayer of cells formed in the primary culture of ovarian tissues. C. Subculture of the established cell line SL7A at a 1: 10 split ratio after more than 60 passages. Ex, explants. Scale, 400 μ m.



圖二 斜紋夜蛾細胞株SL7A培養之生長曲線圖

Fig. 2. Growth curve of *Spodoptera litura* cell line SL7A incubated in TNM-FH medium at 28°C.

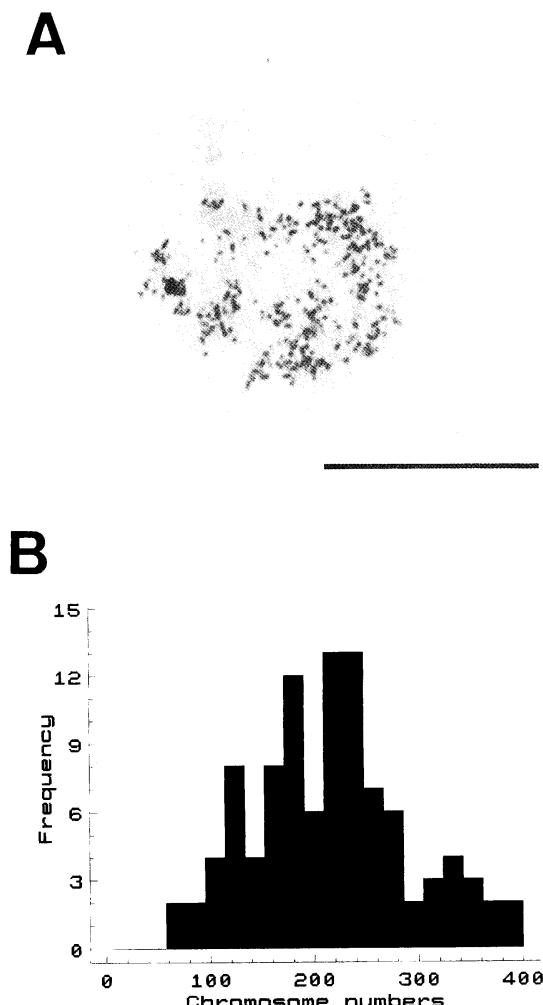
經過繼代培養後，有些細胞相繼死亡，而有些細胞經過選汰(selection)、突變(mutation)或轉型(transformation)等作用，漸漸適應人工培養液及培養盒之環境，最後生長速率較快之細胞取代原有細胞族群而形成細胞株(cell line)。就外部型態而言，SL7A細胞株為圓球型，此種外部型態與秋行軍蟲細胞株(SF21AE)比較，二者外型甚為相似。但就細胞附著於培養盒底部之程度而言，斜紋夜蛾細胞株比秋行軍蟲細胞株弱。

此種細胞對培養盒附著度低的現象，在繼代培養時有很大的便利，只要輕拍培養盒，即可將附著之細胞拍下分殖於新培養盒，對細胞之機械性傷害較小。此外在細胞大量培養時，此類附著性較小之細胞有助發展成懸浮式培養(suspension culture)，對日

後以生物反應器(bioreactor)方式作昆蟲細胞大量培養(Maiorella *et al.*, 1988)有很大的幫助，因此本細胞株有很大之發展應用價值。

昆蟲細胞大量培養時，細胞倍增時間短者細胞增長速率快，可減少生產成本提高應用價值。從秋行軍蟲建立之細胞株IPLB-21(SF21AE)，其細胞倍增時間為23小時，從甜菜夜蛾建立之UCR-SE-1細胞株則倍增時間高達56小時(Hink and Hall, 1989)。本研究建立之SL7A細胞株細胞倍增時間僅21小時，與其他昆蟲細胞株比較，具有細胞增長快速之優點，因此在細胞大量培養值得進一步開發研究。

昆蟲細胞株外型甚為相似，不同細胞株之間很難區別，必須依靠細胞株之特徵(characterization)作為判別依據，而其中細胞核型之分析即為其中重要特徵之一。昆蟲細胞



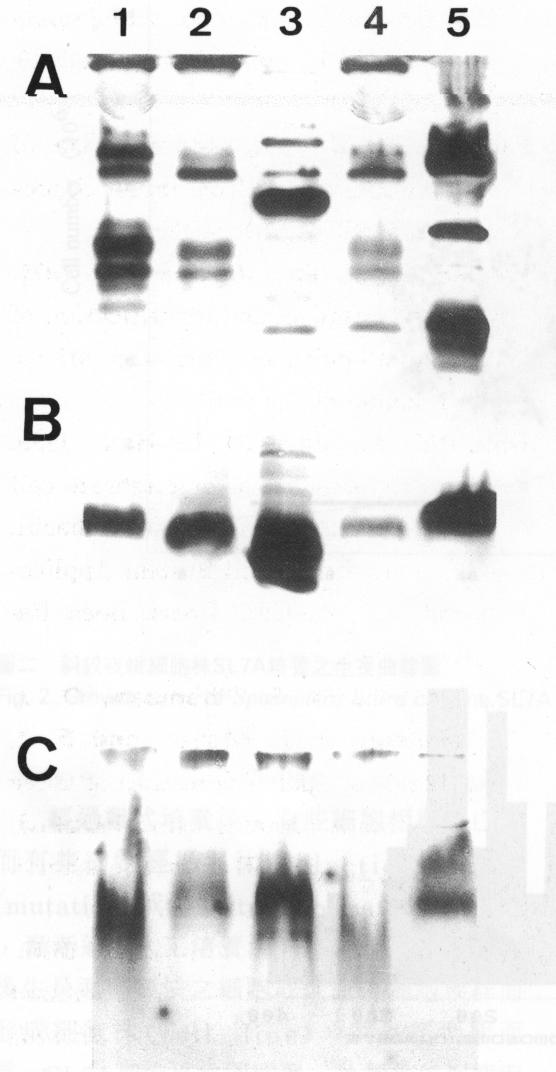
圖三 斜紋夜蛾細胞株之染色體及數量分佈

Fig. 3. Chromosomes from the metaphase of *Spodoptera litura* cell lines. A. Chromosomes. Scale, 5μm. B. Distribution of chromosome numbers.

染色體數目依其容易判別程度可分為三級 (Nichols *et al.*, 1971)，其中以雙翅目之染色體較大，數目較少($2n=6-8$)最容易判別，直翅目昆蟲次之(8-16n)，而鱗翅目昆蟲則最難區分(25 to $>256n$) (Ennis and Sohi, 1976) 可能是由於鱗翅目細胞株染色體數目太多所

致。

有關鱗翅目細胞株染色體之研究顯示，大部份均為多倍體(polyplloid)，而且染色體數目多且變異大。例如煙草夜蛾(*Heliothis virescens*)之細胞株染色體數量為30-180個之間(McIntosh *et al.*, 1981)；舞蛾(*Lyme-*



圖四 斜紋夜蛾與其它四種鱗翅目細胞株之同功異構酶比較

Fig. 4. Isozymes patterns of *Spodoptera litura* cell lines SL7A and four other lepidopteran cell lines. A. Esterase. B. Lactate dehydrogenase. C. Malate dehydrogenase. Lane 1, SF9. Lane 2, SF21AE. Lane 3, SE-1. Lane 4, SL7A. Lane 5, PNHH.

ntria dispar) 則為 55-143 之間，平均 89 個 (Lynn et al., 1988)，小菜蛾 (*Plutella*

xylostella) 亦在 20-180 間 (Lee and Hou, 1992)。本試驗所得斜紋夜蛾 SL7A 細胞株之染色體形狀及數目，是為典型之鱗翅目昆蟲細胞株染色體特性。

生物體中，催化同一化合物之酶，在電泳下具有多種不同之移動速率，這些酶稱之為異構酶 (isozyme)，其中有些種類之異構酶具有種之特異性 (species specific)，可用來鑑別生物之近緣種 (Markert and Moller, 1959)。Greene and Charney (1971) 最早利用此種異構酶之特性來鑑定細胞株之種類，其後更廣泛應用於無脊椎動物或昆蟲細胞株之特性及鑑定上 (Tabachnick and Knudson, 1980)。本試驗利用上述三種異構酶之電泳圖譜差異，可用來鑑定斜紋夜蛾細胞株，及與其他鱗翅目昆蟲細胞株之差異，本試驗研究結果證實，新建立之斜紋夜蛾細胞株 SL7A 與其他供試細胞株來源不同，有明顯之種的特異性。

利用桿狀病毒表現載體系統，將可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，生產多種含毒基因之重組病毒 (genetic engineering baculovirus)，可增強病毒的致病效果，縮短感染時間，應用於蟲害防治上具有很大發展潛力 (Tomalski and Miller, 1991; Hu et al., 1994)。目前已發展完備並經普遍採用者，有二種核多角體表現載體系統，分別是由 Smith et al. (1983) 及 Maeda et al. (1985) 所建立之苜宿夜蛾及家蠶 (*Bombyx mori*) 的核多角體表現載體系統。此二系統所用之病毒各有其專屬之寄主細胞 (SF21AE 及 BmN cell line)，由於病毒對寄主具有專一性，因此上述二種表現載體系統並不適用於重組本省害蟲斜紋夜蛾病毒之基因組。

為發展我國斜紋夜蛾重組病毒在蟲害防治之利用，首要之務即為建立本蟲病毒 S1NPV

之寄主細胞。本研究已成功自斜紋夜蛾卵巢建立細胞株，目前正進一步進行SL7A細胞株對斜紋夜蛾核多角體病毒感受性測定，期能建立本省斜紋夜蛾核多角體病毒體外培養技術，作為SINPV分子生物學研究基礎。

誌謝

本研究承台大植病系王重雄教授熱心指導，台大動物系羅竹芳教授支援耗材及儀器設備，中央研究院動物所王清澄教授介紹細胞核型分析技術，特此誌謝。

參考文獻

- Carter, J. B., C. Griffiths, and C. F. Edwards.** 1994. Establishment of a cell line from *Tipula paludosa* (Diptera, Tipulidae) hemocytes and replication of *T. paludosa* baculovirus *in vitro*. *J. Invertebr. Pathol.* 63: 119-122.
- Davis, T. R., T. J. Wickham, K. A. McKenna, R. R. Granados, M. L. Shuler, and H. A. Wood.** 1993. Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 29: 388-390.
- Ennis, T. J., and S. S. Sohi.** 1976. Chromosomal characterization of five lepidopteran cell lines of *Malacosoma disstria* (Lasiocampidae) and *Christoneura fumiferana* (Tortricidae). *Can. J. Genet. Cytol.* 18: 471-477.
- Gelernter, W. D., and B. A. Federici.** 1986. Continuous cell line from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) that supports replication of nuclear polyhedrosis viruses from *Spodoptera exigua* and *Autographa californica*. *J. Invertebr. Pathol.* 48: 199-202.
- Grace, T. D. C.** 1962. Establishment of four strains of cell from insect tissues grown *in vitro*. *Nature* 195: 788.
- Greene, A. E., and J. Charney.** 1971. Characterization and identification of insect cell cultures. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 55: 51-61.
- Hink, W. F., and R. L. Hall.** 1989. Recently established invertebrate cell lines. pp. 269-293 *in: J. Mitsuhashi, ed. Invertebrate Cell System Applications. vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida.*
- Hink, W. F., D. R. Thomsen, D. J. Davidson, A. L. Mayer, and F. J. Castellino.** 1991. Expression of three recombinant proteins using baculovirus vector in 23 cell lines. *Biotechnol. Prog.* 7: 9-14.
- Hu, Y. C., C. F. Lo, and C. J. Shih.** 1994. Construction of recombinant baculovirus containing the *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin gene. *Chinese J. Entomol.* 14: 445-461. (In Chinese)
- Knudson, D. L., T. Lescott, and T. W. Tinsley.** 1980. Establishment of a continuous cell line of *Spodoptera littoralis*. *In Vitro* 16: 369-370.
- Lee, S. H., and R. F. Hou.** 1992. Establishment of a cell line derived from embryos of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *J.*

- Invertebr. Pathol. 59: 174-177.
- Lynn, D.E., and H. Oberlander.** 1983. The establishment of cell lines from imaginal winginal wing disc of *Spodoptera frugiperda* and *Plodia interpunctella*. J. Insect Physiol. 29: 591-599.
- Lynn, D. E., E. M. Dougherty, J. T. McClintock, and M. Loeb.** 1988. Development of cell lines from various tissues of Lepidoptera. pp. 239-242. in: Y. Kuroda, E. Kurstak, and K. Maramorosch eds. Invertebrate Fish Tissue Culture. Springer-Verlag, New York.
- Maeda, S.** 1989. Expression of foreign genes in insects using baculovirus vector. Ann. Rev. Entomol. 34: 351-372.
- Maeda, S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, T. Saeki, Y. Sato, and M. Furusawa.** 1985. Production of human alfa-interferon in silkworm using a baculovirus vector. Nature 315: 592-594.
- Maiorella, B., I. D. Shauger, and D. Harano.** 1988. Large-scale insect cell culture for recombinant proteins production. Bio / Technology 6: 1406-1410.
- Markert, C. L. and F. Moller.** 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 45: 753-763.
- McIntosh, A. M., P. A. Andrews, and C. M. Ignoffo.** 1981. Establishment of two continuous cell lines of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera) In Vitro 17: 649-654.
- Nichols, W. W., C. Bradt, and W. Bowne.** 1971. Cytogenetic studies on cells in culture from the class insecta. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 55: 61-69.
- Patterson, M. K.** 1979. Measurement of growth and viability of cells in culture. pp. 450-466. In: W. B. Jakoby and I. H. Pastan, eds. Cell Culture. Academic Press Inc, San Diego.
- Shih, C. J.** 1994. Using transgenic microorganism to improve insecticidal effect. pp.5.1-5.36. in: G. C. Li, S. S. Kao, and W. C. Fei, eds. Proceeding of the Symposium on Research and Development of Biopesticides. Taiwan Agriculture Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Taiwan. (In Chinese)
- Shih, C. J., S. S. Farn, and C. H. Wang.** 1995. Characterizations of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus isolated from Taiwan. Plant. Prot. Bull. 37: 157-167. (In Chinese)
- Smith, G. E., M. D. Summers, and M. J. Fraser.** 1983. Production of human β -interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell Biol. 3: 2156-2165.
- Tabachnick, W. J., and D. L. Knudson.** 1980. Characterization of invertebrate cell lines II. Isozyme analysis employing starch gel electrophoresis. In

In Vitro 16: 392-398.

Tomalski, M. D., and L. K. Miller. 1991.

Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. *Nature* 352: 82-85.

Vaughn, J. L., R. H. Goodwin, G. J.

Tompkins, and P. McCawley. 1977.

The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro*

13: 213-217.

Wickham, T. J., T. Davis, and R. R.

Granados. 1992. Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus system. *Biotech. Prog.* 8: 391-396.

收件日期：1995年8月15日

接受日期：1995年11月24日

Establishment of a Cell Line from Pupal Ovaries of *Spodoptera litura* (Lepidoptera : Noctuidae)

Shih, Cheng-Jen* and Ren-Wei Lin. Department of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

A cell line was established from pupal ovaries of the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. This cell line, designated as SL7A, was grown in TNM-FH insect cell culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum. In primary cultures, small numbers of wandering connective-tissue-like cells appeared. After subculturing, cells generally became spherical rather than spindle shaped and adhered to the bottom of the culture plate, forming a monolayer of cells. The growth curve of the cells was $Y = e^{-0.6738 + 0.0323X}$, $r^2 = 0.98$. The population doubling time during logarithmic growth at 28 °C was 21.4 h. The saturated population of cells was approximately 2×10^7 cells in a 25-T flask, representing a 20-fold increase over the initial population in 4 days. Karyotype analysis revealed that the nucleus of SL7A cells contained numerous microchromosomes. The number of chromosomes appeared to follow a normal distribution in the range from 63 to 382 with a mean of 215.5 ± 74.3 . Isozyme analysis revealed that the SL7A cell line was characteristically different from 4 insect cell lines.

Key words: *Spodoptera litura*, cell line, growth curve, karyotype, isozyme.