



**The Insecticidal Activity of Genetically Engineered *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Containing the *Bacillus thuringiensis* Toxin Gene to SF9 Cell Line and *Spodoptera litura* Larvae  
[Research report]**

**基因重組苜蓿夜蛾核多角體病毒對秋行軍蟲細胞株及斜紋夜蛾幼蟲殺蟲效力【研究報告】**

Cheng-Jen Shih\* and Yao-Cygbg Hu  
石正人\*、胡耀中

\*通訊作者E-mail:

Received: Accepted: 1996/02/03 Available online: 1996/03/01

## Abstract

The production of *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxic protein in the genetically engineered *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus containing Bt  $\delta$ -endotoxin gene was detected by indirect immunofluorescence. The Bt toxic protein proved to be aggregated around the cell membrane, revealing that the toxin is a membrane binding protein. More toxic protein was expressed as post-infection time progressed. The infected cell lysed 72h after infection and toxic protein was released into the medium. The viability of infected cells was assayed using trypan blue and mitochondrial dehydrogenase; the results reveal that the infectivity of recombinant virus was higher than wild type in infected cells. The cloning of modified cry IC gene to AcNPV not only improves the toxicity of recombinant virus to cell but also reduce the time of infection leading to cell death. The recombinant and wild type viruses were injected into haemocoel of 4th instar larvae of *Spodoptera litura* to test the insecticidal activity, and results showed larval mortality increased with time after infection, but there was no significant difference in killing time between wild type and recombinant virus against *Spodoptera litura* larvae.

## 摘要

將蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*) $\delta$ --內毒素經修飾過之cryIC基因選殖至野生型苜蓿夜蛾核多角體病毒(*Autographa californica* NPV)基因組中，以間接免疫螢光法可測得毒素在被重組病毒感染的細胞之細胞膜上聚集，並可得知在不同感染後時間，毒素在細胞中之表現量亦有差異。以粒線體去氫酶測定細胞被病毒感染後細胞活性之變化，得知感染後48、72、及96小時，受重組病毒感染之細胞粒線體去氫酶活性均比野生型病毒感染者低，且有顯著性差異。利用trypan blue染色法，分別測定被野生型及重組病毒感染後不同時間，細胞存活比率之變化，結果就活細胞所佔比率而言，不論野生型或重組病毒感染，存活細胞比率均隨感染病毒後時間之增加而降低，但三株重組病毒感染組，其存活細胞率在感染後48小時降低至10%以下，而野生型病毒感染組則至感染後96小時，存活細胞比率仍佔70%左右。比較野生型病毒與重組病毒對四齡斜紋夜蛾幼蟲之毒性，結果供試之野生型及重組病毒對幼蟲之致病力並無顯著性差異。

**Key words:** Recombinant Baculovirus, *Bacillus thuringiensis*,  $\delta$ -endotoxin, Cytotoxicity, *Spodoptera litura*.

**關鍵詞:** 重組桿狀病毒、蘇力菌、 $\delta$ -內毒素基因、細胞毒性、斜紋夜蛾。

Full Text:  [PDF\(3.21 MB\)](#)

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

# 基因重組苜蓿夜蛾核多角體病毒對秋行軍蟲細胞株及斜紋夜蛾幼蟲殺蟲效力

石正人\* 胡耀中 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*)  $\delta$ -內毒素經修飾過之 *cryIC* 基因選殖至野生型苜蓿夜蛾核多角體病毒 (*Autographa californica* NPV) 基因組中，以間接免疫螢光法可測得毒素在被重組病毒感染的細胞之細胞膜上聚集，並可得知在不同感染後時間，毒素在細胞中之表現量亦有差異。以粒線體去氫酶測定細胞被病毒感染後細胞活性之變化，得知感染後 48、72、及 96 小時，受重組病毒感染之細胞粒線體去氫酶活性均比野生型病毒感染者低，且有顯著性差異。利用 *trypan blue* 染色法，分別測定被野生型及重組病毒感染後不同時間，細胞存活比率之變化，結果就活細胞所佔比率而言，不論野生型或重組病毒感染，存活細胞比率均隨感染病毒後時間之增加而降低，但三株重組病毒感染組，其存活細胞率在感染後 48 小時降低至 10% 以下，而野生型病毒感染組則至感染後 96 小時，存活細胞比率仍佔 70% 左右。比較野生型病毒與重組病毒對四齡斜紋夜蛾幼蟲之毒性，結果供試之野生型及重組病毒對幼蟲之致病力並無顯著性差異。

**關鍵詞：**重組桿狀病毒、蘇力菌、 $\delta$ -內毒素基因、細胞毒性、斜紋夜蛾。

## 前言

利用微生物防治害蟲，在害蟲防治體系中扮演的角色日趨重要，目前已有多種微生物殺蟲劑已商品化，並得到很好的防治效果。在昆蟲病原微生物中，主要以細菌及病毒之利用最為普遍。其中又以桿菌屬 (*Bacillus*) 中之蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*) 及桿狀病毒科 (*Baculoviridae*) 中的核多角體病毒 (*nuclear polyhedrosis virus*, NPV) 使用最多。我國相關利用昆蟲病毒防治

害蟲之研究亦有多篇報導 (Hou, 1991; Su, 1992; Tuan et al., 1995)。

桿狀病毒之致病機制主要為，含多角包體 (polyhedral inclusion body, PIB) 的病毒被昆蟲食入後，在蟲體內之中腸鹼性環境下溶解，釋出其內包含的病毒粒子 (polyhedral derived virus)，然後此病毒粒子外膜與中腸上皮細胞微絨毛 (microvillus) 融合，病毒的核鞘蛋白 (nucleocapsid) 進入細胞質，最後在經過去外膜 (uncoating) 後，病毒核酸被送至細胞核，進行核酸複製產生新的子代

病毒(Granados and Williams, 1986)。

受病毒感染之細胞，在感染後6小時即開始進行病毒DNA之複製，感染後12小時新的鞘蛋白(capsid protein)生成，包裹住新合成的病毒DNA形成新的病毒粒子。此病毒粒子以出芽的方式離開細胞，產生出芽病毒(budding virus)，再以胞飲作用(endocytosis)或融合(fusion)方式，再次感染鄰近細胞。在感染後18—24小時，病毒之核多角體蛋白開始合成。當多角體蛋白量增加後，可包圍住留在細胞核內的病毒粒子，如此形成包埋體病毒(occluded virus)，待細胞裂解(lysis)後釋放出蟲體外。此種包埋體病毒，可感染其他昆蟲，誘發昆蟲之流行病(Blissard and Rohrmann, 1990)。然而藉由此種致病機制產生的殺蟲效果甚為緩慢，一般約需10天才能殺死標的害蟲，而且昆蟲在罹病後，其食量反而增加，因此難為田間農民接受使用，此為病毒殺蟲劑未能廣泛運用的主要障礙之一。

由於現代病毒分子生物學及生物技術之進展，目前我們已能很容易地對某些微生物進行基因轉殖，以增強其殺蟲活性(Shih, 1994; Miller, 1995)，其中又以蘇力菌及桿狀病毒分子生物學之研究最為完備。本文乃利用前期已構築之含蘇力菌 $\delta$ —內毒素經修飾過之cryIC基因之重組病毒(Hu et al., 1994)，測試其對昆蟲細胞及斜紋夜蛾幼蟲之毒性，期能將現代生物技術之發展成果，落實於我國蟲害防治工作上。

## 材料與方法

### 一、供試細胞株及病毒來源

供試細胞株為秋行軍蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞株—SF21AE(台大動物系羅竹芳教授贈予)，培養於含有8%胎牛血清(fetal calf serum)、1.75 mg/ml Fungizone和50

IU / ml Penicillin及Streptomycin的TNM—FH培養液中，培養溫度為28°C，且每隔三天進行繼代培養一次。

苜蓿夜蛾核多角體病毒(*AcNPV*, E2 strain)(台大動物系羅竹芳教授贈予)及含蘇力菌 $\delta$ —內毒素經修飾過之cryIC基因之重組病毒，由Hu et al. (1994)構築，分別為Acendo-T7、Acendo-UW1及Acendo-1393。所有供試用病毒液包括重組病毒及野生型病毒之效價(titer)，均利用病毒斑檢測法(plaque forming unit, PFU)訂定之，並將病毒效價統一稀釋為 $10^7$  PFU / ml，作為細胞毒性分析及對斜紋夜蛾幼蟲生物檢定之用。使用方法參照O'Reilly et al. (1992)步驟進行。

### 二、重組病毒表現蘇力菌毒素蛋白之檢定

利用間接免疫螢光法(indirect immunofluorescence technique)(Coligan et al., 1994)，檢定含蘇力菌 $\delta$ —內毒素經修飾過之cryIC基因之重組病毒，感染細胞後表現之毒素蛋白。使用方法簡述如下：將滅菌過的蓋玻片放入4孔板中，以 $3 \times 10^5$  cell / well的密度將細胞接入孔板中，並以MOI(multiple of infection)=10之病毒劑量感染細胞。感染病毒後在各個特定時間中，將培養液抽乾後，以 $1 \times$  PBS沖洗三次，輕微搖晃每次10分鐘，再以固定液(methanol: acetone=1: 1)於室溫下固定30分鐘，以 $1 \times$  PBS再洗三次，每次10分鐘，然後用1%小牛血清(bovine serum albumin, BSA)於37°C下進行blocking 1小時。將1級抗體溶於3% BSA(1: 200)中，於37°C下作用1小時。接著用 $1 \times$  PBS洗三次，每次10分鐘，再用2級抗體(FITC anti-rabbit IgG)以1: 100比例溶於3% BSA中，作用37°C，1小時後，同樣以 $1 \times$  PBS洗三次，每次10分鐘。最後以Evan's blue染色10秒，水洗10秒後以PBS: glycerol=1: 1之封片液封

片，並以透明指甲油劃過蓋玻片周圍，待風乾後，避光保存於4°C中，以螢光顯微鏡觀察並照相。

### 三、重組病毒對細胞毒性檢定

#### 1.Trypan blue染色法檢定細胞存活率：

以 $3 \times 10^6$  cell / well的密度接種細胞於25 T的細胞培養盒中，以MOI=10濃度的病毒劑量感染細胞，在感染後特定時間內將細胞輕輕拍下，倒入15ml離心管，離心2500 rpm, 10分鐘。用0.4% trypan blue : 1×PBS=1: 1染色3分鐘，再以2500 rpm, 10分鐘將細胞離心下來。最後將細胞沈澱物小心地溶在5ml的1×PBS中，並放入血球計數器上計算細胞被trypan blue染色的比例(Wilson, 1986)。

#### 2.粒線體去氫酶活性檢定：

根據Chow and Gill (1989)的方法進行細胞內粒線體去氫酶活性檢定，利用粒線體去氫酶活性之改變來顯現細胞活性之變化。其方法簡述如下：以 $1 \times 10^5$  cell / well的密度接種細胞於4孔板中，以MOI=10的病毒濃度感染細胞，在感染後各種特定時間內，將培養液抽乾，並加入0.5ml MTT(3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]2, 5-diphenyltetrazolium bromide)試液(1mg / ml)，避光作用30分鐘。然後抽乾MTT試液，再加入0.5ml DMSO (Dimethyl sulfoxide)，溶解紫色結晶物，並於光譜儀中測定570nm波長下之吸光值。粒線體去氫酶之相對活性經ANOVA及DMRT分析以判定各處理間之差異性。

### 四、重組病毒對斜紋夜蛾幼蟲之生物檢定

試驗所用斜紋夜蛾(*Spodoptera litura*)採自台大農場芋頭葉片，在實驗室以人工飼料累代飼養。飼料配方、飼養方法及幼蟲齡期之判別等參照Shih(1995)報告進行。生物檢定時選取四齡幼蟲，作為供試材料，每隻幼蟲利用微量注射器打入 $10\mu\text{l}$ 病毒液(供試各種病毒液均經病毒效價測定，並將病毒效價

統一稀釋為約 $10^7\text{PFU / ml}$ )，隨後單隻置於直徑3.5公分之圓孔容器內，避免幼蟲自相殘殺，並放入28°C生長箱中，每天紀錄幼蟲死亡率。本試驗共分成對照組(只注射細胞培養液)、野生型病毒組(注射AcNPV)及重組病毒組(注射Acendo-1393、Acendo-UW1或Acendo-T7)等五種處理，每種處理共用30隻幼蟲，每處理共3重複。

## 結 果

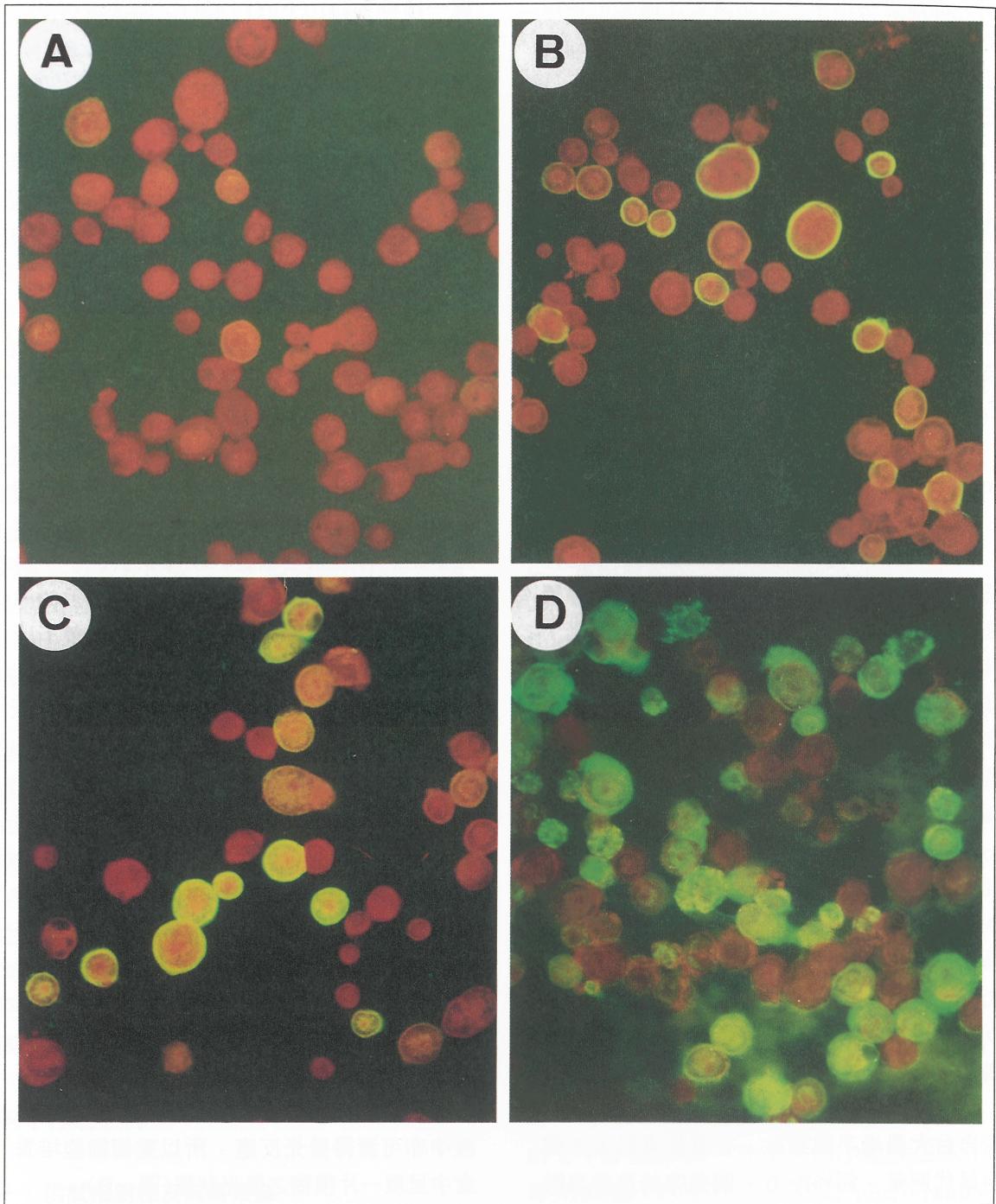
### 一、重組病毒表現蘇力菌毒素蛋白之檢定

將含蘇力菌 $\delta$ -內毒素經修飾過之cryIC基因之重組病毒感染細胞後，各不同感染病毒後之時期，利用間接螢光免疫吸附法，測定重組病毒感染之細胞表現毒素蛋白，所得結果如圖一所示。感染病毒後不同時間數的細胞經過螢光抗體標定後，在螢光顯微鏡下所呈現之螢光量有顯著不同。在感染後18小時(圖一A)，大部分的細胞由於 $\delta$ -內毒素蛋白尚未產生，在螢光顯微鏡下細胞呈現紅色(負反應)。當感染重組病毒後36小時(圖一B)，已有部份毒素蛋白產生，此時利用螢光抗體可檢測到部份細胞周圍呈現螢光反應，而且毒素聚集並附著於細胞周圍。細胞感染重組病毒後48小時，毒素的表現量愈來愈多，幾乎整個細胞均有螢光抗體之反應呈現(圖一C)。最後在感染病毒後72小時，由於有些被重組病毒感染之細胞開始裂解，使得部份內毒素蛋白釋放出來，因此這一時期不但細胞可偵測到螢光抗體反應，連細胞培養液中亦可測得螢光反應，所以整個細胞培養盒中呈現一片模糊之螢光狀態(圖一D)。

### 二、重組病毒對細胞毒性檢定

#### 1. Trypan blue染色法

Trypan blue染色的原理是由於染劑可經由受傷的細胞膜或死的細胞膜穿入細胞中，



圖一 感染含蘇力菌毒素重組病毒之SF21AE細胞在不同感染時間後利用間接免疫螢光法偵測內毒素之表現量及分佈情形。A. 感染後18小時；B. 感染後36小時；C. 感染後48小時；D. 感染後72小時。

Fig. 1. Micrographs of SF21AE cells infected with recombinant virus containing *Bt* toxin gene. Each photograph represents the distribution and relative amount of expressed *Bt* toxic protein. A. 18-h post-infection; B. 36-h post-infection; C. 48-h. post-infection; D. 72-h. post-infection.

而使細胞被trypan blue染色。但對於健康細胞而言，由於其細胞膜完整，因此可以排除染劑進入細胞內，是故完整之活細胞不會被trypan blue染色(Wilson, 1986)。

本試驗將細胞分別經野生型及重組病毒感染後，在不同時間收集被感染的細胞，利用trypan blue染色細胞，並從細胞被染色之比率，推算該處理中之細胞存活率。細胞存活率是以血球計數板中未被trypan blue染色之細胞佔總觀測細胞數之百分率表示，所得的結果如圖二所示。從圖二可知，在感染後48小時，以重組病毒所感染的細胞，其細胞存活率均降至10%以下；然而以野生型病毒感染者(對照者)，其細胞存活率均高過70%。此種細胞存活率的不同，在受病毒感染後第二天即有明顯的差異。比較三株重組病毒對細胞存活率之影響程度，發現三者間並無顯著性差異。從此項試驗得知，轉殖 $\delta$ -內毒素經修飾過之cryIC基因之重組病毒，其對細胞的毒性比野生型病毒強，亦即重組病毒感染細胞後，細胞活性之降低比野生型病毒快。

## 2. 粒線體去氫酶活性之測定

當細胞感染蘇力菌毒素後，細胞中粒線體會發生脹大，而粒線體去氫酶活性會因而降低，因此對細胞活性之測定除利用trypan blue染色法外，亦可用粒線體去氫酶活性作為細胞活性的指標(Johnson, 1987)。細胞活性之計算乃將野生型病毒與三株重組病毒感染細胞後，所測得的細胞溶液吸光值除以對照組(健康的未感染病毒細胞)所測得的吸光值。

野生型病毒及三株重組病毒感染細胞後，利用上述方法測定細胞內粒線體去氫酶之活性，用以檢測病毒對細胞活性之影響，從而判別病毒對細胞之毒性。當細胞感染病毒後不同時間，測定細胞內粒線體去氫酶之活性，所得結果如表一所示。就供試之四種

病毒而言，其粒線體去氫酶之活性均隨病毒感染後時間之增加而降低。在感染後48、72及96小時，野生型病毒處理組之粒線體去氫酶之活性均比重組病毒處理組高，且具有顯著性差異。就感染後不同時間而言，隨著感染後時間之增加二者之差異隨之拉大。例如重組病毒Acendo-T7與野生型病毒比較，在感染後48小時其粒線體去氫酶之活性分別為50%與66%，二者相差1.32倍；但在感染後96小時，二者分別為21%與45%，相差達2.14倍。從此顯示三株重組病毒對細胞毒性確實比野生型病毒強，可提早對細胞產生毒害作用，降低細胞活性。

## 三、重組病毒對斜紋夜蛾幼蟲之生物檢定

從細胞毒性試驗證實，經過剪接蘇力菌 $\delta$ -內毒素經修飾過之cryIC基因之重組桿狀病毒，確實比野生型病毒具有較高毒性。為測試其運用到田間防治我國蔬菜及雜糧重要害蟲斜紋夜蛾，因此乃進行斜紋夜蛾幼蟲活體試驗，所得結果如圖三。

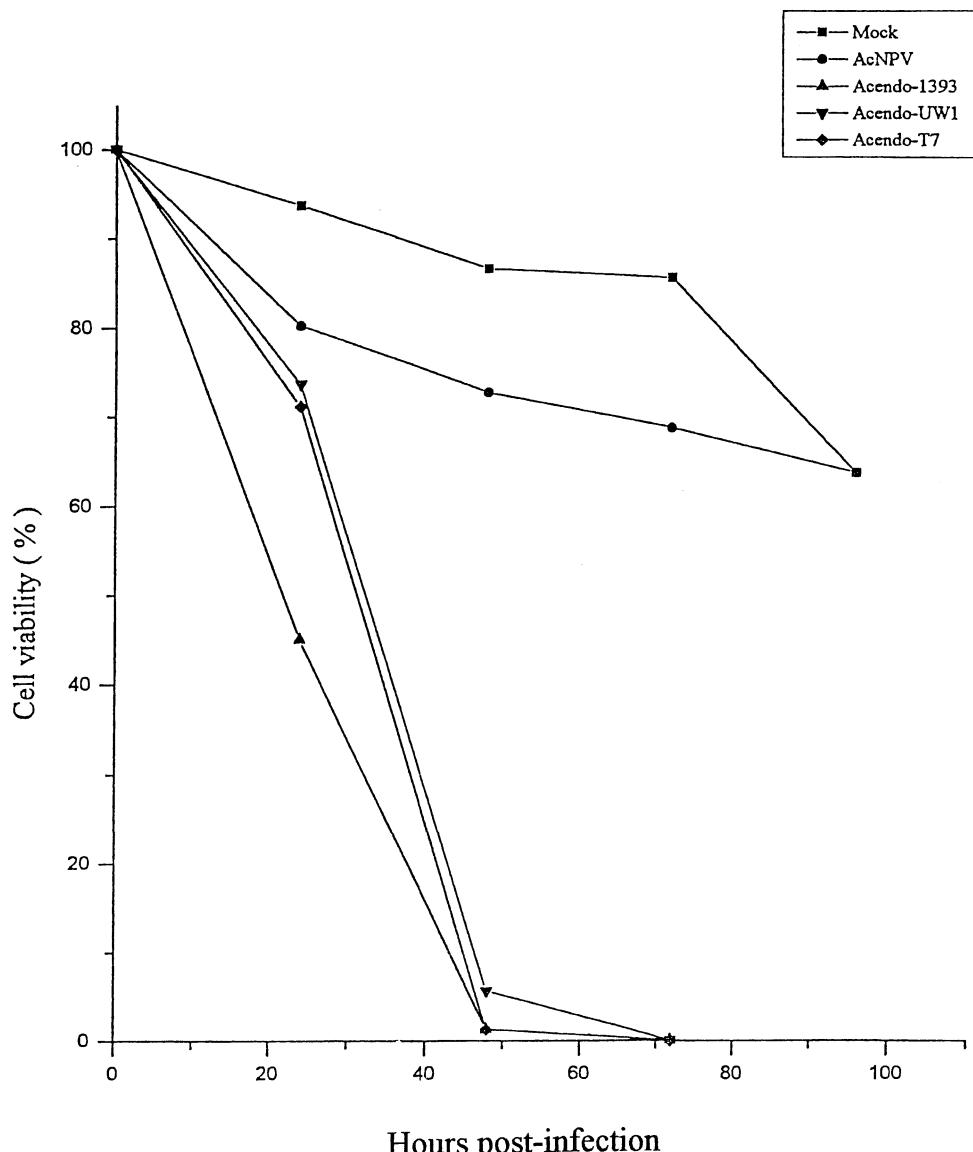
從圖三可知野生型與三株重組病毒，對斜紋夜蛾幼蟲之致病力並無顯著性差異。在感染病毒第4天起才開始有幼蟲死亡出現，此後隨感染病毒時間增加，幼蟲死亡率隨之提高；至感染後第10天，供試幼蟲累積死亡率均可高達80%以上。此顯示含 $\delta$ -內毒素基因之重組病毒，對斜紋夜蛾之致病效果並不比野生型病毒強。本試驗對照組只注射細胞培養液，但由於機械性之傷害使幼蟲死亡率較日常飼養時為高。對照組在處理後第三天即有幼蟲死亡，但至第五天後不再有幼蟲死亡，試驗期間斜紋夜蛾幼蟲平均死亡率為9.6%。

## 討 論

桿狀病毒是最早成為微生物殺蟲劑的品

蟲病源性病毒，到目前為止，被發現的桿狀病毒已超過600餘種，其寄主範圍包括鱗翅目、膜翅目、雙翅目、鞘翅目和毛翅目等多種昆蟲(Wood and Granados, 1991)。自從

Smith *et al.* (1983)成功建立桿狀病毒表現載體系統後，提供基因重組桿狀病毒一條坦蕩大道，此後利用該載體系統，可輕易地將各種基因，重組入桿狀病毒基因組內。特別是



圖二 感染野生型病毒或含蘇力菌毒素重組病毒之SF21AE細胞在不同感染時間後利用trypan blue染色法測定之細胞存活率

Fig. 2. The cell viability of SF21AE cell infected with wild type and recombinant virus containing *Bt* toxin gene at different times post-infection. Cell viability was examined by the trypan blue staining method.

表一 感染野生型或含蘇力菌素重組病毒之SF21AE

細胞在不同感染時間後之粒線體去氫酶活性測定

Table 1. The relative mitochondrial dehydrogenase activity of SF21AE cells infected by wild type recombinant virus containing  $\delta$ -endotoxin at different time of post-infection.

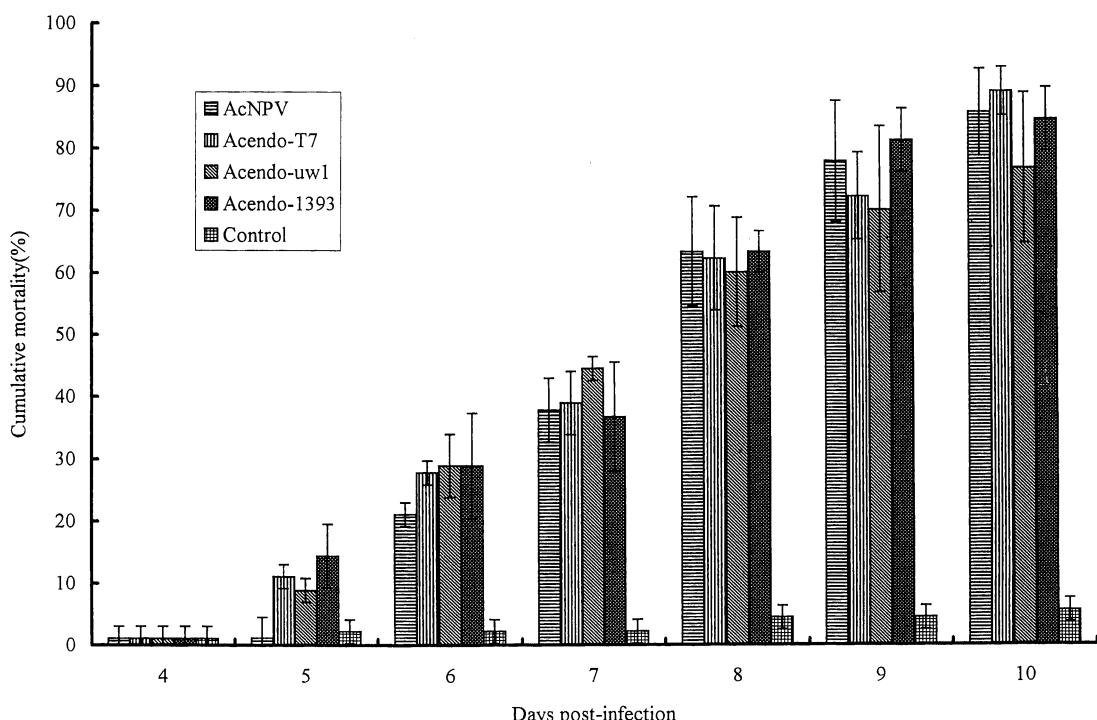
Virus	Related enzyme activity (%) <sup>1)</sup>		
	48 PI	72 PI	96 PI <sup>2)</sup>
AcNPV(wild type)	66 <sup>a</sup>	55 <sup>a</sup>	45 <sup>a</sup>
Acendo-1393	46 <sup>b</sup>	28 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>
Acendo-UW1	51 <sup>b</sup>	36 <sup>c</sup>	23 <sup>c</sup>
Acendo-T7	50 <sup>b</sup>	35 <sup>c</sup>	21 <sup>c</sup>

1). Data were transformed to  $\sin^{-1}$  prior to statistical analysis, and values in a given column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

2). PI: Post-infection (h).

一些對昆蟲有毒之基因，可縮短病毒致病時間，使害蟲提早停止取食(Hawtin *et al.*, 1992)。

重組病毒在蟲害防治之應用，至目前為止已有田間實際運用成功之例子(Cory *et al.*, 1994)。就改變病毒致病效力而言，可剪接的基因包括：對昆蟲具專一性之有毒基因、昆蟲激素基因、代謝酵素基因與生長調節基因等。例如Tomalski and Miller (1991)接入捕植蠅毒基因(*Pyemotes tritici* toxin-I; ToxP-I)。Stewart *et al.* (1991)將北非蠍(*Androctonus australis*)神經毒蛋白基因接入AcNPV中。Merryweather *et al.* (1990)及Martens *et al.* (1990)將蘇力菌



圖三 斜紋夜蛾四齡幼蟲注射感染野生型病毒或含蘇力菌素重組病毒後不同天數之死亡率

Fig. 3. The mortality of 4th instar larvae of *Spodoptera litura* after different days of post-infection by injection with wild type recombinant viruses containing *Bt* toxin gene into haemocoel.

$\delta$ -內毒素基因，接入AcNPV中。Maeda (1989) 將菸草天蛾(*Manduca sexta*)的利尿激素基因(diuretic hormone gene)接到家蠶核多角體病毒(*BmNPV*)上。

本試驗選取的蘇力菌 $\delta$ -內毒素基因 $cryIC$ 是屬於*Bt. aizawai* 7.29品系。本段基因最早由Kalfon and Barjac (1985) 選殖成功。Sanchis *et al.* (1988) 利用不同限制酶切割，將一些和毒性無關之片段去除而得數種質體DNA，其中經由*PstI*及*HindIII*限制酶切割而得之含2.7kb片段，對*Spodoptera*屬的昆蟲具專一性致毒的效果，定名為pHT71 (Sanchis *et al.*, 1989)。此段基因的DNA序列已定出，且基本生物學研究資料完備，故選用此段基因用於構築AcNPV重組病毒，期望對寄主細胞秋行軍蟲(*Spodoptera frugiperda*)，及標的害蟲斜紋夜蛾(*S. litura*)具有較佳之毒性，因其等均為同一屬 (*Spodoptera*)。

經由螢光抗體標定測試後，可知本試驗所接入的毒素基因確實會作用於細胞膜上，此與Martens *et al.* (1990) 和Merryweather *et al.* (1990)，所得結果有所差異。由於他們接入的是整段的 $\delta$ -內毒素基因，所以當重組病毒產生 $\delta$ -內毒素時，會形成結晶體毒蛋白，不會直接對細胞產生毒性，必須將這些受感染的細胞拿來餵食昆蟲，才能達到致病效果。本試驗選殖的pHT71上的 $\delta$ -內毒素基因乃經過修剪(truncated)，因此不論在毒素表現量或致毒作用上均與整段原始 $\delta$ -內毒素基因不同。

許多報告中曾提到，毒素結晶體蛋白在中腸溶解成原毒素，再變為毒素後和細胞膜外的接受器(receptor)結合後才會插入細胞膜 (Hofte and Whiteley, 1989; Gill *et al.*, 1992)。但Slatin *et al.* (1990) 發現Cry IA和Cry IIIA的毒素蛋白能直接插入細胞膜的脂質

雙層(lipid bilayer)結構中，不須與細胞膜上的接受器結合。Schwartz *et al.* (1991) 也發現CryIC毒素可由細胞質那一面插入細胞膜中，無須經過接受器的結合即可產生毒性。本試驗的毒素是在重組病毒感染細胞後始表現，因此毒素蛋白是在細胞內產生，故應不會與細胞膜上接受器結合，所以推測毒素之作用部位乃在細胞膜內側；或者可能在細胞膜上可與毒素結合之接受器，在細胞膜內面亦具有相當數量，因此在細胞內表現之毒素蛋白仍能引起細胞膜產生孔洞，最後使細胞死亡。

綜合trypan blue及粒線體去氫酶活性試驗，二者對細胞之活性分析均有相同結果。此顯示本試驗所採用的二種方法，均可用於偵測細胞受病毒感染後活性降低之程度，並可從而利用此活性之降低比例，用來判定病毒對細胞之毒性效果。根據細胞活性分析，本試驗所構築之重組病毒對細胞之毒性確比野生型病毒較早發揮致毒效果，顯示 $\delta$ -內毒素經修飾過之 $cryIC$ 基因在細胞層次之試驗效果較野生型病毒佳。

雖然本試驗所構築之重組病毒在細胞活性分析上，其對細胞之致毒時間上比野生型病毒較早，但在以斜紋夜蛾幼蟲為寄主之活體試驗，卻未能得到滿意之效果，推測其原因可能為蘇力菌 $\delta$ -內毒素對細胞之毒性傷害，不會因毒素表現量的不同而有所差異，亦即它只須要少量就足夠造成細胞毒性效果的增加。此外亦可能與所剪接之 $cryIC$ 基因寄主專一性有關。就 $\delta$ -內毒素之分子結構而言，其約可分為三個部分，即N端區，約為1~279個氨基酸；C端區，約461~695個氨基酸及可變區，位於N端和C端中間的區域。N端區是毒性作用區(toxin domain)，擁有多疏水性(hydrophobic)的氨基酸，而且氨基酸之間的交互作用，產生許多 $\alpha$ -螺旋( $\alpha$ -

helix)，可讓毒蛋白插入細胞膜形成孔洞(pore)。而可變區與C端氨基酸形成初級的 $\beta$ -褶板( $\beta$ -sheet)結構，此與毒蛋白和標的細胞接受器結合有關(Choma and Kaplan, 1990)，足見 $\delta$ -內毒素之寄主專一性非常高。本試驗所選殖之基因雖對*Spodoptera*屬昆蟲具有專一性，但斜紋夜蛾顯然對本試驗所用之基因感受性低，因此使重組病毒之活體試驗未能達理想目標。有鑑於此，今後當致力選殖一些對本土性害蟲專一性強之基因，方能提高運用價值。

除選殖之 $\delta$ -內毒素經修飾過之*cryIC*基因未能對斜紋夜蛾具有專一性外，另一影響重組病毒活體試驗結果之因子，可能為本試驗所用之病毒為*AcNPV*，而此病毒雖然寄主專一性較廣，但其主要寄主為苜蓿夜蛾(*A. californica*)及擬尺蠖(*Trichoplusia ni*)等昆蟲。根據先前病毒致病性試驗結果知，*AcNPV*對斜紋夜蛾幼蟲之致病率較低(段淑人，私人通訊；石正人，未發表資料)，故在此先天不良條件下，雖然重組後之病毒毒性增加，但對斜紋夜蛾幼蟲而言，對*AcNPV*病毒感受性本來就低，因此使試驗結果不如預期理想。

從本試驗可知，利用國外已建立之*AcNPV*模式，所構築之重組病毒，對我國本地害蟲斜紋夜蛾致病力之改進效果顯然不如理想。在重組桿狀病毒研究中，另一由日本人所建立之*BmNPV*系統，由於其寄主範圍更窄，因此要利用來做蟲害防治可能性甚低。為使生物技術落實於我國之蟲害防治工作，應著重作為以本國害蟲為中心之基礎研究。例如本試驗對象害蟲斜紋夜蛾之主要病毒為斜紋夜蛾核多角體病毒(*SINPV*)(Shih et al., 1995)，因此今後若要推廣重組病毒在斜紋夜蛾害蟲防治之利用，首要之務當為建立*SINPV*傳送載體，以之構築斜紋夜蛾重組病毒，方能解決我們國家自己所發生的蟲害問題。

## 誌謝

本試驗承蒙農委會計畫經費補助(八四科技-1.1-糧-62-5-1-2)得以完成，謹此誌謝，植保科科長陳秋男博士及技正葉瑩博士等在實驗室草創之時，不計成敗鼎力相助，銘感於心，特誌謝忱。

## 參考文獻

- Blissard, G. W., and G. F. Rohrmann.** 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. Annu. Rev. Entomol. 35: 127-155.
- Chow, E., and S. S. Gill.** 1989. A rapid colorimetric assay to evaluate the effects of *Bacillus thuringiensis* toxin on cultured insect cell. J. Tissue Culture Method 12: 39-42.
- Choma, C. T., and H. Kaplan.** 1990. Folding and unfolding of the protoxin from *Bacillus thuringiensis*: evidence that the toxin moiety is present in an active conformation. Biochemistry 29: 10971-10977.
- Coligan, J. E., A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober.** 1994. Current Protocols in Immunology. pp. 12.5.5-12.5.7. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Cory, J. S., M. L. Hirst, T. Williams, R. S. Halls, D. Goulson, B. N. M. Green, T. M. Cart, R. D. Possee, P. J. Cayley, and D. H. L. Bishop.** 1994. Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. Nature 370: 138-140.
- 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.
- 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.
- Hou, R. F.** 1991. Recent status of insect pathology in Taiwan. pp.87-97. in: J. T. Chao ed. Chinese J. Entomol. Special Publication No. 7. (in Chinese)
- Hu, Y. C., C. F. Lo, and C. J. Shih.** 1994. Construction of recombinant baculovirus containing the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin gene. Chinese J. Entomol. 14: 445-461. (in Chinese)
- Johnson, D. E.** 1987. Entomocidal activity of crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* toward cultured insect cells. pp. 45-61. in: K. Maramorosch, ed. Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture. Academic Press, New York.
- Kalfon, 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.
- Maeda, S.** 1989. Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1177-1183.
- Martens, J. W. M., G. Honee, D. Zuidema, J. W. M. van Lent, B. Visser, and J. M. Vlak.** 1990. Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2764-2770.
- Merryweather, A. T., U. Weyer, M. P. G. Harris, M. Hirst, T. Booth, and R. D. Possee.** 1990. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 delta endotoxin. J. Gen. Virol. 71: 1535-1544.
- Miller, L. K.** 1995. Genetically engineered insect virus pesticides: present and future. J. Invertebr. Pathol. 65: 211-216.
- O'Reilly, D. R., L. K. Miller, and V. A. Luckow.** 1992. Baculovirus Expression Vector. W. H. Freeman, New York, 347 pp.
- Sanchis, V., D. Lereclus, G. Menou, J. Chaufaux, and M. M. Lecadet.** 1988. Multiplicity of  $\delta$ -endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* 7.29. Mol. Microbiol. 2: 393-404.
- Sanchis, V., D. Lereclus, G. M. Menou, J. Chaufaux, S. Guo, and M. M. Lecadet.** 1989. Nucleotide sequence

- nce and analysis of N-terminal coding region of *Spodoptera*-active  $\delta$ -endotoxin gene *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* 7.29. Mol. Microbiol. 3: 229-238.
- Schwartz, J. L., L. Garneau, L. Masson, and R. Brousseau.** 1991. Early response of cultured lepidopteran cell to exposure to  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: involvement of calcium and anion channels. Biochem. Biophys. Acta. 1065: 250-260.
- Slatin, S. L., C. K. Abrams, and L. English.** 1990. Delta-endotoxins from cation-selective channels in planar lipid bilayer. Biochem. Biophys. Res. Commun. 169: 765-772.
- 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.** 1995. Determination of larval stadium and effect of temperature on the development of *Spodoptera litura*. Mem. Coll. Agr., NTU 35: 393-400. (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. 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 insect-specific toxin gene. Nature 352: 85-88.
- Su, C. Y.** 1992. Use of nuclear polyhedrosis virus for control of *Spodoptera litura*. Plant Prot. Bull. 34: 227-234. (in Chinese)
- Tomalski, M. D., and L. K. Miller.** 1991. Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. Nature 352: 82-85.
- Tuan, S. J., S. S. Kao, and U. L. Leu.** 1995. Factors affecting pathogenicity and stability of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus isolated in Taiwan. Chinese J. Entomol. 15: 47-58. (in Chinese)
- Wilson, A. P.** 1986. Cytotoxicity and viability assay. pp. 183-226. in: R. I. Freshney ed. Animal Cell Culture a Practical Approach. IRL Press. Washington DC.
- 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：1995年11月1日

接受日期：1996年2月3日

# The Insecticidal Activity of Genetically Engineered *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Containing the *Bacillus thuringiensis* Toxin Gene to SF9 Cell Line and *Spodoptera litura* Larvae

Cheng-Jen Shih\* and Yao-Chung Hu Department of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan University, No.1 Roosevelt Road, Sec. IV, Taipei, Taiwan, R.O.C.

## ABSTRACT

The production of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxic protein in the genetically engineered *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus containing *Bt*  $\delta$ -endotoxin gene was detected by indirect immunofluorescence. The *Bt* toxic protein proved to be aggregated around the cell membrane, revealing that the toxin is a membrane binding protein. More toxic protein was expressed as post-infection time progressed. The infected cell lysed 72h after infection and toxic protein was released into the medium. The viability of infected cells was assayed using trypan blue and mitochondrial dehydrogenase; the results reveal that the infectivity of recombinant virus was higher than wild type in infected cells. The cloning of modified *cry* IC gene to *AcNPV* not only improves the toxicity of recombinant virus to cell but also reduce the time of infection leading to cell death. The recombinant and wild type viruses were injected into haemocoel of 4th instar larvae of *Spodoptera litura* to test the insecticidal activity, and results showed larval mortality increased with time after infection, but there was no significant difference in killing time between wild type and recombinant virus against *Spodoptera litura* larvae.

**Key words:** Recombinant Baculovirus, *Bacillus thuringiensis*,  $\delta$ -endotoxin, Cytotoxicity, *Spodoptera litura*.