



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Factors Influencing the Production of Baculovirus from a Cell Line Derived from *Spodoptera litura* 【Research report】

影響斜紋夜蛾細胞株生產桿狀病毒之因子【研究報告】

C. T. Sen and S. C. Jen

張台聖、石正人*

*通訊作者E-mail:  entsocjournal@yabee.com.tw Spodoptera litura cell line, AcMNPV, recombinant protein expression, cell population doubling time, medium supplements.

Received: 1998/10/13 Accepted: 1998/12/10 Available online: 1999/03/01

Abstract

A cell line derived from *Spodoptera litura*, SL7B, was used to ascertain mass production of Autograph californica nucleopolyhedrovirus (AcMNPV). Results revealed that the SL7B cell line was better than a commercial cell line, SF21AE, for the replication of wild type AcMNPV and for the amount of recombinant virus protein expressed. SL7B cells can grow in low-cost and simple ISC-03 medium, and growth rates increased upon an increase in concentration of fetal bovine serum (FBS) contained in the culture medium. In addition, the production of wild type AcMNPV and amounts of the recombinant protein, luciferase, expressed had a positive correlation to the concentration of FBS in the medium. Addition of Pluronic F68 in ISC-03 was helpful to the growth of SL7B cells. When Pluronic F-68 was added, the cell growth rate was faster in medium containing 2% FBS than in medium containing 8% FBS. Moreover, in medium containing the same concentration of FBS, both the wild type AcMNPV and the recombinant protein production rate were much higher when supplemented with Pluronic F-68. In addition, the multiplicity of infection (MOI) and timing of infection were also very important for using the cell culture to produce virus. The greatest yield of virus production was with an MOI = 0.1 at the initiation (day 0) stage of cells cultured in TNM-FH medium. However, the best cell growth in ISC-03 medium was obtained with an MOI = 10 at 3 d after culturing.

摘要

本文利用斜紋夜蛾細胞株SL7B進行病毒量產試驗，發現就細胞株種類而言，斜紋夜蛾細胞株比現行商品化秋行軍蟲細胞株SF21AE更適合用來生產苜蓿夜蛾核多角體病毒。利用簡易培養液ISC-03培養SL7B細胞時，隨培養液中添加血清濃度增加，細胞生長速度加快且細胞生產野生型病毒數量與表現重組病毒外源蛋白產量均增加。Pluronic F-68添加物對細胞生長有益，在含2%胎牛血清的ISC-03培養液中添加0.1%的Pluronic F-68，則細胞生長速度比添加8%胎牛血清者更快；當培養液中血清濃度相同時，Pluronic F-68的添加不但可增加細胞生產病毒核多角體數量且可提高重組蛋白螢光酵素表現量。此外，細胞培養生產病毒時，病毒感染劑量(multiplicity of infection, MOI)與感染時機相當重要，以TNM-FH + 8% FBS培養時，在第0天以MOI = 0.1感染，可得最高病毒產量；而以ISC-03 + 8% FBS培養時，則在第3天以高MOI = 10感染所得產量最高。

Key words: *Spodoptera litura* cell line, AcMNPV, recombinant protein expression, cell population doubling time, medium supplements.

關鍵詞: 斜紋夜蛾細胞株，苜蓿夜蛾核多角體病毒，重組蛋白產量，細胞倍增時間，細胞培養液添加物

Full Text:  [PDF \(0.82 MB\)](#)

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

影響斜紋夜蛾細胞株生產桿狀病毒之因子

張台聖 石正人* 國立台灣大學昆蟲學系 台北市羅斯福路四段一號

摘要

本文利用斜紋夜蛾細胞株 SL7B 進行病毒量產試驗，發現就細胞株種類而言，斜紋夜蛾細胞株比現行商品化秋行軍蟲細胞株 SF21AE 更適合用來生產苜蓿夜蛾核多角體病毒。利用簡易培養液 ISC-03 培養 SL7B 細胞時，隨培養液中添加血清濃度增加，細胞生長速度加快且細胞生產野生型病毒數量與表現重組病毒外源蛋白產量均增加。Pluronic F-68 添加物對細胞生長有益，在含 2% 胎牛血清的 ISC-03 培養液中添加 0.1% 的 Pluronic F-68，則細胞生長速度比添加 8% 胎牛血清者更快；當培養液中血清濃度相同時，Pluronic F-68 的添加不但可增加細胞生產病毒核多角體數量且可提高重組蛋白螢光酵素表現量。此外，細胞培養生產病毒時，病毒感染劑量 (multiplicity of infection, MOI) 與感染時機相當重要，以 TNM-FH+8% FBS 培養時，在第 0 天以 MOI=0.1 感染，可得最高病毒產量；而以 ISC-03+8% FBS 培養時，則在第 3 天以 MOI=10 感染所得產量最高。

關鍵詞：斜紋夜蛾細胞株、苜蓿夜蛾核多角體病毒、重組蛋白產量、細胞倍增時間、細胞培養液添加物。

前言

昆蟲細胞培養自從 Grace (1962) 首次建立昆蟲細胞株後，已有三十餘年的歷史。而自 Smith *et al.* (1983) 成功利用昆蟲細胞作為桿狀病毒表現載體之宿主細胞以生產外源蛋白後，昆蟲細胞培養之重要性日益升高。昆蟲細胞大量培養除可量產野生型病毒，做為病毒殺蟲劑外 (Weiss and Vaughn, 1986; Granados *et al.*, 1987)，亦可利用來作為桿狀病毒表現載體系統的寄主細胞，生產各種

重組蛋白質 (Luckow and Summers, 1988; Davis *et al.*, 1993)。

從斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 蛹體卵巢建立的細胞株 SL7B (Shih and Chang, 1997a)，經證實可感染苜蓿夜蛾核多角體病毒 (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 之野生型或重組病毒，且每個細胞生產的病毒核多角體數量和表現氯黴素乙酰轉移酵素 (chloramphenical acetyl-transferase protein, CAT) 重組蛋白質產量，分別為秋行軍蟲 (*S. frugipe-*

* 抽印本索取及論文聯繫之負責人

nda) 細胞株 SF21AE 和 SF9 的 1.5-2 倍及 2-3 倍。此外, SL7B 細胞株又能以低成本的 ISC-03 培養液培養 (Shih and Chang, 1997b), 是以在細胞大量培養應用上, 深具潛力值得進一步研究。

利用昆蟲細胞量產核多角體病毒或重組蛋白質時, 影響產量的因子歸納有下列數項: 1. 細胞株的特性 (Hink *et al.*, 1991; Wickham *et al.*, 1992); 2. 培養液的種類 (Chang, 1994); 3. 細胞培養的方式 (Maiorella *et al.*, 1988); 4. 培養液血清含量 (Shih and Chang, 1996); 5. 氧氣之供應 (Palomares and Ramirez, 1996); 6. 感染時細胞密度 (Reuveny *et al.*, 1993); 7. 感染時機及病毒重複感染數 (multiplicity of infection, MOI) (Licari and Bailey, 1991) 等。

本文以實驗室建立之斜紋夜蛾細胞株 SL7B 進行病毒量產試驗, 分別探討細胞株種類、培養液成份、血清含量、培養液添加物及病毒感染時機等因子對細胞生長及量產病毒之影響。期望能建立高產量及低成本的病毒體外培養系統, 有助於病毒殺蟲劑之量產及利用桿狀病毒表現外源蛋白。

材料與方法

一、供試細胞株、培養液及病毒來源

斜紋夜蛾細胞株 SL7B 由本實驗室建立多年, 例行以 TNM-FH 昆蟲細胞培養液並添加 8% 胎牛血清培養。TNM-FH 昆蟲細胞培養液, 以 Grace's medium (Gibco, 11300-027) 為基礎, 依廠商說明書調配而成, 並經 0.2 μ m 孔徑之無菌過濾膜過濾。ISC-03 培養液之配製方法, 參考 Shih and Chang (1997b) 配方調製。其中, 所用之海水取自淡水沙崙海水浴場, 經濾紙過濾後, 存放在 4°C 冰箱備用。調配時, 先將海水加蒸餾水以 1:3 比例稀

釋, 再依上述配方進行調配, 並以 120°C, 高溫高壓滅菌 15 分鐘。

細胞培養盒 (25T tissue culture flask; NUNC, cat. #163371) 及細胞刮起器 (cell scraper; NUNC, cat. #179693) 分別購自 NUNC 公司。細胞接種於培養盒後, 置於 28°C 之定溫箱, 每隔三天進行一次繼代培養。

苜蓿夜蛾核多角體病毒野生型 C₂ strain, 購自 Phamigen 公司 (cat. #21103 D), 經剪接螢光酵素基因 (luciferase gene) 所構築之重組病毒 Acluc 為本實驗室所有 (Chiu and Shih, 1996)。供試病毒於實驗室感染 SL7B 細胞, 收集細胞外病毒液 (extracellular virus, ECV) 作為感染源 (inoculum solution)。經連續性稀釋法 (end point dilution), 以 96 孔培養盒測定病毒效價 (TCID₅₀) 後, 存放於 4°C 冰箱備用。

二、細胞生長曲線、病毒多角體及外源蛋白產量之計量

將待測細胞接種於 25T 細胞培養盒內, 使細胞密度分別為 1.5 或 3×10^6 cells/25T flask, 於室溫下靜置 30 分鐘後, 移去舊培養液, 加入 3 ml 新鮮培養液, 於 25T 細胞培養盒底部標定特定位置, 利用定點觀測法, 定點定時於倒立式顯微鏡下觀測並計數細胞數。比較各處理間細胞生長情形, 藉以繪製細胞生長曲線。利用指數迴歸方程式, $Y = e^{a+bx}$ (Y: 細胞數; X: 培養時間)。利用此生長曲線方程式, 可計算細胞倍增時間。即當 $Y \rightarrow 2Y$, 則 $e^{a+bx} \rightarrow 2e^{a+bx}$, 而 e^{a+bx} 可表示為 $e^{a+bx+\ln 2}$, 即 $e^{a+b(x+\ln 2/b)}$ 。所以當 $Y \rightarrow 2Y$ 時, $e^{a+bx} \rightarrow e^{a+b(x+\ln 2/b)}$ 。據此可計算細胞倍增時間 (population doubling time, PDT), 亦即 $PDT = \ln 2/b$ 。

不同培養液培養的細胞, 對病毒的複製能力差異性比較, 則取相同培養條件的細胞

(各約 1×10^6 cells)，接種於 6 孔培養盒，於室溫下靜置 30 分鐘。移去舊培養液，以約 MOI=10 之病毒劑量感染細胞。病毒種類分別為野生型的 AcMNPV 或含螢光酵素基因的重組病毒 Acluc。經 1 小時吸附感染 (absorption) 後，移去病毒感染液，加入 2 ml 新鮮培養液，置於 28°C 培養箱培養。七天後，收集培養液及細胞，以離心機 (KUBOTA 2010) 離心，轉速為 2000 rpm，室溫下，離心 10 分鐘。沉澱部份再以 1 ml TE buffer (0.01 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA, 0.1% SDS, pH=7.5) 混勻，經超音波震盪 1 分鐘，利用血球計數器 (hemocytometer) 於光學顯微鏡下，計算病毒核多角體 (polyhedral inclusion bodies, PIB) 個數。

細胞表現外源蛋白螢光酵素量之測定，則以光譜儀 (Hitachi, F4500) 進行。首先取已知濃度的螢光酵素標準液與基質作用，使其激發光譜，再置於光譜儀中測定發光量。以發光量為 X 軸，標準液中螢光酵素含量為 Y 軸，作成檢量線供計量參考。將待測樣本與基質作用後，以光譜儀測定其發光光譜，將此光譜面積積分，即為其發光量。利用內插法，代入原先測定的檢量線，即可求出待測樣品中螢光酵素的含量。

三、培養液中血清含量對 SL7B 細胞生長及病毒產量之影響

斜紋夜蛾 SL7B 細胞通常均累代培養於 TNM-FH+8% FBS 培養液中。試驗前，依試驗項目不同，先將 SL7B 細胞進行適應培養 (adaptation) 於各種供試培養液中。適應培養數代後，才進行培養液成份對細胞生長影響之測試。

適應培養的過程如下：於 25T flask 中接種較高密度的 SL7B 細胞 (約 3×10^6 cells/flask)，待細胞完全附著後，倒出 1/2 體積

(約 1.5 ml) 的舊培養液 (TNM-FH)，再加入 1.5 ml 的新培養液。三天後，將盒中 1/2 的舊培養液倒出，再加入 1/2 的新培養液，重複此一步驟，直至盒中細胞長滿後，再將細胞分殖至另一培養盒作繼代培養。如此適應培養數代，直到細胞生長穩定，可完全使用新提供的培養液進行累代培養為止。適應培養所得細胞除一部份供作試驗外，其餘繼續累代培養於 28°C 定溫箱，作為供試細胞來源。本項試驗依血清含量不同，適應培養所用新培養液分為下列四種：ISC-03+8% FBS; ISC-03+6% FBS; ISC-03+4% FBS; ISC-03+2% FBS。利用前項方法，分別測定不同血清含量的培養液，細胞生長曲線、野生型病毒及重組病毒之產量。

四、細胞培養液添加物對 SL7B 細胞生長之影響

為尋求細胞生長促進物以培養斜紋夜蛾 SL7B 細胞，參考其它細胞培養液成份，從中選取 10 種不同化學添加物，添加入 ISC-03 培養液，測試其對斜紋夜蛾細胞株生長之影響。本試驗在 96 孔細胞培養盒中進行，每 1 孔接種以 ISC-03+2% FBS 培養的 SL7B 細胞各約 2×10^4 個，待細胞附著後，吸去舊培養液，加入不同的待測培養液各 300 μ l，以倒立式顯微鏡計數各孔固定區域內的細胞數，並記錄起始培養之細胞數。將培養盒置於 28°C 定溫箱中培養，五天後，以同法計數該區域內細胞數並記錄之，藉以計算細胞生長速率，作為評估各種添加物對細胞生長之促進作用。

本試驗以 ISC-03+2% FBS 為基礎，分別添加各供試化學藥品，測定其對 SL7B 細胞生長及病毒產量之影響。測試藥品分別如下：casitone (SIGMA, cat. #0259-17-9), cholesterol (SIGMA, cat. #C2044), glu-

tamine (GIBCO, cat. #25030-081), insulin-transferrin-selenium (GIBCO, cat. #41400-011), L- α -lecithin (SIGMA, cat. #P3782), lipid concentrate (GIBCO, cat. #21900-030), peptone (SIGMA, cat. #P5905), Pluronic F-68 (SIGMA, cat. #p1300), Tween-80 (SIGMA, cat. #P4675), vitamin solution (市售美強生小兒滴劑)等。

結果發現 lecithin 之添加明顯對細胞有害，其危害程度隨添加量增加而更嚴重。其它化學添加物，諸如 casitone、glutamine、vitamine、cholesterol、lipid concentrate、peptone、Tween-80 等，在本試驗的條件下，對斜紋夜蛾細胞株 SL7B 均無明顯的促進生長效果。通常在添加上述各種化合物後，細胞生長停止，在供試期間中，不但細胞數量沒有增加反而減少，因此這些化合物乃捨棄不用。Insulin-transferrin selenium 為商品化的血清替代物，在本試驗的條件下對細胞生長有促進效果，但最佳的效果並非如使用說明書所推薦的 1x，而為稀釋後的 0.2x。然而此一添加物在細胞繼續累代培養數代後，細胞生長趨緩且無法附著於培養盒底部，最後只好捨棄不用。在本試驗的條件下，僅 Pluronic F-68 對細胞具有生長促進效果，因此乃進一步測試此藥品之生長促進作用。

五、MOI 與感染時機對病毒及外源蛋白產量的影響

本試驗所用之 SL7B 細胞分別以 TNM-FH+8% 胎牛血清及 ISC-03 + 8% 胎牛血清等二種培養液培養。試驗前，先將細胞接種於 6 孔細胞培養盒底部，接種密度為 5×10^5 /well。自接種細胞後，分別在不同細胞生長期，感染不同 MOI 之病毒劑量。

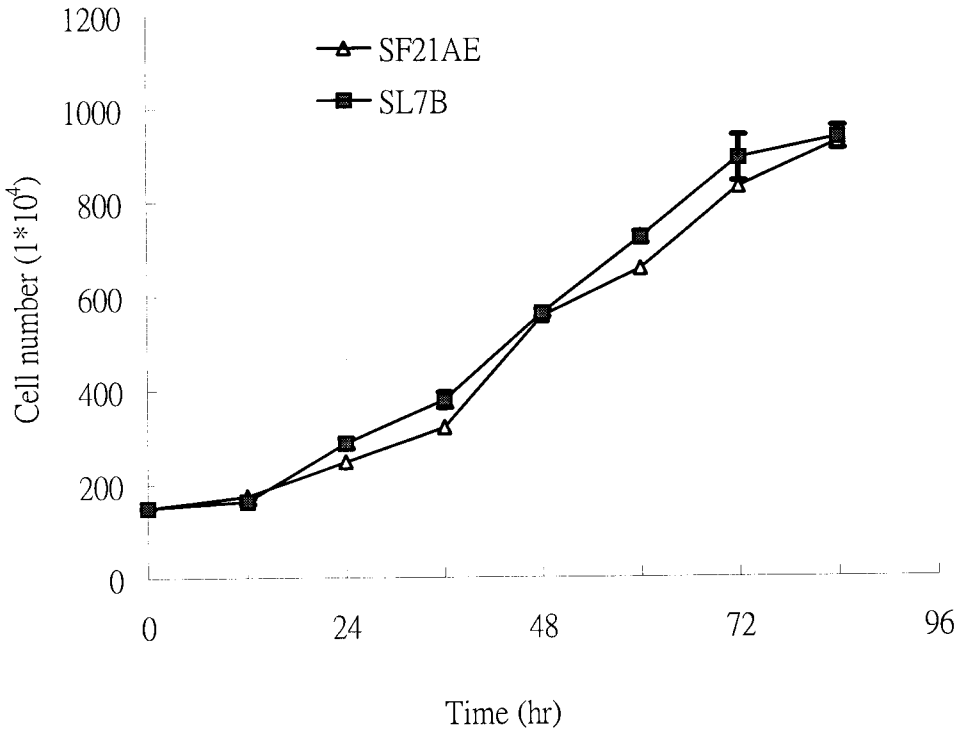
本項試驗共分為三種不同處理組，第一種處理在剛接種細胞時（即第 0 天），即以低的病毒劑量 MOI=0.1 感染 SL7B 細胞；第二種處理則是在剛接種細胞時不感染病毒，直到細胞生長至第 3 天時，才感染高劑量 MOI=10 的病毒；第三種處理則是到細胞接種後第 5 天，才以 MOI=10 的病毒劑量感染細胞。每一種處理均在細胞接種後第 7 天收集細胞及培養液，分別以上述（第三項）方式測量野生型 AcMNPV 病毒核多角體數量及重組病毒 Acluc 表現螢光酵素重組蛋白質產量。

結 果

一、SL7B 與 SF21AE 細胞株之細胞倍增時間、病毒多角體及螢光酵素產量比較

利用 TNM-FH+8% 胎牛血清培養液分別培養斜紋夜蛾細胞株 SL7B 及秋行軍蟲細胞株 SF21AE，以定點觀測法，定時定點於倒立式顯微鏡下，觀測並計數不同培養時段之細胞數目。將所觀測的細胞數分別用以繪製細胞生長曲線，結果如圖一所示。二種細胞株之生長曲線趨勢相似，經 84 小時培養後，細胞數目從 1.5×10^6 增加到 7.5×10^6 ，亦即本試驗所測試的二種細胞在 3.5 天的培養中，細胞數目約可增加 5 倍之多。

SL7B 及 SF21AE 二種細胞經感染野生型 AcMNPV 後，每個細胞平均生產的病毒核多角體數量分別為 20.63 ± 1.83 及 15.92 ± 1.54 個。利用含螢光酵素基因的重組病毒 Acluc 感染二種細胞後，SL7B 及 SF21AE 細胞所表現之螢光酵素外源蛋白質產量，分別為 82.20 ± 7.73 及 55.12 ± 1.77 (ng/ml)/ 1×10^6 cells (表一)。從試驗結果可知，不論是野生型病毒多角體產量或重組病毒外源蛋白表現量，斜紋夜蛾細胞株 SL7B 均優於秋行軍蟲細



圖一 斜紋夜蛾細胞株 SL7B 及秋行軍蟲細胞株 SF21AE 以 TNM-FH 添加 8% 胎牛血清培養之細胞生長曲線
 Fig. 1. Growth curves of SL7B and SF21AE cells cultured in TNM-FH medium containing 8% FBS.

表一 斜紋夜蛾細胞株 SL7B 及秋行軍蟲細胞株 SF21AE 之生長曲線迴歸方程式、細胞倍增時間、核多角體及螢光酵素產量之比較

Table 1. Comparison of growth curve, population doubling time (PDT), number of polyhedral inclusion body (PIB) production, and amount of foreign protein luciferase expression between SL7B and SF21AE cells

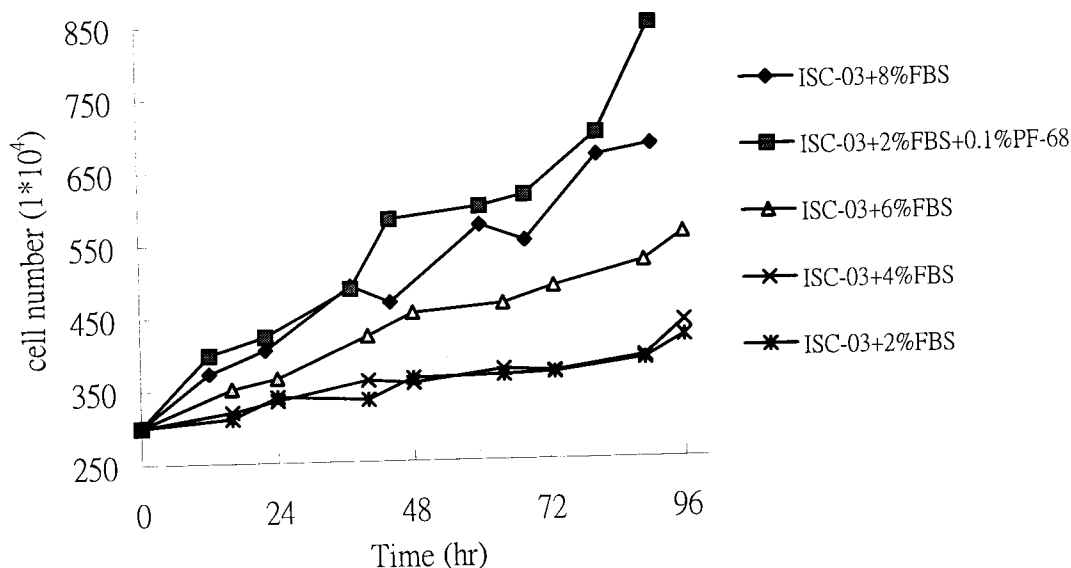
Cell line	Growth curve ^{a)} regression formula	PDT (h)	PIBs/cell	Luciferase concentration (ng/ml)/x 10 ⁶ cells
SL7B	$Y = e^{3.05 + 0.024X}$	28.45	20.63 ± 1.83	82.20 ± 7.73
SF21AE	$Y = e^{3.00 + 0.023X}$	29.05	15.92 ± 1.54	55.12 ± 1.77

a) Y=cell number, X=hours of growth.

胞株 SF21AE。就細胞倍增時間而言，斜紋夜蛾細胞株比秋行軍蟲細胞株短。換言之，SL7B 細胞株生長速度略較 SF21AE 細胞快。

二、簡易培養液 ISC-03 胎牛血清含量及添加物對 SL7B 細胞生長及病毒產量之影響
 簡易培養液 ISC-03 配製簡易，且成本

低廉，然而在培養時卻需添加 8% 胎牛血清才能供細胞生長。血清成本高昂，在添加血清後，ISC-03 培養液成本低廉的優勢便不再明顯。故利用 ISC-03 培養液培養 SL7B 細胞時，若想再進一步降低成本，最有效的方式應為設法降低培養液中血清的含量，或開發添加物促進細胞生長。



圖二 ISC-03 培養液中血清含量及添加物 Pluronic F-68 對斜紋夜蛾細胞株 SL7B 生長之影響

Fig. 2. Influence of fetal bovine serum concentrations and Pluronic F-68 supplement in ISC-03 medium on growth of SL7B cells.

表二 ISC-03 培養液中血清含量及 Pluronic F-68 的添加對 SL7B 細胞株之細胞倍增時間、病毒核多角體及重組蛋白質產量之影響

Table 2. Effects of fetal bovine serum concentration and Pluronic F-68 supplement in ISC-03 medium on population doubling time, PIB production, and amount of foreign protein luciferase expression of SL7B cells

	8%FBS+ ISC-03	6%FBS+ ISC-03	4%FBS+ ISC-03	2%FBS+ ISC-03	2%FBS+ ISC-03+ Pluronic F-68
Growth curve regression formula a)	$Y = e^{5.79 + 0.00849X}$	$Y = e^{5.76 + 0.00598X}$	$Y = e^{5.72 + 0.00322X}$	$Y = e^{5.71 + 0.00302X}$	$Y = e^{5.81 + 0.00875X}$
PDT (h)	81.63	115.81	214.89	229.30	78.42
PIBs/cell	7.55 ± 1.05	5.37 ± 0.10	4.82 ± 0.79	4.58 ± 1.71	5.21 ± 0.94
Luciferase concentration (ng/ml)/10 ⁶ cell	50.74 ± 2.02	37.90 ± 0.52	27.99 ± 0.19	25.62 ± 0.05	35.42 ± 0.01

a) Y = cell number, X = hours of growth.

為降低 ISC-03 培養液之成本，使利用於培養斜紋夜蛾 SL7B 細胞，本試驗測試不同胎

牛血清添加量對細胞生長及病毒產量的影響。由試驗結果顯示，細胞生長曲線隨

ISC-03 培養液中血清含量的減少而隨之趨緩（圖二）。利用不同血清含量之培養液所培養之細胞，不論感染野生型 AcMNPV 後所得病毒核多角體數，或感染重組病毒 Acluc 後之螢光酵素表現量，均隨培養液中血清含量減少而降低（表二）。

添加 Pluronic F-68 在本試驗的條件下，0.1%、0.2% 或 0.3% 的添加量，均對 SL7B 細胞有促進生長的效果，但不同濃度添加量之間並無明顯差異，故選取 0.1% 的添加量作進一步的試驗。添加 0.1% 的 Pluronic F-68 培養液，所培養的細胞外形及大小與原先的 SL7B 細胞無異，經過累代培養，細胞均能正常生長，並且在重新接種至新培養盒時，細胞附著的比例及速度均較僅添加 2% FBS 者為佳。因此乃選擇此一配方的培養液，進一步作細胞倍增時間及病毒產量的試驗。由試驗結果顯示，當添加了 0.1% Pluronic F-68 後，即使 ISC-03 培養液中胎牛血清含量僅為 2%，細胞仍可快速地生長，甚至優於添加 8% 胎牛血清的培養液（圖二）。就血清含量各為 2% 的試驗組而言，Pluronic F-68 的添加除可縮短細胞倍增時間外，其培養之細胞生產病毒核多角體數及螢光酵素表現量，均優於無添加之處理組（表二）。

三、MOI 與感染時機對病毒及外源蛋白產量

的影響

利用 TNM-FH+8% 胎牛血清及 ISC-03+8% 胎牛血清之培養液分別培養斜紋夜蛾 SL7B 細胞，以 5×10^5 /孔的密度，接種細胞於 6 孔培養盤底部。分別在不同時段感染不同 MOI 劑量之病毒，在細胞接種後第 7 天收集細胞及培養液，分別測量野生型 AcMNPV 病毒之核多角體數量及螢光酵素重組蛋白質產量。結果如表三所示，在第 0 天以 MOI=0.1 的劑量感染，所得病毒核多角體產量及螢光酵素表現量最高，分別為 744.75 ± 31.93 PIBs/ml 及 3024.81 ± 45.26 ng/ml 螢光酵素。其次為在培養第 3 天以 MOI=10 劑量感染的處理組，分別為 423.17 ± 111.33 PIBs/ml 及 2528.12 ± 361.40 ng/ml 螢光酵素。而在細胞接種後第 5 天，以 MOI=10 之劑量感染，所得結果不論野生型病毒或重組蛋白質的表現量均最低，分別為 $3.83 \pm 0.76 \times 10^4$ PIBs/ml 及 0.63 ± 0.15 ng/ml 螢光酵素。

利用 ISC-03 培養液添加 8% 胎牛血清培養 SL7B 細胞所作的 MOI 與感染時機的組合試驗，結果如表四所示。以在細胞培養第 3 天以 MOI=10 感染者，在 AcMNPV 野生型病毒核多角體數量及螢光酵素重組蛋白質的表現量為最高，分別為 $189.33 \pm 9.83 \times 10^4$ PIBs/ml 及 672.18 ± 79.89 ng/ml；其次為在細胞培養第 0 天時以 MOI=0.1 感染者，在

表三 利用 TNM-FH 培養液添加 8% 胎牛血清培養 SL7B 細胞時病毒感染劑量及感染時機對病毒及重組蛋白質產量的影響

Table 3. Effect of multiplicity of infection (MOI) and time of infection on PIB production and luciferase expression of SL7B cells cultured in TNM-FH medium containing 8% fetal bovine serum

MOI	Time of infection	Polyhedral conc. ($\times 10^4$ PIBs/ml)	Luciferase concentration (ng/ml)
0.1	day 0	744.75 ± 31.93	3024.81 ± 45.26
10	day 3	423.17 ± 111.33	2528.12 ± 361.40
10	day 5	3.83 ± 0.76	0.63 ± 0.15

表四 利用 ISC-03 培養液添加 8% 胎牛血清培養 SL7B 細胞時病毒感染劑量及感染時機對病毒及重組蛋白質產量的影響

Table 4. Effect of multiplicity of infection (MOI) and time of infection on PIBs production and luciferase expression of SL7B cells cultured in ISC-03 medium containing 8% fetal bovine serum

MOI	Time of infection	Polyhedral conc. (x 10 ⁴ PIBs/ml)	Luciferase concentration (ng/ml)
0.1	day 0	168.50±19.29	561.78±53.68
10	day 3	189.33±9.83	672.18±78.89
10	day 5	23.17±9.00	0.40±0.07

AcMNPV 野生型病毒核多角體數量及螢光酵素重組蛋白質的表現量分別為 $168.50 \pm 19.29 \times 10^4$ PIBs/ml 及 561.78 ± 53.68 ng/ml；在細胞培養第 5 天以 MOI=10 所感染者，其病毒核多角體數量及螢光酵素重組蛋白質表現量最低。

討 論

昆蟲細胞培養無論在量產病毒殺蟲劑或表現外源蛋白上，均佔要重要地位 (O'Reilly *et al.*, 1992)。由於病毒具有很高寄主專一性，而不同來源之細胞除對病毒感受性不同外，細胞株本身特性之差別亦為影響病毒產量之因素。Hink *et al.* (1991) 曾測試 23 種昆蟲細胞株，比較其表現 3 種外源蛋白質，結果發現隨細胞株種類不同，其表現外源蛋白的能力亦有差異。Davis *et al.* (1993) 以 TNM-FH+10% FBS 培養來自秋行軍蟲、擬尺蠖 (*Trichoplusia ni*)、甘藍夜蛾 (*Mamestra brassicae*) 和 鹽澤枝燈蛾 (*Estigmene acrea*) 等 8 株細胞株，並以含 secreted alkaline phosphatase (SEAP) 基因的重組 AcMNPV 感染，結果發現就每個細胞而言，來自 *T. ni* 的 BTI-TN-5B1-4 細胞株較來自 *S. frugiperda* 的 SF9 或 SF21 細胞株，所生產的 SEAP 量多了 20 倍，並比其他細胞株多了 9 倍以上；若就每毫升細胞培養液而言，BTI-TN-5B1-4 細胞的 SEAP 產量約為其他細胞株

的 5 倍。本試驗所用斜紋夜蛾細胞株 SL7B 不論就野生型 AcMNPV 產量或重組螢光酵素蛋白表現量，均比商品化之秋行軍蟲細胞株 SF21AE 產量高，因此值得進一步開發研究。

就細胞培養成本而言，培養液中胎牛血清含量具有關鍵性影響力，而隨著細胞株種類不同，其對血清需求量亦有差別，因此降低血清含量或開發無血清培養液，是重要的 7 研究項目 (Wang *et al.*, 1992)。經由本試驗結果可知，ISC-03 培養液中，胎牛血清含量對 SL7B 細胞生長與病毒產量有重大的影響，若試圖直接減少血清含量以降低成本，並無法得到合理的經濟效益，因此開發血清替代物以降低培養成本，應為可行之道。

本試驗評估 10 種不同化學添加物，測試其對細胞生長之影響。結果發現 Lecithin 之添加明顯對細胞有害，其危害程度隨添加量而增加，推究其原因可能與該藥品係以氯仿為溶劑有關。Goodwin (1989) 將 cholesterol, β -穀脂醇 (β -sitosterol), 大豆磷脂 (soybean phosphatide), α -生育酚酸 (α -tocopherol acetate) 及 peptones 等合成脂粒 (liposome) 型式，用以取代血清，添加入培養液中培養舞蛾 (gypsy moth) 細胞株，結果發現在細胞的生長速率方面與添加 8% 血清相同。Glutamine 對昆蟲細胞生長的重要性在許多細胞培養上均有報導 (Mitsubishi, 1989)，然而，在本試驗條件下，其對 SL7B

細胞亦無明顯促進生長的效果。分析原因，可能為ISC-03 培養液本身的 glutamine 含量已足夠細胞生長所需，另行添加並無明顯的助益，或為細胞株本身特性差異所致。就供試十種化合物而言，僅有 Pluronic F-68 對細胞生長有益。

Maiorella *et al.* (1988) 以 IPL-41 培養液為基礎，在其中添加 cod liver oil、Tween-80、cholesterol 等物質，並將 α -tocopherol acetate 溶於酒精中，再滴入 Pluronic F-68 中形成微乳化物，以此添加物取代血清用來培養 SF9 細胞株，檢測細胞生長密度、倍增時間、外源蛋白質的產量等，都與用 10% 血清所培養者無顯著差異。Pluronic F-68 一般用作大量懸浮培養細胞的抗氣泡劑 (Murhammer and Goochee, 1988) 或在無血清培養液中所添加的 lipid emulsion 中作為界面活性劑 (Maiorella *et al.*, 1988; Inlow *et al.*, 1989; Schlaeger *et al.*, 1993)，但在本試驗的條件下，Pluronic F-68 的添加卻具有促進細胞生長的效果。Schlaeger *et al.* (1993) 曾配製一種低成本的 SF-1 培養液，內含多種無機鹽類、氨基酸、葡萄糖及 3 種蛋白質水解物，在不含血清而以 lipid 加 Pluronic F-68 mixture 添加的情況下，可使 SF9 細胞株生長，若再添加 10% 的 IP301 培養液，將可使細胞生長更好，接著在 1996 年的報告中又指出，10% 的 IP301 培養液可以其他的昆蟲細胞培養液取代，其效果相同 (Schlaeger, 1996)。

Gilbert *et al.* (1996) 以含 Pluronic F-68 之 lipid emulsion components，評估在無血清昆蟲培養液中對擬尺蠖細胞株 High-Five 生長及對重組蛋白質表現量的影響。結果發現 lipid emulsion components 成份中，僅添加 Pluronic F-68 即能達到 80% 完整的 lipid emulsion 添加對細胞生長的促進效果。如將

lipid emulsion 中完全除去 Pluronic F-68，則 High-Five 細胞完全無法生長。在細胞對重組蛋白質表現量方面，若僅添加 Pluronic F-68，則蛋白產量為添加完整的 lipid emulsion 者的 1/10，顯示 Pluronic F-68 能有效促進細胞生長，但並無促進細胞生產外源蛋白的能力。

本試驗中添加 Pluronic F-68，除可促進細胞生長外，也能維持高水準的病毒產量。Pluronic F-68 一般用作懸浮培養時的抗氣泡劑，或作為無血清培養液中所添加的 lipid emulsion 的成分之界面活性劑使用，對將來細胞大量培養時，以懸浮方式進行量產，此時 Pluronic F-68 之添加具有雙重效果。然而究竟 Pluronic F-68 所扮演的角色是細胞生長所需養分或為在培養液中改變物理、化學特性以利細胞生長，仍有待進一步研究。

影響細胞生產病毒產物另一重要因子為病毒感染劑量及感染時機。Licari and Bailey (1991) 以 MOI 介於 0 至 100 的病毒劑量感染 SF9 細胞株，並檢測重組蛋白質的表現量。結果發現，重組蛋白表現量與感染時細胞所處的生長時期，有密切的關係。在細胞生長對數期早期感染時，MOI 與最終的蛋白質產量較無關係，但在細胞生長對數期晚期感染時，以最高的 MOI 所感染者，所表現之蛋白質產量最高。Licari and Bailey (1992) 更進一步指出，在細胞對數生長期之初，以低的 MOI 來感染，可得最佳的重組蛋白質表現量。Jesionowski and Mohammad (1997) 以 MOI = 0.008, 0.08, 0.8 及 4 等劑量，分別在 SF9 細胞對數生長期的早、中、晚各三種不同時期感染重組病毒，並測重組蛋白質 (β -gal) 表現量。結果顯示，在早期感染時，以 MOI = 0.08 者產量最高；在中期及晚期感染者，重組蛋白質的產量與 MOI 劑量呈正相關。他們研究結果顯示，在細胞

對數生長早期，以 $MOI=0.08$ 感染所得重組蛋白質產量最高。

本試驗以 TNM-FH 添加 8% 胎牛血清來培養 SL7B 細胞所作的 MOI 與感染時機的組合，所得結果與前人試驗吻合，亦即日後在大量培養 SL7B 細胞以生產病毒多角體或重組蛋白質時，應在細胞培養的早期，以較低的 MOI 劑量來感染細胞，將可獲得最高的病毒產量。此外，因所用的 MOI 不需太高，所以在大量培養昆蟲細胞以量產病毒時將不會遭遇需求大量病毒液的問題，此亦有助於日後生產病毒殺蟲劑時的實際運作。

利用 ISC-03 培養液添加 8% 胎牛血清培養 SL7B 細胞所作的試驗中，不論 AcMNPV 野生型病毒核多角體數量或螢光酵素重組蛋白質的表現量，均以在細胞培養第三天以 $MOI=10$ 的感染組合為最高。造成此結果的原因可能與細胞生長的動態及複製病毒的速度有關。當以非常低的 MOI 來感染細胞時，僅有少數的細胞在剛開始即被感染，而其他細胞得以繼續生長；被感染的細胞隨著時間複製新病毒子代以感染臨近生長中的細胞，因此隨著細胞密度的增加，而產生了較高的病毒產量。此時，若細胞生長的速度較慢或複製的病毒數量較少，則此種低 MOI 配合早期感染的優勢將不復見。在細胞生長的晚期雖以較高的 MOI 感染可得較高的病毒產物，但產量仍屬最低，其可能原因為在細胞培養的晚期，培養液中的養分已消耗殆盡或已有一些代謝物質的累積，使不利於病毒感染細胞或形成病毒產物。此外，也可能是細胞受感染後，尚未能大量表現病毒產物即面臨試驗結束（第 7 天結束試驗，測病毒產量）。是在用 TNM-FH 或 ISC-03 培養液添加 8% 胎牛血清培養 SL7B 細胞以表現病毒產物的試驗中，均以在細胞生產晚期才感染病毒的試驗組合，所得的病毒產物表現量最低。

從試驗結果可知，細胞感染病毒時所用的 MOI 及感染的時機，對病毒產量的影響很大。在大量培養昆蟲細胞以生產病毒或重組蛋白質時，需針對此一現象擬定一最佳的感染策略。此外，即使是同一種細胞株，但因所使用的培養液不同，最佳的感染策略亦可能會有所不同，因此最佳病毒感染策略須視不同細胞特性及培養方法而擬定，才得以獲得最高的病毒或重組蛋白質表現量。

誌 謝

本論文研究經費承行政院農業委員會撥款補助，前農委會植保科科長陳秋男鞭策鼓勵及台大昆蟲系王重雄教授協助，特此致謝。

引用文獻

- Chang, J. C.** 1994. Modification of cell culture methods and the expression of two foreign proteins in *Spodoptera litura* cell line. Master thesis from Dept. of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan University. 65pp (in Chinese).
- Chiu, S. C., and C. J. Shih.** 1996. Construction of recombinant baculovirus containing luciferase gene and its expression in *Spodoptera litura* cells. Chinese J. Entomol. 16: 267-278 (in Chinese).
- Davis, T. R., T. J. Wickman, 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. 19: 388-

- Gilbert, R. S., Y. Nagano, T. Yokota, S. F. Hwan, T. Fletcher, and K. Lydersen.** 1996. Effect of lipids on insect cell growth and expression of recombinant proteins in serum-free medium. *Cytotechnology* 22: 221-216.
- Goodwin, R. H.** 1989. Construction of peptoliposomes for the incorporation of nutrient lipid supplements in insect cell culture media. *J. Tissue Culture Methods* 12: 17-20.
- Grace, T. D. C.** 1962. Establishment of the four strains of cell from insect tissue grown in vitro. *Nature* 195: 788-789.
- Granados, R. R., K. G. Dwryer, and A. C. G. Derksen.** 1987. Production of viral agents in invertebrate pathology and cell culture. Pp.167-181. *in*: K. Maramosch, ed. *Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture*. Academic Press, San Diego.
- Hink, W. F., D. R. Thomesn, 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.
- Inlow, D., A. Shanger, and B. Maiorella.** 1989. Insect cell culture and baculovirus propagation in protein-free medium. *J. Tissue Culture Methods* 12: 13-16.
- Jesionowski, G. A., and M. A. Mohammad.** 1997. An efficient medium for high protein production in the insect cell/baculovirus expression system. *Bio-technol. Prog.* 13: 355-360.
- Licari, P., and J. E. Bailey.** 1991. Factors influencing recombinant protein yields in an insect cell-baculovirus expression system: multiplicity of infection and intracellular protein degradation. *Biotechnol. Bioeng.* 37: 238-246.
- Licari, P., and J. E. Bailey.** 1992. Modeling the population dynamics of baculovirus-infected insect cells optimizing infection strategies for enhanced recombinant protein yields. *Biotechnol. Bioeng.* 39: 432-441.
- Luckow, V. A., and M. D. Summers.** 1988. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology* 6: 47-55.
- Maiorella, B., D. Inlow, A. Shauger, and D. Harano.** 1988. Large-scale insect cell culture for recombinant protein production. *Bio/Technology* 6: 1406-1410.
- Mitsuhashi, J.** 1989. Simplified medium (MTCM-1601) for insect cell lines. *J. Tissue Culture Methods* 12: 21-22.
- Murhammer, D. W., and C. F. Goochee.** 1988. Scale up of insect cell cultures: protective effects of Pluronic F-68. *Bio/Technology* 6: 1411-1418.
- O'Reilly, D. R., L. K. Miller, and V. A. Luckow.** 1992. *Baculovirus Expression Vectors - A Laboratory Manual*. W. H. Freeman, New York. 347 pp.
- Palomares, L. A., and O. T. Ramirez.** 1996. The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. *Cytotechnology* 22: 225-237.

- Reuveny, S., Y. J. Kim, C.W. Kemp, and J. Shiloach.** 1993. Production of recombinant proteins in high-density insect cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 235-239.
- Schlaeger, E. J.** 1996. Medium design for insect cell culture. *Cytotechnology* 20: 57-70.
- Schlaeger, E. J., M. Foggetta, J. M. Vonach, and K. Christensen.** 1993. SF-1, a low cost culture medium for the production of recombinant proteins in baculovirus infected insect cells. *Biotechnol. Tech.* 7: 183-188.
- Shih, C. J., and J. C. Chang.** 1996. Effect of fetal bovine serum replacements and serum-free medium to culture a *Spodoptera litura* cell line. *Chin. J. Entomol.* 16: 177-185 (in Chinese).
- Shih, C. J., and J. C. Chang.** 1997a. High level expression of recombinant protein in a cell line derived from *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool.* 32: 179-188.
- Shih, C. J., and J. C. Chang.** 1997b. A simple media for growth of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) cells and propagation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Appl. Entomol. Zool.* 32: 589-594.
- Smith, G. E., M. D. Summers, and M. J. Fraiser.** 1983. Production of human β -interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell Biol.* 3: 2156-2165.
- Wang, P., R. R. Granados, and M. L. Shuler.** 1992. Studies on serum-free culture of insect cells for virus propagation and recombinant protein production. *J. Invertebr. Pathol.* 59: 46-53.
- Weiss, S. A., and J. L. Vaughn.** 1986. Cell culture methods for large-scale propagation of baculovirus. pp. 63-67. *in*: R. R. Granados, and B. A. Federici, eds. *The Biology of Baculoviruses*, vol. 2. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Wickham, T. J., T. Davis, R. R. Granados, M. L. Shuler, and H. A. Wood.** 1992. Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infections virus in the baculovirus expression system. *Biotechnol. Prog.* 8: 391-396.

收件日期：1998年10月13日

接受日期：1998年12月10日

Factors Influencing the Production of Baculovirus from a Cell Line Derived from *Spodoptera litura*

Tai-Sen Chang and Cheng-Jen Shih* Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

A cell line derived from *Spodoptera litura*, SL7B, was used to ascertain mass production of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV). Results revealed that the SL7B cell line was better than a commercial cell line, SF21AE, for the replication of wild type AcMNPV and for the amount of recombinant virus protein expressed. SL7B cells can grow in low-cost and simple ISC-03 medium, and growth rates increased upon an increase in concentration of fetal bovine serum (FBS) contained in the culture medium. In addition, the production of wild type AcMNPV and amounts of the recombinant protein, luciferase, expressed had a positive correlation to the concentration of FBS in the medium. Addition of Pluronic F68 in ISC-03 was helpful to the growth of SL7B cells. When Pluronic F-68 was added, the cell growth rate was faster in medium containing 2% FBS than in medium containing 8% FBS. Moreover, in medium containing the same concentration of FBS, both the wild type AcMNPV and the recombinant protein production rate were much higher when supplemented with Pluronic F-68. In addition, the multiplicity of infection (MOI) and timing of infection were also very important for using the cell culture to produce virus. The greatest yield of virus production was with an MOI=0.1 at the initiation (day 0) stage of cells cultured in TNM-FH medium. However, the best cell growth in ISC-03 medium was obtained with an MOI=10 at 3 d after culturing.

Key words: *Spodoptera litura* cell line, AcMNPV, recombinant protein expression, cell population doubling time, medium supplements.