



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Detection and Identification of Five Nucleopolyhedrovirus Isolates from Taiwan by PCR-RFLP 【Research report】

利用PCR-RFLP技術定五種核多角體病毒台灣分離株【研究報告】

Suey-Sheng Kao*, Tzyy-Rong Jinn and Chuy-Hsiung Wang
高穗生*、靳子蓉、王重雄

*通訊作者E-mail: sskao@tactri.gov.tw

Received: 1999/12/16 Accepted: 2000/01/07 Available online: 2000/03/01

Abstract

Five nucleopolyhedrovirus (NPV) isolates from Taiwan: *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SpeiNPV), *Spodoptera litura* NPV (SpltNPV), *Perina nuda* NPV (PenuNPV), *Lymantria xyliana* NPV (LyxyNPV) and a isolate of *Autographa californica* NPV (AcMNPV-TWN4) from *S. exigua* were used for this study. EcoR I profiles of genomic DNAs of five NPVs gave a clear pattern for identification, this result showed that EcoR I profiles were sufficient to identify these NPVs. A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) technique was used for rapid detecting and identifying NPVs which were even at low concentration. A set of primers, designated as primers 35 and 36 (Chou et al., 1996) was used for amplification of polyhedrin gene from five NPVs by PCR and the size of amplicons was 680 bps. These polyhedrin gene fragments were sequenced and were then digested with BsuR I, BspH I, BsiW I, Hpa II, Mse I and Taq I DNA restriction endonuclease, respectively. The BsuR I patterns of amplicons gave a completely different pattern from each other, and the profiles of other selected restriction enzymes could be regarded as a complement data for Bsu RI for detection and identification. It is suggested that PCR-RFLP technique is a feasible method for rapid detection and identification of five NPVs isolated from Taiwan.

摘要

對甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)、斜紋夜蛾(*S. litura*)、榕樹透翅毒蛾(*Perina nuda*)、木毒蛾(*Lymantria xyliana*)核多角體病毒及苜蓿夜蛾(*Autographa californica*)核多角體病毒台灣分離株等五種本土性核多角體病毒進行鑑定與分析的研究。經EcoRI限制[西每]圖譜分析，證實此五種核多角體病毒的基因組DNA各具有不同的EcoRI限制[西每]圖譜，因此以EcoRI限制[西每]圖譜分析法即可達到區分此五種本土性核多角體病毒的效果。但為求更進一步改善及提高對此五種本土性核多角體病毒偵測的靈敏度，故選擇以聚合[西每]鏈鎖反應(PCR)增幅多角體蛋白基因片段(約680bp)，其增幅的片段除定序外，再與BsuRI、BspHI、BsiWI、HpaII、MseI和TaqI等限制[西每]進行限制[西每]片段多型性(RFLP)分析。其結果顯示此五種核多角體病毒經BsuRI限制[西每]切割後即呈現不同的剖面，所以各核多角體病(NPV)之間的差異性可明顯地分辨開來。另BspHI、BsiWI、HpaII、MseI和TaqI之限制[西每]圖譜亦可輔助鑑定此五種核多角體病毒。因此PCR-RFLP分析技術將可提供一套快速且靈敏的偵測系統以鑑定此五種本土性核多角體病毒。

Key words: nucleopolyhedrovirus (NPV), polymerase chain reaction (PCR), polyhedrin gene (Polh), restriction fragment length polymorphisms (RFLP).

關鍵詞: 核多角體病毒、多角體蛋白基因、聚合[西每]鏈鎖反應、限制[西每]片段多型性

Full Text: [PDF \(0.27 MB\)](#)

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

利用 PCR-RFLP 技術鑑定五種核多角體病毒台灣分離株

高穗生* 靳子蓉 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所生物藥劑系 台中縣霧峰鄉光明路11號

王重雄 國立台灣大學昆蟲研究所 台北市羅斯福路四段1號

摘要

對甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*)、斜紋夜蛾 (*S. litura*)、榕樹透翅毒蛾 (*Perina nuda*)、木毒蛾 (*Lymantria xyliina*) 核多角體病毒及苜蓿夜蛾 (*Autographa californica*) 核多角體病毒台灣分離株等五種本土性核多角體病毒進行鑑定與分析的研究。經 *EcoRI* 限制酶圖譜分析，證實此五種核多角體病毒的基因組 DNA 各具有不同的 *EcoRI* 限制酶圖譜，因此以 *EcoRI* 限制酶圖譜分析法即可達到區分此五種本土性核多角體病毒的效果。但為求更進一步改善及提高對此五種本土性核多角體病毒偵測的靈敏度，故選擇以聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 增幅多角體蛋白基因片段 (約 680bp)，其增幅的片段除定序外，再與 *BsuRI*、*BspHI*、*BsMI*、*HpaII*、*MseI* 和 *TaqI* 等限制酶進行限制酶片段多型性 (RFLP) 分析。其結果顯示此五種核多角體病毒經 *BsuRI* 限制酶切割後即呈現不同的剖面，所以各核多角體病毒 (NPV) 之間的差異性可明顯地分辨開來。另 *BspHI*、*BsMI*、*HpaII*、*MseI* 和 *TaqI* 之限制酶圖譜亦可輔助鑑定此五種核多角體病毒。因此 PCR-RFLP 分析技術將可提供一套快速且靈敏的偵測系統以鑑定此五種本土性核多角體病毒。

關鍵詞：核多角體病毒、多角體蛋白基因、聚合酶鏈鎖反應、限制酶片段多型性。

前言

昆蟲核多角體病毒 (nucleopolyhedrovirus; NPV) 是一種桿狀病毒，其寄主範圍多數呈狹窄且專一性高，對脊椎動物和植物不具感染力，只會在昆蟲 (主要是鱗翅目) 體內增殖。故此特性使得 NPV 在殺蟲劑的研發上及

害蟲的防治上都極具潛能。目前已有多種商品化的 NPV 殺蟲劑在農業上使用，面對此日益增多的 NPV 殺蟲劑，其當前最重要的課題即是建立一套實用且完善的品質管制系統。因此，NPV 病毒種類的鑑定工作就顯得十分的重要，且刻不容緩。

過去鑑定 NPV 病毒乃建立在生物學、免

*論文聯繫人
e-mail:sskao@tactri.gov.tw

疫學及形態學的基礎上，其應用的方法包括了細胞病變效應 (cytopathic effect; CPE) (Tanada *et al.*, 1982) 及抗體組群特異抗原之酶標記免疫吸附測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) (Smith and Summers, 1981 ; Hohmann and Faulkner, 1983) 和電子顯微鏡觀察 (Liu and Hou, 1983; Falcon and Hess, 1985) 等，但這些方法之使用均有它們本身的限制，在少量的病毒下無法快速、有效地鑑定出 NPV 病毒，例如：細胞病變效應方法需進行體內或體外之病毒培養，以觀察 NPV 所造成的寄主細胞病變情形，而免疫學的酶標記免疫吸附測定法使用上雖簡便且靈敏度高，但除受到酵素反應條件影響外，再加上核多角體病毒間的交互反應高，所以易造成鑑定上的誤判。另，各核多角體病毒形態上的變化並不明顯，故以電子顯微鏡術鑑定 NPV 種類並不實際。

目前，被利用於鑑定 NPV 的方法有蛋白質圖譜分析法 (Kozlov *et al.*, 1992) 和核酸限制酶圖譜分析法 (Wiegiers and Vlask, 1984; Smith and Summers, 1987) 兩種，其中又以核酸限制酶圖譜分析法，對種源相近的 NPV 才有鑑別力，所以，此法還可偵測到 NPV 的變異種 (mutant) 以及混合的 NPVs (Robert *et al.*, 1986 ; Maeda and Majima , 1990)。因此，利用核酸限制酶圖譜鑑定核多角體病毒可說是一種相當實用的方法。但當蟲體在感染初期或持續性感染低的情況下，檢體內只存在少量病毒，則病毒較困難以此方法進行鑑定與分析。故如何建立一個 NPV 病毒偵測系統，以克服此微量 NPV 的偵測問題，是本文所探討的重點。在本文中主要探討的 NPV 為甜菜夜蛾核多角體病毒 (*Spodoptera exigua* NPV; SpeiNPV)、斜紋夜蛾核多角體病毒 (*S. litura* NPV; SpltNPV)、榕樹透

翅毒蛾核多角體病毒 (*Perina nuda* NPV; PenuNPV) 和木毒蛾核多角體病毒 (*Lymantria xyliina* NPV; LyxyNPV) 以及苜蓿夜蛾核多角體病毒的分離株 (*Autographa californica* NPV-TWN₄; AcMNPV-TWN₄) 等五種台灣分離的本土性 NPV 病毒。

材料與方法

一、病毒核多角體的分離

來自田間健康的甜菜夜蛾和斜紋夜蛾，以人工飼料繼代飼育於生長箱內，其生長箱的溫度、濕度則是以各供試蟲的適溫為依據。其有關 SpeiNPV 及 SpltNPV 的增殖，是以純化的多角體分別感染其寄主昆蟲之第四齡或五齡的幼蟲所獲得。多角體之純化步驟敘述如下：將收集來的病蟲加入適量的 1xTE 緩衝劑 (10mM Tris, 1mM EDTA, pH7.5)，研磨，經二層紗布過濾，濾液先以 1000 rpm，10 離心 15 分鐘，除去細胞碎片，懸浮液再以 3000 rpm，10 離心 20 分鐘，沉澱物，再以 1xTE 緩衝劑沖散，此即是含核多角體的懸浮液，以 35-56%(W/W) 蔗糖密度階梯離心，74,000 xg，4 離心 30 分鐘後，收集所有核多角體集中帶，並加入二次蒸餾水稀釋 3 倍，然後用 3500 rpm，30 分鐘將它沈澱下來，即得純化的 SpeiNPV 及 SpltNPV 之核多角體。另外 PenuNPV、LyxyNPV 和 AcMNPV-TWN₄ 等三種經純化之核多角體乃是由臺灣大學昆蟲系王重雄教授提供，其中 AcMNPV-TWN₄ 系是由甜菜夜蛾體內所分離出之 AcMNPV 分離株 (Wang *et al.*, 1992)。

二、核多角體病毒粒子之純化

將純化所得之核多角體以 1xTE 緩衝劑稀釋後加入 3xDAS 液 (diluted alkaline solution; 0.3 M Na₂CO₃, 0.5 M NaCl, 30 mM EDTA, pH 10.9), 在室溫下震盪 15-20 分鐘後於顯微鏡下鏡檢, 待核多角體完全溶解, 再以 35-65%蔗糖密度階梯離心, 74,000 xg, 4 離心 60 分鐘, 收集所有病毒粒子集中帶, 並加入二次蒸餾水稀釋 3 倍, 然後用 74,000 xg, 30 分鐘將病毒粒子沈澱下來, 再以 1xTE 緩衝劑沖散, 保存在 4 。

三、病毒基因組 DNA 之萃取

取 1 ml 純化之核多角體病毒粒子, 加入 1/10 體積的 1M KCl 和 10% SLS 及 10 mg/ml 的 proteinase K, 置於 55 下作用 2-3 小時後, 經酚萃取, 除去溶液中的蛋白質, 再以 2 倍體積的絕對酒精沈澱基因組 DNA (genomic DNA) 並放置於 -20 , 隔夜後取出以 1000 xg 離心 30 分鐘, 使 DNA 完全沈澱下來, 再倒去上清液並加入 70% 的酒精以洗去過多的鹽類, 以 10,000 xg 離心 15 分鐘將 DNA 沈澱下來後, 去上清液並將離心管倒置, 等酒精完全揮發後, 將 DNA 保存在 -20 冰箱備用。

四、病毒基因組 DNA 之限制酶圖譜

病毒基因組 DNA 與 *Eco* R 限制酶 (Bio-Lab) 於 37 , 進行水解反應 1 小時, 於 1.5% 的瓊膠中進行電泳分析, 並在濃度 1 mg/ml 的溴化乙錠 (ethidium bromide) 溶液中進行 DNA 染色反應, 其 DNA 片段大小的測定乃是採用 Alpha Innotech Corporation 的 IS-1000 數位影像處理分析系統 (IS-1000 Digital Imaging System), 此系統依 Rf 值之原理推算出 DNA 片段大小

的分子量。

五、聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

合成 *polh* 基因所使用的引子 35 和 36 乃是依據已發表之 NPV 病毒中高相似性的 *polh* 基因序列所設計 (Chou *et al.*, 1996), 其序列如下:

引子 35: AC(T/C) TA(T/C) GTG TCA GAC
AAC AAA TA(T/C) TAC AAA

引子 36: GG(T/C) GCG TC(T/G) GG(T/C)
GCA AA(T/C) TC(T/C) TT (A/T)
AC(T/C) TT(A/G) AA

其 PCR 反應為: 在 100 μ l 之 PCR 反應液中含 100 ng 的病毒基因組 DNA 模板, 並加入引子 35 和 36 各 10 pM, 及 200 μ M 的 dNTP 和 1xPCR 反應之緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH9, 50mM KCl, 1.5 mM Mg Cl₂, 0.1% Triton X-100) 和 2.5 units 的 *Taq* polymerase (Promega)。其 PCR 反應溫度和時間設定如下: (1) 變性的溫度為 94 , 1 分鐘 (2) 接合的溫度為 45 , 1 分鐘 (3) 延伸的溫度為 72 , 3 分鐘 (4) 依前述三步驟重覆反應 30 次後在 72 進行最後延伸反應, 5 分鐘。最後取 10 μ l 的 PCR 反應物, 以 1 % 瓊膠在 0.5X TAE 緩衝液下 (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 8.0) 進行電泳分析。

六、多角體蛋白基因 (*polh*) 定序及分析

經純化回收的 PCR 產物—多角體蛋白基因, 利用 Perkin Elmer 公司所提供的鏈終止序列分析法的套組 (big-dye terminator ready reaction kit) 進行核酸定序反應, 反應後的核酸混合物, 再以 DNA 定序儀 (biosystems 377 DNA sequencer) 定序出

多角體蛋白基因中的碳鹼基順序(此核酸定序乃委託國立彰化師範大學生物系)。有關核多角體病毒之多角體蛋白基因(*polh*)的序列分析及親源性分析所使用的軟體為 Dnasis 組裝軟體(UPGMA method)。

七、限制酶片段多型性分析 (Restriction fragment length polymorphisms, RFLP)

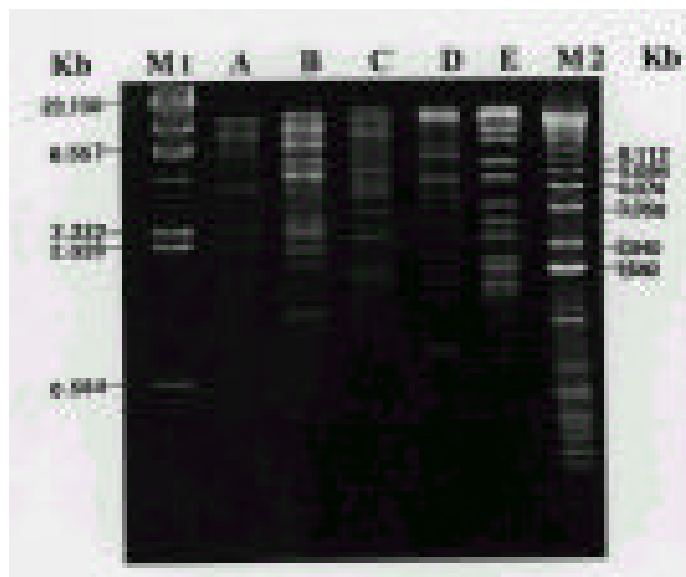
經核酸純化回收套組(GFX-PCR kit; pharmacia)所純化的 PCR 產物(*polh* 基因片段)於 37 °C 下與 *BsuR*、*BspH*、*Hpa* 和 *Mse* 限制酶(Bio-Lab)進行水解反應 1 小時,另 *BsM* 和 *Taq* 限制酶(Bio-Lab)則是在 55 °C 和 65 °C 下進行水解反應,1 小時,經限制酶水解後的 DNA 片段再以 1.2% 的瓊膠進行電泳分析,並在濃度 1 mg/ml 的溴化乙錠溶液中進行 DNA 染色反應,其

DNA 之片段大小的測定則是以 100 bp DNA marker (promega)為標準,採用 IS-1000 系統測定。

結 果

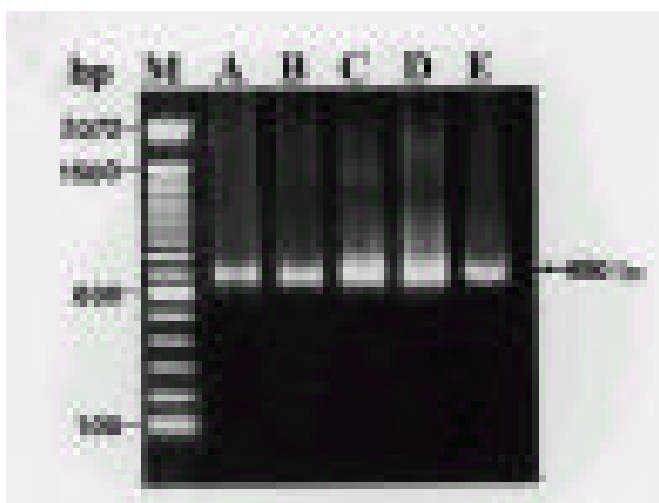
一、病毒基因組 DNA 之限制酶圖譜分析

將純化所得之 SpeiNPV、SpltNPV、PenuNPV、LyxyNPV 和 AcMNPV-TWN₄ 等病毒的基因組 DNA 與 *EcoR* 限制酶進行水解反應,發現這五種病毒各具有獨特的基因組之 *EcoR* 限制酶圖譜(圖一),故藉此圖譜即可清楚分辨此五種核多角體病毒。其分子量約在 96-128kbp 之間,其中以 SpltNPV 的基因組之分子量最大,約 128 kbp,而 AcMNPV-TWN₄ 的基因組之分子量最小,約 96kbp。



圖一 五種核多角體病毒基因組 DNA 之 *EcoR* 限制酶圖譜(A)AcMNPV-TWN₄ (B) SpltNPV (C) SpeiNPV (D) PenuNPV 及(E) LyxyNPV, 分子量的估計標準為 (M1) *Hind* III 的 DNA marker 及 (M2) 1Kb DNA marker (Bio-Lab)。

Fig. 1 Ethidium bromide-stained agarose gel of genomic DNA from five nucleopolyhedroviruses digested with *EcoR*I. (A) AcMNPV-TWN₄, (B) SpltNPV, (C) SpeiNPV, (D) PenuNPV, (E) LyxyNPV. (M1) is *Hind* III-digested lambda DNA size marker, (M2) is 1Kb DNA size marker (Bio-Lab).



圖二 五種核多角體病毒聚合酶鏈鎖反應之增幅的多角體蛋白基因(*polh*)片段(A)AcMNPV-TWN₄ (B) SpItNPV (C) SpeiNPV (D) PenuNPV 及(E) LyxyNPV (M) DNA marker, 指針表示處為 680bp 的增幅片段。

Fig. 2 The *polh* PCR products of 5 nucleopolyhedroviruses. Lane A,B,C,D,E and F are AcMNPV-TWN₄, SpItNPV, SpeiNPV, PenuNPV and LyxyNPV, respectively. M is DNA marker. Arrow shows PCR products, about 680 bp.

二、多角體蛋白基因(*polh*)序列分析

根據桿狀病毒之 *polh* 基因中相似性較高的區域，所設計的一組引子 35 和 36(Chou et al., 1996)，即可大量增幅此五種 NPV 病毒之 *polh* 基因片段，其長度約 680bp(圖二)。將此五種 NPV 病毒的 *polh* 基因片段進行核酸定序，經編輯(editing)整理後各取 606bp 進行 DNA 序列分析比較(圖三)，其分析結果 SpeiNPV、SpItNPV、LyxyNPV 及 AcMNPV-TWN₄ 的 *polh* 基因片段分別與 PenuNPV 的 *polh* 基因片段有 70.2%，65.6%，59.9% 和 58.3% 的鹼基相似性(圖四)。SpeiNPV 則是分別與 SpItNPV、LyxyNPV 和 AcMNPV-TWN₄ 有 66.6%，60.2%，60.4% 的相似性，另，LyxyNPV 和 AcMNPV-TWN₄ 與 SpItNPV 的 *polh* 基因片段則是有 58.0% 和 59.1% 的相似性，而 LyxyNPV 和 AcMNPV-TWN₄ 的 *polh* 基因片段之相似性則是 58.9% (以上經 Dnasis 軟體分析之結果未編製成親源樹狀圖)。

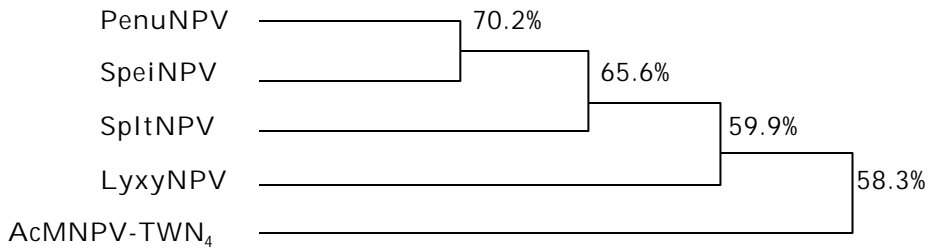
三、限制酶片段多型性 (RFLP) 分析

依 PenuNPV 之 *polh* 基因的定序分析結果，選擇了 *BsuR*、*BspH*、*BsiW*、*Hpa*、*Mse* 和 *Taq* 等六種限制酶對此五種 NPV 病毒的 *polh* 基因片段進行水解反應。其實驗結果依 *BsuR* 限制酶圖譜即可將此五種 NPV 明顯地區分(圖五 A)，又參照 *BsuR* 和 *BspH* 的限制酶圖譜(圖五 A、C)之分析結果，則此五種 NPV 將可被歸納為三群，其 PenuNPV 被列為第一群。另，SpItNPV、SpeiNPV 和 LyxyNPV 此三種病毒則編列為第二群。因為，此三種病毒所呈現之 *BsuR* 和 *BspH* 的限制酶圖譜模式均較相似。而 AcMNPV-TWN₄ 的 *BsuR* 和 *BspH* 限制酶圖譜模式與其它四種 NPV 均不相似，故編列和為第三群。因此 *BsuR* 和 *BspH* 二限制酶圖譜均可用來鑑定 PenuNPV 和 AcMNPV-TWN₄ 此二種病毒。換言之，利用此 *BsuR* 和 *BspH* 二限制酶圖譜即可區分 PenuNPV 和



圖三 五種核多角體病毒 *Polh* 基因片段(680bp)序列分析比較五種核多角體病毒之 *polh* 基因片段(680bp)之序列，其各序列中的和 N 代表之意義為相同及未確定之碳鹼基。另，*Autographa californica* MNPV-TWN₄，*Spodoptera litura* NPV，*Spodoptera exigua* NPV，*Perina nuda* NPV，*Lymantria xyliana* NPV 則分別簡寫為 Ac, Splt, Spei, Penu, Lxyx。

Fig. 3 Comparison of amplicon's sequences of polyhedrin genes(680bp) from five nucleopolyhedroviruses by PCR with 35/36 primers. Dots and N indicate that nucleotide sequence with homology and undetermined type, respectively. Abbreviations: Ac : *Autographa californica* MNPV-TWN₄, Splt : *Spodoptera litura* NPV, Spei : *Spodoptera exigua* NPV, Penu : *Perina nuda* NPV, Lxyx : *Lymantria xyliana* NPV.



圖四 五種核多角體病毒親源分析圖譜

Fig. 4 Phylogeny of five nucleopolyhedroviruses based on the amplicon's sequences of polyhedrin gene by PCR with 35/36 primers and analyzed by DnasisII program(UPGMA method).

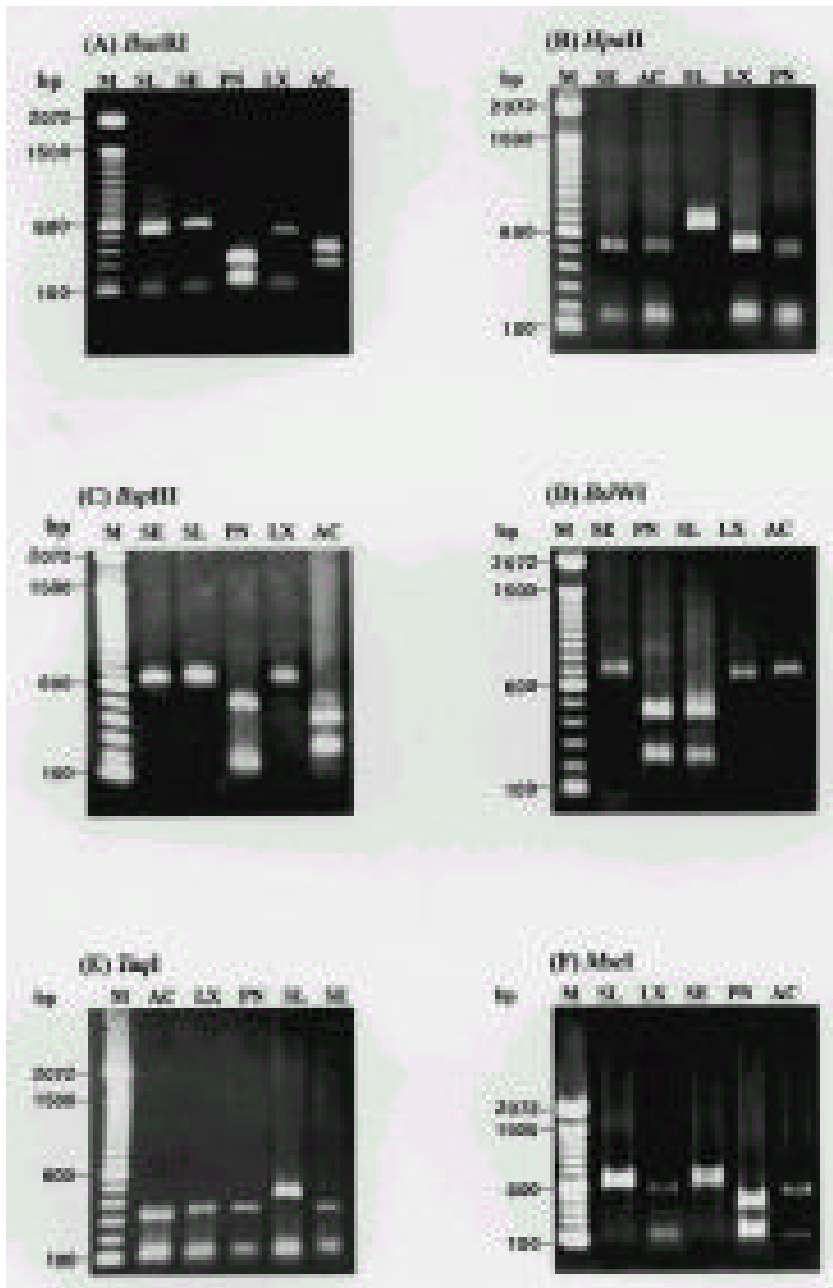
AcMNPV-TWN₄ 與 SplItNPV、SpeiNPV 和 LyxyNPV。

其第二群中的 SplItNPV 則是以 *Hpa* 限制酶圖譜即可與其它四種 NPV 病毒作明顯的區分(圖五 B)，因 SplItNPV 的 *polh* 基因序列中並無 *Hpa* 限制酶的切割位置，而 PenuNPV、LyxyNPV、AcMNPV-TWN₄ 及 SpeiNPV 的 *polh* 基因序列中則均有 *Hpa* 限制酶的切割位置，所以 *Hpa* 限制酶圖譜用來鑑定 SplItNPV 將具有很高的特異性。另，第二群中的 SpeiNPV 與 LyxyNPV 兩病毒則可利用 *MseI* 限制酶作區分(圖五 F)，因 SpeiNPV 的 *polh* 基因序列中並無 *MseI* 限制酶的切割位置，而在 LyxyNPV 之 *polh* 基因序列中的第 178 位置即為 *MseI* 限制酶的切割位置，故配合此 *Hpa* 和 *MseI* 二限制酶圖譜的分析結果，即可區分和鑑定同歸屬為第二群的 SplItNPV、SpeiNPV 和 LyxyNPV 此三種病毒。另外 *BsiW* 和 *Taq* (圖五 D、E)之限制酶圖譜亦可輔助區分此五種 NPV 病毒。表(一)歸納上述六種限制酶對此五種 NPV 病毒的 *polh* 基因之切割位置。

討 論

由於核多角體病毒(NPV)具備多項可成為生物藥劑的先決條件，故目前已被廣泛的應用在農業害蟲防治的研究開發上(Entwistle, 1983; Agathos, 1991)。而有關 NPV 殺蟲劑之研發能否成功，則是以對各 NPV 之間的親源關係和寄主範圍的瞭解是否透徹為關鍵(Chen *et al.*, 1998)。因此種源的鑑定對 NPV 殺蟲劑的研發是十分重要的依據，但近幾年來對各 NPV 之間的親源關係、寄主範圍和病毒種源的鑑定進展均十分的有限，故目前專家學者均將 NPV 的研究焦點集中在這些問題層面上，希望藉此以加強對 NPV 病毒結構及功能的認識與瞭解，以期早日解決病毒親源演化的關係和寄主範圍認定上的問題，進而達到成功研發 NPV 殺蟲劑的目標。

NPV 感染寄主蟲體或細胞株的後期，NPV 的多角體蛋白量約為感染的寄主蟲體或細胞株的總蛋白質的 20-50% (Luckow and Summers, 1988)，故 *polh* 基因為一個十分強勢的基因，也由於此原因使得 *polh* 基因和多角體蛋白(polyhedrin)成為研究 NPV 病毒的焦點。於 1986 年 Rohrmann 即以 *polh* 基因的胺基酸序列進行 NPV 親源性分析，其結果發現各 NPV 病毒之間的相似性頗高，其中又以感染鱗翅目昆蟲的 NPV 之間的相似性最高，均有高於 85% 的相似性，因此建議以 *polh*



圖五 多角體蛋白基因之限制酶片段多型性分析圖譜經 PCR 增幅此五種核多角體病毒之多角體蛋白基因，以 *BsuR* (A); *Hpa* (B); *BspH* (C); *BsiW* (D); *Taq* (E)和 *Mse* (F)等限制酶切割之圖譜。M:100 bpDNA marker。

Fig. 5 Restriction endonuclease profiles of polyhedrin gene fragments (PCR products,680 bp) digested with *BsuR* (A); *Hpa* (B); *BspH* (C); *BsiW* (D); *Taq* (E); and *Mse* (F) endonuclease, respectively. M:DNA marker (promega). Abbreviations: SE : *Spodoptera exigua* NPV, SL : *Spodoptera litura* NPV, PN : *Perina nuda* NPV, AC : *Autographa californica* MNPV-TWN₄, LX : *Lymantria xyliana* NPV.

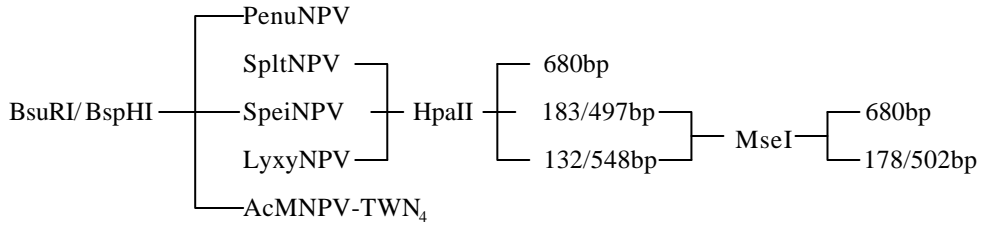
基因的胺基酸序列來分析病毒在親源演化上的發展和寄主範圍的關係，同時也指出各病毒的 *polh* 基因序列之間均有著相當程度的相似性(Rohrmann, 1986)。在本文中分析此五種 NPV 病毒的 *polh* 基因片段之序列(圖三)，亦得到類似的結果，此五種 NPV *polh* 基因片序列之相似性均高，其中又以 PenuNPV 與 SpeiNPV 在 *polh* 基因片段之序列上的相似性最高，二者之間有 70.2% 的相似性，而 SpeiNPV 和 SpltNPV 之間亦有 66.6% 的相似性。另，AcMNPV-TWN₄ 雖是由甜菜夜蛾體內所分離出，增殖於 IPLB-SF21AE 細胞(Wang et al., 1992)原定名為 SeNPV，後來證明應屬 AcMNPV，於是易名為 AcMNPV-TWN₄。

經比對其 *polh* 基因發現與 SpeiNPV 之 *polh* 基因的相似性並不大，而是與野生型之 AcMNPV 的 *polh* 基因(Iddekinge et al., 1983)有著 96% 極高的相似性。故依此結果可推測此 AcMNPV-TWN₄ 的 *polh* 基因產物多角體蛋白所扮演的角色可能只是病毒晚期表現的主要結構蛋白，與維續病毒在自然界的永續存活有關，而與病毒的寄主選擇性的關係不大。經比較數種已發表的 NPV 之 *polh* 基因序列發現 PenuNPV 與花旗松毒蛾 (*Orgyia pseudotsugata* NPV; OpNPV) (Leisy et al., 1986) 有 95% 相似性，此結果符合 Chou et al., (1996) 所發表之結果，SpltNPV 與海灰翅夜蛾 (*S. littoralis* NPV; SpliNPV) (Croizier et al., 1994) 有 91% 相似性，LyxyNPV 與吉普賽舞蛾 (*Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus; LdNPV) (Smith et al., 1988) 有 92% 相似性，由此可見這些 NPV 的 *polh* 基因序列之相似性均很高，故 *polh* 基因序列並不適合用來區分上述親緣性極高的 NPVs。

過去在 NPV 鑑定方面，乃是憑藉著病毒在生物學、免疫學、形態學的特性來進行鑑定，但這些方法不確定因素頗高。且根據已發表的研究文獻指出(Smith and Summers, 1987)，在所有的鑑定方法中只有限制酶圖譜分析法可用於鑑定不同種或親源性相近的 NPV。故本文選擇一般實驗室常用的 *EcoR*

限制酶與這五種本土性 NPV 進行切割反應，實驗結果與前人研究結果相符合，各 NPV 皆可經由各自獨特的基因組之 *EcoR* 限制酶圖譜(圖一)，而與其它四種 NPV 區別。但當 NPV 的 DNA 在微量的情況下，則無法在凝膠上經由溴化乙錠的染色而呈現清晰的 *EcoR* 限制酶切割片段。此現象在自然感染下亦或是持續性的感染下常會發生此問題 因檢體量上的限制而導致分類與鑑定上的困難，面對此類的問題，目前在微生物系統分類學的研究上常利用 PCR-RFLP 技術來克服(Ristaino et al., 1998; Hyun et al., 1998)，因為 PCR 反應可大量的增幅所欲探討之 DNA 分子標示 (DNA molecular marker) 的樣本數，以提高對此 DNA 分子標示的偵測靈敏度。另一方面，RFLP 技術則可適用於探討 DNA 序列的多樣性，以區分不同種源和親源性相近的物種。因此 PCR-RFLP 技術是一個兼具靈敏度和特異性的方法 (Loxdale and Lushai, 1998)。所以本試驗採用 PCR-RFLP 技術以鑑定與區分此五種本土性 NPV，並依據上述六種限制酶圖譜之分析結果，可將此五種 NPV 的鑑定流程歸納如次頁。

所以憑藉著不同的限制酶圖譜分析(表一)即可對此五種不同的 NPV 病毒達到鑑定與區分的目的。故此 PCR-RFLP 技術除了可提供一套更快速且簡便的偵測系統以鑑定此五種台灣分離的本土性 NPV 病毒外，還可解決限



表一 不同的限制酶對五種核多角體病毒之多角體蛋白基因增幅片段切割後之片斷長度

Table 1. The length of amplicon's restriction fragments (bp) of 5 nucleopolyhedro-viruses

| Taxonomic group and species | <i>BsuRI</i> | | <i>HpaII</i> | | <i>BspHI</i> | <i>BsiWI</i> | | <i>TaqI</i> | | <i>MseI</i> | |
|-----------------------------|--------------|---------|--------------|----------|--------------|--------------|---------|-------------|-----|-------------|-----|
| | GG | CC | C | CGG | T | C | GTACG | T | CGA | T | TAA |
| Group I | | | | | | | | | | | |
| PenuNPV | 380,220,80 | | 548, 132 | | 485, 195 | | 422,258 | 390,190 | | 520, 160 | |
| Group II | | | | | | | | | | | |
| SpeiNPV | | 600,80 | | 497, 183 | 680 | | 680 | 390,190 | | 680 | |
| SpltNPV | | 580,100 | | 680 | 680 | | 422,258 | 490,190 | | 680 | |
| LyxyNPV | | 586,94 | | 548, 132 | 680 | | 680 | 390,190 | | 178, 502 | |
| Group III | | | | | | | | | | | |
| AcNPV-TWN ₄ | | 324,356 | | 548, 132 | 393,287 | | 680 | 380,190 | | 178, 502 | |

制酶圖譜分析法的缺點 無法偵測微量 NPV 的問題，同時還兼具限制酶圖譜分析法的優點 可從事病毒親源性的分析、種類的鑑定及解釋 NPV 複合性感染和偵測 NPV 病毒變異種(mutant)。所以 PCR-RFLP 技術應用在大量養蟲及田間採集蟲源時，可預作偵測蟲隻是否受到 NPV 病毒感染和何種 NPV 病毒感染，以確保供試昆蟲的健康。因此，PCR-RFLP 技術應用在 NPV 的鑑定和研究時，將會是一個相當實用且有意義的方法。

誌 謝

本研究承石振宏先生、王簾讀先生、段淑人小姐、吳秋櫻小姐提供技術上之卓見及

郭雪小姐、林秀昭小姐、蘇珍桂小姐、林月美小姐之協助，使得研究順利完成，在此致上由衷的感謝。

引用文獻

Agathos, S. N. 1991. Mass production of viral insecticides. *In: Biological Control of Pests and Vectors.* Mar-amorosch, Ed., CRL Press, Boca Rator, FL pp278.

Chen, C.-J, M. E. Quentin, L. A. Brennan, C. Kukel, and S.M. Thiem. 1998. *Lymantria dispar* nucleopolyhedro-virus hrf-1 expands the larval host

- range of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. J. of Virol. 72: 2526-2531.
- Chou, C.-M., C.-J. Huang, C.-F. Lo, G.-H. Kou, and C.-H. Wang.** 1996. Characterization of *Perina nuda* nucleopolyhedrovirus (PenuNPV). J. Invertbr. Pathol. 67: 259-266.
- Croizier, L. and G. Croizier.** 1994. Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Spodoptera littoralis* multiple nucleocapsid. Biochim. Biophys. Acta 1218: 457-459.
- Entwistle, P. F.** 1983. Control of insect by virus diseases. Biocon. Ne. Info. 4: 203-225.
- Falcon, L. A. and R. T. Hess.** 1985. Electron microscope observations of multiple occluded virions in the granulosis virus of the codling moth, *Cydia pomonella*. J. of Invertebr. Pathol. 45: 356-359.
- Hohmann, A. W., and P. Faulkner.** 1983. Monoclonal antibodies to baculovirus structural proteins: determination of specificities by western blot analysis. Virology 125: 432.
- Hyun, J.-W., and C. A. Clark.** 1998. Analysis of *Fusarium lateritium* using RAPD and rDNA RFLP techniques. Mycol. Res. 102: 1259-1264.
- Iddekinge, H. V., G. E. Smith., and M. D. Summers.** 1983. Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology 131: 561-565.
- Kozlov, E. A., N. V. Rodnin., T. L. Levitina., N. M. Gusak., N. F. Radomskj., and L. J. Palchikovskaya.** 1992. The amino acid sequence determination of a granulosis and a polyhedrin from two baculoviruses infecting *Agrotis segetum*. Virology 189: 320-323.
- Liu, H. S., and R. F. Hou.** 1983. Electron microscopic observations on infection of nuclear polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*, Proc. Natl. Sci. Council. ROC. 7:51.
- Leisy, D., G. Rohrmann, and G. Beaudreau.** 1986. The nucleotide sequence of the polyhedrin gene region from the multicapsid baculovirus of *Orgyia pseudotsugata*. Virology 153: 280-288.
- Loxdale, H. D., and G. Lushai.** 1998. Molecular markers in entomology. Bull. Entomol. Res. 88: 577-600.
- Luckow, V. A., and M. D. Summers.** 1988. Trends in the development of baculovirus expression vector. Bio/Technology 6: 47-55.
- Maeda, S., and M. Majima.** 1990. Molecular cloning and physical mapping of the genome of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. J. Gen. Virol. 71: 1851-1855.
- Ristaino, J. B., M. Madritch, C. L. Trout, and G. Parra.** 1998. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. Appl. Environ.

Microbiol. 64: 948-954.

Rohrmann, G. F. 1986. Baculovirus evolution. In "The Biology of Baculoviruses", vol 1. B. A. Federici and R. R. Granados, Ed., CRC Press. Boca Raton, pp.203-215.

Smith, I. R. L., J. D. Podgwaite, and H. A. Wood. 1988. Physical map and polyhedrin gene sequence of *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. Gene 71: 97-105.

Smith, G. E. and M. D. Summers. 1981. Application of a novel radioimmunoassay to identify baculovirus structural proteins that share interspecies antigenic determinants. J. Virol. 39: 125-131.

Smith, G. E., and M. D. Summers. 1987. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. Virology 89: 517-527.

Tanada, Y., R. T. Hess, and E. M. Omi. 1982. Unique virus morphogenesis and cytopathology of a baculovirus (hypertrophy strain) in larva of the armyworm. *Pseudaletia unipuncta*. J. Invertebr. Pathol. 40: 197-203.

Wang, C-H, H-W. Hung, G.-H. Kou, and C.-F. Lo. 1992. The characterization of clonal cell strains derived from established IPLB-SF 21AE Insect cell Line. Acta Zoologica Taiwanica 3: 35-46.

Wieggers, F. P. and J. M. Vlak. 1984 . Physical map of the DNA of a *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus variant isolated from *Spodoptera exigua*, J. Gen. Virol. 65: 2011-2019.

收件日期：1999年12月16日

接受日期：2000年1月7日

Detection and Identification of Five Nucleopolyhedrovirus Isolates from Taiwan by PCR-RFLP

Suey-Sheng Kao* and Tzyy-Rong Jinn Biopesticide Department, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute,
Council of Agriculture, Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.

Chuy-Hsiung Wang Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

Five nucleopolyhedrovirus (NPV) isolates from Taiwan: *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SpeiNPV), *Spodoptera litura* NPV (SpltNPV), *Perina nuda* NPV (PenuNPV), *Lymantria xyliana* NPV (LyxyNPV) and a isolate of *Autographa californica* NPV (AcMNPV-TWN₄) from *S. exigua* were used for this study. *EcoR* profiles of genomic DNAs of five NPVs gave a clear pattern for identification, this result showed that *EcoR* profiles were sufficient to identify these NPVs. A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) technique was used for rapid detecting and identifying NPVs which were even at low concentration. A set of primers, designated as primers 35 and 36 (Chou *et al.*, 1996) was used for amplification of polyhedrin gene from five NPVs by PCR and the size of amplicons was 680 bps. These polyhedrin gene fragments were sequenced and were then digested with *BsuR*, *BspH*, *BsW*, *Hpa*, *Mse* and *Taq* DNA restriction endonuclease, respectively. The *BsuR* patterns of amplicons gave a completely different pattern from each other, and the profiles of other selected restriction enzymes could be regarded as a complement data for *BsuR* for detection and identification. It is suggested that PCR-RFLP technique is a feasible method for rapid detection and identification of five NPVs isolated from Taiwan.

Key words: nucleopolyhedrovirus (NPV), polymerase chain reaction (PCR), polyhedrin gene (*Polh*), restriction fragment length polymorphisms (RFLP).