



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Transduction of AcMNPV Nonpermissive Cells as a Non-lytic Baculovirus Expression System 【Research report】

利用AcMNPV非寄主細胞之侷限性發展非裂解性桿狀病毒蛋白表現系統【研究報告】

Tzong-Yuan Wu*, Yu-Chan Chao and Jin-Ching Lee
吳宗遠* 趙裕展、李景欽

*通訊作者E-mail: tywu@cycu.edu.tw

Received: 2003/10/30 Accepted: 2004/02/09 Available online: 2004/03/01

Abstract

Activities of viral and insect promoters constructed in an *Autographa californica* multiple capsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) were tested in AcMNPV permissive-SF21AE cells and -nonpermissive BmN4 and SL2 cells. Recombinant AcMNPVs containing reporter genes (green fluorescence protein egfp gene) under the control of an early promoter (IE1hr5), a late promoter (VP39), a very late promoter (P10) of AcMNPV, and a heat shock promoter (hsp70), derived from *Drosophila melanogaster*, were constructed, respectively. In BmN4 and SL2, late and very late promoter activities were inhibited, but they expressed the early and hsp70 promoters. These results indicate that BmN4 and SL2 cells support the absorption, entry, and early gene expression of recombinant AcMNPVs. Interestingly, we found that the hsp70 promoter- containing recombinant AcMNPV expressed egfp at least 8 days after infection; this result suggests that SL2 cells can serve as host cells for recombinant AcMNPV in non-lytic baculovirus expression systems.

摘要

分析帶有加州苜蓿夜蛾核多角體病毒(*Autographa californica* multiple capsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)早期啟動子IE1hr5、晚期啟動子VP39、最晚期啟動子P10及源自果蠅的hsp70啟動子驅動egfp 螢光蛋白基因的重組AcMNPV病毒分別感染其寄主細胞SF21和非寄主細胞BmN4與SL2。顯示雖然BmN4和SL2可以抑制晚期基因的表現，但對早期基因如IE1和hsp70啟動子卻無明顯的抑制現象。因此BmN4和SL2細胞對AcMNPV之吸附性、進入及早期基因的表現可提供完整的支持。而源自果蠅的hsp70啟動子在AcMNPV感染SL2細胞後可持續的表現EGFP報導基因最少可維持8天之久，因此應可利用果蠅的hsp70啟動子和AcMNPV非寄主細胞SL2建立非裂解性桿狀病毒表現系統。

Key words: AcMNPV, nonpermissive cells, non-lytic baculovirus expression system.

關鍵詞: 加州苜蓿夜蛾核多角體病毒、非寄主細胞、非裂解性桿狀病毒表現系統

Full Text: [PDF \(0.72 MB\)](#)

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

利用 AcMNPV 非寄主細胞之侷限性發展非裂解性桿狀病毒蛋白表現系統

吳宗遠* 中原大學生物科技學系 桃園縣中壢市普忠里普仁 22 號
趙裕展 李景欽 中央研究院分子生物研究所

摘 要

分析帶有加州苜蓿夜蛾核多角體病毒(*Autographa californica* multiple capsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)早期啓動子 IE1hr5、晚期啓動子 VP39、最晚期啓動子 P10 及源自果蠅的 hsp70 啓動子驅動 egfp 螢光蛋白基因的重組 AcMNPV 病毒分別感染其寄主細胞 SF21 和非寄主細胞 BmN4 與 SL2，顯示雖然 BmN4 和 SL2 可以抑制晚期基因的表現，但對早期基因如 IE1 和 hsp70 啓動子卻無明顯的抑制現象。因此 BmN4 和 SL2 細胞對 AcMNPV 之吸附性、進入及早期基因的表現可提供完整的支持。而源自果蠅的 hsp70 啓動子在 AcMNPV 感染 SL2 細胞後可持續的表現 EGFP 報導基因最少可維持 8 天之久，因此應可利用果蠅的 hsp70 啓動子和 AcMNPV 非寄主細胞 SL2 建立非裂解性桿狀病毒表現系統。

關鍵詞：加州苜蓿夜蛾核多角體病毒、非寄主細胞、非裂解性桿狀病毒表現系統

前 言

桿狀病毒表現系統(baculovirus expression vector system, BEVS)是一以昆蟲細胞來生產外源蛋白的真核表現系統。雖然有許多不同的桿狀病毒，但以加州苜蓿夜蛾核多角體病毒 (*Autographa californica* multiple capsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)所發展的 AcMNPV 桿狀病毒表現系統最廣為使用和開發(Possee, 1997)。AcMNPV 可在其寄主細胞，如 SF (*Spodoptera frugiperda*, 細分為 SF9 和 SF21 細胞株)和擬尺蠖

(*Trichoplusia ni*) Tn368 細胞株，大量的繁衍。而當 AcMNPV 感染其寄主細胞時，病毒基因的表現可依表現之時間分為早期(early)，晚期(late)和最晚期(very late) 3 個時期 (Morris and Miller, 1992)。AcMNPV 早期基因的表現，如 IE1 基因，是由寄主細胞之 RNA polymerase II 所執行，可受 α -amanitin 抑制。晚期基因，如 VP39，和最晚期基因，如 P10 和 polyhedrin，則需病毒 DNA 複製完成後(約感染 20-24 小時)始啓動，為 AcMNPV 所攜帶之 RNA polymerase 主導且不受 α -amanitin 影響。在晚期基因表

*論文聯繫人
e-mail: tywu@cycu.edu.tw

現後，出芽型 AcMNPV 病毒(budded form virus, BV)即組裝完成並釋放到細胞外，而最晚期基因 P10 和 polyhedrin 的表現對 BV 型式之 AcMNPV 的產生並無影響，而是對在蟲體間傳播的包涵體式(occlusion form virus, OV) AcMNPV 所必需(Smith *et al.*, 1983)，因此欲利用 BEVS 生產外源蛋白時，大都以 homologous recombination 的形式將外源蛋白基因置換 AcMNPV 病毒 DNA 上 polyhedrin 基因或 P10 基因，並以這兩種晚期啟動子在昆蟲細胞中驅動外源蛋白的生產。

自 1983 年 Smith 等人發展 BEVS 至今，已有數百種以上的外源蛋白以重組 AcMNPV 病毒自昆蟲細胞成功的生產。利用 BEVS 生產外源蛋白的優點如下：(1)昆蟲細胞為真核表現系統，許多在原核系統中所缺乏的後轉譯修飾作用(post-translational modification)，如醣基化(glycosylation)，磷酸化(phosphorylation)，烷基化(acylation)等大都可在昆蟲細胞中進行。雖然有些較複雜的醣基化作用，如在哺乳動物細胞表現系統中進行的 biantennary N-linked oligosaccharide 修飾，無法在 SF 或 Tn 等常用的昆蟲細胞中進行，但最近的研究顯示，以 *Estigment acrea* 昆蟲細胞株卻可達到和哺乳動物細胞同樣的醣基化作用(Ogonah *et al.*, 1996)。(2) AcMNPV 的 polyhedrin 啟動子和 P10 啟動子皆是強啟動子，在重組 AcMNPV 病毒感染昆蟲細胞 72 小時後，外源蛋白的含量可達所有細胞蛋白的 30% 以上，遠較大腸桿菌和酵母菌的 1-10% 或是哺乳動物細胞的 1% 為高，這對外源蛋白的純化有很大的裨益。而且用 BEVS 生產外源蛋白時，產量通常可達 1-500 mg/l。(3)昆蟲細胞的培養並不需要價昂的 CO₂ 培養箱，且可懸浮培養，因此在生產價高之醫療用蛋白時，成本遠較哺乳動物細胞表現系統

為低。新進開發出的 High Five 昆蟲細胞株，更可不用昂貴的血清培養，而使生產外源蛋白的成本更為降低 (Possee, 1997)。基於上述的優點，BEVS 是目前在生技產業或分子生物實驗室中最常用的外源蛋白表現系統之一。

BEVS 迄今近 20 年的開發與廣泛的使用，也累積了許多缺點和值得進一步研發的方向。Jarvis 於 1993 年首先注意到，若以 BEVS 生產核蛋白(nuclear proteins)或細胞質蛋白(cytoplasmic proteins)時產量極豐，但若是欲生產之外源蛋白為需經由內質網再傳送到高基氏體以完成合成之分泌性蛋白，則產量通常極低(Jarvis, 1993)。隨後對於分泌性抗體(Hsu *et al.*, 1996)，細胞表膜受器蛋白(Chazenbalk and Rapoport, 1995)之研究顯示，當以重組 AcMNPV 急性感染(productive infection)昆蟲細胞生產外源蛋白之裂解性 BEVS (lytic BEVS)進行外源蛋白生產時，這些蛋白的表現量都極低。Chazenbalk 和 Rapoport (1995)則進一步發現若以早期啟動子取代傳統之最晚期 polyhedrin 啟動子則可以使膜蛋白產量提高。故當以最晚期強啟動子，如 polyhedrin 啟動子和 P10 啟動子，做為裂解性 BEVS 驅動外源蛋白生產的啟動子時，一明顯的缺點是 AcMNPV 進行急性感染時，會破壞內質網或高基氏體等後轉譯修飾工作的運作，使得許多分泌性蛋白和膜蛋白無法及時的合成或正確的摺疊，導致晚期強啟動子生產具功能性外源蛋白的能力較早期弱啟動子差(Jarvis *et al.*, 1996)。此因病毒對其寄主細胞進行急性感染所造成的裂解性問題，不僅使 BEVS 不利於生產分泌性蛋白或細胞表膜蛋白，同時，若欲生產之外源蛋白基因含有 intron 時，病毒的裂解式急性感染亦不利此基因體式(genomic sequence)外源蛋白基因的表達，因為在感染之末期，RNA splicing 之

機制可能也被破壞殆盡了(Lu *et al.*, 1997)。除了上述後轉譯修飾和後轉錄修飾 (post-transcriptional modification)的問題外，裂解式 BEVS 的另一缺點為當細胞分解時，許多細胞的蛋白分解酶(protease)會自溶素體(lysosome)釋出，使得後續的蛋白純化工作更加困難。因此，開發早期強啟動子並發展非裂解式 BEVS (nonlytic BEVS)將是一重要的研究方向(Hegedus *et al.*, 1998)。本研究嘗試分析 AcMNPV 的早期啟動子 IE1，晚期啟動子 VP39，和最晚期啟動子 P10 及源自果蠅的 hsp70 啟動子並利用 egfp 螢光蛋白基因做為報導基因在 AcMNPV 寄主細胞 SF21 與非寄主細胞 BmN4 與 SL2 中表現外源基因之情形並揭示可以利用果蠅的 hsp70 啟動子和 AcMNPV 非寄主細胞 SL2 開發非裂解性桿狀病毒表現系統。

材料與方法

一、細胞培養與病毒增殖

AcMNPV 之寄主細胞 SF21 及其非寄主細胞 BmN4(源自家蠶)和 SL2(源自果蠅)係購自 ATCC，此細胞株均培養於 26~28°C 之恆溫箱中。培養液為含 8% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)之 TNM-FH 培養液中，每隔 3 至 4 天繼代一次。

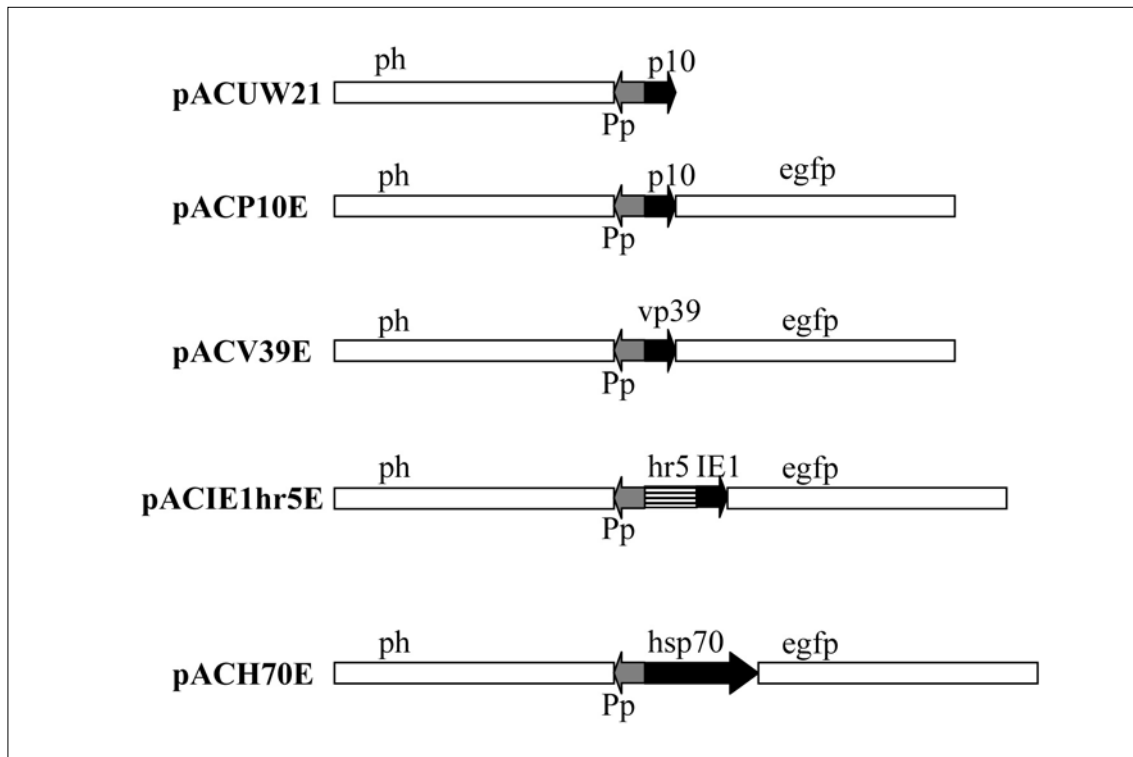
欲增殖病毒時，則將 3×10^6 的 SF21 細胞接種於 T25 培養皿中，待細胞在平台上靜置貼附約 1~2 小時後，吸出培養液，加入 $\text{moi} = 0.1 \sim 0.001$ 之病毒量(體積通常小於 10 μl)，吸附 1 小時後吸出病毒液，再加入 5 ml 之新鮮培養液。於培養 3~4 天後，於倒立螢光顯微鏡下觀察細胞感染狀況並收集細胞培養液，經 2000 rpm 離心 30 分鐘後，收集含病毒之上清液(盡量避免收集到細胞碎片)，並於

4°C 下保存。

二、重組病毒構築

為構築含不同啟動子(IE1, VP39, P10 及 hsp70)及水母螢光 egfp 基因為報導基因之重組病毒，以 pAcUW21 桿狀病毒轉殖載體(transfer vector)為分子選殖載體，其中 IE1 啟動子還包括其上游的增益子(enhancer) hr5。分子選殖之方法及步驟均參考 *Molecular cloning* 一書(Sambrook *et al.*, 1989)。pAcUW21 轉殖載體上含有完整的包涵體基因及啟動因子，而外源基因則以最晚期啟動 p10 驅動，因此我們先將自 pEGFP-c1 載體(購自 Clontech)上的 egfp 基因剪接進 pAcUW21 中，此含 egfp 螢光基因之載體命名為 pAcP10E (Fig. 1)。pAcP10E 再以 XbaI 和 BglII 限制酶處理後，切除 P10 啟動子後，再分別接入果蠅的 hsp70 啟動子、IE1hr5 啟動子和 VP39 啟動子，所得之質體分別命名為 pACH70E、pACIE1hr5E 和 pACV39E (Fig. 1)。其中 hsp70 啟動子和 ielhr5 啟動子剪接自 pki^{h35Hn} 質體(Lee and Chao, 1998)，vp39 啟動子則參考 AcMNPV 晚期基因 VP39 之 DNA 序列(Thiem and Miller, 1989)以聚合酶連鎖反應(PCR)自 AcMNPV 病毒 DNA 增幅而得。病毒 DNA:vAcRP23.LacZ(購自 PharMingen)與上述之轉殖載體分別共轉染到 21AE 細胞株(細胞數約 3×10^5 cells/well 先吸附在 24 圓孔盤上)以產生重組病毒。其中轉殖載體和病毒 DNA 的莫耳數比為 87:1，轉染液體積為 500 μl 且 DNA 總量不超過 1 μg 。待 5~7 天後取出上清液，再以終點稀釋法(end-point dilution)進行重組病毒的單株化。

單株化之病毒株再以前述病毒增殖方法獲得供試病毒液，由於這些重組病毒皆可產生包涵體及螢光，故可以以終點稀釋法測定病毒



圖一 含不同啟動子及 *egfp* 螢光基因之 AcMNPV 轉移載體之構築。

Fig. 1. Construction of transfer vectors containing the *egfp* fluorescence gene driven by different promoters. Pp: polyhedrin promoter, ph: polyhedrin gene; P10: P10 promoter; VP39: VP39 promoter; IE1: IE1 promoter; hr5: hr 5 enhancer; hdp70: hdp70 promoter; egfp: *egfp* gene.

力價。

三、螢光定量分析

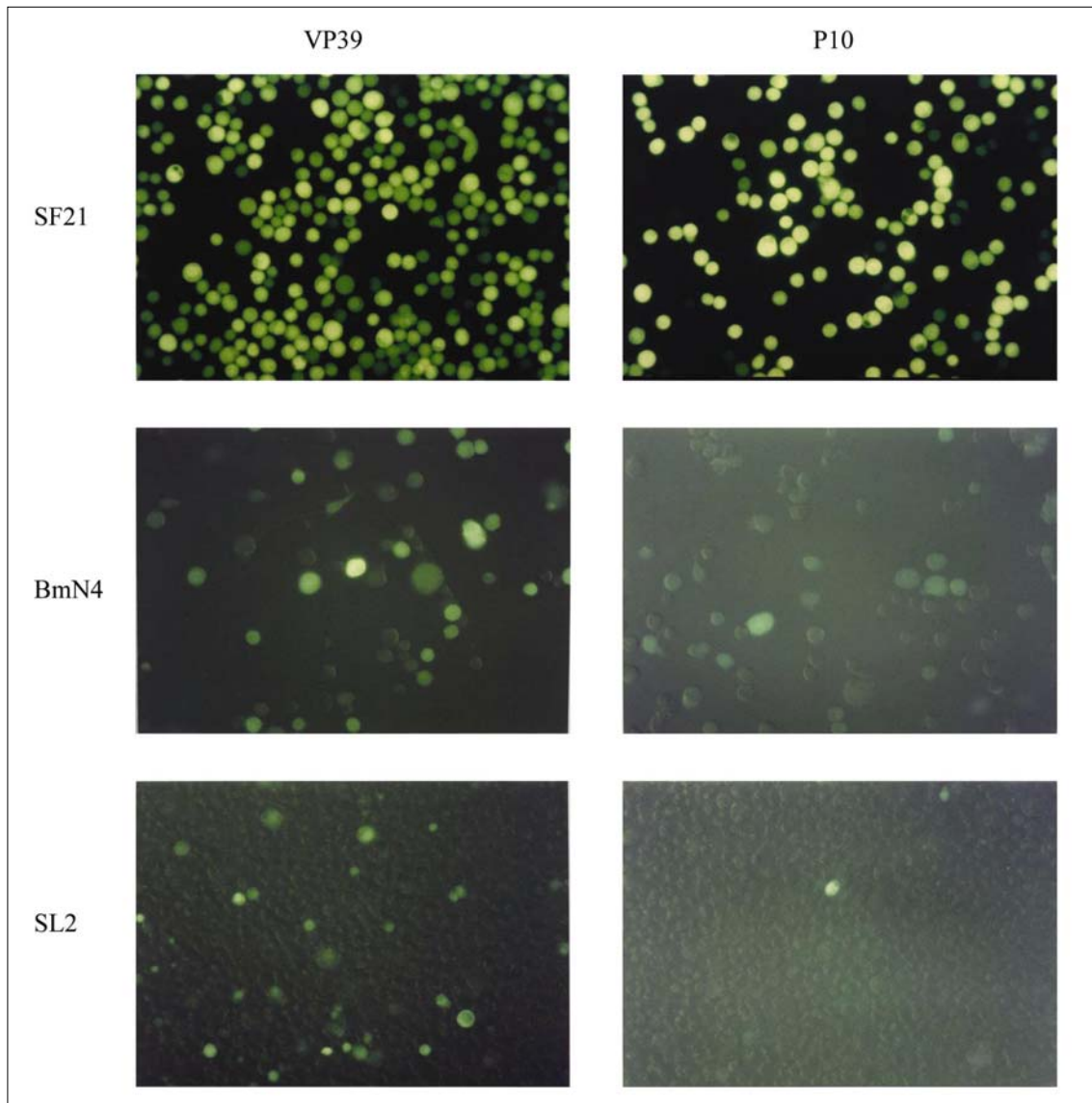
先將各昆蟲細胞株 SF21, BmN4 和 SL2 各約 3×10^5 cells/well, 先吸附在 24 孔盤上, 再以 $moi = 10$ 的病毒液進行感染, 在感染後之特定時間, 以 CytoFluor 2300 (購自 Beckman), 以 485 nm 為激發光, 530 nm 為吸收波長, 靈敏度設為 5 的條件下, 進行螢光的定量分析。

結 果

一、AcMNPV 在其寄主細胞與非寄主細胞中

表現外源基因之定性分析

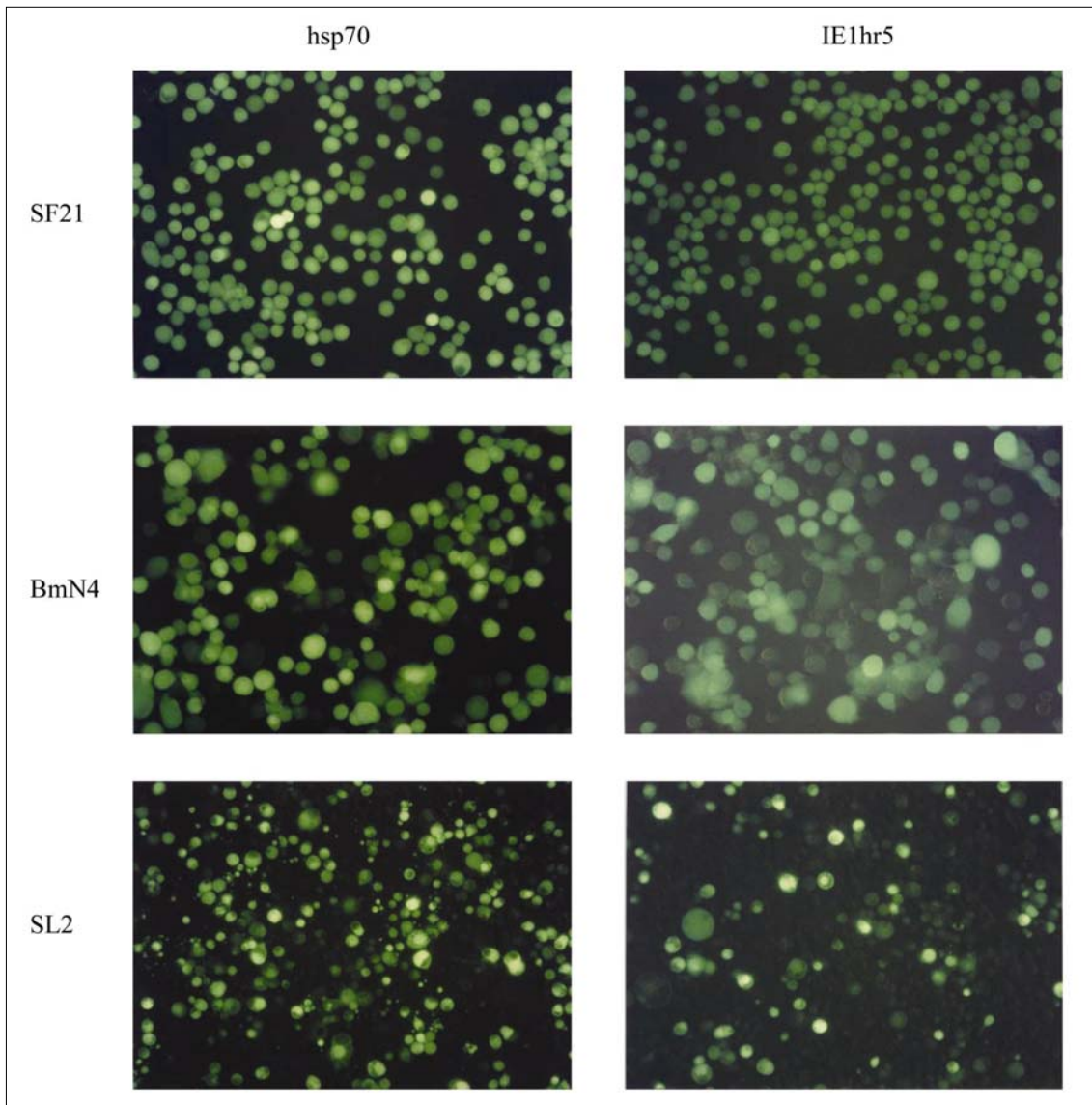
選殖 AcMNPV 的早期啟動子 IE1, 晚期啟動子 VP39, 和最晚期啟動子 P10, 以探討家蠶細胞和果蠅細胞對 AcMNPV 病毒的感受性, 且選殖非 AcMNPV 基因體上的果蠅的 *hsp70* 啟動子做為比較。在這四種啟動子的下游, 分別接上報導基因 *egfp* gene (Fig. 1)。利用螢光顯微鏡, 篩選出在寄主細胞 SF21 中, 表現出綠螢光的重組病毒(如 Fig. 2A, B 第一列所示)。雖然分別帶有早期、晚期、最晚期和 *hsp70* 啟動子及 *egfp* 基因的重組 AcMNPV 病毒在 $moi = 10$ 的條件下, 皆可在 SF21 細胞表現出螢光, 但在 BmN4 和 SL2 細胞中, VP39 晚期啟動子及 P10 最晚期啟動



圖二 A 不同啟動子之重組病毒在 AcMNPV 寄主細胞 SF21 和非寄主細胞 BmN4 與 SL2 表現螢光之定性分析。
 Fig. 2A. *egfp* gene expression in AcMNPV host cells (SF21) and nonpermissive cells (BmN4, SL2) infected with these recombinant viruses (at an moi of 10, 3 d p.i.). The *egfp* gene was respectively driven by the VP39, P10, hsp70 or IE1hr5 promoter.

子在感染後第三天，螢光蛋白的表現活性明顯的低於 SF21 (Fig. 2A)。然而以早期啟動子 IE1hr5 和 hsp70 啟動子驅動之螢光蛋白表現之 BmN4 或 SL2 細胞數則和 SF21 細胞並無明顯差異(Fig. 2B)，因此可以肯定的是:家蠶

BmN4 細胞株和果蠅 SL2 細胞株對 AcMNPV 急性感染之阻斷，主要應在於晚期啟動子表現的限制上。由 Fig. 2A 顯示家蠶 BmN4 細胞對 AcMNPV 晚期啟動子 VP39 的支持度較 SL2 細胞強(產生螢光之細胞數較多)，而最晚



圖二 B 不同啟動子之重組病毒在 AcMNPV 寄主細胞 SF21 和非寄主細胞 BmN4 與 SL2 表現螢光之定性分析。
 Fig. 2B. *egfp* gene expression in AcMNPV host cells (SF21) and nonpermissive cells (BmN4, SL2) infected with these recombinant viruses (at an moi of 10, 3 d p.i.). The *egfp* gene was respectively driven by the VP39, P10, hsp70 or IE1hr5 promoter.

期啟動子 P10 仍可在部份的 BmN 細胞中表現，但在 SL2 細胞中則幾乎沒有產生螢光之細胞。為進一步定量此四種啟動子在 SF21，BmN4 和 SL2 的表現，則利用 Cytofluor 進行 EGFP 蛋白在細胞內表現的定量分析。

二、不同啟動子在 AcMNPV 寄主細胞與非寄主細胞表現的定量分析。

含有綠螢光基因之重組 AcMNPV 病毒，以 moi = 10 的病毒力價分別進行 AcMNPV

在寄主細胞 SF21 與非寄主細胞(家蠶的 BmN4 細胞株和果蠅的 SL 細胞株)的感染實驗。在 SF21 細胞中，雖然晚期啓動子 VP39 與最晚期啓動子 P10 於感染後第一天(1-d p.i.)表現 EGFP 的螢光活性只有 hsp70 啓動子的 1/3 強度，但已略高於 IE1hr5 啓動子在 SF21 細胞中的表現活性(Fig. 3A)。然則在 BmN4 與 SL2 細胞株中，P10 啓動子完全失去表現 EGFP 的活性。有趣的是 VP39 啓動子在家蠶細胞中仍可表現出部份活性，且可達在 SF21 於感染後第三天(3 ds p.i.)時的 1/5 之強度(Fig. 2A, B)。但 VP39 啓動子在果蠅的 SL2 細胞株之活性則劇降，僅有其在 SF21 在 3 ds p.i.時的 1/30 強度(Fig. 3A, C)，同時也僅有 IE1hr5 啓動子的 1/4 強度(Fig. 3C)，而 VP39 啓動子在 BmN4 細胞中與 IE1hr5 啓動子的強度相當(Fig. 3B)。源自果蠅的 hsp70 啓動子雖然在 SF21 細胞中的活性，在 3 ds p.i.時僅有 P10 啓動子的 1/10 強(Fig. 2A)，但在 BmN4 與 SL2 細胞株卻有最強表現活性(Fig. 3B, C)。而且，雖然 AcMNPV 病毒無法在 BmN4 細胞和 SL2 進行急性感染以增加外源基因之複製數(copy number)，但果蠅的 hsp70 啓動子活性在 BmN4 與 SL2 細胞株中仍可達到 SF21 細胞的 80% (Fig. 3A~C)，這些結果顯示，在 moi = 10 的感染條件下 AcMNPV 可以在 BmN4 家蠶細胞或 SL2 果蠅細胞中行非裂解性的侵染(transduction)，而在所篩選的啓動子中，以 hsp70 啓動子效果最佳。

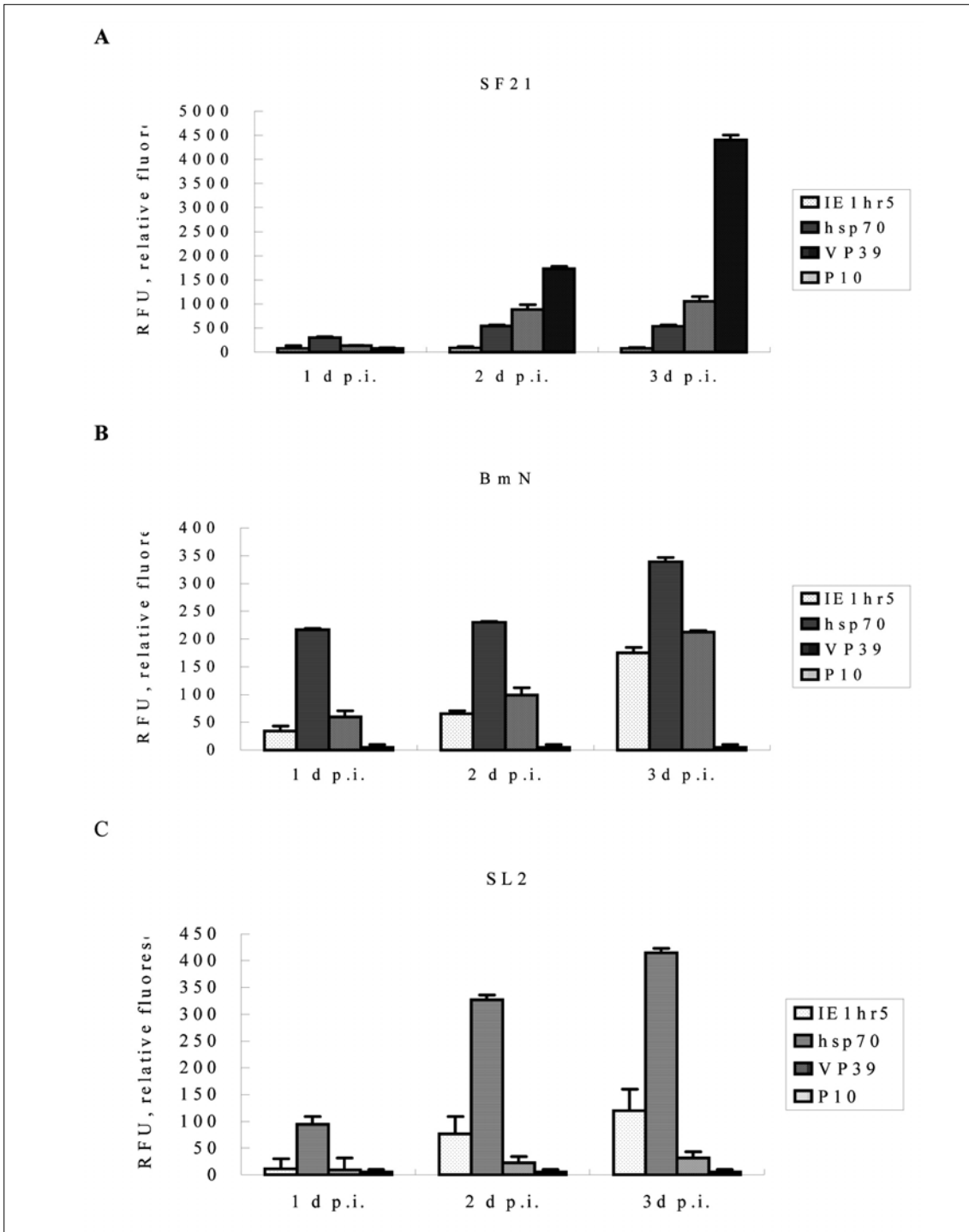
三、hsp70 啓動子在 AcMNPV 寄主細胞與非寄主細胞的時序表現分析

由上述的實驗可做如下之推測：hsp70 啓動子銜入 AcMNPV 後可在 AcMNPV 非寄主細胞中行非裂解性的侵染而表現外源蛋白。若

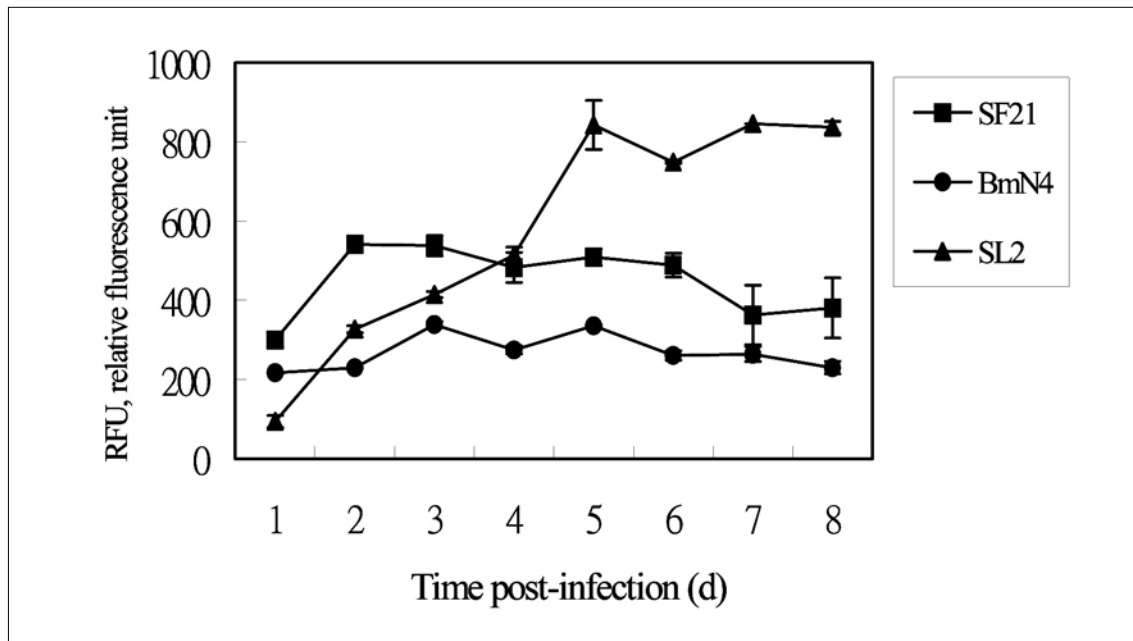
重組 AcMNPV 在非寄主細胞中能不破壞正常的細胞運作，則在侵染 3 天後，hsp70 啓動子啓動的基因於細胞中累積的表現量應會持續地增加，但若進行類似急性感染的情況，基因的表現量會達到一高峰值後，因細胞的死亡而使表現量遞減。從圖四的結果顯示以含 hsp70 啓動子 egfp 基因之重組病毒感染 SL2 細胞時，其細胞內螢光的產量在第五天(5 ds p.i.)時始達最大值，而且至少可持續到第八天(8 ds p.i.)。然則當以 vAch70E 感染 SF21 和 BmN4 細胞時，細胞內螢光的產量皆在第三天即達高峰值，三天(3 ds p.i.)後隨著感染時間的增加則螢光的表現量隨之遞減。故 SL2 和 BmN4 雖都是 AcMNPV 的非寄主細胞，但以果蠅的 hsp70 啓動子進行重組病毒之外源蛋白生產時，以 SL2 較適合進行非裂解性的細胞系統。

討 論

目前發展已成熟之非裂解性昆蟲表現系統(nonlytic insect cell expression system)是建立在穩定轉染(stable transfection)的家蠶細胞株或是果蠅細胞株(Lu *et al.*, 1997)。利用此穩定轉染細胞之系統，其蛋白產量除受限於啓動子的強度外，需費時費力才能篩選出較高產量的穩定轉染細胞。利用螢光蛋白 EGFP 我們可以明確的判斷出 AcMNPV 之非寄主細胞 BmN4 和 SL2 對 AcMNPV 感染後，並不能進入急性感染之主要因素為對晚期啓動子的抑制，進而抑制出芽病毒的形成，及最晚期啓動子的表現和 OV 及 PIB 的形成。雖然 BmN4 和 SL2 可以抑制晚期基因的表現，但對早期基因如 IE1 和 hsp70 啓動子卻無明顯的抑制現象(Fig. 2, 3)，因此 BmN4 和 SL2 細胞對 AcMNPV 之吸附和進入以及早期基因的表現可提供完整的支持。除此之外，源自果



圖三 不同啟動子之重組病毒在 AcMNPV 寄主細胞 SF21(A)和非寄主細胞 BmN4(B)與 SL2(C)表現螢光之定量分析。
 Fig. 3. Quantitative analysis of *egfp* gene expression in SF21 (A), BmN4 (B) and SL2 (C) cells infected with recombinant viruses.



圖四 SL21, BmN4 和 SL2 細胞株，感染以 hsp70 啟動子驅動 *egfp* 基因之重組 AcMNPV 的螢光變現時序分析。
Fig. 4. Time course analysis of *egfp* gene expression in SF21, BmN4, and SL2 cells infected with recombinant viruses (at an moi of 10) in which the *egfp* gene was driven by the hsp70 promoter.

蠅的 hsp70 啟動子在 AcMNPV 感染 SL2 細胞後，可持續地表現 EGFP 報導基因，並至少可維持 8 天之久 (Fig. 4)。這結果顯示 SL2 細胞可適於以 AcMNPV 非寄主細胞之局限性而建立非裂解性的桿狀病毒表現系統。

AcMNPV 雖是桿狀病毒中寄主範圍最廣的，然而能夠完全支持 AcMNPV 進行急性感染的細胞株卻不多 (Morris and Miller, 1992)。目前已知 AcMNPV 要進行急性感染最少必需符合下列條件：(1) 病毒要能進入細胞株中 (2) 病毒早期基因的表現 (3) 病毒 DNA 的複製 (4) 晚期基因的表現 (5) 出芽病毒 (budded virus) 的形成與釋出 (6) 最晚期基因的表現與 PIB (polyhedral inclusion body) 的形成等 (Morris and Miller, 1993)。先前的實驗結果顯示 AcMNPV 進入 BmN4 和果蠅之 Dm 細胞後，病毒 DNA 複製的量只受到些微的抑制，而在舞毒蛾細胞 Ld652Y 中 DNA 複製的

量甚至在感染後的 24~36 小時間與 SF21 細胞相當 (Morris and Miller, 1993)。因此 AcMNPV 進入 BmN4 細胞和 SL2 細胞後，其晚期啟動的表現便成為進入急性感染與否的控制點。尤其 BmN4 細胞對晚期啟動子 VP39 之支持度較 SL2 細胞為強，這顯示 AcMNPV 晚期和最晚期啟動子轉錄的起始序列：TAAG，在家蠶細胞中有部分的遺漏 (leaking) 現象。含 TAAG 的啟動子已知除要有 DNA 的複製外，亦要有不受 α -amanitin 抑制的 RNA 聚合酶活性才能進行轉錄 (Fuchs *et al.*, 1983; Glocker *et al.*, 1992)。目前已知此 AcMNPV 晚期啟動和最晚期啟動子相依 (dependent) 之 RNA 聚合酶為一四單體 (tetramer) 蛋白複合物，含 lef-4、lef-8、lef-9 和 P47 等四種基因 (Guarino *et al.*, 1998)。家蠶細胞可部分支持晚期啟動子的表現，顯示若能選殖出一適當之寄主因子 (host range

factor)，就能選擇性或調控 AcMNPV 晚期啟動子表現，進而控制 AcMNPV 對 BmN4 或其他細胞株的急性感染，那麼 VP39 啟動子即可在 BmN4 或其他細胞株細胞中進行非裂解性的外源蛋白生產。反之於 SL2 細胞中，AcMNPV 之晚期啟動子和最晚期啟動子則幾乎完全受到抑制，因此要利用 SL2 細胞以 AcMNPV 進行非裂解性的外源蛋白生產，則需找尋更強的早期啟動子，以增加表現量。hsp70 啟動子雖較 IE1hr5 啟動子強，但其在 SF21 細胞中與 SL2 細胞中的 EGFP 的表現量僅約 P10 啟動子在 SF21 細胞的 1/10 (Fig. 3)，因此選殖一強的早期啟動子應是發展以 SL2 細胞進行重組 AcMNPV 病毒非裂解性表現外源蛋白的關鍵。

誌 謝

本研究承行政院農委會委託計畫 90 農科-2.1.3-糧-z2 之經費補助，謹誌謝忱。

引用文獻

- Chazenbalk, G. D., and B. Rapoport.** 1995. Expression of the extracellular domain of the thyrotropin receptor in the baculovirus system using a promoter active earlier than the polyhedrin promoter. *J. Biol. Chem.* 270: 1543-1549.
- Fuchs, L. Y., M. S. Woods, and R. F. Weaver.** 1983. Viral transcription during *Autographa californica* polyhedrosis virus infection: a novel RNA polymerase induced in infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.* 43: 641-646.
- Glocker, B., R. R. Hoopes, and G. F. Rohrmann.** 1992. In vitro transactivation of baculovirus early genes by nuclear extracts from *Autographa californica* polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.* 66: 3476-3484.
- Guaro, L. A., B. Xu, J. Jin, and W. Dong.** 1998. A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus infected cells. *J. Virol.* 72: 7985-7991.
- Hegedus, D. D., T. A. Pfeifer, J. Hendry, D. A. Theilmann, and T. A. Grigliatti.** 1998. A series of broad host range shuttle vectors for constitutive and inducible expression of heterologous proteins in insect cell lines. *Gene* 189: 241-249.
- Hsu, T. A., S. Watson, J. J. Eiden, and M. J. Betenbaugh.** 1996. Rescue of immunoglobulins from insolubility is facilitated by PDI in the baculovirus expression system. *Protein Expr. Purif.* 7: 281-288.
- Jarvis, D. L.** 1993. Continuous foreign gene expression in stably-transformed insect cells. pp.193-217. *In: Insect cell culture engineering.* M. F. A. Goosen, A. Daugulis, and P. Faulkner, eds. Marcel Dekker, New York.
- Jarvis, D. L., C. Weinkauff, and L. A. Guarino.** 1996. Immediate early baculovirus vectors for foreign gene expression in transformed or infected insect cells. *Protein Expr. Purif.* 8:

- 191-203.
- Lee, J. C., and Y. C. Chao.** 1998. Apoptosis resulting from superinfection of *Heliothis zea* virus 1 is inhibited by p35 and is not required for virus interference. *J. Gen. Virol.* 79: 2293-2300.
- Lu, M., P. J. Farrell, R. Johnson, and K. Iatrou.** 1997. A baculovirus (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus) repeat element functions as a powerful constitutive enhancer in transfected insect cells. *J. Biol. Chem.* 272: 30724-30728.
- Morris, T. D., and L. K. Miller.** 1992. Promoter influence on baculovirus-mediated gene expression in permissive and nonpermissive insect cell lines. *J. Virol.* 66: 7397-7405.
- Morris, T. D., and L. K. Miller.** 1993. Characterization of productive and non-productive AcMNPV in selected insect cell lines. *Virology* 97: 339-348.
- Ogonah, O. W., R. B. Freedman, N. Jenkins, K. Patel, and B. C. Rooney.** 1996. Isolation and characterization of an insect cell line able to perform complex N-linked glycosylation on recombinant proteins. *Nat Biotechnol.* 14: 197-202.
- Possee, R. D.** 1997. Baculoviruses as expression vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 569-572.
- Sambrook, J., D. W. Fritsch, and S. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual* vers. 2/e. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- Smith, G. E., M. J. Fraser, and M. D. Summers.** 1983. Molecular engineering of the *Autographa californica* polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. *J. Virol.* 46: 584-593.
- Thiem, S. M., and L. K. Miller.** 1989. Identification, sequence and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* polyhedrosis virus. *J. Virol.* 63: 2008-2018.
- 收件日期：2003年10月30日
接受日期：2004年2月9日

Transduction of AcMNPV Nonpermissive Cells as a Non-lytic Baculovirus Expression System

Tzong-Yuan Wu* Department of Bioscience Technology, Chung Yuan Christian University, Chungli 320, Taiwan

Yu-Chan Chao and Jin-Ching Lee Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, Nankang, Taipei 115, Taiwan

ABSTRACT

Activities of viral and insect promoters constructed in an *Autographa californica* multiple capsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) were tested in AcMNPV permissive-SF21AE cells and -nonpermissive BmN4 and SL2 cells. Recombinant AcMNPVs containing reporter genes (green fluorescence protein *egfp* gene) under the control of an early promoter (IE1hr5), a late promoter (VP39), a very late promoter (P10) of AcMNPV, and a heat shock promoter (hsp70), derived from *Drosophila melanogaster*, were constructed, respectively. In BmN4 and SL2, late and very late promoter activities were inhibited, but they expressed the early and hsp70 promoters. These results indicate that BmN4 and SL2 cells support the absorption, entry, and early gene expression of recombinant AcMNPVs. Interestingly, we found that the hsp70 promoter-containing recombinant AcMNPV expressed *egfp* at least 8 days after infection; this result suggests that SL2 cells can serve as host cells for recombinant AcMNPV in non-lytic baculovirus expression systems.

Key words: AcMNPV, nonpermissive cells, non-lytic baculovirus expression system