



# Formosan Entomologist

Journal Homepage: [entsocjournal.yabee.com.tw](http://entsocjournal.yabee.com.tw)

## 【Review article】

### 生物技術在昆蟲之應用【綜合論述】

吳金洌

\*通訊作者E-mail :

Received: 1987    Accepted: 1987/07/07    Available online: 1987/09/01

## Abstract

### 摘要

生物技術在昆蟲之應用

Key words:

關鍵詞:

Full Text:  [PDF\(0.33 MB\)](#)

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

綜合論述

生物技術在昆蟲上之應用

APPLICATION OF BIOTECHNOLOGY IN THE STUDY  
OF INSECT

吳金洌

中央研究院動物研究所

(接受日期：民國76年7月7日)

一、生物技術之發展與展望

生物技術之發展，由基礎研究之 DNA 重組技術及細胞融合瘤技術，帶動在實用性之醫學、農業及工業上之產業革新，使生命科學得以在高科技之領域佔有一席之地，並為二十一世紀，人類之健康，糧食之提供，及環境之保護等問題，提供有希望的遠景。1973 年，Dr. S. N. Cohen 及 Dr. H. W. Boyer 教授研究大腸菌質體 (plasmid) DNA 可用核酸限制酶 (restriction enzyme) 切開，再以核酸連結酶 (DNA ligase) 接上外來基因之 DNA，最後，經由轉形作用 (transformation)，使這種遺傳工程改造之質體得以在大腸菌內複製，並且製造這些外加 DNA 之基因產物 (Cohen, S. *et al.* 1973; Watson, J. D. *et al.* 1983)。這種分子生物學的 DNA 重組技術 (recombinant DNA technology) 的運用，不但促使生命科學的基礎研究躍入新紀元；並且由於它的實用性，可使微生物或動植物細胞生產高價值的醫藥、農業、工業及能源產品，改良動植物的特定遺傳性質，因而奠定了遺傳工程技術 (genetic engineering technique) 的基石；使傳統的發酵技術產生革命性的改變，進而提昇為高科技產業 (high-techniques industry) 的一種。由於學術界不斷創新研究，如核酸限制酶 (restriction enzymes) 的研究 (Smith, H. O. *et al.* 1970; Robert, R. J. 1983)，核酸電泳鑑定法 (southern and northern blot techniques) (Southern, E. M. 1975, Alwine, J. C. *et al.* 1977)，DNA 定序法 (DNA sequencing techniques) (Maxam, A. M. *et al.* 1977; Sanger, F. *et al.* 1975; Sanger, F. *et al.* 1980) 和 DNA 化學合成法 (DNA chemical synthesis) 的開發 (Gait, M. J. *et al.* 1977; Itakura, K. *et al.* 1980)，選殖媒介 (cloning vectors) 的運用 (Gilbert, W. *et al.* 1980; Dimario, D. *et al.* 1982; Hamer, D. H. *et al.* 1974; Broach, J. R. 1982)，細胞融合瘤技術 (hybridoma technique) 製造單源抗體 (monoclonal antibody) (Köhler, G. *et al.* 1975; Milstein, C. 1980)，以及動物基因轉殖技術 (transgenic animals) (Yelton, D. E. *et al.* 1981; Palmiter, R. D. *et al.* 1982) 等研究結果，都可以直接應用在各種相關之生產產業。由於科學研究者對於生物基因操作的理論與技術趨於成熟，加上 NIH 操作規範 (NIH guideline) 列有詳細的指導原則，因此，重組 DNA 研究的結果，可以直接轉移到實際生產的目的。1977 年，Cohen 和 Boyer 率先成立遺傳工程公司 (Genetech Co.)，並促使美、日、歐各國相繼各自成立數百家的研究公司，由於二十一世紀是生物技術的世紀，我國有鑑於科技發展的趨勢，已明定生物技術是八項重點科技推動項目，期能趕上國際水準。

生物技術研究開發公司在 1985 年之前的研究生產項目大都注重高價值的醫藥產品，如干擾素 (interferon)，生長激素 (growth hormone)、胰島素 (insulin) 及 B 型肝炎疫苗等蛋白質的製造，

上述之醫療用途廣泛，但是不易取得以供大量使用，因此運用遺傳工程技術加以生產，最具開發價值。展望未來 10 年到 2000 年，遺傳工程技術最大的市場是在農業上，以及能源上的應用，根據預測，全世界的生物技術產業市場可達 650 億至 4000 億美元之間，因之，生物技術開發公司研究方向，都是逐年加重農業上的應用，主要是指各項動物和植物的品種改良與病害防治。由於世界人口，尤其是未開發國家的人口仍然未能有效控制，但是可供農業使用的土地資源有限，解決未來全世界糧食供應的問題，倚靠高度運用生物技術於農業，乃是最大冀望，目前我國臺灣地區，亦遭逢人口過密，可利用農業用地日漸縮小的問題，若能早日應用遺傳工程等生物技術，增加農林漁牧產量，改良農產品質，減少農業病害，是達到自給自足目標的唯一途徑，更可因而提昇農民收益，藏富於農林，使廣大的農村早日享受高科技的福祉。限於篇幅，本文討論重點側重於生物技術應用在昆蟲方面的發展近況，敘述我國臺灣地區供發展的重點研究方向，做為拋磚引玉的參考。若有疏誤之處，多望指正。

## 二、蘇力菌毒素之生化特性與遺傳工程

昆蟲微生物之殺蟲劑應用在昆蟲生物防治上有學理上之依據及實用性，並且可以彌補化學殺蟲劑之毒性殘留及抗藥性變種之缺點。目前已知 400 種以上之真菌，90 種以上之細菌及多種之昆蟲病毒會感染各種昆蟲及蟎 (mites) (Ferron, P. 1978; Falcon, L. A. 1971)，並且具有不同程度之殺蟲效果。最具代表性的微生物殺蟲劑是利用醱酵培養之蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*) 毒素，主要用來控制鱗翅目昆蟲 (*Caterpillar pests*)，最近更發展來控制蚊子及蚋 (Blackflies) (Falcon, L. A. 1971)，現在每年超過三千萬美元以上之銷售額，即是生物技術應用在昆蟲上之典型例子。

蘇力菌之發芽細胞 (sporulated cells) 含有大分子蛋白質之結晶 (Fast, P. G. 1981)，這就是通稱的蘇力菌毒素，簡稱 BT 毒素；BT 毒素經由鱗翅目昆蟲吞食後，在中腸道 (mid-gut) 部分經由蛋白質水解酶分解，其次單元蛋白質分子就會造成腸道表面之表皮細胞崩解，最後導致蟲體之死亡。鱗翅目昆蟲吞食蘇力菌毒素後，依劑量之不同，可以使昆蟲在 10 至 15 分鐘內停止進食，3 至 5 天內死亡。(Fast, P. G. 1981, Dulmage, H. J. 1981)。在蘇力菌毒素蛋白質之組成份中，以  $\delta$ -內毒素 (delta-endotoxin) 和  $\beta$ -外毒素 (beta-exotoxin) 最具殺蟲之效果。*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 之毒素由 130 KD, 65 KD 及 28 KD 之蛋白質組成，具殺死蚊及蚋之效果。(Tyrell, D. J. *et al.* 1979; Held, G. A. *et al.* 1986)。由於蘇力菌之蛋白質之生化性質已相當清楚 (Quinlan, R. J. *et al.* 1983)，其生物活性及免疫活性分析亦已確定，因此，應用遺傳工程技術，進行蘇力菌毒素基因之選殖與生產已具有相當之成果。

## 三、核多角體病毒在遺傳工程上的運用

核多角體病毒 (baculovirus) 之昆蟲病毒製成病毒殺蟲劑應用於生物防治上已有相當經驗，同時，病毒之病原機制及生化特性相當明確，以 *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) 病毒為例，它的 DNA 分子由十三萬對鹼基配對 (130 Kb) 構成，成為環狀之雙股 DNA 構造 (Kelly, D. C. 1982; Miller, L. K. *et al.* 1983)；在 AcNPV 病毒感染 15 至 18 小時後，病毒顆粒開始形成，並且聚在一起形成病毒封閉體 (viral occlusion)，封閉體裏面由多角蛋白質 (polyhedrin protein) 所填充。在 AcNPV 所感染的斜紋夜盜蛾細胞 (*Spodoptera frugiperda*) 內，多角蛋白質會被大量製造出來，佔全部細胞之 25% 以上，(Smith, G. E. *et al.* 1983)，這表示 AcNPV 病毒在複製過程中，多角蛋白質基因表現系統活躍，使這蛋白質是主要的基因產物；依據分子遺傳學上之探討，已證實在 AcNPV 之基因體，具有多角蛋白質之起動子 (promotor) 存在，(Miller, L. K. *et al.* 1983)，這一起動子是一個很強的起動子，具有高效率之基因表現或 hnRNA (mRNA) 之轉錄。因是之故，AcNPV 很適合做為在昆蟲細胞內做為選殖媒介體，而應用於遺傳工

程。美國德州農工大學 (Texas A & M University) 昆蟲系之 Dr. G. E. Smith, M. D. Summers 和 M. J. Fraser 共同合作，將人類之  $\beta$ -干擾素 ( $\beta$ -interferon) 基因剪接到 AcNPV 之 DNA 上，嵌入多角蛋白質之轉錄與轉譯訊息基因附近，經過 DNA 轉殖到 Sf 細胞內，能製造高達  $5 \times 10^6$  單位/ $10^6$  細胞之干擾素活性蛋白質，比大腸菌中產生者高 500 倍，(Smith, G. E. *et al.* 1983; Goeddel, D. V. *et al.* 1984)，比鼠類細胞產生者高 100 倍，(Hauser, H. *et al.* 1982)，而且這種基因工程製造之干擾素已是醣化蛋白質，並且和真核細胞之醣化修飾機制相同，這是利用 AcNPV 病毒當做媒介體最有利之優點之一 (Smith, G. E. *et al.* 1983)。在日本方面，更進一步將  $\alpha$ -干擾素基因接在 Baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) 上，再去感染家蠶蟲體，在蟲體血液 (haemolymph) 中可分析到  $5 \times 10^7$  單位/ml 之活性干擾素，(Maeda, S. *et al.* 1985)，約等於  $50 \mu\text{g/ml}$ ，可見基因之表現效率很高，而且培養家蠶之成本較哺乳類細胞培養所生產者為低。因此昆蟲病毒已可發展為新的遺傳工程運用體系。

#### 四、昆蟲單源抗體之運用

一般將抗原 (antigen) 物質打入動物體內，所產生之抗體是多源抗體 (polyclonal antibodies)，表示血清中誘發之抗體是混合抗體，各由不同之抗體分子與抗原之不同部位或相同部位 (determinant) 結合，這些抗體是由不同脾臟中之  $\beta$ -淋巴細胞 ( $\beta$ -lymphocyte) 所製造產生。因為這些抗體分子不容易分開，因此，在抗體特異性研究上，有其不易克服之缺點。G. Köhler 和 C. Milstein (Köhler, G. *et al.* 1975) 於 1975 年首先將老鼠骨髓瘤細胞 (mouse myeloma cells) 和抗原刺激後之老鼠 (Balb/c mice) 脾臟之  $\beta$ -淋巴細胞融合，稱之融合瘤細胞 (hybridoma cells)，融合瘤細胞具有原有兩種細胞之特點，一是產生抗體，而且這種抗體只認識抗原分子之特定部位 (specific determinant)，所以，抗體分子是單一種抗體而非混合抗體，特別稱為單源抗體 (monoclonal antibody)；二是融合瘤仍保有骨髓瘤細胞之細胞株生長特性，可以在培養皿中進行連續培養，進而做大量之細胞培養。因此，依這兩種特性，融合瘤細胞可以大量產生特異性很高之單一抗體，供研究、臨床檢驗及治療之廣泛應用。

運用融合瘤技術製造之單源抗體，已經應用在昆蟲生理、生化、遺傳與病理之研究 (Ma, M. *et al.* 1984; Ma, M. 1986)；依單源抗體和抗原結合之高特異性原理，可以用於探討各種昆蟲受精卵及蟲體內各種蛋白質之存在與變化，瞭解其生理、生化、遺傳，或發生學上之意義，進一步應用在區分蟲體種間的細微差別，與確認品系之正確性。

#### 五、未來發展方向

我國臺灣地區應用生物技術於昆蟲學及其防治上之研究方向建議如下：

1. 建立昆蟲細胞株及病毒之培養系統。
2. 發展運用核多角體病毒之基因選殖媒介在昆蟲細胞及家蠶等蟲體之感染與表現。
3. 應用遺傳工程技術生產蘇力菌毒素蛋白質。
4. 推展費洛蒙及微生物殺蟲劑(昆蟲之病毒，細菌或真菌)之綜合性生物防治(周延鑫，1985)。
5. 應用單源抗體於昆蟲之研究。
6. 以生物技術探討昆蟲抗藥性基因。

#### 六、參考文獻

周延鑫 1985 生理性藥劑在害蟲管制上之應用。農藥毒性研討會，中央研究院動物研究所專刊：pp.

287-296。

- Alwine, J. C., D. J. Kemp and G. R. Stark. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 5350-5354.
- Broach, J. R. 1982. The yeast plasmid  $2\mu$  circle. *Cell* 28: 203-204.
- Cohen, S., A. Chang, H. Boyer and R. Helling. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70: 3242-3244.
- Dimario, D., R. Treisman and T. Maniatis. 1982. Bovine papilloma virus vector that propagates as a plasmid in both mouse and bacteria cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79: 4030-4034.
- Dulmage, H. J., L. F. Davidson, Lee A. Bulla Jr., and W. A. Ramoska. 1979. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 656-658.
- Falcon, L. A. 1971. In "Microbial control of insects and mites" (H. D. Burges and N. W. Hussey Ed.) pp. 67-95. Academic Press, London.
- Fast, P. G. 1981. In "Microbial control of pests and plant diseases". (H. D. Burges Ed.) pp. 223-248, Academic Press, London.
- Ferron, P. 1978. *Ann. Rev. Entomol.* 23: 409-442.
- Gait, M. J. and R. C. Sheppard. 1977. Rapid synthesis of oligo-deoxyribonucleotides: A new solid-phase method. *Nucleic Acid Res.* 4: 1135-1158.
- Gilbert, W. and L. Villa-Komaroff. 1980. Useful proteins from recombinant bacteria. *Sci. Am.* 242(4): 74-94.
- Goeddel, D. V., H. M. Shepard, E. Yelverton, D. Leung, R. Crea, A. Sloma and S. Pestka. 1980. *Nucleic Acid Res.* 8: 4075-4074.
- Hamer, D. H., K. D. Smith, S. H. Boyer and P. Leden. 1974. SV40 recombinants carrying rabbit  $\beta$ -globin gene coding sequences. *Cell* 17: 725-735.
- Hammer, R. E., V. G. Pursel, C. E. Rexroad Jr., R. J. Wall, D. J. Bolt, K. M. Ebert, R. D. Palmiter and R. L. Brinster. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315: 680-683.
- Hauser, H., G. Gross, W. Bruns, H. K. Hochkeppel, U. Mayer and J. Collins. 1982. *Nature (London)* 297: 650-654.
- Held, G. A., Y. S. Huang and C. Y. Kawanish. 1986. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 141: 937-941.
- Itakura, K. and A. D. Riggs. 1980. Chemical DNA synthesis and recombinant DNA studies. *Science* 209: 1401-1405.
- Kelly, D. C. 1982. *J. Gen. Virol.* 63: 1-13.
- Köhler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined. *Nature* 256: 495-497.
- Ma, M. 1986. *Proc. Symp. Develop. Appl. Biotechnol. Agr.* pp. 54-61.
- Ma, M., S. T. Wu, M. Howard and A. B. Borkonec. 1986. *In vitro* 20: 739-742.
- Maeda, S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Hori, Y. Saeki, Y. Sato and M. Furusawa. 1985. *Nature (London)* 315: 592-594.
- Maxam, A. M. and W. Gilbert. 1977. A new method of sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 560-564.
- Miller, L. K., A. J. Lingg and L. A. Bulla Jr., 1983. *Science* 219: 715-721.
- Milstein, C. 1980. Monoclonal antibodies. *Sci. Am.* 243(4): 66-74.
- Palmiter, R. D., R. L. Brinster, R. E. Hammer, M. E. Trumbauer, M. G. Rosenfeld, N. C. Birnberg and R. M. Evans. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300: 611-615.
- Quinlan, R. J. and S. G. Linsansky. 1983. In "Biotechnology" (H. J. Rehm and G. Reed Ed.) pp. 233-254.
- Roberts, R. J. 1983. Restriction and modification enzyme and their recognition sequences. *Nucleic Acid Res.* 11: 2135-2167.

- Sanger, F. and A. R. Coulson. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94: 444-448.
- Sanger, F., A. R. Coulson, B. G. Barrell, A. J. H. Smith and B. A. Roe. 1980. Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J. Mol. Biol.* 143: 161-178.
- Smith, G. E., J. M. Vlak and M. D. Summers. 1983. *J. Virol.* 45: 215-225.
- Smith, G. E., M. D. Summers and M. J. Fraser. 1983. *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156-2165.
- Smith, H. O. and K. W. Wilcox. 1970. A restriction enzyme from hemophilus influenzae, I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* 51: 379-391.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Tyrell, D. J., L. F. Davidson, Lee A. Bulla Jr. and W. A. Ramoska. 1979. *Appl. Environ. Microbial.* 38: 656-658.
- Watson, J. D., J. Tooze and D. T. Kurtz. 1983. *Recombinant DNA: a short course.* Scientific American Books.
- Yelton, D. E. and U. D. Scharff. 1981. Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 657-680.