

# 荳莢螟核多角體病毒時序性基因表現圖譜之研究

陳俐嘉、蔡孟

E-mail: 9701204@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

桿狀病毒近年來在發展生物農藥及新穎之桿狀病毒載體 (外源蛋白) 表現系統方面有相當高的發展潛力。目前經由臺灣大學王重雄教授實驗室鑑定並建立國內特有的桿狀病毒及其細胞株，荳莢螟核多角體病毒 (*Maruca vitrata* multiple nucleopolyhedrovirus，簡稱 MaviMNPV) 及荳莢螟細胞株，荳莢螟核多角體病毒之基因體在 2006 年也經同實驗室初步完成解序分析。本實驗之目的即利用 DNA 微陣列晶片及即時定量 PCR 來研究荳莢螟核多角體病毒的基因表現之時序圖譜，藉以尋找具有潛力發展為桿狀病毒載體表現系統之基因啟動子。結果分析顯示 DNA 微陣列技術可以找出整體基因組之各基因表現時序的分布，接著利用即時定量 PCR 進行精準估測的數據分析每個時期的基因確切之表現量估測。雖然 DNA 微陣列技術整體數據是較低的，大部分基因也是比較偏向晚期表現，但是趨勢表現與即時定量 PCR 是相類似的。綜合以上結果荳莢螟核多角體病毒表現基因可以定義為三個時期，早期 2 - 4 小時、晚期 8 - 12 小時、非常晚期 12 小時後。早期表現基因佔 22% (28/126)、晚期表現基因有 29% (37/126)、非常晚期佔 28% (35/126)、尚未確定 21% (26/126)。同時也發現有些基因在早期即有表現，其表現量可以持續到晚期大量表現，例如：ORF13、ORF56、ORF63、ORF91；除了 polyhedrin 及 p10 基因外，有些基因雖然不是早期基因但是在晚期可以有較大量表現，例如：ORF40、ORF93、ORF43、ORF61。這些在早期或是晚期較高表現量的基因是值得再去做有關表現載體的深入研究，而其基因表現時序分析也可以幫助了解本土性桿狀病毒的基因表現。

關鍵詞：荳莢螟核多角體病毒；生物晶片；基因表現時序

## 目錄

封面內頁 簽名頁 授權書.....	iii	中文摘要.....	iv	英文摘要.....	vi
誌謝.....	vii	目錄.....	ix	圖目錄.....	xiii
目錄.....	xv	1. 文獻回顧.....	1	1.1 前言.....	1
螟.....	2	1.2.1 荳莢螟的形態特徵.....	2	1.2.2 荳莢螟的生活史.....	3
方式.....	4	1.3 桿狀病毒.....	4	1.3.1 桿狀病毒的基本形態與構造.....	4
類.....	5	1.3.2 桿狀病毒的分類.....	5	1.3.3 桿狀病毒的生活史.....	7
在生物科技應用上的重要性.....	10	1.3.4 桿狀病毒的重要基因及其表現.....	8	1.3.5 桿狀病毒在	
介紹.....	12	1.3.6 荳莢螟核多角體病毒及荳莢螟細胞株.....	11	1.4 現階段基因表現分析平台之簡	
法.....	15	1.4.1 DNA 微陣列技術 (DNA microarray technique).....	12	1.4.2 即時定量 PCR.....	13
.....	15	2.1 荳莢螟細胞培養及 DNA 純化.....	15	2.1.1 荳莢螟細胞株之來源.....	15
.....	15	2.1.2 荳莢螟細胞株 NTU-MV56 細胞培養及繼代.....	15	2.1.3 培養基 TNM-FH 製備.....	16
.....	16	2.1.4 荳莢螟細胞株 NTU-MV56 細胞 DNA 純化.....	16	2.2 荳莢螟核多角體病毒封埋體及病毒 DNA 純化.....	17
.....	17	2.2.1 荳莢螟核多角體病毒液感染細胞株之方法.....	17	2.2.2 荳莢螟核多角體病毒封埋體純化.....	17
.....	17	2.2.3 荳莢螟核多角體病毒 DNA 純化.....	18	2.3 病毒感染後不同時間點之樣本收集及 cDNA 製備	
.....	19	2.3.1 荳莢螟核多角體病毒感染 NTU-MV56 細胞的時間點 收取及 RNA 製備.....	19	2.3.2 製備 cDNA.....	20
.....	20	2.4 荳莢螟核多角體病毒基因表現分析平台.....	21	2.4.1 DNA 微陣列技	
.....	21	2.4.2 微陣列平台之建立 mRNA 純化、雜合呈色反應及掃描.....	21	2.4.3 數據統計.....	24
.....	24	2.5 荳莢螟核多角體病毒基因專一性之引子對之設計 及確.....	25	2.5.1 即時定量 PCR 引子對之設計.....	25
.....	25	2.5.2 利用聚合酶鏈反應 (PCR, polymerase chain reaction) 確認引子對之專一性.....	26	2.5.3 利用 Melting Curve 確認引子對之專一性.....	26
.....	26	2.5.4 荳莢螟基因片段之 (18S rRNA, Actin, Elongation factor 1) 之選殖及其即時定量 PCR 引子對之設計.....	27	2.6 利用即時定量 PCR 偵測荳莢螟核多角體病毒之基因表	
.....	29	3. 結果.....	31	3.1 荳莢螟核多角體病毒感染荳莢螟細胞 (NTU-MV56).....	31
.....	31	3.2 荳莢螟核多角體病毒基因分析平台之建立及感染.....	31	3.3 荳莢螟核多角體病毒基因表現時序圖譜.....	32
.....	32	3.3 荳莢螟核多角體病毒基因表現時序圖譜.....	32	3.4 即時定量 PCR 引子對設計及專一性確定.....	35
.....	35	3.5 設計製備 18S rRNA, Actin, Elongation factor 1 之即時定量 PCR 引子對.....	36	3.6 以即時定量 PCR 偵測荳莢螟核多角體病毒基因表現時序.....	37
.....	37	3.6.1 早期基因 (Early stage) 的表現.....	37	3.6.2 晚期基因 (Late stage) 的表現.....	38
.....	38	3.6.3 非常晚期 (Very late stage) 的基因表現.....	39	3.7 荳莢螟核多角體病毒之基因表現時序性分析.....	39
.....	39	4. 結論.....	41	參考文獻.....	89
.....	89	附錄.....	93		

## 參考文獻

1. 王重雄、黃偉峰 (2001) 生物技術應用於昆蟲病原體研究, 台灣大學農業陳列館:181-200
2. 黃啟鐘、彭武康、 Talekar, N.S. (2002) 台南亞蔬農場田菁上豆莢螟 (*Maruca vitrata* (Fabricius)) (鱗翅目:螟蛾科) 幼蟲之族群變動, 台灣昆蟲 22期: 271-278
3. 黃啟鐘、彭武康 (2002) 溫度對豆莢螟 (*Maruca vitrata*) 在田菁上發育之影響, 植物保護學會會刊 44期: 245-248
4. 黃啟鐘 (2004) 田菁植物上主要害蟲之季節性消長, 植物保護學會會刊 46期: 81-91
5. 葉昌偉、謝昌煥 (2005) 基因晶片簡介與分析及應用軟體介紹, 國家高速網路與計算中心
6. 靳子蓉、高穗生 (2005) 桿狀病毒表現載體之發展與應用, 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所技術專刊第137 號79期: 1-7
7. Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M., Possee, R.D. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 1994; 202(2): 586-605.
8. Berretta, M.F., Deshpande, M., Crouch, E.A., Passarelli, A.L. Functional characterization of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus late gene transcription and genome replication factors in the non-permissive insect cell line SF-21. *Virology*. 2006; 348(1): 175-89.
9. Barrion, A. T., Bandong, J. P., De la Cruz, C. G., Aposts, R. F., Litsinger, J. A. Natural enemies of the bean pod borer *Maruca vitrata* in the Philippines. *Grain Legume Bull*. 1987; 34: 21- 22.
10. Becker, K., Pan, D., Whitley, C.B. Real-time quantitative polymerase chain reaction to assess gene transfer. *Hum Gene Ther*. 1999; 10(15): 2559-66.
11. Bianchi, F.J., Snoeiijing, I., van der Werf, W., Mans, R.M., Smits, P.H., Vlak, J.M. Biological activity of SeMNPV, AcMNPV, and three AcMNPV deletion mutants against *Spodoptera exigua* larvae (Lepidoptera: noctuidae). *J Invertebr Pathol*. 2000; 75(1): 28-35.
12. Bonning, B. C., Hammock, B. D. Development of recombinant baculoviruses for insect control. *Annu Rev Entomol*. 1996; 41: 191-210. Review.
13. Braunagel, S.C., Russell, W.K., Rosas-Acosta, G., Russell, D.H., Summers, M.D. Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(17): 9797-802.
14. Dhar, A.K., Dettori, A., Roux, M.M., Klimpel, K.R., Read, B. Identification of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with White spot syndrome virus by cDNA microarrays. *Arch Virol*. 2003; 148(12): 2381-96.
15. Downham, M.C., Hall, D.R., Chamberlain, D.J., Cork, A., Farman, D.I., Tamo, M., Dahounto, D., Datinon, B., Adetonah, S. Minor components in the sex pheromone of legume podborer: *Maruca vitrata* development of an attractive blend. *J Chem Ecol*. 2003; 29(4): 989-1011.
16. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Manil, J., DeseL Berger, U., Ball, L. A. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Hardcover). 2005; p117- 185
17. Felix, J. J., Bianchi, A., Snoeiijing, I., Werf W., Mans, M. W., Smits, P. H., and Vlak, J. M. Biological Activity of SeMNPV, AcMNPV, and Three AcMNPV Deletion Mutants against *Spodoptera exigua* Larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Invertebr Pathol*. 2000; 75(1): 28-35
18. Gomi, S., Majima, K., Maeda, S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol*. 1999; 80 ( Pt 5): 1323-37.
19. Harrap, K. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. I. The inclusion body. *Virology*. 1972; 50(1): 114-23.
20. Herniou, E.A., Olszewski, J.A., Cory, J.S., O'Reilly, D.R. The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annu Rev Entomol*. 2003; 48: 211-34. Review.
21. IJkel, W.F., van Strien, E.A., Heldens, J.G., Broer, R., Zuidema, D., Goldbach, R.W., Vlak, J.M. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol*. 1999; 80 ( Pt 12): 3289-304.
22. Jiang, S.S., Chang, I.S., Huang, L.W., Chen, P.C., Wen, C.C., Liu, S.C., Chien, L.C., Lin, C.Y., Hsiung, C.A., Juang, J.L. Temporal transcription program of recombinant *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrosis virus. *J Virol*. 2006; 80(18): 8989-99.
23. Kuzio, J., Pearson, M.N., Harwood, S.H., Funk, C.J., Evans, J.T., Slavicek, J.M., Rohrmann, G.F. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology*. 1999; 253(1): 17-34.
24. Lee, S. T., Srinivasan, R., WU, Y. J., and Talekar, N. S. Occurrence and characterization of a nucleopolyhedrovirus from *Maruca vitrata* (Lepidoptera, Pyralidae) isolated in Taiwan. *BioControl*. 2007; 52: 801-819
25. Liao, C. T., Lin., C. S. Occurrence of the legume pod borer, *Maruca testulalis* Geyer (Lepidoptera: Pralidae) on cowpea ( *Vigna niguiculata* Walp ) and insecticides application trial. *Plant Prot. Bull*. 2000; 42: 213- 222.
26. Long, G., Pan, X., Westenberg, M., Vlak, J.M. Functional role of the cytoplasmic tail domain of the major envelope fusion protein of group II baculoviruses. *J Virol*. 2006; 80(22): 11226-34.
27. Lo, C.F., Leu, J.H., Ho, C.H., Chen, C.H., Peng, S.E., Chen, Y.T., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Huang, C.J., Chou, H.Y., Wang, C.H., Kou, G.H. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat*. 1996; 25: 133-141.
28. Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y., Furusawa, M. Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*. 1985; 315(6020): 592-4.
29. Morris, T.D., Miller, L.K. Mutational analysis of a baculovirus major late promoter. *Gene*. 1994; 140(2): 147-53.
30. Moscardi, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu Rev Entomol*. 1999; 44: 257-89.
31. Oliveira, J.V., Wolff, J.L., Garcia-Maruniak, A., Ribeiro, B.M., de Castro, M.E., de Souza, M.L., Moscardi, F., Maruniak, J.E., Zanotto, P.M. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol*. 2006; 87(Pt 11): 3233-50.
32. Possee, R.D. Baculoviruses as expression vectors. *Biotechnol*. 1997; 8: 569- 572.
33. Pullen, S.S., Friesen, P.D. The CAGT motif functions as an initiator element during early transcription of the baculovirus transregulator ie-1. *J Virol*. 1995; 69(6): 3575-83.
34. Srinivasan, R. Susceptibility of legume pod borer (LPB), *Maruca vitrata* to delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* (Bt) in Taiwan. *J Invertebr Pathol*. 2008; 97(1): 79-81.
35. Summers, M., Anderson, D. Granulosis virus deoxyribonucleic acid: a closed, double-stranded molecule. *J Virol*. 1972; 9(4): 710-3.
36. Tanada, Y., Kaya, H.K. *Insect Pathology*. Academic Press. 1993. p414-423.
37. Theilmann, D. A., Blissard, G. W., Bonning, B., Jehle, J. A., O' Reilly, D. R., Rohrmann, G. F., Thiem, S., and Vlak, J. M. Family Baculoviridae in " Classification and Nomenclature of Viruses: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Fauquet et al. Elsevier Academic Press. 2005; 177 – 185.
38. Tweeten, K.A., Bulla, L.A., Consigli, R.A. Characterization of an Extremely Basic Protein Derived from Granulosis Virus Nucleocapsids. *J Virol*. 1980; 33(2): 866-876.
39. Yeh, S.C., Lee, S.T., Wu, C.Y., Wang, C.H. A cell line (NTU-MV) established from *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Pyralidae): Characterization, viral susceptibility, and polyhedra production. *J Invertebr*

