

發明專利說明書

※申請案號：092127510

※IPC分類：

一、發明名稱：

應用於生產重組蛋白與桿狀病毒生物農藥的蟲體噴霧感染方法

二、中文發明摘要：

一種應用於生產重組蛋白與桿狀病毒生物農藥的蟲體噴霧感染方法，藉由芽體形式桿狀病毒(budding form baculovirus)之液體噴霧來感染昆蟲幼蟲，減少以蟲體注射感染方式所花費之人力與餵食感染技術所導致的能量耗費，並提升桿狀病毒對昆蟲幼蟲之感染率，將可應用於重組蛋白的生產和桿狀病毒作為生物農藥的產量平台。

三、英文發明摘要：

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第1圖

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

步驟110...提供30隻3齡至4齡擬尺蠖幼蟲

步驟120...提供具有芽體形式桿狀病毒之核多角體病毒液1毫升至2毫升

步驟130...以核多角體病毒液對擬尺蠖幼蟲進行噴霧感染

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

[0001] 本發明是關於一種桿狀病毒之噴霧感染方法，特別是關於一種可應用於生產重組蛋白與桿狀病毒生物農藥的蟲體噴霧感染方法。

【先前技術】

[0002] 桿狀病毒表現系統(Baculovirus expression vector system, BEVS)是一種以昆蟲細胞或蟲體(insect larva)為宿主，可用來生產重組蛋白的真核表現系統，同時桿狀病毒也是最具潛力的生物性農藥(bio-insecticide)。桿狀病毒是不感染人類的昆蟲病毒，其含有130 k之去氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)基因體。除了本身為有效之生物農藥以取代化學農藥外，並且可藉由基因重組使桿狀病毒攜帶外來基因(foreign gene)，以作為生產重組蛋白的工具，最近的研究發現桿狀病毒也具有作為人類基因療法之載體的潛能。自1983年Smith等人發展桿狀病毒表現系統至今，已有數百種以上的蛋白質成功的以桿狀病毒表現系統進行生產。

[0003] 相較於哺乳動物的細胞，昆蟲之細胞分裂時間較短與營養需求較經濟，在培養過程也不須太多的特殊培養裝置，成本遠較哺乳動物細胞表現系統來的低。由於昆蟲細胞具備容易培養和生產時間短等優點，再加上桿狀病毒具有專一性感染之病毒特性，使桿狀病毒表現系統成為極具市場價值的生物技術。桿狀病毒表現系統可分為細胞和蟲體之生產程序，其中細胞之桿狀病毒生產程序，所涉及的關鍵因子包括了昆蟲細胞株，病毒，培養基，培養程序和製劑，在和蟲體生產程序相較其生產較為複雜。且培養基價格較高造成成本的增加，再加上細胞之大量培養不易進行所造成的產能放大(scale up)問題，使其在量產上有實質困難。

[0004] 蟲體之生產程序即以病毒感染昆蟲主的幼蟲來進行生產，除成本低廉的優點外，由於蟲體本身之產能遠大於細胞培養之產能，是目前公認量產的最佳途徑。一般來說，桿狀病毒對幼蟲之感染途徑可分為兩大類，幼蟲個體之間的感染與蟲體本身之組織細胞感染。幼蟲

個體之間的感染需由口進入，幼蟲經口感染桿狀病毒包涵體(OV)，再於鹼性之腸道下釋出芽體病毒(BV)粒子，而感染腸道細胞。蟲體本身之組織細胞感染則是於桿狀病毒進入腸道細胞，約12小時後即可產生出芽體形式桿狀病毒，在蟲體內感染各組織細胞。因而要使幼蟲順利感染桿狀病毒需採以餵食包涵體病毒(OV)或逐隻施打芽體形式桿狀病毒的方式，餵食方式除難以控制幼蟲的感染率外，當此包涵體病毒進行蟲體感染時，會耗費許多能量產生包涵體蛋白而降低重組蛋白之產能，所以目前之生產技術大多趨向於以施打芽體形式桿狀病毒的方式來進行蟲體感染。但逐隻施打方式則造成許多人力與時間消耗。因此，如何以有效的方式節省人力資源並提升桿狀病毒對幼蟲之感染率，則成為發展以桿狀病毒表現系統生產外源蛋白的重要課題。

[0005] 於1994年美國加州柏克萊大學Volkman教授對桿狀病毒之感染途徑所進行的研究，顯示昆蟲之氣管系統(tracheal system)可能是桿狀病毒能在蟲體內快速蔓延，感染整個蟲體各組織的原因。Volkman的研究小組發現，在餵食感染的16小時後，有54%的氣管母細胞(tracheoblasts)受感染，是第一個受桿狀病毒感染的非腸道表皮細胞(non-midgut epithelial)。由於昆蟲的氣管系統延伸到蟲體表面形成氣孔(spiracles)，桿狀病毒有可能經由氣孔而以噴霧型式感染(aerosol infection)。於是Volkman的研究團隊於實驗過程中先用二氧化碳先進行蟲體麻醉，再以同時含有包涵體病毒和芽體形式桿狀病毒的蟲體乾燥粉末噴霧噴灑於幼蟲進行實驗。Volkman的研究小組在1995年所發表的結果顯示，擬尺蠖(*Trichoplusia ni*)、煙芽夜蛾(*Heliothis virescens*)和玉米穗蟲(*Helicoverpa zea*)可以蟲體乾燥粉末噴霧方式感染桿狀病毒，但感染率不高且不穩定(8~53%)，並且無法釐清桿狀病毒係以何種型式於蟲體間進行噴霧感染。因此以逐隻施打方式或餵食感染來進行桿狀病毒的感染仍為生產技術主流，甚至於市面上亦販售成套之注射與培養工具，以用來進行桿狀病毒於蟲體的注射感染。

【發明內容】

[0006] 鑑於先前技術的缺點，本發明提供一種應用於生產重組蛋白與桿狀病毒生物農藥的蟲體噴霧感染方法，為一種使用新的芽體形式桿狀病毒液之噴霧感染方法，不需如Volkman小組進行蟲體乾燥粉末噴霧實驗時，先將蟲體麻醉的步驟。並進一步證明只需芽體形式桿狀病毒液即可進行噴霧感染，排除須有包涵體病毒共存才能進行蟲體噴霧感染的可能。以噴霧方式來感染幼蟲，將減少蟲體注射感染所花費之人力與餵食感染技術所導致的能量損失，並提升桿狀病毒對幼蟲之感染率，有效降低以昆蟲細胞生產桿狀病毒或重組蛋白的成本。

[0007] 本發明所揭露的桿狀病毒之噴霧感染方法，其步驟包含有：首先，準備健康之昆蟲幼蟲(insect larvae)；提供芽體形式桿狀病毒之病毒液；以病毒液對昆蟲幼蟲進行噴霧感染(aerosol infection)。於噴霧感染完成四至六天後，即可收集已感染病毒的昆蟲幼蟲之產物。感染桿狀病毒的昆蟲幼蟲之產物可為桿狀病毒本身，或連帶產生之重組蛋白。

[0008] 本發明證實噴霧感染僅需透過芽體病毒即可進行感染，不需包涵體病毒，而利用刪除包涵體基因之芽體形式桿狀病毒進行噴霧感染以生產重組蛋白時，因不用耗費能量生產包涵體蛋白將較先前以包涵體病毒進行餵食感染的技術在產量上預期會有兩倍以上的效益，而且也不用進行包涵體病毒的純化步驟。由此可知，發展噴霧感染對於發展桿狀病毒作為生物農藥與生產重組蛋白具有多重的效益。

[0009] 為使對本發明的目的、特徵及其功能有進一步的了解，茲配合圖示詳細說明如下：

【實施方式】

[0010] 本發明實施例係利用既有的設備來進行噴霧感染，以波特噴霧塔(Potter spray tower)作為提供均勻噴灑的噴霧設備，如附件1所示，其為噴霧設備的實體照片。並且於噴霧感染完成之後利用蟲體之螢光來判讀感染率，如附件2所示，其為感染後之蟲體螢光照片。

[0011] 請參考第1圖，其為本發明第一實施例之流程圖。本發明實施例選擇加州苜蓿夜蛾核多角體病毒(*Autographa californica nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV)作為桿狀病毒噴霧之來源。

[0012] 如第1圖所示，提供30隻3齡至4齡擬尺蠖(*T. ni*)幼蟲(步驟110)；提供具有芽體形式桿狀病毒之核多角體病毒液1毫升至2毫升(步驟120)；以核多角體病毒液對擬尺蠖幼蟲進行噴霧感染(步驟130)。本發明實施例所使用之核多角體病毒液的病毒力價可為 10^7 到 10^9 pfu(plaque formation unit)/ml。

[0013] 核多角體病毒為桿狀病毒的一種，核多角體病毒具有一些非必要基因(nonessential genes)，如包涵體蛋白基因(polyhedrin gene)或P10基因，病毒若缺乏這些基因，並不影

響病毒在昆蟲細胞及幼蟲體內的複製與增殖，可用來形成帶有外來基因之重組病毒 (recombinant virus)，以利於辨識感染情形或生產重組蛋白等。

[0014] 為辨識擬尺蠖幼蟲的感染情形以及確認噴霧感染係藉由芽體形式桿狀病毒作為感染途徑，本發明實施例以不含包涵體基因之核多角體病毒的DNA和帶有螢光基因的桿狀病毒轉移載體(Baculovirus transfer vector)共轉染於sf9昆蟲細胞後，選殖出具有螢光基因的病毒株。由於包涵體基因已被螢光基因取代，故只能生產出芽體形式的桿狀病毒，並以此桿狀病毒進行噴霧感染。證實只要芽體形式桿狀病毒即可進行噴霧感染，且感染率可達80%至100%。

[0015] 使用噴霧感染法可一次處理30隻以上之昆蟲幼蟲而不用一隻一隻施打，將可節省蟲體注射之大量勞力。為證明桿狀病毒對幼蟲進行噴霧感染的感受性，分別使用1毫升與2毫升劑量來進行噴霧感染實驗，其結果如表一：

表一(病毒力價為 1×10^8 pfu/ml, 每次試驗30隻蟲)

	感染率(1ml)	感染率(2ml)
擬尺蠖	88.3%	96.7%

[0016] 由表一之感染率結果得知，噴霧感染可得到高感染率，增加劑量可使幼蟲的感染率更往上提升，證明噴霧感染的可行性。

[0017] 為進一步探討芽體形式桿狀病毒經口感染的可能性，分別將本發明實施例之不含包涵體基因的核多角體重組病毒和帶有包涵體的重組病毒塗抹在飼料上餵食擬尺蠖，結果發現不含包涵體基因的病毒只有三成左右的感染率，而另一組帶有包涵體的重組病毒則有九成的感染率，如表二所示：表二(每次試驗30隻蟲)

	不含包涵體 基因的病毒(BV)	帶有包涵體 的重組病毒(OV)
餵食法 感染率	33.3%	90.0%

[0018] 因此芽體形式桿狀病毒經口感染的效率低，推測芽體形式的桿狀病毒(BV)可經由氣管進入蟲體而進行噴霧感染。如前所述以芽體形式桿狀病毒進行噴霧感染，可省去包涵體病毒純化步驟，且不需耗費能量產生包涵體蛋白，可使蟲體完全用於重組蛋白之生產。

[0019] 本發明實施例可應用於生物農藥的生產，如第2圖所示，其為本發明第二實施例之流程圖。係於步驟110至步驟130完成之後，再收集已感染核多角體病毒的擬尺蠖幼蟲所產生之病毒(步驟140)，此病毒可作為具有專一性的生物農藥。

[0020] 此外，重組病毒在感染細胞或幼蟲之後，於細胞內或幼蟲體內進行病毒的複製(Replication)、轉錄(Transcription)及轉譯(Translation)過程中，可連帶地產生大量的重組蛋白。本發明亦可應用於生產重組蛋白，如第2圖所示，其為本發明第三實施例之流程圖。係進行步驟110至步驟130，完成噴霧感染之後，再收集已感染核多角體病毒的擬尺蠖幼蟲所產生之重組蛋白(步驟150)，另外，本發明所使用之AcMNPV的多角體啟動子為強啟動子，在AcMNPV病毒感染昆蟲細胞72小時後，其重組蛋白的含量即可達所有細胞蛋白的30%以上，遠較於大腸桿菌和酵母菌的1-10%或是哺乳動物細胞的1%來的高，因此除以蟲體生產降低成本外，對於重組蛋白純化步驟的簡化與時間成本的降低都有很大的裨益。

[0021] 進一步比較噴霧感染和習知的注射法或餵食法之感染率，注射法之劑量為每隻幼蟲4微升(μ l)病毒液，飼料表面污染濃度為1ml病毒液，噴霧法之劑量為1ml病毒液/30隻，皆使用病毒力價為 10^8 pfu/ml之病毒液感染擬尺蠖三齡幼蟲，其結果如表三：

	感染率
注射法	84.6%
餵食法	33.3%
噴霧感染法	88.3%

[0022] 由表三之結果得知噴霧感染法可得到最佳的感染率，其感染率遠高於使用相同劑量之病毒液的餵食法。相較於注射法，噴霧感染法可節省注射法所需的大量人工及時間。

[0023] 由於已感染桿狀病毒的幼蟲，其桿狀病毒或重組蛋白的產率將取決於蟲體的重量。因比較各齡期擬尺蠖幼蟲進行噴霧感染後的重量變化，將可得知較佳的幼蟲感染齡期。以1毫升桿狀病毒液(力價為 10^8 pfu/ml)噴霧感染1齡至4齡幼蟲，作為實驗組，另提供一控制組，則以二次水進行噴霧感染。記錄各組6天後的重量變化如表四：

表四(每次試驗30隻蟲)

	感染時的重量	控制組	實驗組	重量比 (控制組/實驗組)
1齡	0.8mg	78.2mg	1.7mg	46.0
2齡	1.1mg	110.9mg	8.1mg	13.7
3齡	13.4mg	243.3mg	141.6mg	1.7
4齡	43.8mg	243.4mg	258.1mg	0.9

[0024] 由表四結果得知，於1齡和2齡感染的幼蟲，最終實驗組和控制組的的重量比差異很大，表示在1齡和2齡感染桿狀病毒將影響幼蟲的生長，使幼蟲最終的重量偏低。而3齡和4齡感染的幼蟲，最終實驗組和控制組的的重量比差異較小，尤其是4齡的幼蟲幾乎沒有影響，表示在3齡和4齡感染的幼蟲，可以得到較佳的桿狀病毒和重組蛋白的產率。

[0025] 由於加州苜蓿夜蛾核多角體病毒除擬尺蠖外亦可感染其它的鱗翅目昆蟲，因此進一步以不含包涵體基因的桿狀病毒對三齡期之小菜蛾幼蟲進行噴霧感染，結果如表五所示：

表五(每次試驗30隻蟲)

	感染率(1ml)
擬尺蠖	88.3%
小菜蛾	31.6%

[0026] 如表五所示，除擬尺蠖之外，對於小菜蛾也有三成的感染率，這結果顯示桿狀病毒科之病毒，如AcMNPV, SeMNPV, LdMNPV, SiMNPV, BmNPV等，對其寄主皆具有以芽體形式病毒進行噴霧感染的可能性，例如AcMNPV對擬尺蠖和小菜蛾、BmNPV對家蠶(silkworm)、蘋果蠹蛾核多角體病毒對於蘋果蠹蛾幼蟲、甜菜夜蛾核多角體病毒對甜菜夜蛾幼蟲、斜紋夜蛾核多角體病毒對斜紋夜蛾幼蟲噴霧感染生產、吉普賽蛾核多角體病毒以吉普賽蛾幼蟲噴霧感染生產等，可應用本發明建立之技術進行噴霧感染進而生產外源蛋白或生物農藥。

[0027] 雖然本發明之較佳實施例揭露如上所述，然其並非用以限定本發明，任何熟習相關技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之專利保護範圍須視本說明書所附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

[0033] 附件1為噴霧設備的實體照片；附件2為感染後之蟲體螢光照片；第1圖為本發明第一實施例之流程圖；第2圖為本發明第二實施例之流程圖；及第3圖為本發明第三實施例之流程圖。

【主要元件符號說明】

[0028] 步驟110...提供30隻3齡至4齡擬尺蠖幼蟲

[0029] 步驟120...提供具有芽體形式桿狀病毒之核多角體病毒液1毫升至2毫升

[0030] 步驟130...以核多角體病毒液對擬尺蠖幼蟲進行噴霧感染

[0031] 步驟140...收集已感染核多角體病毒的擬尺蠖幼蟲所產生之病毒

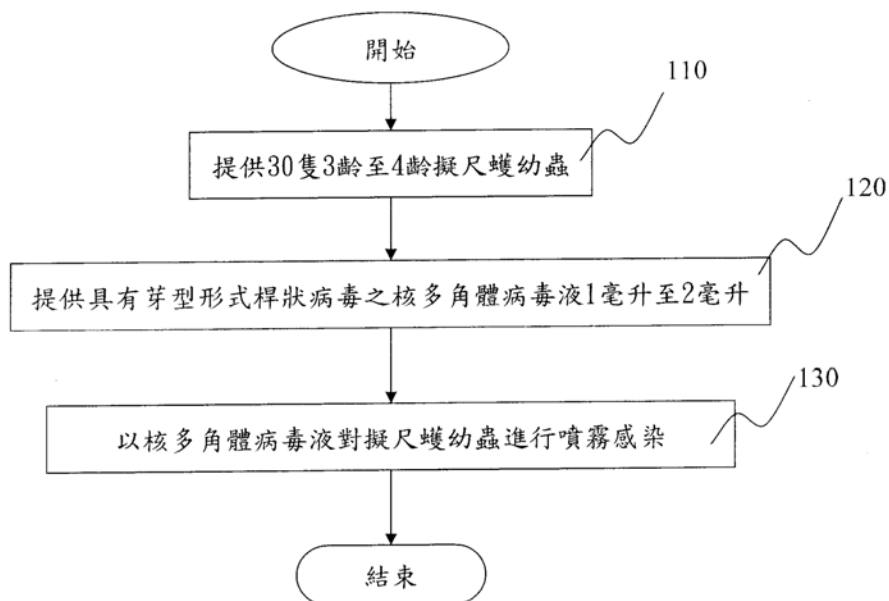
[0032] 步驟150...收集已感染核多角體病毒的擬尺蠖幼蟲所產生之重組蛋白

七、申請專利範圍：

1. 一種桿狀病毒之噴霧感染方法，係應用於桿狀病毒表現系統的蟲體之生產程序，其步驟包含有：提供複數個昆蟲幼蟲；提供一病毒液，其包含一芽體形式桿狀病毒；及以該病毒液對該昆蟲幼蟲進行噴霧感染。
2. 如申請專利範圍第1項所述之桿狀病毒之噴霧感染方法，其中該昆蟲幼蟲為擬尺蠖幼蟲。
3. 如申請專利範圍第1項所述之桿狀病毒之噴霧感染方法，其中該昆蟲幼蟲為家蠶。
4. 如申請專利範圍第1項所述之桿狀病毒之噴霧感染方法，其中該昆蟲幼蟲為小菜蛾。
5. 如申請專利範圍第1項所述之桿狀病毒之噴霧感染方法，其中該昆蟲幼蟲為3齡至4齡之昆蟲幼蟲。
6. 如申請專利範圍第1項所述之桿狀病毒之噴霧感染方法，其中該芽體形式桿狀病毒係為一核多角體病毒。
7. 如申請專利範圍第6項所述之桿狀病毒之噴霧感染方法，其中該核多角體病毒之病毒種類係針對不同的該昆蟲幼蟲而選擇加州苜蓿夜蛾核多角體病毒(*Autographa californica nucleopolyhedrovirus, AcMNPV*)或家蠶核多角體病毒(*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus, BmNPV*)。
8. 如申請專利範圍第6項所述之桿狀病毒之噴霧感染方法，其中該昆蟲幼蟲為蘋果蠹蛾幼蟲，該核多角體病毒為蘋果蠹蛾核多角體病毒。
9. 如申請專利範圍第6項所述之桿狀病毒之噴霧感染方法，其中該昆蟲幼蟲為甜菜夜蛾幼蟲，該核多角體病毒為甜菜夜蛾核多角體病毒。
10. 如申請專利範圍第6項所述之桿狀病毒之噴霧感染方法，其中該昆蟲幼蟲為斜紋夜蛾幼蟲，該核多角體病毒為斜紋夜蛾核多角體病毒。
11. 如申請專利範圍第6項所述之桿狀病毒之噴霧感染方法，其中該昆蟲幼蟲為吉普賽蛾幼蟲，該核多角體病毒為吉普賽蛾核多角體病毒。
12. 如申請專利範圍第1項所述之桿狀病毒之噴霧感染方法，其中該病毒液之病毒力價為 10^7 到 10^9 pfu(plaque forming unit)/ml。
13. 一種生產桿狀病毒的方法，係應用桿狀病毒表現系統的蟲體之生產程序，其步驟包含有：提供複數個昆蟲幼蟲；提供一病毒液，其包含一芽體形式桿狀病毒；以該病毒液對該昆蟲幼蟲進行噴霧感染；及收集已感染病毒的昆蟲幼蟲所產生之病毒。
14. 如申請專利範圍第13項所述之生產桿狀病毒的方法，其中該昆蟲幼蟲為擬尺蠖幼蟲。
15. 如申請專利範圍第13項所述之生產桿狀病毒的方法，其中該昆蟲幼蟲為家蠶。
16. 如申請專利範圍第13項所述之生產桿狀病毒的方法，其中該昆蟲幼蟲為小菜蛾。
17. 如申請專利範圍第13項所述之生產桿狀病毒的方法，其中該昆蟲幼蟲為3齡至4齡之昆蟲幼蟲。
18. 如申請專利範圍第13項所述之生產桿狀病毒的方法，其中該芽體形式桿狀病毒係為一核多角體病毒。
19. 如申請專利範圍第18項所述之生產桿狀病毒的方法，其中該核多角體病毒之病毒種類係針對不同的該昆蟲幼蟲而選擇加州苜蓿夜蛾核多角體病毒(*Autographa californica nucleopolyhedrovirus, AcMNPV*)或家蠶核多角體病毒(*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus, BmNPV*)。
20. 如申請專利範圍第18項所述之生產桿狀病毒的方法，其中該昆蟲幼蟲為蘋果蠹蛾幼蟲，該核多角體病毒為蘋果蠹蛾核多角體病毒。
21. 如申請專利範圍第18項所述之生產桿狀病毒的方法，其中該昆蟲幼蟲為甜菜夜蛾幼蟲，該核多角體病毒為甜菜夜蛾核多角體病毒。
22. 如申請專利範圍第18項所述之生產桿狀病毒的方法，其中該昆蟲幼蟲為斜紋夜蛾幼蟲，該核多角體病毒為斜紋夜蛾核多角體病毒。
23. 如申請專利範圍第18項所述之生產桿狀病毒的方法，其中該昆蟲幼蟲為吉普賽蛾幼蟲，該核多角體病毒為吉普賽蛾核多角體病毒。
24. 如申請專利範圍第13項所述之生產桿狀病毒的方法，其中該病毒液之病毒力價為 10^7 到 10^9 pfu(plaque forming unit)/ml。
25. 一種生產重組蛋白的方法，係應用桿狀病毒表現系統的蟲體之生產程序，其步驟包含

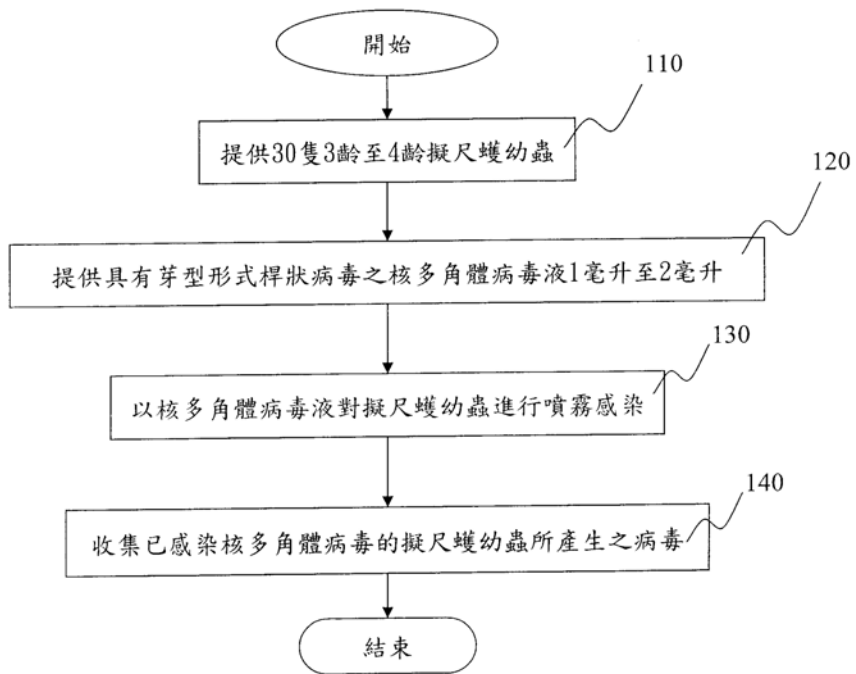
- 有：提供複數個昆蟲幼蟲；提供一病毒液，其包含一芽體形式桿狀病毒；噴灑該病毒液於該昆蟲幼蟲以進行噴霧感染；及收集已感染病毒的該昆蟲幼蟲所產生之重組蛋白。
26. 如申請專利範圍第25項所述之生產重組蛋白的方法，其中該昆蟲幼蟲為擬尺蠖幼蟲。
27. 如申請專利範圍第25項所述之生產重組蛋白的方法，其中該昆蟲幼蟲為家蠶。
28. 如申請專利範圍第25項所述之生產重組蛋白的方法，其中該昆蟲幼蟲為小菜蛾。
29. 如申請專利範圍第25項所述之生產重組蛋白的方法，其中該昆蟲幼蟲為3齡至4齡之昆蟲幼蟲。
30. 如申請專利範圍第25項所述之生產重組蛋白的方法，其中該芽體形式桿狀病毒係為一核多角體病毒。
31. 如申請專利範圍第30項所述之生產重組蛋白的方法，其中該核多角體病毒之病毒種類係針對不同的該昆蟲幼蟲而選擇加州苜蓿夜蛾核多角體病毒(*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)或家蠶核多角體病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)。
32. 如申請專利範圍第30項所述之生產重組蛋白的方法，其中該昆蟲幼蟲為蘋果蠹蛾幼蟲，該核多角體病毒為蘋果蠹蛾核多角體病毒。
33. 如申請專利範圍第30項所述之生產重組蛋白的方法，其中該昆蟲幼蟲為甜菜夜蛾幼蟲，該核多角體病毒為甜菜夜蛾核多角體病毒。
34. 如申請專利範圍第30項所述之生產重組蛋白的方法，其中該昆蟲幼蟲為斜紋夜蛾幼蟲，該核多角體病毒為斜紋夜蛾核多角體病毒。
35. 如申請專利範圍第30項所述之生產重組蛋白的方法，其中該昆蟲幼蟲為吉普賽蛾幼蟲，該核多角體病毒為吉普賽蛾核多角體病毒。
36. 如申請專利範圍第25項所述之生產重組蛋白的方法，其中該病毒液之病毒力價為 10^7 到 10^9 pfu(plaque forming unit)/ml。

八、圖式：



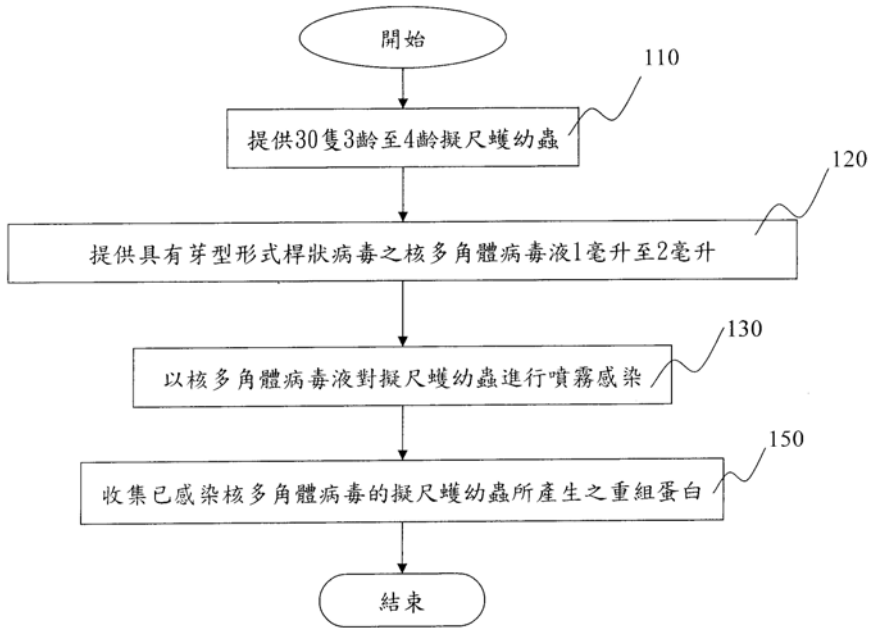
第1圖

第1圖



第2圖

第2圖



第3圖

第3圖