

發明專利說明書

※申請案號：092134744

※IPC分類：C12N15/09

一、發明名稱：

珊瑚紅螢光基因做為重組病毒之追蹤方法

二、中文發明摘要：

一種珊瑚的紅螢光蛋白基因(DsRed)做為重組病毒之追蹤方法，其關鍵係利用珊瑚之紅螢光蛋白基因，當含有此紅螢光蛋白基因的重組病毒感染蟲體後，在日光下即顯現出肉眼可辨識之紅螢光，此項技術將可應用於基因改造微生物之追蹤。

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：

無

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] 本發明係有關於一種珊瑚的紅螢光蛋白基因(DsRed)做為重組病毒之追蹤方法及其含珊瑚的紅螢光基因(DsRed)之重組病毒的構築方法，是一種可於日光下直接利用肉眼追蹤之生物性重組病毒的方法，對於基因改造微生物生物製劑作為生物農藥的應用將很有裨益。

【先前技術】

[0002] 化學農藥是第二次世界大戰後，蟲害防治工作的一項利器，其效果迅速，使用方便和價格便宜，使得以往植物保護的工作幾乎完全依賴化學農藥，然而自1962年，卡遜女仕(Rachel Carson)之名著：「寂靜的春天(Silent Spring)」出版後，人們漸漸感受到化學農藥對環境生態所造成的浩劫，尤其在害蟲產生抗藥性，許多之化學農藥失靈後，人們便深感可降低甚或替代化學農藥的生物防治法將是未來植物保護研究的重點；在眾多的生物防治製劑中，桿狀病毒(Baculovirus)是最具潛力的蟲害防治微生物製劑。

[0003] 桿狀病毒屬於桿狀病毒屬(Baculoviridae)，可分為兩個亞種，Nudeopolyhedrovirus (NPV)和Granulovirus (GV)。桿狀病毒已知可以感染超過500種以上的昆蟲，尤其是鱗翅目昆蟲如小菜蛾、擬尺蠖、斜紋夜蛾、甜菜夜蛾、玉米穗蟲、吉普塞蛾等，都可以桿狀病毒加以防治。

[0004] 雖然是目前最被看好的生物性農藥製劑之一，然則桿狀病毒對害蟲的致死效率和迅速致死的化學農藥相較差異極大，一般需要4-8天或以上的時間方能殺死其寄主，因此受感染的害蟲仍能持續危害農作物一段時間。若欲克服上述之難題，基因工程改造之桿狀病毒(Genetic modified baculovirus, GMBV)可能是最佳之解決途徑。自1983年Smith等人成功的發展桿狀病毒：加州苜蓿葉蛾核多角體病毒(Autographa Californica multiple capsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)作為真核外源蛋白表現系統起，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。基因工程的引進除作為重要的重組蛋白生產工具外，亦提供了解決野生型桿狀病毒緩慢致死效率的方法。諸如能有加速害重死亡的蝎毒、蠟蜂毒素和？毒素等針對昆蟲之神經系統作用的神經毒素都被加進AcMNPV的基因組中以期能增益桿狀病毒的致死效率，其中以蝎毒之效果最佳，可增益殺蟲效率達30~40%。

[0005] Caro等人於1993~1994年，以含蝎毒基因之桿狀病毒進行田間測試時與野生型AcMNPV對擬尺蠖的毒殺效果相較，含蝎毒基因的GMBV確實縮短了桿狀病毒對擬尺蠖的致死時間，同

時對作物的損害也大大的降低。此田間試驗的效果雖然證實GMBV確實可以有效的解決桿狀病毒作為農藥低致死效率的問題，但也因此GMBV帶有蝎毒毒素基因，而引發社會大眾的疑慮與不安。在此 GMBV田間試驗的結果在自然期刊(Nature 1994, 370;138-140)發表後，Coghlian隨即在新科學家(New Scientist)雜誌撰文指出：蝎毒基因是否會在田野流竄？(Will the scorpion gene run wild?)。這也引發社會大眾對桿狀病毒作為生物防治劑的疑慮，雖然在1975年時Summers等人即指出，桿狀病毒作為生物農藥時相關安全性無疑的種種研究，尤其是和化學農藥相較之下，桿狀病毒對於哺乳動物和益蟲是極安全的(extremely safe)，然則當重組病毒(recombinant virus)和蝎毒(Scorpion toxin)字眼擺在一起時，社會大眾的不安是不得不考量的。因此研發一種藉由肉眼即可觀察檢測的GMBV病毒將是重組桿狀病毒生物農藥能否上市的關鍵技術。

【發明內容】

[0006] 有鑑於上述問題，本發明提出一種珊瑚紅螢光基因做為重組病毒之追蹤方法及其含珊瑚的紅螢光基因(DsRed)之重組病毒的構築方法，本發明揭露珊瑚紅螢光蛋白基因的表現在日光下即可以肉眼觀察到，極具做為生物農藥追蹤劑的潛力，對生物農藥的開發與評估將有極大的裨益。

[0007] 本發明主要係將珊瑚的紅螢光蛋白基因選殖入桿狀病毒轉殖載體中，並與病毒基因體共同轉染昆蟲細胞，於細胞內發生重組後純化出重組病毒，藉由重組病毒感染蟲體時，會於感染的蟲體內進行病毒的複製(replication)、轉錄(transcription)及轉譯(translation)過程，而於蟲體內大量表現紅螢光蛋白基因，而使蟲體在日光下發出肉眼即可辨識之紅螢光。

【實施方式】

[0008] 根據本發明所揭露之珊瑚紅螢光基因做為重組病毒之追蹤方法，其製造方法請參閱「第1圖」所示，首先提供具有珊瑚的紅螢光蛋白基因(coral red fluorescence protein gene)及IRES-EGFP基因的轉殖載體(transfer vector)(步驟101)，並與病毒基因體共同轉染昆蟲細胞(步驟102)，其中紅螢光蛋白基因係以多角體蛋白基因(polyhedron gene)之啟動子驅動，然後再利用終點稀釋法(end point dilution)純化出重組病毒株(步驟103)。此重組病毒感染蟲體時，會於感染的蟲體內進行病毒的複製(replication)、轉錄(transcription)及轉譯(translation)過程，並於蟲體內表現紅螢光蛋白基因，而使蟲體發出紅螢光，因為此紅螢光可於日光下，直接利用肉眼觀察，非常適合用於生物農藥的追蹤。

[0009] 含珊瑚的紅螢光蛋白基因之重組病毒的構築詳述如下：首先構築含珊瑚的紅螢光蛋白基因的桿狀病毒轉殖載體，請參閱第2圖。具有AcMNPV多角體基因上游及下游之pBac 4.5桿狀病毒轉殖載體(transfer vector)，先以限制酶EcoR I及Sal I將pBac4.5切開，再以EcoR I及Sal I將IRES-EGFP基因從pIRES-EGFP載體上切下，將IRES-EGFP基因接入pBac4.5，即完成了pBacIR-GFP的構築。然後再以Nhe I及EcoR I將pBacIR-GFP切開，再加入珊瑚的紅螢光蛋白基因。珊瑚的紅螢光蛋白基因係以聚合酶鏈式反應(PCR)自含有珊瑚的紅螢光蛋白基因，DsRed的pDsRed質體增幅而得，詳述如下：用DsRed-Nhe I-F及DsRed-EcoR I-R引子(primer)從pDsRed模板上增幅出DsRed的片段，再以限制酶Nhe I及EcoR I將PCR得到的DsRed基因的片段切下，將DsRed基因接入已切開的pBacIR-GFP中，即完成了含珊瑚的紅螢光蛋白基因的桿狀病毒轉殖載體pBacDR-IR-GFP的構築。緊接著再以共轉染(co-transfection)的方式，將pBacDR-IR-GFP與病毒基因體DNA一起送入sf9昆蟲細胞中，使之發生同源重組

[0010] (homologous recombination)，並於三到五天後收取上清液，然後以終點稀釋法純化重組病毒，藉由IRES和綠螢光基因的特性，在倒立螢光顯微鏡可發現重組成功的病毒感染細胞後會發出綠螢光，而使得重組病毒可以被快速的純化出來，我們將得到的重組病毒命名為vBacDRIRGFP。

[0011] 將vBacDRIRGFP重組病毒感染昆蟲細胞三至五天後，以倒立螢光顯微鏡觀察，結果顯示受vBacDRIRGFP感染的昆蟲細胞，同時發出紅螢光和綠螢光(請參閱第3A及3B圖)，表示在細胞內有紅螢光蛋白與綠螢光蛋白產生。而請參閱第4A及4B圖，當我們進一步以vBacDRIRGFP重組病毒感染擬尺蠖幼蟲時則大部分受感染的蟲體在日光下即可發出紅色的螢光並不需要螢光燈的輔助，進一步比較受僅含綠螢光基因之重組病毒感染的擬尺蠖幼蟲時則發現綠螢光僅在螢光燈的輔助下才可辨別受感染的幼蟲(比較第4A圖及第4B圖，其中第4A圖為螢光下、第4B圖為日光下)。而第4A及4B圖中位於中央的蟲體，乃同時感染有綠螢光以及紅螢光，我們亦以在螢光燈下可發出黃光之擬尺蠖幼蟲其綠螢光在日光下即不見而只剩下紅螢光證明紅螢光基因較綠螢光基因更適合做為桿狀病毒生物農藥的追蹤劑。為進一步證明紅螢光基因作為重組桿狀病毒追蹤的潛力，我們亦測試以vBacDRIRGFP感染甜

菜葉蛾、小菜蛾及斜紋葉蛾之幼蟲，結果顯示此三種田間常見的害蟲於感染含紅螢光基因的重組病毒後於日光下即可顯示紅色之螢光(分別參見第5A、5B及5C圖)，因此即使是外表皮呈深黑色的甜菜葉蛾及斜紋葉蛾幼蟲仍可以此揭露之技術用肉眼進行重組病毒的追蹤。

[0012] 另外一方面，除了上述的應用外，利用珊瑚的紅螢光蛋白基因來作為基因改造微生物之追蹤也是相當適合，基因改造的微生物(如細菌和真菌)帶有這樣的珊瑚紅螢光蛋白基因時，因可於日光下顯示出直接利用肉眼觀察的紅螢光對於基因改造微生物的追蹤將有很大的裨益。

[0013] 以上所述者，僅為本發明其中的較佳實施例而已，並非用來限定本發明的實施範圍；即凡依本發明申請專利範圍所作的均等變化與修飾，皆為本發明專利範圍所涵蓋。

【圖式簡單說明】

[0014] 第1圖為本發明一實施例之製作重組病毒之步驟流程示意圖。

[0015] 第2圖為本發明一實施例之含珊瑚的紅螢光蛋白基因之重組病毒的構築方法的流程示意圖。

[0016] 第3A及3B圖是顯示受vBacDRIRGFP感染的昆蟲細胞。

[0017] 第4A及4B圖是顯示以vBacDRIRGFP重組病毒感染的蟲體。

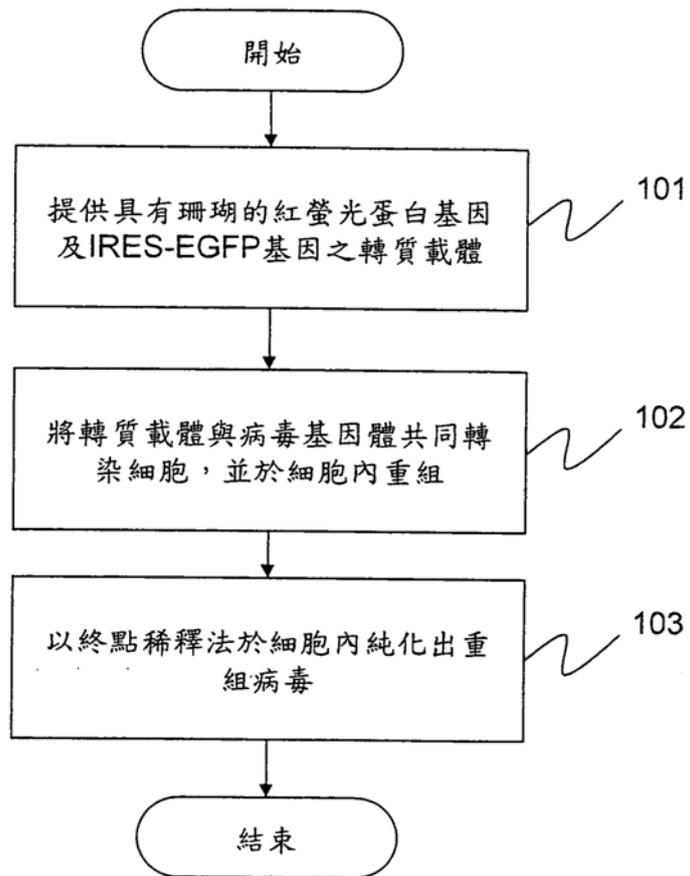
[0018] 第5A、5B及5C圖分別是顯示以vBacDRIRGFP感染的甜菜葉蛾、小菜蛾及斜紋葉蛾之幼蟲。

【主要元件符號說明】

七、申請專利範圍：

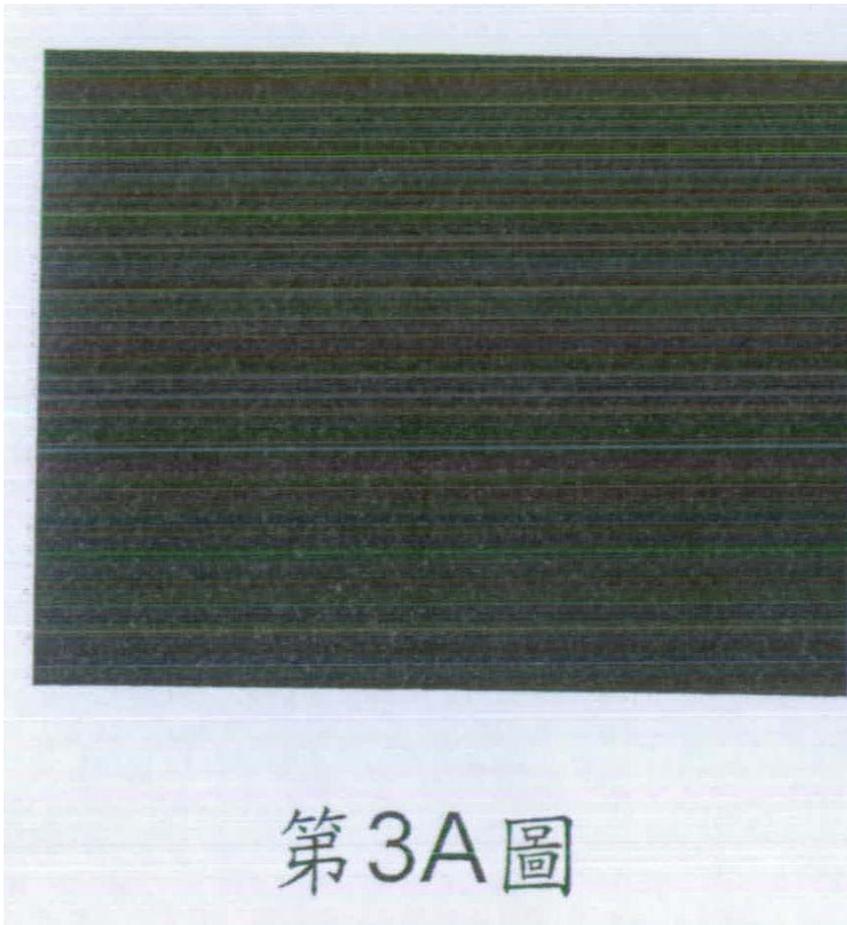
1. 一種珊瑚的紅螢光蛋白基因(DsRed)做為重組病毒之追蹤方法，係將珊瑚的紅螢光蛋白基因(DsRed)和IRES-EGFP基因選殖入具有多角體蛋白基因的一桿狀病毒轉殖載體中，並與一病毒基因體共同轉染一昆蟲細胞，於該昆蟲細胞內發生重組後純化出一重組病毒，藉由該重組病毒感染一昆蟲蟲體時，進行該重組病毒的複製、轉錄及轉譯過程，其特徵在於：該珊瑚的紅螢光蛋白基因(DsRed)係以該多角體蛋白基因之啟動子驅動，以使該昆蟲蟲體顯現出在日光下可由肉眼直接辨識的紅螢光。
2. 如申請專利範圍第1項所述之珊瑚的紅螢光蛋白基因(DsRed)做為重組病毒之追蹤方法，其中該重組病毒係可為一生物農藥。
3. 如申請專利範圍第1項所述之珊瑚的紅螢光蛋白基因(DsRed)做為重組病毒之追蹤方法，其中將該珊瑚的紅螢光蛋白基因(DsRed)和該IRES-EGFP基因選殖入具有該多角體蛋白基因的該桿狀病毒轉殖載體的構築方法包括：將該IRES-EGFP基因從一pIRES-EGFP載體上切下；切開具有該多角體蛋白基因的該桿狀病毒轉殖載體，以接入該IRES-EGFP基因；以及切開接入該IRES-EGFP基因的該桿狀病毒轉殖載體，以加入該珊瑚的紅螢光蛋白基因。
4. 一種含珊瑚的紅螢光基因(DsRed)之重組病毒的構築方法，包括：將IRES-EGFP基因從一pIRES-EGFP載體上切下；切開具有多角體蛋白基因的一桿狀病毒轉殖載體，以接入該IRES-EGFP基因；以及切開接入該IRES-EGFP基因的該桿狀病毒轉殖載體，以加入珊瑚的紅螢光蛋白基因。

八、圖式：



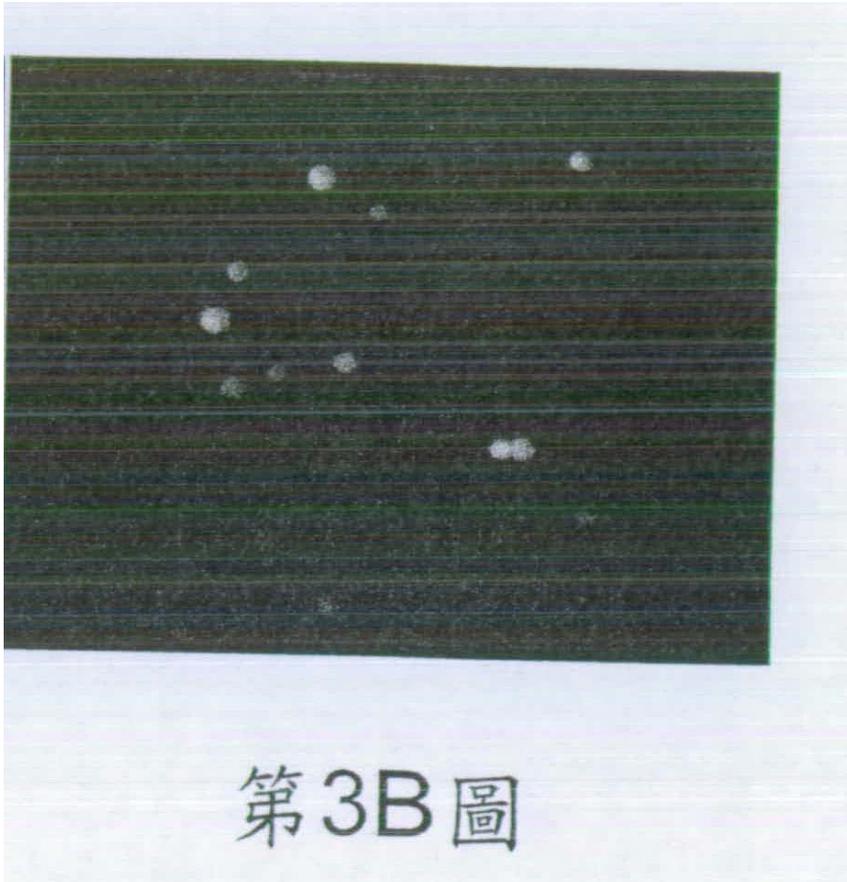
第1圖

第1圖



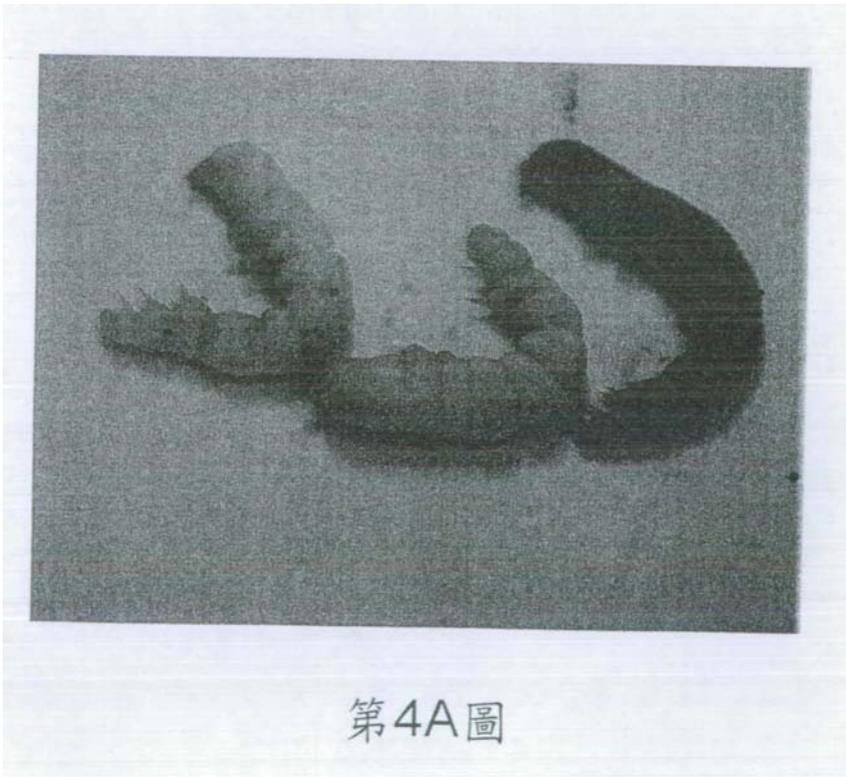
第3A圖

第3A圖



第3B圖

第3B圖



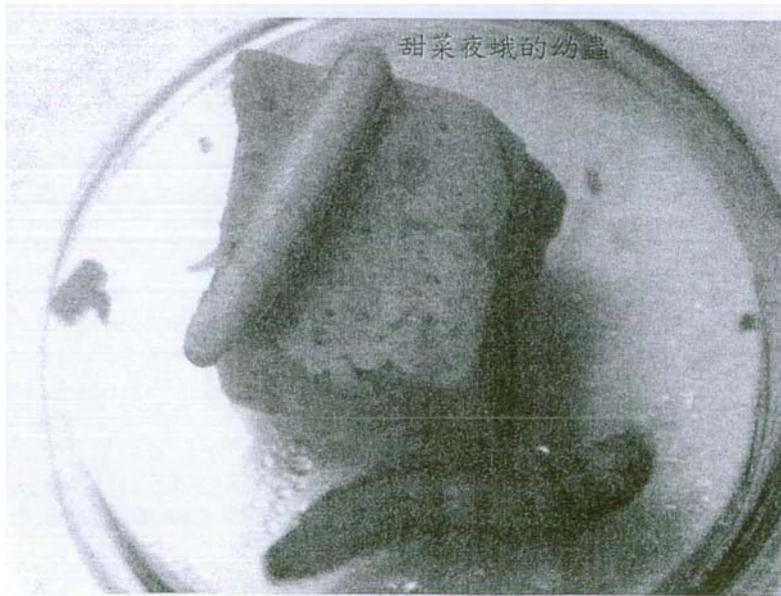
第4A圖

第4A圖



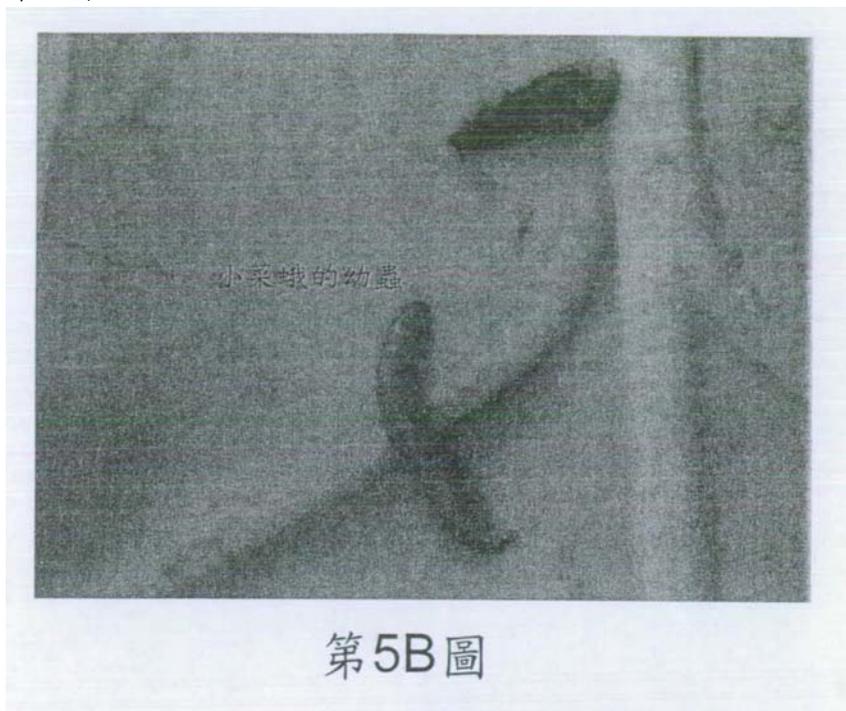
第4B圖

第4B圖



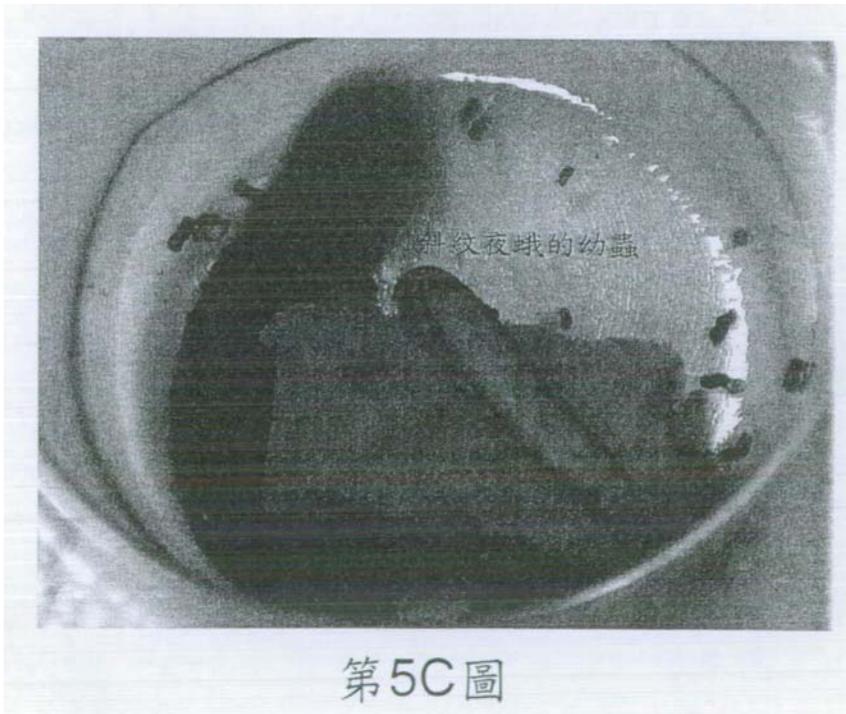
第5A圖

第5A圖



第5B圖

第5B圖



第5C圖