

公告本

205569

申請日期	81年3月20日
案 號	81102108
類 別	C ₁₂ 1 7/10, 1 7/10, 1 1/2, A61K 3 7/10

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發明 專利說明書

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

一、發明 創作名稱	中 文	生物控制劑
	英 文	Biological control agents
二、發明 創作人	姓 名	1.派翠西亞·凱利 Cayley Patricia Jane 2.羅納·史都華 Stewart Lorna Mary Dyet 3.羅伯特·波西 Possee Robert David 4.麥高·法伯 Feber Miguel Lopez
	籍 貫 (國籍)	1.英國 2.3.同1. 4.西班牙
	住、居所	1.英國PH42DY哈德福郡貝漢史德雷文巷魯梭卡福環境衛生中心 2.英國PC1A7BE倫敦巴梭洛姆路59號多明尼昂大樓帝國癌症研究基金會 3.英國OX13SR牛津郡牛津曼斯田路濾過性微生物學及環境微生物學NERC協會 4.同3.
	三、申請人	姓 名 (名稱) 籍 貫 (國籍) 住、居所 (事務所) 代表人 姓 名
		1.威爾康基金股份有限公司 The Wellcome Foundation Limited 2.自然環境研究評議會 Natural Environment Research Council 英國 1.英國倫敦NW1 2BP尤斯頓路160號尤尼惹大廈 2.英國威爾特郡·文登·北星路波拉理斯大樓2號 1.邁可·彼得·傑克遜 Jackson Michael Peter 2.喬安·古伯 Cooper Joanne Elizabeth

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (1)

本發明是有關杆狀病毒殺虫劑。

昆蟲特異性杆狀病毒提供化學劑於農業害虫控制上的另一用法。其以此目的應用已有數年。杆狀病毒的優點是與標的有機體具有特異性，且對環境不造成污染。其被視為可安全地用於野地害虫控制計劃中（WHO，1973）。其主要的缺點是殺死標的害虫極為緩慢，因此使得取食傷害無法快速停止。杆狀病毒遺傳操作技術之出現，已可聯想到這些作用物之有效性藉著於宿主中表現昆蟲特異性毒素、激素酵素，或許可以予以改進，且因此減少殺死昆蟲所需之時間，或至少使其無法取食。

目前企圖改變杆狀病毒殺虫劑效力之嚐試，只有有限的成功。Carbonell 等人（1988）、自鉗蝎（*Buthus eupeus*）中利用苜蓿銀紋夜蛾核型多角體毒素（*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus（AcMNPV））表現昆蟲特異性蝎毒，但無法偵測重組體毒素之生物活性。Maeda（1989）將得自煙草天蛾（*Manduca sexta*）之利尿激素基因，嵌入家蚕（*Bombyx mori*）NMPV中，並使殺死宿主之時間減短20%。Hammock et al.（1990）於粉紋夜蛾（*Trichoplusia ni*）幼虫中，利用多體素-陰性之AcMNPV表現保幼激素酯酶，且在高劑量病毒時可偵測到體重之增加有顯著地減少。最後，Merryweather et al.（1990）及Martens et al.（1990），將蘇雲金芽孢桿菌子內毒素基因嵌入AcMNPV中，且產生真正的細菌性毒

五、發明說明 (2)

素，其雖然對昆虫幼虫本身有毒，但不會改變病毒之效力。

我們已將一個編號昆虫特異性毒素之合成基因，在杆狀病毒啓動基因控制下，置於重組體 A c M N P V 中。頃發現若毒素編號序列與編號訊號肽之序列（其調介蛋白質之分泌）融合，則在對昆虫之病原性上有顯著之增加。此發現具廣泛之應用性。

因此，本發明提出一種重組體杆狀病毒，其於被感染之昆虫細胞中可表現一種外來蛋白質，包括殺虫性毒素或其功能性衍生物，若加上訊號肽如此毒素或其衍生物可自昆虫細胞中分泌出來。

本發明也提出於區域控制昆虫之方法，方法包括對該區域提供有效劑量的本發明重組體杆狀病毒。昆虫攝食重組體杆狀病毒，病毒 D N A 會在昆虫內增殖，且毒素表現及分泌以殺死昆虫。殺死之速率較只使用重組體杆狀病毒而無提供分泌性訊號序列時為快。此對由於昆虫害虫死亡前造成農作物損害量，具有減少的重要益處。

本發明可應用至杆狀病毒科中任何適當之杆狀病毒，如杆狀病毒屬。因此重組體杆狀病毒可以是一種閉合的杆狀病毒。杆狀病毒可為核型多角體病毒（N P V），如 A c M N P V、家蚕 N P V、美洲棉鈴虫 N P V 及油桐尺蠖 N P V。依據本發明之重組體 N P V 基因體，包括一個具功能之多體素基因。因此多體素蛋白質之表現，通常由天然的杆狀病毒多體素啓動基因所驅動。因此重組體杆狀

五、發明說明 (3)

病毒在環境中具有功能，病毒必須存活，且具有製造其保護性外衣之能力。

重組體杆狀病毒基因體，也包括一個編號殺虫毒素之嵌合型基因，或其功能性衍生物，及一個訊號肽可調介結構基因自經重組體杆狀病毒感染之昆虫細胞中分泌。因此重組體杆狀病毒之基因體包括其中嵌有嵌合型基因之野生型基因體，及用於彼之轉錄及轉譯控制要件。大體而言，野生型基因體之遺傳機構不因加入嵌合基因及其控制序列而受影響。由野生型基因體天然編號之蛋白質，其表現並未改變。於此方式中，提出一種存活的、穩定的、具感染性之重組體杆狀病毒。

毒素可為神經毒，通常是影響細胞離子管道之神經毒素。適合的毒素，是可為正常產製此毒素之細胞所分泌之毒素。毒素通常是有害動物或微生物的一種多肽毒素。通常毒素被純化至均質時，可藉注射對昆虫具毒性。最好，毒素選擇性作用以拮抗昆虫，且對哺乳動物應無作用。重組體杆狀病毒可表現及分泌二種以上之毒素。

較佳一類之毒素是一種多肽，其自合成之細胞中分泌出來，至毒液囊，由此毒素藉咬或叮注射至另一動物。毒素可為蝎毒、蜘蛛毒，來自另一類或節肢動物或微生物之毒素，尤其是蝎毒或蜘蛛毒。因此適當的毒素有：

1. 昆虫特異的蝎毒 (節肢動物門蜘蛛綱蠍目)

Buthus eupeus (中亞蝎)

五、發明說明 (4)

I₁A (Int. J. Quantum Chemistry 19 (1981) 291-298)

Met-Cys-Met-Pro-Cys-Phe-Thr-Thr-Arg-Pro-Asp-Met-
Ala-Gln-Gln-Cys-Arg-Ala-Cys-Cys-Lys-Gly-Arg-Gly-
Lys-Cys-Phe-Gly-Pro-Gln-Cys-Leu-Cys-Gly-Tyr-Asp

I₂A (Int. J. Quantum Chemistry 19 (1981) 291-298)

Ala-Asp-Gly-Tyr-Val-Lys-Gly-Cys-Lys-Ile-Ser-Cys-
Phe-Leu-Asp-Asn-Asp-Leu-Cys-Asn-Ala-Asp-Cys-Lys-
Tyr-Tyr-Gly-Gly-Lys-Leu-Asn-Ser-Trp-Cys-Ile-Pro-
Asp-Lys-Ser-Gly-Tyr-Cys-Trp-Cys-Pro-Asn-Lys-Gly-
Trp-Asn-Ser-Ile-Lys-Ser-Glu-Thr-Asn-Thr-Cys

I₃A Toxins as tools in Neurochemistry, Walter de
Gruyter, Berlin & New York, 1983, 291-309. Eds Hu-
cho, F. and Ovchinnikov, Y.A.

Met-Cys-Met-Pro-Cys-Phe-Thr-Thr-Asp-Pro-Asn-Met-
Ala-Lys-Lys-Cys-Arg-Asp-Cys-Cys-Gly-Gly-Asn-Gly-
Lys-Cys-Phe-Gly-Pro-Gln-Cys-Leu-Cys-Asn-Arg

I₃A 及 I₄A. 之序列和 I₁A 有關。

Androctonus australis Hector (A a H I T) : 見圖
1。已自此種類中分離出二個相關胺基酸序列之昆虫特異
性毒素, A a H I T 1 及 A a H I T 2 (Loret ,
1990)。

五、發明說明 (5)

Leiurus quinquestriatus quinquestriatus (LqqIT2)

Asp-Gly-Tyr-Ile-Arg-Lys-Arg-Asp-Gly-Cys-Lys-Leu-
Ser-Cys-Leu-Phe-Gly-Asn-Glu-Gly-Cys-Asn-Lys-Glu-
Cys-Lys-Ser-Tyr-Gly-Gly-Ser-Tyr-Gly-Tyr-Cys-Trp-
Thr-Trp-Gly-Leu-Ala-Cys-Trp-Cys-Glu-Gly-Leu-Pro-
Asp-Glu-Lys-Thr-Trp-Lys-Ser-Glu-Thr-Asn-Thr-Cys-
Gly

(Zlotkin, E., Kadouri, D., Gordon, D., Pelhate, M.,
Martin, M.F., Rochat, H., Arch. Biochem. Biophys.
240, 877, 1985)

Buthotus judaicus (BjIT2)

Asp-Gly-Tyr-Ile-Arg-Lys-Lys-Asp-Gly-Cys-Lys-Val-
Ser-Cys-Ile(val)-Ile-Ile-Gly-Asn-Glu-Gly-Cys-Arg-
Lys-Glu-Cys-Val-Ala-His-Gly-Gly-Ser-Phe-Gly-Tyr-
Cys-Trp-Thr-Trp-Gly-Leu-Ala-Cys-Trp-Cys-Glu-Asn-
Leu-Pro-Asp-Ala-Val-Thr-Trp-Lys-Ser-Ser-Thr-Asn-
Thr-Asn-Gly

此毒素已發現具有二個同型，其一在15位置上含I l e
，其二含V a l。(Lester, D., Lazarovici, P., Pel-
hate, M., Zlotkin, E., Biochim. Biophys. Acta
701, 370, 1982)。

L. quinquestriatus habraeus (LqhIT2)

五、發明說明 (6)

Asp-Gly-Tyr-Ile-Lys-Arg-Arg-Asp-Gly-Cys-Lys-Val-
Arg-Cys-Leu-Ile-Gly-Asn-Glu-Cys-Asp-Lys-Glu-Cys-
Lys-Ala-Tyr-Gly-Gly-Ser-Tyr-Gly-Tyr-Cys-Trp-Thr-
Trp-Gly-Leu-Ala-Cys-Trp-Cys-Glu-Gly-Leu-Pro-Asp-
Asp-Lys-Thr-Trp-Lys-Ser-Glu-Thr-Asn-Thr-Cys-Gly
Scorpio maurus palmatus (SmpIT2)

Ala-Leu-Pro-Leu-Ser-Gly-Glu-Tyr-Glu-Pro-Cys-Val-
Arg-Pro-Arg-Lys-Cys-Lys-Pro-Gly-Leu-Val-Cys-Asn-
Lys-Gln-Gln-Ile-Cys-Val-Asp-Pro-Lys
(Lazarovici, P., Yanai, P., Pelhate, M., Zlotkin,
E., J. Biol. Chem 257 8397, 1982)

2. 昆蟲特異之蜘蛛毒素 (節肢動物門、蜘蛛綱、真
蜘蛛目) 漏斗-蜘蛛網 (Agelenid)、蜘蛛 Hololena cur-
ta Curtatoxins

CT-I

Ser-Cys-Val-Gly-Glu-Tyr-Gly-Arg-Cys-Arg-Ser-Ala-
Tyr-Glu-Asp-Cys-Cys-Asp-Gly-Tyr-Tyr-Cys-Asn-Cys-
Ser-Gln-Pro-Pro-Tyr-Cys-Leu-Cys-Arg-Asn-Asn-Asn-
NH₂

CT-II

Ala-Asp-Cys-Val-Gly-Asp-Gly-Gln-Arg-Cys-Ala-Asp-
Trp-Ala-Gly-Pro-Tyr-Cys-Cys-Ser-Gly-Tyr-Tyr-Cys-
Ser-Cys-Arg-Ser-Met-Pro-Tyr-Cys-Arg-Cys-Arg-Ser-

五、發明說明 (7)

Asp-Ser-NH₂

CT-III

Arg to Lys at position 9

Ala to Phe at position 14

(Stapleton, A., Blankenship, D.T. Ackermann, B.L.,
Chen, TM., Gorder, G.W., Manley, G.D. Palfreyman,
M.G., Coutant, J.E., Cardin, A.D., J Biol. Chem.
265, 2054, 1990)

Cellar spider Sequestria florentina (SefIT)

Arg-Gly-Asp-Met-Val-Asp-Glu-Ser-Val-Cys-Tyr-Ile-
Thr-Asp-Asn-Asn-Cys-Asn-Gly-Gly-Lys-Cys-Leu-Arg-
Ser-Lys-Ala-Cys-His-Ala-Asp-Pro-Trp-Glu-Leu

(Saqdiev, N. ZH., Valieva, L.A., Korneev, A.S., S-
adykov, A.A., Salikhov, SH.I., Bioorg Khim 13,
1013, 1987)

3. 來自節肢動物門昆蟲網膜翅目的其他昆蟲毒素組份

蜂之毒素，如已示出 Campsomeris sexmaculata 及 Meqascolia flavifrons 含有可麻痺昆蟲之組份 (Piek, T., Hue, B., Mony, L., Nakajaima, T., Pelhate, M., Yasuhara, T., Comp. Biochem. Physiol. 87C, 287, 1987; Piek, T., Hue, B., Pelhate, M., Mony, L., Comp. Biochem. Physiol. 87C, 283, 1987)。

五、發明說明 (8)

4. 源自微生物之毒素

由對昆虫具毒性之微生物所產生之毒素。在自然發生之毒素中，以蘇雲金芽孢桿菌 Kurtaki 變種及鮎澤 (aizawai) 變種可有效拮抗鱗翅目。自 Xenorhabdus luminescens NC - 19 株中，已分離出一個對煙草天蛾具毒性之 40 仟道耳吞之毒素。B.t. israelensis 變種及球形芽孢桿菌可有效拮抗雙翅目。其他毒素包括昆虫致病性真菌，如白僵菌之白僵菌素及綠僵菌之毀菌素。

由微生物產生之毒素可為毒素之前軀體或原型，其需注入昆虫內處理修飾才具毒性。已分離及定序來自許多細菌之毒素結晶基因。包括以下

蘇雲金芽孢桿菌 (kurstaki) HD - 1 及 HD - 73

蘇雲金芽孢桿菌鮎澤 (aizawai) ICI 及 IPL 7

蘇雲金芽孢桿菌柏氏 (berliner) 1715

蘇雲金芽孢桿菌 (israelensis)

蘇雲金芽孢桿菌猝倒 (sotto)

蘇雲金芽孢桿菌莫氏 (morrisoni)

球形芽孢桿菌 1593

內毒素基因可分離自攜有基因之質體，且其在蘇雲金芽孢桿菌中暫宿。美國農業巨之蘇雲金芽孢桿菌培養物收集所，含有許多適合的蘇雲金芽孢桿菌變種。

五、發明說明 (9)

殺虫性毒素之功能性衍生物可為重組體杆狀病毒表現。毒素之“功能性衍生物”是一種物質，其所具有的生物活性（不論是功能上或結構上）基本上和毒素之生物活性相似。“功能性衍生物”一詞要了解包括分子之“片段”、“變型”、“類似物”或“化學衍生物”。

而分子之“片段”如毒素，係指分子的任何多肽片段。分子的“變型”表示一分子在結構及功能上與另一分子為基本上相似的，不論當二分子具有基本上相同結構時與另一分子為“基本上相似”及／或當其呈現一個相似活性時二分子具有基本上相同的生物變型，即使一分子之結構不反映在另一分子，或者胺基酸序列並不相同。分子之“類似物”表示分子在功能上與全部分子或一片段是基本上相同的。在此中及下文，一分子被視為是另一分子之“化學衍生物”，係指當其含有額外的化學部份，而其係一般情況下不形成分子的一部份的。

訊號肽使得毒素可自細胞中被分泌，而此細胞為其產生處。訊號序列可為調升蛋白質自哺乳動物或昆蟲細胞中分泌之序列。因此其可為哺乳動物序列，如間白素 2 (IL - 2) 所用之分泌性訊號序列，或昆蟲序列如保幼激素酯酶、羽化激素、或果蠅表皮蛋白質之分泌性訊號序列。以杆狀病毒訊號序列特別有用，如 gp 67 蛋白質之分泌訊號序列。因此適當的訊號序列有：

五、發明說明 (10)

- 1) MetLeuLeuValAsnGlnSerHisGlnGlyPheAsnLysGluHisThrSerLys
MetValSerAlaIleValLeuTyrValLeuLeuAlaAlaAlaHisSerAlaPheAla
- 2) MetThrSerHisValLeuAlaLeuAlaPheLeuLeuHisAlaCysThrAlaLeuAla
- 3) MetAlaGlyLysValThrValAlaPhePheMetPheAlaMetIleAlaPheLeu
AlaAsnPheGlyTyrValGluCys
- 4) MetLysIleLeuLeuAlaIleAlaLeuMetLeuSerThrValMetTrpValSerThr
- 5) MetIleThrArgProIleIleLeuValIleLeuCysTyrAlaIleLeuMetIle
ValGlnSerPheValProLysAlaValAlaLeu
- 6) MetAsnPheSerArgIlePhePhePheValPheAlaLeuValLeuAlaLeuSer
ThrValSerAlaAlaProGluPro
- 7) MetPheLysPheValMetIleLeuAlaValValGlyValAlaThrAla
- 8) MetLysPheLeuLeuLeuPheLeuValValLeuProIleMetGlyValLeuGly
- 9) MetSerTyrThrAlaLeuAlaValThrPhePheGlyTrpLeuAlaLeuSerSerAla
- 10) MetTyrArgMetGlnLeuLeuSerCysIleAlaLeuSerLeuAlaLeuValThr
AsnSer
- 11) MetAlaCysProSerLeuAlaCysCysLeuLeuGlyLeuLeuAlaLeuThrSer
Ala.

參考

- 1) A c N P V 之 G p 6 7。Whitford, M. et al., 1989。
- 2) 美洲菸夜蛾之 J H E。Hanzlik, T., et al., 1989。
- 3) 煙草天蛾之羽化激素。Horodyski, F.M. et al., 1989。
- 4) 家蚕之蚕素 (Bombyxin) (4 k - P T T H), Adachi, T. et al., 1989。
- 5) 家蚕之 P T T H, Kawakami, A., et al., 1990。
- 6) 惜古比天蚕蛾之惜古比素 B (Cecropin B), van Hofsten, P., et al., 1985。

005509

五、發明說明 (11)

7) 黃猩猩果蠅之 C P 2, Snyder, M. et al.,
1982。

8) A a H I T。Bougis, P.E., et al., 1989。
。

9) 日本蟾蜍之中催產素。Nojiri, H., et al.,
1987。

10) I L - 2, Taniguchi, T., et al., 1983。
。

11) 大鼠之催產素。Ivell, R. and Tichter, D.,
1984。

訊號肽可自毒素中解離，如此毒素可被分泌出來。因此訊號肽可直接或經由連接子序列，融合至毒素之 N - 末端或 C - 末端胺基酸殘基。連接子序列可有 1 至 10 個胺基酸殘基，如 1 至 5 個殘基。

本發明之重組體杆狀病毒可由下列製備：

(i) 將編號外來蛋白質之嵌合基因，包括毒素，或其功能性衍生物，及訊號肽，選殖至杆狀病毒轉移載體，嵌入之限制位置於啟動基因之下游，而可指令外來蛋白質於昆蟲細胞中之表現；及

(ii) 將得自 (i) 步驟之重組體轉移載體，及完整的野生型杆狀病毒 D N A，共同轉感至易為杆狀病毒感染之細胞。

發生同質重組作用，生成重組體杆狀病毒其攜有操作性鏈結至啟動基因的嵌合基因。嵌合基因典型地分離，以

五、發明說明 (12)

用於選殖步驟 (i) 中。重組體杆狀病毒也可含有可表現之多體素基因。為達成此點可利用 (ii) 步驟中之野生型杆狀病毒，其納有此一基因。另外，轉移載體也可用於 (i) 步驟，其進一步包括操作性鏈結至多體素啟動基因之多體素編號序列。於此狀況中，可使用無可表現多體素基因之野生型杆狀病毒於 (ii) 步驟中。最好，重組體杆狀病毒有天然的多體素基因。換言之，多體素編號序列及多體素啟動基因因為重組體杆狀病毒所自然擁有的。

嵌合基因包括毒素，或其功能性衍生物之編號序列。此編號序列，或其完整的嵌合基因，均可合成。可合成相當於欲求序列（整體而言）之寡核苷酸並回冷之。基於此，最好採用適用於編碼序列欲嵌入之特殊杆狀病毒之密碼子。可合成編號序列，或完整的結構基因，加上額外的 3' - 末端之甘胺酸密碼子，或其相當序列，其可轉譯後修飾成 - NH₂。提供轉譯停止密碼子。可利用技藝中可應用之技術選殖毒素基因。若單獨合成毒素基因，其連接至適當的分泌訊號編號序列。

存在有分泌訊號序列，以確保毒素自經本發明重組體杆狀病毒感染之昆蟲細胞中分泌。測試候選之訊號序列，係構築重組體杆狀病毒，感染秋粘虫細胞，且於經感染之秋粘虫細胞培養上清液中測試分泌的毒素。另外，也可自經重組體杆狀病毒感染之昆蟲中回收血淋巴，注入敏感的昆蟲中再分析其毒性。毒素可注入幼虫或成虫。對可有效拮抗雙翅目之毒素而言，受試昆蟲可為家蠅。若針對其他

五、發明說明 (13)

毒素所需之受試種類，也可選用其他適合的昆虫。

嵌合基因與轉錄及轉譯控制序列（包括啓動基因）一起提供。選擇啓動基因，如此其可指令蛋白質於經重組體杆狀病毒感染之昆虫細胞中表現。因此，啓動基因可為杆狀病毒之啓動基因，如自感染細胞中病毒基因表現四相中選擇（Blissard and Rohrmann, 1990）：

第1相（速發早期基因啓動基因）：1. 速發現早期基因1, 2, 速發早期基因N。

第2相（延緩早期基因啓動基因）：1. 39K基因。

第3相（晚期基因啓動基因）：1. gp67基因，2. 基本蛋白質基因，3. 衣殼蛋白質基因。

第4相（極晚期基因啓動基因）：1. 多體素基因，2. P10基因。

最好此杆狀病毒啓動基因是對感染病毒粒子形成非必需的，但也可使用基本基因來的一個套數的啓動基因。頃發現P10啓動基因十分有用。二個啓動基因可縱排。

嵌合基因及其啓動基因可提供於杆狀病毒轉移載體中。此型式適當的轉移載體也包括於pAcUW2B中可表現之多體素基因（Weyer et al., 1990）。此載體包括一個完全的多體素基因套數，及於相反方向有一套數之P10啓動基因及BgII選殖位置及SV40轉錄作用終結序列。一般而言，適當的轉移載體類型是其中為基因表現使用二個杆狀病毒啓動基因，如WO89/0151

五、發明說明 (14)

8 中所揭示。

易為杆狀病毒感染之細胞，以納有嵌合基因之重組體轉移載體轉感之，及以上 (ii) 步驟之野生型杆狀病毒感染。易感受之細胞，為典型的昆蟲細胞株，適合的有秋粘蟲。一旦發生同質重組作用後，可分離出依據本發明之重組體杆狀病毒。

重組體杆狀病毒是穩定的。換言之，重組體杆狀病毒足夠穩定可實際應用。多體素一陰性之 NPV 無足供實際應用之充份穩定性。重組體杆狀病毒也是具感染力的。重組體杆狀病毒可感染任何的易感受昆蟲。包括毒素之外來基因，於昆蟲細胞中表現並分泌。毒素會造成昆蟲死亡。

因此，重組的杆狀病毒可用來控制昆蟲害蟲。將有效劑量施用至作物或草類區域，其係昆蟲害蟲之宿主，且特別是為該昆蟲害蟲所侵襲之農作物上。此外，重組體杆狀病毒可施用至，如捕獲的或實驗室飼養之昆蟲上，再於該區域釋放以感染接下來之世代。重組體病毒之劑量水平通常是每英畝 $10^8 - 10^{13}$ PIB。依據欲消滅之昆蟲來選擇適當的杆狀病毒。重組體杆狀病毒通常以噴灑方式施用，但也可呈誘餌或粉墨型式施用。重組體杆狀病毒為昆蟲幼蟲攝取，因此於昆蟲卵預測孵化期間可施用至適當區域。此期間通常可持續 2 至 4 週。病毒可單獨使用，或與其他的生物控制劑或化學殺蟲劑合用。

依據所選用之杆狀病毒，本發明之控制方法可應用至以下昆蟲：—

205569

五、發明說明 (15)

鞘翅目雙翅目膜翅目脈翅目毛翅目

且特別是鱗翅目。

藉著選擇適當的杆狀病毒，利用本方法可控制許多重要的農作物及森林害虫，包括以下：

松柏鋸角葉蜂棉黑紋燈蛾紅鈴虫小葉蛾蘋實巢蛾小蠹蛾蘋果蠹蛾大菜粉蝶煙草天蛾棉鈴虫、美洲棉鈴虫、美洲菸夜蛾甘藍夜蛾。小夜蛾、甜菜夜蛾、斜紋夜蛾、莎草粘虫、眉紋粘虫粉紋夜蛾

本發明的重組體杆狀病毒，因此本身可充作殺虫劑，其中使用未經修飾之天然病毒，即將有效劑量施用至另為病毒感染之昆虫區域。頃發現重組體病毒經由含有生殖致

五、發明說明 (16)

命性侵襲及供毒素多肽表現之天然 DNA 序列，於此目的下是存活的或可勝任的。重組體病毒可經構築以表現及分泌二種以上之毒素。

含有殺虫有效劑量之重組體杆狀病毒之殺虫組成物，通常可含有惰性載體，如粘土、乳糖及蛋白物質，如脫脂之大豆粉以助於應用，特別是如蛋白材質之載體，屬誘食吸引劑，且可加強所含杆狀病毒之穩定性。此種組成物通常貯存在低溫，如 14°C 至 -20°C ，以加強病毒之保存。

本發明提出之組成物，可為微粒組成物，其中組成物由許多細碎粒子組成，其中杆狀病毒保護在粘土及／或蛋白質基質中。此中所用的“保護”一詞係指此粒子某部份包埋在基質中，而粒子表面曝出，也包括杆狀病毒完全包膠在基質中，後一狀況較佳，且本發明粒子大多如此。組成物中粒子之特徵最好是一種細碎大小，不超過 150 微米，且見有粒子大小由 5 至 100 微米之令人滿意之組成物，也是本發明另一特性，較好是 5 至 50 微米，且特別是 5 至 25 微米可容易地製作。

基質物質占杆狀病毒總重量的 65 - 99.9% w t，且在發明的組成物具體實例中，較好是 85% 至 99% w t。應用於組成物之粘土，可為任何商品化之粘土，細碎且基本上輾磨成粉，例子如：高嶺土、Olacha 粘土、美國活性白土及皂土。以 Olancha 及活性白土為較佳。充作基質物質的任何植物性蛋白質，可得自各種蛋白質源，其

五、發明說明 (17)

經過處理為細碎且粉碎型式。物質較好脫脂或者實質上是無脂質的。經由說明可提及之植物性蛋白質源包括：大豆、棉籽、向日葵及各種酵母浸膏。較佳的植物性蛋白質為大豆蛋白質及棉籽蛋白質，較好來自脫脂源，更好是脫脂之大豆蛋白質。代表性之動物蛋白質為脫脂牛乳、酪蛋白及白蛋白。得自天然來源之蛋白物質，可含相當多量之非蛋白物質，且此中所用的“蛋白質”及“蛋白物質”大體上包括至少含25%wt%確實蛋白質之物質。極適合的物質，如較佳的植物性蛋白質，通常含有40%至75%確實的蛋白質。

雖然個別的粒子及全部之組成物，可含相當低濃度之杆狀病毒，而就最小之實際觀點而言極希望組成物中所含之活性當量，有至少1.0微克/毫升之LD50。組成物之效力適當範圍由0.001微克/毫升至1.0微克/毫升，且通常範圍在由0.003微克/毫升至0.4微克/毫升範圍。所使用及指稱之殺虫活性或效力之偵測，係依據LD₅₀值之決定，其係可使30℃下生長之第一齡幼虫中50%死亡之劑量，以微克/毫升計。方法基本上如J. Insect. Pathology; 6, 737-45 (1965)中所述，係估計粉紋夜蛾NPV之效力。

本發明提供之微粒子組成物，呈現欲求之殺虫效力，其大體上的特徵在於對光滅活及熱變性之降解作用，有改進之抗性。組成物之其他特性，特別是物理特性，依據許多因素而變化，特別是所採用之基質物質。其質只由粘土

五、發明說明 (18)

組成之組成物，一般特徵在於良好的可沾濕性，但括著力較佳，且於某些例子可能含有較軟物質。另一方面，其基質只由植物性蛋白質組成之組成物，一般特徵在於良好的粘著能力及硬度，但較不易沾浸。含大量動物性蛋白質之組成物可有好的粘著力，但沾濕性及硬度不佳。因此，特佳之基質物質係選自下列包括植物性蛋白質、粘土及其混合物。頃發現，由植物性蛋白質及粘土二者緊密混合物組成之基質，具有提供良好沾濕力、粘著性及硬度之優點，以及其他欲求之特性。因此，本發明之尤佳組成物為其中基質由植物性蛋白質及粘土的混合物所組成者。植物性蛋白質對粘土之重量百分率範圍可在每份按重計之粘土中有 0.1 至 10 份蛋白質，且較好是每份粘土有 0.3 至 4 份植物性蛋白質，更好是 0.5 至 3 份。

本發明之杆狀病毒可包膠於牛物可降解之聚合物中，如 Culigel 之藻酸塩（商品名）。在聚合物中可納有防止紫外光及／或誘合刺激物。因此，聚合物中可含有防光之粒子，如碳，以碳為基礎之染料、氧化鋁、二氧化鈦、粘土、麵粉或螢光物質。

以下實例說明本發明。

於附圖中：

圖 1 示出 A c M N P V g p 6 7 訊號序列及 A a H I T 編號序列。g p 6 7 訊號肽底下劃線，其中二個潛在的轉譯起始密碼子以粗體字標出。

圖 2 示出構築 A a H I T 基因時，所使用之合成的寡

五、發明說明 (19)

核苷酸之序列 $\swarrow$ 核苷酸序列以 5' - 3' 方向 (a 1, b 3, c 5 及 d 7) 及 3' - 5' 方向示出 (a 2, b 4, c 6 及 d 8)。在序列上示出組合毒素基因時之關鍵性限制酶位置。轉譯起始密碼子低下劃線，且轉譯停止密碼子 (T A A) 在第二個核苷酸上以星號標出。B a m H I 及 A c c I 位置間嵌入“刻板的”區域，以促進於構築時需此二位置之雙重水解。寡核苷酸依序嵌入 p U C 1 8 多重選殖位置中。d 7 / d 8 嵌入 p U C 1 8 之 A c c I 及 X b a I 之間 (構築 A c c I 位置使嵌入時可被破壞) 形成 p S T D。c 5 / c 6 嵌入 p S T D 之 B a m H I 及 X b a I 位置間以形成 p S T D C。此以 B a m H I 及 A c c I 水解以釋出“刻板”區，且 a 1 / a 2 再選殖至這些位置以形成 p S T D C A。其以 A c c I 水解，且 b 3 / b 4 再嵌入以形成 p L S - S T。

圖 3 a 示出 p A c S T - 1 之構築。編號 A a H I T 之合成的寡核苷酸如圖 2 所述地於 p U C 1 8 中組合，以衍生 p L S - S T。完全的 A a H I T 編號區再自 p L S - S T 中移去，並嵌入 p A c U W 2 B 之 B a l I 位置，此 p A c U W 2 B 是杆狀病毒轉移載體，在完全的 A c M N P V 多體素基因上游有一個套數之 p 1 0 啟動基因。生成之轉移載體 p A c S T - 1，含有完全的 A a H I T 編號序列而無訊號肽。

圖 3 b 示出 p A c S T - 3 之構築。合成的 A a H I T 自 p L S - S T 中移出，並嵌入

五、發明說明 (20)

p A c A T M 1 之 B a m H I 位置以衍生 p A c A T M - 1 - S T。於 g p 6 7 分泌訊號及 A a H I T 編號區之接點處進行位置指令之突變作用，以在經修飾之質體

p A c S T - 2 中提供一個有益之蛋白酶解離位置。經修飾之 g p 6 7 - A a H I T 編號區自 p A c S T - 2 中移出，並嵌入 p A c M N P V 2 B 中以衍生 p A c S T - 3。

圖 4 A 示出 A c M N P V p 1 0 啓動基因 (1 - 240) 之核苷酸序列，加上 g p 6 7 訊號肽編號區 (246 - 359) 及 A a H I T 編號區 (360 - 569) 自 p 1 0 啓動基因之轉錄作用啓動基因 (167 - 170 位置，T A A G) 以粗體字示出。突變前示出訊號肽及毒素間之接點。移出之核苷酸示於下方。

圖 4 b 示出 A c M N P V p 1 0 基因之核苷酸序列，加上 g p 6 7 訊號肽編號區及 A a H I T 編號區，序列上是用來衍生重組體病毒之轉移載體之質體限制與圖 (p A c S T 3)。

圖 5 說明於經病毒感染之秋粘虫 (S f) 細胞中蛋白質之表現。細胞以 A c S T - 3 或野生型病毒感染，並於感染後不同時間點以 ^{35}S - 半胱氨酸追加標記 1 小時，如方法中所述的。於 10 - 30% 聚丙烯醯胺梯度凝膠上分離蛋白質，再以 X 射線底片曝光。示出 A a H I T 及多體素蛋白質之位置。

圖 6 示出 H P L C 中 A a H 總毒素及 A c S T - 3 感

五、發明說明 (21)

染細胞培養基流份，免疫吸漬分析之結果。H P L C 中 25 - 28 流份於 10 - 30 % 聚丙烯醯胺梯度凝膠中分出，再如文中所述地吸漬。示出 B S A (存在於再懸浮緩衝液) 及 A a H I T。

圖 7 來自 S f 細胞經 A c S T - 3 感染，其全部粗製 A a H 毒液或培養基以 H P L C 分級分離 (見實例 1)。分析選定之流份，係取 4 微升注入家蠅，並觀察其麻痺及亡。

圖 8 示出經被 A c S T - 3 及 A c M N P V (野生型) 感染之幼虫所破壞之局部葉片。

圖 9 示出 A c M N P V p 10 基因啓動基因之核苷酸序列，加上間白素 2 訊號肽編號區及 A a H I T 編號區。序列上是轉移載體之質體限制與圖 (p A c I 12 S T)，其係用來衍生重組體病毒。

圖 10 示出 A c M N P V p 10 基因啓動基因之核苷酸序列，加上保幼激素酯酶訊號肽編號區及 A a H I T 編號區。序列上是用來衍生重組體病毒之轉移載體之質體限制與圖 (p A c J H E S T)。

圖 11 示出 p A c S T S T 之限制與圖及 p 10 啓動基因之序列，A a H I T 訊號肽及 A a H I T 編號區。

圖 12 示出 p A c C P 2 S T 之限制與圖及 p 10 啓動基因之序列，C P 2 訊號肽及 A a H I T 編號區。

圖 13 示出 p A c O X Y S T 之限制與圖及 p 10 啓動基因之序列，催產素訊號肽及 A a H I T 編號區。

005509

五、發明說明 (22)

圖 1 4 示出 A c M N P V 基本蛋白質基因啓動基因之核苷酸序列，及 p 1 0 基因啓動基因，與 g p 6 7 訊號肽編號區及 A a H I T 編號序列縱排。序列上是用來衍生重組病毒之轉移載體 (A c B P S T) 之質體限制與圖。

圖 1 5 說明如圖 5 所示述地，於感染有病毒之 S f 細胞中合成蛋白質，(a) A C I 2 S T；(b) A c J H E S T；(c) A c B P S T。

圖 1 6 示出 A c M N P V g p 6 7 訊號序列及 S e f I T 編號序列。g p 6 7 訊號肽底下劃線，而二個潛在的轉譯起始密碼子以粗體字表示。

圖 1 7 示出用於構築 S e f I T 基因所使用之合成的寡核苷酸序列。核苷酸以 5' - 3' 方向 (O S 3 7 1 1) 及 3' - 5' 方向 (O S 3 7 1 2) 示出。在序列下方示出寡核苷酸對繼代選殖至質體所使用之限制酶位置。轉譯起始密碼子底下劃線，且轉譯停止密碼子 (T A G) 在第二個核苷酸上以星號標出。經回冷後，寡核苷酸嵌入 p D H 7，介於 S p h I 及 B a m H I 位置之。p D H 7 是 p E M B L 1 9 之衍生物，其在獨特的 B g l I I 位置 (代替多連接子 H i n d I I I 位置) 及 S p h I 之間有 A c N P V g p 6 7 之分泌訊號。

圖 1 8 示出 A c M N P V p 1 0 啓動基因之核苷酸序列 (1 - 2 4 0)，加上 g p 6 7 訊號肽編號區 (2 4 6 - 3 5 9)。其餘的序列是 S e f I T 之編號區。示出 g p 6 7 區及 S e f I T 區接點處突變後之序列。

五、發明說明 (23)

圖 19 示出 A c M N P V p 10 基因啓動基因之核苷酸序列，加上 g p 67 訊號肽編號區及 S e f I T 編號區。序列上是用來衍生重組病毒之轉移載體 (p A c S e f I T) 之質體限制與圖。

實例1. 材料及方法(A) 病毒及毒素

A c M N P V C 6 (Possee, 1986) 及所有的重組體病毒均於秋粘虫 (I P L B - S f - 21) 細胞中增殖 (Vaughn et al., 1977)，於 28℃ 下，以 T C 100 添加 5% 或 10% 胚牛血清 (F C S)，並存在有青黴素及鏈黴素。利用由 Brown 及 Faulkner (1977) 所述之噬菌斑分析法來估計病毒感染力。病毒純化：多角體分離自經感染細胞或昆蟲中，如 Harrap et al. (1977) 中所述，但在所有溶液中加入 0.1% (w/v) 之 S D S。S D S 之除去是在純化末了以水洗多角體。利用 Wigley (1976) 之乾式計數法計數多角體。

(B) 構築合成的 A a H I T 及 S e f I T 編號序列

利用 A c M N P V 多體素 (Hooft van Iddenkinge et al., 1983) 及 p 10 (Kuzio et al., 1984) 基因較佳之密碼子傾向，可將 A a H I T 蛋白質序列轉化

五、發明說明 (24)

成核苷酸序列。所預測之DNA序列，於VAX主架構電腦上利用Staden分子生物程式以鑑定出限制酶位置。以此於Applied Biosystem自動合成儀上產生4個合成寡核苷酸之互補對。設計序列使得4個核苷酸在ATG密碼子前之序列，與AcMNPV多體素基因配合，如此保留轉譯周圍之初之完整。一個轉譯終結密碼子納入編號區之3'端。納有適當的限制酶位置，以助合成的寡核苷酸可嵌入pUC18，且接下來其以完整的AaHIT編號區以BamHI及BglII切下，以供後來之操作。寡核苷酸組合至pUC18內完全之AaHIT編號序列中 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)，利用標準策略進行 (Sambrook *et al.*, 1989)。此方法進一步詳見上文圖2、3a及3b所述。於最終質體構體 (pLS-ST) 中之AaHIT編號區，再以二去氧核苷酸鏈終結予以定序 (Sanger *et al.*, 1977) 以証實其真實性。

以相似方式，將SeFIT之蛋白質序列轉化成核苷酸序列資料。合成二個互補的寡核苷酸，OS 3711及OS 3712 (圖17)。經回冷後，這些寡核苷酸嵌入質體pDH7中，介於SphI及BamHI位置之中。pDH7是pEMBL19之衍生物 (Dente *et al.*, 1983) 其含有AcMNPV gp67之分泌訊號，介於唯一的BglII位置 (其所在取代多連接子之HindIII位置) 及SphI之間。於質體構體，pDH7-SeFIT中之SeFIT編號區，如上述地

五、發明說明 (25)

定序以確實其真確性。

(C) 構築杆狀病毒轉移載體

(i) p A c S T - 1 (比較) : 為產生實際的病毒殺虫劑, 必須將 A a H I T 編號序列嵌入杆狀病毒中, 其保留有功能性多體素基因。轉移載體 p A c U W 2 B (Weyer et al. 1990) 滿足此要件。其係以

A c M N P V E c o R I - I 片段為基礎, 包括有多體素基因。其有一個完整數之多體素基因, 一套數之 p 10 啟動基因, 及一個 B a l I 選殖位置具有 S V 40 轉錄終結序列, 嵌入之位置在多體素 A T G 密碼子上游 90 個核苷酸處, 及相對的方向。利用 B a m H I 及 B g l I, 將 A a H I T 編號區自 p L S - S T 中切去, 於低凝結溫度之瓊脂糖凝膠上分級分離純化後, 嵌入轉移載體

p A c U W 2 B 之 B g l I 位置 (Weyer et al., 1990) 以衍生 p A c S T - 1 (圖 3 a)。

(ii) p A c S T - 2 : 為產生可具潛力地分泌 A a H I T 之病毒, 將編號區嵌入 p A c A T M 1 中, 後者為一轉移載體, 其有多體素啟動基因後有一套數之 g p 67 訊號肽序列 (Whitford et al., 1989)。自 p L S - S T 中以 B a m H I 及 B g l I 切出毒素編號區, 並嵌入 p A c A T M 1 之 B a m H I 位置中, 產生轉移載體 p A c S T - 2 (圖 3 b)。p A c A T M 1 是 p A c C L 29 之衍生物 (Livingstone and Jones

五、發明說明 (26)

1989), 是一種以多體素為基礎之轉移載體, 含有 M13 基因間區, 其有助於經由 M13 輔助噬菌體產單股 DNA (Livingstone and Jones 1989)。利用 M13 寡核苷酸指令之突變作用 (Kunkel, 1985) 處理修飾介於 gp67 訊號序列及 AaHIT 間之接點。使用如圖 4A 所示之 GP67-SC.TOX 以衍生編號有益蛋白酶確認位置之適當的 DNA 序列; 此步驟也移去 AaHIT 原先的 ATG 轉譯起始密碼子。對 gp67 接點處所做之變化示於圖 4A, 加上 p10 啟動基因之序列。

(iii) pAcST-3 (本發明): 以 XhoII 水解將 gp67 訊號序列及 AaHIT 自 pAcST-2 移去, 再置於 pAcUW2B 之 BglII 位置, 以產生 pAcST-3 (圖 3b)。

(iv) pAcI12ST (本發明)。AaHIT 合成的編號區, 以經 BamHI/BglII 水解之 DNA 片段, 嵌入 BLUESCRIPT M13 噬菌質體 (stratapene) 多連接子區中之 BamHI 位置。編號區之方向由限制酶與圖証實。將 IL-2 訊號肽編號序列 (Taniguchi et al., 1983) 嵌入毒素基因轉譯起始密碼子上游之 EcoRV/PstI 位置之間。利用寡核苷酸指令之突變作用 (Kunkel, 1985) 改變訊號肽及毒素編號序列接點處, 以生成解離分泌性肽之最佳蛋白酶確認位置。利用鏈終結方法証實序列。以 XhoII 切出含有訊號肽及

五、發明說明 (27)

毒素編號區之 DNA 片段，並嵌入杆狀病毒轉移載體

p A c U W 2 1 之 B g Ⅱ 位置，以衍生

p A c I 1 2 S T。p A c U W 2 1 係由 p A c U W 2 B 發展而來，其鄰接多體素基因及 p 1 0 基因啓動基因之病毒序列減少。其也具有適當的調控序列，使得經 M 1 3 K O 7 超感染後可於細菌中產生單股 DNA。

p A c U W 2 1 之構築是切去 p A c U W 2 B 中 5 4 0 8 個核苷酸之 DNA 片段，並將之嵌入已用 H i n d Ⅲ 及 E c o R I 水解之 p E W B L 1 9 中，DNA 二端以 DNA 聚合酶修補，以牛腸磷酸酶處理再連接。I L - 2 訊號肽編號區之序列加上 A a H I T 編號序列，示於圖 9 中。

(v) p A c J H E S T (本發明)：構築編號

J H E 訊號肽之合成的 DNA，係將二個重疊寡核苷酸對，嵌入介於 B g Ⅱ 及 E c o R I 位置之間，

p E M B L 1 9 經修飾版 (H i n d Ⅲ 位置已改成

B g Ⅱ) 之多連接子中。此質體再以 B a m H I 水解 (在 J H E 序列之 3' 區)，且毒素編號區以經 B a m H I

/ B g Ⅱ 水解之 DNA 片段型式嵌入。利用如上述之寡核苷酸指今之突變作用改變介於 J H E 訊號肽及毒素編號區間之接點。再以 B g Ⅱ 水解回收序列，嵌入

p A c U W 2 1 之 B g Ⅱ 位置以衍生 p A c J H E S T。J H E 訊號肽編號區之序列，加上 A a H I T 編號序列示於圖 1 0。

五、發明說明 (28)

✓ (vi) p A c S T S T (本發明) : 使用聚合酶鏈反應方法，製作一套數之 A a H I T 基因，其中天然 A a H I T 所用之訊號肽序列 (Bougis, P.E., et al., 1989) 位於 5' 端，而 B g l II 位置位於二端。

5' 引子為：

Mer Lys Phe Leu Leu Phe Leu Val Val Leu Pro Ile Mec Gly
TATATAAGATCT ATG AAA TTT CTC CTA TTG TTT CTC GTA GTC CTT CCA ATA ATC CCC

Val Leu Gly

CTG CTT GGC AAA AAA AAC GGC TAC GGG GTT GAC TC

3' 引子為：

XATATAAGATCT TTA GTT AAT AAT AGT ACT GTC

再將 B g l II 水解片段嵌入 p A c U W 2 1 唯一的 B g l II 位置上。載體命名為 p A c S T S T。

A a H I T 訊號肽之序列及 A a H I T 編號區示於圖 1 1。

✓ (vii) p A c C P 2 S T (本發明) : 此載體如 p A c S T S T 般製備，除了 C P 2 (來自黃猩猩果蠅) (Syder, M. et al., 1982) 之訊號肽序列加入其中，取代天然的 A a H I T 訊號肽。

5' 引子為

Met Ala Cys Pro Ser Leu Ala Cys Cys Leu Leu Gly Leu Leu
TATATAACATCT ATG GCC TGC CCC AGT CTC OCT TGC TGC CTC CTT GGC CTA CTC

五、發明說明 (29)

Ala Leu Thr Ser Ala

ACT CTC ACC TCC GCC AAA AAA AAC GGC TAC OCG OTT GAC TC

3' 引子為：

XATATAAGATCT TTA GTT AAT AAT AGT ACT GTC

C P 2 訊號肽之序列及 A a H I T 編號區示於圖 1 2

。

(viii) p A c O X Y S T (本發明)：此載體如

p A c S T S T 般製備，除了供來自大鼠之催產素訊號肽序列 (Ivell, R. and Tichter, D., 1986) 加入其中，以取代天然的 A a H I T 訊號肽。

5' 引子為：

Met Phe Lys Phe Val Met Leu Leu Ala Val Val Gly Val All

TATATAAGATCT ATG TXT AAA TTC GTT ATC ATT CTA GCC GTT GTT GGC CTT GCC

Thr Ala

ACA GCG AAA AAA AAC GGC TAC GCG GTT CAC CC

3' 引子為

XATATAAGATCT TTA GTT AAT AAT AGT ACT GTC

催產素訊號肽之序列及 A a H I T 編號區，示於圖

五、發明說明 (30)

1 3 中。

(ix) p A c U W 2 1 B P (本發明) : 以 A s p 7 1 8 及 B a m H I 將基本蛋白質啓動基因自 p A c M P 1 中切出 (Hill-Perkins et al., 1990), 並嵌入 p D H 7 中相同位置以衍生 p D H 7 B P。再使用聚合酶鏈反應方法以製成一套數之基本蛋白質基因啓動基因, 並在啓動基因 5' 端也加入一個 X b a I 位置。此片段再嵌入 p A c U W 2 1 中, 以取代 p 1 0 基因啓動基因並命名為 p A c U W 2 1 B P。自 p A c S T - 3 中利用 X h o II 切出含有 g p 6 7 訊號肽及毒素編號區之 DNA 序列, 並嵌入 p A c U W 2 1 B P 之 B g l II 位置, 以衍生 p A c B P S T。基本蛋白質之序列及 p 1 0 基因啓動基因, 加上 g p 6 7 及 A a H I T 編號區示於圖 1 4 中。

(x) p A c S e f I T (本發明) : 利用如上述之位置指令之突變作用, 將 g p 6 7 編號區與 S e f I T 編號區 (於 p D H 7 - S e f I T) 位架構上。改變可由定序証實。自 p D H 7 - S e f I T 中切出完全的編號區 (g p 7 6 及 S e f I T), 利用 B g l II 及 B a m H I, 再嵌入 p A c U W 2 1 之 B g l II 位置以衍生 p A c S e f I T。S e f I T 編號區之序列, 加上 g p 6 7 位訊號肽區及 p 1 0 基因啓動基因, 示於圖 1 8 及 1 9 中。

五、發明說明 (31)

(D) 產生重組體病毒

(i) A c S T - 1 (比較用) : 秋粘虫細胞以 p A c S T - 1 及多體素 - 陰性之 A c R P 6 - S C (Kitls et al 1990) 感染性病毒 DNA, 利用磷酸鈣法 (Smith et al., 1983) 共轉感之。重組體病毒之選擇, 係在標準噬菌斑分析中選出多體素 - 陽性之表現型。

(ii) A c S T - 3 (本發明) : p A c S T - 3 以 A c R P 6 - S C 共轉感, 利用脂感染法 (Felgner et al., 1987; Groebe et al, 1990) 進行, 病毒再如先前之共轉感般篩選。

(iii) A c I 1 2 S T、A c J H E S T、A c B P S T、A c S T S T、A c C P 2 S T、A c O X Y S T、A c S e f I T (本發明) : 如 A c S T - 3 所述。

重組體病毒以 5 次連續之噬菌斑分析純化, 且以經感染細胞中經 E c o R I 水解之 DNA 行南方吸漬法 (Southern) 確認, 其中使用與 A a H I T 基因具特異性之經 [32 P] 放射標記之寡核苷酸為探針。

(E) 於經病毒感染之細胞中分析蛋白質

秋粘虫細胞 (10^6 / 35 毫米培養皿) 以感染複數 (m o i) 10^6 / 細胞之病毒接種, 並於室溫下共培育 1 小時。接種物移出, 且更換以 2 毫升 T C 1 0 0 /

五、發明說明 (32)

10% FCS，培養皿再於28℃下共置直到行放射標記前15分鐘。之後移去培養基，加入0.5毫升飢餓培養基（無半胱胺酸TC100，加2%經透析之FCS），且培養盤置28℃下15分。之後加入0.5毫升飢餓培養基，其中添加20 μ Ci [35 S] 半胱胺酸，並共置1小時。於變性之10-30%聚丙稀醯胺梯度凝膠上分離蛋白質萃取物（Cook et al., 1979）。凝膠以考馬斯藍染色，乾燥，再曝於X取線底片下。

(F) 感染細胞蛋白質或HPLC流份之免疫吸漬分析

自未標記，且經病毒感染之細胞中所得之蛋白質萃取物（見上E、或下G），於10-30%變性聚丙稀醯胺凝膠中分離，再利用Bio-Rad電泳吸漬裝置，在100V及25mH Tris, 5.3M-甘胺酸及20%甲醇為轉移緩衝液下進行2小時以轉移至硝化纖維膜。濾膜共置於含有0.05%吐溫-20 (PBST) 之PBS中，以3-5%低脂牛乳粉末為阻斷劑。此在室溫下緩和震盪1小時，再與天竺鼠血清（括抗合成的AaHIT肽而生成的），其以1/1000稀釋於PBST中（效價大於1:10,000於間接ELISA中扣抗同質之肽）共置2小時。之後濾膜以PBST洗數次，以除去未結合之抗體。已結合之抗體利用抗一天竺鼠IgG性磷酸酶共軛物偵測。

五、發明說明 (33)

(G) A a H總毒素及經感染之細胞上清液之H P L C，
及於家蠅中之活體內分析：藉注射測毒性

得自Sigma，呈冷凍乾燥樣品久之總粗製之A a H毒液，懸浮於20微升DMSO中，再稀釋於H₂O中使達100微升，以15,000g離心5分鐘，移出沉澱物質。以H P L C進行上清液(20微升)純化，利用L C D系統且Spectroflow 783偵測計設在280毫微米波長下。分離時使Spheisorb，C₈，5微米粒子大小，25公分之管柱。A溶劑為0.5M甲酸銨，pH 2.7，B溶劑為乙腈。進行直線梯度，由15%至40B/A，歷40分，流速為1毫升/分，並收集40×1毫升流份。流份冷凍乾燥以除去乙腈及甲酸銨，之後懸浮於200微升0.1毫克/毫升BSA/水中。各0.5微升之流份，注入10隻成虫之家蠅中(雄及雌)，利用25號針頭。

分析感染細胞之上清液，係以2培養皿之經感染之秋粘虫細胞之上清液為起始物質(即2毫升)。其以Centricon過濾系統(3K)濃縮4倍，在5000xg下離心3小時(Sorvall RC5離心機)。取100微升經濃縮之物質填料至H P L C管柱，再以和總毒液相同方式處理之。一旦樣品進行H P L C後，流份冷凍乾燥，並再懸浮於100微升0.1毫克/毫升BSA中。各4微升之流份用來注入家蠅中。

五、發明說明 (34)

(H) 製備昆蟲中之病毒

粉紋夜蛾以半合成飲食維持於實驗室中 (Hunter et al., 1984)。所有的分析均以多角體進行，其已在昆蟲中傳代一次。於最初傳代中，第三齡之粉紋夜蛾幼蟲消耗含有感染細胞粗製萃取物之充填食物，之後幼蟲轉移至新鮮飲食。於死亡後昆蟲立即回共匯集。純化多角體，且用於所有其他的分析中。

(I) 回收自經感染幼蟲淋巴之生物活性

毒素生物活性之評估係將所給樣品之連續稀釋液4微升注入家蠅腹部背側區、骨片之間。得自A a H總毒液H P L C之含毒素流份，用來做為標準品以估回收自血淋巴中毒素之量。流份冷凍乾燥，並懸浮於水中使達90毫微克/100微升水之濃度。此再稀釋於P B S中，以促進毒素(4微升含有18、9、4.5、2.25或1.125毫微克)注入昆蟲中(示出18毫微克已超出毒素L D 50)。

(J) L D 50測量

50個第二齡的粉紋夜蛾幼蟲(0.6-0.7毫克)個別餵以已知效價之病毒5次連續稀釋液，其係在少量，2食物中再置微滴定盤內。病毒最大劑量應是可使死亡率在90%以上者，而最小劑量為生成10%死亡率者。非遺傳工程之A c M N P V株符合這條條件，每幼蟲有

五、發明說明 (35)

120、60、30、15及7.5 PIB。幼虫可在24小時內消耗這些劑量，若非如此者則排除於此實驗外。其他轉移至人工飲食之個別容器中，並在暗培育箱中保持24小時。每天檢查幼虫，死亡的移出，於玻片上塗抹，並於染色及顯微鏡來後証實死因。所得的數據分析以決定LD50值 (Finney, 1971)。

(K) ST50偵測

為產生可用於研究中之新生幼虫，成虫飼養在檻中，其內放置濾紙供產卵之用。有卵之濾膜表面使無菌，再放在塑質容器中。孵化後，新生虫餓3-6小時，再以各種病毒懸液小滴餵食。懸液以5%藍色食用染料染色使餵食具象化。此懸液小油滴置於培養皿上於向心圖。幼虫引入向心圖中心，故待其爬向皿緣時會取走少量液體。於處理中死亡的幼虫留在中心，以進行同步餵食並選出健康個體。先前的工作顯示，在這些實驗中，粉紋夜蛾之幼虫可消耗0.0087 (+/- 0.0023) 微升。(Hughes and Wood, 1981。Hughes et al. 1980)，且於這些ST50分析中，病毒懸液含有 2×10^6 多角體/毫升。經餵食後，幼虫留於有人工飲食之個別容器中。24小時後，幼虫檢視，且移去任何死亡者因其係操作所致。經過48小時後，幼虫檢視，且之後以固定間隔再檢視。所有死亡的幼虫均移去，並以外觀及顯微鏡檢評估死因。以Vistat程式估計ST50 (Boyce Thompson Inst-

五、發明說明 (36)

itute, Ithaca, New York) 。

(L) 以 A c S T - 3 感染後昆虫取食傷害之減少

第三齡幼虫 (粉紋夜蛾) 個別餵以人工飲食一夜, 其中接種有 10^4 多角體包涵體 (P I B ' s) 。此高劑量可確保 100% 死亡率。經餵食後, 幼虫以 5 隻分成一組, 其中加有甘藍菜葉, 此植物係在控制環境下生長。於餵食前, 葉子已浸一夜以使水飽和。經 2 天餵食後, 照相評估菜葉之損害。

2. 結果(A) 以重組體合成蛋白質

A a H I T 具有 70 個胺基酸 (包括第一個甲硫胺酸) 之蛋白質序列, 預測之分子量為 8000。秋粘虫以 A c S T - 1 (無分泌訊號之 A a H I T) 或 A c S T - 3 (有分泌訊號之 A a H I T) 感染, 其萃取物以變性的 10-30% 聚丙烯醯胺凝膠分析無法以考馬斯藍或銀染色偵測預期大小之額外蛋白質。細胞經病毒感染後, 在各個時間點以 [35 S] 半胱胺酸放射標記。這些結顯示, 額外的蛋白質移動之處正好在病毒 p 10 蛋白質 (無半胱胺酸殘基之 p 10 蛋白質) 預期位置下方。此假想 A a H I T 之合成於感染後 18 及 36 小時間可達最大。蛋白質之本身利用經 A c S T - 1 或 A c S T - 3 感染之細胞萃取物, 行西方墨點方析可証實, 此中採用由合成

五、發明說明 (37)

A a H I T 生成之抗血清反應。

(B) A a H 全部毒液及合成的 A a H I T 之 H P L C

由 H P L C 痕跡顯示，在 280 毫微米光密度讀數處有一高峰，約在 27 / 28 流份處，峰出現在全部毒液及以 A c S T - 3 感染之細胞培養基中，但以野生丑病毒感染之細胞中則不存在。25 及 28 間流份之西方墨點分析顯示：於粗製毒液的 27 反 28 流份中有 A a H I T，以 A c S T - 3 感染之細胞上清液則在 26 及 27 間（圖 6）。

將這些流份各自少量注入家蠅中可証實，於這些流份可見麻痺及致命活性。由於毒性所致之不動性，在注射後 1 小時可十分明顯，24 小時後會死之（圖 7）。

(C) 回收自感染幼虫血淋巴之生物活性

經 A c S T - 3 感染之細胞中，A a H I T 之分泌活體內評估可先回收經病毒感染之粉紋夜蛾幼虫血淋巴，再將其注入家蠅中。第 4 齡的粉紋夜蛾幼虫以 10^5 P I B ' s 的 A c S T - 3 感染。感染後 72 小時，在末端腹足上切割，並收集血淋巴（20 微升）。為限制黑化，收集血淋巴樣品之吸取管先以苯硫脲溶液潤濕。取此血淋巴 4 微升注入受試的家蠅幼虫中，再評估毒性。反應與由 H P L C - 純化之 A a H I T 總毒素製成之標準曲線比較，結果示於表 2 中。家蠅的反應顯示注入 72 小時後

五、發明說明 (38)

1. 5 - 2. 0 毫微克 / 微升血淋巴左右之粉紋夜蛾幼虫內之毒素濃度。

表 2. 回收自以 A c S T - 3 感染之血淋巴之毒性活性 (
p. i. 72 小時)

劑量 (毫微克)	A	B	C	D
對照組 (P B S)	10	0	0	10
1.125)	7	2	1	10
2.25) AaHIT	2	5	3	10
4.5) 之	0	4	6	10
9.0) 稀釋液	0	4	6	10
18.0)	0	0	10	10
血淋巴 A c N P V	10	0	0	10
血淋巴 A c S T - 3	0	3	7	10

A : 可飛之昆虫

B : 可動但不會飛之昆虫

C : 根本不會動之昆虫

D : 注射之昆虫數目

(D) 重組體病毒之活體內活性

估計 L D ₅₀ 值以評估重組病毒之活體內活性。注射第二齡之粉紋夜蛾幼虫。重覆個體給予 7、15、30、

五、發明說明 (39)

60 或 120 PIB's 之劑量。於分析後，未修飾之 AcMNPV LD50 值為 44 (35 及 55 之 95% 信任度界線) 而 AcST-3 是 31 (27 及 37 之 95% 信任度界線)。在 $\alpha = 0.05$ 時，AcMNPV 及 AcST-3 之 LD50 值顯著不同。LD50 之差異相當小，增加 1.4191，而具 1.026216 - 1.9846 之 95% 信任度界線。

經新生幼虫感染後評估 ST50。然而，ST50 數據說明在殺死幼虫所花的時間上，有極顯著地減少。AcMNPV 為 113.1 (112 - 115 之 95% 信任度界線)，AcST-1 為 109.2 (107 - 110 之 95% 信任度界線) 及 AcST-3 (本發明) 為 85.8 小時 (85 - 87 之 95% 信任度界線)。AcST-3 之結果與未經修飾的 AcST1 病毒顯著不同，後者含有毒素編號序列但無分泌訊號 ($\alpha = 0.0001$)。此意味著，AcST-3 病毒殺粉紋夜蛾幼虫之速率至少比 AcMNPV 快 25%。這些結果綜合於表 3 中：

五、發明說明 (40)

表 3 : A c S T - 1、A c S T - 3及A c M N P V之
L D 50及S T 50值

<u>病 毒</u>	<u>LD50 (95%CL)</u>	<u>ST50 (95%CL)</u>
AcMNPV	44 (35-55)	113.1 (112-115)
AcST-1	38 (31-46)	109.2 (107-110)
AcST-3	31 (27-37)*	85.8 (85-87)**

* 此代表在 L D 50 方面較野生型病毒有統計上有意義之減少 ($\alpha = 0.05$)。

** 此代表在 L D 50 方面較野生型病毒有統計上有意義之減少 ($\alpha = 0.0001$)。

(E) 感染之病理

也檢查以 A c M N P V、A c S T - 1 或 A c S T - 3 感染後之病理方面。以 A c S T - 3 感染之幼虫和以 A c S T - 1 或 A c M N P V 感染的不同。以 A c S T - 1 或 A c M N P V 感染造成重大病毒誘生之組織損害，使幼虫液化產生乳色。以 A c S T - 3 感染，幼虫可保持其結構之完整性並保持綠色。

五、發明說明 (41)

(F) 昆虫以 A c S T - 3 感染在取食傷害上之減少

A c S T - 3 重組體病毒，減少由粉紋夜蛾幼虫所造成之農作物損失之效力示於圖 8。

(G) 以重組病毒但不同的訊號肽所合成之蛋白質

測試嵌入每一重組體病毒中，毒素基因之表現，係將之感染秋粘虫細胞，並在固定時間間隔下放射標記個別的培養皿，歷 1 小時。結果示於圖 15 a、b。

A c J H E S T 於感染後 12 小時會產某些毒素，合成高峰在感染後 18 - 36 小時之間；之後，蛋白質產生之速率減低。於經 A c I 12 S T 感染之細胞中可觀察到可比較之結果，雖然以此病毒感染的細胞，其毒素之產率可能略低。

(H) 以具雜種基因啓動基因之重組體病毒合成蛋白質

圖 15 C 也示出於 A c B P S T 感染細胞中所產生之蠟毒之動力學。可証知此病毒於感染 12 小時後，可啓動相當量之毒素產生。此產率顯著高於以 p 10 基因啓動基因單獨控制毒素基因之重組病毒所感染的其他細胞中任一個細胞。以 A c B P S T 感染之細胞，其毒素之產製持續到感染後 48 小時。

(I) 由病毒感染之細胞中分泌至培養基之毒素生物活性

表 4 示出 A a H I T 分泌至培養基中，支持經病毒感染

五、發明說明 (42)

染之 S f 細胞生長之生物活性。培養基利用 (C) 中所述之家蠅分析。可十分清楚看出，A c S T - 1 不會釋出活性毒素至培養基中。

(J) 具不同分泌訊號或雜種基因啟動基因之重組體病毒之活體內活性

如先 (D) 所述地，估計每一重組體病毒之 L D 5 0 值。發現十分相似。經新生動虫感染後評估 S T 5 0 。 A c S T - 3 之 S T 5 0 為 7 1 . 4 小時 (7 0 . 6 - 7 2 . 2 之 9 5 % 信任度界線) 、 A c J H E S T 為 7 7 . 7 小時 (7 6 . 7 - 7 8 . 7 之 9 5 % 信任度界線) 、 A c I 1 2 S T 為 8 7 . 2 小時 (8 6 . 1 - 8 8 . 3 之 9 5 % 信任度界線) 、 A c B P S T 為 7 3 . 1 小時 (7 1 . 8 - 7 4 . 4 之 9 5 % 信任度界線) 。

五、發明說明 (43)

表4：經含A a H I T之重組體病毒所感染之細胞培養物中培養基之毒性活性

病毒	感染後小時數																			
	12				18				24				42				48			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
AcST-1	10	0	0	10	10	0	0	10	10	0	0	10	10	0	0	10	1	0	0	10
AcST-3	10	0	0	10	8	2	0	10	1	5	4	10	0	4	6	10	1	9	0	10
AcI12ST	10	0	0	10	9	1	0	10	10	0	0	10	10	0	0	10	8	2	0	10
AcJHEST	10	0	0	10	10	0	0	10	7	3	0	10	4	6	0	10	3	7	0	10
AcBPST	10	0	0	10	0	6	4	10	1	4	5	10	0	1	9	10	0	9	1	10

A = 可飛之昆虫

B = 可移動但不會飛之昆虫

C = 根本不會動的昆虫

D = 注射之昆虫數目

五、發明說明 (44)

表 5 含 A a H I T 之重組體杆狀病毒之 L D 5 0 及 S T
5 0 值

<u>病 毒</u>	<u>LD50(95%CL)</u>	<u>ST50(95%CL)</u>
AcST-3	-	71.4(70.6-72.2)
AcJHEST	46(36-59)	77.7(76.7-78.7)
AcI12ST	-	87.2(86.1-88.3)
AcBPST	50(36-67)	73.1(71.8-74.4)
AcMNPV	41(34-49)	108(106.9-109.1)

大腸桿菌 X L - Blue 攜有 p A c A T M - 1 , 大腸桿菌 H B 1 0 1 攜有 p A c U W 2 B , 及大腸桿菌 SURETM 攜有 p A c S T - 3 , 於 1 9 9 1 年 3 月 2 2 日貯置在 National Collection of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, GB, 其編號分別為: N C I M B 4 0 3 9 3 、 N C I M B 4 0 3 9 4 、及 N C I M B 4 0 3 9 5 。

參考文獻

五、發明說明 (45)

Adachi, T., Takiya, S., Suzuki, Y., Iwami, M., Kawakami, A., Takahashi, S.Y., Ishizaki, H., Nagasawa, H., Suzuki, A., (1989). cDNA structure and expression of bombyxin, an insulin-like brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori*. J. Biol. Chem., 264: 7681-7685.

Blissard, G.W., Rohrmann, G.F. (1989). Location, sequence, transcription mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. Virology, 170: 537-555.

Bougis, P.E., Rochat, H., Smith, L.A. (1989). Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins. Structures of precursors, processing outcomes, and expression of a functional recombinant toxin II. J. Biol. Chem., 264: 19259-19265.

Brown, M., Faulkner, P. (1977). A plaque assay for nuclear polyhedrosis virus using a solid overlay. J. Gen. Virol., 36: 361-364.

Carbonell, L.F., Hodge, M.R., Tomalski, M.D., Miller, L.K. (1988). Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors. Gene, 73: 409-418.

Cook, R.F., Avery, R.J., Dimmock, N.J. (1979). Infection of chicken erythrocytes with influenza and other viruses. Infection and Immunity 25: 396-402.

Cunningham, J.C. (1982). Field trials with baculoviruses: control of forest insect pests. In Microbial and Viral Insecticides, pp. 335-386. Edited by E. Kurstak. Marcel Dekker, New York.

Dente, L., Cesarini, G., and Cortese, R. (1983) Nucl. Acids. Res. 11 1645-1655. pEMBL: a new family of single stranded plasmids.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M. (1987). Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84: 7413-7417.

五、發明說明 (46)

- Finney, D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London, England.
- Gordon, J.D., Carstens, E.B. (1984). Phenotypic characterization and physical mapping of a temperature-sensitive mutant of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus defective in DNA synthesis. *Virology*, 138: 69-81.
- Groebe, D.R., Chung, A.E., Ho, C. (1990). Cationic lipid-mediated co-transfection of insect cells. *Nucl. Acids Res.*, 18 (13): 4033.
- Hammock, B.D., Bonning, B.C., Possee, R.D., Hanzlik, T.N., Maeda, S. (1990). Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. *Nature*, 344: 458-461.
- Hanzlik, T.N., Abdel-Aal, Y.A.I., Harshman, L.G., Hammock, B.D. (1989). Isolation and sequencing of the cDNA clones coding for juvenile hormone esterase from *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.*, 264: 12419-12425.
- Harrap, K.A., Payne, C.C., Robertson, J.S. (1977). The properties of three baculoviruses from closely related hosts. *Virology*, 79: 14-31.
- Hill-Perkins, M.S. and Possee, R.D. (1990). A baculovirus expression vector derived from the basic protein promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. gen. Virol.* 71, 931-976.
- Hooft van Iddekinge, B.J.L., Smith, G.E., Summers, M.D. (1983). Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 131: 561-565.
- Horodyski, F.M., Riddiford, L.M., Truman, J.W., (1989). Isolation and characterization of the eclosion hormone gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 8123-8127.
- Hughes, P.R., van Beek, N.A.M., Wood, H.A. (1986). A modified droplet feeding method for rapid assay of *Bacillus thuringiensis* and baculoviruses in noctuid larvae. *J. Inverteb. Pathol.*, 48: 187-192.

五、發明說明 (47)

- Hughes, P.R., Wood, H.A. (1981). A synchronous peroval technique for the bioassay of insect viruses. J. Inverteb. Pathol., 37: 154-159
- Hunter, F.R., Crook, N.E., Entwistle, P.F. (1984). Viruses as pathogens for the control of insects. In Microbial Methods for Environmental Biotechnology, pp. 323-347. Edited by J.M. Grainger & J.M. Lynch. New York & London: Academic Press.
- Ivell, R., Richter, D. (1984). Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 81: 2006-2010.
- Kawakami, A., Kataoka, H., Oka, T., Mizoguchi, A., Kimura-Kawakami, M., Adachi, T., Iwami, M., Nagasawa, H., Suzuki, A., Ishizaki, H., 1990. Molecular cloning of the *Bombix mori* prothoracicotropic hormone. Science, 247: 1333-1335.
- Kitts, P.A., Ayres, D., Possee, R.D. (1990). Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant expression vectors. Nucl. Acids. Res., 18(19): 5667-5672
- Kunkel, T.A., (1985). Rapid and efficient site specific mutagenesis without phenotype selection. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 83: 488-492.
- Kuzio, J., Rohel, D.Z., Curry, C.J., Krebs, A., Carstens, E.B., Faulkner, P. (1984). Nucleotide sequence of the p10 polypeptide gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology, 139: 414-418.
- Livingstone, C., Jones, I. (1989). Baculovirus expression vectors with single strand capability. Nucl. Acids Res., 17: 2366.
- Loret, E.P., Mansuelle, P., Rochat, H., Granier, C. (1990). Neurotoxins active on insects: Amino acid sequences, chemical modifications, and secondary structure estimations by circular dichroism of toxins from the Scorpion *Androctonus australis* Hector. Biochemistry, 29: 1492-1501
- Maeda, S. (1989). Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a sythetic diuretic hormone gene. Biochem. Biophys. Res. Commun., 165: 1177-1183.

五、發明說明 (48)

- Martnes, J.W.M., Honee, G., Zuidema, D., van Lent, J.W.M., Visser, B., Vlak, J.M. (1990). Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells. *App. Env. Microb.*, 56: 2764-2770.
- Matsuura, Y., Possee, R.D., Overton, H.A., Bishop, D.H.L. (1987). Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J. Gen. Virol.*, 68: 1233-1250.
- Merryweather, A.T. Weyer, U., Harris, M.P.G. Hirst, M., Booth, T., Possee, R.D. (1990). Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 delta endotoxin. *J. Gen. Virol.*, 71: 1535-1544.
- Nojiri, H., Ishida, I., Miyashita, E., Sato, M., Urano, A., Degushi, T. (1987). Cloning and sequence analysis of cDNAs for neurohypophysial hormones vasotocin and mesotocin for the hypothalamus of toad, *Bufo japonicus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84: 3043-3046.
- Possee, R.D. (1986). Cell-surface expression of influenza virus haemagglutinin in insect cells using a baculovirus vector. *Virus Research*, 5: 43-59.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 74: 5463-5467.
- Smith, G.E., Fraser, M.J., Summers, M.D. (1983). Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletions within the polyhedrin gene. *J. Virol.*, 46: 584-593.
- Snyder, M., Hunkapiller, M., Yuen, D., Silvert, D., Fristrom, J., Davidson, N. (1982). Cuticle protein genes of *Drosophila*: Structure, organization and evolution of four clustered genes. *Cell*, 29: 1027-1040.
- Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashimira, N., Yoshimoto, R., Hamuro, J. (1983). Structure

五、發明說明 (49)

and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. Nature, 302: 305-310.

van Hofsten, P., Faye, I., Kockum, K., Lee, J.Y., Xanthopoulos, K.G., Boman, I.A., Boman, H.G., Engstrom,? ., Andreu, D., Merrifield, R.B. (1985). Molecular cloning, cDNA sequencing, and chemical synthesis of cecropin B from *Hyalophora cecropia*. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82: 2240-2243.

Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J., McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). In vitro, 13: 213-217.

Weyer, U., Knight, S., Possee, R.D. (1990). Analysis of very late gene expression by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and the further development of multiple expression vectors. J. Gen. Virol., 71: 1525-1534.

Whitford, M., Stewart, S., Kuzio, J., Faulkner, P. (1989). Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. J. Virol., 63: 1393-1399.

WHO, (1973). The use of viruses for the control of insect pests and disease vectors. report of a joint FAO/WHO meeting on insect viruses. World Health Organisation Technical Reprint Series No 531. Geneva.

Wigley, P.J. (1976). The epizootiology of a nuclear polyhedrosis virus disease of the winter moth *Operophtera brumata* L. at Wistman's Wood, Dartmoor. D. Phil. thesis, University of Oxford, England.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119.

生物控制劑

四、中文發明摘要(發明之名稱:

本發明是有關一種重組體杆狀病毒，其在所感染之昆
虫細胞中會表現一種外來蛋白質，包括一種殺虫毒素，或
其功能性衍生物，若加上訊號肽如此毒素及其衍生物可自
昆虫細胞中分泌出來。此重組體杆狀病毒可用來控制昆虫
。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

英文發明摘要(發明之名稱:

"BIOLOGICAL CONTROL AGENTS"

A recombinant baculovirus which, in insect cells
infected therewith, expresses a foreign protein comprising
an insecticidal toxin, or a functional derivative thereof,
provided with a signal peptide such that the toxin or
derivative thereof is secreted from the insect cells. This
recombinant baculovirus can be used in insect control.

附註：本案已向

英國(地區) 申請專利，申請日期1991.3.22 案號1 061 85.3

第 1. 圖

MetLeuLeuValAsnGlnSerHisGlnGlyPheAsnLysGluHisThrSerLysMet
ATGCTACTAGTAAATCAGTCACACCAAGGCTTCAATAAGGAACACACAAGCAAGA
50 260 270 280 290 300

ValSerAlaIleValLeuTyrValLeuLeuAlaAlaAlaAlaHisSerAlaPheAlaLys
TGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCATTCTGCCTTTGCGA
310 320 330 340 350 360

LysAsnGlyTyrAlaValAspSerSerGlyLysAlaProGluCysLeuLeuSerAsnTyr
AAAAAACGGCTACGCGGTTGACTCGTCGGGCAAAGCGCCAGAATGTCTACTATCGAACT
370 380 390 400 410 420

CysAsnAsnGlnCysThrLysValHisTyrAlaAspLysGlyTyrCysCysLeuLeuSer
ACTGTAACAACCAATGTACTAAAGTTCACTACGCTGACAAAGGCTACTGTTGTCTACTAA
430 440 450 460 470 480

CysTyrCysPheGlyLeuAsnAspAspLysLysValLeuGluIleSerAspThrArgLys
GCTGTTACTGTTTTGGCCTAAACGACGACAAAAAGTTCTAGAAATTAGCGACACTCGTA
490 500 510 520 530 540

SerTyrCysAspThrThrIleIleAsn *
AAAGCTACTGTGACACTACTATTATTAATACTAA

第 2. 圖

BamHI AccI
 a1. GATCCAAATATGAAAAAAAAACGGCTACGCGGTTGACTCGTCGGGCAAAGCGCCAGAATGT
 a2. GTTTATACTTTTTTTTGGCCGATGCGCCAACTGAGCAGCCCGTTTCGCGGTCTTACAGA
 AcNPV

AccI
 b3. CTACTATCGAACTACTGTAACAACCAATGTACTAAAGTTCACTACGCTGACAAAG
 AccI

GCTACTGTTGT

b4. TGATAGCTTGATGACATTGTTGGTTACATGATTTCAAGTGATGCGACTGTTTCCGATGA-
 CAACAGC

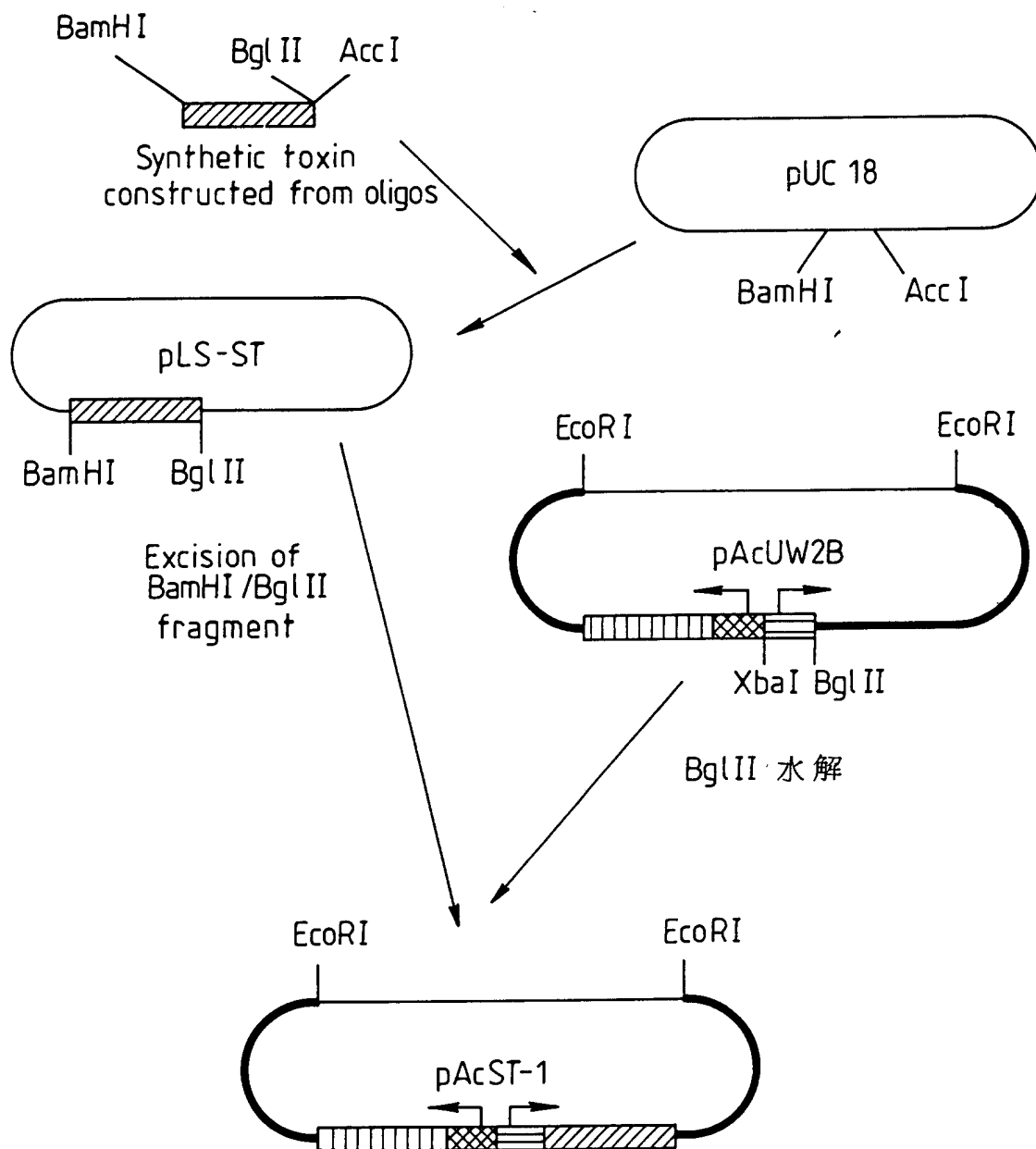
BamHI AccI XbaI
 c5. GATCCACGTGACGTGTCTACTAAGCTGTTACTGTTTTGGCCTAAACGACGACAAAAAAGTT
 c6. GTGCACTGCACAGATGATTCGACAATGACAAAACCGGATTTGCTGCTGTTTTTT-
 Stuffer

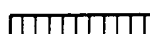
CAAGATC

XbaI *
 d7. CTAGAAATTAGCGACACTCGTAAAAGCTACTGTGACACTACTATTATTAACTAA-
 BglIIAccI
AGATCTGG

d8. TTTAATCGCTGTGAGCATTTTCGATGACACTGTGATGATAATAATTGATTTCTA-
 GACCGC

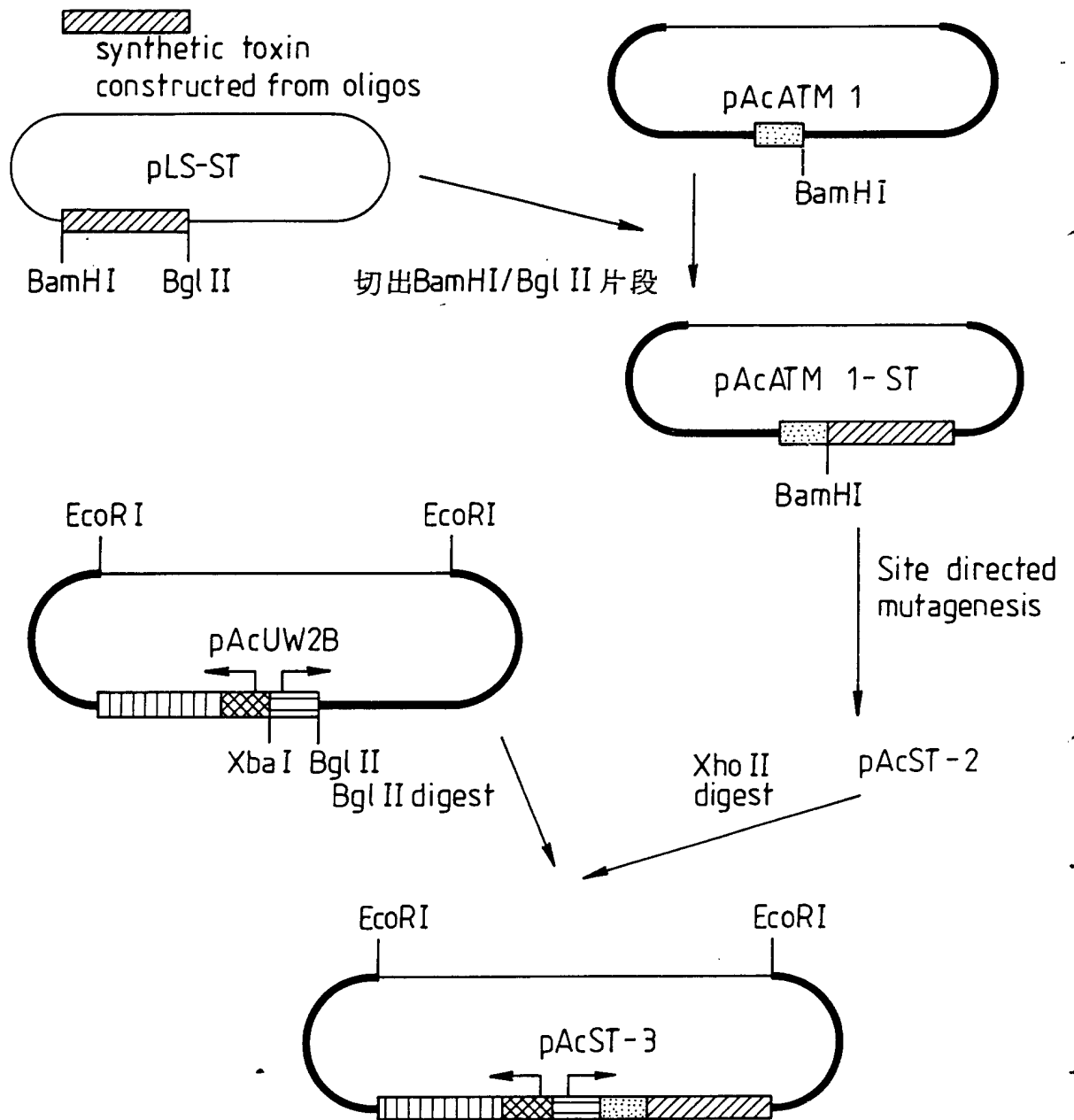
第3a圖



 多體素
 P o l 啓動基因
 P l o 啓動基因
 蝎 毒

 AcNPV 序列
 pUC 序列

第 3b 圖



- | | | |
|---------------|------------------------|-----------------|
| Polyhedrin | gp 67 secretion signal | AcNPV sequences |
| Pol. promoter | Scorpion toxin | pUC sequences |
| p10 promoter | | |

第4A圖

TCTAGAGTCGAGCAAGAAAATAAAACGCCAAACGCGTTGGAGTCTTGTGTGCTATTTTAC
 Xba I 10 20 30 40 50 60

AAAGATTTCAGAAATACGCATCACTTACAACAAGGGGGACTATGAAATTATGCATTTGAGG
 70 80 90 100 110 120

ATGCCGGGACCTTTAATTCAACCCAACACAATATATTATAGTTAAATAAGAATTATTATC
 130 140 150 160 170 180

AAATCATTTGTATATTAATTAAAATACTATACTGTAAATTACATTTTATTACAATCACA
 190 200 210 220 230 240

MetLeuLeuValAsnGlnSerHisGlnGlyPheAsnLysGluHisThrSerLysMet
GATCTATGCTACTAGTAAATCAGTCACACCAAGGCTTCAATAAGGAACACACAAGCAAGA
 Bgl II 50 260 270 280 290 300

ValSerAlaIleValLeuTyrValLeuLeuAlaAlaAlaHisSerAlaPheAlaLys
TGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGCGCATTCTGCCTTTGCGA
 310 320 330 340 350 360

LysAsnGlyTyrAlaValAspSerSerGlyLysAlaProGluCysLeuLeuSerAsnTyr
 AAAAAACGGCTACGCGGTTGACTCGTCGGGCAAAGCGCCAGAATGTCTACTATCGAACT
 370 380 390 400 410 420

CysAsnAsnGlnCysThrLysValHisTyrAlaAspLysGlyTyrCysCysLeuLeuSer
 ACTGTAACAACCAATGTACTAAAGTTCACTACGCTGACAAAGGCTACTGTTGTCTACTAA
 430 440 450 460 470 480

CysTyrCysPheGlyLeuAsnAspAspLysLysValLeuGluIleSerAspThrArgLys
 GCTGTTACTGTTTTGGCCTAAACGACGACAAAAAAGTTCTAGAAATTAGCGACACTCGTA
 490 500 510 520 530 540

SerTyrCysAspThrThrIleIleAsn***
 AAAGCTACTGTGACACTACTATTATTAATACTAAAGATCT
 550 560 570 Bgl II

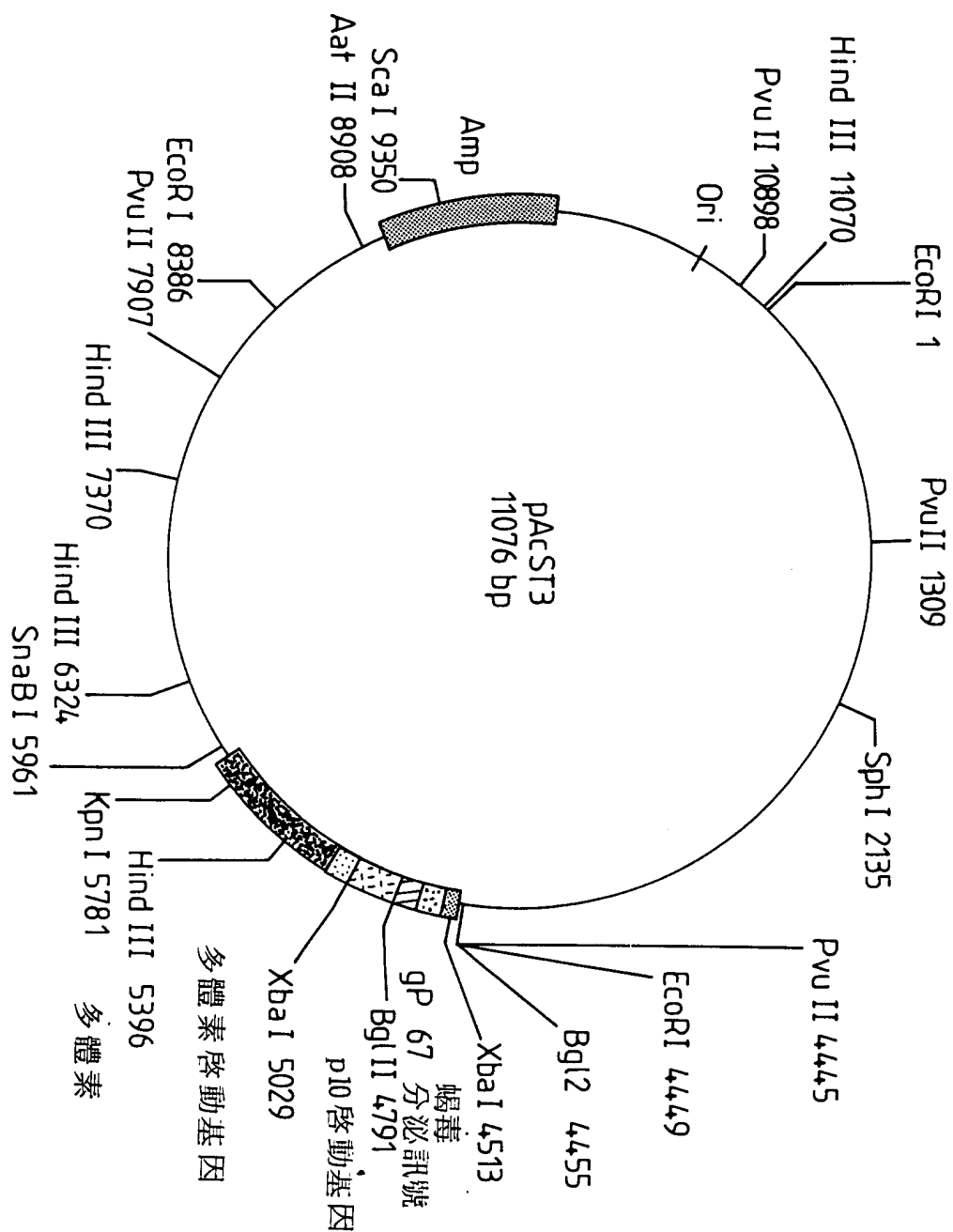
在接點處未突變的序列

HisSerAlaPheAla LysLysAsnGlyTyr
 CATTCTGCCTTTGCGgatcaaatatgAAAAAACGGCTAC
 350 370

用於突變之寡核苷酸 GP67-SC . Tox

CATTCTGCCTTTGCGAAAAAACGGCTAC

第 4b 圖



續 第4b圖

P10 promoter

GAGCAAGAAATAAACGCCCAACGCCGTGGAGTCTTGCTGCTATTTCACAAGATTCA
GGAATACGCATCACTTACAACAAGGGGACTATGAAATTAATGCAATTGA GGATGCCG
GGACCTTTAATTCACCAACCAACAATATAT ATAGTTAAT AAGAATTATTCAAAT
CATGTATTATTAAATTAATACTATACGTAAATTACATTTTATTACAAATCAC

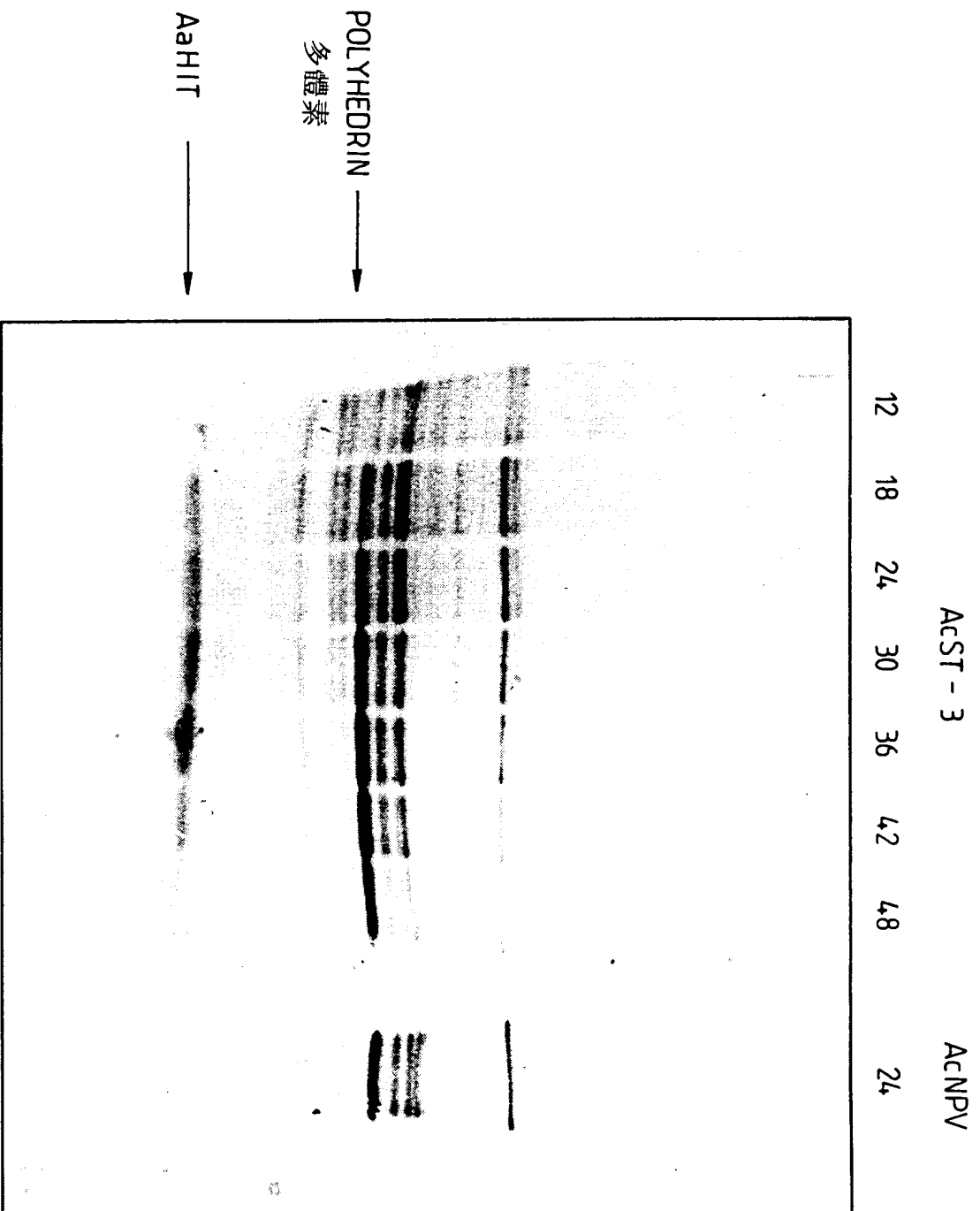
Secretion signal gp67

M L L V N Q S H Q G F N K E H T S K
agatctatgctactagtaaatcagtcacacccaaggcttcaataaggaaacacacagcaag
M V S A I V L Y V L L A A A A H S A F A
ATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTTGGCGCGCGGCATCTGCTTGGC

AaIT

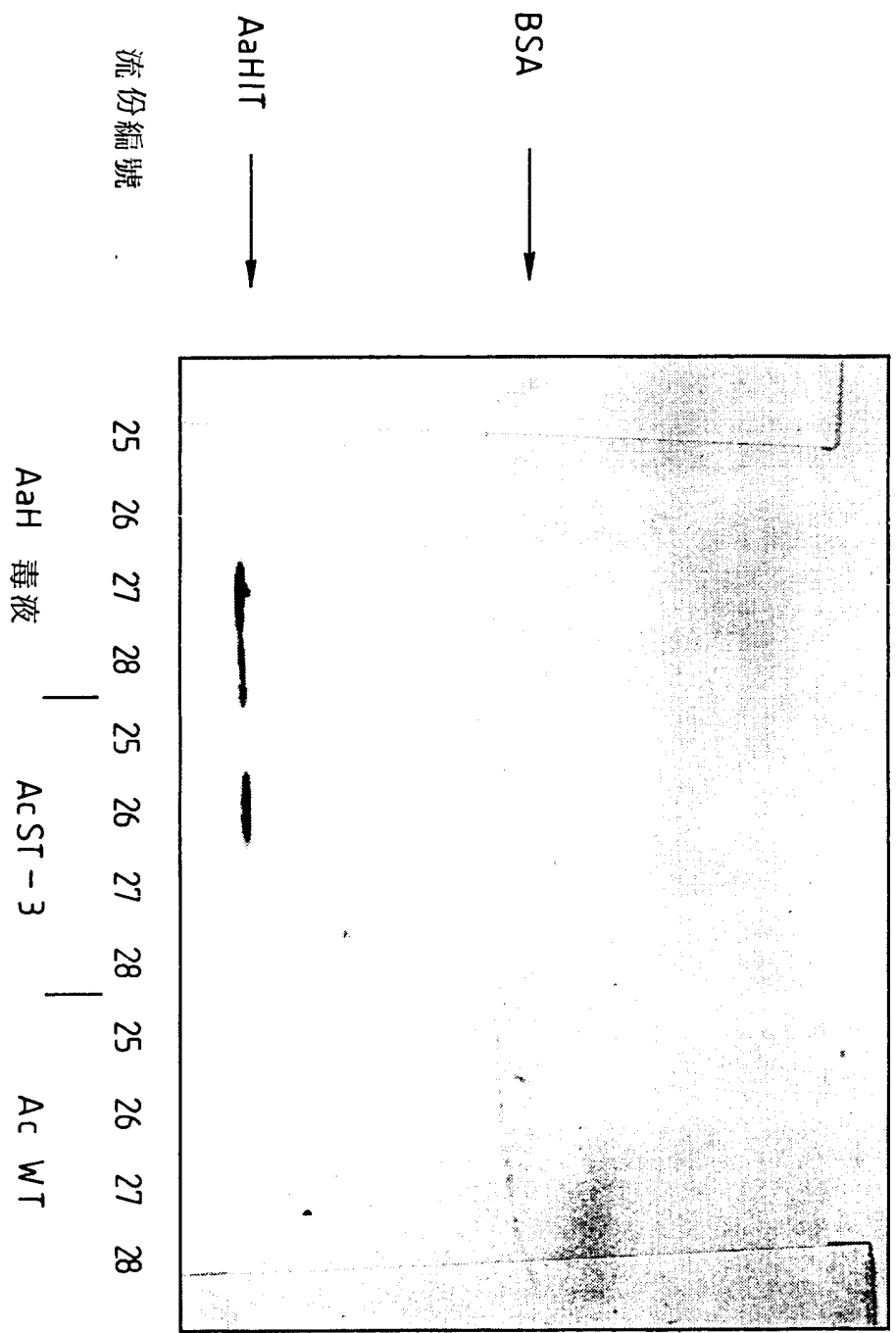
K K N G Y A V D S S G K A P E C L L S N
AAAAAAACGGCTACGGCGTTGACTCGTCGGGCAAAAGCCGCAATGCTACTATCGAAC
Y C N N Q C T K V H Y A D K G Y C C L L
TACTGTAACAACCAATGTAATAAGTTCACCTACGCTGACAAAGGCTACTGTGCTACTA
S C Y C F G L N D D K K V L E I S D T R
AGCTGTACTGTTTGGCCTAAACGACGACCAAAAAGTTCAGAAATTAGCGACACTCGT
K S Y C D T T I I N *
AAAAGCTACTGTGACACTACTATTATTAACTAagatct

第 5. 圖

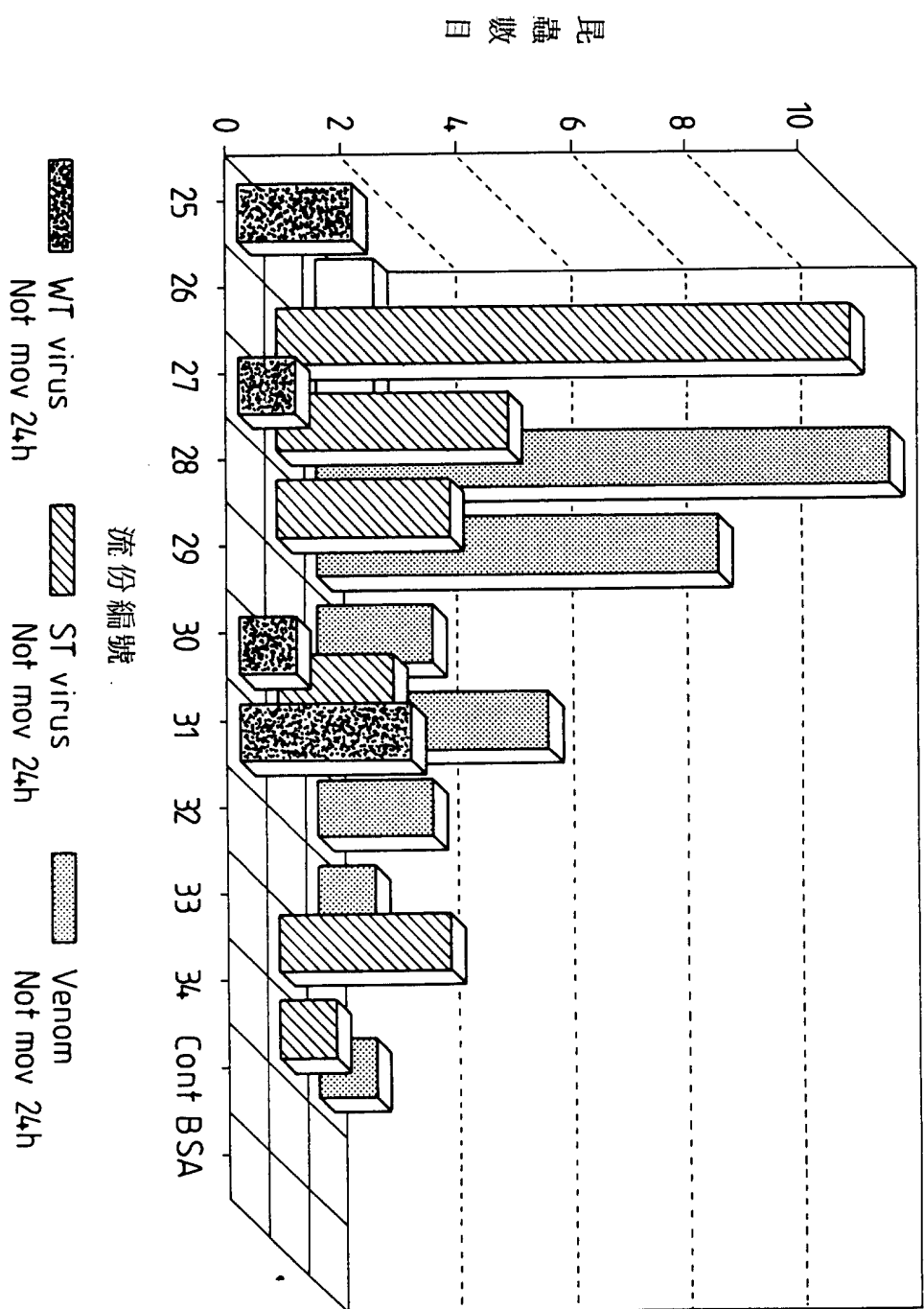


205569

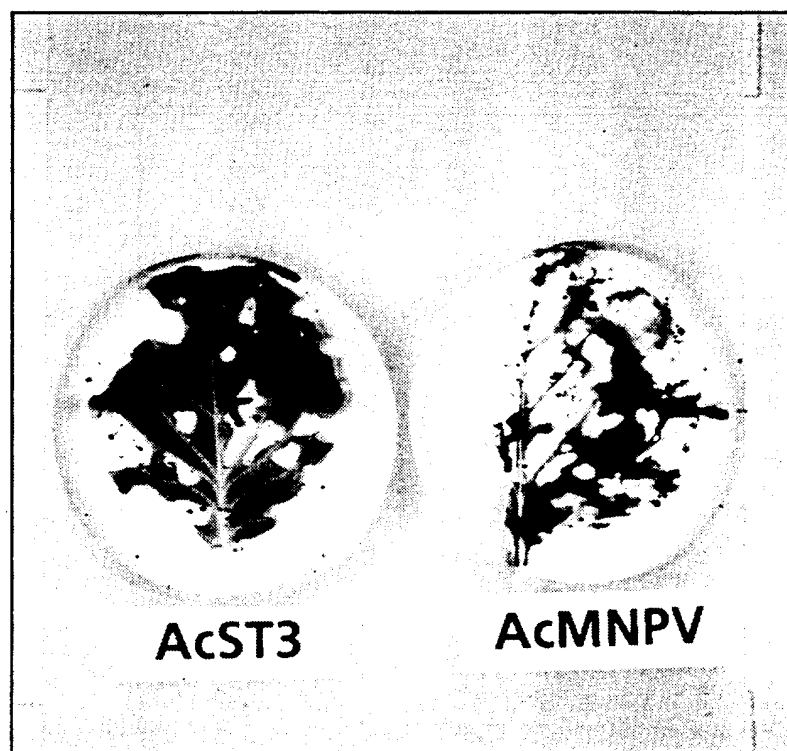
第.6.圖



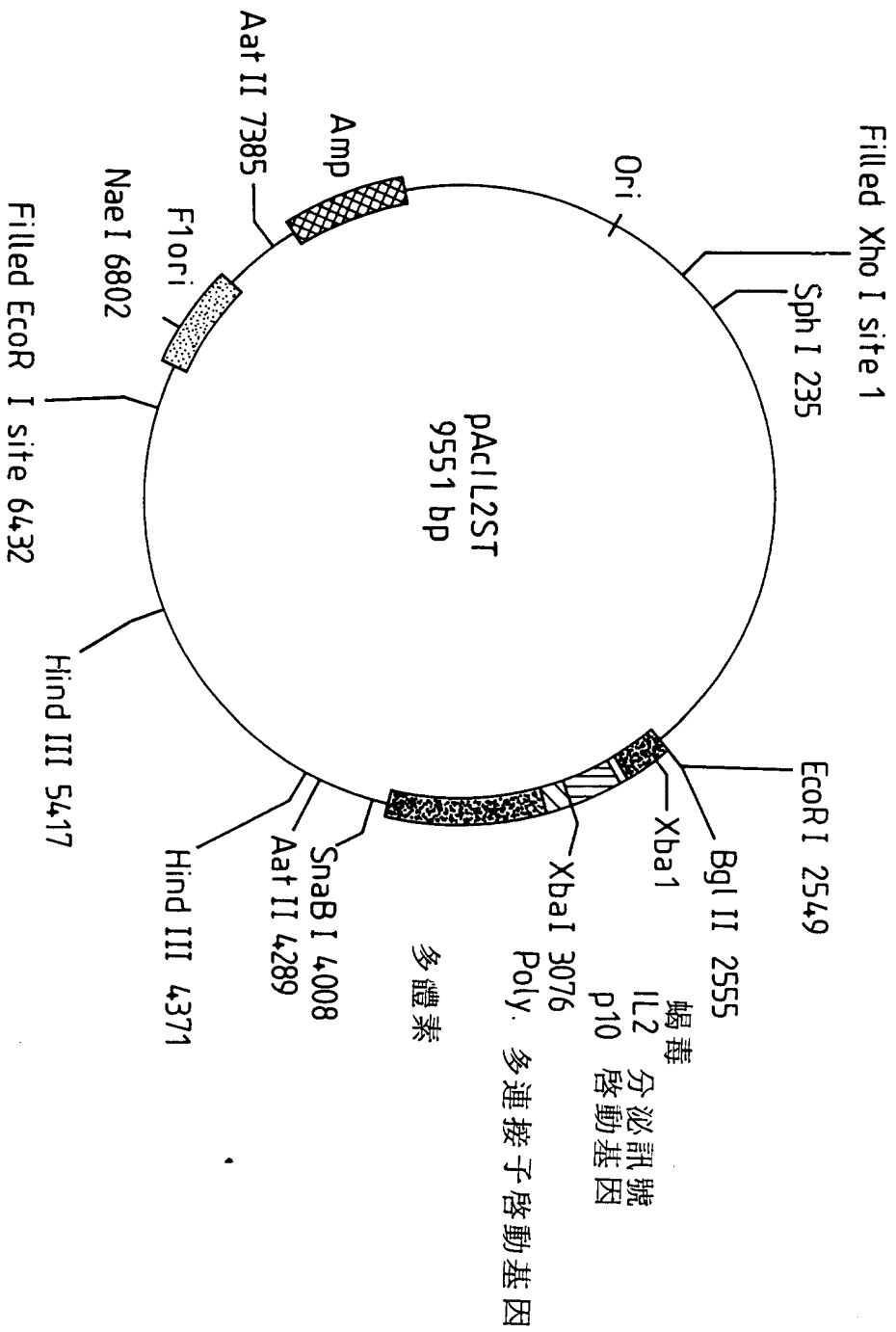
第 7. 圖



第 8. 圖



第 9. 圖



續 第 9 圖

P10 啓動基因

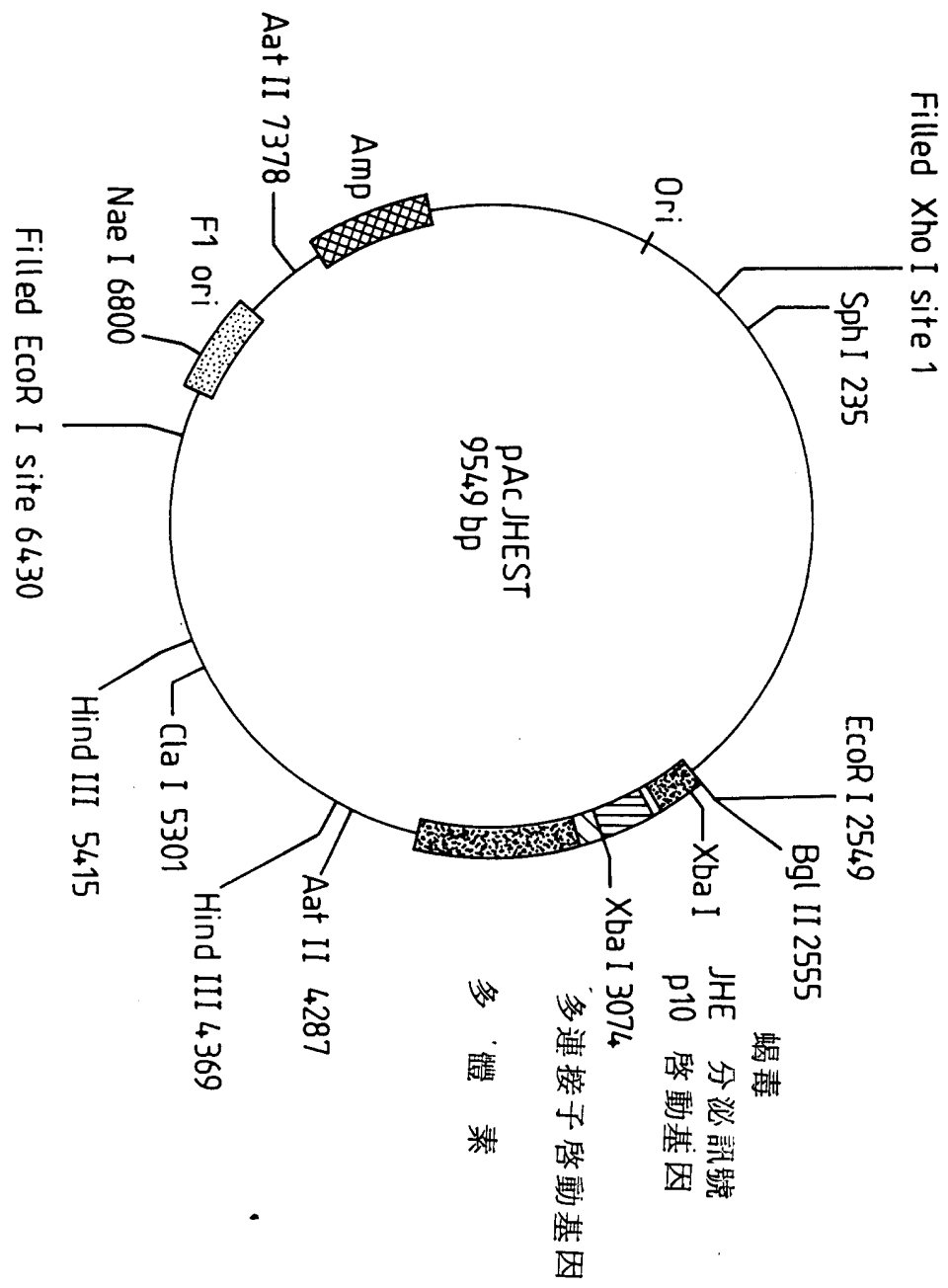
GAGCAAGAAATAAAAACGCCAACGCCGTTGGAGTCTTGTTGCTATTTTACAAAGATTCA
GGAATAACGATCATTACACAAGGGGACTATGAATTATGCAATTGA GGATGCCGG
GGACCTTAAATTCACCACACATATATT ATAGTTAAAT AAGAATTATATCAAAAT
CATTGTATTATTAAATTAATACTATCTGTAATTTACATTTTATTTACAATCAC

嵌入 IL 2 分泌訊號 + AaIT IL2 分泌訊號

M Y R M Q L L S C I A L S L A L V T
ggtccatgtacaggatgcaactcctgtcttgcattggcactaagtcttggcacttgtcaca
N S A
AACAGTGCA

AaIT
K K N G Y A V D S S G K A P E C L L S N
AAAAAAACGGCTACGGGTGACTCGTCGGGCAAGCGCCAGATGTTCTACTATCGAAC
Y C N N Q C T K V H Y A D K G Y C C L L
TACTGTAACAACCAATGTACTAAAGTTCACCTACGCTGACCAAAGGCTACTGTGTTACTA
S C Y C F G L N D D K K V L E I S D T R
AGCTGTACTGTTTGGCCTAAACGACGACAAAAAAAGTTCTAGAAATTAAGCGACACTCGT
K S Y C D T T I I N *
AAAAGCTACTGTGACACTACTATTATTAACTAAagatct

第 10 圖



續 第 10 圖

P10 啓動基因

GAGCAAGAAATAAAGCCCAACGGCTGGAGTCTTGCTGCTATTTACAAGATTCA
GGAATACGCATCCTTACACACAAAGGGGACTATGAATTATGCAATTGA GGATGCCGG
GGACCTTAAATTCACCCACACATATAT ATAGTTAAAT AAGAATTATCAAAAT
CATTGTATTTAATAAATACCTACTGTAAATTACATTTTATTTACAATCAC

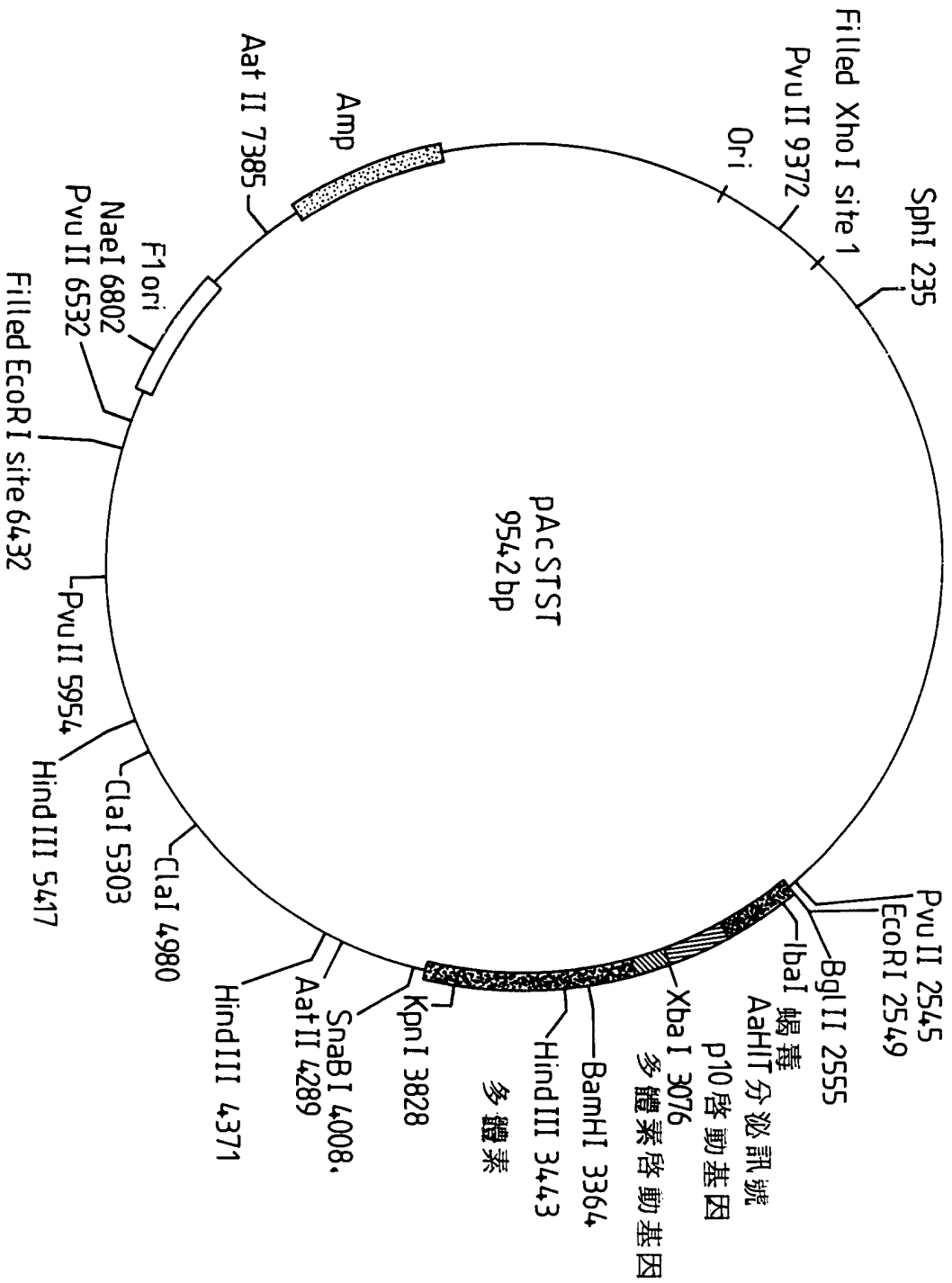
插入 J H E 分泌訊號 + AaIT JHE 分泌訊號

M T S H V L A L A F L L H A C
agatcTAAATATGACTTCACACGCTACTCGCGCTCGCCTTCTTCTACACGCGTGT
T A L A
ACAGCGCTGGCA

AaIT

K K N G Y A V D S S G K A P E C L L S N
AAAAAAACGGCTACGGGTTGACTCGTGGGCAAGCGCCAGATGTCTACTATCGAAC
Y C N N Q C T K V H Y A D K G Y C C L L
TACTGTAAACAACCAATGTACTTAAAGTTCACCTACGCTGACAAAGGCTACTGTCTACTA
S C Y C F G L N D D K K V L E I S D T R
AGCTGTACTGTTTGGCCTAAACGACGACAAAAAAGTCTAGAAATTAGCGACACTCGT
K S Y C D T T I I N *

第 11. 圖



續 第 11 圖

P10 promoter

GAGCAAGAAAAATAAACGCCCAACGCCGTGGAGTCTGTGCTAATTTACAAAGATTCA
GGAATACGCATCCTTACCAACCAAGGGGACTAIGAAATTAIGCAATTGA GGATGCCGG
GGACCTTTAATTCACCCCAACACAATATATT ATAGTTAAAT AAGAATTATTAICAAAT
CATTGTATTAATTAATTAATACTAATCTGTAATTACATTTTATTACCAATCAC

插入 S T 分泌訊號 + AaHIT

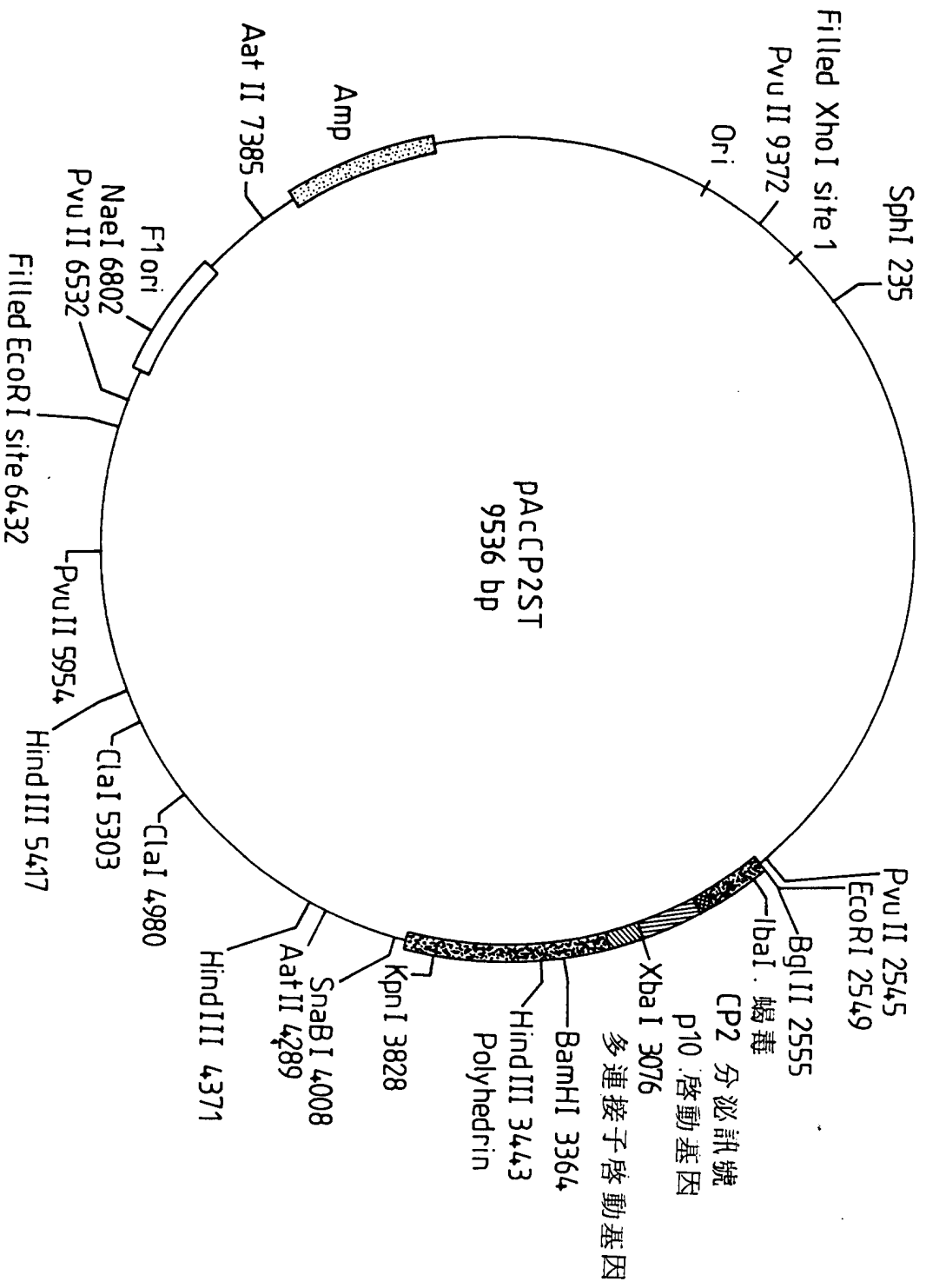
AaHIT 天然分泌訊號

M K F L L L F L V V L L P I M G V L G
ggatccATGAATTTCTCTAATGTTTCTCGTAGTCCCTTCCAATAATGGGGTGCTTGGC

AaHIT

K K N G Y A V D S S G K A P E C L L S N
AAAAAAACGGCTACGGGTTGACTCGTCGGCAAGCGCCAGAATGCTACTATCGAAC
Y C N N Q C T K V H Y A D K G Y C C L L
TACTGTACCAACCAATGTAATAAGTTCACCTACGCTGACCAAGGCTACTGTGTCTACTA
S C Y C F G L N D D K K V L E I S D T R
AGCTGTACTGTTTGGCCTAACGACGACAAAAAAGTTCTAGAAATTAGCGACACTCGT
K S Y C D T T I I N *
AAAAGCTACTGTGACACTACTAATTAATTAACCTAAagatct

第12. 圖



續
第 12 圖

P10 啓動基因.

GAGCAAGAAAATAAACGCCCAACGCCGTTGGAGTCCTGTGCTATTTACCAAGATTCA
GGAATATACGCATCCTTACAACAAGGGGACTATGAATTTATGCATTTGA GGATGCCGG
GGACCTTTAATTCACCCACACACAATATATT ATAGTTAAAT AAGAATTATTACAAT
CATTGTATTATTAAATAAATACTATACCTGAAATTACATTTATTACAAATCAC

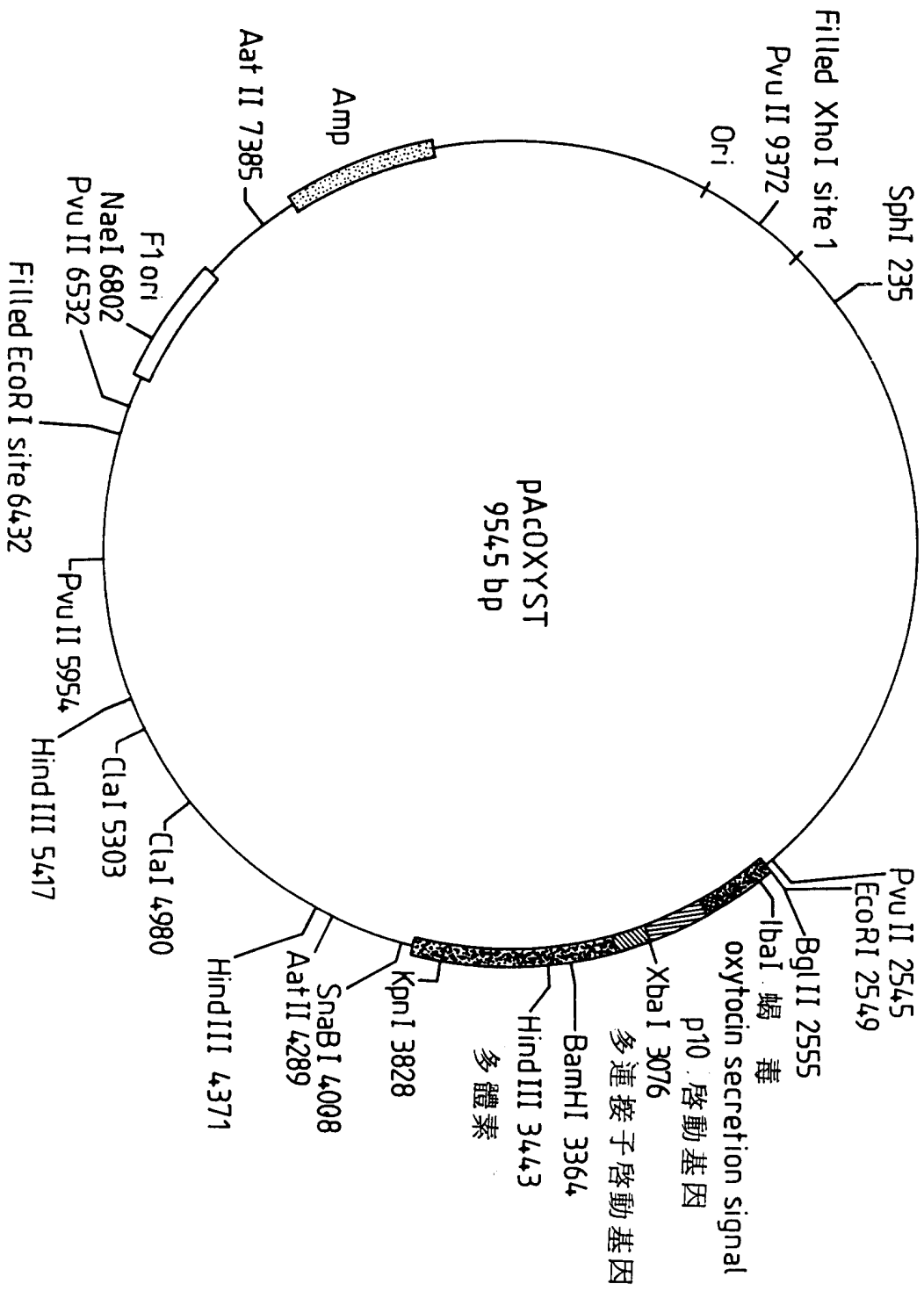
嵌入CP2分泌號+ AaHIT
CP2分泌號

M F K F V M I L A V V G V A T A
ggatccATGTTAAATTCGTTATGATTCAGCGGTGTTGGCGTGCACACCG

AaHIT

K K N G Y A V D S S G K A P E C L L S N
 AAAAAAACGGCTACGCGGTGACTCGTCGGGCAAGCGCCAGAATGCTACTAATCGAAC
 Y C N N Q C T K V H Y A D K G Y C C L L
 TACTGTACCAACCAATGTACTAAAGTTCACTACGCTGACCAAGGCTACTGTTGCTACTA
 S C Y C F G L N D D K K V L E I S D T R
 AGCTGTACTGTTTGGCCTAAACGACGACAAAAAAGTTCTAGAAATTAGCGACACTCGT
 K S Y C D T T I I N *
 AAAAGCTACTGTGACACTACTATTATTAACTAAagatct

第 13. 圖



續 第 13 圖

P10 啓動基因

GAGCCAAGAAAATAAACGCCCAACGGCGTGGAGTCTTGIGTGTATTTTACCAAGATTCA
GGAATACGCATCCTTACACCAAGGGGACTATGAATATGCAATTGA GGATGCCGG
GGACCTTTAATTCACCCCAACACAATATATT ATAGTTAAAT AAGAATTATATCAAAAT
CATGTATTATTAAATTAAATACTATACTGTAATTACATTTATTACAAATCAC

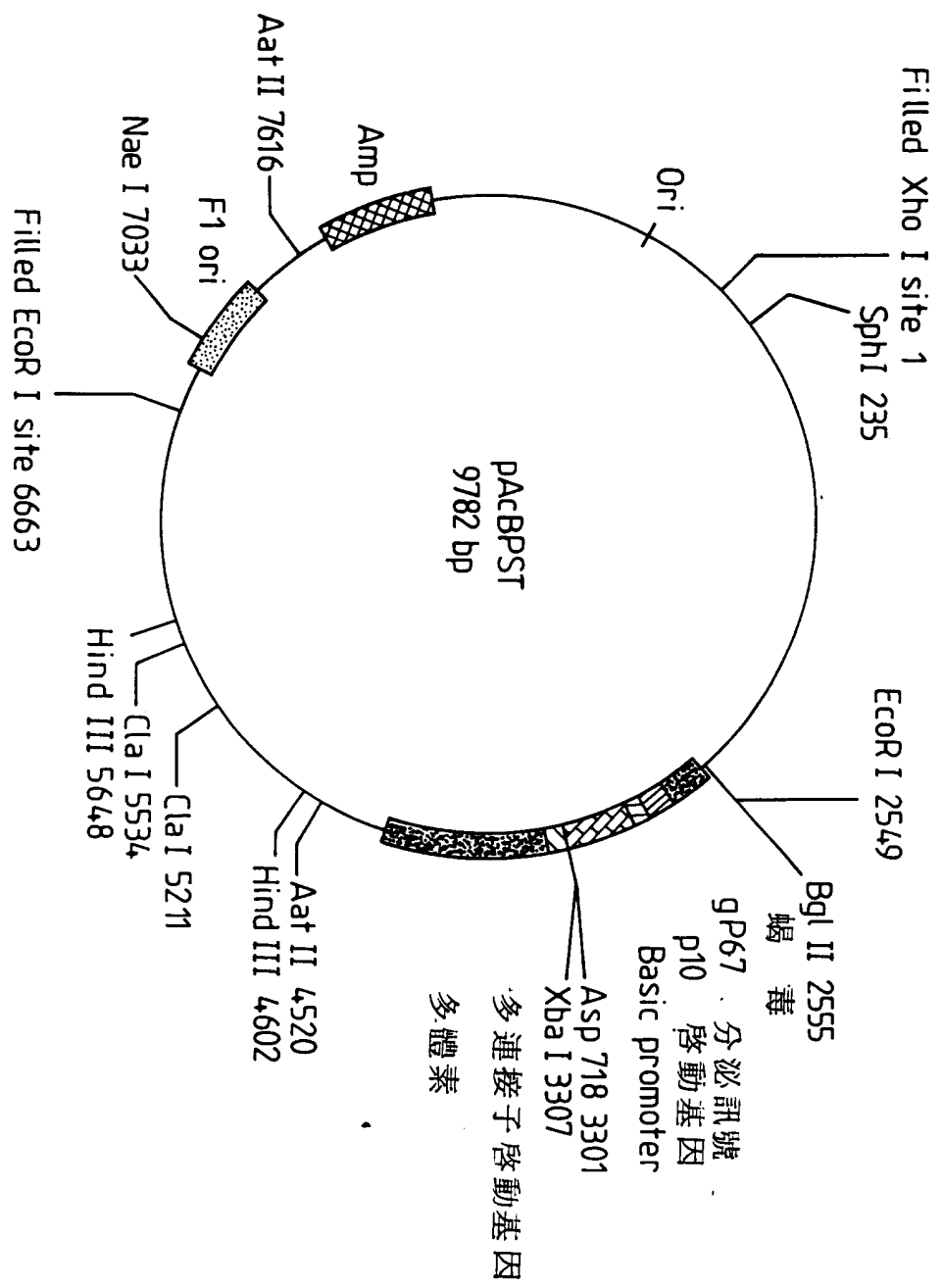
嵌入催產率分泌訊號 + AaHIT
催產率分泌訊號

M A C P S L A C C L L G L L A L T S A
ggatccATGGCCTGCCCCAGTCTCGCTTGCTGCCCTGCTTGGCCTACTGGCTCTGACCTCCGCC

AaHIT

K K N G Y A V D S S G K A P E C L L S N
AAAAAAACGGCTACGGGTTGACTCGTCGGCAAAGCGCCAGAATGCTACTATCGAAC
Y C N N Q C T K V H Y A D K G Y C C L L
TACTGTAAACCAATGTACTAAAGTTCACCTACCGCTGACAAAGGCTACTGTGTCTACTA
S C Y C F G L N D D K K V L E I S D T R
AGCTGTACTGTTTGGCCTAAACGACGACAAAAAAGTCTAGAAATTAGCGACACTCGT
K S Y C D T T I I N *
AAAAGCTACTGTGACACTACTATTATTAACTAAagatct

第 14. 圖



基本蛋白質啓動基因

CCAAATTCGGTTTTCGCGATGCGAGGTTTGAACAGGCTGCTCAAACACATAGATCC
GTACCCGCTCAGTCGGATGTATTACAATGCAGCCATACCATGTTTACACGACTATGGA
AAACTATGCCGTGTCCAATTGCAAGTTCACATTTGAGGATTACAATACATATTTAAGT
GATGGAATAATTAGGAACACAGCAACAAAATTCAAACGACCAGAGGAGTTAAACAT
ATATTGGAGTTCAGTCGTCGAATGCAAGCGTAAAAATATTATAAGGTAATAATTA
CAGCTACATAAATTACACAATTTAAACG

P10 啓動基因

GATCTGATAAGAAATTATTATCAAAATCATTTGTATTATTAAATTAATACTACTGTAAT
TACATTTTATTACATCAC

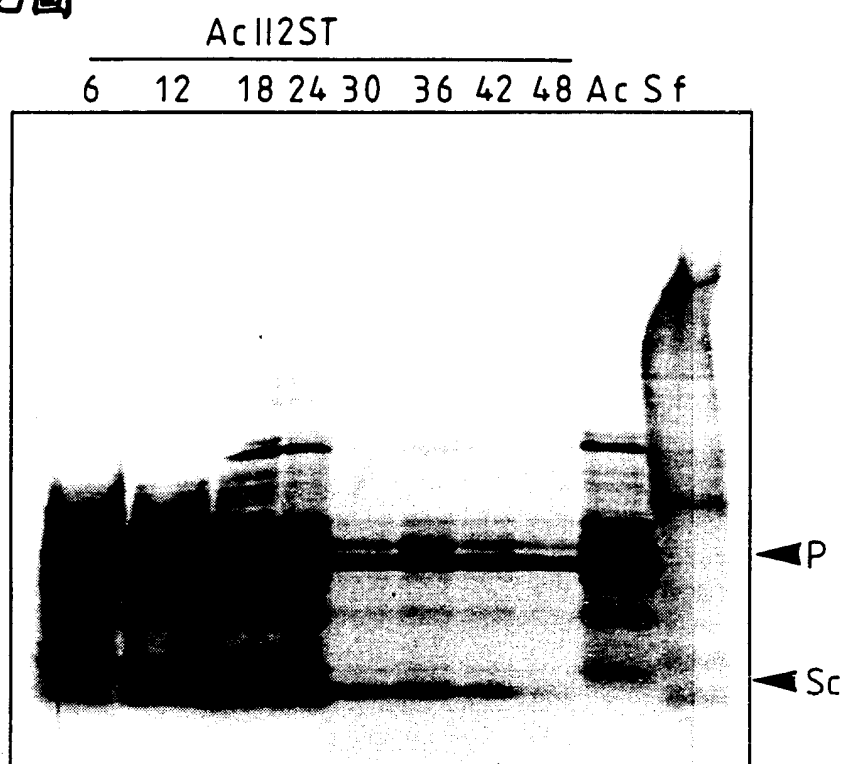
分泌訊號 gp67

M L L V N Q S H Q G F N K E H T S K
agatcctatgctactagtaaatcagtcacaccaaaggcttcaataaggaacacacaagcaag
M V S A I V L Y V L L A A A A H S A F A
ATGGTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGCGCATTCCTGCCCTTGGC

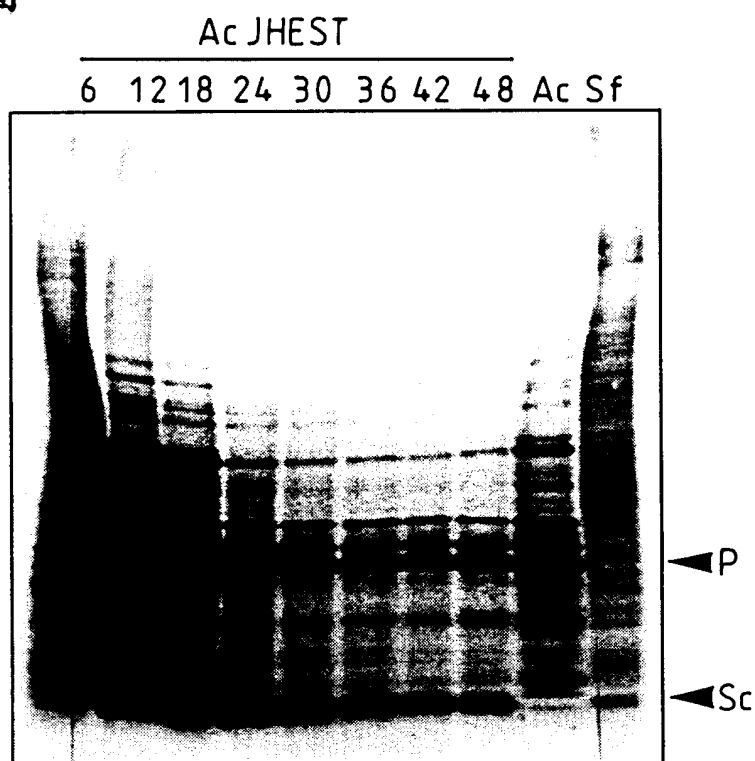
AaIT

K K N G Y A V D S S G K A P E C L L S N
AAAAAAACGGCTACGGCGGTGACTCGTCGGCAAGCGCCAGAAATGCTACTATCGAAC
Y C N N Q C T K V H Y A D K G Y C C L L
TACTGTACAACCAATGTACTAAGTTCACCTACGCTGACAAAGGCTACTGTGCTACTA
S C Y C F G L N D D K K V L E I S D T R
AGCTGTACTGTTTGGCCTAAACGACGACAAAAGTTCTAGAAATTAGCGACACTCGT
K S Y C D T T I I N *
AAAAGCTACTGTGACACTACTATTATTAACTAAgattct

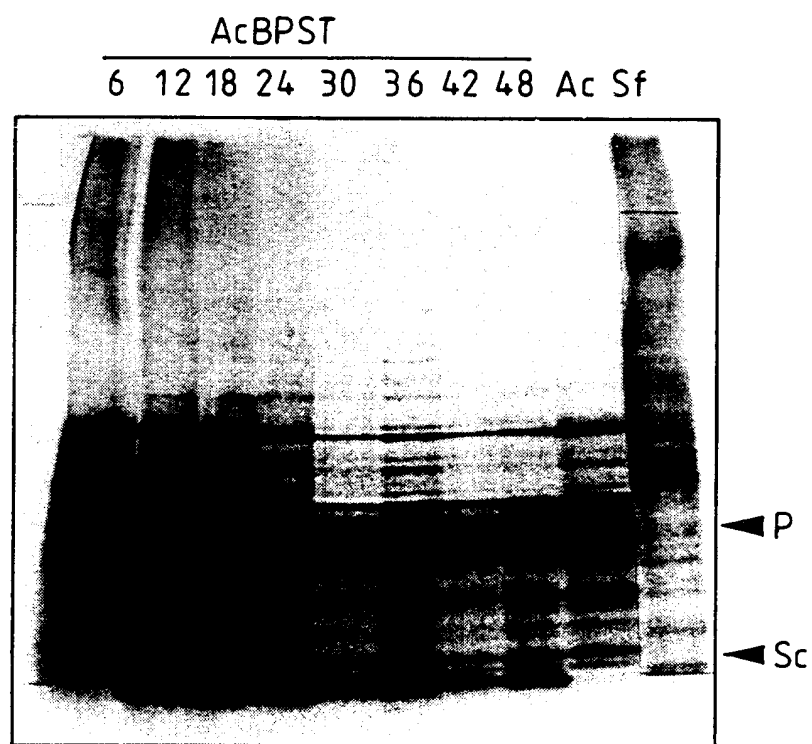
第15a圖



第15b圖



第15c圖



第 16圖

gp67 訊號

MetLeuLeuValAsnGlnSerHisGlnGlyPheAsnLysGluHisThrSerLys
AGATCTATGCTACTAGTAATCAGTCACACCAAGCCTTCAATAAGGAACACACAAGCAAG
10 20 30 40 50 60

MetValSerAlaIleValLeuTyrValLeuLeuAlaAlaAlaHisSerAlaPheAla
ATGCTAAGCGCTATTGTTTATATATGTGCTACTAGCGCGCGGCATTCTGCCCTTGCA
70 80 90 100 110 120

SeifT
ArgGlnaspMetValAspGluSerValCysTyrIleThrAspAsnAsnCysAsnGlyGly
CGTCAAGACATGGTTGACGAGAGCGGTTGTACATTACTGACACAACTGCACACGGCGGC
130 140 150 160 170 180

LysCysLeuArgSerLysAlaCysHisAlaAspProTrrpGluLeu *
AAATGCTTGGCTAGCAAAGCATGCCACCGCGGACCCATGGGAGCTATAG
190 200 210 220

第 17圖

OS 3711 CCGTCAAGACATGGTTGACGAGAGCGCTTGTACATTACTGACAACAACCTGCCAAGCGCGGC
OS 3712 GTACGGCAGTTCGTACCAACTGCTCTCGCAACAATGTAATGACTGTGTGACGTTGCCGCGC
Sph I

OS 3711 AAATGCTTGGCTAGCAAAGCATGCCACGCGGACCCCATGGAGCTATAG
OS 3712 TTACGAACGCATCGTTTCGTACGTTGCGCCTGGGTACCTCGATATCCTAG
BamHI

第 18 圖

p10 啓動基因

TCTAGAGTCGAGCAAGAAAATAAAACGCCAAACGCGTTGGAGTCTTGTGTGCTATTTTAC
 Xba I 10 20 30 40 50 60

AAAGATTCAGAAATACGCATCACTTACAACAAGGGGGACTATGAAATTATGCATTTGAGG
 70 80 90 100 110 120

ATGCCGGGACCTTTAATTCAACCCAACACAATATATTATAGTTAAATAAGAATTATTATC
 130 140 150 160 170 180

AAATCATTTGTATATTAATTAAAATACTATACTGTAAATTACATTTTATTTACAATCACA
 190 200 210 220 230 240

gp67

MetLeuLeuValAsnGlnSerHisGlnGlyPheAsnLysGluHisThrSerLysMet
 GATCTATGCTACTAGTAAATCAGTCACACCAAGGCTTCAATAAGGAACACACAAGCAAGA
 250 260 270 280 290 300

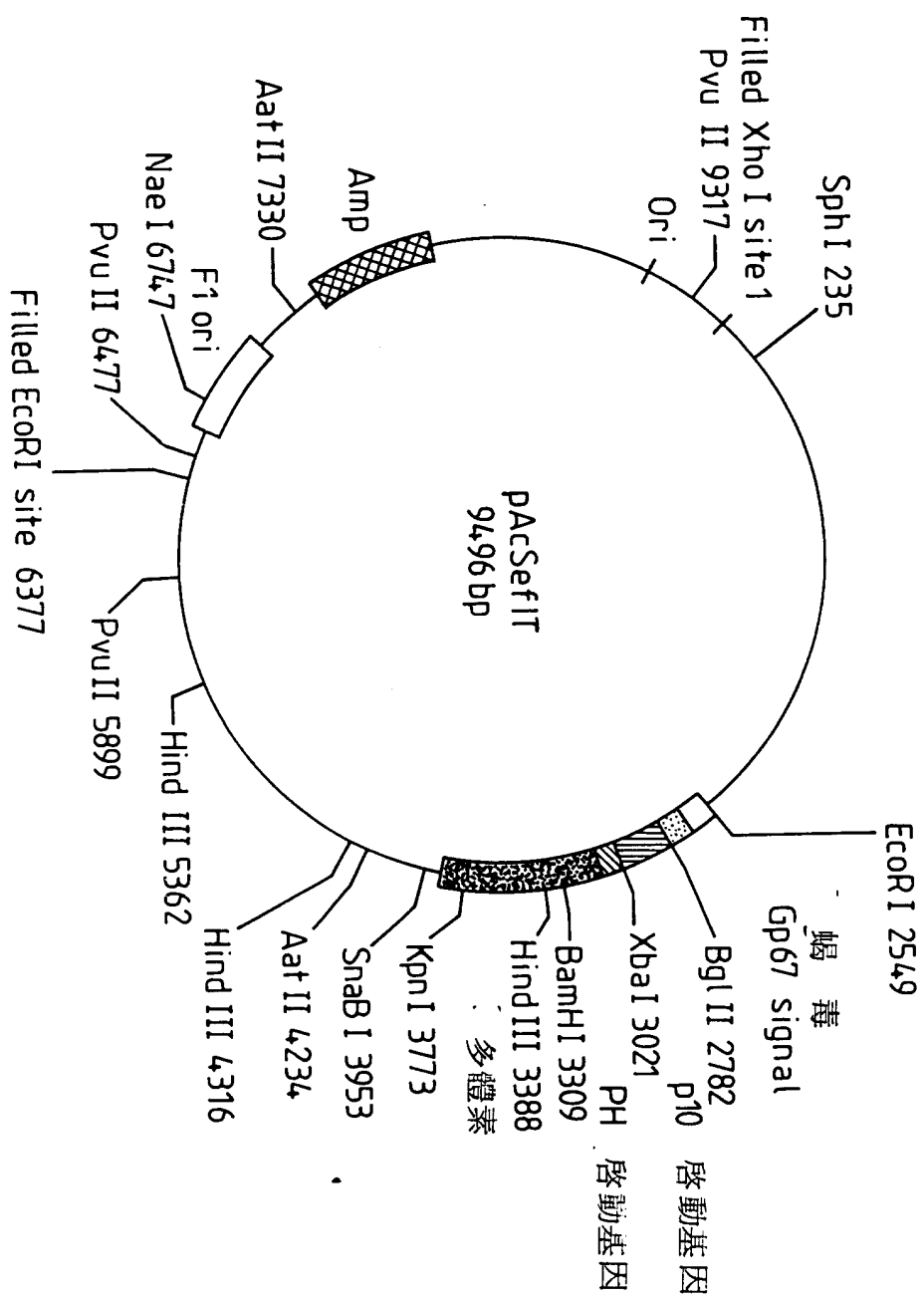
SefIT

ValSerAlaIleValLeuTyrValLeuLeuAlaAlaAlaAlaHisSerAlaPheAlaArg
 TG GTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTACTAGCGGCGGCGGCATTCTGCCTTTGCAC
 310 320 330 340 350 360

GlnAspMetValAspGluSerValCysTyrIleThrAspAsnAsnCysAsnGlyGlyLys
 GTCAAGACATGGTTGACGAGAGCGTTTGTTACATTACTGACAACAACGCAACGGCGGCA
 370 380 390 400 410 420

CysLeuArgSerLysAlaCysHisAlaAspProTrpGluLeu *
 AATGCTTGCGTAGCAAAGCATGCCACGCGGACCCATGGGAGCTATAG
 430 440 450 460

第 19.圖



續 第 19 圖

Inserted sequences: gP67 secretion signal + Segestria toxin
gP67 secretion signal

gatcctaTGCTACTAGTAATACTACACCAAGCCTTCAATAAGAACACACAAGCAA
GATGCTAAGCGCTATTGTTTATATGTGCTACTAGCGGGGGCGGCATTCTGCCTT
GCA

Segestria toxin

CGTCAAGATGGTTGACGAGAGCGTTTGTACATTACTGACAACAACCTGCAACGGCG
GCAAATGCTTGGCTAGCAAAGCATGCCACGGGACCCCATGGAGCTATAG

20 修正
補充 82年1月9日

公 告 本

A7
B7
C7
D7

六、申請專利範圍
附件一 a：

第 81102108 號 專 利 申 請 案

中 文 申 請 專 利 範 圍 修 正 本

民國 82 年 1 月 修 正

1. 一種製備重組體杆狀病毒之方法，此方法包括：

(i) 將編碼含有殺虫毒素 A a H I T 之外來蛋白質之嵌合基因，選殖至杆狀病毒轉移載體中，其選殖之限制位置於可指令該外來蛋白質於昆虫細胞中表現之啓動基因之下游，其中杆狀病毒轉移載體係衍自苜蓿銀紋夜蛾核型多角體病毒 (Autographa californica MNPV) 、家蚕核型多角體病毒 (Bombyx mori NPV) 、美洲棉鈴虫核型多角體病毒 (Heliothis zea NPV) 或油桐尺蠖核型多角體病毒 (Buzura suppressuria NPV) ；及

(ii) 以來自 (i) 步驟之重組體轉移載體及完整的野生型杆狀病毒 D N A 共同轉感易為杆狀病毒感染之細胞；其特徵在於嵌合基因編碼的外來蛋白質包括毒素 A a H I T 或其功能性衍生物，及可令外來蛋白質自昆虫細胞中被分泌出來的 g q 6 7 訊號肽。

2. 一種控制一區域昆虫之方法，此方法包括提供該區域有效劑量的重組體杆狀病毒，其係衍自苜蓿銀紋夜蛾核型多角體病毒 (Autographa californica MNPV) 、家蚕核型多角體病毒 (Bombyx mori NPV) 、美洲棉鈴虫核型多角體病毒 (Heliothis zea NPV) 或油桐尺蠖核型多角體病毒 (Buzura suppressuria NPV) ，其可於所感染

六、申請專利範圍

之昆虫細胞中表現含有殺虫毒素 A a H I T 之外來蛋白質；其特徵在於毒素 A a H I T 或其衍生物供應訊號肽，如此毒素或其衍生物可自昆虫細胞中分泌。

3. 一種經分離之編碼昆虫毒素 A a H I T 的嵌合型基因，其具有如下所示核苷酸序列：

```

MetLeuLeuValAsnGlnSerHisGlnGlyPheAsnLysGluHisThrSerLysMet
ATGCTACTAGTAAATCAGTCACACCAAGGCTTCAATAAGGAACACACAAGCAAGA
  50          260          270          280          290          300

ValSerAlaIleValLeuTyrValLeuLeuAlaAlaAlaAlaHisSerAlaPheAlaLys
TGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCATTCTGCCTTTGCGA
  310          320          330          340          350          360

LysAsnGlyTyrAlaValAspSerSerGlyLysAlaProGluCysLeuLeuSerAsnTyr
AAAAAACGGCTACGCGGTTGACTCGTCGGGCAAAGCGCCAGAATGTCTACTATCGAACT
  370          380          390          400          410          420

CysAsnAsnGlnCysThrLysValHisTyrAlaAspLysGlyTyrCysCysLeuLeuSer
ACTGTAACAACCAATGTACTAAAGTTCACCTACGCTGACAAAGGCTACTGTTGTCTACTAA
  430          440          450          460          470          480

CysTyrCysPheGlyLeuAsnAspAspLysLysValLeuGluIleSerAspThrArgLys
GCTGTACTGTGTTTGGCCTAAACGACGACAAAAAGTTCTAGAAATTAGCGACACTCGTA
  490          500          510          520          530          540

SerTyrCysAspThrThrIleIleAsn *
AAAGCTACTGTGACACTACTATTATTAATACTAA

```