

公告本

85. 10. 24 修正
年 月 日 補充

397865

申請日期	83. 01. 18.
案 號	83100404
類 別	C12N ^{15/12, 15/66, 15/86}

A4
C4
修正頁(85年10月)

(以上各欄由本局填註)

397865

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	分泌昆蟲控制蛋白質之異質性信號序列
	英 文	"HETEROLOGOUS SIGNAL SEQUENCES FOR SECRETION OF INSECT CONTROLLING PROTEINS"
二、發明 創作人	姓 名	布魯斯·克里斯汀·布雷克
	國 籍	美國
	住、居所	美國賓州耶得里市佛里斯路286號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美國氣胺公司
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國紐澤西州韋恩市
	代 表 人 姓 名	艾鳳斯·爾·諾伊

裝

訂

線

公告本

85.10.24 修正
年 月 日 補充

397865

申請日期	83.01.18.
案 號	83100404
類 別	C12N ^{15/12, 15/66, 15/86}

A4
C4
修正頁(85年10月)

(以上各欄由本局填註)

397865

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	分泌昆蟲控制蛋白質之異質性信號序列
	英 文	"HETEROLOGOUS SIGNAL SEQUENCES FOR SECRETION OF INSECT CONTROLLING PROTEINS"
二、發明 創作人	姓 名	布魯斯·克里斯汀·布雷克
	國 籍	美國
	住、居所	美國賓州耶得里市佛里斯路286號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美國氣胺公司
	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國紐澤西州韋恩市
	代 表 人 姓 名	艾鳳斯·爾·諾伊

裝

訂

線

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

發明範圍

本發明係關於促進昆蟲控制蛋白質之表現及分泌的異質性信號序列，及活體內證明昆蟲病毒編碼那些蛋白質的毒性。

發明背景

整個本申請案使用下列縮寫：

- A. cal. 苜蓿銀紋夜蛾 (Autographa californica)
- AcMNPV - 苜蓿銀紋夜蛾核多角形病毒
- AaIT - Androctonus australis 昆蟲毒素
- bp - 鹼基對
- CPU - 收縮麻痺單元
- ECV - 細胞外病毒
- GV - 粒性病毒
- KD - 仟道爾頓
- LT - 致死時間
- MOI - 侵染之多重性
- NPV - 核多角形病毒
- OB - 閉合體
- Occ - 閉合陰性病毒 (es)
- Occ⁺ - 閉合陽性病毒 (es)
- PCR - 聚合酶鏈反應
- PDV - 多角體衍生病毒
- PFV - 噬菌斑形成單元

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

發明範圍

本發明係關於促進昆蟲控制蛋白質之表現及分泌的異質性信號序列，及活體內證明昆蟲病毒編碼那些蛋白質的毒性。

發明背景

整個本申請案使用下列縮寫：

- A. cal. 苜蓿銀紋夜蛾 (Autographa californica)
- AcMNPV - 苜蓿銀紋夜蛾核多角形病毒
- AaIT - Androctonus australis 昆蟲毒素
- bp - 鹼基對
- CPU - 收縮麻痺單元
- ECV - 細胞外病毒
- GV - 粒性病毒
- KD - 仟道爾頓
- LT - 致死時間
- MOI - 侵染之多重性
- NPV - 核多角形病毒
- OB - 閉合體
- Occ - 閉合陰性病毒 (es)
- Occ⁺ - 閉合陽性病毒 (es)
- PCR - 聚合酶鏈反應
- PDV - 多角體衍生病毒
- PFV - 噬菌斑形成單元

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

結構蛋白質 (6, 8)。同樣地，GVs 產生 OBs，OBs 主要是由粒性蛋白質 (granulin) 組成，而不是多角體蛋白質 (polyhedrin)。

該病毒閉合體是天然桿狀病毒性活史之一重要部分，提供於易感染昆蟲品種中水平 (昆蟲對昆蟲) 傳遞的工具。在此環境下，易感染昆蟲 (通常在幼蟲階段) 自受污染之食物來源例如：植物攝取病毒閉合體。該結晶性內含體解離在易感染之昆蟲的腸內，釋出感染病毒粒子。這些多角體衍生之病毒 (PDV) 侵入中腸組織之細胞內並且複製 (6)。

威信病毒粒子藉由胞吞作用 (endocytosis) 或融合作用進入細胞，該病毒 DNA 在核膜孔或在核內未加被覆。經偵測在 6 小時之內病毒 DNA 複製。10-12 小時後感染 (p.i.)，自細胞的表面藉細胞外病毒 (ECV) 之出芽擴散至其他昆蟲組織。該病毒之 ECV 型代表在個別受感染之昆蟲內病毒之細胞至細胞擴散，以及細胞培養中的傳遞感染。

在侵染週期已晚時 (12 小時侵染後)，在侵染細胞內可偵測到多角體蛋白質。未到 18-24 小時 p.i.，該多角體蛋白質集合在受感染細胞之核內並且病毒粒子包埋在蛋白質性閉合體中。當細胞溶解超過 4-5 天時，病毒閉合體累積至大數目。在幼蟲之感染擴散時，這些多角體並沒有活性角色。ECVs 在血淋巴中繁殖及擴散，導致幼蟲死亡 (6-8)。

當受感染之幼蟲死亡時，成千上萬的多角體餘留在分解之組織中，而 ECVs 則被降解。當其他幼蟲曝露於此多角體時，例如：藉由攝取污染植物或其他食物，使重複此循環

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(2)

- P. i. - 侵染後
PIB - 多角形內含體(已稱之為OB)
ST - 成活時間

DNA 昆蟲病毒科已知稱為桿狀病毒科(Baculoviridae)的包括核多角形病毒(NPV)及粒狀病毒(GV)。這些病毒在其生活周期中產生閉合體(OBs)。也包括的是非閉合體(NOV)，在其生活周期中不會產生OBs。DNA 昆蟲病毒之另一科是蟲媒病毒(entomopox viruses)。

已經確認超過400種桿狀病毒存在無脊椎動物內。NPVs之實例包括舞毒蛾(Lymantria dispar) NPV (gypsy moth NPV)，苜蓿銀紋夜蛾(Autographa californica) NPV，芹菜尺蠖(Syngrapha falcifera NPV) (celery looper NPV)斜紋夜蛾(Spodoptera littoralis) NPV，草地黏蟲(Spodoptera frugiperda) NPV，棉鈴蟲(Heliothis armigera) NPV，甘藍夜蛾(Mamestra brassicae) NPV，雲杉捲葉蛾(Choristoneura fumiferana) NPV，粉紋夜蛾(Trichoplusia ni) NPV，Helicoverpa zea NPV等。GVs之實例包括蘋果蠹蛾(Cydia pomonella) GV (codling moth GV)，大菜粉蝶(Pieris brassicae) GV，粉紋夜蛾(Trichoplusia ni) GV等等。NOV的實例是 Orcytes rhinoceros NOV及棉鈴蟲(Heliothis zea) NOV。昆媒病毒(EPV)的實例包括鰓角金龜(Melolontha melonotha) EPV，桑燈蛾

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

泌很類似那些原有真始蛋白質之重組合產物。如此表現之蛋白質會增強病毒之生物殺蟲作用。

一種此種蛋白質是命名為 AaIT 之毒素，係由北非蝎子 (*Androctonus australis* Hector) 之毒液產生的。此毒素有 70 個胺基酸長並且結合到昆蟲之鈉管道 (sodium channels) 並且在奈克至毫奈克範圍在昆蟲之幼蟲，會引起收縮麻痺。因為 AaIT 不會結合到哺乳動物之鈉管道，所以 AaIT 被選為使用作為生物殺蟲劑，藉以保護人類攝食之作物。

AaIT 基因之編碼區域的上游區包括引導自細胞分泌 AaIT 之訊號序列。特定言之，該訊號序列引導該毒素透過分泌管道至細胞表面，在這裡自細胞分泌出毒素。於此運送期間，酵素將此訊號序列斷裂，留下成熟 AaIT。

持續需求在受感染之宿主表現外源毒素之基因工程重組合昆蟲病毒。受這些重組合病毒感染，當與野生型病毒比較時，會增加殺死速度。

發明摘要

本發明提供 7 種特異性異質性信號序列，供與編碼昆蟲控制蛋白質之 DNA 序列一起使用。尤其本發明提供那些異質性信號序列其中一種與編碼昆蟲特異性毒素 AaIT 之 DNA 序列的使用。此編碼 AaIT 之 DNA 序列可為天然序列或密碼子最適序列。然後將一種異質性信號序列及該密碼子最適 AaIT DNA 序列插入昆蟲病毒諸如桿狀病毒 AcMNPV。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(3)

(Amsacta moorei) EPV, 亞洲飛蝗 (Locusta migratoria) EPV, 遷徙蚱蜢 (Melanoplus sanguinipes) EPV, 荒地蚱蜢 (Schistocerca gregaria) EPV, 埃及伊蚊 (Aedes aegypti) EPV, 搖蚊 (Chironomus luridus) EPV 等等。

使用桿狀病毒及蟲媒病毒作為生物殺蟲劑有很大的希望。它們廣泛的用於農業上，其中之一主要障礙是昆蟲最初感染及其死亡之間的時間遲延現象 (time lag)。此遲延現象可由少許幾天至幾星期。於此遲延期間，昆蟲持續進食，對植物會引起進一步的傷害。若干研究藉由將外源基因插入病毒基因組，企圖克服此缺點，以表現昆蟲的控制或修改物質，諸如毒素，神經肽或酵素 (Bibliography entries 1-5)。

桿狀病毒之生活史，若藉由 AcMNPV 例示，包括 2 個階段。生活史的每一階段以病毒的特殊形式代表之：非閉合之細胞外病毒粒子 (ECV)，及閉合病毒粒子 (OB) (6, 7)。該細胞外及閉合病毒型具有相同基因組，但是顯現不同的生物性質。2 種型式病毒中每一個的成熟受重疊病毒基因組的控制，其中一些對每一型式是獨特的。

在天然發生之昆蟲感染形式中，發現多重病毒體包埋在平行結晶性蛋白質間質內，稱之為閉合體 (OB)，也稱之為多角形內含體 (PIB)。該蛋白質性病毒閉合體稱之為多角體 (polyhedra) (polyhedron 是單數名詞)。一種多角體蛋白質，其分子量 29 kD 是該病毒閉合體的主要病毒編碼的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

85.10.24
年 月 日
修正
補充

五、發明說明()

此桿狀病毒感染特異性易感染昆蟲標的種，導致昆蟲在其幼蟲階段之最終死亡。該由一種蠅子產生之毒素 AaIT 也是對易感染昆蟲標的物種(但不是脊椎動物)具特異性並且會引起麻痺及昆蟲最後死亡。

將基因編碼 AaIT 及異質性信號序列插入桿狀病毒，會使此毒素表現及分泌。易感染昆蟲攝取此種經修飾桿狀病毒將會停止吃植物，這是由於比昆蟲攝取缺少 AaIT 基因之野生型桿狀病毒較早發生毒素誘發的麻痺現象。時間減的愈多，對作物的傷害就減的愈大，因為幼蟲進食時間減少了。所以，本發明提供一種保護植物免於受昆蟲傷害之方法，此方法係藉由將一併入 AaIT 基因的表現載體，與異質性信號序列一起傳送給植物(透過噴霧或其他傳送方法)。

起先建立 8 個異質性信號序列。在注射生物分析中，將含 7 個這些信號序列中的任一個之重組合病毒連接至 AaIT 基因。證明比缺乏 AaIT 基因之野生型昆蟲病毒更早開始罹病。在本發明中使用 7 個異質性信號序列，此等序列可為密碼子最適序列或先天序列，係為得自家蠶 (*Bombyx mori*) 之 pBMHPC-12 信號序列，得自煙草天蛾 (*Manduca sexta*) 之脂肪動員激素 (adipokinetic hormone) 信號序列，得自煙草天蛾之 apolipophorin 信號序列，得自家蠶之卵殼信號序列，得自黃猩猩果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 之表皮信號序列，得自黃猩猩果蠅之酯酶-6 信號序列及得自家蠶之性別特異性信號序列。作為有 AaIT 之例示，每一信號序列就位於編碼 AaIT 之密碼子最適

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

結構蛋白質 (6, 8)。同樣地，GVs 產生 OBs，OBs 主要是由粒性蛋白質 (granulin) 組成，而不是多角體蛋白質 (polyhedrin)。

該病毒閉合體是天然桿狀病毒性活史之一重要部分，提供於易感染昆蟲品種中水平 (昆蟲對昆蟲) 傳遞的工具。在此環境下，易感染昆蟲 (通常在幼蟲階段) 自受污染之食物來源例如：植物攝取病毒閉合體。該結晶性內含體解離在易感染之昆蟲的腸內，釋出感染病毒粒子。這些多角體衍生之病毒 (PDV) 侵入中腸組織之細胞內並且複製 (6)。

威信病毒粒子藉由胞吞作用 (endocytosis) 或融合作用進入細胞，該病毒 DNA 在核膜孔或在核內未加被覆。經偵測在 6 小時之內病毒 DNA 複製。10-12 小時後感染 (p.i.)，自細胞的表面藉細胞外病毒 (ECV) 之出芽擴散至其他昆蟲組織。該病毒之 ECV 型代表在個別受感染之昆蟲內病毒之細胞至細胞擴散，以及細胞培養中的傳遞感染。

在侵染週期已晚時 (12 小時侵染後)，在侵染細胞內可偵測到多角體蛋白質。未到 18-24 小時 p.i.，該多角體蛋白質集合在受感染細胞之核內並且病毒粒子包埋在蛋白質性閉合體中。當細胞溶解超過 4-5 天時，病毒閉合體累積至大數目。在幼蟲之感染擴散時，這些多角體並沒有活性角色。ECVs 在血淋巴中繁殖及擴散，導致幼蟲死亡 (6-8)。

當受感染之幼蟲死亡時，成千上萬的多角體餘留在分解之組織中，而 ECVs 則被降解。當其他幼蟲曝露於此多角體時，例如：藉由攝取污染植物或其他食物，使重複此循環

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

DNA 序列或編碼 AaIT 之天生 DNA 序列的上游。每一此種 DNA 序列構造再插入表現載體。

當包含此種異質性信號序列 -AaIT 構造之表現載體用於轉形或浸染適宜寄主細胞時，AaIT 就被表現。該信號序列幫助 AaIT 的分泌，然後藉信號肽酶使裂開，使成熟型 AaIT (70 個胺基酸) 離開。

本發明之每一異質性信號序列都可具有編碼該信號序列之天生核苷酸序列。或變更為每一信號序列可具有編碼相同信號序列之密碼子最適核苷酸序列。

該遺傳密碼之簡并 (degeneracy) 容許此核苷酸序列之變異，而仍然產生一種具有相同胺基酸序列之多肽 (諸如信號序列) 作為被天然 DNA 序列編碼之多肽。

近親胺基酸之個別同義密碼子的頻率，在真核細胞及原核細胞間，基因組至基因組就有很大的變化。這些差異在密碼子選擇類型中呈現藉由調節肽展長比例幫助個別基因之整體表現程度。

在本發明之一具體實例中，密碼子最適信號序列係使用與 AaIT 基因之毒素相同原理設計出來的，該信號序列負責分泌。首先企圖將具有較佳密碼子使用頻率用於此合成基因及信號序列反映由用於重組合蛋白質表現之細胞 / 生物之基因組衍生的基因之密碼子使用法。可是，適當代表鱗翅目 (lepidopteran) 基因序列及昆蟲病毒基因序列不能用於本發明創造一可信賴密碼子使用表，因為只能由一小數目的基因取得 DNA 序列訊息。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(5)

(6) 。

總而言之，病毒之閉合型負責昆蟲透過腸的最初侵染，以及病毒的環境安定性。當藉注射投藥時PDVs本質上不具侵染性，但是經口則具高度侵染性。病毒之非閉合型（即ECV）負責二次及細胞對細胞侵染。在培養或內部昆蟲組織內藉注射ECVs對細胞具高度感染性，但是藉口服時本質上是不具感染性。

使用重組合桿狀病毒表現對昆蟲有毒之外來蛋白質，是受到這些病毒不是對脊椎動物或植物致病之事實的幫助。此外，這些桿狀病毒一般都具有窄寄主範圍。許多菌株都受限於一或少許昆蟲種。

苜蓿銀紋夜蛾 (*Autographa californica*) 核多角形病毒 (AcMNPV) 是桿狀病毒 (*Baculoviridae*) 科之原始型病毒。AcMNPV病毒最初是由苜蓿銀紋夜蛾 (*A. cal*) 單離出來的，此種蛾是一種鱗翅目夜蛾（在成蟲階段是一種夜出性蛾），通常稱之為苜蓿銀紋夜蛾 (*alfalfa looper*)。此病毒感染12科昆蟲並且在鱗翅目昆蟲內有30種以上會被其感染。尚不知道會生產性地感染此目以外的任何種類的昆蟲。最廣泛被研究的桿狀病毒是AcMNPV。此病毒利用許多的蛋白質成熟並且在較高等的真核細胞內發生輸送系統。

在本發明內，將一種編碼昆蟲控制蛋白質之基因插入病毒基因組之安定位置。外源基因插入AcMNPV產生蛋白質，此蛋白質在受感染昆蟲細胞內是具生物活性。這些蛋白質，就大部分來說若不同，會進行後轉譯加工，以產生及分

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

所以，密碼子使用表是由一種黃猩猩果蠅取得，該種具有足夠數目(至少10)的已知基因序列。這些密碼子使用表是用於設計編碼 AaIT 密碼子最適基因及每一種異質性信號序列基因。此方法也容許保存或破壞(若須要)限制酵素識別位點。AaIT 之每一胺基酸的密碼子使用頻率反映在黃猩猩果蠅密碼子使用表中之頻率。

該異質性信號序列之密碼子最適序列及 AaIT 基因編碼全等胺基酸序列分別作為編碼天然信號序列及 AaIT 之天然核苷酸序列。

附圖之簡明描述

圖 1 描述編碼 AaIT 之天然及密碼子最適基因的核苷酸序列，與 AaIT 之胺基酸序列一起的比較。

圖 2 描述質粒 pBS Cuticle-AaIT 之構造的細節，其包含編碼 AaIT 之外源表皮信號序列及密碼子最適 cDNA 序列。

圖 3 描述質粒 pBS GIII-AaIT 之構造的細節，其包含編碼 AaIT 之天然信號序列及天然 cDNA 序列。

圖 4 描述編碼毒素 RNA 之程度，以累積在 Sf9 細胞中，用野生型 AcMNPV 侵染之多角體 RNA 的百分比表示之。DNA 探針偵測與毒素及多角體 RNAs 共有之 3'-未轉譯區域。在 X 軸上的棒如下：Mock (未被侵染)；野生型 (野生型 AcMNPV)；Es6-AaIT (包含酯酶 -6 信號序列及密碼子最適 AaIT 基因之 AcMNPV)；ADK-AaIT (包含脂肪動員信號序列及密碼子最適 AaIT 基因之 AcMNPV)；Cut-AaIT (包含表皮信號

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

泌很類似那些原有真始蛋白質之重組合產物。如此表現之蛋白質會增強病毒之生物殺蟲作用。

一種此種蛋白質是命名為 AaIT 之毒素，係由北非蝎子 (*Androctonus australis* Hector) 之毒液產生的。此毒素有 70 個胺基酸長並且結合到昆蟲之鈉管道 (sodium channels) 並且在奈克至毫奈克範圍在昆蟲之幼蟲，會引起收縮麻痺。因為 AaIT 不會結合到哺乳動物之鈉管道，所以 AaIT 被選為使用作為生物殺蟲劑，藉以保護人類攝食之作物。

AaIT 基因之編碼區域的上游區包括引導自細胞分泌 AaIT 之訊號序列。特定言之，該訊號序列引導該毒素透過分泌管道至細胞表面，在這裡自細胞分泌出毒素。於此運送期間，酵素將此訊號序列斷裂，留下成熟 AaIT。

持續需求在受感染之宿主表現外源毒素之基因工程重組合昆蟲病毒。受這些重組合病毒感染，當與野生型病毒比較時，會增加殺死速度。

發明摘要

本發明提供 7 種特異性異質性信號序列，供與編碼昆蟲控制蛋白質之 DNA 序列一起使用。尤其本發明提供那些異質性信號序列其中一種與編碼昆蟲特異性毒素 AaIT 之 DNA 序列的使用。此編碼 AaIT 之 DNA 序列可為天然序列或密碼子最適序列。然後將一種異質性信號序列及該密碼子最適 AaIT DNA 序列插入昆蟲病毒諸如桿狀病毒 AcMNPV。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

15 描述特別 - 特異性 - AaIT - 病毒構造。在圖 7-9 及圖 12-15 之構造包括密碼子最適 AaIT 基因。

本發明之詳細描述

外源信號其加工 (斷裂及輸出) 昆蟲控制蛋白質者是本發明之主題，藉由使用 7 種特異性異質性信號序列中的任一種與昆蟲控制蛋白質之基因，可促進昆蟲病毒的致死現象。

信號序列是導致蛋白質分泌之轉譯後加工步驟的複合系列所必須者。若存在完整信號序列，被表現之蛋白質進入粗糙型內質網之內腔，然後經高爾基 (Golgi) 裝置輸送至分泌小泡，最後輸送至細胞外。一般，該信號序列緊跟著起始密碼子及在被分泌之蛋白質的胺基末端編碼信號肽。在大部份情況，藉由特異性蛋白酶將信號序列斷裂開來，此蛋白酶稱之為信號肽酶。較佳信號序列使用病毒表現載體改善重組蛋白質表現之加工及輸出效率。使用適當異質性信號序列之昆蟲控制蛋白質的最適表現，將會達到比野生型昆蟲病毒更迅速的致死現象。

Summers 的美國專利 5,155,037 (10) 描述將昆蟲信號序列諸如脂肪動員激素及表皮使用於用 DNA 載體轉形或轉染之鱗翅目昆蟲細胞，其中前述信號引導得自昆蟲細胞之外源蛋白質的分泌。揭示唯一之外來蛋白質是 CD4，介白素 -2 及 β - 干擾素。所有這些蛋白質都是哺乳動物蛋白質；沒有昆蟲控制蛋白質。美國專利案 5,155,037 之前，在昆蟲細胞中，達到外來蛋白質之分泌的唯一方法是藉由使用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

85.10.24
年 月 日
修正
補充

五、發明說明 ()

此桿狀病毒感染特異性易感染昆蟲標的種，導致昆蟲在其幼蟲階段之最終死亡。該由一種蠅子產生之毒素 AaIT 也是對易感染昆蟲標的物種 (但不是脊椎動物) 具特異性並且會引起麻痺及昆蟲最後死亡。

將基因編碼 AaIT 及異質性信號序列插入桿狀病毒，會使此毒素表現及分泌。易感染昆蟲攝取此種經修飾桿狀病毒將會停止吃植物，這是由於比昆蟲攝取缺少 AaIT 基因之野生型桿狀病毒較早發生毒素誘發的麻痺現象。時間減的愈多，對作物的傷害就減的愈大，因為幼蟲進食時間減少了。所以，本發明提供一種保護植物免於受昆蟲傷害之方法，此方法係藉由將一併入 AaIT 基因的表現載體，與異質性信號序列一起傳送給植物 (透過噴霧或其他傳送方法)。

起先建立 8 個異質性信號序列。在注射生物分析中，將含 7 個這些信號序列中的任一個之重組合病毒連接至 AaIT 基因。證明比缺乏 AaIT 基因之野生型昆蟲病毒更早開始罹病。在本發明中使用 7 個異質性信號序列，此等序列可為密碼子最適序列或先天序列，係為得自家蠶 (*Bombyx mori*) 之 pBMHPC-12 信號序列，得自煙草天蛾 (*Manduca sexta*) 之脂肪動員激素 (adipokinetic hormone) 信號序列，得自煙草天蛾之 apolipophorin 信號序列，得自家蠶之卵殼信號序列，得自黃猩猩果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 之表皮信號序列，得自黃猩猩果蠅之酯酶-6 信號序列及得自家蠶之性別特異性信號序列。作為有 AaIT 之例示，每一信號序列就位於編碼 AaIT 之密碼子最適

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

利之圖 2A 描寫表皮基因 CP1 先導肽之核苷酸及胺基酸序列。此核苷酸序列編碼 16 個胺基酸信號肽。

申請者製備 8 個具異質性信號序列之構造。編碼這些信號序列之 DNA 序列可為編碼該信號序列之天然 DNA 序列或編碼那些信號序列之密碼子最適 DNA 序列。一此種信號序列是與編碼昆蟲控制蛋白質之基因組合。每一此種構造再插入桿狀病毒轉移載體，然後藉由在培養細胞中之同源 DNA 重組合 (12) 移入昆蟲病毒之基因組中。

異質性信號序列如下：介白素 -2，酯酶 -6，脂肪動員激素，表皮 (Cuticle)，pBMHPC-12，卵殼素 (Chorion)，Apolipophorin 及性別特異性。

介白素 -2 是一種人類信號序列 (就 T-細胞生長因子而言)，其與 AaIT 之用途已於先前描述過 (13)。脂肪動員激素信號序列 (就神經肽而言) 是得自煙草天蛾並且相當適合 -3，-1 規則 (11)。得自家蠶之卵殼信號序列 (就卵殼構造之蛋白質而言) 及黃猩猩果蠅之表皮信號序列 (就外骨架蛋白質而言) 兩者都分泌大量它們有關之成熟蛋白質。得自煙草天蛾之 apolipophorin 信號序列 (就原生質脂肪輸送蛋白質而言)，家蠶之性別特異性信號序列 (就主要成蟲原生質貯存蛋白質而言) 及得自家蠶之 pBMHPC-12 信號序列 (就 30 kD 幼蟲原生質脂蛋白) 全部會被分泌，因為它們被發現在脂肪體細胞中並且各分泌血淋巴蛋白質。最後，此酯酶 -6 信號序列被用於分泌得自黃猩猩果蠅之絲胺酸水解酶。這些信號序列中的每一個除了 apolipophorin 之外

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

DNA 序列或編碼 AaIT 之天生 DNA 序列的上游。每一此種 DNA 序列構造再插入表現載體。

當包含此種異質性信號序列 -AaIT 構造之表現載體用於轉形或浸染適宜寄主細胞時，AaIT 就被表現。該信號序列幫助 AaIT 的分泌，然後藉信號肽酶使裂開，使成熟型 AaIT (70 個胺基酸) 離開。

本發明之每一異質性信號序列都可具有編碼該信號序列之天生核苷酸序列。或變更為每一信號序列可具有編碼相同信號序列之密碼子最適核苷酸序列。

該遺傳密碼之簡并 (degeneracy) 容許此核苷酸序列之變異，而仍然產生一種具有相同胺基酸序列之多肽 (諸如信號序列) 作為被天然 DNA 序列編碼之多肽。

近親胺基酸之個別同義密碼子的頻率，在真核細胞及原核細胞間，基因組至基因組就有很大的變化。這些差異在密碼子選擇類型中呈現藉由調節肽展長比例幫助個別基因之整體表現程度。

在本發明之一具體實例中，密碼子最適信號序列係使用與 AaIT 基因之毒素相同原理設計出來的，該信號序列負責分泌。首先企圖將具有較佳密碼子使用頻率用於此合成基因及信號序列反映由用於重組合蛋白質表現之細胞 / 生物之基因組衍生的基因之密碼子使用法。可是，適當代表鱗翅目 (lepidopteran) 基因序列及昆蟲病毒基因序列不能用於本發明創造一可信賴密碼子使用表，因為只能由一小數目的基因取得 DNA 序列訊息。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明()

因，諸如密碼子最適 AaIT 毒素肽序列(下列描述者)。如上面所討論者，此信號序列可被編碼異質性信號序列之天然或密碼子最適核苷酸序列編碼。

這些胺基酸序列被反轉譯成顯示所有可能之核苷酸簡并(最大雙關性(maximum ambiguity))之 DNA 序列。產生一定義及潛在(因為密碼子簡并)限制酵素識別位點表。選擇及保存基因合成以及為了方便額外 DNA 操控之限制酵素位點臨界。於最適基因之設計期間密碼子定位之一重要益處是一熟練於此技藝為了便於促進基因建造及操控，可容易地保存或破壞。

一種表記錄每一胺基酸在昆蟲控制蛋白質中發生之次數的數目並且產生每一信號序列。以存在該序列中之胺基酸殘餘部份的數目為基礎定位密碼子，以反映黃猩猩果蠅密碼子使用之相對頻率(17)。

例如：在黃猩猩果蠅中半胱胺酸密碼子頻率，就 TGC 序列而言是 76 %，而序列 TGT 則為 24 %。在 ADK 信號 -AaIT 基因構造中有 8 個半胱胺酸殘餘部份(全部在基因中編碼成熟 AaIT 蛋白質)。因此，6 個密碼子被分派作為 TGC (75 %殘餘物)及 2 個密碼子作為 TGT (25 %殘餘物)。以此限制為基礎，再將每一半胱胺酸密碼子定位成一正確、清楚之序列。注意改變鄰接之同類密碼子(isocodons)。例如：在 AaIT 肽中的 2 個鄰接半胱胺酸殘餘物(胺基酸 37 及 38)定位 TGT TGC 序列，以避免連續定位 2 個相同密碼子序列。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

所以，密碼子使用表是由一種黃猩猩果蠅取得，該種具有足夠數目(至少10)的已知基因序列。這些密碼子使用表是用於設計編碼 AaIT 密碼子最適基因及每一種異質性信號序列基因。此方法也容許保存或破壞(若須要)限制酵素識別位點。AaIT 之每一胺基酸的密碼子使用頻率反映在黃猩猩果蠅密碼子使用表中之頻率。

該異質性信號序列之密碼子最適序列及 AaIT 基因編碼全等胺基酸序列分別作為編碼天然信號序列及 AaIT 之天然核苷酸序列。

附圖之簡明描述

圖 1 描述編碼 AaIT 之天然及密碼子最適基因的核苷酸序列，與 AaIT 之胺基酸序列一起的比較。

圖 2 描述質粒 pBS Cuticle-AaIT 之構造的細節，其包含編碼 AaIT 之外源表皮信號序列及密碼子最適 cDNA 序列。

圖 3 描述質粒 pBS GIII-AaIT 之構造的細節，其包含編碼 AaIT 之天然信號序列及天然 cDNA 序列。

圖 4 描述編碼毒素 RNA 之程度，以累積在 Sf9 細胞中，用野生型 AcMNPV 侵染之多角體 RNA 的百分比表示之。DNA 探針偵測與毒素及多角體 RNAs 共有之 3'-未轉譯區域。在 X 軸上的棒如下：Mock (未被侵染)；野生型 (野生型 AcMNPV)；Es6-AaIT (包含酯酶 -6 信號序列及密碼子最適 AaIT 基因之 AcMNPV)；ADK-AaIT (包含脂肪動員信號序列及密碼子最適 AaIT 基因之 AcMNPV)；Cut-AaIT (包含表皮信號

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

ATG AGG GTT CTA GTA CTA CTG GCC TGC TTG GCC GCG
GCG TCA GCC

可是，被不同核酸序列編碼之訊號序列的胺基酸，就密碼子最適及天然序列兩者而言是相等的。

本發明之異質性信號序列是與昆蟲控制蛋白質一起使用。這些蛋白質是毒素，神經肽及酵素。除了上面所描述之 AaIT 之外，此種毒素之實例包括得自虱狀蒲蟻 (*Pyemotes tritici*) 之毒素 (29)，蘇雲金芽孢桿菌 澤亞種 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) 毒素 (30)，及蘇雲金芽孢桿菌 CryIVD 毒素 (31)。神經肽之實例包括羽化激素 (4)，趨前胸激素 (prothoracicotropic hormone)，脂肪動員激素，利尿激素及 proctolin (32)。酵素之實例包括保幼激素 (juvenile hormone) 酯酶及其衍生物 (5)。

此經單離核酸序列編號此異質性信號序列及昆蟲控制蛋白質，然後插入適於寄主細胞或其中將產生該蛋白質之生物表現載體。此 DNA 序列可直接插入表現載體或可藉移轉載體之助插入。

例如：這些異質性信號序列可與編碼昆蟲特異性毒素 AaIT 之天然或密碼子最適 DNA 序列一起使用。密碼 AaIT 之基因插入一昆蟲病毒，將會導致毒素的表現，此為減少病毒使幼蟲失活及殺死幼蟲所需之時間的原因。易感染昆蟲攝取此種經修飾之昆蟲病毒，將會比昆蟲攝取缺少 AaIT 基因之野生型昆蟲病毒於較早時間停止攝取植物。時間減得

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(10)

序列及密碼子最適 AaIT 基因之 AcMNPV) ; pBM-AaIT (包含 pBMHPC-12 信號序列及密碼子最適 AaIT 基因之 AcMNPV) ; Chor-AaIT (包含卵殼信號序列及密碼子最適 AaIT 基因之 AcMNPV) ; Ap6-AaIT (包含 apolipophorin 信號序列及密碼子最適 AaIT 基因之 AcMNPV) ; Sex-AaIT (包含性別特異性信號序列及密碼子最適 AaIT 基因之 AcMNPV) ; 及 grpIII-AaIT (包含天然信號序列及天然 AaIT 基因之 AcMNPV) 。

圖 5 描述 *H. virescens* 幼蟲在病毒注射分析中的反應時間圖。在 A 格中，幼蟲沒有接受病毒(負對照組)(80 隻昆蟲)或接受 100, 1000 或 10,000 PFU 野生型 AcMNPV (E2 品系)(各 48 隻昆蟲)。在 B 格中，幼蟲未接受病毒(負對照組)(80 隻昆蟲)或接受 100, 1000 或 10,000 PFU 含編碼 AaIT 之表皮訊號序列及密碼子最適 cDNA 的 AcMNPV (各 48 隻昆蟲)。

圖 6-15 描述病毒之毒性圖，以幼蟲相當於不同時間間隔對存在攝取食物之微滴中病毒之指示劑量的百分比表示之。圖 6 描述野生型 AcMNPV (品系 E2)，其使用作為圖 7-10 之對照。圖 7 描述酯酶-6-AaIT-病毒構造。圖 8 描述脂肪動員激素-AaIT-病毒構造。圖 9 描述表皮-AaIT-病毒構造。圖 10 描述天然信號-天然 AaIT-病毒構造。圖 11 描述野生型 AcMNPV (品系 E2)，其使用作為圖 12-15 之對照組。圖 12 描述 pBMHPC-12-AaIT-病毒構造。圖 13 描述卵殼-AaIT-病毒構造。圖 14 描述 apolipophorin-6-AaIT-病毒構造。圖

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

愈多，對作物傷害將減得愈多，因為幼蟲攝食時間減少了。

使用 AaIT 基因之完整密碼子最適序列與此異質性信號序列是根據上面描述之原理構成的。此密碼子最適基因具有 210 核苷酸之序列如下：

```
AAG AAG AAC GGC TAC GCA GTC GAC TCA TCC GGA AAA
GCC CCC GAG TGC CTG CTC TCG AAC TAT TGC AAC AAT
GAA TGC ACC AAG GTG CAC TAC GCT GAC AAG GGC TAC
TGT TGC CTT CTG TCC TGC TAT TGC TTC GGT CTC AAC
GAC GAC AAG AAA GTT CTG GAA ATC TCT GAT ACT CGC
AAG AGC TAC TGT GAC ACC ACC-ATC ATT AAC TAA
```

天然 cDNA AaIT 基因序列如下：

```
AAG AAG AAT GGA TAT GCC GTC GAT AGT AGT GGT AAA
GCT CCT GAA TGT CTT TTG AGC AAT TAC TGT AAC AAC
GAA TGC ACA AAA GTA CAT TAT GCT GAC AAA GGA TAT
TGC TGC TTA CTT TCA TGT TAT TGC TTC GGT CTA AAT
GAC GAT AAA AAA GTT TTG GAG ATT TCG GAC ACA AGG
AAA AGT TAT TGT GAC ACC ACA ATA ATT AAT TAA
```

此密碼子最適序列不同於藉由 210 核苷酸外的 58 (參閱圖 1) 編碼 AaIT 天然 cDNA 序列。可是，由天然 cDNA 及密碼子最適 cDNA 產生的 AaIT，具有相同 70 個胺基酸長之序列，此序列如下：

```
Lys Lys Asn Gly Tyr Ala Val Asp Ser Ser Gly Lys
Ala Pro Glu Cys Leu Leu Ser Asn Tyr Cys Asn Asn
```

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

15描述特別-特異性-AaIT-病毒構造。在圖7-9及圖12-15之構造包括密碼子最適AaIT基因。

本發明之詳細描述

外源信號其加工(斷裂及輸出)昆蟲控制蛋白質者是本發明之主題，藉由使用7種特異性異質性信號序列中的一種與昆蟲控制蛋白質之基因，可促進昆蟲病毒的致死現象。

信號序列是導致蛋白質分泌之轉譯後加工步驟的複合系列所必須者。若存在完整信號序列，被表現之蛋白質進入粗糙型內質網之內腔，然後經高爾基(Golgi)裝置輸送至分泌小泡，最後輸送至細胞外。一般，該信號序列緊跟著起始密碼子及在被分泌之蛋白質的胺基末端編碼信號肽。在大部份情況，藉由特異性蛋白酶將信號序列斷裂開來，此蛋白酶稱之為信號肽酶。較佳信號序列使用病毒表現載體改善重組蛋白質表現之加工及輸出效率。使用適當異質性信號序列之昆蟲控制蛋白質的最適表現，將會達到比野生型昆蟲病毒更迅速的致死現象。

Summers 的美國專利 5,155,037 (10) 描述將昆蟲信號序列諸如脂肪動員激素及表皮使用於用 DNA 載體轉形或轉染之鱗翅目昆蟲細胞，其中前述信號引導得自昆蟲細胞之外源蛋白質的分泌。揭示唯一之外來蛋白質是 CD4，介白素-2 及 β -干擾素。所有這些蛋白質都是哺乳動物蛋白質；沒有昆蟲控制蛋白質。美國專利案 5,155,037 之前，在昆蟲細胞中，達到外來蛋白質之分泌的唯一方法是藉由使用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

其次，藉由雜交至對 AaIT 基因特異性之輻射標定 DNA 探針之核酸的墨點雜交，分析病毒侵染細胞。藉放射性自顯影偵測輻射活性；陽性結果確認在病毒單離物中存在 AaIT 基因（參閱實施例 6）。

使用類似那些在下面實施例 1, 2, 4 及 5 所描述之方法建立包含天然 AaIT 基因及編碼天然 AaIT 信號序列之天然核酸序列之桿狀病毒轉移載體，然後由此製備重組合病毒（參閱下面實施例 3-5）。使用聚合酶鏈反應，以證明此重組合病毒包含含 AaIT 基因之正確大小的插入子（參閱下面實施例 7）。使用含 AaIT 基因之重組合病毒作為陽性對照組，在分析中供分析含密碼子最適 AaIT 基因與異質性信號序列之重組合病毒的生物活性。

藉由單離自經病毒侵染細胞之全部細胞 RNA 之 Northern 墨點分析，評估在昆蟲細胞中用密碼子最適或天然 AaIT 病毒侵染之 AaIT 基因的表現（參閱下面實施例 8）。分析顯示有高度的毒素編碼 RNA 24 小時後侵染（參閱實施例 8 之數據）。

如上面所提及者，此桿狀病毒侵染寬範圍昆蟲，但是對哺乳動物沒有害。調查所有昆蟲品種都易感受由 AaIT 引起的麻痺；可是，哺乳動物不會受到該毒素之不利影響。

野生型桿狀病毒，含此天然 AaIT 基因之病毒，及含密碼子最適 AaIT 基因之病毒（其他可包含外信號序列）之比較生物活性，係藉由用昆蟲幼蟲用 2 種類型的活體內試驗分析之，此 2 種分析是：注射分析及進食分析。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(12)

外來基因的天然信號肽。因為外來基因通常是得自非昆蟲類，其信號可能不利被昆蟲細胞識別，導致表現之亞最適程度。該信號序列一般是被DNA序列編碼，緊跟隨(5'至3')在外來基因之轉譯起始位點。合成由細胞分泌之蛋白質作為含疏水性N-端信號肽之前驅體分子。

分泌信號序列包含3個區域；基礎N-端區域(n-區域)；中心疏水區(h-區域)；及更極性C-端區(c-區域)(11)。該信號序列由成熟蛋白質斷裂之一次輸出是於n-及h-區中依構造而定，在呈現之通路之下；可是，對斷裂位點而言在3及-1位(在c-區域)已經建議是最重要者(11)。在-1位中的殘餘部分應該是小的(丙胺酸，絲胺酸，甘胺酸，半胱胺酸，蘇胺酸或麩胺酸)，而在3位中殘餘部分則不應是芳族(苯丙胺酸，組胺酸，酪胺酸或色胺酸)，帶電(天冬醯胺，麩胺酸，賴胺酸或精胺酸)或大及極性(天冬醯胺或麩胺酸)，脯胺酸則自-3~+1區缺乏。容許對這些參數有一些例外。

此-3，-1規則是在哺乳動物系統中斷裂位點的75-80%推斷(11)，但是在昆蟲系統中則未被確認。

Summers 的美國專利 5,155,037 (10) 描述編碼鱗翅目(煙草天蛾)脂肪動員激素信號肽之序列。此為阻斷神經肽之短信號肽(19個胺基酸)，該神經肽調節昆蟲之能量基質帶動作用及新陳代謝。該專利之圖2B描寫此信號肽之核苷酸及胺基酸序列。

此專利也描述編碼黃猩猩果蠅表皮信號肽之序列。此專

裝

訂

85年10月24日 修正
補充

五、發明說明 ()

在初步分析中，於製備密碼子最適 AaIT- 病毒原種期間所獲得之培養基及細胞丸(再懸浮在緩衝溶液中)注射至家蠅幼蟲，以測定那些樣品是否包含可偵測量的生物活性 AaIT。

於注射後 5 秒調查幼蟲，證明身體部分無意識的收縮。由分析所得之結果(參閱下面實施例 9 之表)顯示生物活性 AaIT 經偵測存在用 14 密碼子最適 AaIT- 病毒單離物之 13 與異質性信號序列(酯酶-6，脂肪動員激素及表皮)侵染之經培養細胞中。用 IL2-AaIT- 病毒構造預期是陰性結果，由於在毒素基因編碼區中存在有移碼突變。在任何細胞培養上清液中缺乏可偵測之 AaIT 活性顯示生物活性分泌毒素的濃度少於約 0.2 微克/毫升。

劑量反應注射分析證明插入密碼子最適 AaIT 基因會藉由減少殺死標的昆蟲品種所需之時間，增強桿狀病毒的性能。如在下面實施例 10 及圖 5 所示者，由密碼子最適 Cuticle-AaIT-AcMNPV 構造及由不含 AaIT 基因之 AcMNPV 的野生型 E2 株製得的出芽病毒，以每隻幼蟲 10^2 ， 10^3 及 10^4 PFU 之劑量注入分開的中第四齡幼蟲組中。

於每一試驗劑量，Cuticle-AaIT-AcMNPV 殺死其宿主之速度比野生型 AcMNPV 更快。於 10^4 PFU 野生型病毒之 LT_{50} 大約 97 小時，而 Cuticle-AaIT-AcMNPV 之對應 LT_{50} 是 67 小時。此結果顯示 AaIT 基因及表皮信號序列插入 AcMNPV，經由生物活性毒素的表現，加速殺死昆蟲的速度。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

利之圖 2A 描寫表皮基因 CP1 先導肽之核苷酸及胺基酸序列。此核苷酸序列編碼 16 個胺基酸信號肽。

申請者製備 8 個具異質性信號序列之構造。編碼這些信號序列之 DNA 序列可為編碼該信號序列之天然 DNA 序列或編碼那些信號序列之密碼子最適 DNA 序列。一此種信號序列是與編碼昆蟲控制蛋白質之基因組合。每一此種構造再插入桿狀病毒轉移載體，然後藉由在培養細胞中之同源 DNA 重組合 (12) 移入昆蟲病毒之基因組中。

異質性信號序列如下：介白素 -2，酯酶 -6，脂肪動員激素，表皮 (Cuticle)，pBMHPC-12，卵殼素 (Chorion)，Apolipophorin 及性別特異性。

介白素 -2 是一種人類信號序列 (就 T-細胞生長因子而言)，其與 AaIT 之用途已於先前描述過 (13)。脂肪動員激素信號序列 (就神經肽而言) 是得自煙草天蛾並且相當適合 -3，-1 規則 (11)。得自家蠶之卵殼信號序列 (就卵殼構造之蛋白質而言) 及黃猩猩果蠅之表皮信號序列 (就外骨架蛋白質而言) 兩者都分泌大量它們有關之成熟蛋白質。得自煙草天蛾之 apolipophorin 信號序列 (就原生質脂肪輸送蛋白質而言)，家蠶之性別特異性信號序列 (就主要成蟲原生質貯存蛋白質而言) 及得自家蠶之 pBMHPC-12 信號序列 (就 30 kD 幼蟲原生質脂蛋白) 全部會被分泌，因為它們被發現在脂肪體細胞中並且各分泌血淋巴蛋白質。最後，此酯酶 -6 信號序列被用於分泌得自黃猩猩果蠅之絲胺酸水解酶。這些信號序列中的每一個除了 apolipophorin 之外

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

85年10月4日 修正
補充

五、發明說明 ()

使用較老幼蟲 (早期第五齡蟲) 與 7 個不同的密碼子最適外源信號 -AaIT-AcMNPV 構造, 天然 AaIT 信號 - 天然 AaIT 基因 -AcMNPV 構造及不含 AaIT 基因之 AcMNPV 的野生型 E2 株, 重複此注射分析。將 10^4 PFU 劑量的每一構造之出芽病毒注入幼蟲之分開組中。

如下面實施例 11 所描述者, 每一密碼子最適外源信號 -AaIT-AcMNPV 構造 (以及天然 AaIT 信號 - 天然 AaIT 基因 -AcMNPV 構造) 殺死其宿主比野生型 AcMNPV 更快。野生型病毒之 LT_{50} 大約 126 小時, 而 7 個外源信號 -AaIT-AcMNPV 構造之對應 LT_{50} 範圍大約 68-89 小時, 天然 AaIT-AcMNPV 構造之 LT_{50} 大約 74 小時。這些結果確認實施例 10 的結果, AaIT 基因及異質性信號序列插入 AcMNPV, 會透過生物活性毒素的表現, 加速殺死昆蟲的速度。

為了試驗這些重組合病毒的口服毒性, 此重組合病毒是用於偵測多角體 (polyhedrin) 的產生, 藉由在培養中用重組合 AaIT- 病毒及野生型輔助病毒 (諸如 AcMNPV 之 E2 株) 共侵染細胞, 製備含野生型及重組合病毒粒子之混合物的多角體。作此研究是可能的, 因為一多角體 (閉合體) 包含 700 個病毒粒子。

因此, 將寄主細胞用不同量的重組合 AaIT- 病毒, 以及野生型病毒共侵染。所得之侵染細胞具有包含野生型及重組合病毒粒子之混合物的多角體。如在下面實施例 12 所看到者, 當野生型病毒之 MOI 是每個細胞至少 2 PFU 時, 若重組合病毒之 MOI 增加, 具病毒閉合之細胞的百分比及每

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(14)

，都順從 -3, -1 規則 (11)，供預測斷裂位點。

遺傳密碼之簡并容許核苷酸序列之變異，而仍然產生具有相同胺基酸序列之多肽作為被天然 DNA 序列編碼之多肽。此方法已知為密碼子最適作用，提供一種有設計此種改變 DNA 序列之方法。

密碼子最適基因之設計應考慮成種種因子，包括在生物體內密碼子使用之頻率，最近頻率，RNA 安定性，二次構造形成之潛能，合成之路徑及此基因之意圖未來 DNA 操控。

此遺傳密碼之簡并容許相同胺基酸序列被編碼並且以許多不同方式轉譯。例如：亮胺酸、絲胺酸及精胺酸各被 6 種不同密碼子編碼，而纈胺酸、脯胺酸、蘇胺酸、丙胺酸及甘胺酸各被 4 種不同密碼子編碼。

可是，此種同義密碼子的使用頻率，在真核細胞及原核細胞之中，由基因組至基因組各不同。例如：哺乳動物中同義密碼子一選擇類型是很類似的，而進化遠離生物諸如：酵母 (*S. cerevisiae*)，細菌 (諸如：*E. coli*) 及昆蟲 (諸如：*D. melanogaster*) 顯示基因組密碼子使用頻率之明顯不同類型 (14-19)。

在密碼子 - 選擇類型中的這些差異顯現幫助藉由調節肽伸長比例對個別基因的整體表現程度。2 行實驗證明支持此爭論。首先，多肽合成之比例係依被轉譯之密碼子的特性，以及移轉 RNA ("tRNA") 三級複合形成之最初動力而定 (19-24)。第二，細胞移轉 RNA 分佈傾向跟隨傳信 RNA

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

1996年10月24日
修正
補充

五、發明說明()

個細胞之多角體的平均數目會顯著減少。所以，用閉合陰性重組合病毒及野生型病毒，各於3個MOI下，進行進一步的共閉合研究。此容許重組合病毒粒子在多角體中，於多角體產生的可接受程度下之有效表現。

最後，口服毒性分析是藉由用含預期量PIBs之昆蟲食物一微滴餵幼蟲進行分析。野生型病毒除外，每一PIB包含野生型病毒及重組合病毒粒子之混合物。重組合病毒粒子可編碼天然AaIT基因(及天然信號序列)或連接至異質性信號序列之密碼子最適基因。

然後監測幼蟲麻痺及死亡。分析結果說明在實施例13及圖6-15。

除了重組合病毒其中之一外的全部證明比野生型AcMNPV(其缺少AaIT基因者)較早開始罹病。此例外是AcMNPV構造包含pBMHPC-12信號序列接收到編碼AaIT之密碼子最適序列者，其執行性能大約與野生型AcMNPV相同。此重組合病毒顯示特有麻痺反應，此反應容易與由野生型病毒引起之病理區別。在多角體及在受侵染之昆蟲中野生型對重組合病毒之真正比例並未分析。

本發明又包括藉冗餘遺傳密碼之DNA序列，其為生物上相當於本文特別描述之天然或密碼子最適序列，其編碼該信號序列，即這些其他DNA序列(包括天然DNA序列)具有核苷酸序列不同於那些本文所說明者之特性，但是其編碼具有一信號序列，其與那些被本文所說明之密碼子最適DNA序列編碼者具相同胺基酸序列。

五、發明說明(15)

("mRNA")池之同族密碼子頻率(24-27)。

為了這些原因，希望及用於設計想做昆蟲病毒表現系統之基因，其中此密碼子頻率反映此同族細胞tRNA頻率。這是特別合宜於使用多角體啟動子，像桿狀病毒表現系統之表現系統，其中一種單一mRNA可利用超過一半的細胞轉譯容量。因此，密碼子頻率當於高程度表現重組合蛋白質時，應反映此同族細胞tRNA頻率。

合成基因之較佳密碼子使用頻率應反射由希望用於重組合蛋白質表現之細胞／生物的正確(或盡可能密切相關)基因組衍生之核基因的密碼子使用法。

在本發明中，適當代表鱗翅目基因序列及昆蟲病毒基因序列兩者在本發明不能利用於創造這些最初實驗之可信賴密碼子使用表。Ikemura等人已經注意可信賴密碼子-選擇類型需要由10或更多具不同功能之基因的密碼子頻率之總和(16, 28)。此密碼子最適序列希望表現在各種不同昆蟲中，而不是僅在受AcMNPV侵染之昆蟲。所以，最重要的是密碼子最適作用是與分佈在各種不同昆蟲細胞中的tRNA池相容。

為了此原因，選擇之昆蟲品系是具有足夠數目的已知基因序列。黃猩猩果蠅具有由44種核基因全部有20,451個密碼子衍生之密碼子使用表(17)。這些密碼子使用表是用於設計編碼本發明之訊號序列的密碼子最適基因及下面描述之AaIT毒素序列。

一種全長信號肽序列之基因融合至昆蟲控制蛋白質之基

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

尤其，本發明企圖包括那些 DNA 序列其編碼此異質性信號序列及 / 或 AaIT 其足夠重複這些序列，無論是天然或密碼子最適序列，為了使藉以於標準高嚴緊 Southern 雜交條件，諸如那些在 Sambrook 等人 (36) 論文中所描述，條件下雜交，以及藉以產生生物活性信號序列。

本發明也包括編碼之胺基酸序列不同於那些所描述之信號序列之 DNA 序列，但是其為生物上相當於那些信號序列所描述者。此種胺基酸序列假使其序列只是自該信號序列作微少缺失或於該信號序列作保留置換所導致的差異，使得該序列之三級構型本質上並未自該信號序列作改變，所以其可說是生物上相當於那些信號序列者。

例如：胺基酸丙胺酸，疏水性胺基酸之密碼子，可被編碼另外較不疏水性殘餘部份，諸如：纈胺酸、亮胺酸或異亮胺酸取代。同樣地，可使導致一負電荷殘餘部份取代另外部份，諸如：門冬胺酸取代麩胺酸，或一正電荷殘餘部份取代別的，諸如：賴胺酸取代精胺酸之改變，以及以殘餘部份其水療指數 (hydropathic index) 之類似性為基礎的改變，也可預期會產生生物上相當之產物。核苷酸改變其導致分子之 N-端或 C-端部分的改變，也不認為會改變該信號序列之活性。也可合宜的消除存在序列中一或多個半胱胺酸，若存在半胱胺酸可能導致當蛋白質是以重組合產生時，不合宜多體 (multimers) 的形成，因此使純化及結晶方法複雜化。若決定保留該編碼信號序列的活性，每一提議的修改在例行熟練於此技藝內都是很好的。所以，其

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明()

因，諸如密碼子最適 AaIT 毒素肽序列(下列描述者)。如上面所討論者，此信號序列可被編碼異質性信號序列之天然或密碼子最適核甘酸序列編碼。

這些胺基酸序列被反轉譯成顯示所有可能之核甘酸簡并(最大雙關性(maximum ambiguity))之 DNA 序列。產生一定義及潛在(因為密碼子簡并)限制酵素識別位點表。選擇及保存基因合成以及為了方便額外 DNA 操控之限制酵素位點臨界。於最適基因之設計期間密碼子定位之一重要益處是一熟練於此技藝為了便於促進基因建造及操控，可容易地保存或破壞。

一種表記錄每一胺基酸在昆蟲控制蛋白質中發生之次數的數目並且產生每一信號序列。以存在該序列中之胺基酸殘餘部份的數目為基礎定位密碼子，以反映黃猩猩果蠅密碼子使用之相對頻率(17)。

例如：在黃猩猩果蠅中半胱胺酸密碼子頻率，就 TGC 序列而言是 76 %，而序列 TGT 則為 24 %。在 ADK 信號 -AaIT 基因構造中有 8 個半胱胺酸殘餘部份(全部在基因中編碼成熟 AaIT 蛋白質)。因此，6 個密碼子被分派作為 TGC (75 %殘餘物)及 2 個密碼子作為 TGT (25 %殘餘物)。以此限制為基礎，再將每一半胱胺酸密碼子定位成一正確、清楚之序列。注意改變鄰接之同類密碼子(isocodons)。例如：在 AaIT 肽中的 2 個鄰接半胱胺酸殘餘物(胺基酸 37 及 38)定位 TGT TGC 序列，以避免連續定位 2 個相同密碼子序列。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

85.10.24

年 月 日

修正
補充

五、發明說明 ()

。注意改變鄰近等密碼子。例如：在 AaIT 肽中的 2 個鄰近半胱胺酸殘餘部分 (胺基酸 37 及 38) 指定為序列 TGT TGC，以避免陸續指定 2 個相同密碼子序列。

所有 20 個胺基酸及終止密碼子都重複此方法 (雖然終止密碼子之序列 ATT 不被此方法改變)。此外，保存所有臨界限制酵素位置並且破壞不必要之位點。

將質粒載體以及轉移載體之側翼 DNA 序列融合至完全基因序列，以確認接合一連接邊界上沒有不合宜限制位點。

實施例 2

包含異質性信號序列之基因卡組加編碼 AaIT 之密碼子最適 cDNA 序列的建立

合成 8 個異質性信號序列 - 密碼子最適 AaIT 毒素基因卡組並組合成 2 片：A "B" 片段，對每一構造獨特者，係由編碼 8 個異質性信號序列其中之一的 DNA，加上毒素編碼區域之胺基端部分 (對所有構造共有的)，及 "A" 片段，其為每一構造相同者並且編碼該毒素密碼區域之剩餘者。

每一片段 A 及 B 是由購自 New England Biolabs (Beverly, MA) 之一對含 15bp 重疊之寡聚物退火製成的。Sequenase™ 2.0，一種 DNA 聚合酶 (美國 Biochemical Corporation, Cleveland, OH) 用於完成雙股分子，其包含異質性信號序列加編碼 AaIT 之密碼子最適 cDNA 序列。下面是用於建立這 8 個構造之寡聚物的表：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

五、發明說明(17)

所有 20 個胺基酸及終止密碼子重複此方法 (雖然終止密碼子序列 TAA 不受此程序改變) 。此外，保存所有臨界限制酵素位點並且破壞不必要之位點。

使用習用技術合成及組合此密碼子最適核苷酸序列。下面實施例 2 描述一此種方法使用一系列合成寡核苷酸片段，然後將其連接形成完整信號及蛋白質密碼序列。

此密碼子最適信號序列與下列天然序列不同：

48 個核苷酸之 pBMNPC-12-7 一比較密碼子最適序列：

ATG AAA CTC CTG GTC GTG TTC GCC ATG TGC GTG CCC
GCT GCC AGC GCT

與天然序列：

ATG AAA CTT CTC GTT GTG TTC GCA ATG TGC GTG CCT
GCC GCC AGC GCC

57 核苷酸之脂肪動員激素 -6 一比較密碼子最適序列：

ATG TAC AAA CTG ACC GTC TTC CTG ATG TTC ATC GCC
TTC GTG ATT ATC GCT GAG GCC

與天然序列：

ATG TAC AAG CTC ACA GTC TTC CTG ATG TTC ATC GCT
TTC GTC ATC ATC GCT GAG GCC

69 核苷酸之 apolipophorin-14 - 比較密碼子最適序列：

ATG GCC GCT AAA TTC GTC GTG GTT CTG GCC GCT TGC
GTC GCC CTG AGC CAC TCG GCT ATG GTG CGC CGC

與天然序列：

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 ()

圖 2 描述包含黃猩猩果蠟表皮信號序列之 AaIT 基因卡組之建立策略。剩餘 7 個異質性信號序列 -AaIT 基因卡組是以相同方式，使用對信號序列特異性之寡聚物，如上面所指明者建立之。

在第一步中，將 B 片段及共有的 B 寡聚物之信號序列特異性寡聚物退火並且將單股區使用 Sequenase™ 2.0 填入。每一信號序列特異性寡聚物是由包含無性繁殖所需之 Bam HI 位點之相同 12 個核苷酸上游非密碼區，信號序列之密碼區，及編碼 AaIT 之前五個胺基端的胺基酸。此短片雙股 DNA 用 Bam HI 及 Ava I 消化。並且再無性繁殖至 pBluescript SK₋ (Stratagene, LaJolla, CA)，此 pBluescript SK₋ 已經用 Xma I 及 Bam HI 消化。陽性亞無性系藉由存在一 Pvu II 片段比單獨存在 pBluescript SK₋ 之 445 bp 片段還大證明之。Ava I 及 Xma I 位點之突出翼間有單一鹼基對錯誤配對。無性系經校正比錯誤配對，使 Ava I 位點再生並且藉適當限制酵素消化選擇失去 Xma I 位點者。在圖 2，所得之質粒命名為 pBS Cuticle B7。

為了建立編碼集團 AaIT 密碼區之 A 片段，寡聚物 E1 及 E2 退火並且使用 Sequenase™ 2.0 填在單股區內。這導致一雙股分子其包含 Ava I 位點在 5' 端並且安置 Bam HI 及 Asp 718 位點，隨後是此毒素密碼區之 3' 端。將 Bam HI 及 Asp 718 位點導入，以便幫助無性繁殖。片段 A 再用 Ava I 及 Asp 718 消化。含片段 B 之質粒，pBS Cuticle B7，也用 Ava I 及 Asp 718 消化而片段 A 再無性繁殖至此消化

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(18)

ATG GCA GCC AAG TTC GTC GTG GTT CTC GCC GCG TGC
GTG GCC CTC TCG CAC AGC GCG ATG GTG CGC CGC

63核苷酸之卵殼-10 - 比較密碼子最適序列：

ATG TTC ACC TTC GCT ATT CTG CTC CTG TGC GTG CAA
GGC TGC CTG ATC CAG AAT GTT TAC GGA

與天然序列：

ATG TTT ACC TTC GCT ATT CTC CTT CTC TGC GTT CAG
GGT TGC CTG ATC CAA AAT GTG TAC GGT

48核苷酸之表皮6- - 比較密碼子最適序列：

ATG TTC AAG TTC GTG ATG ATC TGC GCC GTC CTC GGC
CTG GCT GTG GCC

與天然序列：

ATG TTC AAG TTT GTC ATG ATC TGC GCA GTT TTG GGC
CTG GCG GTG GCC

63核苷酸之酯酶-6-15 - 比較密碼子最適序列：

ATG AAC TAC GTC GGG CTG GGC CTC ATC ATT GTG CTG
TCG TGC TTG TGG CTG GGG AGC AAT GCT

與天然序列：

ATG AAC TAC GTG GGA CTG GGA CTT ATC ATT GTG CTG
AGC TGC CTT TGG CTC GGT TCG AAC GCG

45核苷酸之性-特異性-15 - 比較密碼子最適序列：

ATG CGC GTC CTG GTG CTG TTG GCC TGC CTG GCA GCC
GCT AGC GCT

與天然序列：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

實施例 4

將 AaIT 基因構造插入桿狀病毒轉移載體

實施例 2 之異質性信號序列 - 密碼子最適 AaIT 基因卡組以 Bam HI 片段自 pBS 信號 - AaIT 無性系單離 (參閱圖 3 中 pBS-Cuticle-AaIT 實例)。這些 Bam HI 片段再無性繁殖至已經用 Bam HI 消化之 pVL 985 桿狀病毒轉移載體 DNA (35)。限制酵素分析隨後插入子定序是用於確認 pVL 異質性信號序列 - 密碼子最適 AaIT 無性系之正確方位及完整性。

例如：將質粒 pBS Cuticle-AaIT 再無性繁殖至 pVL 桿狀病毒轉移載體，以產生命名為 pAC0055.1 之質粒。

實施例 3 之天然 AaIT 基因卡組，以 Bam HI ~ Eco RI 片段自 pBS GIII - AaIT 無性系單離 (參閱圖 3)。這些 Bam HI ~ Eco RI 片段再繁殖至已經用 Bam HI 及 Eco RI 消化之 pVL 1393 桿狀病毒轉移載體 DNA (39)。限制酵素分析隨後插入子定序是用於確認 pVL 天然 AaIT 無性系的完整性。

實施例 5

編碼 AaIT 之重組合病毒的產生

包含天然及密碼子最適 AaIT 基因之重組合病毒，於 AcMNPV 多角體啟動子的控制下，藉由在培養之 Sf9 細胞中同源 DNA 重組合作用，依 M. D. Summers 及 G. E. Smith (12) 所描述之方法產生。Sf9 細胞 (ATCC 接受登記號碼 CRL 1711) 是命名草地粘蟲 21 (Sf21) 之細胞株的衍生物。

在此方法中，將 2.0×10^6 Sf9 細胞接種在含 5 毫升補給

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

ATG AGG GTT CTA GTA CTA CTG GCC TGC TTG GCC GCG
GCG TCA GCC

可是，被不同核酸序列編碼之訊號序列的胺基酸，就密碼子最適及天然序列兩者而言是相等的。

本發明之異質性信號序列是與昆蟲控制蛋白質一起使用。這些蛋白質是毒素，神經肽及酵素。除了上面所描述之 AaIT 之外，此種毒素之實例包括得自虱狀蒲螞 (Pyemotes tritici) 之毒素 (29)，蘇雲金芽孢桿菌 澤亞種 (Bacillus thuringiensis subsp. aizawai) 毒素 (30)，及蘇雲金芽孢桿菌 CryIVD 毒素 (31)。神經肽之實例包括羽化激素 (4)，趨前胸激素 (prothoracicotropic hormone)，脂肪動員激素，利尿激素及 proctolin (32)。酵素之實例包括保幼激素 (juvenile hormone) 酯酶及其衍生物 (5)。

此經單離核酸序列編號此異質性信號序列及昆蟲控制蛋白質，然後插入適於寄主細胞或其中將產生該蛋白質之生物表現載體。此 DNA 序列可直接插入表現載體或可藉移轉載體之助插入。

例如：這些異質性信號序列可與編碼昆蟲特異性毒素 AaIT 之天然或密碼子最適 DNA 序列一起使用。密碼 AaIT 之基因插入一昆蟲病毒，將會導致毒素的表現，此為減少病毒使幼蟲失活及殺死幼蟲所需之時間的原因。易感染昆蟲攝取此種經修飾之昆蟲病毒，將會比昆蟲攝取缺少 AaIT 基因之野生型昆蟲病毒於較早時間停止攝取植物。時間減得

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明()

中。RNA 產量藉 UV 光譜儀測定之。

為了 Northern 分析，20 微克每一 RNA 藉由在含 2.7 M 甲醛，40 mM MOPS(4-嗎啉丙磺酸) (pH 7.0)，10 mM 檸檬酸鈉，1 mM EDTA 之 1% 瓊脂糖凝膠電泳區劃大小。此 RNA 再藉毛管塗沫，在 20xSSC (3 M NaCl, 0.3 M 檸檬酸鈉；用 NaOH 調至 pH 7.0) 的存在下，轉移到硝基纖維素膜 (Schleicher and Schuell BA 85)。此膜在雜交緩衝液 (50% (v/v) 甲醯胺，0.9 M NaCl, 50 mM 磷酸鈉 (pH 7.0)，5 mM EDTA, 0.1% (w/v) SDS, 4xDenhardt's, 0.4 毫克 / 毫升 tRNA, 0.25 毫克 / 毫升小牛胸腺 DNA) 簡短預雜交，然後於 42°C 在含 ^{32}P -標定 DNA 探針，在相同緩衝液中，雜交 16 小時，此探針係藉隨機引發 (random priming) (44)，在 AcMNPV 多角體基因中，將 464 bp Bam HI 引至 Kpn I 限制片段，立刻將 3' 連接至 AaIT 基因插入之位點。隨後雜交，未結合探針藉由用 0.25xSSC, 0.1% SDS，於 65°C 4 次連續 30 分洗滌去除之。使用 Molecular Dynamics PhosphorImager™，藉放射性自顯影，產生膜-結合探針之數字化影像，個別帶使用 ImageQuant™ v3.15 軟體 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) 定量。

圖 4 摘要用野生型 AcMNPV (標定為 "野生型") 及用密碼子最適 (用特異性異質性信號序列標定) 及天然 (經標定 grp III AaIT) 重組合病毒轉染之 Sf9 細胞中 AaIT / 多角體 RNA 程度的分析。只有一種含多角體 RNA 經偵測存在每一槽品中而且所有都是適於存在病毒中之多角體或 AaIT / 多角體基

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

愈多，對作物傷害將減得愈多，因為幼蟲攝食時間減少了。

使用 AaIT 基因之完整密碼子最適序列與此異質性信號序列是根據上面描述之原理構成的。此密碼子最適基因具有 210 核苷酸之序列如下：

```
AAG AAG AAC GGC TAC GCA GTC GAC TCA TCC GGA AAA
GCC CCC GAG TGC CTG CTC TCG AAC TAT TGC AAC AAT
GAA TGC ACC AAG GTG CAC TAC GCT GAC AAG GGC TAC
TGT TGC CTT CTG TCC TGC TAT TGC TTC GGT CTC AAC
GAC GAC AAG AAA GTT CTG GAA ATC TCT GAT ACT CGC
AAG AGC TAC TGT GAC ACC ACC-ATC ATT AAC TAA
```

天然 cDNA AaIT 基因序列如下：

```
AAG AAG AAT GGA TAT GCC GTC GAT AGT AGT GGT AAA
GCT CCT GAA TGT CTT TTG AGC AAT TAC TGT AAC AAC
GAA TGC ACA AAA GTA CAT TAT GCT GAC AAA GGA TAT
TGC TGC TTA CTT TCA TGT TAT TGC TTC GGT CTA AAT
GAC GAT AAA AAA GTT TTG GAG ATT TCG GAC ACA AGG
AAA AGT TAT TGT GAC ACC ACA ATA ATT AAT TAA
```

此密碼子最適序列不同於藉由 210 核苷酸外的 58 (參閱圖 1) 編碼 AaIT 天然 cDNA 序列。可是，由天然 cDNA 及密碼子最適 cDNA 產生的 AaIT，具有相同 70 個胺基酸長之序列，此序列如下：

```
Lys Lys Asn Gly Tyr Ala Val Asp Ser Ser Gly Lys
Ala Pro Glu Cys Leu Leu Ser Asn Tyr Cys Asn Asn
```

85.10.24 修正
年 月 日
補充

五、發明說明 ()

在表中，"n" 代表得自 3 個分析之幼蟲的總數，"df" 代表自由度，"N/A" 意義是不可應用且 "L1 (95%)" 及 L2 (95%)" 代表數據之信賴限制，使得若用等數目幼蟲再進行此分析，將有 95% 信賴程度，因此 LT_{50} 應落在 L1 及 L2 所示之數值之內。

結果顯示每一密碼子外源信號 -AaIT-AcMNPV 構造 (以及天然 AaIT 信號 -天然 AaIT 基因 -AcMNPV 構造) 殺死其寄主比野生型 AcMNPV 更快。野生型病毒之 LT_{50} 大約 126 小時，而 7 個外源信號 -AaIT-AcMNPV 構造之對應 LT_{50} 範圍大約 68-89 小時，天然 AaIT-AcMNPV 構造具有大約 74 小時的 LT_{50} 。這些結果確認實施例 10 之結果，AaIT 基因及異質性信號序列插入 AcMNPV，透過生物活性毒素的表現，加速殺死速度。

實施例 12

在病毒多角體中野生型及閉合陰性重組合病毒之共同閉合
因為重組合 AaIT- 病毒是多角體產生的缺陷，含野生型及重組合病毒粒子是藉用重組合 AaIT- 病毒及野生型補助病毒 (即 AcMNPV 之 E2 株) 共侵染 Sf9 細胞製得的。為了測定每一病用於共侵染的量，將 2×10^7 Sf9 細胞接種在 150 平方公分三角瓶中並且用不同量的野生型及重組合病毒侵染，每個細胞各以至少 1 噬菌斑形成單位 (PFU) 的侵染多重性 (MOI)。4 天後計數細胞並且藉顯微鏡看得見測定細胞核中有清楚可識別之病毒閉合之細胞的比例。多角體之總

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(21)

Glu Cys Thr Lys Val His Tyr Ala Asp Lys Gly Tyr
Cys Cys Leu Leu Ser Cys Tyr Cys Phe Gly Leu Asn
Asp Asp Lys Lys Val Leu Glu Ile Ser Asp Thr Arg
Lys Ser Tyr Cys Asp Thr Thr Ile Ile Asn

若須要，AaIT之信號序列也可為種剛剛描述過之相同程度使最適宜之密碼子。

含密碼子最適核酸序列之合成基因一旦被建立(或將天然基因單離)，將此基因插入適當表現載體，藉由習用技術諸如：於用一或多種適當限制酵素，無性繁殖至此載體中。Smith及Summers的美國專利4,745,051(8)描述桿狀病毒表現載體的建立，其為重組合昆蟲病毒，在其中將外來基因之編碼序列插在桿狀病毒啟動子之後，以取代病毒多角體基因。此多角體基因為細胞間生產性病毒侵染非必要者。

使用移轉載體作為工具，將外來基因移轉至病毒基因組。移轉載體一般是包含足夠病毒序列之細菌質粒，以幫助外來基因藉同源重組合插入病毒基因組中。

在昆蟲細胞中建立重組合桿狀病毒的方法說明在Texas Agricultural Experimental Station Bull. No. 1555 (1987)(12) M.D. Summers 及 G.E. Smith 之 A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures。一種較佳細胞株是 Sf9 細胞(ATCC接受登記號碼 CRL1711)，其為指名為草地黏蟲(Spodoptera frugiperda) 21 (Sf 21)細胞株之衍生物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(22)

適於合宜昆蟲病毒繁殖之其他昆蟲細胞株包括那些由粉紋夜蛾 (*Trichoplusia ni*) (TN368) , 家蠶 (*Bombyx mori*) (BM) 及 *Helicoverpa zea* (BCIRL-Hz-Am1, BCIRL-Hz-Am3) 衍生者。

適宜之昆蟲病毒包括那些在上面發明背景中所列出者。一種較佳昆蟲病毒是桿狀病毒 AcMNPV。在實例中使用命名為 E2 之 AcMNPV 的特定品系。那些熟練於此技藝者將會認知其他桿狀病毒株也可使用。這些包括粉紋夜蛾 MNPV, *Rachiplusia ou* MNPV, 大蠟螟 (*Galleria mellonella*) MNPV, 草地黏蟲 NPV 及經噬菌斑純化之品系, 諸如: 在 Smith, G.E., 及 Summers, M.D., *J. Virol.*, 33, 311-319 (1980) (33) 單離及特性描述之 AcMNPV 的 M3、R9、S1 及 S3 株, 以及家蠶 NPV。也參閱 Smith, G.E., 及 Summers, M.D., *Virol.*, 89, 517-527 (1978) (34)。

如上面所描述者, 藉昆蟲病毒表現 AaIT 會減少使幼蟲失活所需之時間。其次, 藉信號肽可促進功能毒素的成熟及分泌。

編碼外源表皮信號序列之密碼子最適 DNA 序列連接至編碼 AaIT 之密碼子最適 DNA 序列及插入桿狀病毒轉移載體之一實例是命名 pAC0055.1 (參閱下面實施例 1, 2 及 4) 之轉移載體。大腸桿菌菌株 HB101 隱藏此轉移載體 pAC0055.1 之樣品由申請人在 1992 年 12 月 17 日, 寄存在 American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, U.S.A., 指定之 ATCC 登記號

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(23)

碼 69166。使用此寄存物質，一普通練於此技藝者，可用不同信號序列取代包含在該質粒中之表皮序列。

特別言之，第一步是建立具有下列特性之合成雙股 DNA 片段：(i) 5'端 Bam HI- 可相容之粘性末端；(ii) 編碼 ATG 起始密碼子之序列及新信號肽之胺基酸序列；及 (iii) 將前 19 個核苷酸包圍在密碼子最適 AaIT 基因頂端股及前 23 個核苷酸在底股中之序列。此種片段之 3'端包含 Sal I-可相容之粘性末端。用此片段取代 pAC0055.1 之對應 Bam HI/Sal I 片段是藉由將下面 3 個片段，在 DNA 連接酶的存在下連接達到目的，此 3 片段為：(1) 上面描述之 Bam HI/Sal I 合成片段；(2) Sal I/Kpn I 片段由 Sal I 位點在密碼子最適 AaIT 毒素基因之密碼子 6-7 延伸至在 3'側翼多角體基因序列的 Kpn I 位點；及 (3) 最大 Kpn I/Bam HI 片段包含在 pAC0055.1 中。此片段是由 pVL985 (35) 衍生的，包含 pUC8 無性繁殖載體及 AcMNPV 序列，使多角體基因之 5'及 3'端側面相接。那些熟練於此技藝者將會認知此產生的構造只有在信號肽之特性不同於 pAC0055.1。

首先製備包含密碼子最適基因之重組合病毒(參閱上面討論及下面實施例 1, 2, 4 及 5)，它們經試驗確認存在有密碼子最適 AaIT 基因。因為密碼子最適基因取代桿狀病毒多角體基因，攜帶毒素基因之重組合病毒不能形成多角體，因此產生閉合陰性噬菌斑。噬菌斑純化用於自轉染上清液，藉 Summers 及 Smith 之方法 (12) (參閱實施例 5)，單離包含 AaIT 基因之重組合病毒。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

其次，藉由雜交至對 AaIT 基因特異性之輻射標定 DNA 探針之核酸的墨點雜交，分析病毒侵染細胞。藉放射性自顯影偵測輻射活性；陽性結果確認在病毒單離物中存在 AaIT 基因（參閱實施例 6）。

使用類似那些在下面實施例 1, 2, 4 及 5 所描述之方法建立包含天然 AaIT 基因及編碼天然 AaIT 信號序列之天然核酸序列之桿狀病毒轉移載體，然後由此製備重組合病毒（參閱下面實施例 3-5）。使用聚合酶鏈反應，以證明此重組合病毒包含含 AaIT 基因之正確大小的插入子（參閱下面實施例 7）。使用含 AaIT 基因之重組合病毒作為陽性對照組，在分析中供分析含密碼子最適 AaIT 基因與異質性信號序列之重組合病毒的生物活性。

藉由單離自經病毒侵染細胞之全部細胞 RNA 之 Northern 墨點分析，評估在昆蟲細胞中用密碼子最適或天然 AaIT 病毒侵染之 AaIT 基因的表現（參閱下面實施例 8）。分析顯示有高度的毒素編碼 RNA 24 小時後侵染（參閱實施例 8 之數據）。

如上面所提及者，此桿狀病毒侵染寬範圍昆蟲，但是對哺乳動物沒有害。調查所有昆蟲品種都易感受由 AaIT 引起的麻痺；可是，哺乳動物不會受到該毒素之不利影響。

野生型桿狀病毒，含此天然 AaIT 基因之病毒，及含密碼子最適 AaIT 基因之病毒（其他可包含外信號序列）之比較生物活性，係藉由用昆蟲幼蟲用 2 種類型的活體內試驗分析之，此 2 種分析是：注射分析及進食分析。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

85年10月24日 修正
補充

五、發明說明 ()

在初步分析中，於製備密碼子最適 AaIT- 病毒原種期間所獲得之培養基及細胞丸(再懸浮在緩衝溶液中)注射至家蠅幼蟲，以測定那些樣品是否包含可偵測量的生物活性 AaIT。

於注射後 5 秒調查幼蟲，證明身體部分無意識的收縮。由分析所得之結果(參閱下面實施例 9 之表)顯示生物活性 AaIT 經偵測存在用 14 密碼子最適 AaIT- 病毒單離物之 13 與異質性信號序列(酯酶-6，脂肪動員激素及表皮)侵染之經培養細胞中。用 IL2-AaIT- 病毒構造預期是陰性結果，由於在毒素基因編碼區中存在有移碼突變。在任何細胞培養上清液中缺乏可偵測之 AaIT 活性顯示生物活性分泌毒素的濃度少於約 0.2 微克/毫升。

劑量反應注射分析證明插入密碼子最適 AaIT 基因會藉由減少殺死標的昆蟲品種所需之時間，增強桿狀病毒的性能。如在下面實施例 10 及圖 5 所示者，由密碼子最適 Cuticle-AaIT-AcMNPV 構造及由不含 AaIT 基因之 AcMNPV 的野生型 E2 株製得的出芽病毒，以每隻幼蟲 10^2 ， 10^3 及 10^4 PFU 之劑量注入分開的中第四齡幼蟲組中。

於每一試驗劑量，Cuticle-AaIT-AcMNPV 殺死其宿主之速度比野生型 AcMNPV 更快。於 10^4 PFU 野生型病毒之 LT_{50} 大約 97 小時，而 Cuticle-AaIT-AcMNPV 之對應 LT_{50} 是 67 小時。此結果顯示 AaIT 基因及表皮信號序列插入 AcMNPV，經由生物活性毒素的表現，加速殺死昆蟲的速度。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

使用較老幼蟲 (早期第五齡蟲) 與 7 個不同的密碼子最適外源信號 -AaIT-AcMNPV 構造, 天然 AaIT 信號 - 天然 AaIT 基因 -AcMNPV 構造及不含 AaIT 基因之 AcMNPV 的野生型 E2 株, 重複此注射分析。將 10^4 PFU 劑量的每一構造之出芽病毒注入幼蟲之分開組中。

如下面實施例 11 所描述者, 每一密碼子最適外源信號 -AaIT-AcMNPV 構造 (以及天然 AaIT 信號 - 天然 AaIT 基因 -AcMNPV 構造) 殺死其宿主比野生型 AcMNPV 更快。野生型病毒之 LT_{50} 大約 126 小時, 而 7 個外源信號 -AaIT-AcMNPV 構造之對應 LT_{50} 範圍大約 68-89 小時, 天然 AaIT-AcMNPV 構造之 LT_{50} 大約 74 小時。這些結果確認實施例 10 的結果, AaIT 基因及異質性信號序列插入 AcMNPV, 會透過生物活性毒素的表現, 加速殺死昆蟲的速度。

為了試驗這些重組合病毒的口服毒性, 此重組合病毒是用於偵測多角體 (polyhedrin) 的產生, 藉由在培養中用重組合 AaIT- 病毒及野生型輔助病毒 (諸如 AcMNPV 之 E2 株) 共侵染細胞, 製備含野生型及重組合病毒粒子之混合物的多角體。作此研究是可能的, 因為一多角體 (閉合體) 包含 700 個病毒粒子。

因此, 將寄主細胞用不同量的重組合 AaIT- 病毒, 以及野生型病毒共侵染。所得之侵染細胞具有包含野生型及重組合病毒粒子之混合物的多角體。如在下面實施例 12 所看到者, 當野生型病毒之 MOI 是每個細胞至少 2 PFU 時, 若重組合病毒之 MOI 增加, 具病毒閉合之細胞的百分比及每

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

1996年10月24日 修正
補充

五、發明說明()

個細胞之多角體的平均數目會顯著減少。所以，用閉合陰性重組合病毒及野生型病毒，各於3個MOI下，進行進一步的共閉合研究。此容許重組合病毒粒子在多角體中，於多角體產生的可接受程度下之有效表現。

最後，口服毒性分析是藉由用含預期量PIBs之昆蟲食物一微滴餵幼蟲進行分析。野生型病毒除外，每一PIB包含野生型病毒及重組合病毒粒子之混合物。重組合病毒粒子可編碼天然AaIT基因(及天然信號序列)或連接至異質性信號序列之密碼子最適基因。

然後監測幼蟲麻痺及死亡。分析結果說明在實施例13及圖6-15。

除了重組合病毒其中之一外的全部證明比野生型AcMNPV(其缺少AaIT基因者)較早開始罹病。此例外是AcMNPV構造包含pBMHPC-12信號序列接收到編碼AaIT之密碼子最適序列者，其執行性能大約與野生型AcMNPV相同。此重組合病毒顯示特有麻痺反應，此反應容易與由野生型病毒引起之病理區別。在多角體及在受侵染之昆蟲中野生型對重組合病毒之真正比例並未分析。

本發明又包括藉冗餘遺傳密碼之DNA序列，其為生物上相當於本文特別描述之天然或密碼子最適序列，其編碼該信號序列，即這些其他DNA序列(包括天然DNA序列)具有核苷酸序列不同於那些本文所說明者之特性，但是其編碼具有一信號序列，其與那些被本文所說明之密碼子最適DNA序列編碼者具相同胺基酸序列。

五、發明說明 ()

尤其，本發明企圖包括那些 DNA 序列其編碼此異質性信號序列及 / 或 AaIT 其足夠重複這些序列，無論是天然或密碼子最適序列，為了使藉以於標準高嚴緊 Southern 雜交條件，諸如那些在 Sambrook 等人 (36) 論文中所描述，條件下雜交，以及藉以產生生物活性信號序列。

本發明也包括編碼之胺基酸序列不同於那些所描述之信號序列之 DNA 序列，但是其為生物上相當於那些信號序列所描述者。此種胺基酸序列假使其序列只是自該信號序列作微少缺失或於該信號序列作保留置換所導致的差異，使得該序列之三級構型本質上並未自該信號序列作改變，所以其可說是生物上相當於那些信號序列者。

例如：胺基酸丙胺酸，疏水性胺基酸之密碼子，可被編碼另外較不疏水性殘餘部份，諸如：纈胺酸、亮胺酸或異亮胺酸取代。同樣地，可使導致一負電荷殘餘部份取代另外部份，諸如：門冬胺酸取代麩胺酸，或一正電荷殘餘部份取代別的，諸如：賴胺酸取代精胺酸之改變，以及以殘餘部份其水療指數 (hydropathic index) 之類似性為基礎的改變，也可預期會產生生物上相當之產物。核苷酸改變其導致分子之 N-端或 C-端部分的改變，也不認為會改變該信號序列之活性。也可合宜的消除存在序列中一或多個半胱胺酸，若存在半胱胺酸可能導致當蛋白質是以重組合產生時，不合宜多體 (multimers) 的形成，因此使純化及結晶方法複雜化。若決定保留該編碼信號序列的活性，每一提議的修改在例行熟練於此技藝內都是很好的。所以，其

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(29)

中 "信號序列基因"，"DNA 編碼信號序列" 及 "信號序列" 一詞被用於說明書或申請專利範圍內，應了解每一個都包含會導致產生生物上相當之信號序列的所有此種修飾及改變。

為了使本發明更可被了解，將示出下列實施例。此實施例只是為了詳細說明，而不因此被解釋作為限制本發明之範圍。

實施例

標準分子生物技術是利用根據 Sambrook 等人 (36) 所描述之原報告。

實施例 1

編碼 AaIT 之密碼子最適 cDNA 序列的測定

AaIT 之密碼子最適基因的設計開始是企圖反映由意圖用於重組合蛋白質表現之細胞 / 生物的正確 (或盡可能密切相關) 基因組衍生之核基因的密碼子使用法。可是，適當表示鱗翅目及桿狀病毒基因序列不能用於產生這些最初實驗的可信賴密碼子之使用表。

Ikemura 等人已經注意到可信賴密碼子 - 選擇模式需要得自 10 或更多具有不同功能之基因的密碼子頻率 (16, 28) 的和。可是，在本發明之時，DNA 序列信息只得自 2 個特殊蛋白質：AcMNPV 多角體及 AcMNPV p10 (37, 38)。

為了此原因，選擇黃猩猩果蠅，因為其密碼子使用表是

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(30)

由44個核基因總共20,451個密碼子(17)衍生的。這些密碼子使用表是用於設計編碼信號序列之密碼子最適基因及本發明之AaIT毒素序列。

將每一全長信號肽序列融合至AaIT毒素肽序列。這些胺基酸序列使用IntelliGenetics Suite™ 軟體(version 1988; Palo Alto, CA)使反轉譯至顯示所有可能核苷酸簡并(最大雙關性)之DNA序列。IntelliGenetics Suite™ 軟體是用於所有電腦幫助之核酸序列分析。

產生明確及潛在(因為密碼子簡并)限制酵素識別位點之表。選擇及保有基因合成之限制酵素位點臨界以及為了便於額外DNA操控。例如: Bam HI及Ava I限制酵素位點是使用Bluescript SK/KS載體(Stratagene, LaJolla, CA)合成基因所必須者。Sal I及Apa I限制位點宜於容許額外基因操控之靈活性。

使用IntelliGenetics Suite™ 軟體,係記錄在AaIT之每一胺基酸發生次數的表並且產生每一信號序列。以胺基酸殘餘物存在序列之數目為基礎指定密碼子,以反映黃猩猩果蠅密碼子使用之相對頻率(17)。

例如:在黃猩猩果蠅中半胱胺酸密碼子頻率就TGC序列是76%,而TGT序列則是24%。在ADK信號-AaIT基構造中有8個半胱胺酸殘餘部分(所有都在編碼成熟AaIT蛋白質之基因中)。因此,6個密碼子都分配作為TGC(殘餘部分的75%),2個密碼子作為TGT(殘餘部分的25%)。以此分佈為基礎,將每一半胱胺酸再指定為一正確,非雙關性序列

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

85.10.24

年 月 日

修正
補充

五、發明說明 ()

。注意改變鄰近等密碼子。例如：在 AaIT 肽中的 2 個鄰近半胱氨酸殘餘部分 (胺基酸 37 及 38) 指定為序列 TGT TGC，以避免陸續指定 2 個相同密碼子序列。

所有 20 個胺基酸及終止密碼子都重複此方法 (雖然終止密碼子之序列 ATT 不被此方法改變)。此外，保存所有臨界限制酵素位置並且破壞不必要之位點。

將質粒載體以及轉移載體之側翼 DNA 序列融合至完全基因序列，以確認接合一連接邊界上沒有不合宜限制位點。

實施例 2

包含異質性信號序列之基因卡組加編碼 AaIT 之密碼子最適 cDNA 序列的建立

合成 8 個異質性信號序列 - 密碼子最適 AaIT 毒素基因卡組並組合成 2 片：A "B" 片段，對每一構造獨特者，係由編碼 8 個異質性信號序列其中之一的 DNA，加上毒素編碼區域之胺基端部分 (對所有構造共有的)，及 "A" 片段，其為每一構造相同者並且編碼該毒素密碼區域之剩餘者。

每一片段 A 及 B 是由購自 New England Biolabs (Beverly, MA) 之一對含 15bp 重疊之寡聚物退火製成的。Sequenase™ 2.0，一種 DNA 聚合酶 (美國 Biochemical Corporation, Cleveland, OH) 用於完成雙股分子，其包含異質性信號序列加編碼 AaIT 之密碼子最適 cDNA 序列。下面是用於建立這 8 個構造之寡聚物的表：

五、發明說明(32)

片段 A

E1 5' AGCCCCGAG TGCCTGCTCT CGAACTATTG
CAACAATGAA TGCACCAAGG TGCCTACGC
TGACAAGGGC TACTGTTGCC TTCTGTCCTG
CTATTGCTTC 3'

E2 5' CTGTAGGTAC CGGATCCTTA GTTAATGATG
GTGGTGTAC AGTAGCTCTT GCGAGTATCA
GAGATTTCCA GAACTTTCTT GTCGTCGTTG
AGACCGAAGC AATAGCAGGA 3'

片段 B1-8

共有的

5' AGGCACTCGG GGGCTTTTCC GGATGAGGTC
GACTGCGTAG CCGTTCTTCT T 3'

IL-2

5' CCCCCGGAT CCATGTACCG CATGCAGCTG
CTCTCCTGCA TCGCCCTGTC GCTGGCTCTG
GTGACCAATA GCAAGAAGAA CGGCTAC 3'

ADK

5' CCCCCGGAT CCATGTACAA ACTGACCGTC
TTCCTGATGT TCATCGCCTT CGTGATTATC
GCTGAGGCCA AGAAGAACGG CTAC 3'

卵殼

5' CCCCCGGAT CCATGTTTAC CTTCGCTATT
CTGCTCCTGT GCGTGCAAGG CTGCCTGATC
CAGAATGTTT ACGGAAAGAA GAACGGCTAC 3'

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(33)

酯酶 -6

5' CCCCCCGGAT CCATGAACTA CGTCGGGCTG
GGCCTCATCA TTGTGCTGTC GTGCTTGTGG
CTGGGGAGCA ATGCTAAGAA GAACGGCTAC 3'

Apolipophorin

5' CCCCCCGGAT CCATGGCCGC TAAATTCGTC
GTGGTTCTGG CCGCTTGCGT CGCCCTGAGC
CACTCGGCTA TGGTGCGCCG CAAGAAGAAC
GGCTAC 3'

性別特異性

5' CCCCCCGGAT CCATGCGCGT CCTGGTGCTG
TTGGCCTGCC TGGCAGCCGC TAGCGCTAAG
AAGAACGGCT AC 3'

表皮

5' CCCCCCGGAT CCATGTTCAA GTTCGTGATG
ATCTGCGCCG TCCTCGGCCT GGCTGTGGCC
AAGAAGAACG GCTAC 3'

pBMHPC-12

5' CCCCCCGGAT CCATGAACT CCTGGTCGTG
TTCGCCATGT GCGTGCCCGC TGCCAGCGCT
AAGAAGAACG GCTAC 3'

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 ()

圖 2 描述包含黃猩猩果蠟表皮信號序列之 AaIT 基因卡組之建立策略。剩餘 7 個異質性信號序列 -AaIT 基因卡組是以相同方式，使用對信號序列特異性之寡聚物，如上面所指明者建立之。

在第一步中，將 B 片段及共有的 B 寡聚物之信號序列特異性寡聚物退火並且將單股區使用 Sequenase™ 2.0 填入。每一信號序列特異性寡聚物是由包含無性繁殖所需之 Bam HI 位點之相同 12 個核苷酸上游非密碼區，信號序列之密碼區，及編碼 AaIT 之前五個胺基端的胺基酸。此短片雙股 DNA 用 Bam HI 及 Ava I 消化。並且再無性繁殖至 pBluescript SK₋ (Stratagene, LaJolla, CA)，此 pBluescript SK₋ 已經用 Xma I 及 Bam HI 消化。陽性亞無性系藉由存在一 Pvu II 片段比單獨存在 pBluescript SK₋ 之 445 bp 片段還大證明之。Ava I 及 Xma I 位點之突出翼間有單一鹼基對錯誤配對。無性系經校正比錯誤配對，使 Ava I 位點再生並且藉適當限制酵素消化選擇失去 Xma I 位點者。在圖 2，所得之質粒命名為 pBS Cuticle B7。

為了建立編碼集團 AaIT 密碼區之 A 片段，寡聚物 E1 及 E2 退火並且使用 Sequenase™ 2.0 填在單股區內。這導致一雙股分子其包含 Ava I 位點在 5' 端並且安置 Bam HI 及 Asp 718 位點，隨後是此毒素密碼區之 3' 端。將 Bam HI 及 Asp 718 位點導入，以便幫助無性繁殖。片段 A 再用 Ava I 及 Asp 718 消化。含片段 B 之質粒，pBS Cuticle B7，也用 Ava I 及 Asp 718 消化而片段 A 再無性繁殖至此消化

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(35)

質粒中。就圖2而言，所得之質粒命名pBS Cuticle-AaIT。片段A及B接合在獨特Ava I位點。此位點正好是為了設計至AaIT序列中。於片段A連接至含片段B之質粒後，連接之DNA用於轉形組份DH α 大腸桿菌。質粒DNA之微小製品是由所得之細菌集落製得。使用限制酵素分析測定包含預期重組合DNA之集落。進一步限制酵素分析，隨後藉DNA定序，用於確認含編碼AaIT之密碼子最適cDNA之8個質粒的完整性。

實施例3

包含編碼AaIT之天然cDNA序列的基因卡組之建立

包含編碼AaIT之天然cDNA序列的基因卡組是以2片構成，但是以不同於實施例2之密碼子最適基因的建立方式構成。取而代之的是使用只有短區域重疊，構成此基因，使用完全重疊之寡聚物組。在建立方式上第二種差異是必需的，因為AaIT信號序列及密碼區者都使用天然DNA序列。沒有人為限制酵素位點被設計至此DNA序列中。所以，將AaIT基因之信號序列及密碼區域接合的不同方法是必須的。在此方法中，使用不對稱截斷限制酵素，讓基因之功能上分開區域彼此適切地融合。這使得可將預先製造區域混合及配對在任一未來構造中。此寡聚物編號1-10之序列用於建立天然AaIT基因者提供在下表。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(36)

Oligo 1

GATCCGATGA AATTTCTCCT ATTGTTTCTC
GTAGTCCTTC CAATAATGGG GGTGCTTGGC

Oligo 2

GCCAAGCACC CCCATTATTG GAAGGACTAC
GAGAAACAAT AGGAGAAATT TCATCG

Oligo 3

AAGAAGAATG GATATGCCGT CGATAGTAGT
GGTAAAGCTC

Oligo 4

CTCAAAAGAC ATTCAGGAGC TTTACCACTA
CTATCGACGG CATATCCATT CTTCTT

Oligo 5

CTGAATGTCT TTTGAGCAAT TACTGTAACA
ACGAATGCAC AAAAGTACAT TATGCT

Oligo 6

CAGCAATATC CTTTGTCAGC ATAATGTACT
TTTGTGCATT CGTTGTTACA GTAATTG

Oligo 7

GACAAAGGAT ATTGCTGCTT ACTTTTCATGT
TATTGCTTCG GTCTAAATGA CGATAAAAAA
GTTTTG

Oligo 8

CTTGTGTCCG AAATCTCCAA AACTTTTTTA
TCGTCATTTA GACCGAAGCA ATAACATGAA
AGTAAG

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(37)

Oligo 9

GAGATTTTCGG ACACAAGGAA AAGTTATTGT
GACACCACAA TAATTAATTA AG

Oligo 10

AATTCTTAAT TAATTATTGT GGTGTCACAA
TAACTTTTC

為了幫助天然 AaIT 毒素基因卡組之無性繁殖，產生一經修改 Bluescript SK 質粒。此載體命名 pBS SK Bsm I 具有 Bgl II 聯結子 (CAGATCTG) 插入在 Bluescript 圖上，位於 330 bp 之 Nae I 位點。此聯結子插入破壞 Nae I 位點。此外，此載體包含如圖 3 上邊所示之經修飾多聯結子。此經修飾質粒命名為 pBS SK Bsm I。該多聯結子包含位於 Bsm I 位點鄰近的 Nae I 位點，使得任何序列無性繁殖至 Nae I 位點者，可藉由使用 Bsm I 限制酵素，隨後藉由用 DNA 聚合酶 I 之 Klenow 片段 (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) 的粘性末端填在其中，使清楚地被切割成為鈍端分子。

為了建立該卡組之天然信號序列部份，將 Oligos 1 及 2 退火合。當這 2 個寡聚物適當退火時，它們在 5' 端包含鈍 3' 端及 Bam HI 粘性末端。質粒 pBS SK Bsm I 用 Bam HI 及 Nae I 消化。此經退火寡聚物再連接至經消化質粒。所得之質粒亞無性系命名為 pBS G III sig。

AaIT 毒素之密碼區以 2 片 DNA 構成。Oligos 4, 5, 8 及 9 之 5' 端使用 T4 激酶 (Kinase) 磷酸化。留下無末端磷酸之 Oligos 3, 6, 7 及 10。2 個退火反應，隨後進行使用 T4

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(38)

DNA 連接酶 (New England Biolabs, Beverly, MA) 之連接反應。Oligos 3, 4, 5 及 6, 其編碼 AaIT 毒素之胺基端部份者, 經對合及連接如圖 3 所示者。Oligos 7, 8, 9 及 10, 其編碼 AaIT 毒素之羧基端者, 經退火及連接如圖 3 所示者。

這 2 個寡聚合片段藉由在含 TAE 40 mM Tris- 醋酸酯, pH 7.8, 1 mM EDTA) 之 2.5 % 低融化瓊脂糖凝膠 (Bio-Rad, Richmond, CA) 上電泳純化之。當此片段足夠自污染片段分開時, 以凝膠片開並且放在個別管內。此片段藉由依 Sambrook 等人 (36) 所描述之苯酚萃取純化之, 此法作下列修改: (1) 將氯化鈉加到凝膠片, 使於加熱之前達終濃度 1.5 M。在其後之步驟中不需再加鹽。(2) 於乙醇沉澱之前, 在液化及稀釋之凝膠片上只進行 2 次苯酚萃取。

質粒 pBS GIII sig 用 Bsm I 消化並且將粘性末端填入及用 DNA 聚合酶 I 之 Klenow 片段 (BRL) 使鈍化。如上面所指示者, 這導致在信號序列的最後鹼基對上, 將此質粒打開。然後此質粒進一步用 Eco RI 消化。然後在凝膠純化之寡聚片段及經消化質粒兩者間建立了方向連接。陽性亞無性系藉限制酵素分析, 隨後藉 DNA 定序證明之。一命名為 pBS GIII - AaIT 之陽性無性系包含天然信號序列及 AaIT 之全長天然密碼區 (圖 3)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

85.10.24 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

實施例 4

將 AaIT 基因構造插入桿狀病毒轉移載體

實施例 2 之異質性信號序列 - 密碼子最適 AaIT 基因卡組以 Bam HI 片段自 pBS 信號 - AaIT 無性系單離 (參閱圖 3 中 pBS-Cuticle-AaIT 實例)。這些 Bam HI 片段再無性繁殖至已經用 Bam HI 消化之 pVL 985 桿狀病毒轉移載體 DNA (35)。限制酵素分析隨後插入子定序是用於確認 pVL 異質性信號序列 - 密碼子最適 AaIT 無性系之正確方位及完整性。

例如：將質粒 pBS Cuticle-AaIT 再無性繁殖至 pVL 桿狀病毒轉移載體，以產生命名為 pAC0055.1 之質粒。

實施例 3 之天然 AaIT 基因卡組，以 Bam HI ~ Eco RI 片段自 pBS GIII - AaIT 無性系單離 (參閱圖 3)。這些 Bam HI ~ Eco RI 片段再繁殖至已經用 Bam HI 及 Eco RI 消化之 pVL 1393 桿狀病毒轉移載體 DNA (39)。限制酵素分析隨後插入子定序是用於確認 pVL 天然 AaIT 無性系的完整性。

實施例 5

編碼 AaIT 之重組合病毒的產生

包含天然及密碼子最適 AaIT 基因之重組合病毒，於 AcMNPV 多角體啟動子的控制下，藉由在培養之 Sf9 細胞中同源 DNA 重組合作用，依 M. D. Summers 及 G. E. Smith (12) 所描述之方法產生。Sf9 細胞 (ATCC 接受登記號碼 CRL 1711) 是命名草地粘蟲 21 (Sf21) 之細胞株的衍生物。

在此方法中，將 2.0×10^6 Sf9 細胞接種在含 5 毫升補給

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(40)

TNM-FH培養基(Grace氏昆蟲培養基(40)附加有0.33% TC水解乳蛋白(Difco, Detroit, MI)及0.33% TC酵母水解物(Difco), 10%胎牛血清, 0.1% Pluronic™ F-68 (Gibco/BRL))之補給TNM-FH培養基之60毫米培養皿中。一旦細胞穩固地附著(2-16小時), 將培養基取出並且用0.75毫升Grace氏昆蟲培養基附加有10%胎牛血清取代之。取1微克AcMNPV(E2株)DNA與2微克得自實施例4之AaIT轉移載體DNA, 在0.75毫升轉染緩衝液(25 mM HEPES, pH 7.05, 140 mM NaCl, 125 mM CaCl₂)中混合並且滴加至此細胞。此細胞再於27℃培養4小時。於培養末了時, 取出轉染培養基, 此細胞用TNM-FH洗一次, 再加5 ml補給TNM-FH, 並且放在27℃培養箱中。5天後, 自細胞取出培養基, 藉由在Beckman GPR離心機中, 於2000 rpm離心10分鐘使澄清, 並且貯存在4℃。這組成初級轉染上清液。

因為天然及密碼子最適AaIT基因取代AcMNPV多角體基因, 攜帶這些毒素基因之重組合病毒不能形成多角體, 所以引起閉合陰性噬菌斑。使用此表現型作為基礎供確認, 自初級轉染上清液, 藉由3回合噬菌斑純化, 使用M. D. Summers及G. E. Smith (12)之噬菌斑分析方法分析單離之。

在此方法中, 將 $1.5-2.0 \times 10^6$ Sf9細胞接種至在補給TNM-FH中的60毫米培養皿中。於細胞附著(2-16小時)之後, 取出培養基並且用1毫升含0.001-0.1%初級轉染上清液

五、發明說明(41)

的補給 TNM-FH 取代之。令此病毒於 27℃ 吸附至細胞 1-2 小時，此後取出並且用包含抗生素及 1.5% 低膠凝溫度瓊脂糖取代之。一旦瓊脂糖膠凝，將細胞轉移至增濕 27℃，培養 4-6 天。然後藉肉眼檢查，於立體顯微鏡下確認閉合 - 陰性噬菌斑，挑出瓊脂糖管塞覆蓋之每一預期噬菌斑並且稀釋至 1 毫升的補給 TNM-FH 中。

使用自每一噬菌斑回收之 1-10% 總病毒，再重複 2 次噬菌斑純化程序。於第三回合結束時自單一噬菌斑回收的所有病毒(即 1 毫升)添加至接種在 25 平方公分三瓶中之 2×10^6 Sf9 細胞，此三角瓶於 27℃ 培養 1-2 小時。然後取出病毒並且用 3 毫升補給 TNM-FH 取代之，再將此三角瓶送回培養箱中。於 5 天末了時，上清液，其命名為 passage 1 或 "P1" 病毒原株，藉由在 Beckman GPR 離心機中，於 2000 rpm 離心 10 分鐘使澄清。P1 原株之保管樣品保存在 -150℃，剩餘病毒則貯存在 4℃。

確定此閉合陰性病毒包含預期 AaIT 基因，係藉密碼子最適 AaIT- 病毒之墨點雜交(下面實施例 6)並且藉天然 AaIT- 病毒之聚合酶鏈反應(下面實施例 7)達到目的。

實施例 6

藉墨點雜交確認重組合病毒

為了確認在閉合 - 陰性病毒中存在密碼子最適 AaIT 基因，得自實施例 5 之經病毒浸染 Sf9 細胞藉雜交對 AaIT 基因特異性之放射性標定 DNA 探針的核酸之墨點雜交分析之。

五、發明說明(42)

為了此方法，將病毒P1原株之澄清期間所獲得的細胞丸各再懸浮在1毫升Dulbecco氏磷酸鹽緩衝食鹽水(D-PBS)中並且取出100微升供雜交。細胞在Eppendorf離心機中，於最大速度離心15秒，使成丸狀，然後在0.5毫升0.5M氫氧化鈉中增溶。於室溫10分鐘後，每一樣品用50微升10M氨水中和之。藉96凹穴墨點裝置，使10~100微升增溶細胞丸通過用1M氨水，0.02M氫氧化鈉平衡過之硝基纖維素膜(Schleicher and Schuell BA 85, Keene, NH)上3毫米直徑之圓圈。自此裝置取出濾紙，用5xSSPE(0.9M NaCl, 50mM NaH₂PO₄, 16.25mM NaOH, 5mM EDTA)漂洗，並且在真空烘箱於80℃，烘2-3小時，將核酸烘至此膜上。使用前，膜在42℃，在預雜交緩衝液(5xSSPE, 50% (v/v)甲醯胺，0.2% SDS, 5xDENHARDT's (0.1% (w/v)，聚乙炔吡咯烷酮，0.1% (w/v) Ficoll 400™ (Pharmacia LKB, Piscataway, NJ), 0.1% (w/v) 牛血清蛋白)培養之。

密碼子最適AaIT基因構造之雜交探針是由寡核苷酸E1及E2(實施例2所描述者)退火製得之³²P-標定之雙股DNA，然後用噬菌體T7 DNA聚合酶，在³²P-標定之dATP及未標定之dCTP, dGTP及TTP存在下，填在單股區內。此放射性標定之探針藉由加熱使變性，然後在雜交緩衝液(預雜交緩衝液附加有100微克/毫升經剪斷及使變性之鮭魚精蟲DNA)稀釋。將此膜放在含探針之雜交緩衝液並且於37℃培養16小時。然後透過4次連續20~30分洗滌，取出未雜交

五、發明說明(43)

探針，4次連續洗滌是：於室溫在2xSSPE，0.2% SDS中洗2次，於65℃，在0.2xSSPE，0.2% SDS洗2次。自此膜取出過量流體，膜結合之放射活性藉放射性自顯影，使用Kodak XAR 醫用X-射線軟片，在DuPont Cronex™ (Wilmington, DE) Lightning Plus 強化螢幕的存在下偵測之。使用此分析，AaIT基因的存在是在經檢查有93%推定之密碼子最適AaIT-病毒單離物中確認之。

實施例 7

使用聚合酶鏈反應(PCR)確認重組合病毒

為了證明推定之天然AaIT重組合病毒包含正確大小之插入子，藉芽病毒之PCR分析測量側面接在AaIT基因插入之位點的2個已知標記位點間的距離。此方法是B. Malitschek及M. Scharl所描述之方法(41)的修改。此分析之引物(primer)是位於AcMNPV多角基因轉譯起始位點之84~110鹼基上游(5'-CAATATATAGTT-GCTGATATCATGGAG-3'; PVLForward)及205~226鹼基下游(5'-GGATTCCTTGAAGAGAGTGAG-3'; PVLReverse)。

為了製備分析用之病毒樣品，取4微升每種P1原株，及野生型AcMNPV E2株作為對照組，分別在GeneAmp管(Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT)中與21微升緩衝液A(10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 40mM KCl, 0.1毫克/毫升明膠，0.45% (v/v) Nonidet™ P40 (Shell Oil Co.)，0.45% (v/v) Tween™ 20 (ICI Americas))附加

五、發明說明(44)

200 微克 / 毫升得自灰色鏈霉菌 (Streptomyces griseus) 之非特異性蛋白酶混合。每一支試管再於 Perkin-Elmer/Cetus DNA Thermal Cyclers 中走單一循環培養之，3 個溫度順序是：(1) 55℃，60分鐘，(2) 95℃ 維持12分鐘，及(3) 在 4℃ 浸漬。此順序的功能是由出芽病毒釋出病毒 DNA 並且於 PCR 擴增步驟之前破壞蛋白酶。

藉由添加 24.5 微升含 1x 緩衝液 A，3.0 mM MgCl₂，400 μM dATP，400 μM dGTP，400 μM dCTP，400 μM TTP，50 毫微莫耳引物 1 (PVLForward)，50 毫微莫耳引物 2 (PVLReverse) 之溶液製備每一樣品。供擴增反應。藉添加 0.5 微升 (2.5 單位) AmpliTaq DNA 聚合酶 (Perkin-Elmer/Cetus) 起始 PCR，而且開始熱循環順序是由 25-35 溫度循組成，其中每一循環是由 (1) 於 94℃ 1 分鐘，(2) 於 55℃ 1.5 分鐘，及 (3) 於 72℃ 2.5-3.0 分鐘。在最後循環時，將在 72℃ 的培養時間再延長 7 分鐘，樣品再於 4℃ 浸漬。適量每一 PCR 反應再藉由在 DNA 大小標記之適當組合的存在下電泳分析之。

每四個不同的推定天然 AaIT 重組合病毒藉此方法分析，產生單一 PCR 產物，在不同樣品中其移動性是相同並且與被擴增之片段的 493 bp 之預期大小同大。此片段包含基因插入之引物側面相接位點。同樣地，單一 PCR 產物是用野生型 AcMNPV 株 E2 病毒獲得，其可動性與 337 bp 之預期大小有很好一致性。

五、發明說明(45)

實施例 8

在病毒侵染細胞中RNA程度的分析

AaIT基因在Sf9細胞中，用密碼子最適及天然AaIT病毒侵染之表現是藉得自病毒侵染之細胞單離之總細胞RNA的Northern墨點分析評估之。總細胞RNA是藉硫氰酸胍/CsCl方法(42, 43)單離之。

在此方法中，Sf9細胞(5×10^7 ，在150平方公分三角瓶中)用病毒，以5 PFU/細胞之MOI侵染並且於27°C培養24小時。然後藉離心(在Beckman GPR離心機中，於2000 rpm離心10分鐘)將細胞收成，此細胞丸再懸浮在10毫升4 M 硫氰酸胍溶液(50% (w/v) 硫氰酸胍溶液，0.5% (w/v) N-月桂基肌胺酸，0.7% (v/v) β -羧基乙醇，25 mM檸檬鈉(pH 7.0))。總RNA再藉由通過5.7 M CsCl, 0.1 M EDTA墊，在Beckman 70.1 Ti轉子，於60,000 rpm旋轉4.5小時部份純化之。再將此RNA丸溶在2毫升TES緩衝液(10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 1% (w/v) SDS)並且於55°C培養5-10分鐘，幫助樣品溶解。此溶液再調至0.15 M NaCl並且用水飽和苯酚萃取一次。水相去除後，有機相再用2毫升TES, 0.15 M NaCl再萃取2次。然後將水相混合，RNA用乙醇使沉澱。將RNA丸再溶於2毫升水中並且於4°C用等體積4 M LiCl使再沉澱過夜。此丸再用冰冷2 M LiCl洗一次並且再溶於0.5毫升水中。殘餘LiCl再藉一最後乙醇沉澱去除，最終丸再溶於0.2毫升水

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明()

中。RNA 產量藉 UV 光譜儀測定之。

為了 Northern 分析，20 微克每一 RNA 藉由在含 2.7 M 甲醛，40 mM MOPS(4-嗎啉丙磺酸) (pH 7.0)，10 mM 檸檬酸鈉，1 mM EDTA 之 1% 瓊脂糖凝膠電泳區劃大小。此 RNA 再藉毛管塗沫，在 20xSSC (3 M NaCl, 0.3 M 檸檬酸鈉；用 NaOH 調至 pH 7.0) 的存在下，轉移到硝基纖維素膜 (Schleicher and Schuell BA 85)。此膜在雜交緩衝液 (50% (v/v) 甲醯胺，0.9 M NaCl, 50 mM 磷酸鈉 (pH 7.0)，5 mM EDTA, 0.1% (w/v) SDS, 4xDenhardt's, 0.4 毫克 / 毫升 tRNA, 0.25 毫克 / 毫升小牛胸腺 DNA) 簡短預雜交，然後於 42°C 在含 ^{32}P -標定 DNA 探針，在相同緩衝液中，雜交 16 小時，此探針係藉隨機引發 (random priming) (44)，在 AcMNPV 多角體基因中，將 464 bp Bam HI 引至 Kpn I 限制片段，立刻將 3' 連接至 AaIT 基因插入之位點。隨後雜交，未結合探針藉由用 0.25xSSC, 0.1% SDS，於 65°C 4 次連續 30 分洗滌去除之。使用 Molecular Dynamics PhosphorImager™，藉放射性自顯影，產生膜-結合探針之數字化影像，個別帶使用 ImageQuant™ v3.15 軟體 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) 定量。

圖 4 摘要用野生型 AcMNPV (標定為 "野生型") 及用密碼子最適 (用特異性異質性信號序列標定) 及天然 (經標定 grp III AaIT) 重組合病毒轉染之 Sf9 細胞中 AaIT / 多角體 RNA 程度的分析。只有一種含多角體 RNA 經偵測存在每一槽品中而且所有都是適於存在病毒中之多角體或 AaIT / 多角體基

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(47)

因之構造。經偵測 AaIT / 多角體 RNA 存在密碼子最適 AaIT-病毒-轉染細胞的含量範圍是 45-67% 多角體 mRNA 的量累積在野生型 AcMNPV 侵染細胞中。天然 AaIT-病毒侵染細胞之對應值是 30%。此分析顯示 AaIT / 多角體基因正確地被利用並且在 AaIT-病毒侵染 Sf9 細胞中具高度活性。

實施例 9

在病毒侵染 Sf9 細胞中產生生物活性 AaIT

AaIT 當以 1 奈克或更多注射至肉蠅 (*Sarcophaga argyrostoma*) 幼蟲的背側區時，會引起急性興奮性 (收縮) 麻痺 (45)。類似分析，使用家蠅幼蟲，用於測定是否可偵測量 (1 奈克) 生物活性 AaIT 存在於密碼子最適 AaIT 病毒 P1 原株的製備期間所獲得的培養基或細胞丸。

為了分析培養基，將 2-6 微升每一種 P1 原株 (600-1000 細胞當量 / 微升) 使用備有 26 種規格針之注射器，注入家蠅幼蟲之背側區域。於注射後 5 秒鐘檢查，證明身體區段之意識的收縮。每一病毒取 5 隻幼蟲分析。

為了分析 AaIT 在細胞丸中的活性，病毒侵染 Sf9 細胞藉離心洗一次並且以每微升 30,000 個細胞之密度，再懸浮在 Dulbecco 氏磷酸鹽緩衝食鹽水 (D-PBS) 中。取出適量細胞懸浮液並且在乾冰上冷凍，然後在 37°C 迅速陸續解凍 3 次。然後將 2 微升冷凍 / 解凍溶解產物 (即 60,000 個細胞當量) 依上述方法注入家蠅幼蟲並且檢查身體區段之急性收縮。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明(48)

下表摘要用介白素-2信號-AaIT-病毒突變種(含移碼突變)及3個其他外源信號-密碼子最適AaIT-病毒-單離物所獲得的結果。生物活性AaIT在此分析中所試驗之任一種P1原株(細胞培養上清液)都偵測不到,顯示在上清液中活性毒素的濃度範圍是0.2奈克/微升或更少。相反地,AaIT在17個細胞丸溶解產物中的13個都容易偵測得到。4個陰性溶解產物中的3個是由突變種IL2-AaIT-病毒單離物衍生,其在毒素基因密碼區中的265位上包含移碼突變。用單離物T9.4.1(推定Cuticle AaIT)獲得其他陰性者,其為藉墨點雜交,分析AaIT基因插入陰性者。其他4個推定Cuticle-AaIT構造得陽性結果,所有9個酯酶-6-AaIT及脂肪動員激素-AaIT構造也得到相同結果。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明(49)

單離物號碼	AaIT基因	墨點雜交 結果	上清液	細胞丸
偽侵染	無	-	0/5	0/5
T6.1.1	IL2-AaIT	+	0/5	0/5
T6.2.1	[突變種]	+	0/5	0/5
T6.5.1		+	0/5	0/5
T7.2.1	Es6-AaIT	+	0/5	5/5
T7.3.1		+	0/5	5/5
T7.4.1		+	0/5	5/5
T7.5.1		+	0/5	5/5
T8.1.1	ADK-AaIT	+	0/5	5/5
T8.2.1		+	0/5	5/5
T8.3.1		+	0/5	5/5
T8.4.1		+	0/5	5/5
T8.5.1		+	0/5	5/5
T9.1.1	Cuticle- AaIT	+	0/5	5/5
T9.2.1		+	0/5	5/5
T9.3.1		+	0/5	5/5
T9.4.1		-	0/5	0/5
T9.5.1		+	0/5	5/5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明(50)

實施例 10

藉注入幼蟲分析病毒性能

為了試驗是否 AaIT 基因插入會增強 AcMNPV 性能，將由密碼子最適 Cuticle-AaIT 及由不含 AaIT 基因之 AcMNPV 的野生型 E2 株製得的出芽病毒，藉由注入中第 4 齡美洲菸夜蛾 (*Heliothis virescens*) 幼蟲進行生物分析。每一病毒藉噬菌斑分析方法，依 M. D. Summers 及 G. E. Smith (12) 所描述之方法測其效價，然後在附加有 0.5% (v/v) 紅色染料 5 號之 TNM-FH 培養基中稀釋至 2×10^7 ， 2×10^6 及 2×10^5 PFU/毫升。每一幼蟲用二氧化碳麻醉 2-5 分；然後用 0.5 微升稀釋病毒，使用設有 26 種規格針之 Hamilton 注射器注射。將此針縱向插在最後 2 隻腹足之間，然後於注射之前向前移動 2~3 個身體區段。注射之後，每一幼蟲視察經染料染色之血淋巴液的釋出，若證明或懷疑樣品喪失就丟棄。此幼蟲再於 27°C，在加蓋之 4 平方公分食物細胞 (每細胞一隻幼蟲) 貯存並且每天用肉眼檢查 2-3 次，證明發病率或死亡率。若在轉向其背面之後，個別在 0.5-2 分之內不能使其本身保持正直，記分作垂死 (陽性反應)。

圖 5 摘要當美洲菸夜蛾幼蟲用 10^2 ， 10^3 及 10^4 PFU 每種病毒注射時所獲得的結果。每一病毒劑量使用 48 隻幼蟲。80 隻昆蟲 ("無病毒") 單獨用 TNM-FH 注射作為陰性對照組。結果顯示於每一試驗劑量 Cuticle-AaIT AcMNPV 殺死其寄主比野生型 AcMNPV 更快。於 10^4 PFU，野生型病毒的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明(51)

LT₅₀大約 97 小時，而 Cuticle-AaIT AcMNPV 的對應 LT₅₀則是 67 小時。而且事實上用 Cuticle-AaIT 侵染之對應幼蟲於死之前都有收縮麻痺現象，但是用野生型 AcMNPV 侵染者則沒有。此結果顯示 AaIT 基因及表皮信號序列插入 AcMNPV，透過生物活性毒素的表現，加速殺死速度。

實施例 11

藉由注射至幼蟲進一步分析毒性能

藉由用 10⁴ PFU 由不含 AaIT 基因之 AcMNPV 的野生型 E2 株，天然 AaIT 信號 - 天然 AaIT 基因 - AcMNPV 構造，或 7 個不同密碼子最適外源信號 - AaIT - AcMNPV 構造其中之一製得的出芽病毒，注射分開組的早期第 5 齡美洲菸夜蛾幼蟲重複實施例 10 之方法。一既定病毒投給 32 隻幼蟲。進行 3 種分開分析。由於注射傷害到幼蟲並不包括在此分析中。取出數據，結果說明在下表：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

重組合 AaIT-AcMNPV 單離物注入 10 美洲菸夜蛾幼蟲之生物分析

病 毒	信 號	"	df	L1(95%)	LT50	L2(95%)
AcMNPV-E2	N/A	81	5	123.8	126.0	128.2
AcMNPV-Es6/AaIT	酯 酶 - 6	91	5	67.2	68.5	69.9
AcMNPV--ADK/AaIT	脂 肪 動 員	81	6	72.7	76.3	80.2
AcMNPV-Cut/AaIT	表 皮	95	2	66.9	68.0	69.1
AcMNPV-Chor/AaIT	卵 殼	89	7	77.3	79.0	80.8
AcMNPV-PBM/AaIT	p1mHPC-12	87	4	87.9	89.6	91.5
AcMNPV-Apo/AaIT	Apolipoprotein III	92	4	85.7	87.4	89.1
AcMNPV-Sex/AaIT	特 別 特 異 性	87	5	77.2	78.7	80.1
AcMNPV-AaIT/cDNA	AaH IT1	85	6	72.5	74.1	75.7

五、發明說明 (52)

A6
B6

85.10.24 修正
年 月 日
補充

五、發明說明 ()

在表中，"n" 代表得自 3 個分析之幼蟲的總數，"df" 代表自由度，"N/A" 意義是不可應用且 "L1 (95%)" 及 L2 (95%)" 代表數據之信賴限制，使得若用等數目幼蟲再進行此分析，將有 95% 信賴程度，因此 LT_{50} 應落在 L1 及 L2 所示之數值之內。

結果顯示每一密碼子外源信號 -AaIT-AcMNPV 構造 (以及天然 AaIT 信號 -天然 AaIT 基因 -AcMNPV 構造) 殺死其寄主比野生型 AcMNPV 更快。野生型病毒之 LT_{50} 大約 126 小時，而 7 個外源信號 -AaIT-AcMNPV 構造之對應 LT_{50} 範圍大約 68-89 小時，天然 AaIT-AcMNPV 構造具有大約 74 小時的 LT_{50} 。這些結果確認實施例 10 之結果，AaIT 基因及異質性信號序列插入 AcMNPV，透過生物活性毒素的表現，加速殺死速度。

實施例 12

在病毒多角體中野生型及閉合陰性重組合病毒之共同閉合
因為重組合 AaIT- 病毒是多角體產生的缺陷，含野生型及重組合病毒粒子是藉用重組合 AaIT- 病毒及野生型補助病毒 (即 AcMNPV 之 E2 株) 共侵染 Sf9 細胞製得的。為了測定每一病用於共侵染的量，將 2×10^7 Sf9 細胞接種在 150 平方公分三角瓶中並且用不同量的野生型及重組合病毒侵染，每個細胞各以至少 1 噬菌斑形成單位 (PFU) 的侵染多重性 (MOI)。4 天後計數細胞並且藉顯微鏡看得見測定細胞核中有清楚可識別之病毒閉合之細胞的比例。多角體之總

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(54)

數也藉由用 0.2% Triton X-100 及 2% (w/v) SDS 處理，計數樣品中多角體。一此種分析的結果包括野生型 E2 AcMNPV 及 cuticle-AaIT 重組合 AcMNPV 之共閉合者摘錄在下表：

培養號碼	MOI [WT:Cut-AaIT]	總細胞 $\times 10^7$	有閉合之 細胞的比例	總多角體 $\times 10^8$	每個細胞 之多角體
1	10:0	2.15	94 %	4.10	19.0
2	10:1	1.85	92 %	3.65	19.7
3	10:2	2.30	89 %	3.30	14.3
4	5:5	1.85	74 %	2.15	11.6
5	2:10	2.00	36 %	0.55	2.75
6	2:20	2.10	23 %	0.12	0.57

這些結果證明甚至當野生型病毒之 MOI 每個細胞至少 2 PFU 時，有病毒多角體（閉合）之細胞的百分比及每個細胞多角體的平均數目，當重組合病毒之 MOI 增加時，顯著地減少每個細胞多角體的平均數目。為了維持每個多角體重組合病毒粒子的大部分，所有後面共閉合實驗是用 2 種病毒（即野生型及閉合陰性）重組合，各以 3 個 MOI 進行之。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝
訂
線

五、發明說明(55)

實施例 13

微滴生物分析以測定密碼子最適及天然序列重組合 AaIT-
病毒的口服活性

用野生型 AcMNPV使序列重組合 AaIT- 病毒共閉合至多角體
中

為了檢查含密碼子最適或編號 AaIT之天然序列的重組合
AcMNPV之口服毒性，每一病毒 (IL-2/AaIT重組合例外，其
未被分析)用野生型 AcMNPV使共閉合至病毒多角體(參閱實
施例 11) 並且餵給第二齡美洲菸夜蛾幼蟲，使用之微滴生
物分析方法如下。個別第二齡美洲菸夜蛾幼蟲轉移至含預
濕濾紙片之空分析凹穴中。每一凹穴放一隻幼蟲。此幼蟲
再於 26℃，50% 相對濕度貯存 12~20 小時(過夜)。

第二天，取 15 毫升 Stoneville 昆蟲食物 (46) 熱至沸騰。
將 5 毫升水加至此融化食物中。此混合物再熱至沸騰並且
於低速迅速離心。上清液取出並且將少許數滴食物染料加
至此澄清上清液作為助劑，使此食物看得見。此融化食物
取適量至微離心管中，在 Beckman 微離心管中再旋轉，並
且將此澄清上清液轉移至新微離心管中。此融化食物於
54℃ 放在熱封阻管直至需要時。

此食物冷卻至 54℃ 之後，添加預期量的 PIBs。典型此
量的範圍每微升 10~250 PIBs。凹穴混合後，取 1 微升滴
數的經處理食物放至 PARAFILM™ (American National
Can, Greenwich, CT) 上，在這兒硬化。將硬化滴迅速轉

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明(56)

移至含個別幼蟲之凹穴中，每隻幼蟲一滴。令此幼蟲進食2小時，那些消耗整個微滴之幼蟲放入含標準量未經處理Stoneville食物之新分析凹穴中。然後將幼蟲放在26℃，50%相對濕度，並且每天監測2次麻痺現象及死亡。麻痺是藉由將幼蟲旋轉至其背面並且觀察30秒測定之。若幼蟲仍保持在其背面，則認為垂死。垂死幼蟲一般於診斷之後24小時期間死亡。試驗期間一般是8天。

幼蟲每天經視察2~3次並且記分證明罹病率及死亡率。死亡及垂死幼蟲兩者記分作為相當於治療。圖6-15摘錄用每一病毒獲得的結果。

有一個例外，所有重組合病毒證明比野生型AcMNPV(缺少AaIT基因者)更早開始反應。例外的是含pBMHPC-12信號序列連接至編碼AaIT之密碼子最適cDNA之AcMNPV構造，其性能大約與野生型AcMNPV相同。野生型對重組合病毒在多角體中及在受侵染昆蟲中之真正比例則未分析。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(57)

參考文獻目錄

1. Tomalski, M. D., and Miller, L. K., Nature, 352, 82-85 (1991).
2. Federici, B. A., In Vitro, 28, 50A (1992).
3. Martens, J. W. M., et al., App. & Envir. Microbiology, 56, 2764-2770 (1990).
4. Eldridge, R., et al., Insect Biochem., 21, 341-351 (1992).
5. Hammock, B. D., et al., Nature, 344, 458-461 (1990).
6. Luckow, V. A., and Summers, M. D., Bio/Technology, 6, 47-53 (1988).
7. Miller, L. K., Ann. Rev. Microbiol., 42, 177-199 (1988).
8. Smith, G. E., and Summers, M. D., U.S. Patent Number 4,745,051.
9. Granados, R. R., and Federici, B. A., The Biology of Baculoviruses, I, 99 (1986).
10. Summers, M. D., U.S. Patent Number 5,155,037.
11. von Heinje, G., Nuc. Acids Res., 14, 4683-4690 (1986).
12. Summers, M. D., and Smith, G. E., A Manual Of Methods For Baculovirus Vectors And Insect Cell Culture Procedures, pages 35, 38-42, Dept. of Entomology, Texas Agricultural Experiment Station and Texas A & M University, College Station, Texas 77843-2475, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987).
13. Dee, A., et al., Bio/Technology, 8, 339-342 (1990).
14. Grantham, R., et al., Nucl. Acids Res., 8, 49-62 (1980).

五、發明說明(58)

15. Grantham, R., et al., Nucl. Acids Res., 9, 43-74 (1981).
16. Maroyama, T., et al., Nucl. Acids Res., 14, 151-197 (1986).
17. Aota, S., et al., Nucl. Acids Res., 16, 315-402 (1988).
18. Wada, K., et al., Nucl. Acids Res., 19 Supp., 1981-1985 (1991).
19. Kurland, C.G., FEBS Letters, 285, 165-169 (1991).
20. Pedersen, S., EMBO J., 3, 2895-2898 (1984).
21. Sorensen, M.A., J. Mol. Biol., 207, 365-377 (1989).
22. Randall, L.L., et al., Eur. J. Biochem., 107, 375-379 (1980).
23. Curran, J.F., and Yarus, M., J. Mol. Biol., 209, 65-77 (1989).
24. Varenne, S., et al., J. Mol. Biol., 180, 549-576 (1984).
25. Garel, J.-P., J. Theor. Biol., 43, 211-225 (1974).
26. Ikemura, T., J. Mol. Biol., 146, 1-21 (1981).
27. Ikemura, T., J. Mol. Biol., 151, 389-409 (1981).
28. Ikemura, T., Mol. Biol. Evol., 2, 13-24 (1985).
29. Tomalski, M. D., and Miller, L. K., Nature, 352, 82-85 (1991).
30. Martens, J. W. M., et al., App. & Envir. Microbiology, 56, 2764-2770 (1990).
31. Federici, B. A., In Vitro, 28, 50A (1992).
32. Menn, J. J., and Borkovec, A. B., J.

五、發明說明(59)

Agric. Food Chem., 37, 271-278 (1989).

33. Smith, G. E., and Summers, M. D., J. Virol., 33, 311-319 (1980).

34. Smith, G. E., and Summers, M. D., Virology, 89, 519-527 (1978).

35. Luckow, V. A., and Summers, M. D., Virology, 170, 31-39 (1989).

36. Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

37. Hooft van Iddekinge, B.J.L., et al., Virology, 131, 561-565 (1983).

38. Kuzio, J., et al., Virology, 139, 414-418 (1984).

39. Webb, N. R., and Summers, M. D., J. Methods Cell & Molec. Biol., 2, 173-188 (1990).

40. Grace, T. C. C., Nature, 195, 788-789 (1962).

41. Malitschek, B., and Scharl, M., BioTechniques, 11, 177-178 (1991).

42. Glisin, V., et al., Biochemistry, 13, 2633-2638 (1974).

43. Chirgwin, J., et al., Biochemistry, 18, 5294-5299 (1979).

44. Feinberg, A. P., and Vogelstein, B., Anal. Biochem., 132, 6-13 (1983).

45. Zlotkin, E., et al., Toxicon, 9, 1-8 (1971).

46. King, E. G., and Hartley, G. G., "Heliothis virescens", in Handbook of Insect Rearing Vol. II, Singh, P., and Moore, R. F., eds., pages 323-328 (Elsevier 1985).

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱：

分泌昆蟲控制蛋白質之異質性信號序列

本發明係描述 7 種異質性信號序列和昆蟲控制蛋白質基因的用途，使得當信號序列及蛋白質基因插入昆蟲病毒時，該昆蟲病毒比缺少昆蟲控制蛋白質之基因的野生型昆蟲病毒更早開始造成病態。

(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：

"HETEROLOGOUS SIGNAL SEQUENCES FOR SECRETION OF INSECT CONTROLLING PROTEINS"

Seven heterologous signal sequence are described for use with genes for insect controlling proteins, such that when the signal sequence and protein genes are inserted into an insect virus, that virus demonstrates an earlier onset of morbidity than a wild-type insect virus which lacks the gene for the insect controlling protein.

附註：本案已向

美

國(地區) 申請專利、申請日期：

1993.1.25.

案號：

08/009,265

四、中文發明摘要(發明之名稱：

分泌昆蟲控制蛋白質之異質性信號序列

本發明係描述 7 種異質性信號序列和昆蟲控制蛋白質基因的用途，使得當信號序列及蛋白質基因插入昆蟲病毒時，該昆蟲病毒比缺少昆蟲控制蛋白質之基因的野生型昆蟲病毒更早開始造成病態。

(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：

"HETEROLOGOUS SIGNAL SEQUENCES FOR SECRETION OF INSECT CONTROLLING PROTEINS"

Seven heterologous signal sequence are described for use with genes for insect controlling proteins, such that when the signal sequence and protein genes are inserted into an insect virus, that virus demonstrates an earlier onset of morbidity than a wild-type insect virus which lacks the gene for the insect controlling protein.

附註：本案已向

美

國(地區) 申請專利、申請日期：

1993.1.25.

案號：

08/009,265

六、申請專利範圍 修正
88.10.18 補充

公告本

1 一種單離核酸序列，其編碼得自蠅 Pyemotes tritici 種之毒素，蘇雲金芽孢桿菌 澤亞種 (Bacillus thuringiensis subsp. aizawai) 毒素，蘇雲金芽孢桿菌 CryIVD 毒素，Androctonus australis 昆蟲毒素 (AaIT)，其中該序列之鄰近上游是編碼異質性信號序列之核酸序列，此異質性信號序列選自包括得自黃猩猩果蠅 (Drosophila melanogaster) 之表皮信號序列

ATG TTC AAG TTT GTC ATG ATC TGC GCA GTT TTG GGC CTG
GCG GTG GCC

得自家蠶 (Bombyx mori) 之卵殼信號序列

ATG TTT ACC TTC GCT ATT CTC CTT CTC TGC GTT CAG GGT
TGC CTG ATC CAA AAT GTG TAC GGT

得自煙草天蛾 (Manduca sexta) 之 apolipophorin 信號
序列

ATG GCA GCC AAG TTC GTC GTG GTT CTC GCC GCG TGC GTG
GCC CTC TCG CAC AGC GCG ATG GTG CGC CGC

得自家蠶之性別特異性信號序列

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

以

六、申請專利範圍 修正
88.10.18 補充

公告本

1 一種單離核酸序列，其編碼得自蠅 Pyemotes tritici 種之毒素，蘇雲金芽孢桿菌 澤亞種 (Bacillus thuringiensis subsp. aizawai) 毒素，蘇雲金芽孢桿菌 CryIVD 毒素，Androctonus australis 昆蟲毒素 (AaIT)，其中該序列之鄰近上游是編碼異質性信號序列之核酸序列，此異質性信號序列選自包括得自黃猩猩果蠅 (Drosophila melanogaster) 之表皮信號序列

ATG TTC AAG TTT GTC ATG ATC TGC GCA GTT TTG GGC CTG
GCG GTG GCC

得自家蠶 (Bombyx mori) 之卵殼信號序列

ATG TTT ACC TTC GCT ATT CTC CTT CTC TGC GTT CAG GGT
TGC CTG ATC CAA AAT GTG TAC GGT

得自煙草天蛾 (Manduca sexta) 之 apolipophorin 信號序列

ATG GCA GCC AAG TTC GTC GTG GTT CTC GCC GCG TGC GTG
GCC CTC TCG CAC AGC GCG ATG GTG CGC CGC

得自家蠶之性別特異性信號序列

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

以

六、申請專利範圍

ATG AGG GTT CTA GTA CTA CTG GCC TGC TTG GCC GCG GCG
TCA GCC

得自煙草天蛾之脂肪動員激素信號序列

ATG TAC AAG CTC ACA GTC TTC CTG ATG TTC ATC GCT TTC
GTC ATC ATC GCT GAG GCC

得自家蠶之 pBMHPC-12 信號序列，

ATG AAA CTT CTC GTT GTG TTC GCA ATG TGC GTG CCT GCC
GCC AGC GCC

，以及

及得自黃猩猩果蠅之酯酶 -6 信號序列

ATG AAC TAC GTG GGA CTG GGA CTT ATC ATT GTG CTG AGC
TGC CTT TGG CTC GGT TCG AAC GCG

2. 根據申請專利範圍第1項之序列，其中毒素是 AaIT，而其中編碼 AaIT 之核酸序列與編碼天然 AaIT 序列之核酸序列或密碼子最適 AaIT 序列雜交。
3. 根據申請專利範圍第2項之序列，其中編碼異質性信號序列之核酸序列與編碼表皮、卵殼、apolipophorin、性別特異性、脂肪動員激素、pBMHPC-12 或酯酶 -6 信號序列之天然信號序列的核酸序列雜交。
4. 一種產生 AaIT 之方法，其包括以申請專利範圍第2項之核酸序列轉形或侵染昆蟲寄主細胞，在允許昆蟲細胞表現該核酸序列之條件下培養寄主細胞，及自寄主細胞分

六、申請專利範圍

離表現的 AaIT。

5. 一種保護植物免於受昆蟲傷害之方法，其包括遞送包含申請專利範圍第 1 項之核酸序列的桿狀病毒於該植物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

Aa-IT密碼區比較

AAG AAG AAT CGA TAT GCC GTC GAT AGT AGT GGT AAA GCT CCT GAA
C...C...C...A.....C.TCA.TCC...A.....C...C...G
 lys asn gly tyr ala val asp ser ser gly lys ala pro glu

Nat.
 C.O.

TGT CTT TTG AGC AAT TAC TGT AAC AAC GAA TCC ACA AAA GTA CAT
 ..C...G.C.C.TCG...C...T...C.....T.....C...G...G...C
 cys leu leu ser asn tyr cys asn asn glu cys thr lys val his

Nat.
 C.O.

TAT GCT GAC AAA GGA TAT TGC TGC TTA CTT TCA TGT TAT TGC
 ..C.....G...C...C...T.....C.T...G...C...C.....
 tyr ala asp lys gly tyr cys cys leu leu ser cys tyr cys

Nat.
 C.O.

TTC GGT CTA AAT GAC GAT AAA AAA GTT TTG GAG ATT TCG GAC ACA
C...C...C...C...G.....C.....A...C...T...T...T
 phe gly leu asn asp asp lys lys val leu glu ile ser asp thr

Nat.
 C.O.

ACG AAA AGT TAT TGT GAC ACC ACA ATA ATT AAT TAA
 C.C...G...C...C.....C.....C...C.....C.....
 arg lys ser tyr cys asp thr thr lle ile asn . . .

Nat.
 C.O.

C.O. = 密碼子最適
 Nat. = 天然

35240

CCCCCGGATCCATGTTCAAGTT...30nt...TGTGGCCAAAGAAGACGGCTAC
 |||||
 TTCTTCTTGGCGATGC...30nt...ACCGA

退火共有寡聚物與信號序列特异性之

寡聚物用 Sequenase 2.0 填在單股區內

AGCCCCGAGTGCCTGCTCTCG...60nt...CTGTCTGCTATTGCTTC
 |||||
 AGGACGATAACGAAGCCAG...70nt...GATTCCTAGGCCATGGATGTC

片段 A 之退火寡聚物 E1 及 E2 用

Sequenase 2.0 填在單股區內

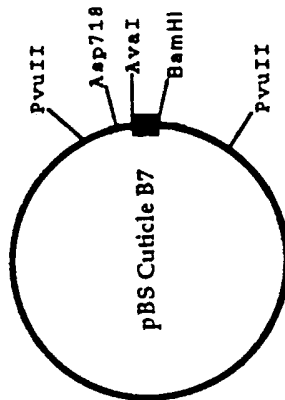
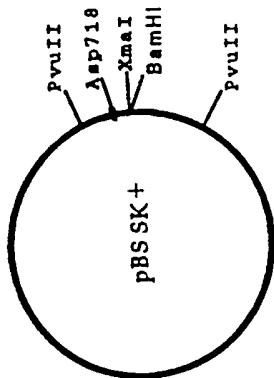
BamHI
 CCCCCGGAT CCAATGTTCAA GTTGGTGATG ATCTGGCGCG TCCTCGGCCT
 GGGGGCCCTA GGTACAAGTT CAAGCACTAC TAGAGCCGCG AGGAGCCGA
 GCTGTGGCC AAGAGAACG GCTACGGCAGT CGACTCATC CGGAAGAACC
 CCGACACCGG TTCTTCTTGC CGATCGGTCA GCTGGAGTAG GCCTTTTCGG
AvaI
 CCGAGTGC T
 CGGCTCAAGG A

片段 "B"

用 Bam HI 及 Ava I 消化並且
 連接至用 Bam HI 及 Xma I 切開
 之 pBluescript SK 內

AvaI
 AGCCCCGAG TCCTGCTCT CGAACTATG CAACATGAA TGCACCAAGG
 TCGGGGGCTC ACGGACGAGA GCTTGATAAC GTTGTACTT ACGTGGTTC
 TGCATPAGC TGACAAGGC TACTGTTC TCTGTCTG CTATTGCTTC
 ACGTGATGG ACTGTTCGG ATGACAACGG AAGACAGAC GATAACGAAG
 GGTCTCAACG ACGACAAGAA AGTCTCGAA ATCTCTGATA CTCCCAAGAG
 CCAGAGTTC TCGTGTTC TCAAGACCT TAGAGACTAT GAGGTTCTC
BamHI Asp718
 CTACTGTGC ACCACCATCA TTAACCTAAGG ATCCGTTACC TACAG
 GATGACACTG TCGTGGTAGT AATTGATTC TAGCCATGG ATGTC

片段 "A"



用 Ava I 及 Asp 718 消化並且
 連接至用 Ava I 及 Asp 718 切
 開之 pBS Cuticle B7 內

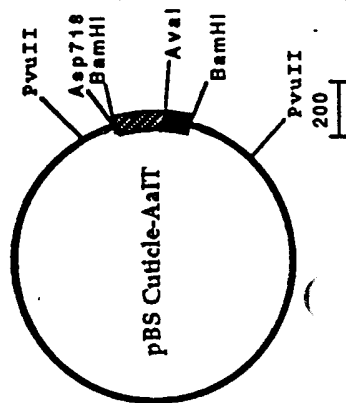
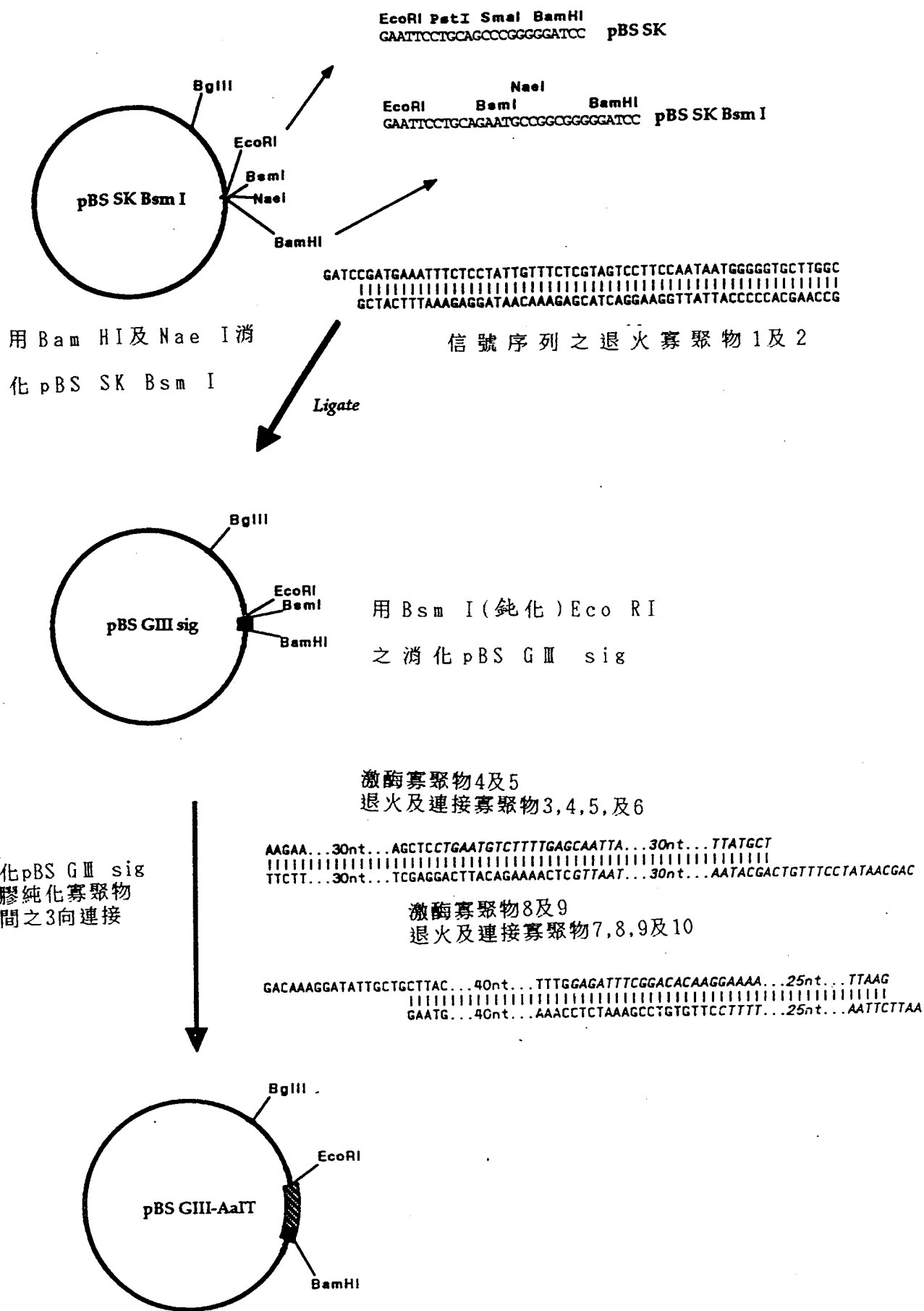
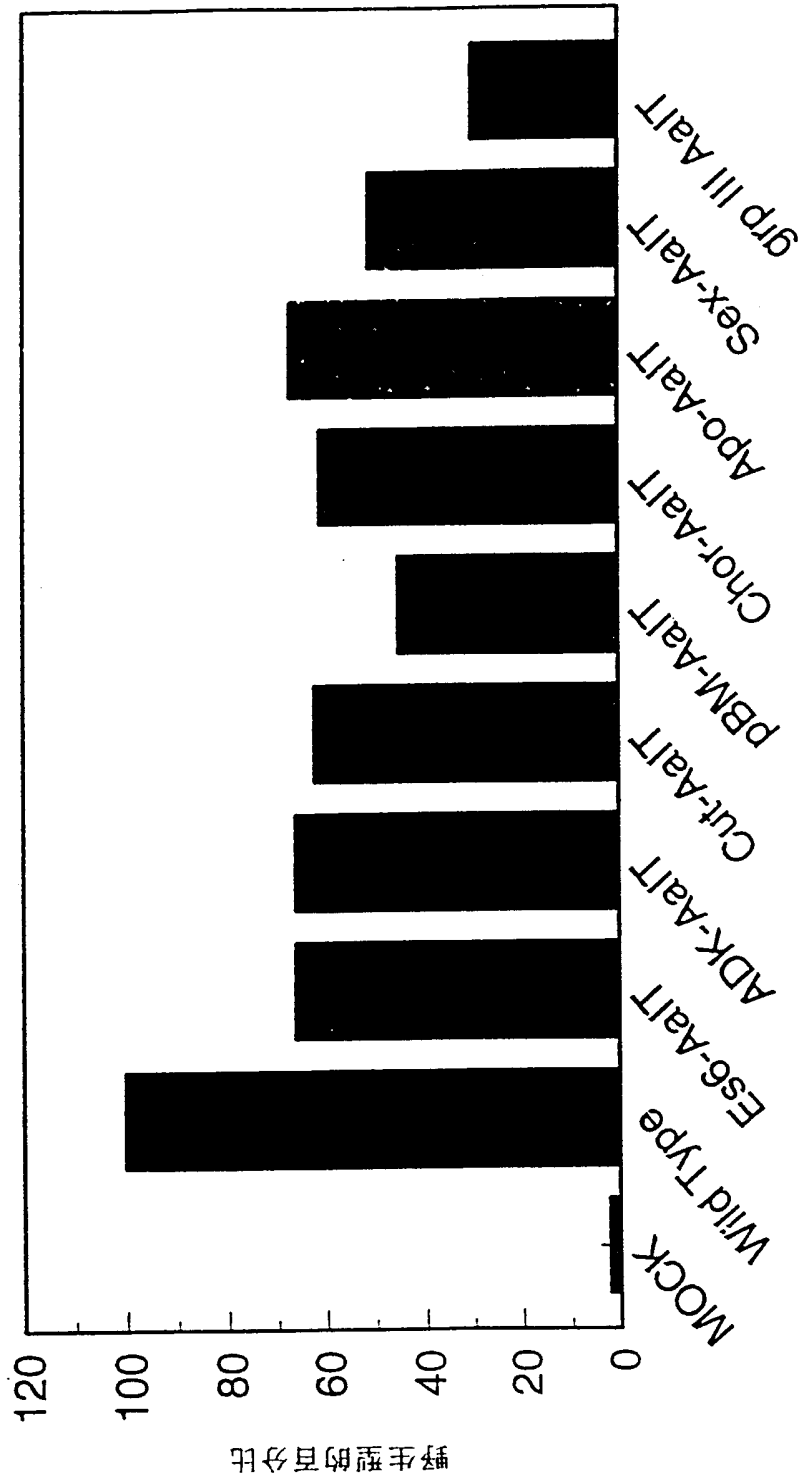


圖 3



RNA 程度



試驗病毒

圖 5A

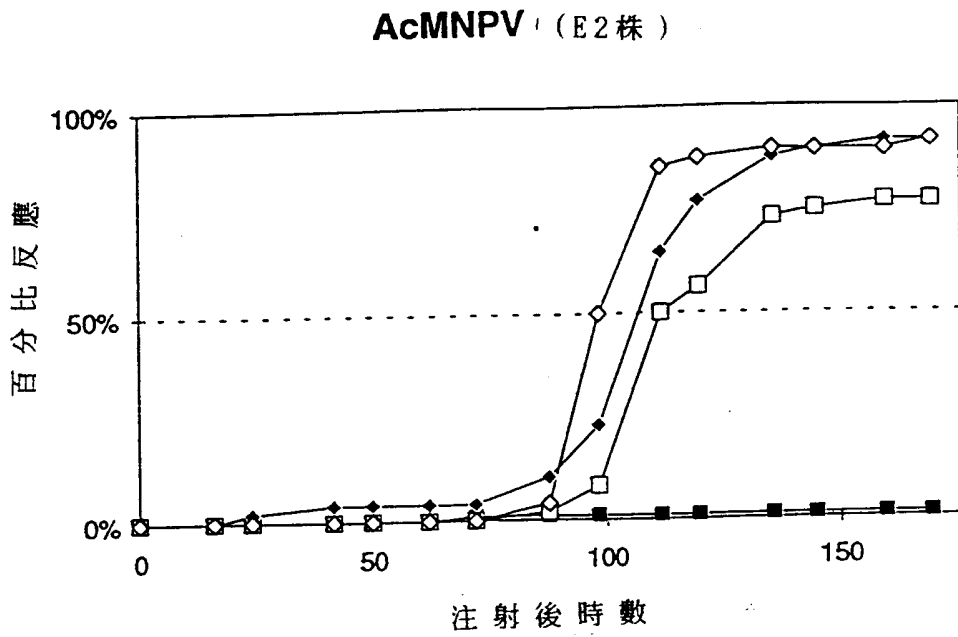
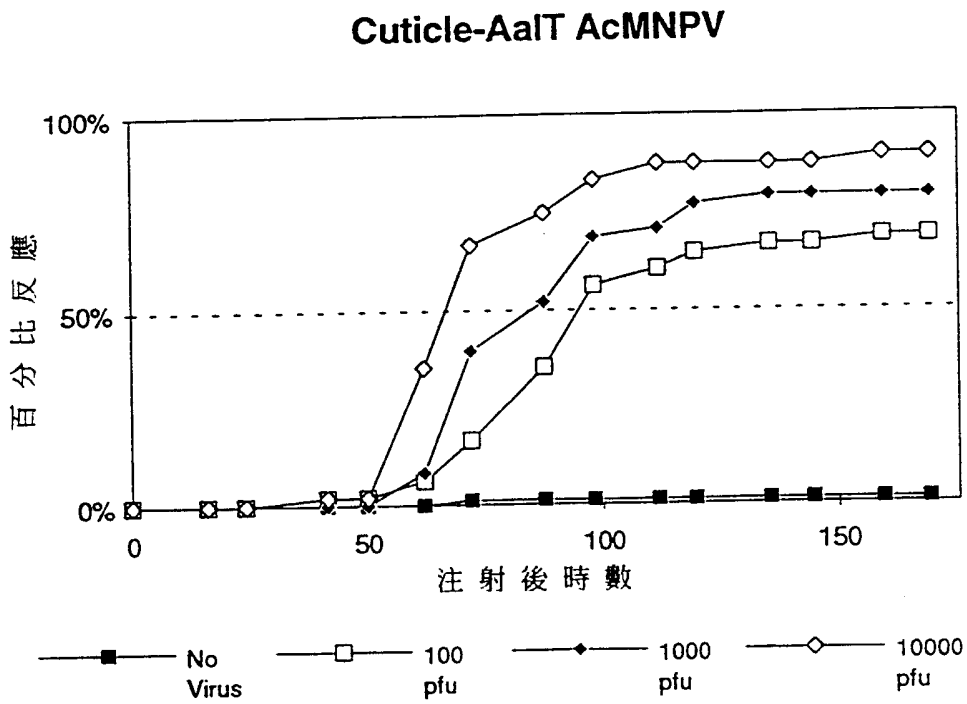
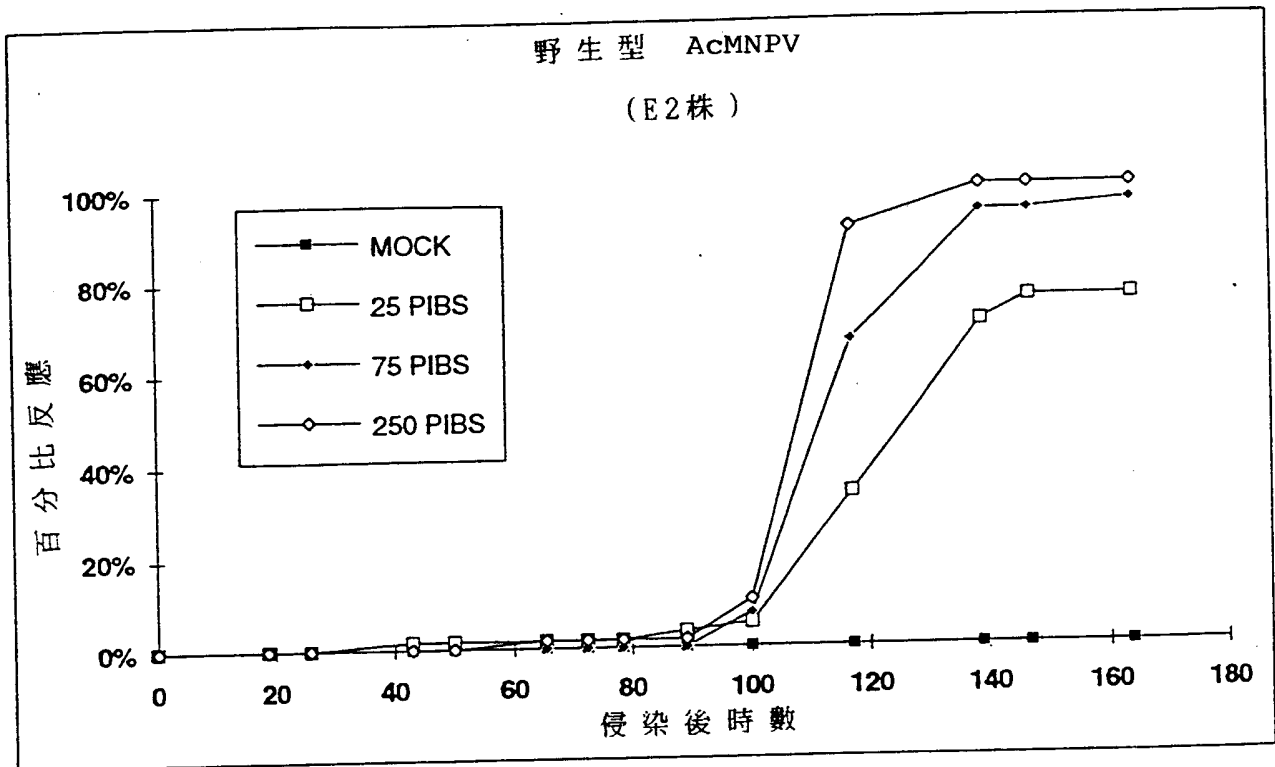
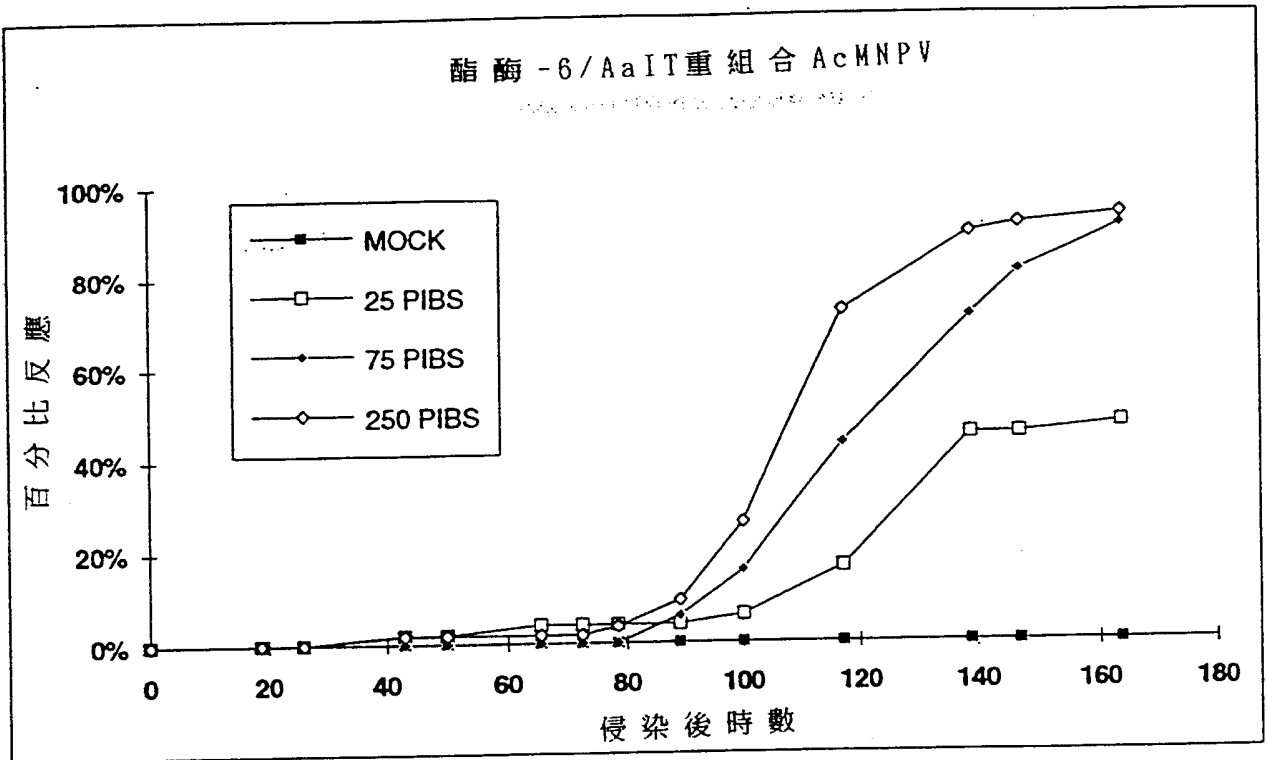
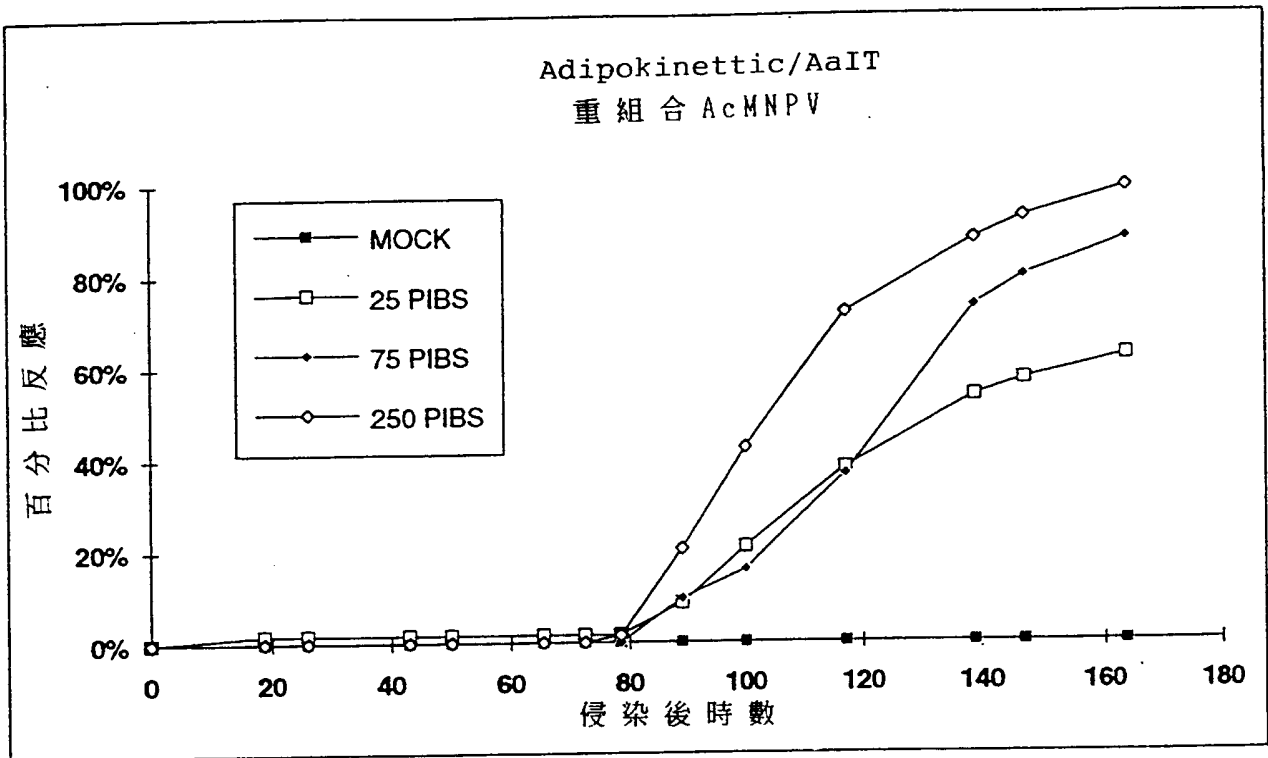


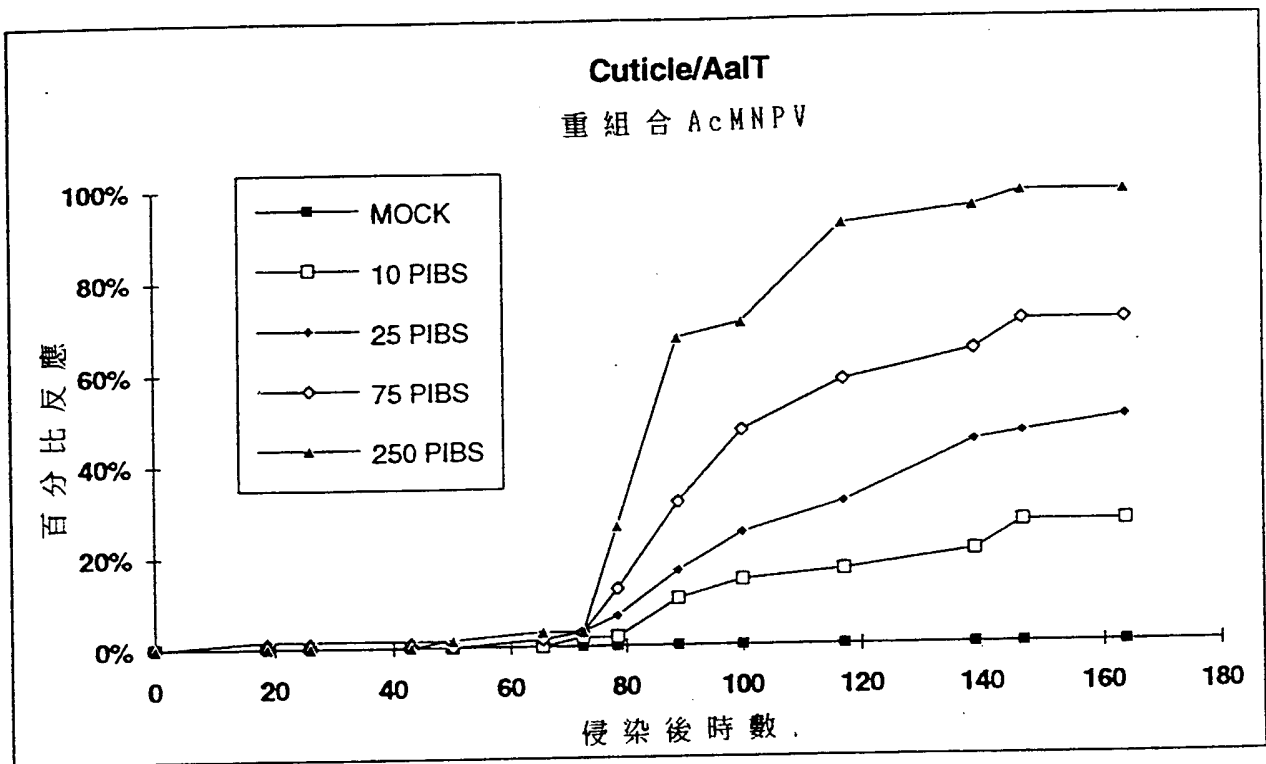
圖 5B











圖：10

