

含 B 型肝炎表面抗原蛋白基因之重組家蠶核多角體病毒感染蠶體之研究

張廣森¹ 彭淑貞¹ 侯豐男^{2*}

¹行政院農業委員會苗栗區農業改良場

²國立中興大學昆蟲學系

摘 要

以含 B 型肝炎表面抗原蛋白基因之重組家蠶核多角體病毒命名為 BmHBs324P，經表皮注射接種家蠶幼蟲，初期無明顯病徵，接種 72 小時後，家蠶停止取食，體節腫大，於蠶座中爬行，96 小時後斃死於蠶座中，並有吐消化液現象，病蠶體液呈黃棕色。以酵素免疫間接法染色，發現具感受性之組織為真皮細胞、氣管皮膜、脂肪體、血球和中腸細胞等，其他組織則不會被感染。重組病毒感染五齡蠶幼蟲，觀察在體液中 B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) 之生產曲線，在接種後 60 小時開始上升，至 108 小時達最高。在家蠶 BmN 細胞株中之生產曲線，胞外之 HBsAg 生產曲線與家蠶體液者雷同，胞內則自接種後 48 小時即開始上升，至 96 小時達最高峰。胞內量較胞外高出甚多，表示 HBsAg 未完全釋出細胞外。

關鍵詞：家蠶、核多角體病毒、B 型肝炎表面抗原

前 言

核多角體病毒 (nucleopolyhedrovirus, NPV)，為昆蟲病毒中發現最早且研究最透徹者 (川瀨，1990)，目前已從 350 種以上之寄主昆蟲中分離出來 (Martigoni and Iwai, 1981)，與人類關係密切。其在自然界扮演天然殺蟲劑 (natural

pesticide) 之角色，近年來已受肯定 (Lewise, 1989)。對家蠶而言，此病毒可引起膿病 (jaundice) 之流行，對蠶農會造成重大損失。

自 Smith *et al.* (1983) 利用 *Autographa californica* NPV (AcNPV) 表現載體，成功地在 *Spodoptera frugiperda* 細胞株表現 β 干擾素 (β -interferon) 後，桿狀病毒表

*論文聯繫人

e-mail: rhou@dragon.nchu.edu.tw

現載體 (baculovirus expression vector) 已廣泛應用於表現異源基因 (heterologous gene) (Griffiths and Page, 1997; Luckow and Summers, 1988)。家蠶核多角體病毒 (*Bombyx mori* NPV, BmNPV) 表現載體也可成功的在家蠶幼蟲體上表現人類 α -干擾素 (α -interferon)(Maeda *et al.*, 1985)。在台灣也成功的利用 BmNPV 表現載體在家蠶體中表現 B 型肝炎表面抗原 (hepatitis B virus surface antigen, HBsAg) (洪, 1989)。

以野生株(wild type) BmNPV感染家蠶幼蟲已有學者深入研究 (有賀, 1973; 陳及侯, 1980)。重組核多角體病毒 (recombinant NPV) 之基本設計, 乃於病毒之DNA序列中, 將非必要基因, 例如利用多角體蛋白基因 (polyhedrin gene) 之啓動子(promoter), 並在其感染所控制之下, 以啓動異源基因之轉錄 (O'Reilly, *et al.*, 1992)。病毒經重組後, 其原有的DNA已經改變, 對寄主之感染與野生株病毒是否會有差異, 而影響表現外源蛋白 (foreign protein) 之能力, 實有必要加以探討。本文以含B型肝炎表面抗原蛋白基因之重組家蠶核多角體病毒為材料, 研究其感染家蠶體時之病徵及組織病變, 並探討影響其表現外源蛋白之因子。

材料與方法

一、供試細胞株

家蠶細胞株 BmN, 由日本九州大學所贈送, 其係以家蠶卵巢組織為材料所建立。細胞株以 IPL-41 培養基

(GIBCO,440-1600EB) 添加 10ml 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) (GIBCO,011-06290M), 培養於 28°C。

二、供試家蠶

家蠶品種為 (瀛國×瀛富) × (華農×華豐) 之雙雜交種, 係本場所飼三、四及五齡蠶, 飼育於 25°C 下, 每日給桑葉二回。品種比較試驗亦由本場家蠶種源庫中選出育種試驗用品系。

三、供試病毒

1. 野生株家蠶核多角體病毒從田間收集膿病病徵明顯之病蠶, 取其膿汁, 離心 (1,500 rpm, 10 mins) 後, 上清液以 0.2 μ m 過濾膜, 取 5ml 濾液感染 75T 培養瓶之細胞, 四天後收集培養液, 經離心 (1,500 rpm, 10 mins) 後, 上清液保存於 4°C 中。
2. 重組家蠶核多角體病毒
重組病毒株, BmHBs324P, 為洪 (1989) 以家蠶核多角體蛋白質基因啓動子, 嵌入 B 型肝炎表面抗原蛋白質基因。以病毒感染培養的單層細胞, 四天後收集培養液, 離心 (1,500 rpm, 10 mins) 後, 上清液保存於 4°C 中。
3. 病毒的定量

參考前田 (1984) 之方法, 將病毒液以 10 倍連續稀釋, 取各稀釋病毒液以 1 ml 分別接種於 2.4×10^6 cells/plate 之 60 mm 培養皿上, 吸附 1 小時, 其間每隔 15 分鐘以十字搖動一次, 然後以不含血清之

培養基清洗三次。上覆含 0.75% agarose (sea plaque agarose, Marine Colloids Co. Ltd.) 之培養基 3 ml。於 28°C 下培養 7 天，觀察形成之溶菌斑 (plaque) 數，依下列推算原始病毒力價，以 PFU/ml 表示 (Summers *et al.*, 1987)。PFU/ml = 1/dilution × number of plaques × 1/ml inoculum/plate。

四、重組病毒感染家蠶病徵的觀察

以微量注射器從五齡起蠶第七腹節氣門接種 5 μ l 之 10^7 PFU/ml 病毒液，飼育於 25°C 下，逐日觀察其行為及病徵。

五、重組病毒感染家蠶之組織觀察

自三齡起蠶注射接種 1 μ l 之 10^7 PFU/ml 病毒液，飼育於 25°C 下，每隔 24 小時取樣一次，以 formal-acetone 液固定 24 小時，以酒精序列脫水，做成石蜡切片，切片厚度 6 μ m，以酵素抗體間接法染色 (indirect immuno-enzymatic staining) (韓及渡部, 1987)，觀察各組織感染情形。

六、重組病毒在家蠶體中之增殖及 HBsAg 合成量的測定

以微量注射器從五齡起蠶第七腹節氣門接種 5 μ l 之 10^7 PFU/ml 病毒液，飼育於 25°C 下，每隔 12 小時取樣一次直至接種後 108 小時。每次取 30 隻蠶，由腹足取其體液，以 3,000 rpm 離心 10 分鐘，上層液置 -20°C 下保存 (Miyajima *et al.*, 1987)。以 ELISA 法分別測其 HbsAg 含量。HbsAg 之測試採用來自永進公司

之 HbsAg 檢驗試劑。

七、重組病毒在 BmN 細胞株之增殖及 HBsAg 合成量的測定

取 $1 \text{ml} 10^7$ PFU/ml 接種於 2.4×10^6 cells/plate 之 60 mm 培養皿上，吸附 1 小時，其間每隔 15 分鐘搖動一次，然後以不含血清之培養基清洗三次。加入培養基 3 ml。每隔 12 小時取樣一次，直至接種後 108 小時。樣本以 3,000 rpm 離心 10 分鐘，上層液及沉澱置 -20°C 下保存。上清液以 ELISA 法測其 HbsAg 含量。沉澱以超音波將細胞打碎後離心，測其胞內 HbsAg 含量。

結 果

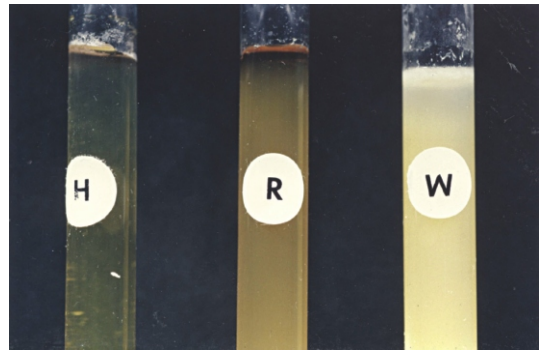
一、重組核多角體病毒感染家蠶病徵

家蠶經注射接種重組病毒後，初期並無明顯病徵，60 小時後開始食慾減退，72 小時後節間腫脹，在蠶座中爬行，但不像感染野生株病毒者，會遊走於蠶架邊緣而掉落地面。外觀上體色稍黃，與感染野生株病毒類似，不易辨識 (圖一)。可區別之處在於感染重組病毒者不流出膿汁。觀察腹足可辨明感染野生株病毒之足部混濁，而感染重組病毒者類似健康蠶呈透明狀。取其體液可發現感染野生株病毒之體液呈乳白色，感染重組病毒呈黃褐色，健康蠶呈透明狀，感染野生株者有大量白色沉澱產生 (圖二)。



圖一 家蠶感染重組病毒與野生型病毒之病徵

Fig. 1. The symptoms of the silkworm infected with recombinant and wild-type BmNPVs. W: Larva infected with wild-type BmNPV. R: Larva infected with recombinant BmNPV. H: Healthy larvae.



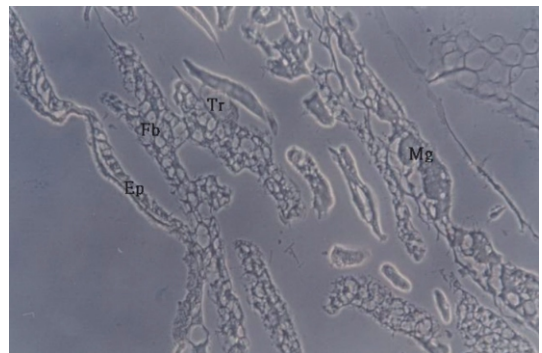
圖二 野生及重組病毒感染家蠶之體液濁度之比較

Fig. 2. Comparison of the hemolymph turbid degree from the silkworm larvae infected with wild-type BmNPV and recombinant BmNPV. H, R, W: footnotes are the same as Fig. 1.

二、重組核多角體病毒感染家蠶組織病變

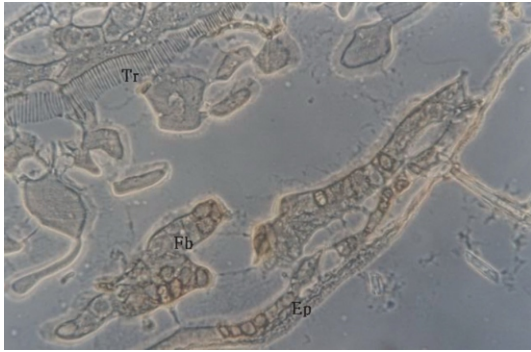
家蠶幼蟲組織切片後，以酵素抗體間接法染色，健康蠶不產生 B 型肝炎表面抗原，染色後呈陰性反應，不呈色 (圖三)。感染重組病毒者，病毒在複製時會產生 HBsAg，以 Anti-HBsAg 抗血清與其反應，Anti-HBsAg 抗血清會和 HBsAg 結合，再以第二抗體與 Anti-HBsAg 抗血清結合，利用第二抗體上之過氧化酵素 (peroxidase) 與 DAB 受質反應，則有產生 HBsAg 的組織呈棕色，為正反應。家蠶以皮下注射方式接種重組病毒後，每隔 24 小時取樣，經組織切片及酵素抗體間接法染色，最早在接種 48 小時後，於真皮細胞及脂肪體上測得正反應 (圖四)。接種 72 小時則在真皮細胞、脂肪體、氣管皮膜、中腸細胞及馬氏管內側均可測

得正反應 (圖五)。96 小時則除上述各組織可測得正反應外，真皮細胞可觀察到組織崩解現象，其餘各組織崩解現象不明顯 (圖六)。



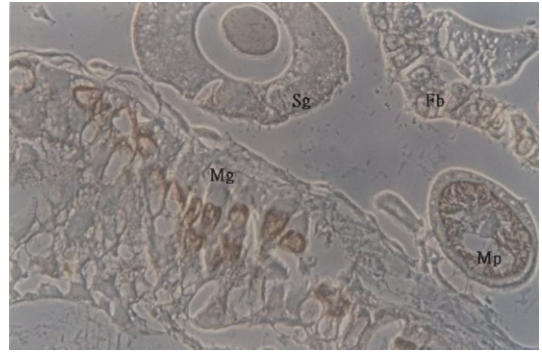
圖三 健康蠶腹部之橫切面

Fig. 3. The cross section of the abdomen of a healthy silkworm larva.(200x)
Ep: epidermis, Fb: fat body, Mg: midgut, Tr: tracheae.



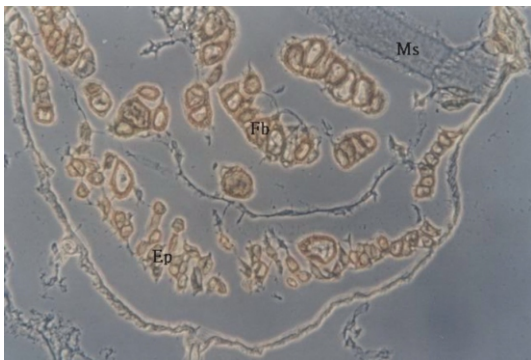
圖四 注射重組病毒液後 48 小時之真皮細胞及脂肪體呈現抗體正反應

Fig. 4. The epidermal and fat body cells of the BmHBs324P injected silkworm larva showing the positive reactions with HBsAg antibody a 48 hrs postinfection. Recombinant BmNPV.(310x) Ep, Fb, Tr:Footnotes are the same as Fig. 3.



圖五 注射重組病毒液後 72 小時之家蠶中，腸細胞呈現抗體正反應

Fig. 5. The midgut cells of the BmHBs324P injected silkworm larva showing the positive reactions with HBsAg antibody at 72 hrs postinfection. (310x) Sg: silk gland;Mp:Malpighian tubules; Fb,Mg: Footnotes are the same as Fig. 3.

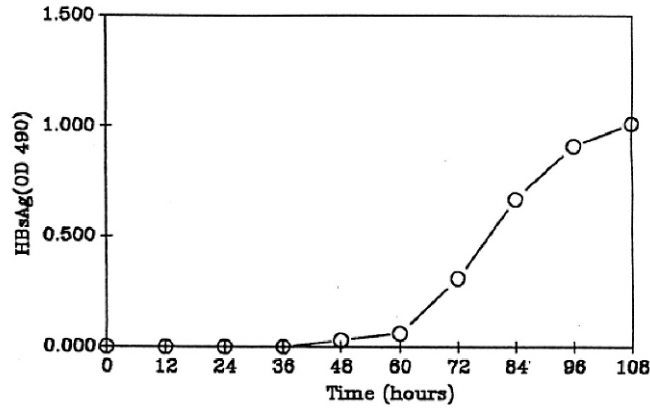


圖六 注射重組病毒液後 96 小時崩解的家蠶真皮細胞

Fig. 6. The lysed epidermal cells of the BmHBs324P injected silkworm larva at 96 hrs postinfection. (310x) Ms: muscle ; Ep,Fb: Footnotes are the same as Fig. 3.

三、HBsAg在蠶體中的增殖

自五齡起蠶接種後，每隔 12 小時取 30 隻家蠶採集其體液，以 ELISA 法分別測其 HBsAg 含量，結果如圖七。家蠶體液中所含 HBsAg 之量，在接種後 48 小時前含量極低，吸光值僅增至 0.03，60 小時才有反應，吸光值為 0.06，72 小時後急速上升，吸光值為 0.31，至 108 小時達最高，吸光值達 1.01。



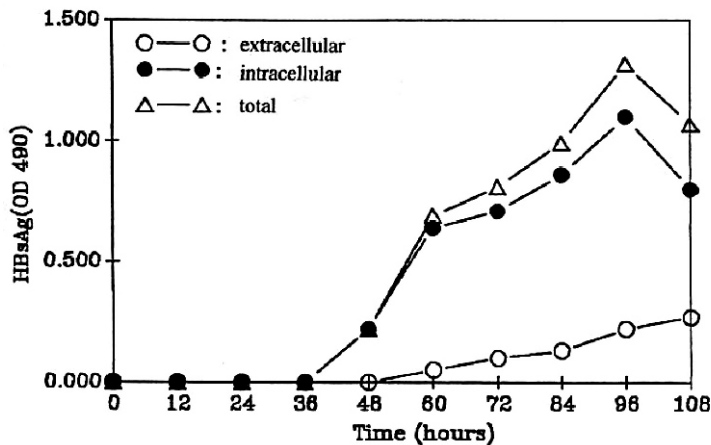
圖七 注射重組病毒液之五齡家蠶血液中HBsAg之生產曲線

Fig. 7. Production curve of HBsAg in the 5th silkworm hemolymph injected with BmHBs324P.

四、HBsAg在細胞株中之增殖

細胞感染重組病毒後，每隔 12 小時取培養液及細胞分別測其 HBsAg 含量。在培養液中，於接種後 60 小時開始反應，所得吸光值 0.05，72 小時後開始增加，吸光值增至 0.10，至 108 小時達最高量，吸光值為 0.27。細胞以超音波打

碎，以 ELISA 測其細胞內 HBsAg 含量，在接種後 48 小時 HBsAg 含量急速增加，吸光值為 0.22，於接種後 96 小時達最高量，吸光值為 1.10。兩者比較可發現不論於任何時間，細胞內 HBsAg 含量皆比細胞外的含量多數倍至數十倍(圖八)。



圖八 家蠶BmN細胞株HBsAg生產曲線

Fig. 8. Production curve of HBsAg in the BmN cells injected with BmHBs324P.

討 論

一、重組核多角體病毒感染家蠶病徵

家蠶感染核多角體病毒，在初期健康蠶無明顯差異，經過三至四天後，開始食慾減退，然後停止取食，節間腫脹，皮膚呈油亮光澤，幼齡尤明顯，爬行於蠶座四週，而掉落地面，至末期皮膚破裂，流出乳白色膿汁，因而有膿病之稱。此膿汁在光學顯微鏡下可觀察到大量多角體，由於本病的潛伏期約為5~7天(有賀，1980；呂，1981；陳及侯，1980)，故此時可在血液中形成大量多角體。重組核多角體病毒，以皮下接種方式感染家蠶，其病徵與感染野生株病毒類似，同樣為食慾減退，節間腫脹，兩者不易分辨。但發病時不若感染野生株病毒者，至末期行為焦躁，在蠶座中劇烈爬行，常常掉落地面，流出乳白色膿汁，僅不安的在蠶座中游走，斃死前口吐黃綠色消化液。造成兩者間差異的原因可能與感染後組織的崩解有關，若採其體液做比較，可發現感染重組病毒之家蠶體液呈黃棕色，與健康蠶體液類似，沉澱物少；而感染野生株病毒的家蠶，體液呈乳白色，且有大量沉澱物，兩者間差異明顯。感染野生株病毒的細胞病變為細胞感染後15小時，核變大，核仁消失，病毒發生基質(virogenic stroma, VS)形成；20小時後，VS擴大，VS與核膜間環區(ring zone, RZ)明顯。感染30小時，RZ處有初期多角體觀察到，隨多角體形成VS逐漸變小；感染40小時，大形多角體充滿細胞核(林及岩下，1990)。隨感染之增進，核漸漸腫脹至充滿整個細胞，最後細胞破

裂散出多角體(Vail and Jay, 1973)。因此，重組病毒與野生株病毒感染家蠶在病徵上的差異，可能與重組病毒不產生多角體，而使家蠶在感病後組織細胞崩解程度較低有關。筆者曾利用以p10基因為載體構築之含B型肝炎表面抗原基因重組家蠶核多角體病毒感染家蠶(呂，1992)，因其具有多角體，故其感染後表現的病徵，與感染野生株病毒相同。

二、重組病毒感染家蠶之組織觀察

重組病毒感染家蠶時，由於多角體基因已被置換為B型肝炎表面抗原蛋白基因，所以感染後不產生多角體，採用多角體染色方法(Hamm, 1966)無法判定其感染。所以採用酵素抗體法，利用抗體與重組病毒產物反應，亦即B型肝炎表面抗原蛋白，再利用受質與抗體上之酵素呈色，如diaminobenzidine, DAB，可測得被感染組織呈正反應(韓及渡部，1987; Volkman and Goldsmith, 1981)。本試驗以此方法染色，對已感染重組病毒並產生HBsAg者呈現黃褐色。本試驗在48小時可於真皮細胞及脂肪體測得HBsAg的正反應。以此推論病毒感染48小時後，應已進入多角體蛋白複製階段。陳(1979)報告，家蠶經口接種野生株病毒，48小時可在脂肪體及真皮細胞等感受性組織發現細胞核腫脹，證明病毒在複製，但未觀察到多角體的產生。本試驗與陳(1979)之間的差異，應是經口感染與經皮下感染之間的差異，因為經口感染者，為多角體透過食物的攜帶，進入中腸經中腸液的分解，釋出桿狀病毒粒子，穿過中腸進入體腔開始感染各組織，此感染模式與本試驗經皮下

感染方式，在時間上應視為相同的。本試驗在接種 72 小時可在氣管皮膜、中腸細胞、及在馬氏管內壁上測得 HBsAg 正反應。在 96 小時後可發現真皮細胞及氣管皮膜開始崩解。此與感染野生株相同。但在絲腺、肌肉、神經細胞、馬氏管等並無發現。陳 (1979) 報告，絲腺、肌肉、神經細胞、馬氏管等組織，在感染後 120 小時後方可發現多角體，本試驗在這些組織上未發現，可能原因為在接種後 96 小時蠶體已斃死，無法繼續測至 120 小時以證實這些組織是否有感染，或者這些組織有感染病毒，只是未到複製 B 型肝炎表面抗原蛋白基因階段，細胞已死亡。又或因病毒經重組後對這些組織親和力改變，則有待日後探討。在感染重組病毒後組織的崩解現象，除真皮及氣管皮膜外，其他組織並不明顯，且崩解的組織其細胞並未破碎。此與感染野生株病毒組織崩解，細胞破碎不同 (段等, 1994; 陳, 1979)，此可能因不形成多角體有關，同時也可能是造成病徵不同的原因。

三、HBsAg 在蠶體中及細胞株的增殖

重組核多角體病毒，BmHBs324P，其產物 HBsAg 在家蠶體及細胞中的增殖，均在接種 60 小時後開始測得，至 108 小時測得最高產量。Maeda *et al.* (1987) 利用重組病毒生產人類 α -interferon; Marumoto *et al.* (1987) 利用重組病毒生產 insulin-like growth factor II (IGF II) 蛋白，其增殖情形皆為 48 小時開始增加，96 小時達最高。Price *et al.* (1989) 利用重組病毒和野生株病毒混合感染生產 HBsAg 其增殖情形亦如此。本

試驗結果所測得的 HBsAg 比前述學者約晚 24 小時，乃因本試驗只取體液檢測，若比較細胞株所測得結果，發現胞內胞外 HBsAg 量差異甚大，且細胞內含量遠比細胞外含量高。前述組織病變的觀察亦發現，至發病末期若干組織崩解不明顯，且崩解的組織其細胞並未破碎，因而可證明只取罹病家蠶體液測 HBsAg 含量，其 HBsAg 值偏低，若將全蠶打碎，應可取較多量的 HBsAg。因此可證明以置換多角體蛋白基因來生產異源蛋白，在目的蛋白質的收集上應開發新技術，以收取更多量的標的蛋白。

誌 謝

本文承蒙國家科學委員會及農業委員會經費補助，在此一併誌謝。

引用文獻

- 川瀨茂實。1990。カ - の核多角体病ウイルス - 最近の研究を中心に -。日蚕雜 59:387-401。
- 有賀久雄。1973。核多角体病。昆學病理學汎論。養賢堂發行。pp. 77-223。
- 有賀久雄。1980。核多角体病。新編養蚕學大要。養賢堂發行。pp. 225-234。
- 呂鴻聲。1981。昆蟲病毒與昆蟲病毒病。科學出版社。中國北京。pp. 44-93。
- 呂燕芬。1992。家蠶核多角體病毒 p10 基因之核苷酸定序及置換載體之構

- 築。國立中興大學碩士論文。
- 林玉清、岩下嘉光。1990。カイコ培養細胞Bm-N株における核多角体病ウイルスの感染、増殖。日蚕雜 59:452-460。
- 洪秀妙。1989。家蠶核多角體病毒置換載體之構築。國立中興大學碩士論文。
- 段淑人、高穗生、鄭朵智。1994。台灣甜菜夜蛾核多角體病毒形態與致病力之研究。中華昆蟲 14:33-45。
- 陳瑞山。1979。家蠶核多角體病及其致病因子之研究。國立中興大學碩士論文。
- 陳瑞山、侯豐男。1980。本省家蠶核多角體病組織病理學之研究。科學發展月刊 8:329-337。
- 前田 進。1984。カイコの核多角体病ウイルスのプラク法による定量とウイルスのクロニング。日蚕雜 53:547-548。
- 韓明世、渡部 仁。1987。家蚕の母蛾検査における微孢子虫類孢子に酵素抗体法による識別法。日蚕雜 56:431-435。
- Griffiths, C. M., and M. J. Page.** 1997. Production of heterologous proteins using the baculovirus/insect expression system. *Methods Mol. Biol.* 75:427-40.
- Hamm, J. J.** 1966. A modified Azan staining technique for inclusion body virus. *J. Invertebr. Pathol.* 8:125-126.
- Lewis, R.** 1989. Baculovirus for biocontrol and biotech a scourge silkworm become a boon to biotechnologist. *BioScience* 39:431-434.
- Luckow, V. A., and M. D. Summers.** 1988. Trends in the development of baculovirus express vectors. *Biotechnology* 6:47-55.
- Maeda, S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horiuchi, Y. Saeki, Y. Sato, and M. Furusawa.** 1985. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* 315:592-594.
- Martignoni, M. E., and P. J. Iwai.** 1981. A catalogue of viral disease of insect, mite and ticks. *In: Microbial control of pests and plant disease 1970-1981.* (H. D. Burces, ed.), pp. 897-911. London: Academic Press.
- Marumoto, Y., Y. Sato, H. Fujiyama, K. Sakano, Y. Saeki, M. Agata, M. Furusawa, and S. Maeda.** 1987. Hyperproduction of polyhedron-IGF II fusion protein in silkworm larvae infect with recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen Virol.* 68:2599-2606.
- Miyajima A., J. Schreurs, K. Otsu, A. Kondo, K. Aral, and S Maeda.** 1987. Use of the silkworm, *Bombyx mori* and an insect baculovirus vector for high-level expression and secretion of biologically active mouse interleukin-3. *Gene* 58:273-281.
- O'Reilly, D. R., L. K. Miller, and V. A. Luckow.** 1992. Virus structure and the

infection process. *In: Baculovirus Expression Vectors a Laboratory Manual*. pp.3-11. New York: W. H. Freeman and Company.

Price, P. M., C. F. Feichelderfer, B. E.

Johansson, E. D. Kilbourne, and G. Acs. 1989. Complementation of recombinant baculovirus by coinfection with wild-type virus facilitates production in insect larvae of antigenic proteins of hepatitis B virus and influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1453-1456.

Smith, G. E., M. D. Summers, and M. J.

Fraser. 1983. Production of hummam beta interferon in insect cells infected with a baculovirus express vector. *Mol. Cell. Biol.* 3:2156-2165.

Summers, M. D, and G. E. Smith. 1987. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture. Texas Agricultural Experiment station Bulletin No. 1555.

Vail, P. V., and D. L. Jay. 1973. Pathology of nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper in alternate host. *J. Invertebr. Pathol.* 21:198-204.

Volkman, L. E., and P. A. Goldsmith.

1981. Baculovirus bioassay not dependent upon polyhedra production. *J. Gen. Virol.* 56:203-206.

收件日期：2007年7月17日

接受日期：2007年8月14日

Infection of Silkworm Larvae with the Recombinant *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus Containing Hepatitis B Surface Antigen Genes

Kuang-Miao Chang¹, Shu-Jen Peng¹, and Roger F. Hou^{2*}

¹ Miaoli District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan, Miaoli, Taiwan, R.O.C.

² Department of Entomology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

After injecting with the recombinant *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV), BmHBs324P, which contains hepatitis B surface antigen (HBsAg) genes driven by polyhedrin promoter, the silkworm larvae did not show apparent symptom of infection at the initial stage. Later, the infected larvae ceased feeding and their inter-segmental membranes became swollen 72 hours after injection. The infected larvae moved around the rearing seat and died 96 hours after injecting antigen (HBsAg). The diseased larvae vomited the digestive fluid before death. The hemolymph of the larvae became light brown in color. Staining with indirect immuno-enzymatic staining method, we found that the susceptible tissues to this recombinant virus included epidermal cells, tracheal matrix, fat body cells, hemocytes and gut cells. The HBsAg production in hemolymph was measured after injecting BmHBs324P into 5th instar larvae, the production curve was going up 60 hours after injection and reached the maximum 108 hours after injection. The production of the extra cellular HBsAg in BmN cells was similar to the produced of HBsAg in the hemolymph of the injected silkworm, but the intracellular HBsAg increased from 48 hours after injection, and reached the peak at 96 hours after injection. The amount of produced intracellular HBsAg was three-fold higher than the amount of intercellular HBsAg produced. Therefore, most of the produced HBsAg was not released from the infected cells.

Key word: silkworm, nuclear polyhedrosis virus, hepatitis B surface antigen.

*Corresponding author. e-mail: rhou@dragon.nchu.edu.tw