

探討利用 PCR 技術鑑別遺傳工程庫斯蘇力菌 EG7841 菌株

謝玉貞^{1*} 林芳妘¹ 蔡韙任¹

摘要

謝玉貞、林芳妘、蔡韙任。2018。探討利用 PCR 技術鑑別遺傳工程庫斯蘇力菌 EG7841 菌株。臺灣農藥科學 5：75-89。

蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*) 為全世界最常使用之生物農藥，內含的殺蟲結晶蛋白分別對某些鱗翅目、雙翅目和鞘翅目昆蟲具有毒效，是一種已發展成熟且被廣泛使用的微生物殺蟲劑。目前在臺灣登記上市的多種蘇力菌生物農藥產品，又可分成庫斯蘇力菌 (*Bt* subsp. *kurstaki*, *Btk*) 和鮎澤蘇力菌 (*Bt* subsp. *aizawai*, *Bta*)，但其中有一 *Btk* EG7841 菌株產品是屬於遺傳工程蘇力菌。本研究針對此菌株設計 BTSS-F4 與 BTSS-R2 專一性引子對，利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 進行檢測分析，並針對 9 種不同品系蘇力菌，包括 *Btk* EG2371、*Btk* ABTS351、*Btk* SA12、*Btk* E911、*Bta* GC91、*Bta* ABTS1857、*Bta* NB200、*Btk* SA11 和 *Btk* EG7841 菌株，進行 PCR 分析。結果此專一性引子對，僅對 *Btk* EG7841 增幅出特異性的 858 bp 核酸片段，而其他品系蘇力菌菌株則無，顯示此專一性引子對可用來快速檢測該特定菌株遺傳工程基因片段。利用此引子對進行田間十字花科甘藍葉及土壤樣本中 *Btk* EG7841 菌 PCR 檢測，結果顯示噴施 *Btk* EG7841 菌株後 1 個月仍可於甘藍葉及土壤測得 *Btk* EG7841 遺傳工程基因片段 (858 bp)，於第 63 天則無檢出。另在臺灣中部地區採集田間土壤，進行該菌株之 *Btk* EG7841 遺傳工程基因片段環境流佈調查，分析 100 處土壤樣本，結果有 30 個樣本檢出蘇力菌基因片段，但均尚未檢出 *Btk* EG7841 遺傳工程基因片段。未來可利用此檢測方法，持續監控此菌株於環境中流佈之情形。

關鍵詞：蘇力菌、聚合酶連鎖反應、遺傳工程、殺蟲結晶蛋白質、*cryIC* 基因

接受日期：2019 年 3 月 22 日

* 通訊作者。E-mail: ych@tactri.gov.tw

¹ 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

緒言

蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*) 首先在西元 1901 年被日本人 Ishiwata 在家蠶 (*Bombyx mori*) 幼蟲中發現，於 1954 年證實蘇力菌內含的殺蟲晶體蛋白 (Insecticidal crystalline protein, ICP) 具有殺蟲活性^(2, 3, 7)。目前非化學性農藥防治害蟲之商品，就以生物農藥殺蟲劑的蘇力菌最廣泛使用⁽¹²⁾。根據聯合國糧農組織/世界衛生組織 (FAO/WHO) 所組成之食品標準委員會 (Codex Alimentarius Commission, Codex) 及歐盟法規對「基因改造生物」(Genetically Modified Organism, 簡稱 GMO) 之定義為：「基因改造生物」是指基因遺傳物質被改變的生物，其基因改變的方式係透過基因技術，而不是以自然增殖及/或自然重組的方式產生。美國環保署 (USEPA) 針對農用基因改造微生物定義「新微生物 (new microorganism)」是指「屬間微生物 (intergeneric microorganism)」，也就是受體微生物被轉入來自不同屬生物之基因者；但若只是插入已知且為非編碼的調控區 (well-characterized, noncoding regulatory regions)，即便該遺傳物質是來自不同屬生物，此基因改造微生物也不是新微生物^(1, 5)。我國衛生福利部食品藥物管理署 99 年發布之「基因改造食品之安全性評估方法」法規中對「基因改造」之定義為：係指使用基因工程或分子生物技術，將遺傳物質植入活細胞或生

物體，產生基因重組現象，並使之增殖的相關技術；但不包括傳統育種、細胞及原生質體融合、雜交、誘變、體外受精、體細胞變異及染色體倍增等技術。而本國基因改造生物性農藥之安全管理乃透過嚴謹的農藥登記審查機制，農藥登記上市必須符合行政院農業委員會所頒布的「農藥理化性及毒理試驗準則」。

目前在全球以美國核准基因工程技術蘇力菌產品較多，如 Ecogen/Certis 公司 1998 年 RavenTM (*Btk* EG7673)、Crymax[®] (*Btk* EG7841) 及 LepinoxTM (*Btk* EG7826) 等研發製造⁽⁵⁾。臺灣微生物殺蟲劑登記至 2018 年 7 月許可證張數共 20 張，蘇力菌佔 19 張，分屬於 9 個品系。我國農藥管理法允許基因改造之生物農藥申請登記，其中 *Btk* EG7841 為目前臺灣唯一登記之遺傳工程蘇力菌。*Btk* EG7841 菌株構築過程 (附錄圖一)，*Btk* EG7841 源自野生庫斯蘇力菌 (*Bt* subsp. *kurstaki*, *Btk*) EG3125 內含 *cryIAC* (x1) 質體，與另一株 *Btk* EG4923 內含 *cryIAC* (x2) 和 *cry2A* (x1) 毒蛋白基因，經接合 (trans-conjugation) 成 *Btk* EG4923 *cryIAC* (x3)、*cry2A* (x1)，再與野生鮎澤蘇力菌 (*Bt* subsp. *aizawai*, *Bta*) EG6346 之 *cryIC* (x1) 毒蛋白基因重組成新的質體 (pEG935)，此質體再經由電穿孔方式轉入至蘇力菌 EG4923 內，變成內含有 *cryIAC* (x3)、*cry2A* (x1) 和 *cryIC* (x1) 毒蛋白基因^(4, 8, 9, 10) 之 *Btk* EG7841 遺傳工程蘇力菌菌株，產品由美國 Ecogen/Certis 生產製造，命名

Crymax[®]。pEG935 質體構築方式 (附錄圖二) 主要包含四個部分重組而成, (1): 複製起始點 (ori60, replication origin) 來自於 *Btk* HD263 菌株; (2): 內部分割位點 (IRS, internal resolution site) 來自於 *Bt* subsp. *morrisoni* EG2158 菌株; (3): 轉錄終結子 (ter, Transcription terminator) 來自於 *Bta* EG6346 菌株之 *cryIF* 基因; (4): 殺蟲結晶蛋白質 (ICP, Insecticidal crystalline protein) 之 *cryIC* 基因來自於 *Bta* EG6346 菌株, 利用遺傳工程技術將這些核酸片段, 構築成為 pEG935 質體, 為非自然界存在的質體, 是經遺傳工程技術重組而成基因改造蘇力菌, 具有增加防治鱗翅目幼蟲效果⁽¹¹⁾。臺灣嘉農公司 1998 年 11 月取得 Crymax[®] 登記證, 商品名為高招, 目前未見有針對上述蘇力菌菌株進行專一性檢測方法, 及 20 年來該菌株在環境中之流佈情形, 尚無研究調查, 本研究基於以技術支援行政管理之需要, 積極建立該基因重組蘇力菌菌株 *Btk* EG7841 之檢測平臺技術, 並進行該菌株在田間環境流佈之監測與調查。

材料與方法

一、蘇力菌菌株收集與基因體核酸萃取

本研究針對國內 19 種蘇力菌商品, 分屬於 2 亞種庫斯蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *Btk*) 和鮎澤蘇力

菌 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, *Bta*), 9 品系之蘇力菌菌株進行測試, 試驗所使用的國內蘇力菌樣本來源, 其菌種、菌株、有效成分、來源、代理廠商及商品名, 分別為:

- Btk* EG2371, 16,000 IU/mg, Ecogen/Certis Crop. USA, 嘉農, 獨佳
- Btk* ABTS351, 16,000 IU/mg, Valent Bioscience Crop. USA, 住友化學, 新大寶
- Btk* SA12, 16,000 IU/mg, Ecogen/Certis Crop. USA, 嘉農, 速利殺
- Btk* E911, 30,000 DBMU/MG, Fuso Crop. Taiwan, 福壽, 速力寶
- Bta* GC91, 25,000 IU/mg, Ecogen/Certis Crop. USA, 優必樂, 美國一雙倍贊
- Bta* ABTS1857, 35,000 DBMU/MG, Valent Bioscience Crop. USA, 住友化學, 見達利
- Bta* NB200, 15,000 IU/mg, Valent Bioscience Crop. USA, 住友化學, 福祿寶
- Btk* SA11, 16,000 IU/mg, Ecogen/Certis Crop. USA, 嘉農, 尚賜配
- Btk* EG7841, 16,000 IU/mg, Ecogen/Certis Crop. USA, 嘉農, 高招

挑選單一菌落培養於 5 mL 的 LB (Luria-Bertani) 液體培養基, 於培養箱 25 °C 培養箱以轉速 150 rpm 振盪培養 24 小時, 得到增殖培養的菌液⁽¹³⁾, 利用 Genomic DNA Mini Kit (Lab Prep, Taipei, Taiwan), 參照革蘭氏陽性菌之萃取步驟

操作萃取純化蘇力菌全基因體核酸。將所萃取純化後之蘇力菌全基因體核酸保存於-20°C冰箱備用。

二、引子設計

依 Kalman 等人 (1993) 之報告⁽⁶⁾，合成分析蘇力菌不同 *cry* 基因之引子對。參考美國 Patent Number: 5441884⁽⁸⁾、5776449⁽⁹⁾、5804180⁽¹⁰⁾、5942664⁽¹¹⁾及 GenBank U03554 序號的 *Bacillus thuringiensis* serovar *morrisoni* EG2158 transposon Tn5401 ORF2, ORF1 序列，設計針對 *Btk* EG7841 菌株之專一性引子對 (表一)。

三、聚合酶連鎖反應

聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)：每支反應管含：250 μ M dNTP's mix、1.0 μ M primer mix、0.2~0.6

μ g genomic DNA、0.125 U Super Tag DNA polymerase (Protech, Taipei, Taiwan)，反應總體積 50 μ L，放入 200 μ L 微量離心管。將配製完成之反應混合液，置於 PCR 熱循環儀 (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, USA) 反應。增幅 *cryIAa* 基因之 PCR 反應條件：於 94°C 預熱 5 分鐘，以 94°C 變性 (denaturation) 30 秒；55°C 煉合 (annealing) 30 秒；72°C 延展 (extension) 30 秒，共進行 35 個循環反應，之後續進行 72°C 最終延展 (final extension) 7 分鐘，及溫度降至 4°C 保存，增幅 721 bp 片段。增幅遺傳工程基因片段之 PCR 反應條件：於 94°C 預熱 5 分鐘，以 94°C 變性 30 秒；61°C 煉合 30 秒；72°C 延展 30 秒，共進行 35 個循環反應，之後續進行 72°C 最終延展 (final extension) 7 分鐘，及溫度降至 4°C 保存狀態，增幅 800~870 bp 片段。

表一、檢測蘇力菌及 *Btk* EG7841 菌株之專一性引子對

Table 1. Specific primer pairs used to detect strains of *Bacillus thuringiensis*, including *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstki* EG7841

Target	Primers	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)
<i>cryIAa</i> gene ⁽⁶⁾	TY1AA	GAGCCAAGCTGGAGCAGTTTACACC	721
	TYIUNI2	ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC	
Genetic engineering fragment	BTSS-F4	CCGATCCGTCGACTCTAG	858
	BTSS-R2	CATGTTTTCCCCACA CATTTC	

四、聚合酶連鎖反應產物核酸片段分析與定序

PCR 反應物，以內含有 3 μ L 溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) (0.5 μ g/mL) 之 1.0% TBE 瓊膠電泳分析⁽¹³⁾，後續將預期片段利用核酸膠體萃取套組 (Axy-Prep DNA Extraction Kit, Axygen, Union City, USA) 進行核酸片段膠體純化回收，並由明欣生物科技有限公司 (臺北，臺灣) 利用 DNA 自動分析儀完成定序工作。解序完成的核酸序列使用 NCBI 網站中的 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 系統，比對 GenBank 中所發表序列的相似度，確認是否為蘇力菌的核酸序列。

五、田間模擬殘留消退試驗偵測蘇力菌 *Btk* EG7841 遺傳工程基因片段

於臺中市霧峰區農業藥物毒物試驗所試驗田進行，田區規劃為二個試驗區，每區畦寬 1 m，長 2 m，種植 5 株甘藍，定植 2 個月後，處理區每週噴灑一次稀釋 1500 倍之高招蘇力菌 (*Btk* EG7841)，共 4 次，另對照區不施藥。於最後一次施藥後間隔 30 天，進行第一次二個試驗區的畦面土壤及甘藍葉片採樣，土壤樣本採自在甘藍周圍三處地表下 0-15 cm 土壤，每處各約 5 克土壤混合均勻，秤取土樣 0.25

克，使用 PowerSoil DNA isolation Kit (MO BIO, Carlsbad, USA) 萃取土壤樣本全基因體 DNA，另與兩株甘藍採取全部外圍葉片供試；甘藍外葉 2.5 克，以 7.5 mL 無菌水震盪 1 分鐘，取 4.5 mL 洗液使用 PureLink Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) 萃取葉表面洗液之全基因體 DNA，進行蘇力菌 *Btk* EG7841 遺傳工程基因片段殘留檢測分析。第一次採樣後將甘藍收成，並將二個試驗區進行翻土，於第 63 天進行第二次土壤採集及分析，之後以前述之 PCR 檢測是否有蘇力菌 *Btk* EG7841 遺傳工程基因片段存在。

六、田間環境流佈調查之蘇力菌 EG7841 遺傳工程基因片段偵測試驗

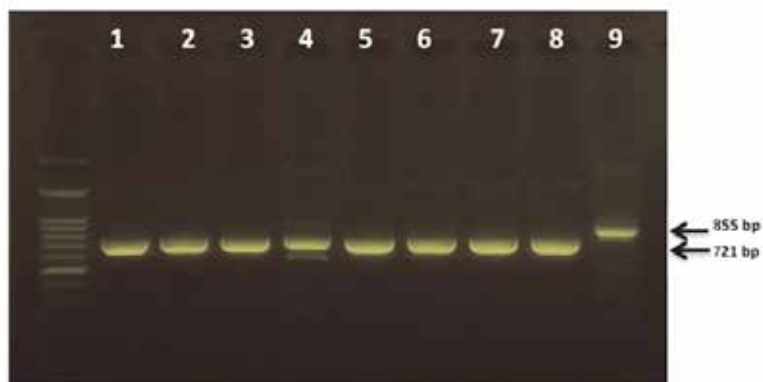
以同上土壤採樣方法，進行田間環境流佈調查，包含有機蔬菜區 (彰化縣永靖鄉、員林鎮，台中市新社區，南投縣名間鄉、草屯鎮及埔里鎮)，採集蔬菜田畦面土壤 22 處樣品、慣行栽培田區 (台中市大里區、霧峰區，嘉義縣太保，雲林縣土庫)，採集 53 處樣本及沿海地區 (苗栗縣通霄鎮、後龍鎮、竹南鎮，台中市清水區，彰化縣芳苑鄉，嘉義縣布袋鎮)，採集潮間帶土壤 25 處樣本，共 100 處土壤樣本，每處樣本混合均勻各取 0.25 克進行核酸萃取，使用 PowerSoil DNA isolation Kit (MO BIO, Carlsbad, USA) 萃取土

樣之全基因體 DNA，以 TY1AA/TYIUNI2 引子對，先測試是否有蘇力菌基因片段存在，後續再以專一性 BTSS-F4/BTSS-R2 引子對來檢測是否帶有 *Btk* EG7841 遺傳工程基因片段。

結果與討論

利用 PCR 方法以 TY1AA/TYIUNI2 引子對⁽⁶⁾，先進行 9 種不同品系蘇力菌菌株 PCR 分析，結果 *Btk* EG2371、*Btk* ABTS351、*Btk* SA12、*Btk* E911、*Bta* GC91、*Bta* ABTS1857、*Bta* NB200、*Btk* SA11 和 *Btk* EG7841 等，皆可增幅出長度 721 bp 預期為 *cry* 1Aa 基因的核酸片段(圖一)，並經定序分析確認為 *cry*1Aa 基

因，其核酸相似度 99% (713/715 bp)。但是在 *Btk* EG7841 樣品卻同時增幅出 2 條核酸片段，除 721 bp 外，另有 855 bp (圖一)，此 855 bp 的核酸片段定序分析後，確認為 *Btk* EG7841 菌株內另一個非基改構築質體中的一部分序列，但是經過反覆的 PCR 試驗，發現此 855 bp 核酸片段的再現性不佳，使用不同廠牌聚合酶醱素進行 PCR 反應，亦發現會影響其再現性，惟不影響 721 bp 片段增幅之結果。由 TY1AA/TYIUNI2 引子所增幅之 855 bp 的核酸片段，經過定序分析並以 GenBank 的 BLAST 系統進行序列比對，發現與 CP003755 序號 *Bacillus thuringiensis* HD-771 (plasmid p03, complete sequence) 之前段核酸序列第 15-578 bp 相似性 99% (560/564 bp)，後



圖一、利用 TY1AA/TYIUNI2 引子對⁽⁶⁾，進行 9 種不同品系蘇力菌之 PCR 分析結果。行 1-9: *Btk* EG2371、*Btk* ABTS351、*Btk* SA12、*Btk* E911、*Bta* GC91、*Bta* ABTS1857、*Bta* NB200、*Btk* SA11 及 *Btk* EG7841。

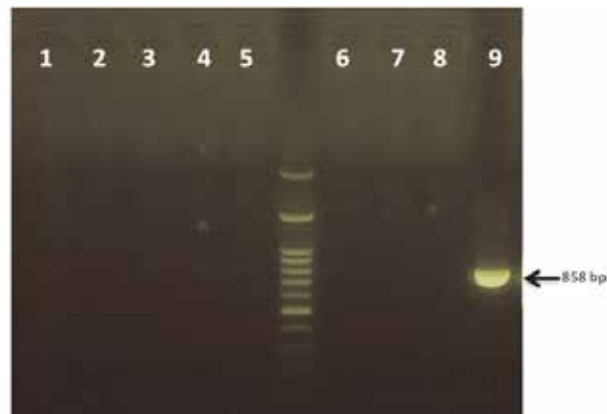
Fig. 1. Results of PCR performed on nine *Bacillus thuringiensis* strains, using the TY1AA/TYIUNI2 primer pairs⁽⁶⁾.

Lanes 1-9: *Btk* EG2371, *Btk* ABTS351, *Btk* SA12, *Btk* E911, *Bta* GC91, *Bta* ABTS1857, *Bta* NB200, *Btk* SA11, and *Btk* EG7841, respectively.

段核酸序列第 602-855 bp 相似性 92% (234/254 bp)，其基因序列依序為 (1) unknow gene fragment 第 1-15 核酸位點 (15 bp)、(2) *cryIAa* gene fragment 第 16-268 核酸位點 (253 bp)、(3) unknow gene fragment 第 269-291 核酸位點 (22 bp)、(4) TnpI resolvase gene fragment 第 292-855 核酸位點 (563 bp)，而且其兩個基因中間有 22 bp 無法比對之連續性基因序列核酸片段。另將 721 bp 片段與 855 bp 片段互相比對其核酸相似性，只有 61% 相似，表示非同一個基因核酸序列，故此 TY1AA/TYIUNI2 引子對，並不適合做為偵測基因重組蘇力菌株 *Btk* EG7841 之單一工具。

因此，又另行設計專一性引子，以遺

傳工程蘇力菌株 *Btk* EG7841 之 pEG935 重組基因質體核酸序列為目標基因，參考 GenBank U03554 序號的 *Bacillus thuringiensis* serovar *morrisoni* EG2158 transposon Tn5401 ORF2, ORF1 序列，找尋出可區別其他蘇力菌的差異，經反覆測試之結果，改良設計出 BTSS-F4/BTSS-R2 引子對。將此 BTSS-F4/BTSS-R2 引子對與 9 種不同品系蘇力菌菌株進行 PCR 反應結果 (圖二)，顯示此引子對只對 *Btk* EG7841 增幅出特定長度 (約 858 bp) 的核酸片段，對其他 *Btk* EG2371、*Btk* ABTS351、*Btk* SA12、*Btk* E911、*Bta* GC91、*Bta* ABTS1857、*Bta* NB200 和 *Btk* SA11 則無增幅出任何的核酸片段產物。此引子對所



圖二、利用 BTSS-F4/BTSS-R2 引子對，進行 9 種不同品系蘇力菌菌株之 PCR 分析結果。

行 1-9: *Btk* EG2371、*Btk* ABTS351、*Btk* SA12、*Btk* E911、*Bta* GC91、*Bta* ABTS1857、*Bta* NB200、*Btk* SA11 及 *Btk* EG7841。

Fig. 2. Results of PCR performed on nine *Bacillus thuringiensis* strains using the BTSS-F4/BTSS-R2 primer pairs.

Lanes 1-9: *Btk* EG2371, *Btk* ABTS351, *Btk* SA12, *Btk* E911, *Bta* GC91, *Bta* ABTS1857, *Bta* NB200, *Btk* SA11, and *Btk* EG7841, respectively.

增幅的核酸片段定序結果 (圖三) 所示，利用 GenBank 的 BLAST 系統進行序列比對，結果與 GenBank KJ024807 序號 *Bacillus* phage (vB_Bts_BMBtp3, complete genome) 核酸序列相似性 99% (816/820 bp)，基因序列依序為 (1) integrase-recombinase protein partial gene fragment 第 001-162 核酸位點 (162 bp)、(2) unknow gene fragment 第 163-318 核酸位點 (155 bp)、(3) hypothetical protein gene fragment 第 319-576 核酸位點 (257 bp)、(4) RelE/stbE replicon stabilization toxin gene fragment 第 545-808 核酸位點 (263 bp)、(5) putative recombination protein U partial

Primer (R): BTSS-R2 integrase-recombinase protein partial gene (1-162)

001 CATGTTTCC CCACACATTT TGAACCAAA ATACAAAATC TTTTAAATCA CTCGTATATT

061 CTTTGTATGT TTTTGTATGC AAATCTCCTT CTTGAGATAA GCTAGAAATA AAATCGGAAA

unknow gene (163-318)

121 TCAAAGATGT TGCTTGATA GAAATTGTTT TAGTGGAAATG CATAAATACC TCCTCTTTTA

181 TTGACTTACA TTAGCGGACA TGATATTTTA ATCTTATCAA TTATGTTAGC GGACATCAAA

241 CATTATTTTT CCCACACTTC ATGTCCACTA ATATTAATTA GTGGACATTT AAAACTATCT

hypothetical protein gene (319-576)

301 CGAAAGTAGG AGTAACACAT GGCTATTTCGT AGAGATGAAT TGTATCGGTT AATTGATCAC

361 CTGGATCAAC AAGATGAAAA AGCAGCATTT GACTTTTTAG AATTTCTTGT TCAACGGTCA

421 AGAAGAAAA CTAAAGAATG GAAAAAATT GATATGGCAG ATCCTGATCA TGAACCGCTG

481 TCTACACAAG AGTTAGAACA GTTAAACAGT GAAGAAGGAT ATGTATCAGG GGAGGACGCA

RelE/stbE replicon stabilization toxin gene (545-808)

541 AAACGTGAAT TCGGACTACA AATTGATTTA CCATAAGTCC GCGTGAAAT TTATTGCAAA

601 GCAAGAAAA GGGATTCAAA AAAGAATTGC AGAAGGATTG AAGGGACTTC TTAAGATTCC

661 TCCTGAAGGG GATATTAATA GTATGAAAGG TTACACAGAA CTATATCGAT TACGGATTGG

putative recombination protein U partial gene (762-820)

721 AACCTTTCGA ATTTTATTG AAATAAATCA TGATGAGAAA GTCATATACA TACAAGCAAT

unknow gene (821-858)

781 TGGAAATCGT GGTGACATCT ATAAATAAAG CAAACATGCA GTCTAGAGGC CCGATCGGCC

841 CTAGAGTCGA CGGATCGG

Primer (F): BTSS-F4

圖三、利用 BTSS-F4/BTSS-R2 引子對 PCR，所增幅之 *Btk* EG7841 核酸片段序列。

Fig. 3. The nucleic acid fragment sequence of the *Btk* EG7841 strain was amplified by PCR using the BTSS-F4/BTSS-R2 primer pairs.

gene fragment 第 762-820 核酸位點 (58 bp)、(6) unknow gene fragment 第 821-858 核酸位點 (37 bp) (圖三)，依上述核酸定序分析比對之結果，可推測所增幅到特定長度 (約 858 bp) 的核酸片段為 *Btk* EG7841 遺傳工程基因中的一部份片段。

利用此引子對進行 *Btk* EG7841 遺傳工程基因片段殘留於田間甘藍之模擬消退試驗，經測試葉片及土壤樣本結果，處理後 1 個月植株葉片、土壤仍可測得 *Btk* EG7841 遺傳工程基因片段存在，但至第 63 天則不再檢出。延續 *Btk* EG7841 遺傳工程基因片段殘留於田間甘藍之模擬消退試驗之結果，在中部地區田間土壤蘇力菌 *Btk* EG7841 遺傳工程基因片段環境流佈調查結果，100 處樣本中，有 30 個樣本檢出含有蘇力菌基因片段，而均未測得 *Btk* EG7841 的遺傳工程片段 (表二)。在臺灣中部不同地區的採樣中，雖然 100 處樣本均尚未檢測出 *Btk* EG7841 遺傳工程基因片段，然而探討其原因，可能在使用上有機農業規定不得使用基改產品，而其他農民使用該產品機率不高，又因取樣不足而未測到，又在檢測技術上，只針對殘存於

植物葉表面及土壤中之基因片段進行 PCR 增幅測試，並未執行菌體先增殖再檢測，所以也可能殘存基因片段太少而測不到，並非不存在，此點以後可改進採集樣本方式及先經菌體培養階段再予檢測分析，以排除可能有極少量活菌體或孢子存在之可能。

謝辭

本研究承蒙行政院農委會「106 農科-6.3.3-藥-P1」計畫經費補助，又試驗期間蒙本所曾經洲博士實驗室提供不同品系蘇力菌市售商品、相關菌株資訊及沿海潮間帶土壤樣本，協助完成試驗研究，謹誌謝忱。

引用文獻

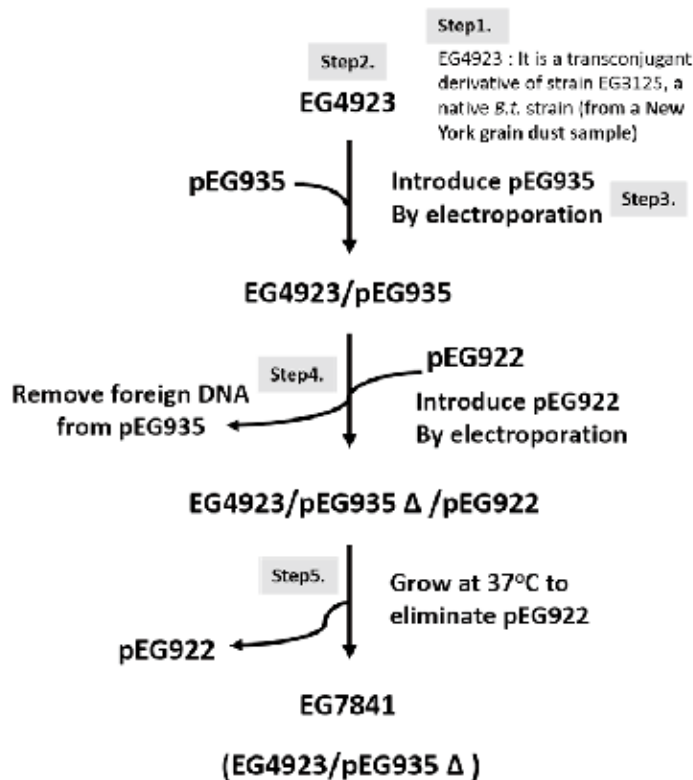
1. 臺灣經濟研究院生物科技產業研究中心。2013。美國農業基因改造微生物管理體系分析。取自 <http://www.biotaiwan.org.tw/download/structure4/%E4%BD%99%E7%A5%81%E6%9A%90/103/%E7%BE%>

表二、田間環境流佈 *Btk* EG7841 菌株蘇力菌之偵測結果

Table 2. Results of detection tests used to identify the presence of *Btk* EG7841 in soil

Soil types	TY1AA/TYIUNI2 primers (<i>Bacillus thuringiensis</i>)	BTSS-F4/BTSS-R2 primers (<i>Btk</i> EG7841 strain)
Organic farmland soil	4/22	0/22
Coastal area soil	6/25	0/25
Customary farmland soil	25/53	0/53
Total samples	30/100	0/100

- 8E%E5%9C%8B%E8%BE%B2%E7%94%A8%E5%9F%BA%E6%94%B9%E5%BE%AE%E7%94%9F%E7%89%A9%E7%94%A2%E5%93%81%E7%AE%A1%E7%90%86%E7%8F%BE%E6%B3%81%E5%88%86%E6%9E%90(201312).pdf
2. 郭雪。2007。臺灣植物葉表本土蘇力菌之篩選。國立嘉義大學農學研究所碩士論文。嘉義。108頁。
 3. 曾經洲。1997。蘇力菌臺灣分離株殺蟲基因之鑑定與選殖。國立中興大學昆蟲學系博士論文。臺中。141頁。
 4. Baum, J. A., Kakefuda, M., and Gawron-Burke, C. 1996. Engineering *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides with an indige-nous site-specific recombination system. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4367-4373.
 5. Wozniak, C. A., McClung, G., Gagliardi, J., Segal, M., and Mathews, K. 2012. Regulation of genetically engineered microorganisms under FIFRA, FFDCA and TSCA, pp. 57-94. *In: C. A. Wozniak & A. McHughen [eds.], Regulation of agricultural biotechnology: The United States and Canada.* Springer. 393pp.
 6. Kalman, S., Kiehne, K. L., Libs, J. L., and Yamamoto, T. 1993. Cloning of a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1131-1137.
 7. Nester, E. W., Thomashow, L. S., Metz, M., and Gordon, M. 2002. 100 years of *Bacillus thuringiensis*: a critical scientific assessment. American Academy of Microbiology, Washington D. C., USA. 18 pp.
 8. Patent Number: 5441884 (1995,8,15). *Bacillus thuringiensis* transposon TN5401. (Ecogen, Inc.)
 9. Patent Number: 5776449 (1998,7,7). Recombinant *Bacillus thuringiensis* strains, insecticidal compositions and method of use. (Ecogen, Inc.)
 10. Patent Number: 5804180 (1998,9,8). *Bacillus thuringiensis* strains showing improved of certain lepidopteran-toxin crystal proteins. (Ecogen, Inc.)
 11. Patent Number: 5942664 (1999,8,24). *Bacillus thuringiensis cryIC* composition insects and methods for making *cryIC* mutants. (Ecogen, Inc.)
 12. Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., and Christou, P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol. J.* 9: 283-300.
 13. Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 999 pp.



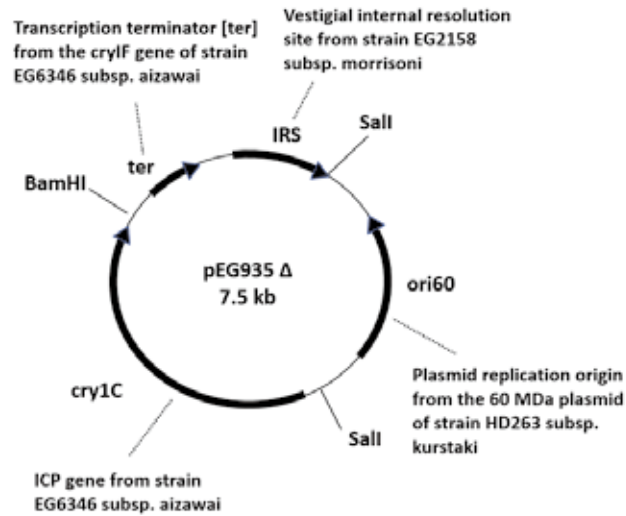
附錄圖一、遺傳工程庫斯蘇力菌 EG781 菌株構築流程。

- 步驟 1. 最原始菌株從美國糧倉粉塵樣本所分離，為庫斯蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstki*, *Btk*) EG3125 菌株，含毒蛋白基因 *cryIAC* (x1) 質體。
- 步驟 2. 取另一個庫斯蘇力菌 (*Btk*) 菌株之毒蛋白基因 (*cryIAC* (x2)、*cry2A*) 質體經接合 (trans-conjugation) 至庫斯蘇力菌 EG3125 菌株 (步驟 1)，變為庫斯蘇力菌 EG4923 菌株，同時內含蛋白基因 *cryIAC* (x1) 質體與毒蛋白基因 (*cryIAC* (x2)、*cry2A*) 質體。
- 步驟 3. 再將與含鮎澤蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, *Bta*) 毒蛋白基因 (*cryIC*) 經由遺傳工程技術重組而成新的質體 (pEG935，附錄圖二) 經電穿孔技術導入至庫斯蘇力菌 EG4923 菌株，變為 EG4923/pEG935 菌株。
- 步驟 4. 再利用電穿孔技術將 pEG922 質體導入，主要經由 TnpI recombinase 在細胞內專一性部位切除重組，移除 pEG935 質體之抗藥性基因 (tetracycline-resistance gene)。

步驟 5. 後續經由 37°C 反應，將 pEG922 質體消除，最後變為遺傳工程庫斯蘇力菌菌株 (EG7841)，同時內含蛋白基因 *cryIAC* (x1) 質體、毒蛋白基因 (*cry IAC* (x2)、*cry2A*) 質體與 *cryIC* (pEG935) 質體，故總內含毒蛋白基因為 *cryIAC* (x3)、*cry2A* (x1) 和 *cryIC* (x1)。

Appendix Fig. 1. The process employed to genetically engineer *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstki* EG7841.

- Step 1. The *BacillusThuringiensis* subsp. *kurstki* (*Btk*) EG3125 strain is isolated from the dust sample of a New York (United States) granary. Note that the EG3125 strain contains the toxic protein *cryIAC* (x1) plasmid.
- Step 2. The toxic protein (*cryIAC* (x2), *cry2A*) plasmid of the *Bacillus thuringiensis kurstki* strain was trans-conjugated to the EG3125 strain. The resulting *Btk* EG4923 strain contained both the toxic protein *cryIAC* (x1) plasmid and the *cryIAC* (x2), *cry2A* plasmid.
- Step 3. The new plasmid (pEG935, Appendix Figure 2), which had been recombined with the *Bacillus thuringiensis aizawai* (*Bta*) toxic protein gene (*cryIC*), was introduced into the EG4923 strain by electroporation. The resulting strain was named EG4923/pEG935.
- Step 4. The pEG922 plasmid was introduced by electroporation, and mainly used the TnpI recombinase from the specific part resection and reorganization in cell, and removed the tetracycline-resistance gene of pEG935 plasmid.
- Step 5. The pEG922 plasmid was eliminated by an incubation reaction at 37°C. The resulting *Btk* EG7841 strain contained the toxic *cryIAC* (x3), *cry2A*, *cryIC* plasmids.



附錄圖二、*Btk* EG7841 菌株之 pEG935 質體構築。

Appendix Fig. 2. The construction of the pEG935 plasmid in the *Btk* EG7841 strain.

Use of Novel Primers and PCR Technology to Identify Genetically Engineered *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstki* EG7841

Yu-Chen Hsieh^{1*}, Fang-Yun Lin¹, Wei-Ren Tsai¹

Abstract

Hsieh, Y. C., Lin, F. Y. and Tsai, W. R. 2018. Use of novel primers and PCR technology to identify genetically engineered *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstki* EG7841. Taiwan Pestic. Sci. 5: 75-89.

Bacillus thuringiensis is a biological insecticide that is among the most commonly used in the world. The insecticidal crystal protein it contains is toxic to certain lepidopteran, dipteran and coleopteran insects. At present, a variety of *Bacillus thuringiensis* bio-pesticide products are registered in Taiwan, and these products can be subdivided into *Bt* subsp. *kurstaki* (*Btk*) and *Bt* subsp. *aizawai* (*Bta*). Of these, *Btk* EG7841 is a genetically recombinant strain. In this study, we designed novel BTSS-F4 and BTSS-R2 primer pairs that can be employed to detect *Btk* EG7841 using polymerase chain reaction (PCR). To test the specificity of these primer pairs, nine strains of *Bacillus thuringiensis*, including *Btk* EG2371, *Btk* ABTS351, *Btk* SA12, *Btk* E911, *Bta* GC91, *Bta* ABTS1857, *Bta* NB200, *Btk* SA11, and *Btk* EG7841 were analyzed by PCR. Results of this analysis showed that the specific primers only successfully increased the specific nucleic acid fragment by 858 bp to the *Btk* EG7841 strain. This confirms that our proposed primer pairs can be used to quickly identify genetically engineered *Btk* EG7841 gene fragments. Hence it is applied to the establishment of the field gene environment distribution detection method. We then sought to determine whether the field gene distribution detection method could be used as a residual regression test to detect *Btk* EG7841 gene fragments in leaf and soil samples from cabbage fields. Results showed that, after spraying the cabbage field with *Btk*

Accepted: March 22, 2019.

* Corresponding author, E-mail: ych@tactri.gov.tw

¹ Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung

EG7841, *Btk* EG7841 gene fragments could still be detected in the leaf and soil samples within 1 month, but could not be detected on the 63rd day. In addition, 100 soil samples were collected from central Taiwan in order to perform an environmental flow investigation of *Btk* EG7841 gene fragments. Results of this investigation revealed that, although 30 samples contained *Bt*, genetically modified *Btk* EG7841 gene fragments were not found in any of the 100 samples. In the future, the methods for *Btk* EG7841 detection proposed in this study may be used to monitor the emergence of this strain in target areas.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Polymerase chain reaction, Genetic engineering, Insecticidal crystalline protein, *cryIC* gene