

# 台灣蘇力菌 *cryIAc5* 殺蟲基因選殖及表現

陳韋如<sup>1,2</sup> 李國欽<sup>1</sup> 高穗生<sup>1</sup> 曾耀銘<sup>2</sup> 曾經洲<sup>1\*</sup>

1. 台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所
2. 台中縣霧峰鄉 朝陽科技大學生物技術研究所

(接受日期：2006年3月22日)

## 摘 要

陳韋如、李國欽、高穗生、曾耀銘、曾經洲\* 2006 台灣蘇力菌 *cryIAc5* 殺蟲基因選殖及表現 植保會刊 48：17-30

以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術，對蘇力菌台灣分離株 D4-01，進行 *cryIAc* 型毒蛋白基因的全長增幅，隨後接入載體 yT&A，成為質體 p1AcTA1。由質體 p1AcTA1 與蘇力菌表現載體 pSB909.5，構築出可表現毒蛋白的質體 p1Ac5SB，並以電穿孔法送入無質體之蘇力菌 CryB 中，得到轉殖的蘇力菌株 1Ac5SB，並可測得 130 kDa 的毒蛋白產物。分析此選殖之 *cryIAc* 核酸序列與其編碼之胺基酸序列，發現在基因序列上與已知的 *cryIAc5* 基因最相似，僅 2 個鹼基之差異，而胺基酸序列方面則完全相同。轉殖株 1Ac5SB 具良好的殺蟲活性，以總蛋白濃度 25 ppm (有效成份蛋白表現量 11.75 ppm) 處理擬尺蠖 (*Trichoplusia ni*) 2 齡幼蟲，72 小時後，可得 60~80% 的致死率。等量處理小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 3 齡幼蟲，72 小時後，可達 80~90% 的致死率。

(關鍵詞：蘇力菌、*cryIAc5*、殺蟲基因、基因選殖及表現)

## 緒 言

近年來在農業害蟲的防治上，除了使用化學農藥外，也逐漸以蘇力菌微生物殺蟲劑輪替使用<sup>(9)</sup>。而近年國內積極推動綠色農業，不僅推廣吉園圃認證，更進而講究農業有機化，因此生物性農藥的需求逐漸增加，尤其是應用最多的蘇力菌

(*Bacillus thuringiensis*)，尋求基因品質優秀的菌株，是目前需積極研究的重點。為了獲致更有價值的蘇力菌株，我們持續地篩選菌株並運用分子生物技術鑑定其基因型態。目前已從台灣分離株 E9-11 中，選殖出一個全長 3.6 kb 的 *cryIAc15* 新基因，轉入 pSB909.5 載體中，並以電穿孔法送入無質體的蘇力菌宿主 CryB 中，發

\* 通訊作者。E-mail: cctzeng@tactri.gov.tw

現不需誘導即可表現出 130 kDa 的毒蛋白產物，此結晶蛋白對小菜蛾具有良好的毒效，對紋白蝶亦具良好的殺蟲的效果，且均較市售 Xentari 與 Delfin 之菌株為佳<sup>(3)</sup>；另亦從台灣分離株 G10-01A 中，選殖出全長 3567 bp 的 *cryICa9* 新基因，經表現得到 134.7 kDa 的毒蛋白產物，其對鱗翅目幼蟲具有毒效<sup>(13)</sup>。

利用基因重組技術，可完成 *cry* 型基因的選殖、定序及表現。除了發現新基因外，也能了解特定基因的活性。探討單一 *cry* 型基因產物之活性外，將來還可以將不同 *cry* 型基因轉殖株之產物混合或共轉殖，以比較單一成份與混合蛋白的殺蟲活性差異。期望能運用分子生物技術，補強傳統微生物研究之範疇，提昇蘇力菌應用研究的潛能，並將研究成果帶入實質的產業應用。

## 材料與方法

### *cry1Ac* 基因增幅

以 LB 培養 (28°C, 250 rpm 隔夜培養) 分離自台灣新竹縣竹東鄉農會穀倉之蘇力菌 D4-01 菌株，以質體萃取套組 (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen Co., USA) 萃其內生型質體 DNA，進行聚合酶連鎖反應 (PCR)。設計含一個 *Bam*H I 切位之引子 (primer) 1A29A (5'-TTAACACCCTGGATCCAAAATTGATATTT-3')<sup>(3)</sup>，及含一個 *Sph* I 切位之引子 1Ab37B1 (5'-TTTGCATGCATATATTATTCCTCCATAAGAAGTAATT-3')。使用具有校正 (proofreading) 功能之 DNA 聚合酶 (Taq DNA polymerase) (Toyobo Co., Japan)。反應條件是：94°C, 5 min；第 1 週期：94°C, 1 min, 42°C, 2 min, 72°C, 5 min，循環 10 次；第 2 週期：94°C, 1 min, 50°C, 2 min 10 sec, 72°C, 6 min，循環 10 次；第 3 週期：94°C, 1 min, 52°C, 2 min 20 sec, 72°C, 7

min，循環 10 次；第 4 週期：94°C, 1 min, 55°C, 2 min 30 sec, 72°C, 15 min, 4°C 保存<sup>(4, 5, 11, 12, 17)</sup>，增幅約 3.7 kb 的 *cry1Ac* 基因。

### p1AcTA1 大腸桿菌質體之構築與轉形

將 PCR 所增幅之 3.7 kb *cry1Ac* 基因產物，進行膠體回收純化 (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen Co., USA)，與選殖載體試劑組 (Yeastern Biotech Co., Taiwan) 之載體 yT&A，接合成 p1AcTA1 之質體，轉形入大腸桿菌 (*Escherichia coli*) DH5α 勝任細胞。

### 核酸定序與 *cry*-type 基因序列比對

定序工作係委託國立中興大學生物科技發展中心完成。即萃取轉殖株 p1AcTA1 質體 DNA，以 M13 universal 引子與 M13 reverse 引子進行正反向定序，再由定序結果設計基因內部引子對 D4-01F1 (5'-AAAAATAGCCGCATTGACAC3') 與 D4-01R1 (5'-GAGATGTTTCAGTGTGG A3') 進行第二次定序。逐步設計基因內部引子對 D4-01F2 (5'-GGATGGTAATCCTGTACTT-3')、D4-01R2 (5'-ACAGAATAACACCGTGCCAC-3')、D4-01F3 (5'-TACTACTACTAGAGCCTG-3')、D4-01R3 (5'-AGCGAGAATTGTCCGAGAAA-3')、D4-01F4 (5'-AACGACTATTGATAGTCGCG-3') 與 D4-01R4 (5'-GAGAGACAAACGTGAAAAT-3')，完成雙股定序。

蘇力菌 *cry* 基因序列之取得與比對，係連結美國國家衛生研究院 (National Institute of Health, USA) 所設立之國家生物技術資訊中心網站 (National Center for Biotechnology Information, NCBI, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，以及蘇力菌毒素命名網站 (*Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature, England, [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/))，查詢蘇力菌相關的 DNA 序列，並比對

之。

### 蘇力菌質體 p1Ac5SB 之構築與轉形<sup>(3)</sup>

分別震盪培養含 p1AcTA1 質體之大腸桿菌轉殖株（培養於含 100 ppm ampicillin 之 LB 培養液中，37°C，250 rpm 隔夜培養）及含 pSB909.5 表現載體之蘇力菌<sup>(3)</sup>，分別萃取質體。利用 PCR 增幅 *cryIac* 基因所得片段兩端，各因設計引子時留下之 *Bam*HI、*Sph*I 切位進行切接。該 *cryIac5* 基因片段接入 pSB909.5 表現載體，即得到 p1Ac5SB 表現質體。製作不含質體之蘇力菌突變株 Cry<sup>B</sup> 之勝任細胞<sup>(3)</sup>，以電穿孔法將 p1Ac5SB 表現質體送入之<sup>(3)</sup>。

### 殺蟲活性檢定樣品之預備<sup>(3)</sup>

培養供試之轉殖及野生蘇力菌株（培養於 50 ml CYS 培養基，28°C，250 rpm，震盪 5 天），至完全產生毒蛋白結晶體及孢子；另培養轉殖及未轉殖之大腸桿菌（培養於 50 ml LB，37°C，250 rpm，震盪 5 天），收取沈澱蛋白或菌體作為殺蟲活性檢定用<sup>(3)</sup>。先以 BCA 蛋白質分析套組（Pierce Co, USA），分析總蛋白質含量，再另進行 SDS-PAGE 膠體電泳，利用數位影像分析系統（Alphamager™ 2200, Alpha Innotech Co., USA），粗估 130 kDa 分子量之殺蟲結晶蛋白（Cry toxin）表現濃度。

### 對小菜蛾之生物活性測試

延用先前報告<sup>(3)</sup>之方法，預備供試 3 齡小菜蛾幼蟲。將已知蛋白質濃度之供試培養液，使用噴藥塔（spray tower），各將 1 ml 菌液噴灑在 15 cm<sup>2</sup> 面積之葉片正反面，待乾後接入 3 齡小菜蛾（*Plutella xylostella*）幼蟲，飼養於 25±1°C、75±3% R.H.，L：D=12：12 之定溫箱，觀察並紀錄以上處理後 24、48 及 72 小時，小菜蛾幼蟲的死亡數<sup>(3)</sup>。

### 對擬尺蠖之生物活性測試

取用國際標準敏感性品系之擬尺蠖幼蟲（*Trichoplusia ni*），以人工飼料飼養於 25±1°C、75±3% R.H.、L：D=12：12 之定溫箱，至 2 齡時備用。將已知蛋白質濃度之供試培養液，混入人工飼料，接入 2 齡擬尺蠖幼蟲，完成處理後，將幼蟲培養於前述飼養條件的定溫箱中，觀察並紀錄以上處理後 24、48 及 72 小時，擬尺蠖幼蟲的死亡數。

## 結 果

### *cryIac* 基因之增幅

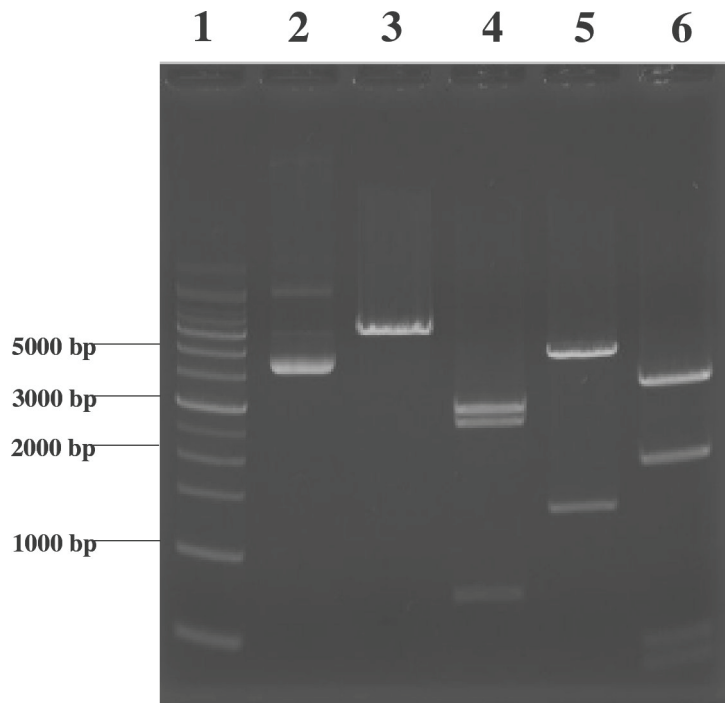
以 1A29A（含 *Bam*HI 切位）<sup>(3)</sup> 及 1Ab37B1（含 *Sph*I 切位）引子，對 D4-01 菌株內生型質體進行 PCR 增幅反應，獲得預期 3702 bp 之 *cryIac* 基因片段<sup>(3)</sup>。

### 大腸桿菌 p1AcTA1 質體的構築與轉形

利用 Taq 聚合酶在 PCR 產物 3 端增生一個 dA 的特性，將 PCR 增幅的 *cryIac* 基因產物與 yT&A 載體進行接合，由於 yT&A 線型載體兩端刻意增生的 dT，可以銜接 3 端增生 dA 的 PCR 產物，因此形成大小 6.4 kb 的 p1AcTA1 質體，並轉形入大腸桿菌中。以 *Bam*HI、*Hind* III、*Kpn* I 及 *Xba* I 等限制酶剪切進行確認：*Bam*HI 限制酶剪切，得約 6.4 kb 之片段；*Hind* III 限制酶剪切，得三個片段，分別約為 2.9 kb、2.7 kb 與 0.8 kb；*Kpn* I 限制酶剪切，得二個片段，分別約為 1.4 kb 與 5 kb；*Xba* I 限制酶剪切，得四個片段，分別為 3.7 kb、1.8 kb、0.5 kb 與 0.4 kb。由限制酶剪切所獲得之結果，可以確認該質體之構築與預期相符合（圖一）。

### 核酸定序與序列比對

上述選殖之 3.7 kb 片段經過定序確認為 3702 bp，其由起始密碼子（start codon）至終止密碼子（stop codon）全長為 3531 bp，



圖一、p1AcTA1 以限制酶剪切，確認構築基因片段之電泳分析圖。Lane 1 為 1 kb DNA Marker，Lane 2 為未經限制酶剪切之 DNA，Lane 3~6 各為 *Bam*H I、*Hind* III、*Kpn* I 及 *Xba* I 限制酶剪切。

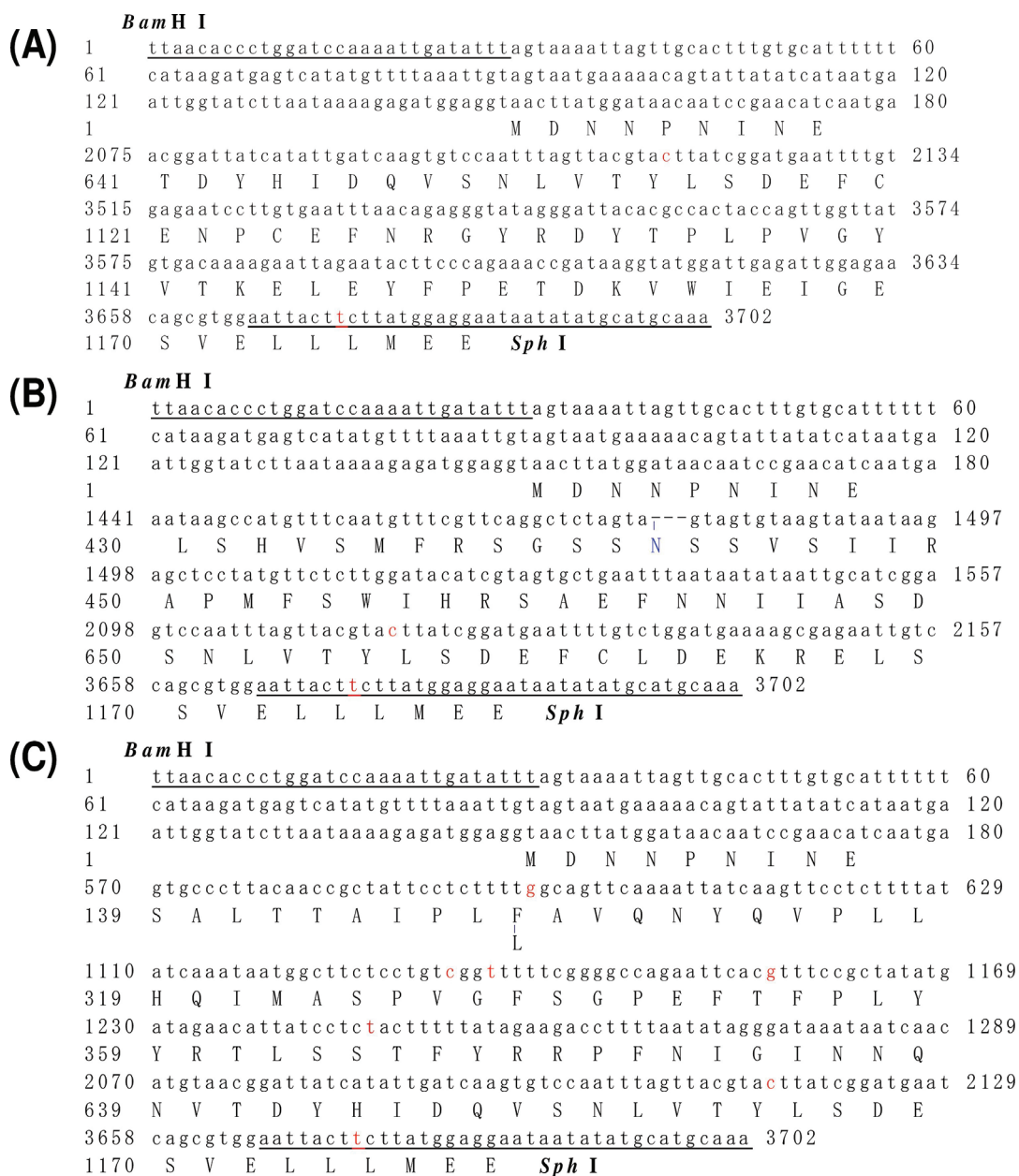
Fig. 1. Digestion of p1AcTA1 with different restriction enzymes. Lane 1, 1-kb molecular weight ladder marker; lane 2, uncut plasmid DNA; lanes 3~6, *Bam*H I, *Hind* III, *Kpn* I, and *Xba* I digestion.

可轉譯 (translation) 出 1177 個胺基酸。該序列經上網與 NCBI 及蘇力菌毒素命名網站所公佈之蘇力菌基因序列進行比對，確認此段基因為 *cry*1*Ac*5 基因型，其中與 *cry*1*Ac*5 (accession number M73248) 序列僅有二處鹼基不同，而胺基酸序列則完全相同(圖二 A)。其次與 *cry*1*Ac*11 (accession number AJ130970) 比對，有五處鹼基不同，以及第 442 個氨基酸，即天門冬胺酸 (Asparagine, Asn, N) 的刪減 (deletion) (圖二 B)。此外本研究所選殖之基因，與先前相關研究所發表之 *cry*1*Ac*15 (accession number AY122057) 基因<sup>(3)</sup>，在 DNA 序列上有 7 個鹼基的差異，而胺基酸序列差異則在第 148 個氨基酸白胺酸

(Leucine, Leu, L) (圖二 C)。

#### p1Ac5SB 蘇力菌表現質體之構築與轉形<sup>(3)</sup>

大量培養含 p1AcTA1 質體之大腸桿菌，抽取其質體 DNA，經 *Bam*H I 及 *Sph* I 限制酶切割出 3.7 kb 之 *cry*1*Ac*5 片段，接入 2.9 kb 的蘇力菌表現質體 pSB909.5，構築的質體以電穿孔法送入無質體之蘇力菌 *Cry*B，獲得 1Ac5SB 的轉殖菌株，該轉殖株菌體產生之結晶形狀，在 1000 倍光學顯微鏡觀察下，顯現與先前之研究<sup>(3)</sup>同為圓或短橢圓型。將轉殖菌株培養於含 erythromycin 100 ppm 之 LB 液體培養基中，萃取其質體 DNA，進行鑑定 *cry*1-type 基因之 PCR 反應<sup>(5)</sup>，複驗出 487 bp 的片



圖二、1Ac5SB 轉殖株與其他 *cryIac* 基因核酸序列以及胺基酸比對結果（紅色為核酸序列有差異處，-為核酸序列剔除，| 為胺基酸插入或置換）：(A) 與 *cryIac5* (accession number M73248)；(B) 與 *cryIac11* (accession number AJ130970)；(C) 與 *cryIac15* (accession number AY122057)。

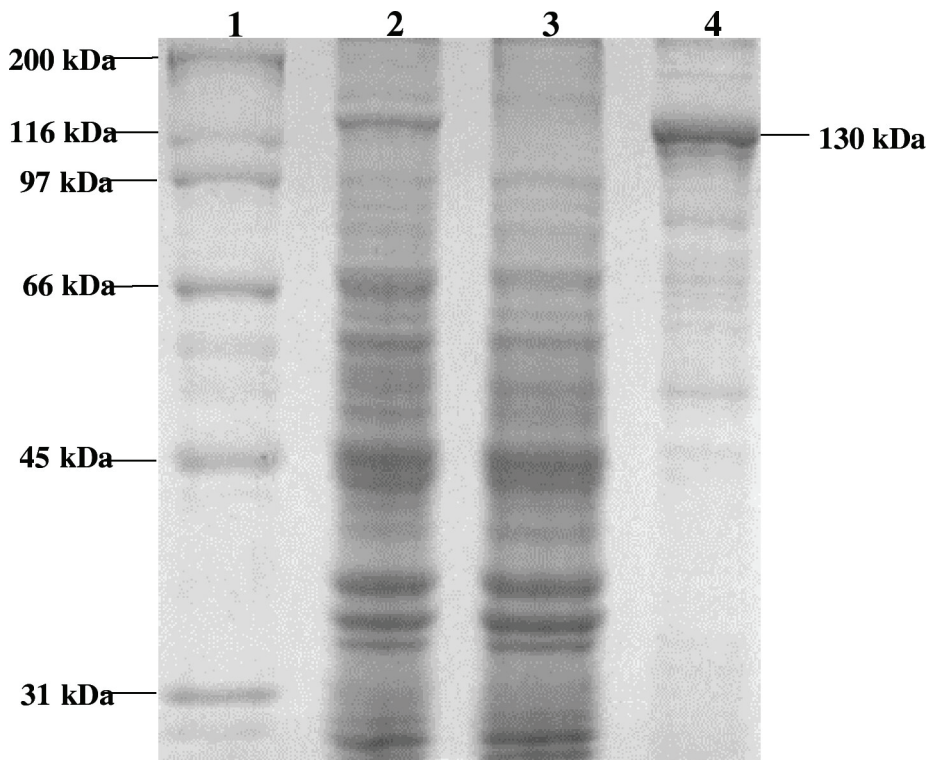
Fig. 2. Comparison of nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the *cryIac* gene in 1Ac5SB clone and *cryIac5*, *cryIac11*, *cryIac15* genes. (The red marked, dashes and vertical line indicate the position where changes, deletion and insertion in the sequences) (A) 1Ac5SB clone and *cryIac5* (accession number M73248). (B) 1Ac5SB clone and *cryIac11* (accession number AJ130970). (C) 1Ac5SB clone and *cryIac15* (accession number AY122057).

段，顯示帶有 *cry1Ac* 基因。經鑑試 *Bam*HI 及 *Sph*I 限制酶圖譜的實驗分析後，分別可觀察到 2.9 kb 及 3.7 kb 的產物，確認表現質體之構築符合預期，亦即 *cry1Ac5* 基因已成功轉入無質體之蘇力菌 Cry<sup>B</sup> 中。

#### 含蘇力菌 *cry1Ac5* 基因的大腸桿菌對小菜蛾的殺蟲活性

取用大腸桿菌轉殖株 1AcTA1 蛋白萃取液，餵食小菜蛾，進行殺蟲活性鑑定，並以基因來源的蘇力菌母株 D4-01 為正對照組，未轉殖的大腸桿菌為負對照組。分別以總蛋白濃度 250 ppm 與 25 ppm 餵食 3 齡小菜蛾幼蟲，觀察處理 24、48 及 72 小

時後之死亡率。結果顯示大腸桿菌 1AcTA1 轉殖株在總蛋白濃度為 250 ppm（此時 130 kDa 目標殺蟲結晶蛋白，約佔總蛋白之 3.9% = 9.75 ppm）時（圖三），在處理 72 小時後，對小菜蛾幼蟲可造成 33% 的死亡率，若濃度在 25 ppm 下，則無殺蟲活性。蘇力菌株 D4-01 的總蛋白濃度於 250 ppm（130 kDa 目標殺蟲結晶蛋白，約佔總蛋白之 51.4% = 128.5 ppm）及 25 ppm 下，處理小菜蛾 72 小時後，分別可達 97% 與 33% 的致死率，無轉殖的大腸桿菌蛋白萃取液則不論是在 250 ppm 或 25 ppm 的濃度下，經過餵食 72 小時後，對小菜蛾皆無殺蟲活性（表一）。



圖三、1AcTA1 轉殖株之 Cry1Ac 蛋白質電泳分析。Lane 1 為 HMW 蛋白質標誌，Lane 2 為 1AcTA1 轉殖株，Lane 3 為 *E. coli*，Lane 4 為 D4-01。

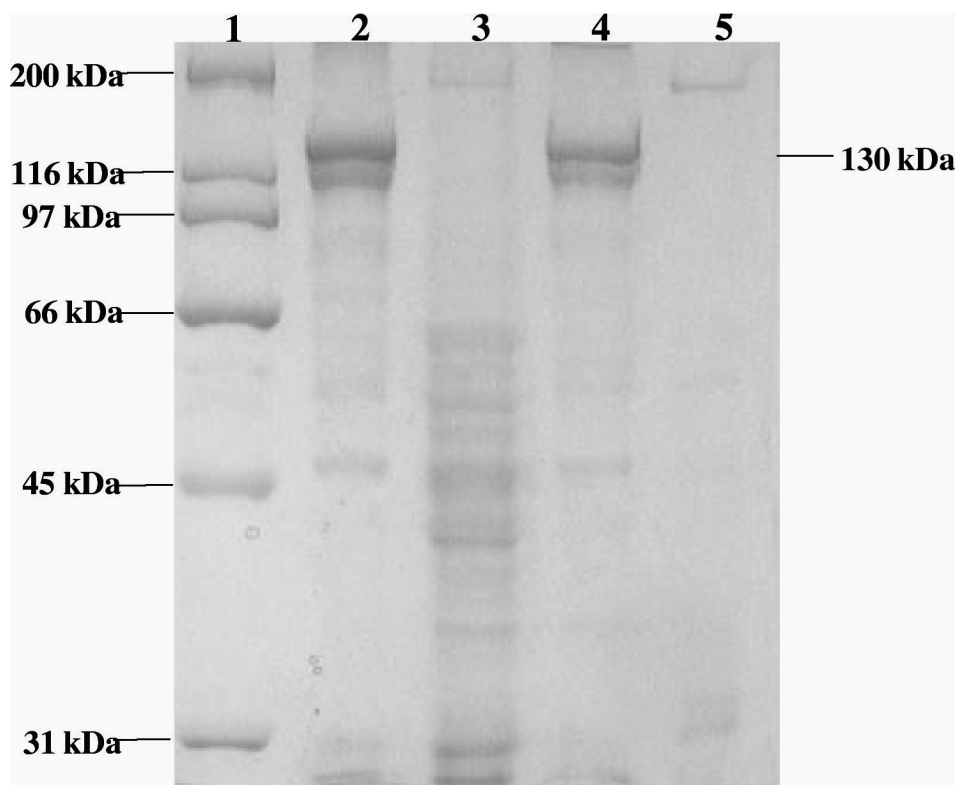
Fig. 3. SDS-PAGE analysis of the Cry1Ac protein from the 1AcTA1 clone. Lane 1, HMW protein marker; lane 2, 1AcTA1; lane 3, *E. coli*; lane 4, D4-01.

表一、大腸桿菌表現質體轉殖株對小菜蛾之生物活性測試

Table 1. Insecticidal activity of extracts from *Escherichia coli* strains against *Plutella xylostella* larvae<sup>1)</sup>

Treatment	Cumulative mortality (%)					
	250 ppm			25 ppm		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
1AcTA1	10	30	33	0	0	0
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0
D4-01	90	93	97	23	33	33
Control	0	0	0	0	0	0

<sup>1)</sup> Third instar larvae were tested. There were 10 larvae/replicate and 3 replicates/treatment. Both sides of the leaf discs (15 cm<sup>2</sup>) were sprayed with 1 ml of the *Bt* suspension.



圖四、1Ac5SB1 轉殖株之 Cry1Ac 蛋白質電泳分析。Lane 1 為 HMW 蛋白質標誌，Lane 2 為 1Ac5SB1 轉殖株，Lane 3 為 Cry<sup>+</sup>B 無質體之蘇力菌（含 pSB909.5），Lane 4 為 Cry1Ac15，Lane 5 為 Cry<sup>-</sup>B 無質體之蘇力菌。

Fig. 4. SDS-PAGE analysis of the Cry1Ac protein from the 1Ac5SB1 clone. Lane 1, HMW protein marker; lane 2, 1Ac5SB1; lane 3, Cry<sup>+</sup>B (containing pSB909.5); lane 4, Cry1Ac15; lane 5, Cry<sup>-</sup>B.

表二、蘇力菌表現質體轉殖株對小菜蛾之生物活性測試

Table 2. Insecticidal activity of extracts from *Bacillus thuringiensis* strains against *Plutella xylostella* larvae<sup>1)</sup>

Samples	Cumulative mortality (%)					
	250 ppm			25 ppm		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
1Ac5SB1-1	0	90	100	0	80	87
1Ac5SB1-2	0	80	100	0	67	87
1Ac5SB1-3	0	97	100	0	63	80
1Ac5SB1-4	0	100	100	0	90	97
1Ac5SB1-5	0	97	100	0	70	90
CryB (pSB909.5)	0	3	3	0	0	0
D4-01	97	100	100	3	67	67
Xentari	23	100	100	17	87	87
Delfin	67	100	100	37	100	100
Control	0	0	0	0	0	0

<sup>1)</sup> Third instar larvae were tested. There were 10 larvae/replicate and 3 replicates/treatment. Both sides of the leaf discs (15 cm<sup>2</sup>) were sprayed with 1 ml of the *Bt* suspension.

#### 蘇力菌轉殖株 1Ac5SB 對小菜蛾的殺蟲活性

取本實驗轉殖得到的數株蘇力菌轉殖株，進行對小菜蛾的殺蟲活性檢定。以其總蛋白濃度 250 ppm 與 25 ppm，處理 3 齡小菜蛾幼蟲，並觀察處理後 24、48 及 72 小時之殺蟲活性。含 1Ac5SB 的蘇力菌轉殖株，以總蛋白濃度 250 ppm (130 kDa 目標殺蟲結晶蛋白約佔總蛋白之 47% = 117.5 ppm) (圖四) 餵食 3 齡小菜蛾幼蟲，可在餵食處理的 48 小時後，造成 80~100% 之死亡率。在處理後的 72 小時內，致死率可達 100%。總蛋白濃度降低至 25 ppm，仍可在處理後 48 小時內，對小菜蛾幼蟲造成 60~80% 的死亡率，72 小時後死亡率則升高至 80~90%。相較之下，對照菌株 (CryB 僅含 pSB909.5 載體) 在其總蛋白濃度 250 ppm 下，餵食處理後的 72 小時內，對小菜蛾幼蟲僅有 3% 的致死率，其餘處理條件，對小菜蛾幼蟲皆無殺蟲活性。在相同培養條件下，比較蘇力菌 1Ac5SB 轉殖株與原始菌株 D4-01 的低濃度蛋白 (25 ppm) 殺蟲活性，歷經處理 48 及 72

小時後的觀察，皆顯示 1Ac5SB 轉殖株殺蟲效果較基因來源的原始菌株 D4-01 佳。此外，1Ac5SB 轉殖蘇力菌亦與市售商品 Delfin (含 Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac 與 Cry2 毒素) 與 Xentari (含 Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1C 與 Cry1D 毒素) 菌株<sup>(3)</sup>，比較殺蟲活性，在相同培養條件下，分別處理 250 ppm 與 25 ppm 的總蛋白質，歷經處理 48 及 72 小時後，觀察殺蟲活性，結果顯示三者之殺蟲效果近似 (表二)。

#### 蘇力菌轉殖株 1Ac5SB 對擬尺蠖的殺蟲活性

將上述所陳的蘇力菌轉殖株 1Ac5SB，進行對擬尺蠖的殺蟲活性檢定。以 250 ppm 與 25 ppm 的總蛋白濃度餵食 2 齡擬尺蠖幼蟲，並觀察處理後 24、48 及 72 小時之殺蟲活性。蘇力菌 1Ac5SB 轉殖株，當使用總蛋白濃度 250 ppm (目標殺蟲結晶蛋白含量約 47% 或 117.5 ppm) 時，可在餵食處理後的 48 小時內，造成 60~80% 之擬尺蠖幼蟲死亡率；72 小時後，死亡率則達 80~90%。降低總蛋白濃度至 25 ppm，

表三、蘇力菌表現質體轉殖株對擬尺蠖之生物活性測試

Table 3. Insecticidal activity of extracts from *Bacillus thuringiensis* strains against *Trichoplusia ni* larvae<sup>1)</sup>

Samples	Cumulative mortality (%)					
	250 ppm			25 ppm		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
1Ac5SB-1	0	77	87	0	40	70
1Ac5SB-2	3	80	87	0	33	70
1Ac5SB-3	6.6	70	93	0	40	67
1Ac5SB-4	10	67	97	0	57	73
1Ac5SB-5	3	67	93	3	50	80
Cry <sup>+</sup> B (pSB909.5)	3	3	10	0	0	0
D4-01	23	67	77	20	23	60
Cry1Ac15	10	73	93	0	53	67
Xentari	43	57	100	0	60	80
Delfin	70	70	97	10	60	93
Control	0	0	0	0	0	0

<sup>1)</sup> Second instar larvae were tested. There were 10 larvae/replicate and 3 replicates/treatment. Artificial diets were incorporated with the test sample.

歷經處理後 48 小時內，可達到 30~50% 的致死率，72 小時後攀升至 70~80%。對照菌株（Cry<sup>+</sup>B 僅含 pSB909.5 載體）在使用總蛋白濃度 250 ppm 時，處理後 72 小時，僅對擬尺蠖有 10% 致死率，其餘處理條件皆無殺蟲效果。比較此 1Ac5SB 轉殖蘇力菌株，與市售商品 Delfin 與 Xentari 菌株之殺蟲效果近似（表三）。

## 討 論

本研究目的是從本土的蘇力菌中篩選單一基因，進行轉殖期以提昇其殺蟲毒效，以開發具有價值之蘇力菌商品。因此經由設計了含 *Bam*H I 切位與 *Sph* I 切位的引子對，從蘇力菌台灣分離株 D4-01 中，選殖 *cryIac* 型的基因。預期選殖片段全長為 3.7 kb。進行 PCR 反應時，運用儀器溫度梯度的調節功能，將煉合溫度（annealing temperature）由 42°C 逐步提升至 55°C，避

免後續非專一性產物的發生。此外，所使用之 DNA 聚合酶，亦具有校正功能，可減低增幅錯誤率，定序結果說明，所增幅之 PCR 產物符合預期，與已知的 *cryIac5*，僅有 2 個鹼基差別，具相當之準確性。

將增幅之 3.7 kb 片段，選殖接入 yT&A 載體，快速構築成 p1AcTA1 質體，並轉形至大腸桿菌 DH5 $\alpha$  中表現，由於此片段上的蘇力菌殺蟲毒蛋白基因，5 端帶有轉譯（translation）所需的訊號，由 yT&A 載體提供轉錄訊號，便可在大腸桿菌中表現。因此，將蘇力菌殺蟲毒蛋白基因轉形至大腸桿菌，可直接表現蘇力菌殺蟲毒蛋白；亦即以大腸桿菌作為初步選殖與表現蘇力菌殺蟲毒蛋白基因的宿主是相當方便的作法<sup>(21)</sup>。

由於特別設計的引子對，預期可選殖出 *cryIac* 型的毒蛋白基因，在經 *cryI*-型基因 PCR 與 PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism)<sup>(1)</sup> 試驗，證實選殖得到的基因是 *cryIac* 型基因，由初步的限

制酶圖譜，確認該選殖片段符合預期大小。經由 NCBI 與蘇力菌毒素命名網站功能，將該基因序列與胺基酸序列進行比對，其基因序列與 *cry1Ac5* 最近似，相似度高達 99.9%，僅差二個鹼基，而胺基酸序列則完全相同，顯示蘇力菌殺蟲基因的序列保守性。將基因轉入大腸桿菌進行表現，以 SDS-PAGE 電泳分析，可觀察到一分子量大小約 130 kDa 的額外蛋白產物，應為 Cry1Ac5 毒蛋白。由於本研究選殖之 Cry1Ac5 毒蛋白，與前述 NCBI 與蘇力菌毒素命名網站，已登錄之 Cry1Ac5 毒蛋白之胺基酸序列完全相同，但因前述 Cry1Ac5 毒蛋白，並未另文發表其活性測試，本研究對選殖之 Cry1Ac5 毒蛋白，所進行之殺蟲活性測試結果，即展現了該產物的毒性表現，但還值得進一步，測試對幾種目標昆蟲的半數致死濃度值 (LC<sub>50</sub>)，以爲精確毒性程度比較標準。

在蛋白產物的殺蟲活性測試中，比較 1AcTA1 大腸桿菌轉殖株與基因來源的蘇力菌株 D4-01 的測試結果，發現於 1AcTA1 轉殖株對小菜蛾的活性，不如基因來源母株 D4-01，其原因可能是，大腸桿菌轉殖株其 130 kDa 目標殺蟲結晶蛋白表現，比例約只佔總蛋白之 3.9%，並不能如 D4-01 蘇力菌，除了產生孢子外，幾乎全力地以結晶方式產生 130 kDa 目標基因毒蛋白產物（約佔總蛋白之 51.4%）（圖三）；另外，大腸桿菌並非 *cry* 基因的天然宿主，基因產物的穩定性方面可能有差異，因而使得 1AcTA1 轉殖株表現活性，不如在蘇力菌中所表現之活性。雖然如此，但在大腸桿菌中所表現之毒蛋白，經殺蟲活性測試，顯示對小菜蛾仍具致死效果，說明大腸桿菌所表現之蘇力菌殺蟲毒蛋白，仍具有毒效。

利用基因重組技術產生優良的蘇力菌轉殖菌株，需要一個穩定的選殖載體。早期送入蘇力菌中所使用的穿梭載體 (shuttle

vector) 都含有一段不屬於蘇力菌的外來 DNA 片段<sup>(7, 18, 22)</sup>，這些 DNA 片段會影響 Cry 毒蛋白基因的穩定性<sup>(9)</sup>。本研究中所選擇的 pSB909.5 蘇力菌表現載體，是一個穩定表現蘇力菌基因的選殖載體，比其他來自非蘇力菌的載體，更能有效地穩定攜帶 Cry 毒蛋白基因<sup>(9)</sup>。比較蘇力菌轉殖株 1Ac5SB 與母株 D4-01 對擬尺蠖及小菜蛾之殺蟲活性，顯示 1Ac5SB 轉殖株與母株 D4-01 之殺蟲活性近似，此結果亦說明 *cry* 基因在蘇力菌宿主中所表現之殺蟲活性仍優於在大腸桿菌中的表現。

1Ac5SB 轉殖株對測試昆蟲的毒性，是在蘇力菌中表現單一基因產物的結果，而蘇力菌 D4-01 株，則可能是多種毒蛋白基因 (*1Aa<sup>α</sup>*, *1Ac<sup>α</sup>*, *1C\*<sup>α</sup>*, *1Cb<sup>α</sup>*, *1D<sup>α</sup>*, *3C<sup>γ</sup>*)<sup>(1)</sup>，共同表現的結果。這些結構相似的毒蛋白之間，可能具有殺蟲協力或拮抗效應 (synergistic or antagonistic effect)，有因不同種類的毒蛋白混合，造成毒性增強的效果<sup>(6, 19)</sup>，也有不同種類的殺蟲毒蛋白混合，反而造成毒性減弱的例子<sup>(15)</sup>。因此，個別選殖之毒蛋白殺蟲效果，若優於原始母株時，有可能是因爲母株中含有較多基因，在表現的過程中彼此競爭，例如毒蛋白成份中，只有某一種對測試昆蟲有毒性，當因每個基因都表現，使得個別表現量低於單獨選殖的基因表現量時，則個別選殖之毒蛋白基因表現，就有可能超過原始母株<sup>(2)</sup>。

本研究選殖之 *cry1Ac5* 型基因與先前所發表之 *cry1Ac15* 基因<sup>(3)</sup>，在胺基酸序列比對發現，僅在第一區域 (domain I) 相差 1 個胺基酸，即 Cry1Ac5 的第 148 個胺基酸爲白胺酸 (Leucine, Leu, L)，而 Cry1Ac15 的第 148 個胺基酸則爲丙胺酸 (Phenylalanine, Phe, F)，由於 domain I 的功能是造成細胞膜孔洞的形成，與細胞受體結合所造成之毒蛋白間親合力無關，故此胺基酸的改變，應不至於對其殺蟲活

性造成影響，本研究中，此二基因轉殖株對擬尺蠖即表現近似之殺蟲活性。

Cry 毒蛋白對昆蟲幼蟲的毒效差異，取決於毒蛋白對幼蟲中腸上皮細胞膜上的接受體 (receptor) 不同強度的鍵結，因此不同的 Cry 毒蛋白，對不同的昆蟲幼蟲，有不同的感受性 (susceptibility)<sup>(8)</sup>，例如：Cry1C 與夜蛾科幼蟲中腸上皮細胞膜上接受體的親和程度比 Cry1Ac 佳，因此 Cry1C 對夜蛾科幼蟲的致死效果，會優於其它鱗翅目幼蟲<sup>(16)</sup>。Cry1Ac 毒蛋白對於菸夜蛾 (*Heliothis virescens*) 具有極高的致死效率<sup>(10)</sup>，係因為菸夜蛾中腸上皮細胞膜上的接受體 APN (aminopeptidase N) 與 Cry1Ac 毒蛋白可產生緊密的鍵結所致<sup>(14)</sup>。比較本研所得到的 *cryIac5* 型基因，與利用相同選殖表現系統所得的 *cryIca9* 新基因<sup>(3, 13)</sup>，其轉殖蘇力菌株產生的毒蛋白，對小菜蛾的生物活性，是前者大於後者，Cry1Ca9 對小菜蛾幼蟲的 LC<sub>50</sub> (處理 72 hr 後) 為 41.0 ppm，而 1Ac5SB 轉殖株於蛋白濃度為 25 ppm 時，72 hr 後的致死率即可達 80%~90%，推測其處理後 72 小時之半致死濃度應低於 25 ppm，顯示含 *cryIac5* 基因的蘇力菌轉殖株 1Ac5B 對小菜蛾幼蟲之毒效，優於含 *cryIca9* 基因之選殖菌株。Cry1Ca9 對擬尺蠖幼蟲的影響僅呈現抑制進食的現象，無法求得 LC<sub>50</sub> 值，但 1Ac5SB 轉殖株於蛋白濃度為 25 ppm 時，72 hr 後對擬尺蠖幼蟲的致死率即可達 60%~80%，顯然本研究中選殖的 *cryIac5* 基因在蘇力菌轉殖菌株內的表現對擬尺蠖幼蟲之毒效，亦優於含 *cryIca9* 基因之選殖菌株。

綜此，顯示持續選殖探討蘇力菌單一基因，為混合基因毒效建立基礎，對提昇此生物性農藥的毒效，具有相當重要的價值。

## 謝 辭

本研究使用陽明大學生物化學研究所

翟建富教授 1995 年提供之 Cry<sup>B</sup> 蘇力菌宿主菌株及 pSB909.5 表現載體；試驗期間承蒙藥毒所李佳鳳、郭自晏、郭雪、吳淑盆小姐和石傑宇先生協助，謹此誌謝。

## 引用文獻

1. 陳韋如。2005。台灣蘇力菌篩選鑑定及 *cryIac* 基因選殖。私立朝陽科技大學生物技術研究所碩士論文。台中。96 頁。
2. 郭懷聲。1998。蘇力菌殺蟲晶體蛋白基因的鑑定、選質與特性分析。國立陽明大學生物化學研究所博士論文。臺北。93 頁。
3. 曾經洲、高穗生、陳良築、翟建富、侯豐男。2002。蘇力菌台灣分離株 *cryIac* 基因之選殖及表現測試。植保會刊 44: 185-208。
4. Bruce, K. D., Hiorns, W. D., Hobman, J. L., Osborn, A. M., Strike, P., and Ritchie, D. A. 1992. Amplification of DNA from native population of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3413-3416.
5. Carozzi, N. B., Kramer, V. C., Warren, G. W., Evola, S., and Koziel, M. G. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3057-3061.
6. Crickmore, N., Bone, E. J., Williams, J. A., and Ellar, D. J. 1995. Contribution of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131: 249-254.
7. Crickmore, N., Nicholls, C., Earp, D. J., Hodgman, T. C., and Ellar, D. J. 1990. The construction of strain of *Bacillus*

- thuringiensis* strain expressing novel entomocidal  $\delta$ -endotoxin combinations. *Biochem. J.* 270: 133-136.
8. Ferr, J., Real, M. D., Van Rie, J., Jansens, S., and Peferone, M. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5119-5123.
  9. Gamela, P. H., and Piot, J. C. 1992. Characterization and properties of a novel plasmid vector for *Bacillus thuringiensis* displaying compatibility with host plasmids. *Gene* 120: 17-26.
  10. Hofte, H., and Whitely, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-258.
  11. Kalman, S., Kiehne, K. L., Cooper, N., Reynoso, M. S., and Yamamoto, T. 1995. Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3063-3068.
  12. 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.
  13. Kao, S. S., Hsieh, F. C., Tzeng, C. C., and Tsai, Y. S. 2003. Cloning and expression of the insecticidal crystal protein gene *cryICa9* of *Bacillus thuringiensis* G10-01A from Taiwan granaries. *Current Microbiol.* 47: 295-299.
  14. Knight, P. J. K., Crickmore, N., and Ellar, D. J. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c)  $\delta$ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 11: 429-436.
  15. Lee, M. K., Curtiss, A., Alcantara, E., and Dean, D. H. 1996. Synergistic effect of *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAa and CryIAc on gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 583-586.
  16. Luo, K., Lu, Y. J., and Adang, M. J. 1996. A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1C  $\delta$ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 783-791.
  17. McPherson, M. J., Quirke, P., and Taylor, G. R. 1991. PCR a practical approach. Oxford University press, New York. 253 pp.
  18. Miteva, V. I., and Grigorova, R. T. 1998. Construction of a bifunctional genetically labeled plasmid for *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Arch. Microbiol.* 150: 496-498.
  19. Park, H. W., Kim, H. S., Lee, D. W., Yu, Y. M., Jin, B. R., and Kang, S. K. 1995. Expression and synergistic effect of three types of crystal protein genes in *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214: 602-607.
  20. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. E. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
  21. Schnepf, H. E., Wang, H. C., and Whiteley, H. R. 1985. The amino acid

- sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. J. Biol. Chem. 260: 6264-6272.
22. Schurter, W., Geiser, M., and Mathe, D. 1989. Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* via electroporation: transformation of acrySTALLIFEROUS strains with a cloned  $\delta$ -endotoxin gene. Mol. Gen. Genet. 218: 177-187.

## ABSTRACT

**Chen, W. R.<sup>1,2</sup>, Li, G. C.<sup>1</sup>, Kao, S. S.<sup>1</sup>, Tzeng, Y. M.<sup>2</sup>, and Tzeng, C. C.<sup>1\*</sup> 2006.**  
**Cloning and expression of the insecticidal crystal protein gene, *cryIAc5*, of *Bacillus thuringiensis* D4-01 from Taiwan.** Plant Prot. Bull. 48: 17-30. (<sup>1</sup> Biopesticide Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung 41358, Taiwan (ROC); <sup>2</sup> Institute of Biotechnology, Chaoyan University of Technology, Wufeng, Taichung 41349, Taiwan (ROC))

A new *cry*-type gene (*cryIAc5*) was cloned and sequenced from *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) D4-01 native to Taiwan. The full-length (3.7-kb) nucleotide sequence of the *cryIAc* gene for insecticidal crystal protein (ICP) was amplified from *Bt* isolate D4-01 by PCR. This *cryIAc* gene was constructed in the *Escherichia coli* plasmid vector,  $\gamma$ T&A. After transformation, the *cry* gene carried by the pSB909.5 expression vector was electroporated into *Bt* Cry<sup>-</sup>B (a crystal-negative host), and the recombinant *Bt* expressing a 130-kDa ICP was obtained. The sequence of 1Ac5SB cloned from D4-01 was determined. The new gene, *cryIAc5*, consisted of an open reading frame of 3.7-kb, which encoded 1177 amino acid residues. The polypeptide has the deduced amino acid sequences predicting a molecular mass of 130-kDa. The *cryIAc5* gene had 99.9% homology with the previously reported *cryIAc5* gene, and only 2 mistakes were found in comparison to a sequence stored in GenBank. The mortality of the *Bt* Cry<sup>-</sup>B clone 1Ac5SB against larvae of *Trichoplusia ni* after 72 h of incubation was 60%~80% when treated with 11.75 ppm crystal protein. The mortality of the *Bt* Cry<sup>-</sup>B clone 1Ac5SB against larvae of *Plutella xylostella* after 72 h of incubation was 80%~90% when treated with 11.75 ppm crystal protein.

(Key words: *Bacillus thuringiensis*, *cryIAc5*, insecticidal crystal protein gene, cloning, expression)

\*Corresponding author. E-mail: cctzeng@tactri.gov.tw