

# 蘇力菌菌種鑑別試驗檢驗方法

曾經洲

吉園圃的標章是水果蔬菜安全的記號，也是消費者為了追求健康，選購果蔬的依據。為符合此要求，在以藥劑防治害蟲的工作上，「生物性農藥 - 蘇力菌」是最佳的選擇。

蘇力菌是一種昆蟲病原細菌，為革蘭氏陽性桿菌，在營養缺乏或環境不良的時候，蘇力菌會進入不分裂的半靜止期，或分化形成孢子和殺蟲蛋白結晶。這種結晶蛋白對某些生物有特殊的毒效，某一類的毒素會對某一些昆蟲，有專一的毒性。各類蘇力菌毒蛋白間的類源關係，因其所產生的殺蟲結晶蛋白不同，殺蟲的對象也不一，其中cry1類對鱗翅目有毒殺蟲效果，cry2對鱗翅目及雙翅目或單獨對雙翅目有效，cry3只對鞘翅目有效，cry4只對雙翅目有效。而且各菌種含有個別的殺蟲基因組合及不同的蛋白質產物，因此可以經由鏡檢分析、孢子培養實驗、cry1、cry3、cry4類的區分、已知cry1 gene的區分、已知cry2A gene的鑑定、cry gene的PCR-RFLP、SDS-PAGE檢定ICP、ELISA檢定等生物技術鑑定各種蘇力菌商品。

## 一、農藥名稱：

普通名稱：蘇力菌

生物學名：Bacillus thuringiensis

## 二、劑型：水懸劑(SC)、可濕性粉劑(WP)、粒劑(GR)、水分散性粒劑(WG)。

## 三、作用：殺蟲劑。

## 四、分析方法：

### 1. cry1Ac 殺蟲基因轉殖螢光假單孢菌的蘇力菌產品：

1.1. 原理：不含活孢子之殺蟲毒蛋白基因轉殖螢光假單孢菌的蘇力菌產品（含Cry1Ac殺蟲蛋白質），無法以NA培養基培養，蛋白質產物可以SDS-PAGE分離及以ELISA確認。

1.2. 適用範圍：cry1Ac殺蟲基因轉殖螢光假單孢菌的蘇力菌產品。

1.3. 檢驗方法：

1.3.1. 供試樣品處理：樣品取 0.01g以1 ml無菌水振盪懸浮稀釋，再繼續稀釋至1/1000倍，於1000倍位相差顯微鏡下鏡檢，

行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所技術專刊第 101 號。

觀察其菌體及內含結晶之形態，並在 NA (nutrient agar) 平板培養基以劃線法純化，測試是否可被培養。

- 1.3.2. 總蛋白量之分析：蘇力菌產品以之蛋白質含量檢定套組，以胎牛血清蛋白(BSA)為標準劑，測定供試蘇力菌總蛋白濃度，其後調整樣品之濃度備用。
- 1.3.3. SDS-聚丙稀醯胺膠體電泳分析 (SDS-PAGE)：將蘇力菌產品，依Dunn (1993)及段等(1993)之方法，並以Cry1Ac蛋白質為正對照組，進行蛋白質成份電泳分離。
- 1.3.4. 酵素聯結免疫檢定(ELISA)檢測特定毒蛋白含量：經1.3.1定量之蘇力菌樣品及Cry1Ac標準品，以coating buffer 稀釋，使濃度為0.2-0.5  $\mu\text{g}/50\ \mu\text{l}$ ，將之加至 EIA 96 孔盤中 (50  $\mu\text{l}$  / 孔)，置於37  $^{\circ}\text{C}$ ，4小時，倒掉盤中液，每孔加 100  $\mu\text{l}$  blocking solution，於37  $^{\circ}\text{C}$  作用30分鐘，以 washing buffer (0.05% PBST) 洗三次，晾乾，保存於-20  $^{\circ}\text{C}$  備用。每孔加50  $\mu\text{l}$  經 PBS 稀釋之Cry1Ac免疫血清，於37  $^{\circ}\text{C}$  下，作用90分鐘，以 washing buffer 洗三次，加入 alkaline phosphatase-conjugated affinity pure goat anti -rabbit IgG (H+L) 2,500 倍稀液 (100  $\mu\text{l}$  / 孔)，於37  $^{\circ}\text{C}$  下作用60分鐘，再以washing buffer 洗五次，加入 0.1% PNPP 受質呈色液，於37  $^{\circ}\text{C}$  下作用60分鐘，以ELISA判讀機於 405nm 下判讀。以已知樣品之蛋白含量對應吸光值(OD)求出相關方程式，並換算出未知樣品之濃度。

## 2. 一般蘇力菌產品：

- 2.1. 原理：蘇力菌產品除了MVP為不含活孢子之殺蟲毒蛋白基因轉殖螢光假單孢菌的蘇力菌產品，無法以NA培養基培養外，其餘的蘇力菌產品則均具有活性孢子，可以顯微鏡檢其孢子及殺蟲毒蛋白結晶，其孢子可以被培養，並且抽取DNA，進行聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)。聚合酶連鎖反應乃是仿自然現象，將所抽取之DNA，首先於高溫下變性(denaturation)，接著降溫引子煉合(annealing)，再是引子延伸(extension)使DNA片段呈2的次方倍增加，而複製出大量的DNA (McPherson et al., 1991)。蘇力菌質體去氧核醣核酸，利用聚合酶連鎖反應技術，設計引子，擴增目標的核酸片段，再經Agarose膠體電泳依分子量分離核酸片段，可判讀出其所含基因種類。

- 2.2. 適用範圍：具活性孢子之蘇力菌產品。

2.3. 檢驗方法：以 Carozzi 等人(1991)針對鱗翅目、鞘翅目和雙翅目之結晶蛋白基因所設計之各2對引子，先鑑定cry1Aa、cry 1Ab、cry 1Ac、cry 3A、cry 3B、cry 4A和cry 4B等基因，探討菌株之基因組成。再以Kalman 等人(1993)針對cry1基因設計引子，鑑定菌株所含cry1Aa、cry1Ab、cry1Ac、cry1B、cry1C、cry1D、cry1E 和 cry1F 等基因組成。

2.3.1. 供試樣品處理：樣品取0.01g以1 ml無菌水振盪懸浮稀釋，再繼續稀釋至1/1000倍，於1000倍位相差顯微鏡下鏡檢，並在 NA (nutrient agar) 平板培養基以劃線法純化，挑20個單一菌落，各別移到5ml LB 液體培養基 (Luria-Bertani Medium: bacto-tryptone 1%, bacto-yeast extract 0.5%, NaCl 1%, pH 7.0 )，於恆溫振盪培養箱(28℃，250 rpm) 隔夜培養，再取0.1ml 繼代培養5ml，同前條件培養4小時。依 Sambrook 等人 (1989) 之方法，以質體製備套組 (EasyPrep™ System with Plasmid Prep Kit, Pharmacia Biotech)，利用鹼溶的方式，進行DNA抽取純化，乾燥沉澱物以20 µl無菌水回溶備用。

2.3.2. 聚合酶連鎖反應：依Carozzi 等人(1991)、McPherson 等人 (1991)、Bruce 等人(1992)、Kalman 等人(1993)、Kalman 等人(1995)方法，加以修飾進行之。

2.3.2.1. 引子：第一套為含Lep-1、Lep -2 Dip-1、Dip -2 Col-1、Col -2等共6對引子混合之Lep+Col+Dip (如表1.) (Carozzi et al., 1991)；第二套為鑑定cry1Aa、cry1Ab、cry1Ac、cry1B、cry1C、cry1D、cry1E、cry1F等基因之cry1-type 8對混合引子(如表2.) (Kalman et al., 1993)。混合調整各引子濃度為20 µM。

表1. PCR區分毒殺鱗翅目、鞘翅目及雙翅目昆蟲基因所用之引子序列

Primer	Sequence	Gene	Position
Lep1A	5'CCGGTGCTGGATTTGTGTTA3'	cry1	310-330
Lep1B	5'AATCCCGTATTGTACCAGCG3'	cry1	780-800
Lep2A	5'CCGAGAAAGTCAAACATGCG3'	cry1	2158-2178
Lep2B	5'TACATGCCCTTTACGTTCC3'	cry1	3046-3066
Dip1A	5'CAAGCCGCAAATCTTGTGGA3'	cry4	2551-2571
Dip1B	5'ATGGCTTGTTCGCTACATC3'	cry4	3328-3348
Dip2A	5'GGTGCTTCCTATTCTTTGGC3'	cry4	740-760
Dip2B	5'TGACCAGGTCCCTTGATTAC3'	cry4	2010-2030
Co11A	5'GTCCGCTGTATATTCAGGTG3'	cry3	1801-1821
Co11B	5'CACTTAATCCTGTGACGCCT3'	cry3	2430-2450
Co12A	5'AGGTGCCAACTAACCATGTT3'	cry3	621-641
Co12B	5'GATCCTATGCTTGGTCTAGT3'	cry3	1611-1681

(Carozzi et al., 1991)

表2. PCR細區分cry1殺蟲基因所用之引子序列

Primer	Sequence	Gene	Position
TY1UNI2	ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC	cry1	2528-2560
TY6	GGTCGTGGCTATATCCTTCGTGTCACAGC	cry1	3599-3626
TY1AA	GAGCCAAGCTGGAGCAGTTTACACC	cry1Aa	1837-1864
TY14	GAATTGCTTTCATAGGCTCCGTC	cry1Ab	3352-3376
TY1AC	TCACTTCCCATCGACATCTACC	cry1Ac	1941-1962
TY1B	GTC AACCTTATGAGTCACCTGGGGCTTC	cry1B	1292-1318
TY1C	CAACCTCTATTTGGTGCAGGTTC	cry1C	1820-1842
TY1D	GGTACATTTAGATATTCACAGCCAC	cry1D	1839-1863
TY1E	CTTAGGGATAAATGTAGTACAG	cry1E	1263-1284
TY1F	CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC	cry1F	2126-2150

(Kalman et al., 1993)

- 2.3.2.2. 反應：每支反應管含dNTP's mix (250  $\mu$ M for each dNTP), primers mix (1.0  $\mu$ M for each primer), template DNA (15 ng/assay), SuperTag DNA polymerase (Protech Technology) (1.25 units/assay), total volume 50 $\mu$ l。負對照組(negative control)不含DNA模板。以DNA熱循環器(Thermal cycler, Perkin E Imer Cetus), 設定反應條件, 第一套引子為94 變性1分鐘、45 煉合45秒、72 延伸45秒, 共35循環。第二套引子為94 變性1分鐘、52 煉合2分鐘、72 延伸3分鐘, 共25循環。
- 2.3.2.3. 膠體電泳：以2.0% agarose gel, 在TAE buffer, E=4.17 v/cm電場強度下, 泳動2.5小時。以ethidium bromide (EtBr)染色, 於360 nm UV光下觀察照相。
- 2.3.2.4. 結果判讀：依表3.及圖1.Carozzi 等人(1991)針對鱗翅目、鞘翅目和雙翅目之結晶蛋白基因所設計之各2對引子, 預期PCR結果判讀第一套引子PCR反應後之電泳圖譜, 鑑定菌株究所含cry1、cry 3、cry 4基因種, 判定可毒殺之目標昆蟲種類。依圖2.Kalman 等人(1993)針對細分cry1基因所設計引子, 預期PCR結果判讀第二套引子PCR反應後之電泳圖譜, 鑑定菌株所含cry1Aa、cry1Ab cry1Ac cry1B cry1C cry1D cry1E 和 cry1F 等基因組成。

表3. 區分毒殺鱗翅目、鞘翅目及雙翅目昆蟲基因之PCR產物分子大小

PCR primers	PCR products (bp) from following genes*						
	cry1Aa	cry1Ab	cry1Ac	cry3A	cry3B	cry4A	cry4B
Lep1A+Lep1B	490	490	490				
Lep2A+Lep2B	986	908	986				
Col1A+Col1B				649	No product**		
Col2A+Col2B				1,060	1,060		
Dip1A+Dip1B						797	797
Dip2A+Dip2B						1,290	No product

\*: cry1Aa, cry1Ab, and cry1Ac are genes coding for crystal proteins active against lepidopterans; cry3A and cry3B code for crystal proteins active against coleopterans, and cry4A and cry4B code for crystal proteins active against dipterans.

\*\* : Expected product on the basis of sequence information.

(Carozzi et al., 1991)

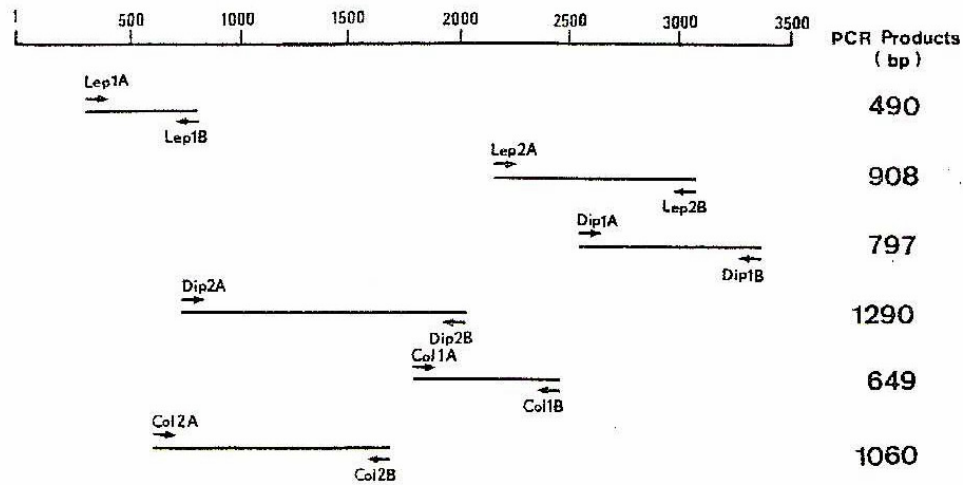


圖 1. 區分毒殺鱗翅目、鞘翅目及雙翅目昆蟲基因之 PCR 位置及分子大小

Fig. 1. Strategy for detection of cry1, cry3, and cry4 genes. Positions of six pairs of PCR oligonucleotide primers relative to those of the corresponding cry genes for amplification of specific cry1, cry3, and cry4 genes fragments are shown. Arrows pointing to the right indicate the locations of forward oligonucleotide primers, whereas arrows pointing to the left indicate locations of reverse oligonucleotide primers. Sizes of specific amplified PCR fragments are indicated. The sequences of all oligoprimer used in this work were previously described.

(From Carozzi et al., 1991)

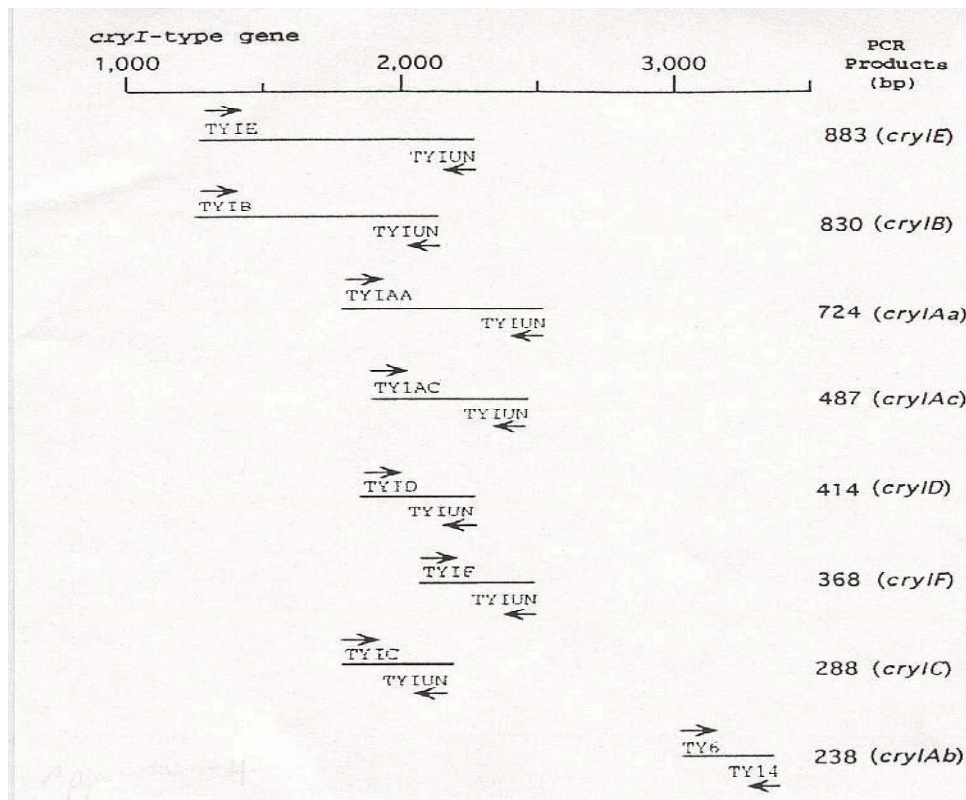


圖2. 區分 cry1-型基因之 PCR 位置及分子大小

Fig. 2. Strategy for detection of cry1 -type genes. Positions of six pairs of PCR oligonucleotide primers relative to those of the corresponding cry genes for amplification of specific cry1-type genes fragments are shown. Arrows pointing to the right indicate the locations of forward oligonucleotide primers, whereas arrows pointing to the left indicate locations of reverse oligonucleotide primers. Sizes of specific amplified PCR fragments are indicated. The sequences of all oligopr imers used in this work were previously described.

(From Kalman et al., 1993)

### 3. 參考文獻：

- 曾經洲。1997。蘇力菌臺灣分離株殺蟲基因之鑑定及選殖。國立中興大學昆蟲學系博士論文。臺中。141頁。
- 段淑人、高穗生、宣詩玲。1993。利用SDS-聚丙烯醯胺膠膠體電泳分析法測定蘇力菌產品中殺蟲結晶蛋白含量。植保會刊 35: 139-148。
- Aronson, A. I., W. Beckman, and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50: 1-24.
- Bruce, K. D., W. D. Hiorns, J. L. Hobman, A. M. Osborn, P. Strike and D. A. Ritchie. 1992. Amplification of DNA from native population of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3413-3416.
- Carozzi, N. B., V. C. Kramer, G. W. Warren, S. Evola and M. G. Koziel. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3057-3061.
- Chak, K. F., D. C. Chao, M. Y. Tseng, S. S. Kao, S. J. Tuan, and T. Y. Feng. 1994. Determination and distribution of cry-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2415-2420.
- Chak, K. F., S. S. Kao, and T. Y. Feng. 1995. Characterization and cry gene typing of *Bacillus thuringiensis*. In *Bacillus thuringiensis. Biotechnology and Environment Benefits. Vol. 1.* (eds. T. Y. Feng et al.). Hua Shiang Yuan Publishing Co., Taipei, Taiwan. pp. 104-123.
- Dunn, M. J. 1993. Gel electrophoresis: proteins. J. M. Graham, and D. Billington, Eds. Alden Press Ltd, Oxford, UK 176pp.
- Hofte, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53(2): 242-255.
- Kalman, S., K. L. Kiehne, J. L. Libs, and T. Yamamoto. 1993. Cloning of a novel cryIC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1131-1137.
- Kalman, S., K. L. Kiehne, N. Cooper, M. S. Reynoso, and T. Yamamoto. 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.

Kao, S. S., C. C. Tzeng, and Y. S. Tsai. 1997. Identification of possibly novel cry-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan by RFLP of PCR-amplified DNA. The 3rd Asia-Pacific conference of Entomology. Abstract p.103. Nov.10-22, 1997.

Kao, S. S., C. C. Tzeng, S. J. Tuan, and Y. S. Tsai. 1996. Isolation, characterization and cry gene typing of *Bacillus thuringiensis* from stored product material samples collected around Taiwan. Rumakom M., (ed.). The Second Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and Its Impact to the Environment. p.132 -151.

Kuo, W. S., and K. F. Chak. 1996. Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1369 -1377.

Lereclus, D., A. Delecluse and M.-M. Lecadet. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. in "*Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice" P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey and S. Higgs. (ed.) p 37 -69. John Wiley and Sons Ltd. Press, England.

McPherson, M. J., P. Quirke and G. R. Taylor. 1991. *PCR A Practical Approach*. 253pp. Oxford University Press, New York.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. E. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

##### 五、品質管制：

1. 所有數據，均需保存以便參考及檢查。
2. 樣品分析時，每個樣品需做二十重複。
3. 重驗樣品需自同件樣品以相同之樣品前處理及實驗步驟分析之。

##### 六、檢驗結果判定：

1. cry1Ac 基因轉殖螢光假單孢菌的蘇力菌產品：
  - 1.1. 可鏡檢觀察出清楚之菌體形態，並且不含有孢子。
  - 1.2. 不能以培養基培養。

- 1.3. 可以電泳分析Cry1Ac蛋白質產物。
  - 1.4. 可以酵素聯結免疫檢定(ELISA)檢測特定Cry1Ac毒蛋白含量。
  - 1.5. 檢驗結果與以上1.1-1.4.不符合者，為偽藥。
2. 一般蘇力菌產品：
- 2.1. 可鏡檢觀察出清楚之毒蛋白結晶及孢子形態。
  - 2.2. 可以培養基培養。
  - 2.3. 二十重複，均應檢出所標示菌種應含有基因之標準圖譜。
  - 2.4. 檢出圖譜與所標示菌種應含有基因標準圖譜相較，二十重複中有七重複(含)以上有缺失，為劣藥。
  - 2.5. 檢出所標示菌種應含有基因標準圖譜以外之基因,達三重複(含)以上者，為偽藥。