

# 利用生物技術來改善蘇力菌殺蟲結晶蛋白

高穗生、曾經洲

## 前 言

雖然蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)產品有空前的成功，但產品目前卻僅侷限於高經濟價值或環境敏感的利基(niche)市場，如蔬菜、森林和病媒防治。蘇力菌之所以沒受到廣泛的接受，部份的原因是因爲蘇力菌與生俱有的生物特性所使然：寄主範圍的特異性；不能夠防治在植物內部或根部取食之害蟲；在葉面由於日光和其他環境因子，使得產品不活化(inactivation)，因而缺少殘效性(residual activity)；在水中由於孢子和結晶的迅速沉降和受到有機粒子的吸附(adsorption)因而缺少殘效性；在土壤中由於土壤微生物的破壞，因而缺少殘效性。這些生物特性都被認爲是蘇力菌的缺點，故而需要增加施用的頻度和次數；需要更精良的施效藥裝置和密集的偵察以改善施藥的時機；換言之，增加了時間和財務的投資(Gelernter and Schwab, 1993)。

蘇力菌仍是一種奢侈品，世界最大栽種面積的作物像棉花，穀物，油料種子和其他中耕作物的農民很少使用蘇力菌(Gelernter, 1992)。要進攻這些市場，或許蘇力菌環境安全的特性，在與施用的花費和使用的困難程度相比較時，其重要性反而低。蘇力菌的某些特性可經由改善配方，嶄新的施用方法，或經由生物技術的方法改變其生物特性而獲得改善。

## 將蘇力菌殺蟲結晶蛋白表現於異源微生物寄主

### 一、細菌寄主

#### (一) 植物保護上之應用：

Skot *et al.* (1990)自黃粉甲蟲亞種(*B. t. tenebrionis*)選殖 *cry3A*(對甲蟲有活性)之殺蟲結晶蛋白基因，並將之表現於植物固氮細菌，荳科植物根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)。豌豆和白色三葉經過接種含有 *cry3A* 基因之重組根瘤菌之後，造成對三葉草根瘤象鼻蟲(*Sitona lepidus*)顯著的死亡率而且根瘤受害減少。

Crop Genetics International 利用所謂 InCide 策略，將蘇力

菌的殺蟲結晶蛋白基因 *cryIAa*，表現於植物内生細菌(endophytic bacterium)木質棒菌(*Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*) 上，可殺死在幼嫩玉米鑽孔為害的玉米螟。利用此法在田間進行至少四年的試驗，測試含有經處理之木質棒菌的多種玉米品種，發現能有效地防治玉米螟(Dimock *et al.*, 1993)。

Mycogen 公司利用嶄新的細胞包覆(cell cap)技術，發展出 MVP 及 M-Trak 兩種產品。此包覆系統涉及兩類細菌種類，生物包裹部分由螢光假單胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)之細胞壁所組成，殺蟲部分則由蘇力菌庫斯塔基亞種(*B. t. kurstaki*)或聖地牙哥亞種(*B. t. san diego*)之殺蟲結晶蛋白所組成。利用重組 DNA 技術，先將殺蟲基因導入質體後，再將質體注入螢光假單胞菌之細胞中。再由醱酵槽大量生產，殺蟲細晶蛋白則於假單胞菌之細胞內產生。然後在醱酵槽中將假單胞菌細胞以熱和化學處理將之殺死，此程序亦能固定假單胞菌之細胞壁，使之變得更硬，死的細胞其硬的細胞壁則成了對包涵之殺蟲蛋白質具有保護性之生物微粒膠囊(microcapsule)。能減少蛋白質因雨、升高的 pH、植物之滲出物、紫外線和其他環境因子的不活化作用。兩種以細胞包覆系統生產的產品 MVP (含有 CryIAc 蛋白質)和 M-Trak(含有 Cry3A 蛋白質)，於 1991 年在美國登記上市，這是以遺傳工程方法產製的生物農藥首次叩關成功的例子(Barnes and Cummings, 1987; Soares and Quick, 1992; Gaertner *et al.*, 1993)。

## (二) 雙翅目害蟲防治：

爲了要延長蘇力菌以色列亞種的效果，有許多研究團隊，曾經調查過，將經選殖過的蘇力菌以色列亞種的毒素基因，表現於目標蚊、蚋相同的水棲環境之微生物上。如此，具雙翅目活性的毒素能持續，且有可能在合適的水的深度中增殖，因而增加了蘇力菌毒素遞送到目標水生昆蟲的機率。

在發展水生轉殖微生物的過程中，Angsuthansombat 和 Panyim(1989)選擇了與許多蚊子棲息處相同(空氣/水 界面)的藍藻細菌(*Agmenellum*)做爲載體(vector)的藍藻細菌(*Escherchia coli*) /*A. quadruplicatum* 的雙功能質體(bifunctional plasmid)，將對雙翅目具活性的 *cry4B* 基因導入藍藻細菌中，產生少量對 Cry4B 蛋白質具免疫活性的蛋白質，亦觀察到對埃及斑蚊幼蟲有某些毒性。並未能發現到結晶蛋白質。至於低毒素含量的表現，可能是由於低的質體拷貝數(copy number)，而且在細胞中毒素降解成 43 kDa 之片段所使然。

Chungjatupornchai (1990)將 *cry4B* 基因或 *cytA* 基因整合到藍藻細菌 *Synechocytis* PCC 6803 之染色體中。毒素基因之表現均受到源自菸草葉綠體基因組 DNA (genomic DNA)的啓動子(promotor) *psbA* 所調控。免疫分析顯示

*cry4B* 基因表現產物，佔有藍藻細菌總共可溶性蛋白質的 0.1-0.2%。其對埃及斑蚊具毒性，但毒素的表現太低，不足以形成蛋白質結晶。此乃由於 *psbA* 啟動子活性低或由於低基因劑量程度(只有一個基因拷貝整合進入 *Synechocystis* 之染色體)所造成。利用相似的免疫分析來分析 *cytA* 之基因表現產物時，發現蛋白質產量僅及於免疫反應之偵測限界，對埃及斑蚊並無活性。在和 *cry4B* 相比較時，*cytA* 之穩定期傳訊核糖核酸(mRNA)量降低近 5 倍，這是為何 CytA 毒素的表現量如此之低的原因。

Murphy and Stevens (1992) 將以色列亞種的 *cry4D* 基因轉殖到與 Augusthanasombat 和 Panyim 報告相同品系的藍藻細菌 (*A. quadruplicatum*)，但 Cry4D 蛋白質的含成量則遠較 Cry4B 為高。

選擇一有效的啟動子以使以色列亞種基因在藍藻細菌有良好表現已被 Soltes- Rak *et al.* (1993) 所證實，他們比較利用不同啟動子，將 *cry4B* 基因導入藍藻細菌 *Synechococcus* 時，觀察 Cry4B 蛋白質表現的程度，發現 Cry4B 蛋白質產量因啟動子的不同而有所差異，其表現程度依次為 *lacZ* 啟動子 + *cry4B* 啟動子 > *Synechococcus petF1* 啟動子 > 原有 *cry4B* 啟動子。Thanabalu *et al.* (1992) 曾將以色列亞種表現 130 kDa 之 *cry4* 基因或圓形芽孢桿菌 (*B. sphaericus*) 表現 51 kDa 和 42 kDa 之基因，轉殖到不營光合作用之細菌新月莖菌 (*Caulobacter crescentus*) 上，此菌為無處不在的水棲微生物，亦為蚊類幼蟲的自然食物源。

目前的研究尚未篩選出作為商品化生產的候選品系，主要的原因在於技術需更進一步的提升(如提高毒蛋白的產量使其有商品競爭性)。即使此一目標已達成，更要克服面臨的法規挑戰，始克有成，尤其是重組細菌的標的害蟲又是水棲昆蟲，更是困難重重，日後若是技術層面能有所突破，而且遺傳工程產品之風險評估規範業經建立完成，則有實際應用之機會。

## 二、病毒寄主

利用蘇力菌 ICP 轉殖於病毒之目的在於縮短昆蟲因病毒致死的時間，減少昆蟲之取食為害。Merryweather *et al.* (1990) 成功地將來自蘇力菌鮎澤亞種的 *cry1Ac* 基因，使其於表現在含多角體基因(polyhedrin plus)和不含多角體基因(polyhedrin minus)之重組加州苜蓿夜蛾核多角體病毒 (*Autographa californica* MNPV, AcMNPV)。他們利用免疫分析來確認 130 kDa ICP 之表現，此外，亦觀察到 62 kDa 及 44 kDa 之降解產物。Martens *et al.* (1990) 亦成功地將來自庫斯塔基亞種之 *cry1Ab* 基因表現到不含多角體基因之重組 AcMNPV 上。當草地粘蟲 (*Spodoptera frugiperda*) 之組織培養細胞以重組病毒感染時，細胞質出現病毒粒子和對 Cry1Ab 130 kDa 蛋白質有免疫反應的結晶蛋白。由於

表現程度相當高，CryIAb 蛋白質佔整個細胞蛋白質的 5%。

雖然這些實驗室均能以轉殖桿狀病毒生產相當高產量的 ICP，但均不能使鱗翅目幼蟲致死的速度加快。應進一步研究其原因何。上述之轉殖病毒其 ICP 是產生在病毒感染的細胞內，因而毒性小甚或無毒性。應努力開發一轉殖病毒，能將 ICP 運輸到受感染的中腸細胞外，而達到微絨毛膜 (microvillar membrane) 上，而改善其殺蟲活性 (Gelernter and Schwab, 1993)。

## 利用微生物包覆

爲了要克服低基因表現之障礙及基因重組生物之法規限制，並必需將以色列亞種多重毒素均能表現，Ben-Dov 曾提出一個居間的解決方案。即是將蘇力菌以色列亞種孢子和結晶製劑包覆於水生原生動物梨形四膜蟲 (*Tetrahymena pyriformis*) 中。在模擬的田間狀況下，已顯示出增加了以色列亞種毒素之持續性。這些觀念的形成是由於觀察將以色列製劑施於水域中，發現存活於空氣與水界面的原生動物梨形四膜蟲會取食以色列亞種之毒素並將之貯存於其食物空泡中 (food vacuoles)。當蚊子幼蟲取食原生動物梨形四膜蟲細胞時，亦將以色列亞種的毒素取食。Ben-Dov 等人亦指出在模擬水域系統中添加梨形四膜蟲會使蘇力菌以色列亞種之持續性由 24 小時延長到 71 小時。在這種情形下並無需利用遺傳工程，這個系統即能達到增進以色列亞種的持續性之目的，也不會遭到法規和開發的困境 (Gelernter and Schwab, 1993)。

## 以操縱殺蟲結晶蛋白基因來改善蘇力菌品系

近幾年來，由於對蘇力菌殺蟲活性的分子遺傳基礎有更一步的瞭解，使得利用嶄新的品系改良技術以獲得優良品系，遠較傳統的品系分離和生物檢定篩選計畫，有更大的潛力。遺傳改進技術可循兩個層次的策略來進行：

一、利用非重組技術 (non-recombinant approach) 來進行品系改良，以發展更優良的產品。

二、利用分子生物學和重組 DNA 的技術來開發新產品。

(一) 利用質體去卻和結合傳輸進行品系改善：

Ecogen 公司利用質體去卻 (plasmid curing) 和結合傳輸 (conjugal transfer) 的方法來衍生 EG2424 品系，此品系爲商品 Foil 之主要成分。兼具防治歐洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 和科羅拉多馬鈴薯甲蟲 (*Leptinotarsa decelneata*) 之功能。將含有 88-MDa 質體 (能譯錄 73 kDa 之 Cry3A 蛋白質) 之

EG2158 品系作為供應體(donor)，而把經過去卻，但含有 60-MDa 質體【能譯錄 133kDa 之 Cry1Ac 蛋白質】之 HD-263-8 作為接受體(recipient)作結合，得到的轉輸接受體(trans-conjugant)為 EG2421 品系，兼具二種質體。再將含有 44 MDa 質體【能譯錄 133 kDa 之 Cry1Ac 蛋白質】之 HD-279-1 品系引入 EG2421，成為 EG 2424 品系，此品系自三個親本品系獲得三個質體：自 EG2158 獲得 88-MDa 之質體能譯錄 Cry3A 蛋白質；自 HD-279-1 和 HD-263-8 分別獲得能譯錄 Cry1Ac 蛋白質之 44-和 60-MDa 之質體(表 1)。故 EG2424 品系在芽孢生殖時，能生產 Cry3A 和 Cry1Ac 蛋白質，分別形成菱形和雙金字塔形的結晶(Carlton,1994; Carlton and Gawron-Burke, 1993)。

(二) 利用重組 DNA 技術進行品系改善：

Crickmore *et al.* (1990)首先成功地將經選殖過的蘇力菌基因導入天然的蘇力菌菌株，而增加了蘇力菌的殺蟲範圍。利用電穿孔的方法(electroporation)將具有殺鞘翅目活性的 *cry3A* 基因傳輸到以色列亞種中。獲得的轉殖蘇力菌除了對鞘翅目和蚊類有活性外，尚意外的對粉蝶(*Pieris brassicae*)表現殺蟲活性。當將含有對鱗翅目有活性的 *cry1Ab* 的基因被導入黃粉蟲甲亞種(此亞種對鞘翅目具活性)之後，意外的對蚊類具有活性。這些實驗顯示，殺蟲結晶蛋白質相互作用具有協力性，能夠殺死個別殺蟲蛋白質單獨存在時所不能殺死的蟲隻，也就是說具有增廣殺蟲範圍的效應。

Carlton and Gawron-Burke (1993)，利用蘇力菌的往返載體系統(shuttle vector system)建造一個嶄新之 EG2424 品系的重組衍生品系 EG7618。此嶄新的重組品系，能產生一獨特而混合具有鞘翅目和鱗目活性的殺蟲結晶蛋白，和 EG2424 的混合結晶蛋白有明顯的不同。利用電穿孔的方法，將譯錄 Cry3B2 (具有殺鞘翅目活性的蛋白質約 70-kDa)之重組 ICP 質體 PEG894 導入 EG2424，取代含 *cry1Ac* 基因的 60-MDa 質體，產生之 EG7618 品系則含有兩個具鞘翅目活性的 ICP (Cry3A 及 Cry3B2)和 1 個具鱗翅目活性的 ICP (Cry1Ac) (表 1.)。

表 1. ICP gene content of *Bt* strains EG2424 and EG7618 (Carlton and Gawron-Burke,1993)

| Strain | ICP Genes/Location <sup>a</sup> | ICPs   | Insecticidal activity <sup>b</sup> |
|--------|---------------------------------|--------|------------------------------------|
| EG2424 | <i>cry1Ac</i> /44 MDa           | Cry1Ac | ECB                                |
|        | <i>cry1Ac</i> /60 MDa           | Cry1Ac |                                    |
|        | <i>cry3A</i> /88 MDa            | Cry3A  |                                    |
| EG7618 | <i>cry1Ac</i> /44 MDa           | Cry1Ac | ECB                                |
|        | <i>cry3A</i> /88 MDa            | Cry3A  | CPB                                |
|        | <i>cry3B2</i> /pEG894           | Cry3B2 | CPB/SCRW                           |

<sup>a</sup> Refers to the native ICP plasmid pEG894 contains the *ori60* *Bt* replicon.

<sup>b</sup> ECB, European corn borer; CPB, Colorado potato beetle; SCRW, Southern corn rootworm.

由於 Cry3 的譯錄基因增加，故較 EG2424 產生之 Cry3 蛋白量為高，故在醱酵過程中具鞘翅目活性的蛋白質的產量獲得改進。EG7618 具有殺歐洲玉米螟，柯羅拉多馬鈴薯甲蟲，及瓜十一星葉甲蟲(*Diabrotica undecimpunctata howardi*)之活性。EG7618 仍具抗生素抗性之標誌基因(Cm<sup>r</sup> marker)，1991 和 1992 年曾在田間進行測試。後來將此標誌基因除去，產生衍生品系 EG7673，此品系則除含 ICP 基因外，無任何外來 DNA，在 1993 年田間試驗成果良好。已向美國環境保護署提出註冊申請，此新產品將於 1995 年上市(Donovan *et al.*, 1992; Rupar *et al.*, 1991; Carlton and Gawron-Burke, 1993; Carlton, 1994)。本所亦成功地利用 PCR 技術，從臺灣本土分離所得之蘇力菌，複製出 3.6 kb 之 *cryIac* 基因片段，該片段有 8 個氮鹽基不同於 *Bt kurstaki* HD-1，並造成 3 個胺基酸的改變及 1 個胺基酸的刪減，經與蘇力菌表現載體 pSB909.5 構築成 pIacSB 質體(圖 1.)，送入無質體蘇力菌 Cry<sup>-</sup>B，產生 130 kDa 蛋白質產物，且形成圓型之結晶(圖 2A.)，與複製該基因之原始母株的標準菱型結晶(圖 2B.)不同，並對小菜蛾(*Plutella xylostella*)及紋白蝶(*Artogeia rapae*)幼蟲，有良好的殺蟲活性(曾，1997)。

## 基因轉殖作物

利用農桿菌(*Agrobacterium*)媒介之基因轉殖技術已成功地將蘇力菌 ICP 基因轉殖到菸草(Vaeck *et al.*, 1987; Barton *et al.*, 1987; Perlak *et al.*, 1991); 番茄(Fishoff *et al.*, 1987; Vaeck *et al.*, 1989; Perlak *et al.*, 1991); 馬鈴薯(Vaeck *et al.*, 1989); 棉花(Perlak *et al.*, 1990)。Vaeck *et al.* (1987)將蘇力菌之 *cryIab* 基因整合到腫瘤農桿菌(*A. tumefaciens*)，之 Ti 質體上，並以之為載體，將之導入菸草細胞中。再生的植株得到毒素基因，可產生毒蛋白。大多數的植物均表現高的殺蟲活性，有 2/3 的植物，能成功地表現導入之基因，造成菸草天蛾(*Manduca sexta*)幼蟲 75%之死亡率。具有全長度(full length)之基因者則無明顯的殺蟲活性，但經過節略(truncated)之基因(將蘇力菌 ICP 基因 C'端去除，而保有具殺蟲活性的 N'端)其殺蟲效果獲得改善。Barton *et al.* (1987)亦證實含全長度的 *cryIaa* 基因之轉殖菸草亦無殺蟲效果。Fishoff *et al.* (1987)將之源自蘇力菌庫斯塔基 HD-1 之 *cryIab* 基因轉殖到番茄上，轉殖番茄對菸草天蛾具抗性，亦呈現對菸草青蟲(*Heliothis virescens*)和玉米穗蟲(*H. zea*)有某些抗性。Vaeck *et al.* (1989)利用經過節略之 *cryIab* 基因轉殖到番茄和馬鈴薯，結果轉殖植物已測出 ICP 之表現。Perlak *et al.* (1990)將經過節略的 *cryIab* 基因轉殖到棉花上，發現野生型

(wild-type)雖然經過節略，其於轉殖棉花上之 ICP 量不足以防治最敏感的害蟲。其原因是由於不同生物對譯碼(codon)偏好性不同所使然，將 *cryIAb* 的結構基因加以修飾(modification)，但不改變其譯錄之氨基酸序列，改造後之基因僅保留和野生型有 20% DNA 之同源性(homology)，因而改變了譯碼的偏好性。以西方墨點法分析發現，經節略後又經修飾後在棉花中 ICP 的表現，為經節略而未經修飾的野生型的 25-50 倍。Perlak *et al.* (1991)將 *cryIAb* 基因轉殖到番茄和馬鈴薯，比較結構基因經節略後再經不同程度之修飾後，其殺蟲基因在轉殖植物上之表現。野生型基因則未經修飾，部分修飾基因其譯碼有 9.5% 的改變，全部修飾基因其譯碼有 60% 的改變。結果顯示，部分修飾之 *cryIAb* 基因，其表現超過野生型 *cryIAb* 基因 10 倍，而全部修飾基因則超過 100 倍。表現程度之增加導致其對菸草天蛾之殺蟲效果的增加。Koziel *et al.* (1993)利用 microprojectile bombardment 技術，將經過節略的 *cryIAb* 基因導入玉米未成熟的胚中。將轉殖玉米之親近交配植株與商品親近交配系交配，產生雜交之玉米植株，在田間測試其對玉米螟蟲之抗性，發現含高濃度 ICP 者表現極為優異。Fujimoto *et al.* (1993)利用電穿孔之技術，將經節略過的 *cryIAb* 基因轉形到蓬萊米之原生質體(protoplast)所得之轉殖水稻能對二化螟(*Chilo suppressalis*)和瘤野螟(*Cnaphalocrocis medinalis*)有殺蟲的效果。

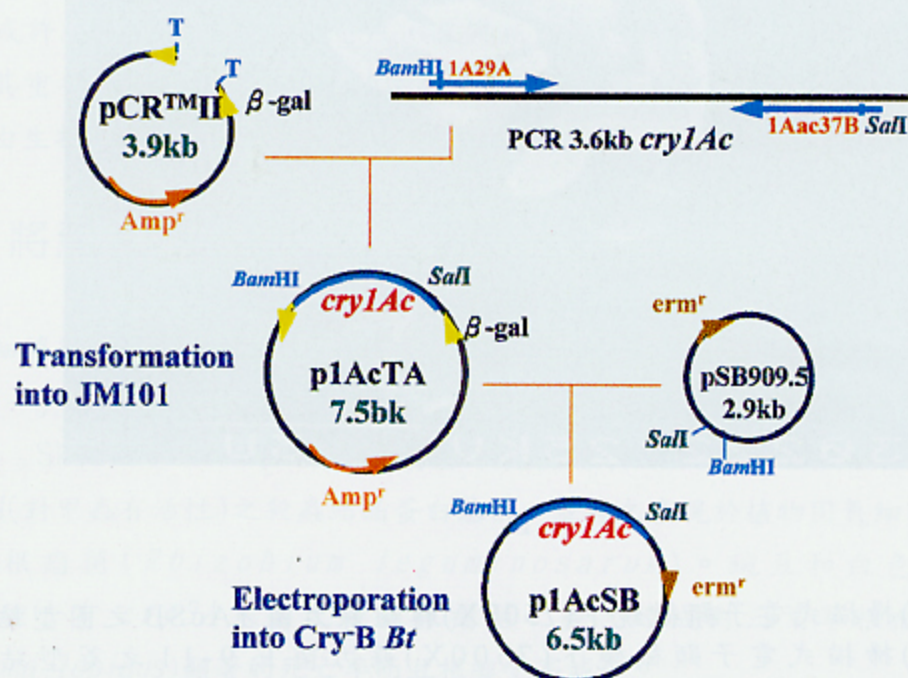
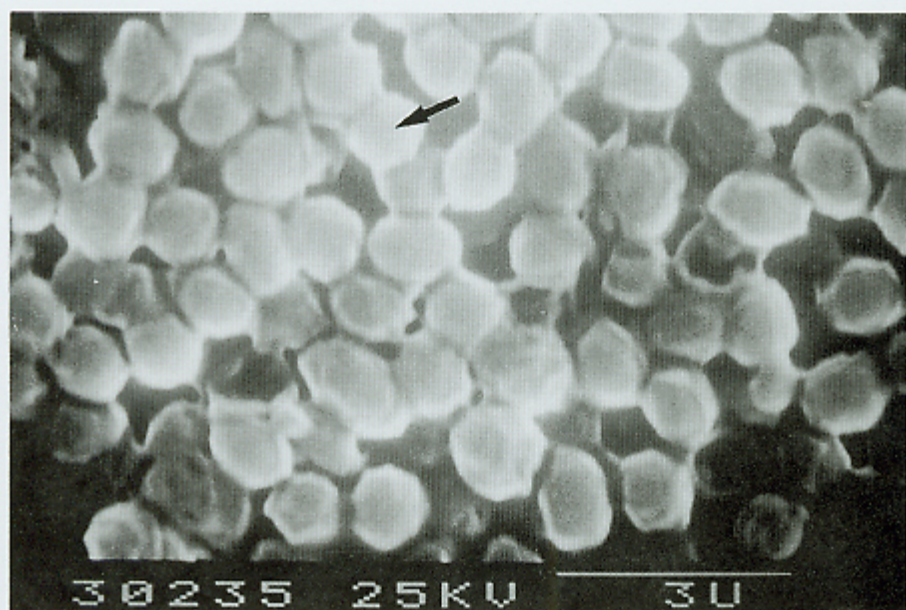
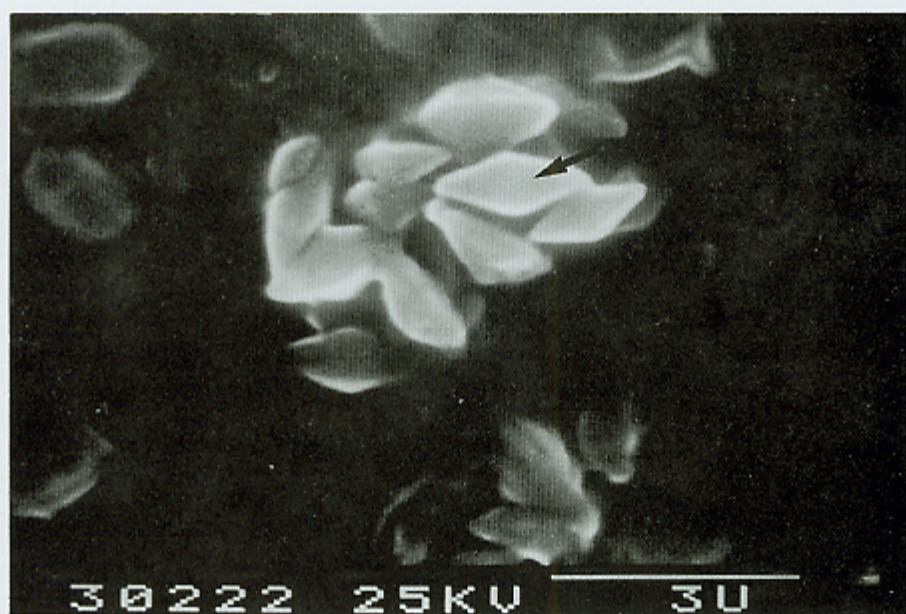


圖 1. 1AcSB 質體之構築。



A



B

圖 2.(A)掃描式電子顯微鏡下(7500X)轉殖蘇力菌 1AcSB 之圓型結晶，  
(B)掃描式電子顯微鏡下(7500X)蘇力菌 E 9-11 之菱型結晶。