

蘇力菌臺灣分離株 *cryI*Ac 基因之 選殖及表現測試

曾經洲^{1*} 高穗生¹ 陳良築² 翟建富³ 侯豐男⁴

1. 臺中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所
2. 臺中市 國立中興大學分子生物研究所
3. 臺北市 國立陽明大學生物化學研究所
4. 臺中市 國立中興大學昆蟲學系

(接受日期：中華民國 91 年 8 月 31 日)

摘 要

曾經洲*、高穗生、陳良築、翟建富、侯豐男 2002 蘇力菌臺灣分離株 *cryI*Ac 基因之選殖及表現測試 植保會刊 44 : 185-208.

將蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*) 臺灣分離株 E 9-11 之 *cryI* Ac 基因, 以 PCR 增幅出含有轉錄起始位置及核糖體結合位置之 3.6 kb 片段, 將此片段送入無質體蘇力菌 Cry⁻B, 轉殖菌株成功表現出 130 kDa 蛋白質產物 (1AcSB), 形成圓型或短橢圓結晶。核酸定序列發現與 Btk HD-73 的 *cryI* Ac 核酸序列有 8 個核苷酸不同, 總共是 4 個氨基酸不同。該轉殖菌對小菜蛾幼蟲效果較遲緩, 但後續具良好的殺蟲活性, 處理後 72 小時, 死亡率與市售商品對照菌株如 Xentari、Delfin 及同為只含 *cryI* Ac 基因的 HD-73 相仿。1AcSB 毒素對紋白蝶幼蟲之影響, 在處理後 24 小時之低濃度可見到促進取食的效果; 處理後 48 小時不論高低濃度均顯示良好的抑制取食效果; 至處理後 72 小時抑制效果更顯著, 供試幼蟲幾乎全部停止取食, 並且顯現無恢復取食能力之現象, 效果較其他各處理菌株良好。推測以 1AcSB 毒素低濃度處理小菜蛾及紋白蝶幼蟲所呈現的特殊毒效, 其原因可能是初期的促進取食, 使蟲體食入更多的毒素劑量而中毒較深。若是如此, 則該轉殖結果正符合促進取食殺蟲之效力。是否因結晶不易被活化及分解而改變, 有待深入探討。

(關鍵詞：斑潛蠅、蘇力菌、臺灣分離株、*cryI* Ac 基因、選殖、表現測試)

* 通訊作者。E-mail: cctzeng@tactri.gov.tw

緒 言

植物病蟲害一直是我國農業生產之主要限制因素，隨著國人對環境生態保護意識的警醒，消費者對高品質和無殘毒果蔬的要求等。為謀求農業的永續經營，過去偏重化學農藥的防治策略，已被調整加入生物農藥作整合性的病蟲害管理⁽⁶⁾。蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*) 可產生殺蟲結晶蛋白，被認為最具殺蟲效果的微生物防治劑^(7, 56, 63)，因此蘇力菌是生物農藥應用中的一大主流，積極研發本土性蘇力菌為時勢所趨。臺灣存在著豐富的蘇力菌自然資源，應當繼續篩選分離、鑑定及大量進行生物活性測定，以發掘更多的可利用菌種及新的殺蟲結晶毒蛋白基因 (*cry* 型基因)，並經由基因轉殖的技術，將所選獲的蘇力菌殺蟲基因加以重組、改造，以應付對某些蘇力菌殺蟲基因產物已產生抗性的昆蟲，及增廣殺蟲範圍，並落實該項生物技術到產業生產，以造福大眾。本研究自臺灣本土蘇力菌菌株選殖 *cryI Ac* 基因，將可不受國外所有權的限制，供本國產業生產、農民使用。殺蟲蛋白基因之研究，從早期於 *Btk* HD-1 選殖出 *cryIAa* 基因⁽⁶⁶⁾，至目前已有大量種植基因改造作物 (GMO)⁽⁷⁾。1985 年從 *Bt kurstaki* HD-73 選殖出 *cryI Ac* 基因⁽⁸⁾，有全長^(8, 14, 46, 55, 64)及截短者^(4, 60)。但由全長 3,537 nt 的 *cryI Ac* 基因，送到 *E. coli* 可表現出 133.3 kDa (1178 a.a.) 之毒蛋白，由於 N 端 68 kDa 為毒性多肽區，若經截短成 1836 nt 時，68 kDa 蛋白質毒性表現程度不如全長基因⁽⁸⁾；而截短的 *cryI Ac* 基因，產生的蛋白質只有 N 端起之 970 胺基酸，對歐洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 的效果不如 *Bt kurstaki*⁽⁶⁰⁾。不同來源的相同基因，會有不同的殺蟲活性，例如自 *Bt kurstaki* 和 *Bt kenya* 選殖之 *cryI Ac* 基因，送入 *Bacillus* 寄主品系後，結果顯示來自 *Bt kurstaki* 品系的 CryIAc，

較來自 *Bt kenya* 的 CryIAc，對小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 及歐洲玉米螟的活性為佳⁽⁶⁴⁾；來自 HD-1 的 *cryI Ac* 基因所產生的毒蛋白，對擬尺蠖 (*Trichoplusia ni*) 的毒性，比來自 HD-73 者為佳⁽⁵⁰⁾。本研究以本土所分離蘇力菌之基因進行選殖。以 *cryI Ac* 基因序列⁽⁸⁾設計可以增幅全長序列之引子，以分離自本土倉庫之蘇力菌 E9-11 為模板 (template)，進行聚合-連鎖反應增幅 *cryI Ac* 基因核酸，構築成表現質體，轉殖入不含質體之蘇力菌宿主，測試其表現及毒效。

材料與方法

蘇力菌殺蟲基因之選殖 菌種培養

E9-11 蘇力菌菌株係分離自花蓮縣鳳林鄉農會穀倉，利用 *cryI*-type 引子 PCR 及 PCR-RFLP 鑑定，確定含 *cryI Ac* 基因⁽³⁹⁾，在 LB 液體培養基 (Luria-broth medium: 1% trypton, 0.5% yeast, 1% NaCl, pH7.0) 於 28°C, 1.75 xg 下隔夜培養，再取 1/10 量依同條件繼代培養 3 小時。以質體製備套組 (EasyPrep™ System with Plasmid Prep Kit, Pharmacia Biotech)，利用鹼溶的方式⁽⁵⁷⁾，進行 DNA 萃取。

大腸桿菌勝任細胞 (competent cell) 之製作

將大腸桿菌 JM101 菌種，之單一菌落在 3ml LB 液體培養基，以 37°C, 1.75 xg 隔夜培養。取 1ml 至 100ml 之 LB 液體培養基，37°C, 1.75 xg 繼代培養 2hr，至 OD₅₈₀=0.3-0.6。菌液放入 4°C 冰浴 15min，其後 4°C, 6300 xg 離心 5min。去上清液，以 4°C, 90ml CaCl₂/Tris-HCl (50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl pH8.0) 洗液重懸浮，同前條件再離心。去上清液，以 4°C, 45 ml CaCl₂/Tris-HCl 洗液重懸，同前再離心。再

去上清液，以 4°C，3 ml CaCl₂/Tris-HCl 洗液重懸浮，置於 4°C 冰上 2hr，加入 60% 甘油 (glycerol) 1 ml，分裝，置 4°C，1hr，移入 -70°C 保存備用⁽⁵⁷⁾。

目標基因之引子設計之增幅

根據已發表 *cryI Ac* 基因核酸序列⁽⁸⁾，設計合成 2 段可增幅全長 *cryI Ac* 基因之引子，正向 1A29A：5' TTAACACCCT **GGATCC**AAAATTGATATTT 3'，及逆向 1Aac37B：5' TTAAA CCTGAGTTT**GCA GTCGACT**TATTCCTCCATAAG 3'，5' 端從 -154 個核苷酸 (nt) 位置開始，以便包含轉錄起始位置 (initiation of transcription)⁽⁸⁾，及 -12 至 -8 nt 的核糖體結合位置 (ribosome binding site)⁽⁶¹⁾。並在 1A29A 正向引子設計一個 *Bam*HI 的限制切位，在 1Aac37B 逆向引子設計一 *Sal*I 限制切位 (粗體劃線部分為修改為限制切位之處)。

預計會有 3.7 kb 之 PCR 產物。聚合連鎖反應^(13, 15, 37, 38, 47)：每支反應管含 dNTP's mix (250 μM for each dNTP)，primers (1.0 μM for each primer)，template DNA (15 ng/assay)，SuperTag DNA polymerase (Protech Technology) (1.25 units/assay)，total volume 50 μl。以 DNA 熱循環器 (Thermal cycler, Perkin Elmer Cetus 480)，並使用 DynaWax (Finnzymes Oy 出品)，預先將 primers、template DNA 分於下層，dNTP's mix、Taq polymerase 分於上層。反應條件，為 94°C 5min；第一階段 94°C 1min，42°C 2min，72°C 5min，10 循環；第二階段 94°C 1min、50°C 2min 10sec，72°C 5min，10 循環；第三階段 94°C 1min，52°C 2min 10sec，72°C 7min，10 循環；第四階段 94°C 1min，55°C 2min 30sec，72°C 15min，1 循環；4°C 保存。反應產物以 1.0% 洋菜膠體 (agarose gel)，在 TAE buffer，E = 8.33 v/cm 電場強度下，電泳 30 min。以 ethidium

bromide (EtBr) 染色，於 UV 光下觀察 3.7 kb 產物並照像。

中間質體之構築之轉殖入腸桿菌

聚合連鎖反應含突出 A 尾之 3.7 kb PCR 產物，以 GENE CLEAN[®] II KIT (BIO 101, Inc.) 作回收。回收後，經膠體電泳確認並定量，與突出 T 尾之 pCR[™] II 載體 (vector) (Invitrogen Co. 出品的 Original TA Cloning[®] Kit) 進行結合 (ligation) 成 1AcTA 質體。將 1AcTA 質體，進行 *E. coli* 的質體轉型 (transformation)，轉殖入 CaCl₂ 處理過之大腸桿菌 JM101⁽⁵⁷⁾，以 APK X-gal 平板培養基 (Luria-agar plate: 1% trypton, 0.5% yeast, 1% NaCl, pH7.0，含 100 μg/ml ampicillin, 100 μg/ml kanamycin, 25 μg/ml X-gal, 20 μg/ml IPTG) 進行篩選⁽⁵⁷⁾。挑 10 個白色菌落，並經酵素切割確認挑出轉殖成功者。

蘇力菌 Cry⁻B、Bt51 無質體之受體細胞的製作

將 Cry⁻B⁽²⁴⁾ 與 Bt51 兩株無質體之蘇力菌突變株，各挑單一菌落在 5 ml BHIS 液體培養基 (BHI/sucrose medium: 1:1 mixture of 2X Brain Heart Infusion (Difco) and 1M sucrose)，37°C，1.75 xg 隔夜培養。取 0.5 ml 至 50 ml 之 BHIS 液體培養基，37°C，1.75 xg 繼代培養 3.5 小時，至 OD₆₀₀ = 0.2-0.25。菌液放入 4°C 冰浴 30 分鐘，4°C，4030 xg 離心 10 分鐘。去上清液，以 4°C，50 ml Hepes/Sucrose 洗液 (以 10mM Hepes pH7.0 與 1M sucrose 混合) 重懸，同前再離心。去上清液，以 4°C，25 ml Hepes/Sucrose 洗液重懸，同前再離心。去上清液，以 4°C，12.5 ml Hepes/Sucrose 洗液重懸，同前再離心。再去上清液，以 4°C，6 ml Hepes/Sucrose 洗液重懸，加入 50% 甘油 1.5 ml，分裝每支 200 μl，置 4°C，1 小時，移入 -70°C 保存備用⁽⁵⁹⁾。

蘇力菌表現質體之構築

以含 100 ppm ampicillin 之 LB 液體培養基，培養含 1AcTA 質體之大腸桿菌轉殖株，以質體製備套組 (EasyPrep™) 抽取純化 DNA，經 *Bam*H I、*Sal* I 限制 (Gibcol BRL) 剪切，回收 3.6 kb 片段，與已經 *Bam*H I、*Sal* I 限制 (Gibcol BRL) 剪切之蘇力菌殺蟲結晶蛋白基因之有效表現載體 pSB909.9 (蘇力菌殺蟲結晶蛋白基因之有效表現載體) 接合⁽⁵⁷⁾。

電穿孔法

取蘇力菌 Cry⁻B、Bt51 無質體之受體細胞 40 μ l，置冰上解凍，加入 2 μ l 接合質體，混合均勻置冰上 1 分鐘。使用 Bio-Rad Gene-Pluser 進行電擊 (electrotransformation)，設定條件為 1.25 kV、3 μ F、 ∞ R，將 p1AcSB 質體擊入 Cry⁻B、Bt51 蘇力菌無質體之受體⁽¹⁹⁾。電擊完畢立刻加入 400 ml BHIS 液體培養基，移入離心管，37 $^{\circ}$ C，1.75 xg 培養 3.5 小時，以 Erm LA 平板培養基 (含 100 μ g/ml erythromycin 之 Luria-agar plate: 1% trypton, 0.5% yeast, 1% NaCl, 1.5% agar) 進行篩選^(57, 59)和電穿孔 (electroporation)⁽⁴⁸⁾。

SDS-聚吡喃醯胺膠體電泳分析 (SDS-PAGE)

將 1AcSB 轉殖蘇力菌於 CYS 液體培養基 (CYS medium)⁽⁶⁸⁾: (1.0% casitone, 0.5% glucose, 0.2% yeast extract, 0.1% KH₂PO₄, 0.5mM MgCl₂, 0.05mM MnCl₂, 0.05mM ZnSO₄, 0.05mM FeCl₃, 0.2mM CaCl₂)，28 $^{\circ}$ C、1.75 xg 培養 5 天，至孢子與晶體大部分均已解離，進行電泳分離^(2, 25)。

光學顯微鏡觀察

取蘇力菌菌液稀釋，於位相差顯微鏡下，以 1,000 倍油鏡，觀察其菌體及內含結晶之形態。

掃描式電子顯微鏡觀察

自然解離之蘇力菌孢子與晶體的混合液，點於掃描式電子顯微鏡觀察載物台，自然乾燥之標本於真空狀態下覆上金箔，以 7,500 倍放大倍率下觀察蘇力菌之結晶形態並照相⁽²⁰⁾。

核酸定序

挑選單一之轉殖蘇力菌 1AcSB 的菌落，於 LB 液體培養基，28 $^{\circ}$ C 恆溫振盪，繼代大量培養。以質體製備套組 (QIAGEN Plasmid Midi Kit)，進行質體核酸抽取純化⁽⁵⁷⁾。*cry* I Ac 基因序列⁽⁸⁾，每 400 nt 設計合成一條 20 nt 引子，使用 ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) 進行核酸定序反應，以 ABI Prism 377A DNA Sequencer, Perkin Elmer 進行膠體電泳及記錄結果。

轉殖株初小葉蛾幼蟲活性測試

供試樣品之製備及總蛋白量分析

含構築中間質體 (p1AcTA) 之大腸桿菌 1AcTA、僅含表現載體 (pSB909.5) 之蘇力菌 SB909.5、無質體蘇力菌 Cry⁻B、蘇力菌轉殖株 1AcSB 1-4，本土野生蘇力菌 E9-11 及蘇力菌商品 Xentari 及 Delfin。以 30ml NB 液體 (Luria-broth medium: 1% trypton, 0.5% yeast, 1% NaCl, pH7.0) 培養基於 28 $^{\circ}$ C^(18, 53)，1.75 xg，振盪培養 5 天。離心沉澱，再以等量無菌水 4 $^{\circ}$ C，4030 g，10 分鐘沉澱清洗三次，並濃縮體積為 10ml，並以超音波均碎機 (sonicator) 均碎，取全液測定蛋白質含量。以 Pirece 23225X 之蛋白質含量檢定套組 (Biurate reaction, ABS at 562nm)，以胎牛血清蛋白 (BSA) 為標準劑，測定供試蘇力菌總蛋白濃度^(12, 51)，其後調整樣品之濃度備用。

生物活性檢定

小菜蛾大量飼養^(3, 43)，選 3 齡幼蟲供

試。甘藍葉片，以模型裁成圓型葉片（15 cm²），置於直徑 9 cm 之培養皿中，放在炮管式噴藥塔（Potter spray tower）下，調整壓力為 5 psi/cm²，以每 1 ml 之蘇力菌樣品液噴施各葉片正反面，對照組以水處理，葉片陰乾後，每片接入 10 隻 3 齡小菜蛾幼蟲^(10, 44)，置 25°C、75%RH，L:D=12:12 之定溫箱中，24 小時後觀察記錄死亡數，測量葉面積，並更換新葉片，於處理後 48 小時、72 小時分別再觀察記錄死亡數，測量葉面積，並更換新葉片，並求出葉面積縮減率。

三種鱗翅目昆蟲之生物活性表現測試

供試蘇力菌樣品來源

BtW (*B. thuringiensis wuhanensis*) 為 BtE 及 BtH 的 *cry* 基因來源母株⁽⁴¹⁾；BtE (*cryIbdl* 基因轉殖於不含質體之 *Bt51* 寄主蘇力菌之轉殖菌)⁽⁴¹⁾；BtH (*cryIGbl* 基因轉殖於不含質體之 *Bt51* 寄主蘇力菌之轉殖菌)⁽⁴¹⁾；SB909.5 (與 BtE、BtH、1AcSB 構築，可以轉殖入蘇力菌之載體 (pSB909.5))；E 9-11 (本土野生蘇力菌菌株)；1AcSB (*cryIac* 基因轉殖於不含質體之 *CryB* 寄主蘇力菌之轉殖菌)；Xentari、Delfin (蘇力菌商品對照株)；HD-73 (蘇力菌對照株)

供試蘇力菌產物之製備及總蛋白量分析

使用 CYS 培養基^(38, 68)，培養蘇力菌殺蟲結晶毒蛋白，供毒性測試用。以 NA 平板 (Nutrient agar plate: 0.5% pancreatic digest gelatin, 0.3% beef extract, 1.5% agar) 活化供試蘇力菌菌株，移入 5 ml 之 CYS 培養基，28°C 下、1.75 xg，振盪隔夜；再移入 250 ml 凸底燒瓶的 50 ml CYS 培養基，繼續在 28°C、0.63 xg 下，振盪 5 天。4800 xg 離心沉澱 10 分鐘，倒去上清液，沉澱物以 50 ml 緩衝液 (10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM EDTA)，重覆沉澱洗三次

後，再懸浮備用。同前測定供試菌液總蛋白濃度，並調整樣品之濃度備用。

生物活性檢定

1. 小菜蛾幼蟲與紋白蝶幼蟲之檢定

小菜蛾的飼養同前；紋白蝶 (*Artogeia rapae*) 幼蟲大量採自本所未施用殺蟲劑之甘藍菜田，室內飼養二日後，選 3 齡幼蟲 (平均體重， $M \pm SD = 67.2 \pm 10.2$ mg) 供試。小菜蛾幼蟲檢定同前；紋白蝶幼蟲檢定部分，取甘藍葉片，以模型裁成圓型葉片 (45 cm²)，置於直徑 9 cm 之培養皿中，放在炮管式噴藥塔 (potter spray tower) 下，調整壓力為 5 psi/cm²，以每 1 ml 之蘇力菌樣品液噴施各葉片正反面。對照組以水處理，葉片陰乾後，每片接入 3 隻 3 齡紋白蝶幼蟲 (平均體重為 67.2 ± 10.2 mg)，置 25°C、75% RH、L:D=12:12 之定溫箱中。經 24 小時後觀察記錄死亡數，測量葉面積，並更換新葉片，於處理後 48 小時、72 小時分別再觀察記錄死亡數，測量葉面積，並更換新葉片。各供試之蘇力菌樣品對小菜蛾幼蟲之生物活性，依各處理濃度與死亡數，以對機數分析法 (Probit analysis)⁽²⁷⁾ 分析。各供試之蘇力菌樣品對紋白蝶幼蟲之生物活性，依各處理濃度求出校正葉面積取食率，並將各處理後不同觀察時間之濃度 (ppm) 取對數與校正葉面積取食率【校正葉面積取食率 = (新葉面積 - 剩葉面積 - 自然縮減面積 / 老葉面積) x 100%】關係求出迴歸直線，評定處理濃度與反應之間的關係。

2. 甜菜夜蛾幼蟲之檢定

甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 以人工飼料飼養，取 2 齡幼蟲供試。預備各測試濃度之蘇力菌樣品液，及甜菜夜蛾幼蟲人工飼料，甜菜夜蛾 4 齡幼蟲 (平均體重， $M \pm SD = 9.6 \pm 2.0$ mg)，供試蟲單隻隔離，

並先經隔夜飢餓處理，仿強迫餵食法⁽⁶²⁾，每隻餵飼 1 μ l 之蘇力菌樣品液，10 重覆。對照組以水餵飼，置 25°C、75% RH、L:D=12:12 之定溫箱中，至 120 小時後觀察記錄各處理濃度之死亡率。

結 果

蘇力菌殺蟲蛋白基因之選擇

cry1 Ac 基因之增幅

根據已發表之 *cry1 Ac* 基因序列⁽⁸⁾，設計可以增幅全長 3713 bp，涵蓋轉錄起始位置、核糖體結合位置，至終止密碼子之引子，以此引子與蘇力菌臺灣分離株 E9-11 質體 DNA 之 PCR 反應，產生 3.6 kb 產物，經 1% agarose gel 電泳分析結果，明顯有 3.6 kb 之產物。

大腸桿菌中間質體之構築

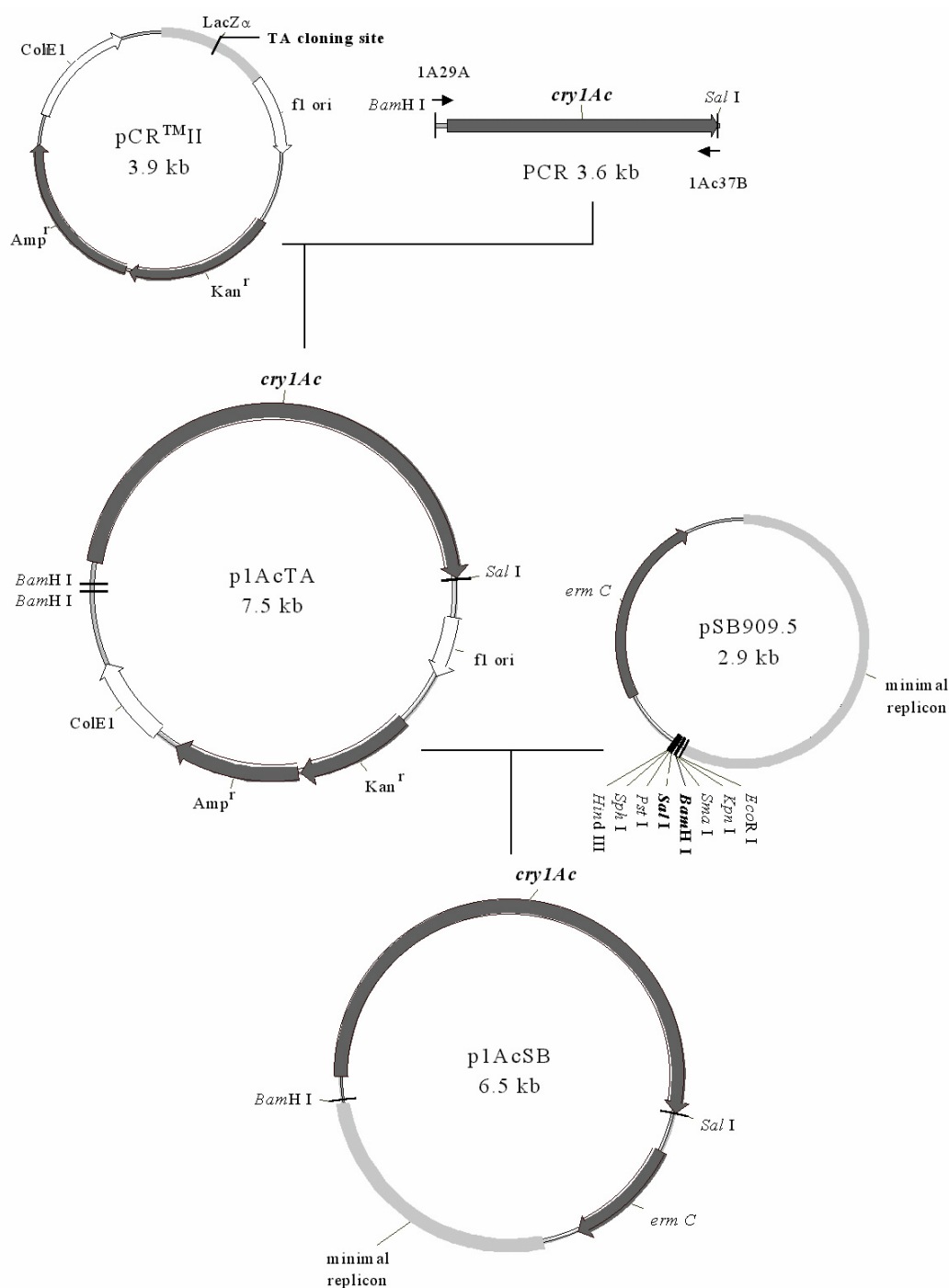
該產物經回收，利用其 PCR 增生之 A-端，與 3.9 kb 之 pCRTMII 中間載體接合成 7.5 kb 之質體 (p1AcTA) (圖一)。該中間質體的插入片段與載體有正反向接合之可能，插入片段經限制 剪切測試，以 *Sal I* 限制 剪切成長鏈狀 (linear)，顯示所選獲之轉殖株，所含構築質體之長度為 7.5 kb，與預期相符合，並經 *BamH I* 限制 剪切測試，得知插入片段為反向相接 (3.6 kb+3.9 kb)。因 *cry1 A* 基因之間有很高的同源性⁽³³⁾，尤其 *cry1 Aa* 基因⁽⁵⁸⁾與 *cry1 Ac* 基因⁽⁸⁾，在起始點及終止點密碼子附近更是相似。本研究所設計出來之引子，即可以同時增幅 *cry1Aa* 與 *cry1 Ac* 基因之全長片段。而所用基因來源之 E9-11 母株，依 PCR-RFLP⁽⁴⁰⁾ 分析結果，即同時含有 *cry1 Aa* 與 *cry1 Ac* 基因，因此兩種基因在以 1A29A、1Aac37B 引子對 E9-11 之 DNA 進行 PCR 時，即可能同時產生此兩種基因片段。但 *cry1 Ac* 基因之核酸序列僅有 1 個 *Hind III* 切位，*cry1Aa* 基因之核

酸序列卻有 2 個 *Hind III* 切位，而載體上有一 *Hind III* 切位，結果該質體被 *Hind III* 限制 剪成 2 片段 (6.9 kb+600 bp)，是 *cry1 Ac* 基因的序列，確認選獲株為含 *cry1 Ac* 基因之質體，而且經 *cry1*-type 引子聚合 連鎖反應⁽³⁷⁾，顯示有 487 bp 屬於 *cry1 Ac* 基因之圖譜，於此中間質體構築成功。

蘇力菌表現質體之構築

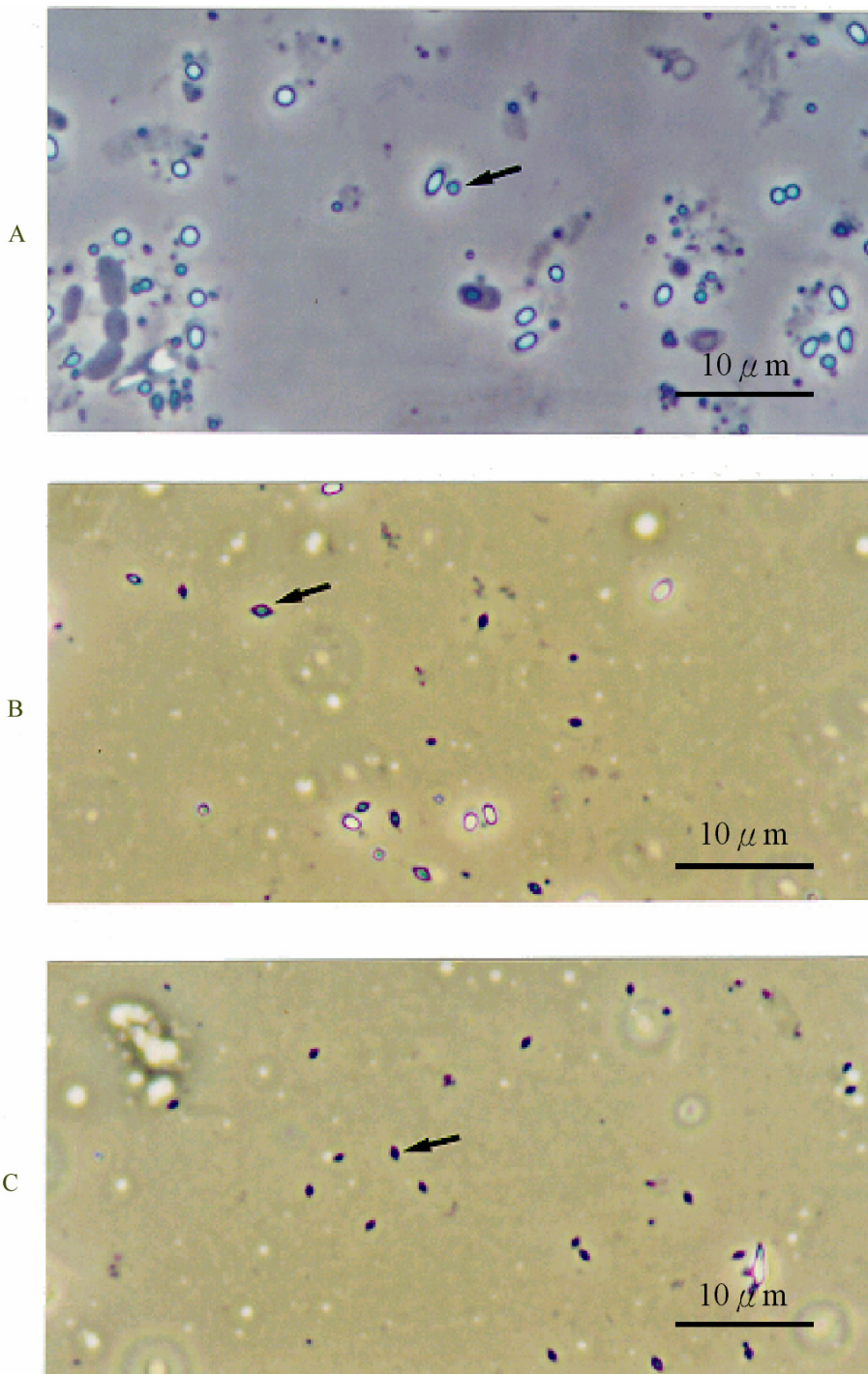
在增幅 *cry1 Ac* 基因的引子設計上，即於 1A29A 引子設計一個 *BamH I* 切位，在 1Aac37B 引子設計一個 *Sal I* 切位，此與表現載體 pSB909.5 有同向相對的切位，中間質體 p1AcTA，經大量培養純化，並經 *BamH I*-*Sal I* 完全切割，回收 3.6 kb 之 *cry1 Ac* 基因片段後，與完成相對切位切割的 2.9 kb 之 pSB909.5 載體接合，產生 6.5 kb 之蘇力菌表現質體 (圖一)。經電穿孔法擊入無質體之蘇力菌 CryB，但無法擊入 Bt51。抽取四株 1AcSB 轉殖株、對照菌株 (Xentari、Delfin)、母株 E9-11、蘇力菌載體 (pSB909.5) 及宿主細胞 (CryB) 等之 DNA，同時以 *cry1*-type 引子進行聚合 連鎖反應⁽³⁷⁾，結果顯示除 Xentari、pSB909.5、CryB 外，均有屬於 *cry1 Ac* 基因之 487 bp 圖譜。經 PCR-RFLP 之方法⁽⁴⁰⁾ 驗證 1AcSB-2 轉殖株，在加入引子 1 (K5un2-K3un2) 時，出現屬於 *cry1 Ac* 基因之 801 bp、518 bp、322 bp 切割片段，加入引子 2 (primer 2) 時出現亦屬於 *cry1 Ac* 基因之 726 bp、434 bp、244 bp 切割片段，由此證實 *cry1 Ac* 基因成功轉殖入無質體蘇力菌 CryB。

其菌體在光學顯微鏡下，可以顯見毒蛋白結晶為圓或短橢圓型 (圖二 A) 而母株 E9-11 為菱型 (圖二 B) 及 HD-73 為菱型 (圖二 C)。在掃描式電子顯微鏡下，顯示其結晶形狀為短橢圓型 (圖三 A)，而母株 E9-11 的結晶形狀為菱型 (圖三 B)。該



圖一、從蘇力菌 E9-11 菌株增幅完整的 *cryI Ac* 殺蟲結晶毒蛋白基因，構築成 p1AcTA 及 p1AcSB 質體。

Fig 1. Construction of plasmid p1AcTA and p1AcSB containing a complete *cryI Ac* crystal protein gene amplified from the *B. thuringiensis* isolate, E9-11.

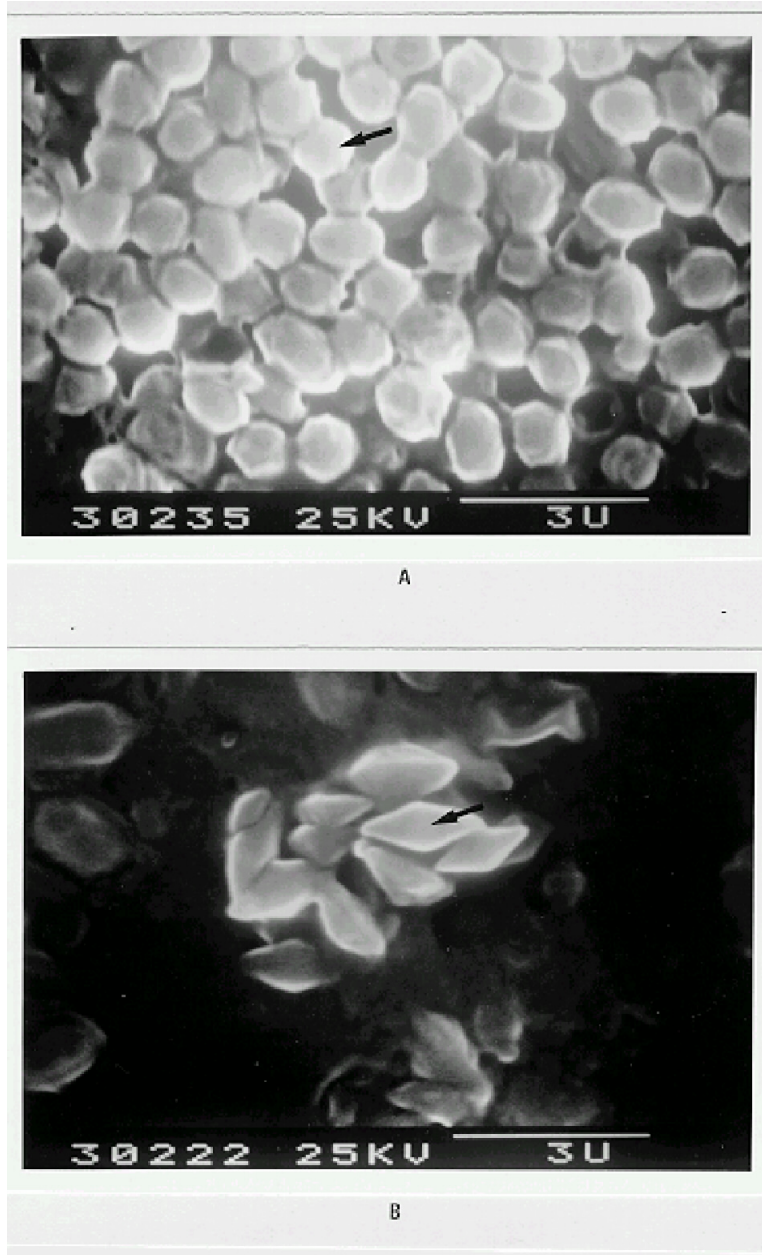


圖二、1,000 倍光學顯微鏡下之蘇力菌毒蛋白結晶，A. 1AcSB 重組蘇力菌；B. E9-11 菌株；C. HD-73 菌株。

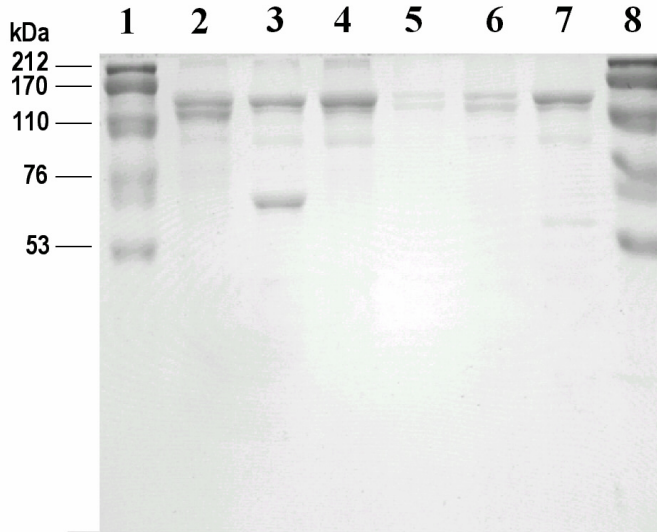
Fig. 2. Micrograph of parasporal crystals in recombinant *B. thuringiensis* 1AcSB(A), in *B. thuringiensis* isolate, E9-11 (B), and in *B. thuringiensis* HD-73 (C).

晶體蛋白經 SDS-PAGE 分析結果，由圖四顯見如同對照菌株 Xentari、Delfin 及 E9-11 均有約 130 kDa 之產物。各樣品相等總蛋白質定量（10 $\mu\text{g/ml}$ ）的電泳分離下，

Xentari、Delfin、E9-11、HD-73 等每一對照菌株，各色帶的總和濃度各為 1AcSB 轉殖蘇力菌之 4、6、4、3 倍，而 130 kDa 則各為 1AcSB 轉殖菌的 5、7、10、8 倍。



圖三、掃描式電子顯微鏡下之蘇力菌毒蛋白結晶，A. 1AcSB 重組蘇力菌；B. E9-11 菌株。
Fig. 3. Scanning electron micrographs of purified parasporal crystals from recombinant *Bacillus thuringiensis* 1AcSB (A), and from *B. thuringiensis* isolate, E9-11 (B).



圖四、蛋白質電泳分析蘇力菌殺蟲毒蛋白，第 1、8 行為 HMW 蛋白質標誌；第 2 行為 Xentari (10 μg)；第 3 行為 Delfin (10 μg)；第 4 行為 E9-11 (10 μg)；第 5 行為 1AcSB (10 μg)；第 6 行為 1AcSB (20 μg)；第 7 行為 HD-73 (10 μg)。

Fig. 4. SDS-PAGE analysis of Cry protein from *Bacillus thuringiensis*. Lanes 1 and 8: HMW protein markers (Pharmacia Biotech), Lane 2: Xentari (10 μg), Lane 3: Delfin (10 μg), Lane 4: E9-11 (10 μg), Lane 5: 1AcSB (10 μg), Lane 6: 1AcSB (20 μg), Lane 7: HD-73 (10 μg).

1AcSB 轉殖蘇力菌之 *cryI Ac* 完整基因之核酸序列，為 3534 個核苷酸 (1177 胺基酸)，已於 NCBI 資料庫 (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 註冊 (Accession No. AY122057)，經與資料庫比對，結果發現與最相似者，僅相差一個胺基酸序列 (Accession No. M73248, Feitelson (1991)，未發表)，其次是與 *Btk* HD-73 的 *cryI Ac* 基因序列⁽⁸⁾ (Accession No. M11068) 最相近，有 8 個核苷酸不同，總共是 3 個胺基酸不同 (包括 1 個胺基酸的刪減) (圖五)。

轉殖株對小菜蛾幼蟲殺蟲活性之初步測試

各菌株或轉殖菌株，噴灑在甘藍菜，供 3 齡小菜蛾幼蟲，取食後之死亡率及葉

面積縮減率之結果。以 1AcSB-2 菌株在 250 ppm 濃度下，24 小時即有 60% 的死亡率為最佳，而且葉子被取食甚少，其葉面積縮減率僅 13.6%，與自然葉面積縮減率 (11.3%) 相接近；48 小時之累積死亡率已達 96.7%。而其餘 3 轉殖株，雖濃度達 2500 ppm，為 1AcSB-2 的十倍，但至 72 小時之死亡率尚不及 20%。中間質體 (1AcTA) 與無質體之寄主蘇力菌 (CryB) 及蘇力菌載體 (SB909.5)，至處理後 72 小時，仍未現有殺蟲效果，但該三者中，1AcTA、SB909.5 在處理後 48 小時，有明顯較對照組高出 2-2.4 倍之葉面積縮減率，亦即有促進取食之現象。至於對照菌株 E9-11、Xentari 與 Delfin，250ppm 在處理後 24 小時，即見 96.7% 以上之死亡率，顯示殺蟲效果較 1AcSB-2 為佳 (表一)。

BamHI

```

1      TTA ACA CCCT GGATCC AAA ATT GAT ATT TAG TAA AAT TAG TTG CAC TTT GTG CAT TTT TTC
61     ATA AGA TGA GTC ATA TGT TTT AAA TTG TAG TAA TGA AAA ACA GTA TTA TAT CAT AAT GAA
121    TTG GTA TCT TAA TAA AAG AGA TGG AGG TAA CTT ATG GAT AAC AAT CCG AAC ATC AAT GAA
                                     M   D   N   N   P   N   I   N   E

1141   GGG CCA GAA TTC ACT TTT CCG CTA TAT GGA AC[C] ATG GGA AAT GCA GCT CCA CAA CAA CGT
      G   P   E   F   T   F   P   L   Y   G   T   M   G   N   A   A   P   Q   Q   R
1201   ATT GTT GCT CAA CTA GGT CAG GGC GTG TAT AGA ACA TTA TC[C] TCC ACT TT[T] TAT AGA AGA
      I   V   A   Q   L   G   Q   G   V   Y   R   T   L   S   S   T   [L]F   Y   R   R
1261   CCT TTT AAT ATA GGG ATA AAT AAT CAA CAA CTA TCT GTT CTT GAC GGG ACA GAA TTT GCT
      P   F   N   I   G   I   N   N   Q   Q   L   S   V   L   D   G   T   E   F   A
1321   TAT GGA ACC TCC TCA AAT TTG CCA TCC GCT GTA TAC AGA AAA AGC GGA ACG GTA GAT TCG
      Y   G   T   S   S   N   L   P   S   A   V   Y   R   K   S   G   T   V   D   S
1381   CTG GAT GAA ATA CC[A] CCA CAG AAT AAC AAC GTG CCA CCT AGG CAA GGA TTT AGT CAT CGA
      L   D   E   I   P   P   Q   N   N   N   V   P   P   R   Q   G   F   S   H   R
1441   TTA AGC CAT GTT TCA ATG TTT CGT TCA GGC T[C]T AGT [A]AGT AGT GTA AGT ATA ATA AGA GCT
      L   S   H   V   S   M   F   R   S   G   [P]S   S   [N]S   S   V   S   I   I   R   A

3661   GTG GAA TTA CTC CTT ATG GAG GAA TA GTCGAC TGC AAA CTC AGG TTT AA
      V   E   L   L   L   M   E   E           Sal I

```

圖五、1AcSB 轉殖株與 HD-73⁽⁸⁾之核酸及胺基酸序列差異圖 (標示者為差異處)。

Fig. 5. Comparison of nucleotide sequences of the *cryIac* gene in 1AcSB clone and HD-73⁽⁸⁾ (those areas marked indicate changes).

表一、Cry1Ac 殺蟲結晶毒蛋白在 Cry^B 蘇力菌中對小菜蛾幼蟲之殺蟲活性測試

Table 1. Insecticidal activities of Cry1Ac ICP in recombinant Cry^B *Bacillus thuringiensis* against *Plutella xylostella* larvae¹⁾

Samples (ppm)	% Mortality and % leaf area reduced					
	24 hr after treat.		48 hr after treat.		72 hr after treat.	
	M (%) ²⁾	LAR (%) ³⁾	M (%)	LAR (%)	M (%)	LAR (%)
1AcSB-1 (2500ppm)	0	-	0	-	0	-
1AcSB-2 (250ppm)	60.0	13.6	96.7	8.1	96.7	11.4
1AcSB-3 (2500ppm)	3.3	-	6.7	-	16.7	-
1AcSB-4 (2500ppm)	0	-	0	-	6.7	-
1AcTA (250ppm)	0	30.8	3.3	80.7	3.3	50.1
E9-11 (250ppm)	96.7	13.3	100	-	100	-
Cry ^B (250ppm)	3.3	28.4	3.3	35.8	3.3	45.9
SB909.5 (250ppm)	0	23.4	13.3	67.6	13.3	31.8
Xentari (250ppm)	86.7	10.9	100	9.2	100	-
Delfin (250ppm)	90.0	11.8	96.7	11.1	100	11.6
Control (water)	0	30.63	3.3	33.3	3.3	41.3
Check	-	11.3	-	10.9	-	11.5

¹⁾ Third instar larvae were tested. There were 10 larvae/replicate and 3 replicates/trial. Both sides of the leaf discs (15cm²) were sprayed with 1 ml *Bt* suspension on each side.

²⁾ M, accumulated mortality.

³⁾ LAR, leaf area reduced.

轉菌株及其他菌株對三種鱗翅目昆蟲之生物活性表現測試

對小菜蛾幼蟲之生物活性：

各菌株導致小菜蛾幼蟲死亡與處理時間的關係顯示，至處理後 48 小時，LC₅₀

值已接近穩定，除了 BtW 及 1AcSB 外，其餘菌株的 48、72 小時信賴限界均有重疊，亦即無明顯的差異，因此選擇處理後 48 小時的 LC₅₀ 值為比較的重點（表二）。

表二、蘇力菌樣品中對小菜蛾幼蟲之殺蟲活性測試¹⁾

Table 2. Insecticidal activities of *Bacillus thuringiensis* isolates, strains, or recombinants against *Plutella xylostella* larvae¹⁾

Samples	Parameters (ppm)	Lethal concentration after treatment		
		24 hr	48 hr	72 hr
SB909.5	LC₅₀	> 10,000	> 10,000	> 10,000
BtW	LC₅₀	249	34.8	23.6
	(95% Fiducial limits)	(175-411)	(30.6-39.6)	(20.1-27.6)
	LC₉₀	2110	119	118
BtE	LC₅₀	125	14.0	12.1
	(95% Fiducial limits)	(96.0-174)	(11.8-16.4)	(9.89-14.5)
	LC₉₀	1400	70.7	62.7
BtH	LC₅₀	907	233	195
	(95% Fiducial limits)	(714-1227)	(180-309)	(149-261)
	LC₉₀	7620	1210	1130
HD-73	LC₅₀	46.3	6.34	4.97
	(95% Fiducial limits)	(38.6-57.1)	(5.02-7.86)	(3.46-6.72)
	LC₉₀	261	34.0	25.3
1AcSB	LC₅₀	279	9.12	3.82
	(95% Fiducial limits)	(136-1130)	(7.01-11.5)	(2.61-5.19)
	LC₉₀	5650	93.0	50.5
E9-11	LC₅₀	10.5	4.11	2.98
	(95% Fiducial limits)	(7.79-15.6)	(2.88-6.01)	(2.11-4.15)
	LC₉₀	38.5	18.4	16.7
Xentari	LC₅₀	25.1	5.22	4.12
	(95% Fiducial limits)	(19.9-33.2)	(3.94-6.87)	(2.97-5.58)
	LC₉₀	236	36.6	32.5
Delfin	LC₅₀	60.6	6.35	4.96
	(95% Fiducial limits)	(47.5-80.6)	(4.80-7.99)	(3.02-7.03)
	LC₉₀	456	59.5	44.2

¹⁾ Third instar larvae were tested. There were 10 larvae/replicate, 3 replicates/trial, and 3 trials/concentration. Both side of the leaf discs (15 cm²) were sprayed with 1ml on each side.

轉殖 BtE、BtH、1AcSB 入蘇力菌之載體 pSB909.5，LC₅₀ 值大於 10,000 ppm，顯示對小菜蛾幼蟲並無毒性。其餘菌株均顯示對小菜蛾幼蟲具毒性，BtW 之 48 小時 LC₅₀ 值 (34.8 ppm)，約為對照菌株 E9-11、Xentari 及 Delfin 的 5-8 倍，顯然毒性欠佳。由 BtW 轉殖其中 *cryIBdl* 基因而得的 BtE，其 LC₅₀ 值則降低 2.5 倍 (14.0 ppm)，表現較母株的毒性為佳，但含 *cryIGbl* 基因之 BtH，其 LC₅₀ 值 (233 ppm) 則遠高於母株，毒性不佳。含 E 9-11 的 *cryI Ac* 基因之 1AcSB，其殺小菜蛾幼蟲活性，在處理後 24 小時的 LC₅₀ 值為 279 ppm，殺蟲效果不佳，約為對照菌株 E9-11、Xentari 及 Delfin 的 4-26 倍，而與 BtW (249 ppm) 近似，但處理後 48 小時的 LC₅₀ 值 (9.12 ppm) 卻大為降低，與 HD-73 (6.34 ppm) 接近，處理後 72 小時的 LC₅₀ 值更降為 3.82 ppm，並且 72 小時的 LC₅₀ 值信賴限界與 48 小時的 LC₅₀ 值信賴限界互相不重疊，顯示隨處理時間顯著增加殺蟲效果之趨勢，而且 72 小時的 LC₅₀ 值信賴限界與對照菌株 Xentari、Delfin 及 HD-73 的 72 小時 LC₅₀ 值信賴限界均有重疊，顯示至處理後 72 小時殺蟲效果相仿。1AcSB 表現出初期效果較遲緩，但後續效果良好的殺小菜蛾幼蟲活性。同為只含 *cryI Ac* 基因的 HD-73，其 24 小時 LC₅₀ 值 (46.3 ppm) 較 1AcSB 為佳，48 小時之 LC₅₀ 值 (6.34 ppm) 效果比 1AcSB 稍佳，但信賴限界相重疊，而 72 小時之 LC₅₀ 值，則是 1AcSB 較 HD-73 為佳，LC₅₀ 值低 1.3 倍，但信賴限界相重疊。分離自臺灣本土穀倉的 E 9-11 蘇力菌分離株，其各時段的殺小菜蛾幼蟲活性，均較 Xentari、Delfin 為佳，是為供試菌株中之殺小菜蛾活性最佳者 (表二)。

對紋白蝶幼蟲之生物活性：

因各蘇力菌樣品對紋白蝶幼蟲的急毒性致死效果緩慢，雖中毒之蟲體不如小菜

蛾幼蟲在短時間內死亡，但是可隨中毒程度降低取食量，減少危害。因此各供試之蘇力菌樣品對紋白蝶幼蟲之生物活性，依各處理濃度求出校正葉面積取食率，並將各處理後不同觀察時間之濃度取對數與校正葉面積取食率關係求出迴歸直線，如圖六，分述如下：

載體對照組 pSB909.5 各濃度之取食率的迴歸線，呈現近似水平，並且隨處理時間之增加，而同等增加取食率，顯示均無毒效。

BtW、BtE 樣品隨濃度之升高，抑制取食效果亦升高，顯示與濃度呈正相關性，但取食量會隨著時間的延長而繼續增加。

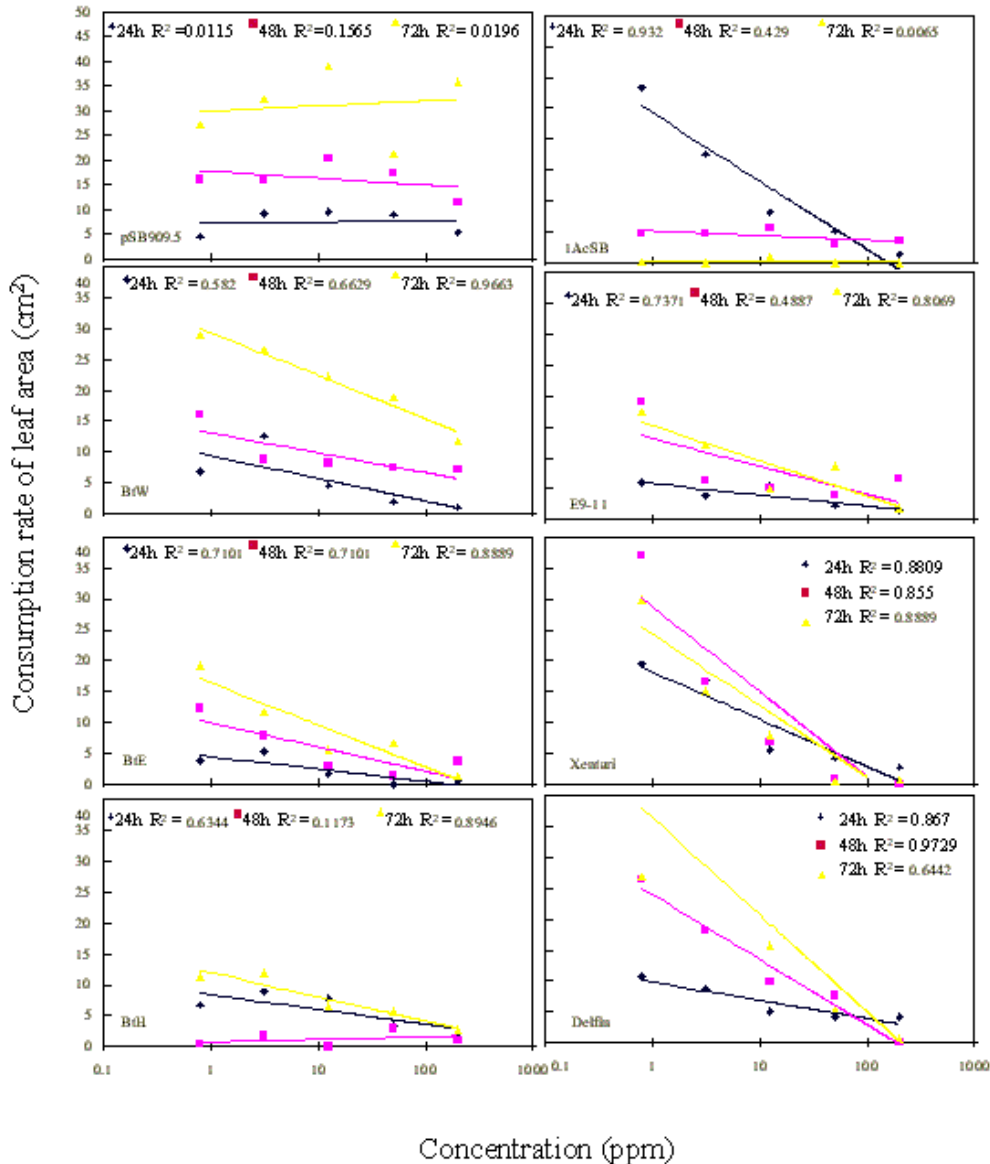
BtH 隨濃度之升高，抑制取食效果升高，與濃度呈正關性，但 48 小時觀察時，其斜率變成正，不論高低濃度，其抑制取食效果均良好，顯現普遍的抑制效果，但 72 小時會稍恢復，並與濃度繼續呈現正相關。

總之 BtW、BtE、BtH，均具抑制取食之效果。處理 48 小時後，在高濃度下，BtE、BtH 較 BtW 有更好的效果，BtH 在處理後 48 小時，不論高低濃度，均有較 BtE、BtW 良好的抑制取食效果。處理 72 小時後，BtE、BtH 不論高低濃度，持續較 BtW 為佳的效果。綜上抑制取食效果，BtH 稍優於 BtE 優於 BtW。

E 9-11 野生株之迴歸線圖形，近似 BtE。含 E 9-11 之 *cryI Ac* 基因的 1AcSB，處理後 24、48、72 小時之迴歸線，分佈情形與 E9-11 相反，顯示隨時間的增長，取食量逐漸降低，且在低濃度下，亦有良好的抑制效果，推測低於供試濃度，仍具有顯著的生物活性。比較抑制取食效果，1AcSB 在處理初期，即處理 24 小時後，隨濃度升高，抑制效果升高，但在低濃度下，不及其母株 E 9-11 的抑制取食效果，顯示不具忌食性，反而是稍為促進取食，推測原因，E 9-11 含多種殺蟲基因 (*cryIAa*,

cry1Ac, *cry1B**, *cry1C**, *cry1Cb*, *cry1D*, *cry3C*, *cry2*), 其中某些基因表現早期的協力殺蟲效果, 而 1AcSB 或許由於寄主菌體有促進取食之效果, 故早期低濃度取食反

較多, 可是高濃度仍有相當保護的效果。但 48 小時後, 1AcSB 展現相當高的不可恢復的抑制取食效果, 整體效果較 E 9-11 為佳, 並且遠較 Xentari 及 Delfin 為佳。



圖六、蘇力菌樣品對紋白蝶 3 齡幼蟲之殺蟲活性測試。

Fig. 6. Insecticidal activities of *Bacillus thuringiensis* isolates, strains, or recombinants against *Artoeia rapae* larvae. Third instar larvae (larval weight, mean \pm SD= 67.2 \pm 10.2 mg) were tested. There were 3 larvae/replicate and 3 replicates/concentration. Both sides of the leaf discs (45 cm²) were sprayed with 1 ml on each side.

表三、蘇力菌樣品處理甜菜夜蛾幼蟲 5 天後之致死率¹⁾Table 3. Insecticidal activities of *Bacillus thuringiensis* isolates, strains, or recombinants against *Spodoptera exigua* larvae after 5-day treatment¹⁾

<i>Bt</i> samples	% Mortality of different feeding dosages (μg)					
	5.0	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156
SB909.5	0	0	0	0	0	0
BtW	40	0	0	0	0	0
BtE	20	0	0	10	0	0
BtH	10	0	0	10	10	0
HD-73	10	10	0	10	0	0
1AcSB	10	0	0	0	10	0
E9-11	40	10	10	0	10	0
Xentari	100	60	20	40	20	0
Delfin	70	30	50	0	0	10

¹⁾ Fourth instar larvae (larval weight, mean \pm SD= 9.6 \pm 2.0mg) were tested. There were 1 larvae/replicate and 10 replicates/dosage. Each larva was fed with 1 μl diluted *Bt* suspension.

對照組 Xentari 及 Delfin 均顯示供試濃度升高，抑制效果也升高，Xentari 之各處理時間的迴歸線相接近，Delfin 在處理後 48、72 小時，有較大的恢復取食程度。

以上 8 種供試蘇力菌對紋白蝶幼蟲生物活性測試的結果，比較其處理後不同觀察時間之濃度與取食量關係的出迴歸直線。在 24 小時的抑制取食效果，BtE、E9-11 較負對照組 pSB909.5 佳，其他的菌株如 1AcSB、Xentari 甚至在 10、1 ppm，中、低濃度下，還有促進取食的效果。48 小時後改變成 BtH 最佳，其次是 1AcSB、BtE、E9-11 及 BtW，而 Delfin、Xentari 只有在 10 ppm 時稍佳，在 1 ppm 下取食率高於 pSB909.5，無效。處理後 72 小時，在中、低濃度（1、10 ppm）之情況下，評估抑制取食效果，1AcSB 明顯較其他供試樣品為佳，其效果排序依次為 1AcSB > BtH > E9-11 \geq BtE > Xentari > BtW \geq Delfin \geq pSB909.5。

對甜菜夜蛾之生物活性：

以各處理樣品（SB909.5、BTW、BTE、

BTH、1AcSB、E9-11、Xentari、Delfin）進行甜菜夜蛾生物活性測試，觀察至 120 小時，各餵飼劑量之死亡率，在高劑量下（每隻餵食 5 μg ），SB909.5、BTE、BTH、HD-73、1AcSB 死亡率 \leq 20%，顯示殺甜菜夜蛾之效果甚差，Xentari 效果最佳，其次 Delfin，再次 E9-11、BTW（表三）。

討 論

本研究參考已發表的 *cryI Ac* 基因序列⁽⁸⁾設計引子，自本土穀倉所分離之蘇力菌 E9-11，以聚合連鎖反應增幅出全長的 *cryI Ac* 基因（3.6 kb）。因係增幅由 -154 nt 開始之全長基因，包含轉錄起始位置、核糖體結合位置及終止密碼子，可以利用原來的基因序列進行轉錄、轉譯調控。因為涵蓋毒性片段及構造片段，所以就會形成晶體⁽¹⁷⁾，不像截短基因只有毒性片段，雖然有生物活性，但不會形成晶體^(1, 4, 5)。為避免非專一性及形成引子二聚物（primer dimer），而且又在引子上開創切位，因此引子的設計，採較長的策略，在正向以 29

nt，逆向以 37 nt。因欲增幅之序列全長為 3.6 kb，故在聚合 連鎖反應程式上，以煉合溫度自 42°C 起逐步提升，並且延伸之時間亦拉長，並於反應管中先以腊分層，直到反應開始加溫才混合，避免非專一性產物之產生。所增幅出來之 3.6 kb 產物，經回收後，因其尾端僅多出 18 nt，而 *SalI* 需有 30 nt 以上的殘基，經 20 小時作用，才會 50% 的切割效率，所以所設計之切位 *BamHI*、*SalI*，無法直接與 pSB909.5 蘇力菌表現載體接合，採中間載體轉接之策略，以 PCR 產物多出 A 尾之特性，與 pCRII 載體之 T 尾結合，構築成 1AcTA 質體，殖入大腸桿菌 JM101，再萃取、純化其質體，而與 pSB909.5 蘇力菌表現載體，以相對切位 *BamHI*、*SalI* 行完全切割及接合，構築成 1AcSB 質體，以電擊法送入無質體之蘇力菌 *CryB*。殖入 *CryB* 之 *cryI Ac* 基因，在核酸層次，經 *cryI*-type 引子 PCR 及 PCR-RFLP 證實是 *cryI Ac* 基因，在蛋白質層次，有 130 kDa 的產物產生，並且有結晶產生，結晶形狀為圓型或短橢圓型，與母株 E9-11 的菱型，或是 HD-73 的菱型不同。而同為轉殖 *cryI Ac* 基因到 *Bacillus* 的研究⁽⁶⁴⁾，在序列分析上與本研究相差 8 個鹼基對（4 胺基酸），產生了雙金字塔型及不規則型的結晶。然而本試驗亦非培養在 37°C，以致形成許多小的蛋白質，無法折疊成結晶正確的構形，導致結晶不定形⁽⁵³⁾。而形狀的改變，亦非會影響毒效的改變⁽²³⁾。

在生物活性上，4 株 1AcSB 轉植株中，並非均有殺蟲效果，僅以 1AcSB-2 殺小菜蛾幼蟲效果最佳，且葉面被取食甚少，葉面積縮減率與自然葉面積縮減率相近，對照組中間質體（p1AcTA）與無質體之宿主蘇力菌（*CryB*）及蘇力菌載體（pSB909.5），均無殺蟲效果。1AcSB 轉植株對小菜蛾幼蟲在較長的觀察中，表現出較為遲緩的效果，即後續可見強勁的殺小

菜蛾幼蟲活性。

Cry1Ac 對 *Pieris* 屬昆蟲有良好的生物活性⁽³²⁾。1AcSB 轉殖蘇力菌對紋白蝶幼蟲的毒性，隨時間的增長，持續降低取食量。在低濃度下，亦有良好的抑制取食效果，推測低於供試濃度，仍還具有顯著的生物活性。比較抑制取食效果，1AcSB 在處理初期，即處理 24 小時後，隨濃度升高，抑制效果升高，但在低濃度下，不及其母株 E9-11 的抑制取食效果，顯示不具忌食性，反而稍具促進取食。固然促進取食，會食入較高的劑量，因而有較高的毒效，但亦有在 M-one 劑型加入取食促進劑，增加取食量，卻不增加科羅拉多甲蟲死亡率之例⁽³⁴⁾。E9-11 含多種殺蟲基因，其中某些基因可能表現早期的協力殺蟲效果，例如對小菜蛾幼蟲無效的 *Cry2*⁽⁴⁹⁾，對玉米蛀蟲（*Elasmoplus lignosellus*）之毒性就較 *Cry1Ac* 強一百倍⁽⁵¹⁾。*Cry2A* 較 *Cry1Ac* 快速阻止 3 齡 *H. zea* 的取食，然而病徵的出現卻比 *Cry1Ac* 慢⁽²⁶⁾，因此在對照菌株，*Cry2A* 扮演早期“速死”效果的重要角色。因 *Cry2A* 與 *Cry1Ac* 在蟲腸刷狀緣膜（BBMV）的結合上，使用相同的受器成份，而 *Cry2A* 不會減弱或切斷 *Cry1Ac* 的結合，反而 *Cry1Ac* 可以有效地減弱或停止 *Cry2A* 對刷狀緣膜的初期結合（initial binding）⁽²⁶⁾，因此在毒效反應上，雖然早期 *Cry2A* 的表現為主，但後期還是以 *Cry1Ac* 為要。雖然 *Cry1Ac* 對吉普賽蛾（*Lymantria dispar*）毒性不強，但與其中 BBMV 卻有很高的親和力，由於其不可逆的結合動能，致使毒素分子不解離，而反應在毒效上⁽⁴²⁾。當然中毒的機制除與受器的親和力有關外，原毒素（protoxin）是否易活化，而活化的毒素是否會快速分解，也是毒素是否有效的重點⁽²⁸⁾。鱗翅目昆蟲腸內見高鹼性，不僅對蘇力菌結晶的溶解及活化很重要，對毒性表現亦相當重要^(23, 32, 65)。毒素在昆蟲腸內溶解度不同，則其

毒性表現亦不同⁽⁹⁾。以腸液的蛋白質分解活化過程，探討家蠶為何較斜紋夜蛾對 *Btk* HD-1 的感受性高 3,600 倍，當家蠶腸液濃度 $\geq 10\%$ 時，會將原毒素活化成 60 kDa 的毒素，但斜紋夜蛾腸液濃度 0.1% 時，就會活化原毒素成 65 kDa 的毒素，若腸液濃度 $\geq 10\%$ 時，則毒素已經完全被分解了⁽³⁵⁾。因此 HD-1 之殺蟲效果不只與活化有關，而分解亦同。1AcSB 可能因核酸序列的改變，而導致較不易活化，但活化後又較不易被分解，而改變其殺蟲的特性，呈現強勁的緩效性殺蟲效果。其在核酸序列上，8 核苷酸的改變(包括 3 個胺基酸的改變及 1 個胺基酸的刪除)，皆位於 block 2 與 block 3 之間⁽³¹⁾，屬於細胞結合區域的前端^(29, 30)，因此推測其改變了氨基酸組成，使活化的毒蛋白變成不易被分解，立體結構影響與受體 (receptor) 或蛋白 (protease) 之親和力，因此後續的殺蟲效果表現較其他對照樣品為佳。在 *Cry1Aa* 與 *Cry1Ac* 間，以 335-450 胺基酸位置互換，結果改良出超級結合區域，對擬尺蠖及 *H. virescens* 之毒效均提升⁽²⁹⁾。以等量總蛋白量進行 SDS-PAGE 電泳的結果，顯示 1AcSB 之色帶均較淡 (圖四)，亦即其微量即可產生高效，毒效表現突出。1AcSB 轉殖蘇力菌的 *cryI Ac* 基因，部分核苷酸的不同是否由於聚合 連鎖反應所造成，因不同的位置並非均勻的分散在 3.6 kb 序列的各處，而是 8 個不同的核苷酸序列，皆集中在 a.a. 340 至 a.a. 442 之間，因此可推論不是因聚合 連鎖反應所造成，即其自本土所分離到的母株 E9-11，就帶有不與 *Bt* HD-73 完全相同之核酸序列，但未以母株 *cryI Ac* 基因直接定序前，由於聚合 連鎖反應造成 *cryI Ac* 基因核酸序列改變的可能仍然存在。然而不論其係因母株的 *cryI Ac* 基因核酸序列即與 HD-73 有所不同，或由於聚合 連鎖反應造成改變，本研究獲得的轉殖株 1AcSB，在細胞結合

位置的胺基酸序列改變，是否為造成異於尋常的殺蟲活性的主因，可為企圖改造蘇力菌基因序列之學者參考。但亦不能排除由因於 1AcSB 轉殖株在低濃度時，因紋白蝶幼蟲大量取食，造成攝取累積量大增，因此毒性升高。1AcSB 如同 HD-73，除 *cryI Ac* 基因，不含其他的毒素基因⁽³⁶⁾，或許由於寄主菌體 (*CryB*) 本身有促進取食之效果，或由於 pSB909.5 載體在 *CryB* 內產生某些促進取的物質，故在早期低濃度紋白蝶幼蟲取食反而較多，然而在對小菜蛾幼蟲的初步試驗中並未發現此現象。在處理後 48 小時，1AcSB 對紋白蝶幼蟲展現相當高的不可恢復的抑制取食效果，至處理後 72 小時之效果較母株 E9-11 為佳，且較對照菌株 Xentari 及 Delfin 為佳。從 Javelin (=Delfin) 蘇力菌產品 (含 *Cry1Aa*、*Cry1Ab*、*Cry1Ac* 及 *Cry2*)，調製人工飼料，餵食吉普賽蛾 48 小時後換回新鮮葉片，結果未死的蟲體取食能力恢復，並無取食受到抑制的後遺症⁽⁵²⁾。顯然，1AcSB 對紋白蝶幼蟲是有後遺症 (post-larval effect) 的產物。

甜菜夜蛾在高劑量下 (每隻餵食 5 μ g、2.5 μ g)，1AcSB 仍無殺蟲之效果，顯示 *Cry1Ac* 對甜菜夜蛾並無毒效，而對照菌株 E9-11、Xentari 及 Delfin 均有效。以 Xentari (含有 *Cry1Aa*、*Cry1Ab*、*Cry1C*、*Cry1D*) 最佳，Delfin (含有 *Cry1Aa*、*Cry1Ab*、*Cry1Ac*) 並無 *Cry1C*、*Cry1D*；E9-11 可能 *Cry1C*、*Cry1D* 含量較少，因此對此蟲之效果較差。*Cry1C*、*Cry1D* 對 *S. exempta* 有效，但 *Cry1Ac* 無效⁽¹¹⁾。在同為夜蛾科的 *S. frugiperda* 幼蟲，僅帶有 *cryIA* 類基因的蘇力菌，其殺蟲效果不如另附有 *cry1C*、*cry1D* 者⁽¹⁶⁾。*Cry1C* 與 *Cry1D* 混合對 *S. frugiperda* 的毒效不如加入 *Cry1Ab* 或 *Cry1Ac*⁽⁹⁾，*Cry1Ac* 雖對 *Heliothis armigera* 有很高的毒性⁽⁵⁴⁾，但對 *S. exempta* 則無效⁽¹¹⁾。

雖本 1AcSB 轉殖株在相等總蛋白質定量 (10 µg/ml) 的電泳分離下, 130 kDa 蛋白的產量僅為 Xentari、Delfin、E9-11、HD-73 等對照菌株的 1/5、1/7、1/10 和 1/8 倍, 但對以上害蟲, 卻有良好的殺蟲效果。一如 *cryI Ac* 基因轉殖到桃體胚⁽²²⁾、稻米^(21, 45), 分別佔細胞蛋白質的 0.01%⁽²²⁾、佔總可溶性蛋白質的 0.01-1%⁽⁴⁵⁾、0.31%⁽²¹⁾, 但對蘋果蠹蛾 (*Cydia pomonella*) 有 80-100% 殺蟲效果⁽²²⁾, 對鱗翅目的瘤野螟 (*Cnaphalocrocis medinalis*)⁽⁴⁵⁾、二化螟 (*Chilo suppressalis*)⁽²¹⁾、三化螟 (*Scripophaga incertulas*)^(21, 45) 有良好的效果, 甚至對同翅目的褐飛蝨 (*Nilaparvata lugens*) 都有 24% 的致死效果⁽⁴⁵⁾; 或 *cryIAb* 轉殖稻米中含有佔總可溶性蛋白質的 0.009% 很低量的 Cry1Ab 毒素, 但對二化螟、三化螟仍有 100% 的致死率⁽⁶⁷⁾, 均表現類似的少量毒素高毒殺率的結果。

謝 辭

承蒙中興大學分生所陳鵬文、柴御清、黃文忠, 陽明大學生化所郭懷聲, 本所林志輝、王玉如、吳淑盆, 中國醫藥學院附設醫院蔡輔仁、鄔哲源博士等, 提供寶貴意見和協助試驗, 謹此誌謝。

引 用 文 獻

- 林志輝、黃文忠、曾經洲、陳良築。2002。含蘇力菌毒素基因 *cryIAa1* 之轉形葉表生菌 *Erwinia herbicola* 的殺蟲活性與質體留存之分析。植保會刊 44: 21-36。
- 段淑人、高穗生、宣詩玲。1993。利用 SDS-聚丙烯醯胺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。
- 高穗生。1995。昆蟲之大量飼育。台灣省農業藥物毒物試驗所技術專刊第 62 號。8 頁。
- 陳彥宇。1995。蘇力菌殺蟲晶體蛋白基因在轉殖植物表現之研究。國立中興大學分子生物研究所碩士論文。臺中。84 頁。
- 陳鵬文。1992。蘇力菌殺蟲晶體蛋白基因之分離及應用。國立中興大學分子生物研究所碩士論文。臺中。80 頁。
- 曾經洲。2001。蘇力菌在整合蟲害管理上之應用。謝豐國、林政行、顧世紅 編 "跨世紀台灣昆蟲學研究之進展研討會專刊" 國立自然科學博物館刊印 313-328 頁。
- 黃三光、曾經洲。2001。基因改造作物的優勢與潛藏的危機。行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所技術專刊第 110 號 p. 1-11。
- Adang, M. J., Staver, M. J., Rocheleau, T. A., Leighton, J., Barker, R. F., and Thompson, D. V. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36: 289-300.
- Aronson, A. 1995. The protoxin composition of *Bacillus thuringiensis* insecticidal inclusions affects solubility and toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4057-4060.
- Asano, S., Maruyama, T., Iwasa, T., Seki, A., Takahashi, M., and Jr. Soares, G. G. 1993. Evaluation of biological activity of *Bacillus thuringiensis* test samples using a diet incorporation method with diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Appl. Entomol. Zool.* 28: 513-524.

11. Bai, C., Degheele, D., Jansens, S., and Lambert, B. 1993. Activity of insecticidal crystal proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exempta* (Walker). *J. Invertebr. Pathol.* 62: 211-215.
12. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
13. 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.
14. Calogero, S., Albertini, A. Fogher, M., C., Marzari, R., and Galizzi, A. 1989. Expression of a cloned *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gene in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 446-453.
15. 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.
16. Ceron, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L., and Bravo, A. 1994. PCR Analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 353-356.
17. Chak, K. F., and Ellar, D. J. 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of an insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* HD-133. *J. Gen. Microbiol.* 133: 2921-2931.
18. Chak, K. F., and Jen, J. C. 1993. Complete nucleotide sequence and identification of a putative promoter region for the expression in *Escherichia coli* of the *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* HD133. *Proc. Natl. Sci. Council., ROC. part B: Life Science* 17: 7-14.
19. Chambers, J. A., Jelen, A., Gilbert, M. P., Jany, C. S., Johnson, T. B., and Gawron-Burke, C. 1991. Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *J. Bacteriol.* 173: 3966-3976.
20. Chang, C. W., Yang, H. C., and Leu, L. S. 1984. Zygosporangium formation of *Choanephora cucurbitarum*. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 25: 67-74.
21. Cheng, X., Sardana, R., Kaplan, H., and Altosaar, I. 1998. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 2767-2772.
22. Dandekar, A. M., McGranahan, G. H., Vail, P. V., Uratsu, S. L., Leslie, C. A., and Tebbets, J. S. 1998. High levels of expression of full-length *cryIA(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* in transgenic somatic walnut embryos. *Plant Science* 131: 181-193.
23. Du, C., Martin, P. A. W., and Nickerson, K. W. 1994. Comparison of disulfide contents and solubility at

- alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3847-3853.
24. Dubois, N. R., and Dean, D. H. 1995. Synergism between CryIA insecticidal crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis*, other bacterial spores, and vegetative cells against *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae. Environ. Entomol. 24: 1741-1747.
25. Dunn, M. J. 1993. Gel electrophoresis: proteins. J. M. Graham, and D. Billington, Eds. Alden Press Ltd, Oxford, UK 176pp.
26. English, L., Robbins, H. L., von Tersch, M. A., Kulesza, C. A., Ave, D., Coyle, D., Jany, C. S., and Slatin, S. L. 1994. Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Insect Biochem. Molec. Biol. 24: 1025-1035.
27. Finney, D. J. 1971. Probit analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London, 333pp.
28. Forcada, C., Alcacer, E., Garcera, M. D., and Martinez, R. 1996. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. Arch. Insect Biochem. Physiol. 31: 257-272.
29. Ge, A. Z., Rivers, D., Milne, R., and Dean, D. H. 1991. Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. J. Biol. Chem. 266: 17954-17958.
30. Gill, S. S., Cowles, E. A., and Pietrantonio, P. V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Ann. Rev. Entomol. 37: 615-636.
31. Gleave, A. P., Hedges, R. J., and Broadwell, A. H. 1992. Identification of an insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis* DSIR517 with significant sequence differences from previously described toxins. J. Gen. Microbiol. 138: 55-62.
32. Gringorten, J. L., Milne, R. E., Fast, P. G., Sohi, S. S., and Van Frankenhuyzen, K. 1992. Suppression of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin activity by low alkaline pH. J. Invertebr. Pathol. 60: 47-52.
33. Hofte, H., and Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255.
34. Hough-Goldstein, J., Tisler, A. M., Zehnder, G. W., and Uyeda, K. A. 1991. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) consumption of foliage treated with *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* and various feeding stimulants. J. Econ. Entomol. 84: 87-93.
35. Inagaki, S., Miyasono, M., Ishiguro, T., Takeda, R., and Hayashi, Y. 1992. Proteolytic processing of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 in insensitive insect, *Spodoptera litura*: unusual proteolysis in the presence of sodium dodecyl sulfate. J. Invertebr. Pathol. 60: 64-68.
36. Indrasith, L. S., Suzuki, N., Ogiwara, K., Asano, S., and Hori, H. 1992. Activated insecticidal crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* serovars

- killed adult house flies. *Lett. Appl. Microbiol.* 14: 174-177.
37. 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.
38. 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.
39. Kao, S. S., Tzeng, C. C., Tuan, S. J., and Tsai, Y. S. 1996. Isolation, characterization and *cry* gene typing of *Bacillus thuringiensis* isolates from stored product material samples collected around Taiwan. Symposium on "The Second Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Impact to the Environment". Abstract p. 35. 4-8 Nov. 1996. Chiang Mai, Thailand.
40. Kuo, W. S., and Chak, K. F. 1996. Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* toxins and genes on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1369-1377.
41. Kuo, W. S., Lin, J. H., Tzeng, C. C., Kao, S. S., and Chak, K. F. 2000. Cloning of two new *cry* genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *wuhanensis* strain. *Current Microbiol.* 40: 227-232.
42. Liang, Y., Patel, S. S., and Dean, D. H. 1995. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* 270: 24719-24724.
43. Liu, M. Y., and Sun, C. N. 1984. Rearing diamondback moth (Lepidoptera: Yponomeutidae) on rape seedlings by a modification of the Koshihara and Yamada method. *J. Econ. Entomol.* 75: 153-155.
44. Liu, M. Y., Tzeng, Y. J., and Sun, C. N. 1982. Insecticide resistance in the Diamondback moth *Plutella xylostella*, pest of cruciferous crops, China. *J. Econ. Entomol.* 75: 153-155.
45. Maqbool, S. B., Riazuddin, S., Loc, N. T., Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, J. A., and Christou, P. 2001. Expression of multiple insecticidal genes confers broad resistance against a range of different rice pests. *Mol. Breed.* 7: 85-93.
46. Masson, L., Mazza, A., Gringorten, L., Baines, D., Aneliunas, V., and Brousseau, R. 1994. Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin is highly dependent on the bioassay system. *Mol. Microbiol.* 14: 851-860.
47. McPherson, M. J., Quirke, P., and Taylor, G. R. 1991. *PCR A Practical Approach*. 253pp. Oxford University Press, New York.
48. Mettus, A. M., and Macaluso, A. 1990. Expression of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin genes during vegetative growth. *Appl. Environ.*

- Microbiol. 56: 1128-1134.
49. Miyasono, M., Inagaki, S., Yamamoto, M., Ohba, K., Ishiguro, T., Takeda, R., and Hayashi, Y. 1994. Enhancement of δ -endotoxin activity by toxin-free spore of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. J. Invertebr. Pathol. 63: 111-112.
50. Moar, W. J., Masson, L., Brousseau, R., and Trumble, J. T. 1990. Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2480-2483.
51. Moar, W. J., Pusztai-Carey, M., and Mack, T. P. 1995. Toxicity of purified proteins and the HD-1 strain from *Bacillus thuringiensis* against lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 88: 606-609.
52. Moldenke, A. F., Berry, R. E., Miller, J. C., Wernz, J. G., and Li, X. H. 1994. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* to gypsy moth, *Lymantria dispar*, fed with alder or Douglas-fir. J. Invertebr. Pathol. 64 : 145-145.
53. Oeda, K., Inouye, K., Ibuchi, Y., Oshie, K., Shimizu, M., Nakamura, K., Nishioka, R., Takada, Y., and Ohkawa, H. 1989. Formation of crystals of the insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* IPL7 in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 171: 3568-3571.
54. Palidam, M. 1992. The insecticidal crystal protein CryIA(c) from *Bacillus thuringiensis* is highly toxic for *Heliothis armigera*. J. Invertebr. Pathol. 59 : 109-111.
55. Ribeiro, B. M., and Crook, N. E. 1993. Expression of full-length and truncated forms of crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a baculovirus and pathogenicity of the recombinant viruses. J. Invertebr. Pathol. 62: 121-130.
56. Rowe, G. E., and Margaritis, A. 1987. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. CRC Critical Rev. Biotechnol. 6: 87-127.
57. Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
58. Schnepf, H. E., Wong, H. C., and Whiteley, H. R. 1985. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA sequence. J. Biol. Chem. 260: 6264-6272.
59. Schurter, W., Geiser, M., and Mathe, D. 1989. Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* via electroporation: transformation of acrySTALLIFEROUS strains with a cloned delta-endotoxin gene. Mol. Gen. Genet. 218: 177-181.
60. Tailor, R., Tippett, J., Gibb, G., Pells, S., Pike, D., Jordan, L., and Ely, S. 1992. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. Mol. Microbiol.

- 6: 1211-1217.
61. Thorne, L., Garduno, F., Thompson, T., Decker, D., Zounes, M., Wild, M., Walfield, A. M., and Pollock, T. J. 1986. Structural similarity between the Lepidoptera- and Diptera- specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. “*kurstaki*” and “*israelensis*”. J. Bacteriol. 166: 801-811.
62. Van Frankenhuyzen, K., Gringorten, J. L., Milne, R. E., Gauthier, D., Pusztai, M., Brousseau, R., and Masson, L. 1991. Specificity of activated CryIA proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kuustaki* HD-1 for defoliating forest Lepidoptera. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1650-1655.
63. Van Rie, J. 2000. *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. Int. J. Med. Microbiol. 290: 463-469.
64. Von Tersch, M., Robbins, H. L., Jany, C. S., and Johnson, T. B. 1991. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*: gene cloning and characterization and comparison with *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIA(c) toxins. Appl. Environ. Microbiol. 57: 349-358.
65. Wilson, G. R., and Benoit, T. G. 1993. Alkaline pH activates *Bacillus thuringiensis* spores. J. Invertebr. Pathol. 62: 87-89.
66. Wong, H. C., Schnepf, H. E., and Whiteley, H. R. 1983. Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. J. Biol. Chem. 258: 1960-1967.
67. Wunn, J. Kloti, A., Burkhardt, P. K., Biswas, G. C. G., Launis, K., Iglesias, V.A., and Potrykus, I. 1996. Transgenic Indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. Bio/Technology 14: 171-176.
68. Yamamoto, T. 1990. Identification of entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* by high-performance liquid chromatography. pp. 46-60. In “Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*“. L. A. Hickie, and W. L. Fitch Eds. American Chemical Society, Washington, D.C.

ABSTRACT

Tzeng, C. C.^{1*}, Kao, S. S.¹, Chen, L. J.², Chak, K. F.³, and Hou, R. F.⁴ 2002.
Cloning of *cryI Ac* gene in a *Bacillus thuringiensis* isolate from Taiwan. Plant Prot. Bull. 44: 185-208. (¹Department of Bio-pesticide, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC; ²Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC; ³Institute of Biochemistry, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan, ROC; ⁴Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC)

Full length DNA (3.6 kb) of the *cryI Ac* gene encoding insecticidal crystal protein (ICP) was amplified from a locally isolated *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) strain of E9-11 via PCR. This *cryI Ac* gene was constructed into *Escherichia coli* plasmid vector, pCR™ II, and then subcloned into the expression vector, pSB909.5 to form p1AcSB. After transforming p1AcSB into *Bt* Cry^B, the recombinant *Bt* expresses a 130 kDa ICP in the shape of a spherical crystal. Comparing the nucleotide sequence of this *cry* gene with that of the *cryI Ac* gene from *Bt* HD-73, only 8 different nucleotides were found, therefore, this *cry* gene can be grouped into the *cryI Ac* gene type. Toxicity of this ICP against larvae of *Plutella xylostella* was similar to that of Xentari, Delfin, and HD-73; however, this ICP was more toxic against larvae of *Artogeia rapae* than all other *Bt* control samples tested. Larvae of *Artogeia rapae* stopped feeding and died 1 day after treatment with this ICP even under low concentrations.

(Key words: *Bacillus thuringiensis*, isolate from Taiwan, *cryI Ac* gene, cloning, expression)

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