

蘇力菌台灣株 B11-30a 之營養期殺蟲基因 *vip3Aa* 的選殖與表現

石傑宇 郭 雪 高穗生 曾經洲*

台中縣霧峰鄉 農委會農業藥物毒物試驗所 生物藥劑組

(接受日期：2007 年 12 月 31 日)

摘 要

石傑宇、郭雪、高穗生、曾經洲* 2007 蘇力菌台灣株 B11-30a 之營養期殺蟲基因 *vip3Aa* 的選殖與表現 植保會刊 49：299 – 309

分離自台灣各地穀倉之 111 個蘇力菌菌株，利用 *vip3A* 基因特異性引子，進行 1.1 kb 片段的 PCR 篩選，獲得 66% 的篩獲率。由菌株 B11-30a 選殖 *vip3A* 相關基因，並進行基因的定序及比對，所得之 2,370 bp 的 *vip3A* 相關基因，與已發表之 *vip3Aa15* 具有 99.4% 同源性，推測是 *vip3Aa* 類型基因。轉譯後之胺基酸序列，與 *Vip3Aa15* 有 7 個胺基酸的差異，顯示本基因應該具有地區獨特性，且非因境外移入所產生。選殖此 *vip3Aa* 基因至 pQE82 蛋白質表現載體，進行 IPTG 的誘導及表現培養，經蛋白質電泳及西方墨點法分析，顯示 *vip3Aa* 基因，在大腸桿菌宿主中，可受 IPTG 誘導及表現，產物約為 88 kDa。可能由於表現量不高、形成包涵體 (inclusion bodies) 導致蛋白質立體結構錯誤的摺疊，或胺基酸序列的些微差異，造成本研究之 *Vip3Aa* 蛋白質產物，對於小菜蛾 (*Plutella xylostella*)、擬尺蠖 (*Trichoplusia ni*)、斜紋夜盜 (*Spodoptera litura*) 及甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 幼蟲的生物活性試驗，均不具明顯的殺蟲效果。

(關鍵詞：蘇力菌、*vip3Aa*、營養期殺蟲基因、基因選殖及表現)

緒 言

蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*) 屬好氣性革蘭氏陽性桿菌，是一種昆蟲病原細菌，在營養缺乏或環境不良的時候，會產生殺蟲結晶蛋白 (insecticidal crystal protein, ICP)，又稱為 δ -內毒素，約佔菌

體乾重的 25%^(1, 3)。在營養生長對數中期 (mid-log phase) 則會向胞外分泌可溶性營養期殺蟲蛋白 (Vegetative insecticidal protein, VIP)⁽⁹⁾。Vip 主要分為 Vip1、Vip2 和 Vip3 三種。Vip1 和 Vip2 對鞘翅目 (Coleoptera) 金花蟲科 (Chrysomelidae) 昆蟲如西方玉米根蟲 (*Diabrotica virgifera*)⁽¹⁵⁾

* 通訊作者。E-mail: cctzeng @tactri.gov.tw

具有殺蟲特異性；而 Vip3 對鱗翅目昆蟲具有殺蟲特異性，如球菜夜蛾 (*Agrotis ipsilon*)、秋行軍蟲 (*Spodoptera frugiperda*)、甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*)、菸草青蟲 (*Heliothis virescens*)、玉米穗蟲 (*Helicoverpa zea*) 等⁽⁹⁾。

1996年 *vip3Aa* 基因自蘇力菌中首次被選殖出來⁽⁹⁾，截至 2007 年為止共有 25 種 *vip3Aa* 型 (*vip3Aa1*~25) 的基因已陸續被選殖出來 (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.html)。 *vip3Aa* 轉殖至大腸桿菌及無質體之蘇力菌的研究陸續發表，顯示具有相當程度的殺蟲活性^(8, 15)。在以大腸桿菌為表現宿主之研究中，*vip3Aa1* 被構築至 pBluescript 載體，並轉形至大腸桿菌 (DH5 α) 中，表現對球菜夜蛾、秋行軍蟲、甜菜夜蛾等夜蛾科幼蟲，具有良好的殺蟲活性⁽⁹⁾；將 *vip3Aa9* 構築至 pQE30 載體，並轉形至大腸桿菌 (M15)，經由 IPTG 誘導，表現 Vip3Aa9 蛋白，對小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 及斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 具良好的毒效 (LC₅₀ 值分別為 36 及 5 ng/cm²)，但對球菜夜蛾的毒效則不佳 (LC₅₀ 值高達 2,165 ng/cm²)⁽¹⁴⁾，與 Vip3Aa1 的殺蟲效果⁽⁹⁾相異，因此推論可能與球菜夜蛾的品系多樣性及胺基酸序列的不同有關⁽¹⁴⁾；*vip3Aa10* 構築在 pET22b 載體，並轉形至大腸桿菌 (BL21)，以蘇力菌的啟動子 (promoter) 及核糖體結合子 (RBS)，驅動蛋白質的表現，對小菜蛾及斜紋夜蛾的 LC₅₀ 值，分別為 221 及 45 ng/cm²，其略遜於 Vip3Aa9 的殺蟲效果，可能的原因為胺基酸序列的不同及昆蟲地域性及蟲齡上的差別⁽⁸⁾；*vip3Aa14* 構築至 pET29a 載體，並轉形至 BL21，表現的蛋白對小菜蛾及斜紋夜蛾的 LC₅₀ 值分別為 120 及 12 ng/cm²⁽⁴⁾。在以蘇力菌為表現宿主之研究上，*vip3Aa13* 構築至 pHT3101 載體，並轉形至無質體之蘇力菌中，分別比較 *vip3A*、*cry3A* 及 *cry1A* 等

三種啟動子，對殺蟲活性表現的影響，對甜菜夜蛾，以使用 *cry3A* 啟動子，表現最佳 (LC₅₀ 值為 0.56 μ g/ml)，其殺蟲效果分別是 *vip3A* 啟動子的 3 倍及 *cry1A* 啟動子的 2 倍⁽⁶⁾；*vip3Aa7* 構築至 pHT305A 載體，並轉形至含有 ICP 基因的蘇力菌中，對甜菜夜蛾的殺蟲效果 (LC₅₀ 值為 0.87 μ g/ml)，較未轉形前提高了 10 倍以上⁽¹⁷⁾。

餵食 Vip3A 後的昆蟲組織病理分析顯示，Vip3A 作用之首要部位為中腸上皮細胞，對於感受性 (susceptible) 的昆蟲，如球菜夜蛾及秋行軍蟲而言，低濃度的 Vip3A，會造成腸道麻痺，提高濃度則會引起腸道上皮細胞的裂解並造成死亡。然而對於非感受性 (nonsusceptible) 的昆蟲，如歐洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 則無病徵的出現，因此 Vip3A 的殺蟲範圍，與昆蟲腸道細胞的專一性結合有關⁽¹⁶⁾。蘇力菌 (HD-1) 內源性 *vip3A* 經過基因剔除 (gene knockout) 後，對於球菜夜蛾及甜菜夜蛾的殺蟲效力，分別減少為原始母株的 1/4 及 1/16，相同情況下，菸草青蟲及擬尺蠖 (*Trichoplusia ni*) 則不受影響⁽⁷⁾。刷狀緣膜微粒 (brush border membrane vesicles, BBMV) 配位體墨點法 (ligand blotting) 試驗，顯示 Vip3A 與 Cry1A 各有專一性結合的接受器蛋白質分子，因此 Vip3A 與 Cry1Ab 在鱗翅目昆蟲 BBMV 上，應分別具有不同的接受器結合位置⁽¹⁰⁾。另有報告指出，Vip 的 N 端訊息胜肽與殺蟲活性有相關性，刪除 Vip 的 N 端 39 個胺基酸訊息胜肽並進行殺蟲活性試驗，結果顯示刪除訊息胜肽會使殺甜菜夜蛾的殺蟲活性減少約 100 倍 (LC₅₀ 由 5 ng/cm² 增加至 530 ng/cm²)，對於 *Chilo partellus* (螟蛾科) 則不受影響⁽¹⁴⁾；因此推論 Vip 對不同的昆蟲具有不同的殺蟲機制，其中訊息胜肽引導 Vip 進入細胞膜對於甜菜夜蛾的致病力是必要的⁽¹⁴⁾。類似研究也證實大腸桿菌中表現的 Vip，其 N 端 27 個胺基酸的訊息胜

肽對於蛋白質的分泌以及生物殺蟲活性是必須的⁽⁵⁾；另一研究則顯示刪除位於 N 端 33 個胺基酸序列的訊息勝肽 (signal peptide)，對小菜蛾及斜紋夜蛾的殺蟲活性並無顯著的差異⁽⁴⁾。已知在革蘭氏陰性菌中，蛋白質分泌至細胞間質是未經加工修飾的，然而在革蘭氏陽性的蘇力菌中，Vip3A 是少數分泌型蛋白中不具有 N 端加工修飾之特性⁽⁹⁾。

由於 ICP 殺蟲結晶蛋白，對於部分重要的作物害蟲缺乏殺蟲效力，因此營養期殺蟲蛋白 VIP 的發現，除了可彌補殺蟲結晶蛋白殺蟲效力的不足，也許可搭配其他在營養期大量表現之抗蟲蛋白，以發展廣效、多功能的生物性農藥。

材料與方法

樣本來源

以本實驗室台灣蘇力菌菌種庫中，採集分離自穀倉之 111 株菌株為試驗對象。

質體之萃取與純化

使用 QIAGEN MINI PREPARE KIT (Qiagen, Germany) 進行質體的萃取及純化。

聚合酵素連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

PCR 反應包含模版 DNA (100 ng)、1X PCR buffer、MgSO₄ (1 mM)、引子 (0.3 μM of each primer)、dNTP (0.2 mM)、KOD hot start DNA polmerase (2 units) (Novagen, Germany) 及去離子水，總反應體積 (reaction volume) 為 50 μl。置 PCR 反應器 (MWG-Biotech Thermal Cycler Primus, Germany)，PCR 反應之溫度時間條件為 94°C : 2 mins；再進行 94°C : 55 sec、60°C : 30 sec、72°C : 2 mins 反應，共 30 循環；72°C : 10 mins。

vip3A 基因初步篩選

以 111 株本土蘇力菌，進行菌株的初步篩選分別以萃取之質體為模版，使用針對 *vip3A* 高度保留區域所設計之引子⁽¹²⁾ vipF: 5' gCACAAgAgCCTTACCAAgT 3' 及 vipR: 5' TTAGCTTAgCCTCATAT 3'，進行聚合酶連鎖反應。

基因增幅定序及比對 (*vip3Aa* 基因序列比對)

以 B11-30a 菌株之質體為模版，參考 *vip3Aa1* (L48811) 序列並設計引子擴增具有 *Bam*HI 及 *Sph*I 切位的 *vip3Aa* 全長基因⁽⁹⁾。vipF30: 5' gggATCCCGATgAACAAgAATAA TACTAA 3' (含 *Bam*HI 切位) 及 vipR33: 5' ACATgCATgCATGTTACTTAATAgAgACA TCgT 3' (含 *Sph*I 切位)。

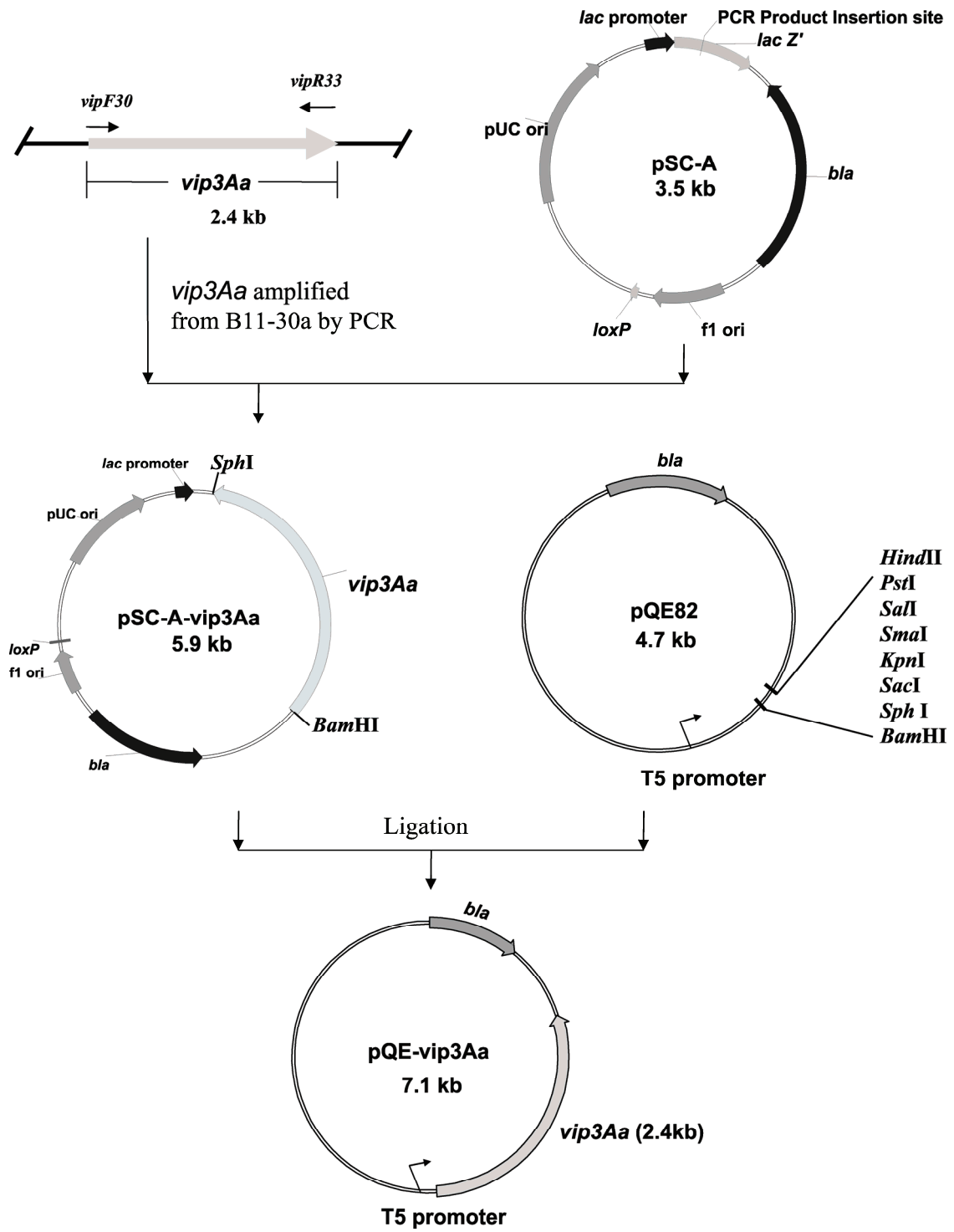
利用 StrataClone PCR Cloning Kit (Stratagene, USA)，將 *vip3Aa* 全長基因，構築至 pSC-A 載體，得到 pSC-A-*vip3Aa* 質體，再以 primer walking 方式，進行全長定序 (委託波仕特公司)，並將定序結果，登入 NCBI 網站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) 進行序列同源性比對。

質體構築 (pQE-*vip3Aa* 質體之構築)

pQE82 及 pSC-A-*vip3Aa* 分別以 *Bam*HI 及 *Sph*I 進行剪切，取 4.7 及 2.4 kb 產物，分別以 DNA gel extraction Kit (Qiagen, Germany) 進行回收，兩產物按一定比例混合後，加入 T4 ligase 進行接合反應，最後獲得 pQE-*vip3Aa* 質體 (圖一)。

細胞轉型 (Transformation)

將裝有 50 μl 冰凍的勝任細胞 (源資，台灣) 之微量離心管，利用常溫水浴浸泡 10-20 sec，直到 1/3 體積退冰溶解，均勻混入不超過勝任細胞總體積 1/10 的質體 DNA，立即置於冰上 1-10 mins，隨即將菌液塗佈於已 37°C 預暖，含有 100 μg/ml



圖一、pQE-vip3Aa 之質體構築。

Fig. 1. Construction of plasmid pQE-vip3Aa.

Ampicillin 的 LB 固體培養基上，於 37°C 培養箱進行篩選培養。

IPTG 誘導蛋白質表現及 SDS 聚丙烯醯膠體電泳 (SDS-PAGE)

將上述轉型成功之轉殖菌，培養於 50 ml 的 LB 培養液，於 37°C、180 rpm 下震盪培養至菌液 OD₆₀₀ 值介於 0.6-0.8，以 1 mM IPTG 進行蛋白質誘導，分別收集誘導前後之菌體，利用 B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent (Pierce, USA) 進行可溶性及不溶性蛋白質的分離，以 BCA Protein Assay Kits (Pierce, USA) 進行蛋白質的定量並進行電泳分離。

西方墨點法 (Western blot)

蛋白質經過 10% 的 SDS 聚丙烯醯膠體電泳分離後，將膠片浸泡在冰冷的轉漬緩衝溶液中 (2.5 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, 0.05% SDS)，30 mins 後，將膠片平舖在尺寸相同的 PVDF 轉漬膜 (Immobilon-P Transfer Membrane) (Millipore, USA) 上，上下各舖 3 張與膠片尺寸相同的濾紙，PVDF 轉漬膜與濾紙，均先經轉漬緩衝液浸濕。所形成的轉漬三明治，舖放於轉漬機 (Trans-Blots Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad, USA) 的平台上，通電 22 V，50 mins。取下轉漬完成的 PVDF 轉漬膜，以 50 ml 的 TBS-milk 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.5% non-fat milk) 搖盪浸泡 30 mins，再加入 mouse anti histidine tag (AbD serotec, UK)，持續搖盪 2 hrs。以冰冷的 TBS 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) 浸洗 PVDF 轉漬膜 10 mins，再換新的 TBS 緩衝液，反覆 3 次。二次抗體的結合反應，係將已浸洗過的 PVDF 轉漬膜，浸入 50 ml 的 TBS-milk 緩衝液，並加入 alkaline phosphatase conjugated secondary antibody (Chemicon, USA)，室溫下持續

搖盪 2 hrs，再以新的 TBS 緩衝液，反覆 3 次浸洗，每次 10 mins。將 PVDF 轉漬膜浸於 FAST BCIP/NBT (Sigma, USA) 進行呈色反應，最後以水終止反應。

生物活性測試

以 3 齡初美國感受性品系的擬尺蠖及小菜蛾進行生物活性試驗。供試藥劑以去離子水配製成各種處理濃度之藥劑懸浮液，分別於專用的人工飼料培養基製作完成前，均勻混拌入人工飼料中，培養基凝置於布丁杯中，接入供試蟲，並以去離子水為對照組，每濃度處理 10 隻幼蟲，3 重覆，置於 25°C，75%RH，L:D=12:12 之定溫箱中，連續餵食 48 小時後，置換新鮮無藥劑處理之飼料，再經 24 小時後，觀察紀錄死亡蟲數，並換算為處理後 72 小時之平均死亡率。

以 3 齡初的斜紋夜盜及甜菜夜蛾進行試驗。供試藥劑以去離子水配製成各試驗濃度之藥劑懸浮液，分別於專用的人工飼料培養基製作完成前，均勻混拌入人工飼料中，將固定體積大小 (直徑 0.7 cm×高 1.0 cm) 的人工飼料分別置入 30 孔盤中，將 30 μl 不同濃度之藥劑懸浮液，直接滴在人工飼料上，於室溫下陰乾，接入供試蟲並單隻隔離，並以去離子水為對照組，每濃度處理 10 隻幼蟲，3 重覆，置於 25°C，75%RH，L:D=12:12 之定溫箱中，連續餵食 48 小時後，置換新鮮無藥劑處理之飼料，再經 72 小時後，觀察紀錄死亡蟲數，並換算為處理後 120 小時之平均死亡率。

結 果

vip3A 基因初步篩選

利用 *vip3A* 特異性引子，進行本土蘇力菌菌株的初步篩選，PCR 反應的結果顯示，111 株供試之本土菌株中，共 73 株具有 *vip3A* 基因產物，*vip3A* 基因之篩獲率為 66%。

***vip3Aa* 基因序列比對**

以編號 B11-30a 菌株之質體為模版，利用 *vipF30* 及 *vipR33* 引子，擴增 *vip3A* 相關基因，將此 *vip3A* 構築至 pSC-A(圖一)。經過基因定序及核苷酸序列比對結果顯示，此基因由起始密碼 (start codon) 至終止密碼 (stop codon) 全長為 2,370 bp，與

NCBI 資料庫中，已註冊之核苷酸序列編號 AY295778 (*3Aa15*)、AF500478 (*3Aa12*)、AF373030 (*3Aa10*)、AAY044227 (*3Aa7*)、DQ497637 序列等，有 13 個鹼基對的差異 (圖二)，同源性達 99.4%。轉譯後的序列含有 789 個胺基酸，並包含 N 端 3 個胺基酸所組成的訊息胜肽 (signal peptide)，

1	<u>ATG AAC AAG AAT AAT ACT AAA TTA AGC ACA AGA GCC TTA CCA AGT TTT ATT GAT TAT TTT</u>
	<i>M N K N N T K L S T R A L P S F I D Y F</i>
61	<u>AAT GGC ATT TAT GGA TTT GCC ACT GGT ATC AAA GAC ATT</u> ATG AAC ATG ATT TTT AAA ACG
	<i>N G I Y G F A T G I K D I M N M I F K T</i>
481	CTT ATT AAC TCT ACA CTT ACT GAA ATT ACA CCT GCG TAT CAA CGG ATT AAA TAT GTG AAC
	<i>L I N S T L T E I T P A Y Q R I K Y V N</i>
541	GAA AAA TTT GAG GAA TTA ACA TTT GCT ACA GAA ACT AGT TCA AAA GTA AAA AAG GAT GGC
	<i>E K F E E L T F A T E T S S K V K K D G</i>
841	CTG CAA GCA AAA GCT TTT CTT ACT TTA ACA ACA TGC CGA AAA TTA TTA GGC TTA GCA GAT
	<i>L Q A K A F L T L T T C R K L L G L A D</i>
1021	AGT GAT GAA GAT GCA AAG ATG ATT GTG GAA GCT AAA CCA GGA CAT GCA TTG GTT GGG TTT
	<i>S D E D A K M I V E A K P G H A L V G F</i>
1081	GAA ATT AGT AAT GAT TCA ATG ACA GTA TTA AAA GTA TAT GAG GCT AAG CTA AAA CAA AAT
	<i>E I S N D S M T V L K V Y E A K L K Q N</i>
1141	TAT CAA GTI GAT AAG GAA TCC TTA TCG GAA GTT ATT TAT GGT GAT ATG GAT AAA TTA TTG
	<i>Y Q V D K E S L S E V I Y G D M D K L L</i>
1321	AAT TTT TAT GAT TCT TCT ACA GGA GAA ATT GAC TTA AAT AGG AAA AAA GTA GAA TCA AGT
	<i>N F Y D S S T G E I D L N R K K V E S S</i>
1381	GAA GCG GAG TAT AGA ACG TTA AGT GCT AAT GAT GAT GGA GTG TAT ATG CCG TTA GGT GTC
	<i>E A E Y R T L S A N D D G V Y M P L G V</i>
1741	ATT TIA CAA TTT ATT GGA GAT AAG TTA AAA CCG AAA ACT GAG TAT GTA ATC CAA TAT ACT
	<i>I L Q F I G D K L K P K T E Y V I Q Y T</i>
1861	GAT AAA AAT AAT AAT TTA GAA GAT TAT CAA ACT ATT ACT AAA CGT TTT ACT ACA GGA ACT
	<i>D K N N N L E D Y Q T I T K R F T T G T</i>
2101	CAG GGA GGA CGA GGA ATT CTA AAA CAA AAC CTT CAA TTA GAT AGT TTT TCA ACT TAT AGA
	<i>Q G G R G I L K Q N L Q L D S F S T Y R</i>
2161	GTG TAT TTG TCT GTG TCC GGA GAT GCT AAT GTA AGG ATT AGA AAT TCT AGG GAA GTG TTA
	<i>V Y F S V S G D A N V R I R N S R E V L</i>
2281	GAG AAA GAT AAC TTT TAT ATA GAG CTT TCT CAA GGG AAT AAT TTA TAT GGT GGT CCT ATT
	<i>E K D N F Y I E L S Q G N N L Y G G P I</i>
2341	GTA CAT TTT TAC GAT GTC TCT ATT AAG TAA
	<i>V H F Y D V S I K *</i>

圖二、*vip3Aa* 與 *3Aa15* (AY295778) 之核苷酸及胺基酸序列差異處，斜體加底線之序列為訊息胜肽，字元框線為差異處。

Fig. 2. Comparison of nucleotide and amino acid sequence of the *vip3Aa* and *3Aa15* (AY295778). The italic and underline sequence indicates the signal peptide sequence. The sequence differences are blocked.

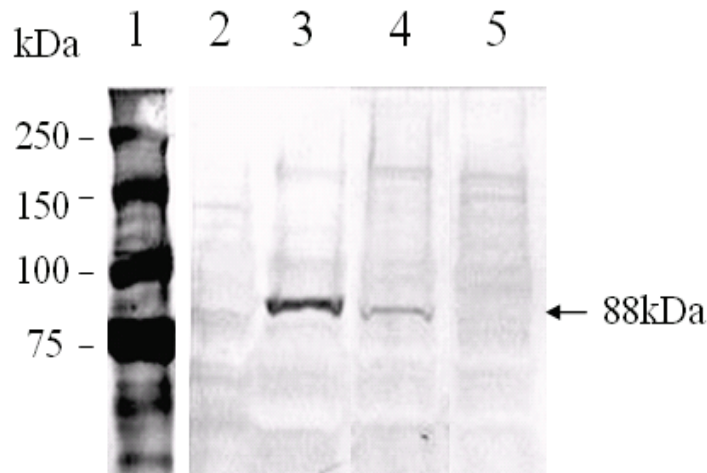
胺基酸序列與 NCBI 資料庫中已註冊序列編號 AAP51131 (*3Aa15*)、AAM22456 (*3Aa12*)、AAN60738 (*3Aa10*)、AAK95326 (*3Aa7*)、AAR36859 (*3Aa11*)、ABD84410 (*3Aa21*)、AAL69543、AAL69544、ABF54929 及 ABV03359 序列等，有 7 個胺基酸的差異 (圖二)，同源性為 99.1%。推論此分離基因，應屬於 *vip3Aa* 類型之基因。

pQE-vip3Aa 質體構築

構築在 pSC 上之 *vip3Aa* 基因 (pSC-A-*vip3Aa*) 與 pQE82，分別用 *Bam*HI 及 *Sph*I 限制酶進行剪切，取 4.7 kb 及 2.4 kb 產物分別回收，並進行連接，獲得 pQE-*vip3Aa* 質體。分別利用 *Bam*HI、*Mlu*I、*Pst*I 及 *Nco*I 進行酵素切位確認，結果在預期位置都分別得到正確長短及方向的片段。

IPTG 誘導 Vip3Aa 蛋白質表現

培養含有 pQE-*vip3Aa* 質體之大腸桿菌 (pQE-*vip3Aa*/BL21)，至菌液 OD₆₀₀ 值達 0.6-0.8 間，添加 1 mM 的 IPTG，進行 5 小時的誘導，收集菌體並加入蛋白質萃取試劑，經過離心分離後，得到可溶性與不溶性蛋白，利用蛋白質電泳 (SDS-PAGE) 及染色 (Commassive blue)，分析蛋白質產物分子量及表現量，結果顯示誘導前後並無顯著的蛋白質表現。為了進一步證實蛋白質是否因表現過低，於是使用具專一性的抗體 (mouse anti histidine tag, AbD serotec, UK)，進行西方墨點 (western blotting) 分析，結果顯示總蛋白質，大約在 88 kDa 的位置出現 Vip3Aa 的染色條帶 (圖三，行 4)。在可溶性及不溶性蛋白質分析上，不溶性蛋白有染色條帶 (圖三，行 3)，而可溶性蛋白則無染色條帶 (圖三，行 2)。



圖三、西方墨點分析 Vip3Aa 在大腸桿菌 BL21 蛋白質的表現。第一行為預染之蛋白質分子量標誌，第二行為誘導後可溶性蛋白質，第三行為誘導後不溶性蛋白質，第四行為總蛋白萃取物，第五行為誘導前之總蛋白，箭頭所指為大約 88 kDa 的 Vip3Aa 蛋白質產物。

Fig. 3. Western blot analysis of Vip3Aa proteins expressed in *E. coli* BL21. Lane 1, prestained marker; 2, soluble fraction; 3, insoluble fraction; 4, total protein extracted; 5, no IPTG induction. The arrowhead indicates the expressed Vip3Aa protein.

表一、Vip3A 對小菜蛾、擬尺蠖、甜菜夜蛾和斜紋夜蛾等四種鱗翅目幼蟲之生物活性
Table 1. Bioactivity of the Vip3A against larvae¹⁾ of 4 lepidopteran insects (*Plutella xylostella*, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua*, and *S. litura*)

Concentration of total protein (ppm)	Insect mortality (%)			
	72 hours after treatment		120 hours after treatment	
	<i>P. xylostella</i>	<i>T. ni</i>	<i>S. exigua</i>	<i>S. litura</i>
3,000	nd ²⁾	nd	0	0
1,500	60	nd	0	0
600	0	3.3	0	0
60	0	0	0	0
Control	0	0	0	0

¹⁾ Third instar larvae were tested. There were 10 larvae/replicate and 3 replicates/trial.

²⁾ nd, not detected.

生物活性測試

生物活性試驗結果(表一)，顯示總蛋白濃度為 1,500 ppm 時，對於 3 齡初小菜蛾幼蟲，有 60% 的致死率，另外在總蛋白濃度為 600 ppm 時，對於 3 齡初擬尺蠖幼蟲僅有 3.3% 的致死率；總蛋白濃度在 3,000 ppm 時，對 3 齡初斜紋夜盜及甜菜夜蛾不具有任何的致死效果。

討 論

蘇力菌殺蟲結晶毒蛋白，商業化後即普遍與長期地應用於田間，對於許多重要作物的害蟲，提供了有效的防治。但由於長期使用，有可能引起部分昆蟲產生抗性⁽²⁾；另外在實際應用上，也有部分的昆蟲對於殺蟲結晶毒蛋白(Cry 型毒素)不敏感⁽²⁾，因而有必要研究開發其他殺蟲蛋白。蘇力菌在營養生長對數中期時，可分泌產生可溶性的殺蟲蛋白，即營養期殺蟲蛋白(VIP)，在分子及生物特性上，有別於生長或培養後期所產生之 Cry 型殺蟲結晶蛋白。VIP 對於鱗翅目夜蛾科昆蟲如球莖夜蛾、秋行軍蟲、甜菜夜蛾、菸草青蟲、玉米穗蟲亦具有殺蟲效果⁽⁹⁾。因此有成為第二代殺蟲蛋白最佳代表性研究對象之趨勢。

利用 *vip3A* 特異性引子，進行本土蘇力菌的初步篩選，在 111 株本土蘇力菌菌株中，共 73 株含有 *vip3A* 基因產物，*vip3A* 之篩獲率為 66%。過去相關篩選含 *vip3A* 基因的篩獲率研究，有包括利用雜合分析(hybridization assay) 的 13% (60/463)⁽⁹⁾，和以 PCR 進行的 18% (2/11)⁽⁸⁾ 及 23% (29/125)⁽¹³⁾。然而造成篩選率的差異，應該與菌株來源多樣性及篩選樣本的總數量有關。

由核苷酸序列比對結果顯示，本研究之 *vip3Aa* 基因與 NCBI 資料庫中核苷酸序列最接近之 AY295778 (*3Aa15*)，有 13 個鹼基對的差異，顯示本基因應該具有地區獨特性。轉譯後的序列含有 789 個胺基酸，與 NCBI 資料庫中之胺基酸序列最接近之 AAP51131 (*3Aa15*)，有 7 個胺基酸的差異，同源性為 99.1%。顯示本研究分離之基因的獨特性，並非因境外移入所產生。

Vip3Aa 在大腸桿菌(BL21)宿主內，並未達到過度表現(over expression)。蛋白質电泳後的染色分析，並未能顯示清楚的條帶，推測原因可能為目標蛋白表現量不高所致。由於 pQE82 表現載體上，包含一段由六個組胺酸(6X-histidine tag)所組成的序列，轉譯後 Vip3Aa 的 N 端即包含此段組胺酸胜肽，所以即可利用專一性的抗

體 (anti-histidine tag) 進行免疫偵測, 由於其具有高靈敏度及高專一性, 證實本試驗之 Vip3Aa 蛋白質有表現, 但形成不可溶包涵體 (inclusion bodies) 之比率多於可溶性蛋白。Vip3Aa9 使用 pQE 系列 (pQE30) 的表現載體, 會在大腸桿菌 (M15) 中大量表現, 且主要以可溶性蛋白的形式, 存在於細胞質液 (cytosol) 內, 約佔總蛋白質的 40%⁽¹⁴⁾。與 Vip3Aa9 僅有 2 個胺基酸序列差異的 Vip3Aa13, 同樣使用 pQE 系列 (pQE30) 表現載體, 在大腸桿菌 (M15) 經誘導表現僅 19% 會分泌形成可溶性蛋白, 其餘的 80% 會形成不溶性的包涵體, 透過穿透式電子顯微鏡觀察, 顯示 Vip3Aa13 表現的包涵體主要分布在細胞間隙 (periplasmic space)⁽⁵⁾。上述研究結果顯示使用相同系列的表現載體及宿主, 可能因為胺基酸序列的差異及不同的培養環境與誘導條件, 而影響最終蛋白質表現的位置及溶解性, 表現在細胞質 (cytoplasm) 可能因還原的環境而阻礙雙硫鍵的形成, 形成的包涵體則會降低目標蛋白質的溶解度、生物活性以及最終的產量⁽¹¹⁾。

生物活性試驗結果顯示, Vip3Aa 對於 3 齡初的小菜蛾幼蟲及夜蛾科 (擬尺蠖、斜紋夜盜及甜菜夜蛾) 幼蟲之殺蟲效果不佳, 推測原因可能表現量不高, 還有 Vip3Aa 蛋白質形成不可溶的包涵體, 造成蛋白質不正常的摺疊, 而喪失活性及功能。另外, 過去研究指出 VipS (Vip3Aa9) 與 Vip3V (Vip3Aa10), 僅有 1 個胺基酸序列的差異, 其對球莖夜蛾的生物活性, LC₅₀ 值分別是 2,165 及 81 ng/cm², 兩者相差約 27 倍; 而 VipS (Vip3Aa9) 與 Vip3Aa1, 有 3 個胺基酸序列的差異, 也得到類似的結果。因此, 推論造成生物活性的差異, 可能也與胺基酸序列的些微差異有關^(7, 15)。由於本基因的胺基酸序列與 Vip3Aa10 有 7 個胺基酸序列的差異, 因此殺蟲活性降低也可能源自於此。

引用文獻

1. 林志輝、曾經洲、陳良築。2003。蘇力菌毒素基因轉殖與作物蟲害防治。植物保護學會特刊 新五號 (植物保護管理永續發展研討會專刊): 137-158。
2. 曾經洲。2001。蘇力菌在整合蟲害管理上之應用。跨世紀台灣昆蟲學研究之進展研討會專刊, 第 313-328 頁。謝豐國、林政行、顧世紅編。國立自然科學博物館刊印。台中。
3. Agaisse, H., and Lereclus, D. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.* 177: 6027-6032.
4. Bhalla, R., Dalal, M., Panguluri, S. K., Jagadish, B., Mandaokar, A. D., Singh, A. K., and Kumar, P. A. 2005. Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 243: 467-472.
5. Chen, J., Yu, J., Tang, L., Tang, M., Shi, Y., and Pang, Y. 2003. Comparison of the expression of *Bacillus thuringiensis* full-length and N-terminally truncated *vip3A* gene in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 95: 310-316.
6. Chen, J., Sun, F., Shi, Y., Xu, W., Guo, W., and Pang, Y. 2005. Efficient expression of *vip184ΔP* gene under the control of promoters plus Shine-Dalgarno (SD) sequences of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 99: 426-434.
7. Donovan, W. P., Donovan, J. C., and Engleman, J. T. 2001. Gene knockout demonstrates that *vip3A* contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera*

- exigua*. J. Invertebr. Pathol. 78: 45-51.
8. Doss, V. A., Kumar, K. A., Jayakumar, R., and Sekara, V. 2002. Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (*vip3V*) gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*. Protein Expr. Purif. 26: 82-88.
 9. Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., and Koziel, M. G. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5389-5394.
 10. Lee, M. K., Walters, F. S., Hart, H., Palekar, N., and Chen, J. S. 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. Appl. Environ. Microbiol. 69: 4648-4657.
 11. Makrides, S. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 60: 512-538.
 12. Rang, C., Gil, P., Neisner, N., Rie, J. V., and Frutos, R. 2005. Novel *vip3*-related protein from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 71: 6276-6281.
 13. Rice, W. C. 1999. Specific primers for the detection of *vip3A* insecticidal gene within a *Bacillus thuringiensis* collection. Lett. Appl. Microbiol. 28: 378-382.
 14. Selvapandiyan, A., Arora, N., Rajagopal, R., Jalali, S. K., Venkatesan, T., Singh, S. P., and Bhatnagar, R. K. 2001. Toxicity analysis of N- and C-terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5855-5858.
 15. Warren, G. W. 1997. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests, pp. 109-121. In: N. Carozzi & M. Koziel [eds.], Advances in insect control, the role of transgenic plants, Taylors & Francis, London. 301 pp.
 16. Yu, C. G., Mullins, M. A., Warren, G. W., Koziel, M. G., and Estruch, J. J. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. Appl. Environ. Microbiol. 63: 532-536.
 17. Zhu, C., Ruan, L., Peng, D., Yu, Z., and Sun, M. 2006. Vegetative insecticidal protein enhancing the toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against *Spodoptera exigua*. Lett. Appl. Microbiol. 42: 109-114.

ABSTRACT

Shi, C. Y., Kou, S., Kao, S. S., and Tzeng, C. C.* 2007. Cloning and expression of the vegetative insecticidal crystal protein gene, *vip3Aa*, from *Bacillus thuringiensis* Taiwan isolate B11-30a. Plant Prot. Bull. 49: 299-309. (Biopesticide Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung 413, Taiwan (ROC))

Using *vip3A*-specific primers to detect *vip3A* gene from 111 isolates of the *Bacillus thuringiensis* obtained in Taiwan by PCR, 73 isolates were positive for the *vip3A* product. A full-length gene encoding vegetative insecticidal protein (Vip) was amplified from B11-30a isolate and cloned into pSC-A vector. Nucleotide sequence analysis revealed that 99.4% of the *vip* gene was identical to the published *vip3Aa15* gene. There were seven amino acid residues in the Vip protein sequence which was different from the Vip3Aa15 protein. Results showed that *vip3A* gene has the local distinctive characterization and eliminated the possibility that it was imported from abroad. The *vip3Aa* gene we identified was subcloned into pQE82 expression vector for protein expression in *Escherichia coli*. Western blot analysis showed that Vip3Aa protein was expressed as expected with a size of 88 kDa. The bioassay data showed that the expressed Vip3Aa protein did not have significant activity against the larvae of *Plutella xylostella*, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua*, and *S. litura*, probably because of the protein misfolding in the inclusion body.

(Key words: *Bacillus thuringiensis*, *vip3Aa*, vegetative insecticidal protein (VIP), cloning, expression)

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

