

入侵紅火蟻之鑑定

吳孟玲

行政院農委會林業試驗所森林保護組

前言

新入侵台灣的螞蟻—入侵紅火蟻是當前最嚴重的入侵害蟲。該火蟻在受到外力干擾騷動時極具攻擊性，其成熟蟻巢的個體數約可達到 20 萬至 50 萬隻個體，因此入侵者往往會遭受大量的火蟻以螫針叮咬，大量酸性毒液的注入，除立即產生破壞性的傷害與劇痛外，毒液中的毒蛋白往往會造成被攻擊者產生過敏而有休克死亡的危險，若膿泡破掉，則又常常容易引起細菌性的二次感染。在外觀鑑別上以其成熟蟻巢呈現明顯隆起的蟻丘，是極容易快速認定紅火蟻的方法之一，但入侵紅火蟻族群在未成熟前的蟻丘並不明顯，容易與其他種螞蟻的蟻巢造成判斷上的錯誤。若能應用生物技術製成快速而正確的檢測試劑，則對紅火蟻鑑定上幫助極大，亦能免除一般民眾不必要之恐慌。本研究團隊於 93 年下半年度致力於發展出一套「快速、精確、經濟且易於使用」的方法，以提供給民眾或相關單位知道所捉到的螞蟻是否確為入侵紅火蟻。這套方法乃開發對入侵紅火蟻特殊毒蛋白具專一性的單元抗體，作成膠金標誌檢測試劑 (colloidal gold-labeling kit)，如驗孕試劑一樣方便使用，以提供一般民眾居家自行檢測。

紅火蟻的生物學

入侵紅火蟻是屬於地棲型螞蟻類，築巢於地下並形成高於地表的蟻丘，此種蟻巢形式可方便職蟻移動，蟻丘內部呈現蜂巢狀結構。蟻丘對外的水平蟻道可以拓展到蟻巢 100 ft 遠的區域，垂直蟻道達 6 ft，甚至達地下水層。影響蟻丘大小及形狀的因子包括：土壤類型、植被、溫度與季節。低溫及乾燥一直是入侵紅火蟻生存限制因子，入侵紅火蟻族群正常生長活動的溫度範圍在 3.6~40.7°C，22 至 36°C 是火蟻職蟻活動最旺盛的溫度。一般來說，乾季的蟻巢較濕季時的蟻巢來的小，溫度低時，蟻巢會築得較高以獲取太陽熱能，且在族群創始之初，蟻丘並不明顯易見。入侵紅火蟻沒

有特定的婚飛時期，全年都可以有新的生殖個體形成，雄蟻在交配後不久即會死去，蟻后 24 h 內開始產卵。

紅火蟻的分類與鑑定

入侵紅火蟻分類上屬膜翅目、家蟻亞科、火蟻族之火蟻屬。已知火蟻屬有 181 種類被發現命名，台灣記錄有熱帶火蟻、獵食火蟻、知本火蟻與入侵紅火蟻等 4 種。

入侵紅火蟻分類特徵如下：

1. 中軀與腹錘間有 2 節明顯腰節，無前伸腹節齒。
2. 觸角 10 節，錘節部分由 2 節組成。
3. 具明顯複眼，由數十個小眼構成。
4. 具明顯頭楯中齒。
5. 職蟻外部形態上屬於連續多態型，體長在 1.8 mm 至 6 mm 之間。
6. 兵蟻亞階級，後頭部平順無凹陷，大顎內緣有明顯小齒。

單元抗體製備

免疫抗體偵測法至今仍被認為是最簡單且經濟的偵測方法之一，本研究依下列實驗步驟進行：

1. 抗原之純化：

於解剖顯微鏡下，取出紅火蟻的毒腺，加入適量的 PBS 緩衝液，置於試管中磨碎後，離心 10000 g 取上澄液，經 SDS-PAGE 蛋白電泳確認毒蛋白存在後，做為老鼠免疫之抗原。

2. 單元抗體之製備：

- (1) 小白鼠免疫注射：以純系六週大的雌性 Balb/C 小白鼠，免疫注射共四次，間隔二至三週；注射部位以腹腔為主，但最後一次注射尾巴靜脈。
- (2) 培養基製備：培養基選用 RPMI-1640 (pH 7.3)，經無菌過濾後保存於 4°C。用於融合瘤培養者 (CRPMI) 需再添加胎牛血清。
- (3) 細胞融合：完成免疫過程之白鼠，進行無菌操作解剖取出脾臟，以針筒沖出脾臟細胞，與老鼠骨髓瘤細胞 (NS-1 cell) 混合後離心，以 45% PEG 1500 進行融合反應，以 HAT 培養基懸浮並分裝注入細

胞培養盤。

- (4) 細胞單株化與篩選：以間接免疫酵素抗體法進行單元抗體篩選。找出與紅火蟻組織反應強烈，但不與其他種類的火蟻（或螞蟻）組織反應者，進行單元抗體之生產。

3. 單元抗體之生產：

- (1) 抗體獲自小白鼠體內培養之融合瘤細胞：將細胞養至 log phase，離心收集細胞，以 RPMI 懸浮，直接注射到小白鼠之腹腔，經兩週後抽取腹水。
- (2) 抗體純化與酵素標誌：抗體純化採用 Protein A IgG Purification Kit。純化後的抗體，進行抗體酵素（alkaline phosphatase）標誌，抗體保存於 4°C。

4. 製成簡易偵測試紙條：

先將抗體標誌於檢驗試紙條上，利用膠金標誌原理，以毛細擴散作用，達到顯色目的。此項作業將由台大植微系蘇鴻基名譽教授提供技術協助，蘇教授先前已經成功開發出多種植物病毒的簡易偵測試紙條，技術已臻純熟，可有效促成本計畫目的之達成。

紅火蟻快速鑑定技術開發

已完成入侵紅火蟻的毒蛋白抽取，成功自入侵紅火蟻的腹部分離出毒囊與毒腺。並將毒腺內的毒蛋白萃取出來，先進行蛋白質電泳分析，發現確有毒蛋白分子出現在預期的位置。本分子試劑製備先以毒蛋白為抗原進行老鼠的免疫注射，經六週後解剖老鼠取其脾臟做融合瘤細胞篩選及單元抗體製備，經抗原抗體免疫分析實驗證實其血清含抗火蟻多元抗體，對火蟻的毒蛋白具特異性，在"入侵紅火蟻"與"熱帶火蟻"反應上極為強烈，且"入侵紅火蟻"的反應值比"熱帶火蟻"要稍高一些。進一步將融合瘤細胞株進行對入侵紅火蟻抗體篩選，共計獲得約 1000 個融合瘤細胞株，並做毒蛋白抗原抗體免疫分析試驗，篩選得到細胞株具分泌抗體可以區分"入侵紅火蟻"與"熱帶火蟻"，目前共得到 12 株具對入侵紅火蟻毒蛋白專一性之單元抗體細胞株，再從這些篩選到的抗體細胞株中，尋找力價高者，進行較大量的抗體生產與純化，目前已成功地完成對入侵紅火蟻特殊毒蛋白具專一性的單元抗體製備及單元抗體、抗原力價測試，皆表現出良好抗體抗原反應，已可成功地應用免疫酵素抗體法檢測紅火蟻，同時並進一步作成膠金標誌

檢測試劑，以提供非試驗單位快速鑑定紅火蟻用。

誌謝

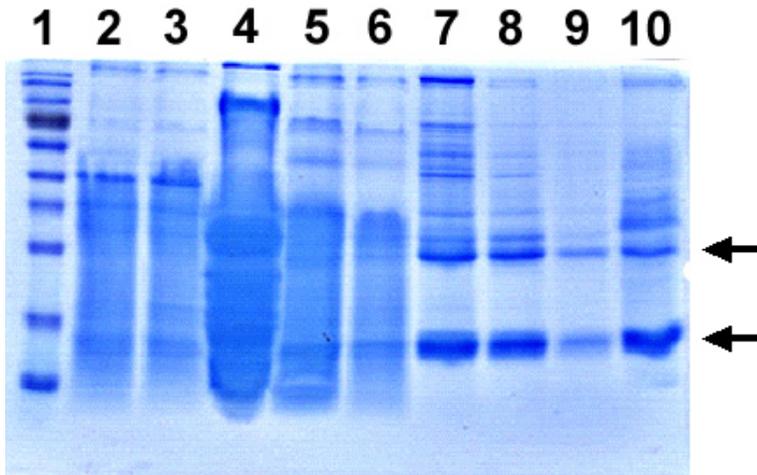
本研究獲行政院農業委員會動植物防疫檢疫局經費補助（94 農科-13.3.1-檢-B2(1)），謹誌謝忱。

參考文獻

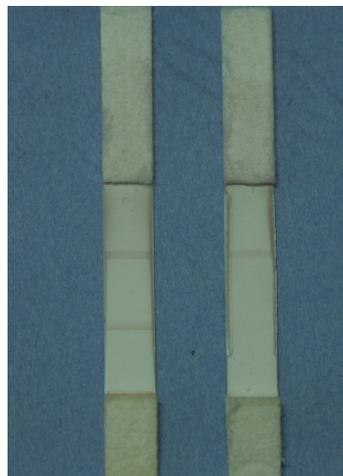
- Bolton, B. 1995. A taxonomic and zoogeographical census of the extant ant taxa (Hymenoptera: Formicidae). *J. Nat. Hist.* 29: 1037-1056.
- Cokendolpher, J. C., and S. A. Phillips. 1990. Critical thermal limits and locomotor activity of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae). *Environ. Entomol.* 19: 878-881.
- Deslippe, R. J., and Y. J. Guo. 2000. Venom alkaloids of fire ants in relation to worker size and age. *Toxicon* 38: 223-232.
- Goddard, J., J. Jarratt, and F. R. de Castro. 2000. Evolution of the fire ant lesion. *JAMA.* 284: 2162-2163.
- Hannan, C. J., C. T. Stafford, R. B. Rhoades, B. B. Wray, H. Baer, and M. C. Anderson. 1986. Seasonal variation in antigens of the imported fire ant *Solenopsis invicta*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 78: 331-336.
- Hoffman, D. R. 1987. Allergens in Hymenoptera venom. XVII. Allergenic components of *Solenopsis invicta* (imported fire ant) venom. *J. Allergy Clin. Immunol.* 80: 300-306.
- Hoffman, D. R. 1995. Fire ant venom allergy. *Allergy* 50: 535-544.
- Hoffman, D. R., D. E. Dove, and R. S. Jacobson. 1988. Allergens in Hymenoptera venom. XX. Isolation of four allergens from imported fire ant (*Solenopsis invicta*) venom. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82: 818-827.
- Kemp, S. F., R. D. deShazo, J. E. Moffitt, D. F. Williams, W. A. Buhner II. 2000. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105: 683-691.
- Kim, S. S., H. S. Park, H. Y. Kim, S. K. Lee, and D. H. Nahm. 2001. Anaphylaxis caused by the new ant, *Pachycondyla chinensis*: demonstration of specific IgE and IgE-binding components. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107:

1095-1099.

- King, T. P. 1996. Immunological studies of stinging insect venom allergens. *Toxicon* 34: 1455-1458.
- Lofgren, C. S., W. A. Banks, and B. M. Glancey. 1975. Biology and control of imported fire ants. *Ann. Rev. Entomol.* 20: 1-30.
- Markin, G. P., H. L. Collins, and J. H. Dillier. 1972. Colony founding by queens of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 65: 1053-1058.
- Markin, G. P., J. H. Dillier, and H. L. Collins. 1973. Growth and development of colonies of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 66: 803-808.
- Schmidt, M., T. J. McConnell, and D. R. Hoffman. 2003. Immunologic characterization of the recombinant fire ant venom allergen Sol i 3. *Allergy* 58: 342-349.
- Tschinkel, W. R. 1993. Sociometry and sociogenesis of colonies of the fire ant *Solenopsis invicta* during one annual cycle. *Ecol. Monogr.* 63: 425-457.
- Vinson, S. B. 1997. Invasion of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae): spread, biology, and impact. *Am. Entomol.* 43: 23-39.



圖一、萃取自入侵紅火蟻 (*Solenopsis invicta* = Si) 與熱帶火蟻 (*S. geminate* = Sg) 不同部位之蛋白 SDS-PAGE 電泳圖。Lane 1, Protein ladder; lane 2, Si soldier (20 whole body); lane 3, Si worker (20 whole body); lane 4, Si queen (2 abdomen); lane 5, Si soldier (20 abdomen); lane 6, Si worker (20 abdomen); lane 7, Si soldier (20 venom organ); lane 8, Si soldier (10 venom organ); lane 9, Si worker (10 venom organ); lane 10, Sg soldier (20 venom organ). 箭頭所指處為火蟻毒蛋白的兩條主要條帶 (26 kDa & 13 kDa)。



圖二、利用膠金標誌檢測試劑 (colloidal gold-labeling kit)，提供快速鑑定紅火蟻用，左邊為正反應 (紅火蟻抗原)，右邊為負反應。

表一、以免疫酵素抗體法測試抗血清對不同種螞蟻的檢測值

		37 °C, 1 h	
Blank		0.116	
Ant species		ELISA value	ELISA value index ^a
入侵紅火蟻	<i>Solenopsis invicta</i>	1.295	+++
熱帶火蟻	<i>S. geminata</i>	1.221	+++
錫蘭迷蟻	<i>Aenictus ceylonicus</i>	-0.110	—
大林長腳家蟻	<i>Aphaenogaster tipuna</i>	-0.142	—
白疏巨山蟻	<i>Camponotus albosparsus</i>	-0.093	—
畢氏粗角蟻	<i>Cerapachys biroi</i>	-0.111	—
吉悌細顎針蟻	<i>Leptogenys kitteli</i>	-0.024	—
小黃單家蟻	<i>Monomorium pharaonis</i>	-0.089	—
高山鋸針蟻	<i>Odontomachus monticola</i>	-0.019	—
黃足粗針蟻	<i>Pachycondyla luteipes</i>	-0.084	—
黃腳黃山蟻	<i>Paratrechina flavipes</i>	-0.102	—
熱烈大頭家蟻	<i>Pheidole fervens</i>	-0.055	—
節膜角瘤家蟻	<i>Pyramica membranifera</i>	-0.083	—
蓬萊瘤顎家蟻	<i>Strumigenys formisensis</i>	-0.124	—
日本瘤顎家蟻	<i>S. solifontis</i>	-0.101	—
愛默網家蟻	<i>Vollenhovia emeryi</i>	-0.093	—

^a ELISA value index: —, OD₄₀₅ < 0.1; +, 0.1 ~ < 0.5; ++, 0.5 ~ < 1.0; +++
+, 1.0 ~ < 1.5.

表二、以免疫酵素抗體法測試抗血清對入侵紅火蟻與熱帶火蟻不同稀釋倍率的檢測值

Ant species	Dilution values	ELISA value ^a	ELISA index ^b
<i>Solenopsis invicta</i> (入侵紅火蟻) (soldier poison gland × 25)	1X	1.524	+++
	2X	1.488	+++
	4X	1.478	+++
	8X	1.540	+++
	10 ³ X	0.980	++
	10 ⁴ X	0.439	+
<i>S. geminata</i> (熱帶火蟻) (soldier poison gland × 25)	1X	1.220	+++
	2X	1.193	+++
	4X	1.184	+++
	8X	1.320	+++
	10 ³ X	0.666	++
	10 ⁴ X	0.226	+

^a Values of OD_{405nm} after 60 min substrate incubation at 37°C.

^b ELISA value index: -, OD₄₀₅ < 0.1; +, 0.1 ~ < 0.5; ++, 0.5 ~ < 1.0; +++, 1.0 ~ < 1.5.

表三、以免疫酵素抗體法測試抗腹水和純化抗體 IgG 對入侵紅火蟻與熱帶火蟻不同稀釋倍率的檢測值

Antibody	37 °C, 30 min				37 °C, 1 h			
	0.096				0.103			
	Ascetic fluid		Purified antibody IgG		Ascetic fluid		Purified antibody IgG	
Dilution values	RIFA	TFA	RIFA	TFA	RIFA	TFA	RIFA	TFA
10 ² X	2.436	1.126	3.214	3.31	3.333	2.073	OVER*	OVER*
10 ³ X	2.440	1.747	2.428	1.973	OVER*	2.971	3.255	3.040
10 ⁴ X	2.304	0.977	2.107	0.687	3.272	1.792	3.173	1.232
10 ⁵ X	2.066	0.572	1.045	0.152	3.172	1.088	1.899	0.286
10 ⁶ X	0.794	0.122	0.253	0.035	1.466	0.244	0.488	0.069
10 ⁷ X	0.100	0.007	0.035	0.003	0.197	0.023	0.078	0.017

Antigen: 0.37 g of *Solenopsis invicta* (RIFA) or *S. geminata* (TFA) with 5 ml coating buffer.

* OVER means OD₄₀₅ value over 3.5.

表四、以免疫酵素抗體法測試抗體對不同種螞蟻的檢測值

Blank		37 °C, 1 h	
		0.105	
Ant species		ELISA value	ELISA value index ^a
入侵紅火蟻	<i>Solenopsis invicta</i>	2.335	++++
熱帶火蟻	<i>S. geminata</i>	0.284	+
大頭家蟻	<i>Pheidole</i> sp.	0.524	++
小紅蟻	<i>Pheidoleton diversus</i>	0.219	+
黑棘蟻	<i>Polyrhachis dives</i>	0.171	+
柯氏黃山蟻	<i>Paratrechina kraepelini</i>	0.037	—
白足扁琉璃蟻	<i>Techomyrmex albipes</i>	0.057	—
花居單家蟻	<i>Monomorium floricola</i>	0.311	+

^a ELISA value index: —, OD₄₀₅ < 0.1; +, 0.1 ~ < 0.5; ++, 0.5 ~ < 1.0; +++, 1.0 ~ < 1.5; +++++, 1.5 ~ < 2.0; ++++++, 2.0 ~ < 2.5.
 Antibody: Antibody diluted with PBST to 10⁵X.
 Antigen: 0.06g of ant with 10ml coating buffer.

表五、以免疫酵素抗體法測試抗體對入侵紅火蟻與熱帶火蟻不同稀釋倍率的檢測值

Ant species	Dilution values	ELISA value ^a	ELISA index ^b
<i>Solenopsis invicta</i> (入侵紅火蟻) (soldier 75 mg)	4X	1.650	++++
	8X	2.163	+++++
	16X	2.238	+++++
	32X	2.148	+++++
	64X	2.809	+++++
	512X	0.150	+
<i>S. geminata</i> (熱帶火蟻) (soldier 75 mg)	4X	0.176	+
	8X	0.229	+
	16X	0.340	+
	32X	0.380	+
	64X	0.290	+
	512X	0.004	-

^a Values of OD_{405nm} after 60 min substrate incubation at 37°C.

^b ELISA value index: -, OD₄₀₅ < 0.1; +, 0.1 ~ < 0.5; ++, 0.5 ~ < 1.0; +++, 1.0 ~ < 1.5; +++++, 1.5 ~ < 2.0; ++++++, 2.0 ~ < 2.5; ++++++, 2.5 ~ < 3.0.

Antibody: Antibody diluted with PBST to 10⁵X.

表六、蟲體自然死亡與冷藏(-20°C)之保存測試

		37 °C, 1 h
Blank		0.119
<i>Solenopsis invicta</i> (Fresh, not treatment)		3.353
<i>S. geminata</i> (Fresh, not treatment)		0.292
Days	Death	Ice (4°C)
1 day	2.511	3.347
2 day	2.065	2.487
3 day	1.933	3.261
4 day	1.750	2.992
5 day	1.995	2.520
6 day	1.595	2.240
7 day	1.090	2.172

Antibody: Antibody diluted with PBST to 10⁵X.

Antigen: 3 of ant with 10ml coating buffer.