

Xenorhabdus nematophilus BP 品系杀虫毒素基因的克隆与鉴别*

崔 龙¹, 邱礼鸿¹, 房媛媛¹, 庞 义¹, 李国勋²

(1. 中山大学生命科学学院//生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 河北农业大学植物保护学院, 河北 保定 071001)

摘 要: 构建了昆虫病原线虫共生菌 *Xenorhabdus nematophilus* BP 品系的粘粒文库并用生物测定的方法从中筛选到2个对棉铃虫初孵幼虫有口服抑杀作用的克隆 cos83 和 cos76。为初步确定这两个克隆的毒素基因与已报道基因的差异程度, 根据已发表的共生菌毒素基因序列资料设计了7对引物对这两个克隆进行 PCR 扩增并对扩增产物进行测序和分析。从毒力较强的 cos83 中, 7对引物均扩增出与目标片段大小一致的产物, 而从 cos76 中只有5对扩增到目标片段。测序结果显示, cos76 的5个 PCR 扩增产物与 cos83 的对应扩增产物 DAN 序列同源性为100%。以 cos83 的7个 PCR 扩增产物所编码氨基酸序列进行 BLAST 分析, 它们与 *X. nematophilus* PMF1296 和 *Photorhabdus luminiscens* W14 毒素相应区间的平均同源性分别为94%和58%, 说明 cos83 毒素是共生菌口服毒素家族的一员但与同类的其它毒素有一定的差异, 值得对其杀虫谱, 作用机理等进行进一步的研究。

关键词: *Xenorhabdus nematophilus* BP; 粘粒文库; 杀虫阳性克隆; 筛选

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 03-0047-05

昆虫病原线虫 (*Entomopathogenic nematodes*, 简称 ENs) 共生菌 *Xenorhabdus* spp. 和 *Photorhabdus* spp. 通过产生各种杀虫毒素在致死昆虫的过程中起着重要作用。现已描述的线虫共生菌有2个属——异杆菌属 (*Xenorhabdus*) 和发光杆菌属 (*Photorhabdus*)。异杆菌与斯氏线虫 (*Steinernema*) 共生, 发光杆菌与异小杆线虫 (*Heterorhabditis*) 共生^[1]。现已从这类细菌中发现多种有口服或血腔杀虫活性的毒素。不同种或品系的共生菌产生的毒素对同一种昆虫的毒性不同, 相同共生菌种对不同种类昆虫的毒性也不同。从线虫共生菌中克隆有口服杀虫效果的新毒素基因作为开发转基因抗虫作物的毒素基因源已成为一个研究热点。

目前已发现的昆虫病原线虫共生菌杀虫毒素均为复合蛋白, 由多个亚基构成。David Bowen^[2,3] 等用 HPLC 的方法对 *P. luminescens* w14 发酵液粗提物纯化后发现, 杀虫毒素由4个亚基组成, 分别称为 Tca, Tcb, Tcc, Tcd, 用鳞翅目昆虫烟草天蛾 *Manduca sexta* 的初孵幼虫进行生物测定表明, 各成分的口服杀虫活性差异显著, 其中 Tca, Tcd 在毒素的杀虫活性中起主要作用。目前已有多个共生菌菌株的杀虫基因被克隆。从目前已克隆的毒素基因来看, 均是大片段复合性基因, 有多个开放读码框

(ORF), Nicholas 等^[4] 分析多种共生菌基因后发现, 杀虫毒素基因有3个必需的位点: *tcaAB* 或 *tcdA* 类似基因; *tcaC* 或 *tcdB* 类似基因; *tccC* 类似基因。这3个位点在不同的共生菌中具有很高的同源性, 这种保守性说明这3个位点的表达产物对昆虫的口服毒性是必需的。为了克隆到能表达具有杀虫活性毒素的基因全序列, 目前一般采用构建粘粒文库, 因为粘粒载体能插入大于30 kb 的基因片段。

Xenorhabdus nematophilus BP 是本实验室保存的菌株, 生测结果显示其发酵液的上清对鳞翅目昆虫棉铃虫和斜纹夜蛾的初孵幼虫均有很高的杀虫活力, 可能存在杀虫毒素。本文介绍了通过构建粘粒文库的方法从中克隆该毒素基因及其对该基因的鉴别结果。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

共生菌菌株来源: *Xenorhabdus nematophilus* BP 从昆虫病原线虫 *Steinernema carpocapsae* BP 品系中分离, -70℃保存于φ=15%甘油中。

试剂: pWEBITM cosmid cloning Kit (Epicentre) 购自基因公司, Sliver Beads DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术公司, pMD18-T Vector 为

* 收稿日期: 2002-07-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170143); 广东省自然科学基金团队资助项目 (000594232172)

作者简介: 崔 龙 (1970年生), 男, 博士生; 通讯联系人: 邱礼鸿; E-mail: ls76@zsu.edu.cn

TaKaRa (大连) 生产。质粒少量提取试剂盒为 Omega Bio-Tek 产品。测序试剂盒: BigDye Terminator Kit (PE ABI)。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取 将-70 ℃保存的共生菌涂布于NBTA 平板^[9]上, 28 ℃培养 48 h, 挑取一个初生型单菌落接到 5 mL LB 液体培养基中, 28 ℃, 200 r/min 震荡培养至 A₆₀₀ 约 1.5, 取 1.5 mL 至 EP 管, 12 000 r/min 离心 2 min, 去上清。参照《精编分子生物学试验指南》描述的方法提取细菌总 DNA。总 DNA 经微量注射器抽吸剪切, 再电泳检查, 直至 80% 以上的 DNA 片段为 35~45 kb 为止。

1.2.2 粘粒文库的构建及保存 按 pWEBIM cosmid cloning Kit 说明书操作。文库构建完成后, 每个克隆分别做甘油菌保存于-70 ℃。

1.2.3 杀虫阳性克隆的筛选 将粘粒文库中每个克隆分别接入 1 mL LB 液体培养基, 振荡培养至 A₆₀₀ 约为 1.5, 将培养物每 20 个一组混合在一起, 离心去掉大部分上清液, 留 100 μL 重悬沉淀, 加入 5 μL 质量浓度为 100 μg/mL 的溶菌酶, 室温放置 1 h, 在冰浴中超声波破碎 100 s, 加入到 1.0 g 棉

铃虫人工饲料中, 将之平分 10 等份, 放入多孔板, 每孔接入 1 头棉铃虫初孵幼虫。用未转入粘粒的大肠杆菌 EPI100 为对照。96 h 后记录死亡虫数, 并计算校正死亡率。对存活幼虫称量, 计算平均体质量。

对于死亡率较高或有明显抑制幼虫生长的组, 再每 5 个分成一亚组, 用同样方法进行生测。对有杀虫活性的亚组, 再对组内的每个克隆分别生测, 找出有活性的单个克隆。

1.2.4 阳性克隆杀虫毒素基因的初步鉴定 根据 GeneBank 中已发表的共生菌 *Xenorhabdus nematophilus* PMF1296 毒素基因 (GenBank accession No.: AJ308438), 设计 7 对引物(图 1, 表 1):

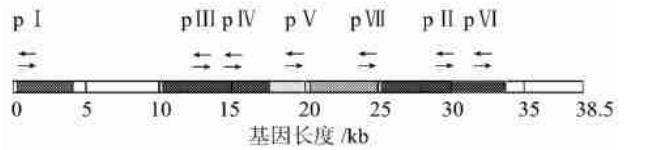


图 1 每对引物在 *Xenorhabdus nematophilus* PMF1296 毒素基因的位置

Fig. 1 The location of the primers in *Xenorhabdus nematophilus* PMF1296 toxin genes (GenBank Accession No.: AJ308438)

表 1 鉴定阳性克隆所用的引物

Tah 1 Seven pairs of primers used for the identification of insecticidal toxin genes

Primer		Targeted ORF of <i>X. nematophilus</i> PMF1296	The predicted size of amplified product/bp
P I	5'-TCGACGCACAGATTGGTAT-3'	<i>xptD1</i>	450
	5'-TCGGCGCTCAGTAAGAAAGT-3'		
P II	5'-ACAACGTC AACAGCAACACC-3'	<i>xptA2</i>	440
	5'-ACACAACACCAGCAGAGTATCC-3'		
P III	5'-CTATCTGCTGATTGCTAACC-3'	<i>xptA1</i>	237
	5'-GTGGGGTTCGATATAGTTTTC-3'		
P IV	5'-AACTGGAACGTCCGCCAATTGGA-3'	<i>xptA1</i>	238
	5'-GGCTCAACACCAATAAAG-3'		
P V	5'-CACTGTCTCGTGAAGAGGGTCA-3'	<i>xptB1</i>	316
	5'-CATCTCTCTGTCCACGATTGATA-3'		
P VI	5'-AATAACCGTTACAGCATCTA-3'	<i>xptA2</i>	185
	5'-GCGGGTCAGGTAAATTCTAAAAG-3'		
P VII	5'-AATTCTGGGTACGGAGTTC-3'	<i>xptC1</i>	406
	5'-GGCAGCCACAGCAGAGA-3'		

取筛选到的阳性克隆质粒 DNA 约 5 ng 作模板, 采用 50 μL 反应体系, 进行 PCR 反应。PCR 产物克隆到 pMD18-T Vector 后 (参照试剂说明), 转化到大肠杆菌 TG1 中, 用少量质粒提取试剂盒提取转化子重组质粒, 并以之为模板, 用测序试剂盒做测序反应, 用 ABI377 自动测序仪进行 DNA 测序, 每个片段重复测序 3 次。得到的 DNA 序列及其推测

编码的氨基酸序列在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>进行在线 BLAST 分析。

2 结果

2.1 阳性克隆筛选

构建的文库共有 434 个克隆。构建原核生物粘粒文库一般容量达 400 以上, 即可满足任一 30~45

kb 的 DNA 片段在文库中出现的概率在 99% 以上。因此此文库中应有含有杀虫毒素基因的克隆。将 434 个克隆随机分成 22 个组(每组 20 个, 最后一组 14 个), 生物测定显示, 5 个组(组 3, 组 4, 组 8, 组 11, 组 15) 能较明显抑制棉铃虫幼虫的生长。这 5 个组再进一步分亚组及单个克隆生测, 找到 2 个克隆(cos76, cos83) 有较明显的杀虫活性(图 2, 3)。

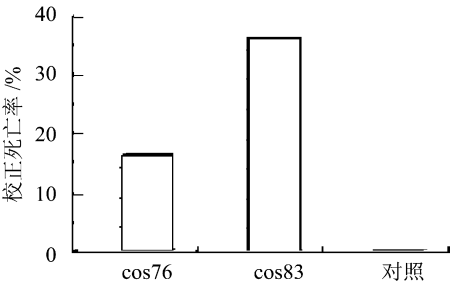


图2 饲喂阳性克隆与对照细胞的棉铃虫幼虫的 96 h 死亡率

Fig. 2 The mortality of *Helicoverpa armigera* neonate fed with diet containing lysate of cos76 or cos83 for 96 h

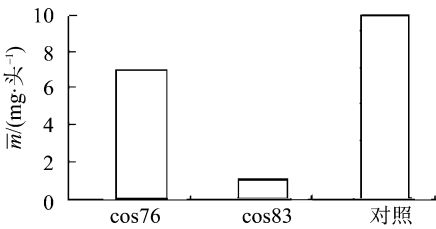


图3 饲喂阳性克隆与对照细胞的棉铃虫幼虫的 96 h 平均质量

Fig. 3 Mean weights of 96 h old *Helicoverpa armigera* larvae fed with diet containing lysate of cos76 or cos83

从图 2, 3 可以看出, 2 个阳性克隆均有一定的杀虫效果, 同时对棉铃虫的生长有较明显的抑制作用。cos83 与 cos76 相比, cos83 在杀虫效果与抑制生长方面均优于 cos76。

2.2 杀虫阳性克隆杀虫毒素基因的鉴定

对于杀虫活性较高的 cos83, 7 对引物均扩增出与预计大小一致的片段。而杀虫活性较低的 cos76, 引物 I、III、IV、V、VI 扩增出与预计大小一致的片段, 而引物 II、VI 没能扩增出 DNA 片段(图 4)。

对 PCR 扩增的 cos83 的 7 个片段和 cos76 的 5 个片段测序后, 发现 cos76 的 5 个片段与 cos83 相同引物扩增的片段的基因序列完全相同。这说明 cos76 和 cos83 的毒素基因应是来自 *X. nematophilus* BP 基因组的同一位置, 只是由于 cos76 部分缺少了 cos83 所具有的与杀虫活性有关的部分基因片段使其杀虫活性降低。通过 BLAST 分析, 从 cos83 中扩

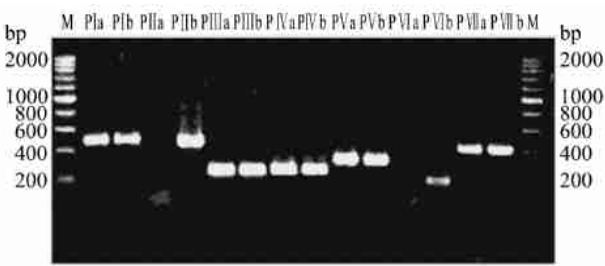


图4 阳性克隆的 PCR 鉴定

Fig 4 Identification of the insecticidal clones by PCR
M: 200 bp DNA ladder marker;
a: cos76; b: cos83

增出的 7 个片段与 *X. nematophilus* PMF1296 杀虫毒素基因相应部位的同源性均在 93% 以上。对这 7 个片段所编码的氨基酸进行 BLAST 分析, 我们发现这些氨基酸序列与来自同一种共生菌 *X. nematophilus* PMF1296 的杀虫毒素蛋白有比较高的同源性, 而与另一种共生菌 *P. luminencenc* W14 的毒素蛋白同源性则相对低一些(表 2), 其相似性加权平均值分别为 94% 和 58%。本研究的 7 个基因片段已在国际基因库 EMBL/GenBank 中注册, 登陆号(Accession No.) 为 AF513479—AF513485。

3 讨论

共生菌有口服毒性的毒素基因由多个 ORF 组成, 各 ORF 的表达产物对毒力的影响不同。Waterfield 等^[6]发现, *P. luminescens* w14 毒素基因的多个 ORF 中 *tcaA*, *talB*, *tccC* 3 个 ORF 的表达产物对该毒素的口服毒性影响最大。虽然 *tccC* 单独表达也具有一定的口服毒性, 但毒性大为降低。Morgan 等^[7]也发现, *X. nematophilus* PMF1296 的 *xptA1*, *xptB1*, *xptC1* 对于昆虫的口服毒性是必须的。本文中引物 III、IV、V、VI 和 VII 是针对 *X. nematophilus* PMF1296 的 *xptA1*, *xptB1*, *xptC* 基因设计的。PCR 扩增和扩增产物的序列分析结果显示, 如果 *X. nematophilus* BP 口服毒素的 ORF 结构与 *X. nematophilus* PMF1296 相同, 则 cos83 应具有 3 个表达口服毒性所必须的基因 *xptA1*, *xptB1*, *xptC*, 而 cos76 则缺少引物 II、VI 对应的 ORF *xptA2*。cos76 的杀虫活性降低可能与 *xptA2* 的缺失有关。其它因素也不能排除, 这些推测需进一步的试验证实。

从文库中筛选阳性克隆是一项非常繁重的工作。由于共生菌口服毒素是由多个亚基组成的复合毒素, 用一般抗体或探针进行 Western^[3] 或 Southern^[8] 杂交的方法从文库中筛选阳性克隆效率极低。我们采用分组生物测定的方法筛选阳性克

表 2 cos83 7 个扩增产物所编码的氨基酸序列与其它杀虫毒素蛋白的同源性¹⁾

Primer, Size of amplified products	Size of deduced amino acid	Homologous protein	Genebank accession No.	Start of companision	Identity of deduced amino acid /%
PI , 455	144	XptD1	AJ308438	996	99 ²⁾
		TccB	AF047028	1225	44
PII , 444	147	XptA2	AJ308438	1099	94
		TcbA	AF047457	1085	46
PIII, 238	79	XptA1	AJ308438	958	98
		TcbA	AF047457	955	75
PIV, 239	79	XptA1	AJ308438	1835	98
		TcbA	AF047457	1810	82
PV , 316	103	XptB1	AJ308438	546	93
		TccC	AF047028	548	71
PVI, 181	59	XptA2	AJ308438	1024	91
		TcbA	AF047457	1010	74
P VII, 406	134	xptC1	AJ308438	151	91
		TcaC	AF046867	157	48

1) Tca, Tcb, Tcc 为 *P. luminencenc* W14 分泌的杀虫毒素蛋白; XptA, XptB, XptC, XptD 为 *X. nematophilus* PMF1296 分泌的杀虫毒素蛋白

隆,大大减少了工作量。在本试验中 20 个一组的生测共有 5 组对棉铃虫有明显的抑杀作用,但最后只在 2 个组(组 4,组 5)中找到单个阳性克隆。这可能是因为其他 3 个组中,有多个克隆携带表达口服毒性必须的多个 ORF 中的某一个杀虫毒素 ORF。单个 ORF 的表达产物没有杀虫效果,但是当多个克隆的杀虫毒素的 ORF 的表达产物混在一起的时候,则显示出杀虫效果。这说明分组生测不仅减少了工作量,还提高了发现毒素基因的概率,特别是当与杀虫毒素有关的多个 ORF 在基因组中相隔较远时,这种优势更为明显。

在生物测定筛选高毒力共生菌菌株时发现 *X. nematophilus* BP 培养物上清液的杀虫活性要大于溶菌酶处理的菌体沉淀,证实共生菌的杀虫毒素是一种分泌蛋白。但 cos76 或 cos83 培养物的上清液却几乎没有杀虫活性。这说明 *X. nematophilus* BP 的杀虫毒素在 *E. coli* 中表达后,并不分泌到胞外。高分子量的蛋白分泌到胞外一般都需要分子伴侣(molecular chaperones)的参与透过细胞膜¹⁾。可能由于 *E. coli* 中缺少共生菌杀虫毒素分泌到胞外所必须的分子伴侣,这种杀虫毒素最后被滞留在 *E. coli* 细胞中。

参考文献:

[1] THOMAS G M, POINAR G O. *Xenorhabdus* gen nov, a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae [J]. Int J System. Bacteriol, 1979, 29: 352—360.

[2] BOWEN D, ROCHELEAU T A, BLACKBURN M, et al. Novel insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*[J]. Science, 1998, 280: 2129—2132.

[3] BOWEN D J, ENSIGN J C. Purification and characterization of a high molecular weight inseticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 3029—3035.

[4] NICHOLAS R, WATERFIELD N, BOWEN D J, et al. The tc genes of *Photorhabdus*: a growing family[J]. Trends Microbiol, 2001, 9: 185—191.

[5] AKHURST R J. Morphological and functional Dimorphism in *Xenorhabdus* spp., Bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neospectana* and heterorhabditis[J]. J Gener Microbiol, 1980, 121: 303—309.

[6] WATERFIELD N, DOWLING A, SHARMA S, et al. Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* W14 toxin complexes in *Escherichia coli* [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 5017—5024.

[7] MORGAN J A, SERGEANT M, ELLIS D, et al. Sequence analysis of insecticidal genes from *Xenorhabdus nematophilus* PMF1296[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 2062—2069.

[8] EAST, PETER, DAVID. 1998 International Patent: WO99/03328

[9] HARIL F U, Molecular chaperones in cellular protein folding [J]. Nature, 1996, 381: 571—580.

(下转第 63 页)

Effects of Foods on Growth of Young Sea Horses (*Hippocampus*)

WEI Xiang-dong, YE Chang-ming, CHEN Dong-hong

(School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Abstract: Under intensive conditions, young sea horses are inclined to some foods, and different foods have great effects on their growth and survival. Young sea horses at different growth phases swallow different foods. Along with their growth, volumes of food organisms of sea horses become bigger and bigger. According to the detection frequency and victual rate in stomachs young sea horse, the most favorite foods of natal sea horses are rotifer and single cellular algae, then are cladocera, copoda. When young sea horses are feed with the later, they grow much faster. The relation between growth rate and the victual rate of the two kinds of foods can be expressed as:

$y = 8.9343\ln x - 18.6628 \quad r = 0.9021, \quad r_{0.05} = 0.8780, \quad r > r_{0.05}$

Key words: sea horse (*Hippocampus*); food; picking frequency; victual rate

(上接第 50 页)

Cloning and Characterization of Insecticidal Toxin Genes
from *Xenorhabdus nematophilus* BP

CUI Long¹, QIU Li-hong¹, FANG Yuan-yuan¹, PANG Yi¹, LI Guo-xun²

(1.State Key Laboratory for Biocontrol //School of Life Sceinces,

Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. College of Plant Protection, Agriculture University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: A cosmid library of *Xenorhabdus nematophilus* BP, the symbiotic bacteria of entomopathogenic nematode (EN) *Steinernema carpocapsae*, was constructed and two clones of the resulting library, cos76 and cos83 were found possess strong and moderate oral toxicity against neonate of cotton ball worm *Helicoverpa amigera*, respectively. To identify the toxin genes presented in these two clones, seven pairs of primers were designed based on the published sequences and used for PCR amplification with both clones. All seven pairs of primers yielded products from cos83 while only five did from cos76. All PCR products were sequenced. The results showed that each sequence of the five PCR products obtained from cos76 was identical with that from cos83, indicating that the toxin genes in cos76 were part of those in cos83. The BLAST results showed that the amino acid sequences deduced from seven PCR products from cos83 had mean homology of 95% and 65% with those from insecticidal toxin genes of *X. nematophilus* PMF1296 and *P. luminescens* W14, respectively. The results indicate that toxin produced by cos83 is a member of the oral toxin family of EN symbiotic bacteria but it differ substantially from other members of the family therefore worthy of further investigation.

Key words: *Xenorhabdus nematophilus* BP; cosmid genomic library; screening; insecticidal positive clones