

Xenorhabdus nematophila BP 杀虫毒素基因的序列分析及其杀虫活性*

李梅^{1,2)**} 邱礼鸿^{1)**} 吴国锋²⁾ 刘常坤²⁾ 沈志华²⁾ 庞义¹⁾

(¹⁾中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275; ²⁾电子科技大学中山学院化学与生物系, 中山 528402)

摘要 XnBP83 是从 *Xenorhabdus nematophila* BP 基因组粘粒文库中筛选出的一个对棉铃虫有较强口服杀虫活性的克隆。采用亚克隆结合 primer-walking DNA 测序技术对粘粒 XnBP83 的插入片段进行序列测定。该插入片段全长 38 939 bp, 其中包括 5 个与杀虫活性相关的 *tc* 类基因 *xptA1*、*xptB1*、*xptC1*、*xptA2*、*xptD1*。序列分析显示: a. 插入片段中的 *xptD1* 不完整, 与 *X. nematophila* PMF1296 *XptD1* 相应氨基酸序列有 99% 的相似性。b. BP *xptA1* 读码框全长 7 569 bp, 编码 2 520 个氨基酸, 与 PMF1296 的 *XptA1* 氨基酸序列有 98% 的相似性, 两者在第 2 200~2 223 氨基酸区域连续有 23 个氨基酸不同。c. BP *xptB1* 读码框全长 3 051 bp, 编码 1 016 个氨基酸, 与 PMF1296 *XptB1* 氨基酸序列有 98% 的相似性, 在第 620~650 氨基酸之间有 28 个氨基酸差异。d. BP *xptC1* 读码框全长 4 225 bp, 编码 1 408 个氨基酸, 与 PMF1296 的 *XptC1* 氨基酸序列有 96% 的相似性。在 BP 的第 232 氨基酸后插入了一个 TAQRYLAK 的氨基酸序列, 在第 627~646 氨基酸区域内, 有 18 个氨基酸不同。e. BP *xptA2* 读码框全长 7 574 bp, 编码 2 524 个氨基酸, 与 PMF1296 的 *XptA2* 氨基酸序列有 90% 的相似性, 在 BP 品系 *XptA2* 的第 788~855 氨基酸和第 1 630~1 784 氨基酸有两个明显变异区。将 XnBP83 培养物上清和沉淀饲喂棉铃虫、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾和粉纹夜蛾, 结果表明 XnBP83 对所测昆虫有广谱杀虫活性。

关键词 序列分析, *Xenorhabdus*, 粘粒 DNA, 杀虫毒素基因, 杀虫活性

学科分类号 Q81, Q93, S43

转基因抗虫植物是近年来生物技术发展所带来的一项有效的害虫防治新技术。目前, 成功地转入作物的几乎均是苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 芽孢期产生的杀虫晶体蛋白基因, 尽管苏云金芽孢杆菌及其产生的毒素对多种昆虫及其他有害生物有较强的毒性, 但苏云金杆菌长期的大规模应用, 以及在转基因植物中表达这些毒素导致了昆虫抗性的产生^[1], 因而寻找和克隆新的杀虫毒素基因以开发新型抗虫植物, 有助于延缓害虫对转 Bt 基因抗虫作物的抗性压力, 扩大转基因抗虫作物的抗虫谱^[2]。

昆虫病原线虫共生菌是存在于昆虫病原线虫 (entomopathogenic nematodes, EN) 肠道内的一类细菌, 革兰氏染色阴性, 属肠道杆菌科 (Enterobacteriaceae)。现已描述的共生菌有两个属:

致病杆菌属 (*Xenorhabdus*) 和发光杆菌属 (*Photorhabdus*), 其中, *Xenorhabdus* 与斯氏属线虫 (*Steinernema*) 共生, *Photorhabdus* 与异小杆属线虫 (*Heterorhabditis*) 共生^[3]。由于线虫-共生菌复合体具有杀虫能力强、杀虫谱广的优点, 已成为引人注目的新型生物杀虫剂, 在线虫-共生菌复合体中起关键作用的主要是共生菌。这类细菌随其共生线虫进入昆虫体内后, 分泌杀虫毒素, 在短时间内使昆虫致死。对这类杀虫毒素的深入研究有助于将其基

* 国家自然科学基金(30470256)资助项目, 电子科技大学中山学院博士科研启动基金资助项目(2007KQ03)。

** 通讯联系人。Tel: 0760-5682058, 020-84113009

李梅。E-mail: lm2570@163.com

邱礼鸿。E-mail: qinlh@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2008-02-27, 接受日期: 2008-05-12

因转入植物, 或者构建高效表达系统生产杀虫毒素直接应用于害虫防治. 目前已报道的昆虫病原线虫共生菌毒素基因主要有在基因组中成簇分布的 *tc* 类基因^[4,5]和散在分布的毒素单基因^[6,7].

Morgan 等^[4]从 *X. nematophilus* PMFI296 中克隆到的毒素基因簇有多个开放读码框, 集中在一个约 40 kb 的区域内. Sergeant 等^[5]研究发现, 不同基因的组合对不同的昆虫发挥毒杀作用. 在国内, 崔龙等构建了昆虫病原线虫共生菌 *X. nematophilus* BP 品系的粘粒文库, 并用生物测定的方法从中筛选到 1 个对棉铃虫初孵幼虫有较强口服杀虫作用的克隆 XnBP83, 初步研究结果显示, 该粘粒有 5 个与杀虫活性有关的基因^[8,9]. 但这些基因的序列、与已报道基因的差异及对其他昆虫的杀虫活性尚不清楚. 本文提取了粘粒 XnBP83 质粒 DNA 构建亚克隆, 用 walking primer 法测序, PCR 测序法补充和验证, 完成了粘粒 DNA 插入序列 38 939 bp 的序列测定与分析, 并对该克隆的杀虫活性进行了测定.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株、粘粒文库. 粘粒载体 pWEBTM 购自 Epicentre 公司; 质粒载体 pBluescript M13、克隆载体 pMD18-T 购自 Takara 公司; 大肠杆菌 EPI100 由 pWEBTM cosmid cloning Kit (Epicentre) 提供; *E. coli* TG1 为本实验室保存. *X. nematophilus* BP 基因组粘粒文库: 由本实验室构建^[8,9]. XnBP83 是从该文库中筛选出的一个对棉铃虫有较强口服杀虫活性的克隆.

1.1.2 酶和抗生素. Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、氨苄青霉素、购自 Takara 公司; 碱性磷酸化酶购自 Promega 公司.

1.1.3 昆虫. 鳞翅目棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)、甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)、斜纹夜蛾(*S. litura*)和粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)初孵幼虫为实验室人工饲养的健康昆虫.

1.1.4 其他试剂. Gel Extraction Kit 及质粒少量提取试剂盒为 Omega Bio-Tek 产品.

1.2 方法

1.2.1 XnBP83 粘粒 DNA 亚克隆的构建. 挑

XnBP83 单菌落接种于 Amp^r 的 LB 培养基, 37℃ 培养至 $A_{600}=1.5$ 左右, 碱法提取质粒 DNA 约 500 ng, 用 10 U 的 *EcoR* I 进行酶切, 同时用 *EcoR* I 对 pBluescript M13 载体进行酶切. 1%琼脂糖电泳, 割胶回收 XnBP83 粘粒 2 kb 以上的酶切片段及载体的酶切片段. pBluescript M13 酶切片段消化完全后, 用酚: 氯仿抽提, 乙醇沉淀 DNA 后回收, 再用 CIP 去磷酸化. XnBP83 粘粒的 *EcoR* I 酶切片段与末端去磷酸化的 pBluescript M13 *EcoR* I 酶切片段 1:2 混合, 45℃ 温育 5 min, 加入适量的反应缓冲液和 T4 连接酶, 16℃ 连接过夜, 次日转化大肠杆菌 TG1 构建亚克隆. 挑取阳性克隆提取质粒进行酶切鉴定.

1.2.2 XnBP83 粘粒 DNA 的序列测定. 将鉴定正确的亚克隆送上海 Invitrogen 公司用 primer-walking 方法进行测序, 每个碱基重复 3 次. 根据 5' 至 3'、3' 至 5' 方向信息, 各个 contig 拼接为一个连续片段. 据粘粒亚克隆已测序列、粘粒载体序列、*X. nematophila* PMFI296 (GenBank accession No. AJ308438) 等设计引物(表 1). 以 XnBP83 粘粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 验证和补充亚克隆所测序列.

1.2.3 粘粒 XnBP83 序列分析. 应用计算机软件 DNASIS、DNASTAR、NTI9.0、GenDoc、Clustal X 和 Clustal W 对所测 DNA 序列进行读码框(open reading frame, ORF)分析, 片段或全长 DNA 酶切, 同源序列比较等. 各 ORF 推衍氨基酸序列使用 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 进行在线分析, 寻找同源蛋白.

1.2.4 粘粒克隆 XnBP83 的口服杀虫活性. 挑 XnBP83 单菌落接入 LB 液体培养基中, 28℃ 振荡培养至 A_{600} 约 1.5, 取 1 ml 培养液离心, 上清液用干冷风浓缩到 200 μ l 后加入 1.5 g 半固体的人工饲料中, 细胞沉淀则用 PBS 溶液洗 2 次, 经超声波破壁后混入 1.5 g 半固体的人工饲料中. 平均分成 30 份到多孔板, 分别将试虫棉铃虫(*H. armigera*)、甜菜夜蛾(*S. exigua*)、斜纹夜蛾(*S. litura*)、粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)接入, 加盖, 在 28℃ 下培养. 记录 96 h 死亡率用转入 pWEBTM 的 *E. coli* EPI100 作对照.

Table 1 PCR primers used for amplification

Primers	Primer sequences	Predicted length/bp	Amplified length /bp
M13-F1xptD1-F	5' CTGCAGCGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC 3'	1 851	877
F1xptD1-R	5' GGTACCCAGTAACATATTGACGGAGT 3'		
F2xptD1-F	5' GGTACCAGCCCTGATATTCTGCTCG 3'	2 054	1 989
xptD1-R	5' AAGCTTTCAGTTAGAATTGTCTGTTTT 3'		
Chi htr- F	5' GGATCCAACAAGACAATTCTAACTG 3'	3 474	3 530
Chi htr- R	5' AAGCTTGAAATTAACAAACCG 3'		
Ist- F	5' CTGCAGCAGAATTTATTTACTATAT 3'	3 001	1 840
Ist- R	5' CTCGAGACAGTTCATTAACCTTTATC 3'		
F1 xptA1-F	5' GGTACCATGATAAAAGTTAATGAACTGTTAG 3'	3 573	3 651
F1 xptA1-R	5' GAGCTCCAGCTGCCATCATAACGAATAT 3'		
F2 xptA1-F	5' CTGATTATATATTAACACTGTCACAT 3'	1 791	1 873
F2a xptA1-R	5' CCATGGGTTTCAGTGTTATTTTC 3'		
F2b xptA1-F	5' TAACACTGAACCCATGGATTTC AAC 3'	2 441	2 826
F2 xptA1R	5' CTCGAGCGCTAGCCGGGTACCTG 3'		
xptB1-F	5' GGATCCATGAAGAATTCGTTACAG 3'	3 045	3 051
XptB1-R	5' CTGCAG TTATGCTTCGGATTCAATATGA 3'		
P1 C1B1	5' GGATCCAAAGTCATGGCGCGCTGAAAC 3'	417	422
P2 C1B1	5' AAGCTTGTCTGACCACGGTTGTCCAGTA 3'		
P1 xptC1(ab)	5' GGATCCACACCCTTTATCCATTATC 3'	674	674
P2 xptC1(ab)	5' AAGCTTGTTCATATTGTTATTGAC 3'		
retro-F	5' GAATTCGTAATCGATATTGTGTCAT 3'	3 128	3 006
retro-R	5' AAGCTTACGATCCATTTGAAAAAAGT 3'		
phage-F	5' AAGCTTCTTTTCGATAACCTGTCTG 3'	469	5 352
phage-R	5' CTCGAGATTTCGCGCCGCATAATAC 3'		

2 结 果

2.1 粘粒 DNA 的酶切分析及亚克隆的构建

XnBP83 粘粒 DNA 经 *EcoR* I 酶切(图 1a)后, 回收 2 kb 以上片段, 连接到 pBluescript M13 上, 构建亚克隆进行序列测定. 各亚克隆分别命名为 pSub17 k、pSub8 k、pSub5 k、pSub2.7 k、pSub2.3 k、

pSub2 k. 将这些重组质粒转化大肠杆菌 TG1, 在 pSub2.7 kb 中挑到两个大小接近的克隆, 共得到 7 个亚克隆. 回收 17 kb 片段经 *Kpn* I 酶切后, 再次亚克隆. 重组质粒的酶切鉴定如图 1b. 经酶切结果显示, 各亚克隆均得到了与预期大小相似的 DNA 片段及载体片段.

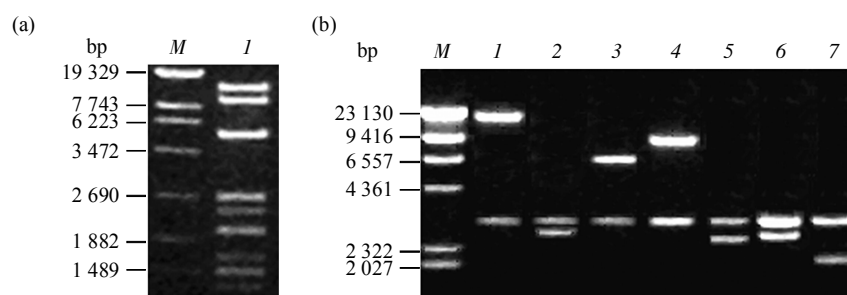


Fig. 1 Restriction analysis of cosmid DNA and recombinant vector

(a) Restriction analysis of cosmid DNA. M: λ -*EcoT*14 I digest; I: XnBP83. (b) Restriction analysis of the recombinant vector in subclones. M: λ -*Hind* III digest; I: pSub17k; 2: pSub2.7k1; 3: pSub5k; 4: pSub8k; 5: pSub2.3k; 6: pSub2.7k2; 7: pSub2k.

2.2 粘粒 DNA 各片段的 PCR 扩增和克隆

经 PCR 鉴定, 各 PCR 产物大小与在亚克隆中所测相应序列大小一致. 但与 *X. nematophilus* PMFI296 相比, 在 *phage* 下游序列比 PMFI296 相应序列大 4 kb 左右, 在 *htran* 与 *xptA1* 之间序列比相应序列小约 1 kb. 其余片段大小与之相似. 将 PCR 产物克隆到 pMD18-T, 得到的重组质粒载体命名为 pTN, N 为片段名称, 重组质粒的酶切鉴定, 所得片段与预期大小一致.

2.3 XnBP83 粘粒 DNA 序列测定及分析

经酶切鉴定正确的亚克隆及 PCR 片段的克隆送上海 Invitrogen 公司测序, 测定结果经拼接, 粘粒 DNA 插入片段全长 38 939 bp(除去粘粒载体序列). 含有 *xptA1*、*xptB1*、*xptC1*、*xptA2* 完整编码序列和 *xptD1* 的部分编码序列. XnBP83 插入片段与 *X. nematophilus* PMFI296 基因序列比对及网上 BLAST 结果显示, 两者有如下差异(图 2): a. XnBP83 中 *xptD1* 不完整, 仅为 2 731 bp, 比 XnPMFI296 相应序列 3 840 bp 少了 1 109 bp; b.

在 XnBP83 *htran* 基因(putative transposase)下游, *xptA1* 上游没有 1 043 bp 的 *ist* 基因(insertion sequence transposae); c. 在 *X. nematophilus* BP 的 *xptA2* 基因内存在两个重要的变异区域; d. 在 XnBP83 的 362 bp 的 *retro* 基因(putative retransposase)下游有 126 bp 的序列与 *P. luminescens* TT01 的 *plu0404* 基因(480 bp, 功能未知)中的 126 bp 序列有 81%相似性, 将该段 DNA 所在 ORF(1 216 bp)命名为 *splu* (similarity to *plu0404*); e. *X. nematophilus* PMFI296 的 *phage* 基因可能不完整, 仅为 471 bp, 而 BP 的相应序列后的 500 bp (PMF 没测到该序列)与 *phage putative primase* 基因仍有 81%以上的相似性; f. 在 XnBP83 *phage* 基因的下游有一个 ORF 内有两个长度分别为 35 bp 和 22 bp 的片段与鼠(mouse)第 8 和第 4 染色体上的两序列有 91%和 100%的相似性, 但功能未知. 在所有 ORF 中, 与杀虫活性密切相关的基因只有 *xptD1*、*xptA1*、*xptB1*、*xptC1*、*xptA2*, 这 5 个基因与 *X. nematophilus* PMFI296 相应基因比较见表 2.

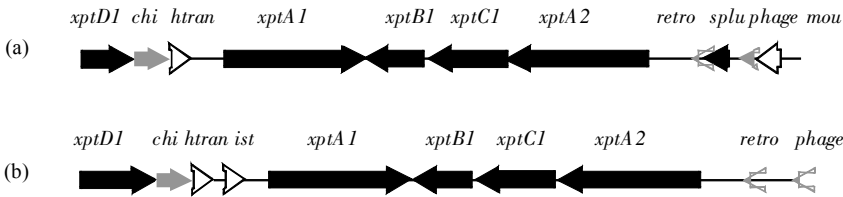


Fig. 2 Genomic organization of the XnBP83 loci compared to XnPMFI296 loci (a) XnBP83; (b) XnPMFI296 (GenBank accession No. AJ308438).

Table 2 Insecticidal genes from XnBP83 compared to insecticidal genes from XnPMFI296

Insecticidal gene of BP	Length of nucleotides/bp	Length of amino acids	Amino acid identity to PMFI296/%	Different amino acid sites to PMFI296
<i>xptD1</i>	2 731	892	99	Incomplete
<i>xptA1</i>	7 569	2 520	98	2 200~2 223
<i>xptB1</i>	3 051	1 016	98	620~650
<i>xptC1</i>	4 225	1 408	96	8 amino acids downstream to 232nd; 627~646
<i>xptA2</i>	7 574	2 524	90	788~855; 1 630~1 784

XnBP83 粘粒中的 *xptD1* 不完整; BP XptA1 在第 2 200~2 223 氨基酸区域连续有 23 个氨基酸与 PMF 1296 的 XptA1 不同; BP XptB1 第 620~650 氨基酸之间有 28 个氨基酸变异; 在 BP XptC1 的第 232 氨基酸后插入了一个 TAQRYLAK 的氨基酸序列, 在第 627~646 氨基酸区域内与 PMFI296 的 XptC1 有 18 个氨基酸差异. 在 BP 品系 XptA2 的第 788~855 氨基酸和第 1 630~1 784 氨基酸有两个明显变异区. 粘粒 XnBP83 中这 5 个与杀虫活性相关的基因均与 *P. luminescens* 的某些 Tc 毒素基因

有 40%以上的相似性. 且与 *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* 等细菌的杀虫毒素有不同程度的相似性.

2.4 粘粒克隆 XnBP83 的口服杀虫活性

粘粒克隆 XnBP83 对鳞翅目棉铃虫(*H. armegera*)、甜菜夜蛾(*S. exigua*)、斜纹夜蛾(*S. litura*)和粉纹夜蛾(*T. ni*)初孵幼虫的口服生物测定结果显示(表 3), XnBP83 是对所测鳞翅目昆虫有广谱杀虫活性的克隆.

Table 3 Oral toxicity of XnBP83 or EPI100 (pWEB™) supernatant and sediment against *Lepidopteran* insect neonate

	Average mortality of supernatant /%				Average mortality of cell sediment /%			
	<i>T. ni</i>	<i>H. armigera</i>	<i>S. litura</i>	<i>S. exigua</i>	<i>T. ni</i>	<i>H. armigera</i>	<i>S. litura</i>	<i>S. exigua</i>
XnBP83	17.50±0.79 ¹⁾	48.33±1.54	20.03±1.85	42.50±2.04	30.00±1.07	35.83±1.36	34.67±1.29	42.50±2.04
EPI100	8.57±0.42 ¹⁾	2.50±0.11	7.50±0.25	5.01±0.26	0.04±0.01	2.50±0.07	2.14±0.02	9.160±0.54
<i>P</i>	< 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

¹⁾Standard error of the mean. Values are an average from three independent experiments; each experiment was performed on 30 larvae.

3 讨 论

一个杀虫毒素基因是否可用来开发转基因抗虫作物, 关键在于该基因的表达产物是否有口服毒性. Waterfield 等^[10]研究发现, *P. luminescens* W14 三个基因 *tcaA*, *tcdB* 和 *tccC* 联合表达对 *M. sexta* 有口服毒性. Morgan 等^[4]也发现, *X. nematophilus* PMFI296 的 *xptA1*, *xptB1* 和 *xptC1* 对于表达具有口服毒性的杀虫毒素也是必需的. 虽然 *xptA1* 的单独表达产物也具有一定的口服毒性, 但毒性却大为降低. XnBP83 是从 *X. nematophilus* BP 的基因组粘粒文库中筛选到的一个对棉铃虫有较强口服活性的克隆. 本文生物测定结果显示, XnBP83 对所测鳞翅目昆虫有广谱杀虫活性. 崔龙等^[9]根据 *X. nematophila* PMFI296 的 *xptA1*, *xptB1*、*xptC1*、*xptD1* 和 *xptA2* 基因设计了 5 对引物, 分别扩增这 5 个基因内的 237~450 bp 的片段. 据扩增的片段分析, 初步认为 XnBP83 具有 3 个表达口服毒性所必需的基因 *xptA1*, *xptB1* 和 *xptA2*. XnBP76 缺少 *xptA2* 引物扩增的片段, 推测 *xptA2* 的缺失或部分缺失可能与 XnBP76 的杀虫活性降低有关. 虽然初步确定 XnBP83 具有 3 个表达口服毒性所必需的基因 *xptA1*, *xptB1* 和 *xptA2*, 但 PCR 扩增的产物只是各基因中不到 500 bp 的片段, 各基因内部是否有部分缺失, 或是变异, 还必须测定粘粒克隆 XnBP83 的 DNA 全序列, 而且要进一步研究各毒素基因之间的相互关系及各自的生物学功能, 也必须测定粘粒 DNA 全序列, 为此我们进行了粘粒 XnBP83 全序列测定.

粘粒克隆 XnBP83 的杀虫毒素基因较集中, 集中在一个长度为 38 939 bp 的序列中, 含有 *xptA1*、*xptB1*、*xptC1*、*xptA2* 的完整编码序列和 *xptD1* 的部分编码序列. 这些基因推衍的氨基酸序列与

X. nematophila PMFI296 相应基因产物的相似性均达 90% 以上. 但我们发现同一种共生菌的不同品系同一基因产物, 基本均有一段变异区, 这些变异区域的存在可能就是导致它们对昆虫的杀虫活性不同的一个重要原因.

Sergeant 等研究发现, *X. nematophila* PMFI296 的基因组片段中 *xptA1*、*xptB1*、*xptA2* 和 *xptC1* 四个基因对三种重要昆虫: 大菜粉蝶 (*Pieris brassicae*), 小菜粉蝶 (*P. rapae*), 烟草夜蛾 (*H. virescens*) 的杀虫活性是必需的. 不同基因的组合与其发挥杀虫活性的昆虫种类不同. *xptA1*, *xptB1* 和 *xptC1* 的共表达对大菜粉蝶 (*P. brassicae*) 和小菜粉蝶 (*P. rapae*) 发挥杀虫活性. 而 *xptB1*, *xptA2* 和 *xptC1* 三个基因联合表达是对烟草夜蛾 (*H. virescens*) 具有杀虫活性所必需的. 各个基因单独表达, 则只能检测到较低水平的杀虫活性. 如将 *xptB1* 和 *xptC1* 在 *E. coli* 中联合表达的细胞裂解物与 *xptA1* 的表达产物混合, 则恢复了对大菜粉蝶 (*P. brassicae*) 和小菜粉蝶 (*P. rapae*) 的杀虫活性. 同样 *xptB1* 和 *xptC1* 联合表达的细胞裂解物与 *xptA2* 表达产物混合则恢复了对烟草夜蛾 (*H. virescens*) 的杀虫活性. 在 *X. nematophilus* PMFI296 的四个基因中, 单个基因受破坏会使杀虫活性降低. 因 *xptB1*、*xptC1* 和 *xptA2* 是作为一个操纵子 (operon) 表达的, *xptC1* 或 *xptA2* 的失活, 会导致下游基因的沉默. 而 *xptA1* 是作为一个单基因而表达的. 两个三基因的产物结合, 相互作用产生了较强的杀虫活性^[5].

崔龙等^[11]构建了 *xptC1* 的表达载体 pQE-C1, 在大肠杆菌 M15 表达出约 150 ku 的融合蛋白. 将诱导表达的细胞沉淀经超声波破碎后混入人工饲料饲喂棉铃虫初孵幼虫, 结果表明对棉铃虫无明显口服毒力. 对 *X. nematophilus* 单基因表达产物的杀虫

活性也有不同的报道. Lee 等^[12]构建了 *xptB1* 的表达载体, 在 *E. coli* 中的表达产物对大蜡螟有较强的杀虫活性. 崔龙等^[8]从 *X. nematophilus* BP 构建的粘粒文库筛选到的粘粒克隆除了 XnBP83 对棉铃虫有较强口服活性外, 还有具有不同杀虫活性的 XnBP76、XnBP203、XnBP378、XnBP414 等四个克隆. 根据 *X. nematophilus* PMFI296 *xptD1*、*xptA1*、*xptB1*、*xptC1*、*xptA2* 序列分别设计引物进行 PCR 扩增, XnBP76 中未扩增到 *xptA2* 基因, 因此初步认为, XnBP76 由于缺失 *xptA2* 基因, 对棉铃虫的杀虫活力大幅度下降, 在高浓度的细胞存在下, 仅能抑制棉铃虫的生长, XnBP203 中未扩增到 *xptC1* 和 *xptA2*, 则杀虫活力完全丧失, 而 XnBP378 和 XnBP414 缺失了 *xptD1* 和 *xptA1* 两个基因中的 1 个或全部缺失, 对其杀虫活力影响很小. 这些缺失了一个或两个基因的粘粒克隆对其他昆虫的杀虫效果尚不清楚, 各个基因之间的相互关系等均有待进一步研究.

Waterfield 等^[10]研究发现, *P. luminescens* W14 有 4 种毒素复合体基座(toxin-complex loci), 即 *tca*、*tcb*、*tcc* 和 *tcd*. *tca* 的产物对烟草天蛾(*Manduca sexta*)有较强的口服活性^[13]. Duchaud 等^[14]测定了 *P. luminescens* TT01 的全基因组序列, 含有 *tcc*、*tcd* 基座, 以及不完整的 *tca* 基座和 5 个其他的 *tc* 基因. 本文 BLAST 结果显示, 粘粒 XnBP83 的 5 个重要的杀虫毒素均与 *P. luminescens* 的 Tc 毒素有 40% 以上的相似性, 说明它们是一类 Tc-like 毒素. 且在 *Serratia entomophila*、*Yersinia frederiksenii*、*Pseudomonas syringae*、*Burkholderia pseudomallei* 等与昆虫有关的细菌中, 均有与 *X. nematophilus* BP 毒素有一定相似性的杀虫毒素, 这可能是由于毒素基因在相同小生境——昆虫内的细菌之间迁移的结果.

参 考 文 献

- McGaughey W H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, 1985, **229**(4709): 193~195
- McGaughey W H, Gould F, Gelernter W. Bt resistance management. Nat Biotechnol, 1998, **16**(2): 144~146
- Poinar G O. Nematodes for Biological Control of Insects. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. 23~62
- Morgan J A, Sergeant M, Ellis D, et al. Sequence analysis of insecticidal genes from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. Appl Environ Microbiol, 2001, **67**(5): 2062~2069
- Sergeant M, Jarrett P, Ousley M, et al. Interactions of insecticidal toxin gene products from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. Appl Environ Microbiol, 2003, **69**(6): 3344~3349
- Li M, Qiu L H, Pang Y, et al. Cloning and expression analysis of a predicted toxin gene from *Photorhabdus* sp. HB78. Annals of Microbiol, 2007, **57** (3): 313~319
- 李梅. 昆虫病原线虫共生菌杀虫毒素基因的克隆与功能研究: [学位论文]. 广州: 中山大学, 2006
- Li M. Cloning and functional analysis of insecticidal toxin genes from symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes: [Thesis]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2006
- 崔龙, 邱礼鸿, 房缓缓, 等. *Xenorhabdus nematophilus* BP 品系杀虫毒素基因的克隆与鉴别. 中山大学学报(自然科学版), 2003, **42** (3): 47~50
- Cui L, Qiu L H, Fang Y Y, et al. Acta Universitatis Sunyatseni (Scientiarum Naturalium), 2003, **42**(3): 47~50
- 崔龙, 邱礼鸿, 辛智海, 等. 昆虫病原共生菌 BP 品系杀虫毒素基因簇中各基因与杀虫活性的关系. 微生物学报, 2003, **43**(6): 747~752
- Cui L, Qiu L H, Xin Z H, et al. Acta Microbiol Sin, 2003, **43**(6): 747~752
- Waterfield N, Dowling A, Sharma S, et al. Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* W14 toxin complexes in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 2001, **67**(11): 5017~5024
- 崔龙. 昆虫病原线虫共生菌杀虫毒素基因的克隆、表达和功能分析: [学位论文]. 广州: 中山大学, 2003
- Cui L. Cloning, expressing and functional analyzing of insecticidal genes from the symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. Sun Yat-sen University: School of Life Sciences, 2003
- Lee P J, Ahn J Y, Kim Y H, et al. Cloning and heterologous expression of a novel insecticidal gene (*tccC1*) from *Xenorhabdus nematophilus* strain. Biochem Biophys Res Commun, 2004, **319**(4): 1110~1116
- Blackburn M, Golubeva E, et al. A novel insecticidal toxin from *Photorhabdus luminescens*: histopathological effects of Toxin complex A (Tca) on the midgut of *Manduca sexta*. Appl Environ Microbiol, 1998, **64**(8): 3036~3041
- Duchaud E, Rusniok C, Frangeul L, et al. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. Nat Biotechnol, 2003, **21**(11): 1307~1313

Sequence Analysis of Insecticidal Genes From *Xenorhabdus nematophila* BP and Insecticidal Activity*

LI Mei^{1,2)**}, QIU Li-Hong^{1)**}, WU Guo-Feng²⁾, LIU Chang-Kun²⁾, SHEN Zhi-Hua²⁾, PANG Yi¹⁾

¹⁾State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

²⁾University of Electronic Science and Technology of China Zhongshan Institute, Zhongshan 528402, China)

Abstract XnBP83 is a clone which had oral toxicity to *Helicoverpa. armigera* screened from the cosmid library of *Xenorhabdus. nematophilus* BP. Comsmid XnBP83 was sequenced using a strategy of subcloning and primer-walking DNA sequencing. The inserted sequences of XnBP83 have 38 939 bp including 5 ORFs that are associated to the insecticidal activity: *xptA1*, *xptB1*, *xptC1*, *xptA2* and *xptD1*. The results of sequence analysis showed that: 1) The *xptD1* of XnBP83 is incomplete, and shares 99% predicted amino acid sequence identity to that of *X. nematophilus* PMFI296. 2) The *xptA1* of XnBP83 has 7 569 bp nucleotides, encoding 2 520 amino acids which shares 98% identical amino acid residues with that of PMFI296. 3) The *xptB1* has 3 051 bp nucleotides, encoding 1 016 amino acids. The XptB1 sequence shares 98% identical amino acid residues with XptB1 of PMFI296. There are 28 different amino acids from 620 to 650 amino acids. 4) The *xptC1* of *X. nematophilus* BP has 4 225 bp, encoding 1 408 amino acids. The XptC1 sequence shares 96% identical amino acid residues with that of *X. nematophilus* PMFI296. There are 18 different amino acids from 627 to 646 amino acids. The amino acid sequence with TAQRYLAK was inserted to downstream to 232nd amino acid. And 5) The *xptA2* has a length of 7 574 bp, encoding 2 524 amino acids. The XptA2 sequence shares 90% identical amino acid residues with that of PMFI296. Two distinctly divergence amino acid regions present from 788 to 855 and from 1 630 to 1 784 amino acids. Oral bioassay of the supernatant and cell sediment of XnBP83 against *H. armigera*, *S. exigua*, *S. litura*, and *T. ni* showed that XnBP83 had broad-spectrum insecticidal activity.

Key words sequence analysis, *Xenorhabdus*, cosmid DNA, insecticidal gene insecticidal activity

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30470256) and Doctoral Scientific Research Start-up Foundation in University of Electronic Science and Technology of China Zhongshan Institute (2007KQ03).

**Corresponding author. Tel: 86-760-5682058, 86-20-84113009

LI Mei. E-mail: lm2570@163.com

QIU Li-Hong. E-mail: qinlh@mail.sysu.edu.cn

Received: February 27, 2008 Accepted: May 12, 2008