

昆虫病原线虫共生菌 BP 品系杀虫毒素 基因簇中各基因与杀虫活性的关系

崔 龙 邱礼鸿* 辛智海 房媛媛 庞 义

(中山大学 生物防治国家重点实验室/昆虫研究所 广州 510275)

摘 要 :昆虫病原线虫共生菌 *Xenorhabdus nematophilus* BP 的多个杀虫毒素基因集中在一起形成一个约 40kb 的基因簇。为研究这个基因簇中各基因与杀虫活性的关系 ,对该共生菌粘粒文库中 5 个粘粒克隆 XnBP76、XnBP83、XnBP203、XnBPp378 和 XnBP414 及 XnBP83 的 3 个亚克隆插入 DNA 片段的基因结构和它们对棉铃虫的杀虫活性进行了比较 ,结果显示 ,*xptB1* ,*xptC1* 和 *xptA2* 3 个基因或后两者的联合表达产物具有最强的杀虫效果 ,缺失其中的任何 1 个或 2 个会使杀虫活力大幅度地下降或完全消失 ,而 *xptD1* 和 *xptA1* 的缺失对毒素基因簇的表达产物的杀虫活力影响很小 ,杀虫毒素的物理混合没有明显的增效作用。

关键词 :*Xenorhabdus nematophilus* BP , 杀虫毒素基因簇 , 杀虫活性

中图分类号 :Q939.96 **文献标识码** :A **文章编号** :1001-6209(2003)06-0747-06

昆虫病原线虫共生细菌存在于昆虫病原线虫肠道内 ,属杆菌目、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)。现已描述的线虫共生菌有两个属——异杆菌属(*Xenorhabdus*)和发光杆菌属(*Photorhabdus*)^[1]。昆虫病原线虫共生细菌随昆虫病原线虫进入昆虫体内后 ,可在血腔内大量繁殖并分泌杀虫活性极高的蛋白毒素 ,在较短时间内将昆虫杀死。由于这类毒素具有杀虫谱广的优点^[2] ,其杀虫毒素基因有望成为另一类转基因植物基因源 ,以缓解害虫对转苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* , Bt)基因抗虫植物产生的抗性压力^[3]。

到目前为止 ,已有两种共生菌的全长毒素基因被克隆并测序。Bowen 等^[2]从 *P. luminescens* W14 克隆到 4 个毒素基因 :*tca* , *tcb* , *tcc* 和 *tcd*。虽然从该菌株分离到的杀虫毒素具有很强的杀虫活性 ,但其毒素基因在大肠杆菌中的表达产物却没有杀虫活性。Morgan 等^[4]从 *X. nematophilus* PMFI296 中克隆到对菜粉蝶(*Pieris brassicae*)有杀虫活性的毒素基因簇 ,该毒素基因簇由 5 个基因组成 ,分别称为 *xptA1* , *xptA2* , *xptB1* , *xptC1* 和 *xptD1*。这些基因与 *tca* , *tcb* , *tcc* 和 *tcd* 之间有较高的同源性。用基因突变和单基因表达的方法证实 :其中 *xptD1* 和 *xptA2* 的缺失对杀虫活性影响极小或无影响 ;*xptA1* 的表达产物杀虫活性很低。本研究认为杀虫活性可能与 *xptA1* , *xptB1* 和 *xptC1* 联合表达有关。

本文介绍从 *X. nematophilus* BP 品系的粘粒文库中筛选出多个含杀虫毒素基因的克隆 ,并对其中的一个粘粒克隆进行亚克隆 ,由于各个克隆和亚克隆所含基因的差异 ,将这

基金项目 国家自然科学基金(30170143) ;广东省自然科学基金团队项目(000594232172) ;归国留学人员科研启动基金资助。

* 通讯作者。Tel 86-20-84113009 ; E-mail lsl76@zsu.edu.cn

作者简介 崔 龙(1970 -)男 ,山东单县人 ,博士生 ,从事昆虫病原线虫共生菌的分子生物学的研究。E-mail lmcuiling@hotmail.com

收稿日期 2003-01-23 ,修回日期 :2003-06-30

些克隆和亚克隆对棉铃虫进行生物测定,比较各克隆和亚克隆杀虫活性之间的差异,来研究基因簇中各基因与杀虫活性之间的关系。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

本研究中所用菌株和质粒列于表 1。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Bacteria and plasmids used in this study

Bacteria and plasmids	Characteristic	Source
<i>X. nematophilus</i> BP	Could produce high oral toxins to kill <i>Helicoverpa armigera</i>	Isolated from <i>Steinernema carpocapsae</i> BP
<i>Escherichia coli</i> EPI100	[F-mcrAΔ <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)80d/ <i>acZΔ</i> M15 Δ <i>lacX</i> 74 <i>recA1 endA1 araD139Δ ara⁻leu</i>)7697 <i>gal</i> /U <i>galK1-rpsL mupG tonA</i>]	pWEB™ Cosmid Cloning Kit
<i>E. coli</i> DH5α	supE44 Δ <i>lac</i> U169 <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 rel A1</i>	This laboratory
pBlue SK(+)	Amp ^r	This laboratory

1.2 粘粒文库的构建

将-70℃保存的共生菌涂布于 NBTA 平板^[5]上,28℃培养 48h,挑取一个初生型单菌落接到 5mL LB 液体培养基中,28℃ 200r/min 震荡培养至 *OD*₆₀₀ 约 1.5,取 1.5mL 至 EP 管,12000r/min 离心 2min,去上清。参照文献[6]描述的方法提取细菌总 DNA。提取的总 DNA 用微量注射器抽吸剪切,使 DNA 片段大小在 35~45kb 之间。以此 DNA 构建粘粒文库。构建粘粒文库的方法参照 pWEB™ cosmid cloning Kit(Epicentre)说明书操作。文库的每个克隆分别做甘油菌保存于-70℃。

1.3 杀虫阳性克隆的筛选

采用菌落原位杂交的方法从粘粒文库中筛选阳性克隆。以 *X. nematophilus* BP 基因组 DNA 为模板,引物为 5'-GCTCAAGCCCTTTTGTCCAAG-3' 和 5'-GATTGAACATCAGTCC-ACTCC-3',PCR 扩增出位于 *xptB1* 上的一个 548bp 的 DNA 片段,用地高辛标记作为探针。菌落原位杂交的方法参照文献[7]。

1.4 阳性克隆杀虫毒素基因的鉴定

1.4.1 PCR 鉴定:根据 GenBank 中已发表的共生菌 *X. nematophilus* PMF1296 毒素基因序列(GenBank accession No. AJ308438)设计 7 对引物(表 2),其中,引物对 PxptD1、PxptB1 和 PxptC1 可扩增出全长的毒素基因 *xptD1*、*xptB1* 和 *xptC1*,引物对 PxptA1-I 和 PxptA1-II 可分别扩增出 *xptA1* 基因两侧的序列,引物对 PxptA2-I 和 PxptA2-II 可分别扩增出 *xptA2* 基因两侧的序列。

引物对 PxptD1、PxptB1 和 PxptC1 任何一个 PCR 扩增结果为阳性,则认为其对应的基因存在。引物对 PxptA1-I 和 PxptA1-II PCR 扩增全部为阳性时可证明 *xmtA1* 基因的存在。

在。引物对 PxptA2- I 和 PxptA2- II PCR 扩增全部为阳性时可证明 *xptA2* 基因的存在。

表 2 鉴定阳性克隆所用的引物

Table 2 The primers used for the identification of insecticidal toxin genes

	Primer	Targeted gene of <i>X. nematophilus</i> PMFI296	The predicted sizes of amplified products/bp
PxptD1	5'-TCGACGCACAGATTGGTAT-3' 5'-TCGGCGCTCAGTAAGAAAGT-3'	<i>xptD1</i>	3800
PxptA1- I	5'-GCATGCATGATAAAAGTTAATGAACTGT-3' 5'-GTGGGGTCGATATAGTTTTC-3'	<i>xptA1</i>	3100
PxptA1- II	5'- CTATCTGCTGATTGCTAACC-3' 5'-CTGCAGCTCTTATCTGTCTCAAGAACGAATG-3'	<i>xptA1</i>	2000
PxptB1	5'-GGATCCATGAAGAATTCGTCCACAG-3' 5'-CTGCAGTTATGCTTCGGATTTCATTATGAC-3'	<i>xptB1</i>	3100
PxptC1	5'-GGATCCATGCAGGGTTCAACACCTTG-3' 5'-CTGCAGACTTCATCGCCGTTTCAGGG-3'	<i>xptC1</i>	4200
PxptA2- I	5'-ATGTATAGCACGGCTGTATTAC-3' 5'-GGATAGCACCGGATAATTGTG-3'	<i>xptA2</i>	240
PxptA2- II	5'-GAAAGCTTTGGCAATGCCCG-3' 5'-GTTAAGAACGAATGTTATACCG-3'	<i>xptA2</i>	440

1.4.2 酶切鉴定：提取各阳性克隆的质粒 DNA ,用 *Eco*R I 消化 ,琼脂糖电泳 ,比较各克隆的酶切片段的差异。

1.5 粘粒克隆的亚克隆

粘粒克隆的质粒 DNA 经 *Eco*R I 消化后 ,回收大于 3kb 的酶切片段 ,与 *Eco*R I 酶切后并未端磷酸化的 pBlue SK(+)载体连接 ,转化 *E. coli* DH5 α 。

1.6 *LC*₅₀的测定

首先建立 *E. coli* *OD*₆₀₀和细胞数对数值的生长曲线。将原位杂交筛选到的阳性克隆接入 250mL 含 100 μ g/mL Ampanicillin 的 LB 培养基中 ,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜 ,测 *OD*₆₀₀ ,根据生长曲线求算细胞浓度。不同量的阳性克隆或亚克隆的培养液细胞沉淀超声波破碎后加入等量棉铃虫人工饲料中 ,饲喂棉铃虫初孵幼虫 ,计算 96h 死亡率。对照组为不含毒素基因粘粒克隆或转入空载 pBlue SK(+)质粒的 *E. coli* DH5 α 。利用昆虫毒力测定软件^[6]计算不同克隆的 *LC*₅₀ ,或称量 1 \times 10¹¹ cells/g 饲料的浓度下存活幼虫的平均体重。

2 结果和分析

2.1 不同阳性克隆基因鉴定和杀虫活性比较

用原位杂交的方法从 *X. nematophilus* BP 粘粒文库的 500 个克隆中筛选出 5 个信号为阳性的克隆 ,分别命名为 XnBP76、XnBP83、XnBP203、XnBP378、XnBP414。通过 PCR 鉴定 XnBP83 包含 *X. nematophilus* PMFI296 的全部杀虫毒素基因 ,其基因大小也与 *X. nematophilus* PMFI296 基本相同(图 1)。我们已经对 XnBP83 和 XnBP76 所含毒素基因进行鉴定 ,用 7 对引物 PCR 扩增出的 XnBP83 7 段 200 ~ 500bp 序列与 *X. nematophilus* PMFI296 的杀虫毒素基因均具有较高同源性 ,PCR 扩增出的 XnBP76 5 段序列与 XnBP83 的对应序

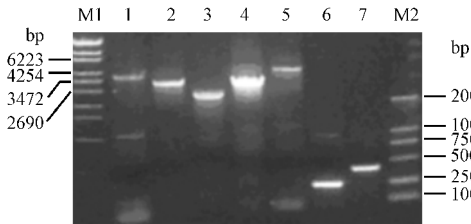


图 1 XnBP83 杀虫毒素基因的 PCR 鉴定

Fig.1 PCR Identification of insecticidal toxin genes in XnBP83

M1.λDNA/*Eco*T41 digest marker ; 1~7. PCR products amplified by the primer pares of Pxp*D* , Pxp*A1*- I , Pxp*A1*- II , Pxp*B1* , Pxp*C1* , Pxp*A2*- I and Pxp*A2*- II ;M2. DL2000 DNA marker.

列完全相同^[9]。用同样 7 对引物对另外 3 个克隆进行 PCR 扩增,对扩增出的序列测序,结果显示所有序列与我们已发表的序列完全相同。这些结果说明这 5 个克隆所含基因来自基因组的同一位置。

比较不同克隆对棉铃初孵幼虫的杀虫效果(LC_{50}),用 PCR 鉴定不同克隆的基因结构(表 3)。表 3 中所列的基因的排序为 *X. nematophilus* PMFI296 杀虫毒素基因簇的排序,由于各阳性克隆缺失的基因均位于这个排序的两侧,所以 *X. nematophilus* BP 的杀虫毒素基因簇的基因结构应与 PMFI296 的相同。与 XnBP83 比较,XnBP76 由于缺失 *xptA2* 基因,其杀虫活力大幅度下降,在高浓度的细胞存在下,棉铃虫的死亡率小于 50%,但能明显抑制棉铃虫的生长;XnBP203缺失了 *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。因此 *xptA2* 和 *xptC1* 的表达产物在毒素蛋白的杀虫活力中发挥着重要作用,而 *xptD1* 和 *xptA1* 表达产物在杀虫活力中所起的作用很小或不起作用。

表 3 不同克隆杀虫效果及基因结构比较

Table 3 The insecticidal toxicity and the gene structure of different clones

Clones	Toxicity		Presence of genes				
	LC_{50} (cells/g diet)	AW ¹	<i>xptD1</i>	<i>xptA1</i>	<i>xptB1</i>	<i>xptC1</i>	<i>xptA2</i>
XnBP76	/	5.0	+ ²	+	+	+	- ³
XnBP83	5.3×10^{10}		+	+	+	+	+
XnBP203	/	24.7	+	+	+	-	-
XnBP378	7.8×10^{10}		-	+	+	+	+
XnBP414	7.5×10^{10}		-	-	+	+	+
CK	/	23.3					

1. Average weight , mg/larva ; 2. Presented ; 3. Not presented.

2.2 阳性克隆的酶切鉴定

3 个具有较高杀虫活性的克隆 XnBP83 ,XnBP378 ,XnBP414 质粒 DNA *Eco*R I 酶切后均有一个 20kb 的 DNA 片段,而 XnBP76 和 XnBP203 的最大酶切片段分别为 10kb 和 5kb。结果显示该 20kb 片段的存在与否可能直接影响毒素基因表达产物的杀虫效果,因此,回收该片段做亚克隆,以进一步研究该片段所含基因与杀虫活性的关系。我们构建了 3 个亚克隆,命名为 pSub20k、pSub20k/9.5 和 pSub20k/6.5,酶切鉴定正确。

2.3 亚克隆的 PCR 鉴定和杀虫活力

分别用 3 个重组质粒转化 *E. coli* DH5α 得到 3 个亚克隆,命名为:Sub20k、Sub20k/9.5 和 Sub20k/6.5。通过 PCR 鉴定,3 个亚克隆所含毒素基因如表 4 所示,说明亚克隆

Sub20k 和亚克隆 Sub20kb/9.5 均具有抑制棉铃虫生长的作用 ,而这两个亚克隆均只有 *xptA2* 一个基因 ,说明 *xptA2* 的单独表达产物对棉铃虫具有一定的口服毒性。

2.4 亚克隆 pSub20k 同 XnBP76 和 XnBP203 分别混合后的杀虫效果

XnBP76 和 XnBP203 由于缺失 *xptA2* 杀虫活性明显下降或完全丧失 ,而亚克隆 Sub20k 含有完整的 *xptA2* ,我们把 XnBP76 和 XnBP203 的细胞分别与 Sub20k 细胞等量混合 ,饲喂棉铃虫初孵幼虫 ,比较其杀虫效果(表 5)。表 5 说明 ,XnBP76 和 XnBP203 的细胞分别与 Sub20k 细胞等量混合并没有使 XnBP76、Xn203 或 Sub20k 3 个克隆的杀虫活力得到明显提高 ,因而 ,杀虫毒素之间的物理混合并没有明显的增效作用。

表 4 亚克隆所含毒素基因和抑杀棉铃虫效果

Table 4 Insecticidal toxin genes in the subclones and its insecticidal toxicity to neonate of *H. armigera*

Subclones	Presence of genes					Toxicity (mg/larva)
	<i>xptD1</i>	<i>xptA1</i>	<i>xptB1</i>	<i>xptC1</i>	<i>xptA2</i>	
Sub20kb	-	-	-	-	+	12.5
Sub20k/9.5	-	-	-	-	+	6.7
Sub20k/6.5	-	-	-	-	-	22.4
CK	-	-	-	-	-	23.3

- .Not presented ;+ .Presented.

表 5 亚克隆 Sub20k 与 XnBP76 和 XnBP203 混合后对棉铃虫的抑杀效果

Table 5 The insecticidal activities of XnBP76 and XnBP203 mixed with Sub20k

Mixes	Toxicity(mg/larva)
XnBP76 + Sub20kb	4.7
XnBP203 + Sub20k	17.1
XnBP76	5.0
XnBP203	24.7
Sub20k	12.5
CK	23.3

3 讨论

从本文的结果 ,我们可以得出以下结论 :*xptB1*、*xptC1* 和 *xptA2* 3 个基因的联合表达产物具有最强的杀棉铃虫效果 ,而缺失其中的 1 个或 2 个都会使杀虫活力大幅度地下降或完全消失 ;*xptD1* 和 *xptA1* 的缺失对毒素基因表达产物的杀虫活力影响很小 ;*xptA2* 的表达产物具有抑杀棉铃虫的作用 ;杀虫毒素之间的物理混合并没有明显的增效作用。

Morgan 等^[4]研究 *X. nematophilus* PMFI296 的毒素基因时发现 ,*xptA2* 和 *xptD1* 毒素基因的表达产物对菜青虫(*Pieris brassicae*)无杀虫活性 ,而 *xptA1* 的单独表达产物却对菜青虫有一定的杀虫活性^[3]。这与我们研究发现的 *X. nematophilus* BP 的毒素基因对棉铃虫的功能明显不同 ,其中 *xptA2* 的缺失使得粘粒克隆 XnBP76 的杀虫活力明显降低 ,而 *xptA1* 缺失的粘粒克隆 XnBP414 的杀虫活力并没有明显降低。这可能是由于生物测定的对象不同或者 *X. nematophilus* 不同品系之间毒素蛋白存在差异的结果。

由于没能得到缺失 *xptB1* 的粘粒克隆或只有 *xptB1* 的亚克隆 ,我们还不能确定该基因与杀虫活性的关系。XnBP203 缺失了 *xptC1* 和 *xptA2* 后 ,该粘粒克隆丧失了杀虫活性 ,说明该基因单独表达产物不具有杀虫活性。

参 考 文 献

[1] Thomas G M , Poinar G O. *Xenorhabdus* gen. nov. , a genus of entomopathogenic , nematophilic bacteria of the family enterobacteriaceae. *Int J Syst Bacteriol* , 1979 , **29** 352 ~ 360.

[2] Bowen D , Rocheleau T A , Blackburn M , et al . Novel insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens* . Sci .
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

ence, 1998, **280** 2129 ~ 2132.

- [3] McGaughey W H, Gould F, Gelemter W. Bt resistance management. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**(2):144 ~ 146.
- [4] Morgan J A, Sergeant M, Ellis D, et al. Sequence analysis of insecticidal genes from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67** 2062 ~ 2069.
- [5] Akhurst R J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J Gen Microbiol*, 1980, **121** 303 ~ 309.
- [6] F 奥斯伯, R 布伦特, R E 金斯顿, 著. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998. 39.
- [7] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 90 ~ 104.
- [8] 陈其津, 李广宏, 林扬帆. 杀虫剂毒力测定数据的快速运算与分析. 中山大学学报论丛, 2001, **21**(3) 39 ~ 43.
- [9] 崔 龙, 邱礼鸿, 房媛媛, 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.

Importance of Five Genes Presented in *Xenorhabdus nematophilus* BP Toxin Gene Cluster to Its Insecticidal Activity

Cui Long Qiu Lihong* Xin Zhihai Fang Yuan Yuan Pang Yi
(State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Importance of five genes, named as *xptA1*, *xptD1*, *xptB1*, *xptC1* and *xptA2* presented in the toxin gene cluster of *X. nematophilus* BP strain, to its insecticidal activity against the neonate of *Helicoverpa armigera* was examined. This was achieved by analyzing and comparing the presence or absence of these five genes in and the insecticidal activity of each of the five clones screened from genomic cosmid library of *X. nematophilus* BP by *in situ* hybridization and another three subclones constructed from the enzyme-digested plasmid DNA of one of the insecticidal cosmid clones. The insecticidal activity of the clone or subclone was estimated by the 50% lethal concentration (LC_{50}) of the neonate of *H. armigera* feed with the mixture of artificial diet and the cells of the clone or subclone examined. The presence or absence of each of the five genes in the clone or subclone was determined by the results of PCR amplification of the whole or the two ends of the targeted gene. The results indicated that: 1 the presence of *xptC1* and *xptA2* was critical for the full insecticidal activity of the toxin gene cluster while absence of *xptD1* and/or *xptA1* had little effect on the insecticidal activity against the neonate of *H. armigera*; 2. mixing cosmid clone XnBP76 and subclone Sub20k, which had a gene structure of (*xptA1*⁺, *xptD1*⁺, *xptB1*⁺, *xptC1*⁺ and *xptA2*⁻) and (*xptA1*⁻, *xptD1*⁻, *xptB1*⁻, *xptC1*⁻ and *xptA2*⁺), respectively, did not achieve the full insecticidal activity. The functions of these five genes in the insecticidal process were discussed briefly.

Key words : *Xenorhabdus nematophilus* BP, Insecticidal toxin gene cluster, Insecticidal activity

Foundation item: Chinese National Nature Science Foundation(30170143); Nature Science Foundation of Guangdong Province (Group Item : 000594232172); Research Initiation Foundation for Overseas Returnees for Dr Qiu

* Corresponding author. Tel : 86-20-84113009 ; Fax 86-20-84037472 ; E-mail : ls76@zsu.edu.cn

Received date : 01-23-2003