

嗜线虫致病杆菌血腔毒素 Tp40 的纯化和特性分析

杨君¹, 王勤英^{1*}, 宋萍¹, 南官自艳², 崔龙¹, 孔繁芳¹, 冯姗姗¹

(河北农业大学¹ 植物保护学院, 河北省农业病虫害生物防治工程技术研究中心,² 林学院, 保定 071001)

摘要:【目的】嗜线虫致病杆菌是一种昆虫病原线虫共生菌,它能够产生多种杀虫毒素。本研究旨在从嗜线虫致病杆菌 *Xenorhabdus nematophila* HB310 菌株的细胞内纯化新的杀虫蛋白毒素,并对其进行基因克隆和序列分析。【方法】应用盐析和制备型非变性凝胶电泳等方法纯化蛋白,再通过对 5 龄大蜡螟幼虫血腔注射进行活性筛选。对获得的目的蛋白与已知蛋白进行同源分析,克隆出该目的蛋白的基因序列,从而进行相应的基因和氨基酸序列分析。【结果】本研究纯化的 Tp40 蛋白对大蜡螟 LD₅₀ 为 68.54 ng/头,其 SDS-PAGE 电泳图谱只显示出一条分子量约为 42 kDa 的多肽。Western 印迹分析表明 Tp40 与已知的 Txp40 为同源蛋白,并且仅存在于细胞内。编码该蛋白的基因开放读码框全长 1107bp (GenBank 登录号: EU095326),编码 368 个氨基酸残基,预测分子量为 41.5 kDa,等电点为 8.66,与 GenBank 中的其余 13 株昆虫病原线虫共生菌所包含的相似基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列比较,同源性分别为 85%~99%和 70%~99%。【结论】Tp40 蛋白具有很高的血腔杀虫活性,其基因序列具有较强的保守性,是昆虫病原线虫共生菌复合体杀虫过程中的一种关键因子。

关键词:嗜线虫致病杆菌;血腔毒素;大蜡螟;基因克隆;序列分析

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 05-0677-07

嗜线虫致病杆菌 (*Xenorhabdus nematophila*) 是小卷蛾斯氏线虫 (*Steinernema carpocapsae*) 肠道内的共生细菌,属肠杆菌科 (Enterobacteriaceae),革兰氏阴性^[1]。侵染期的昆虫病原线虫能够灵活地寻找到靶标昆虫,将携带的共生菌释放到寄主血腔内,并在短期内杀死寄主昆虫。在昆虫病原线虫—共生菌复合体的杀虫过程中,对寄主昆虫致病性起关键性作用的是共生菌产生的多种毒素^[2]。现在已从不同的昆虫病原线虫共生菌中分离到具有杀虫活性的物质,根据其作用方式可分为口服活性和血腔注射活性两类物质,具有血腔活性的物质在杀虫过程中起主要作用^[3]。

目前,有关昆虫病原线虫共生菌血腔毒素方面的报道还不是很多,研究较深入的有来自发光杆菌 (*Photobacterium luminescens*) W14 菌株的 Tc 毒素蛋白^[4-7]和致软毒素 Mcf^[8],来自嗜线虫致病杆菌的

Txp40 毒素蛋白^[9]及溶血素^[10]等。王勤英等已经从嗜线虫致病杆菌 HB310 菌株细胞内分离纯化了三种杀虫蛋白,其中一种分子量约为 60 kDa 的蛋白对大蜡螟具有较高血腔注射活性^[11]。在该菌株的进一步研究中,又从其细胞内得到了一种新的对大蜡螟具有高血腔注射活性的蛋白,分子量约为 42 kDa。本文正是对这种新蛋白的纯化和相关特性进行研究报道。嗜线虫致病杆菌杀虫毒素研究的不断深入,将有助于揭示昆虫病原线虫共生菌的杀虫机理,为新的微生物杀虫资源的开发利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株及昆虫:嗜线虫致病杆菌 HB310 (*Xenorhabdus nematophila* HB310) 菌株和 5 龄大蜡

基金项目: 国家自然科学基金(30400296); 河北省自然科学基金(C2006000443)

*通讯作者。Tel: +86-312-7528150; Fax: +86-312-7528165; E-mail: wqinying@yahoo.com.cn

作者简介: 杨君(1981-), 男, 河北秦皇岛人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫病原微生物。E-mail: yang22181@163.com

收稿日期: 2007-11-01; 修回日期: 2008-02-25

螟幼虫 *Galleria mellonella* (Wt:0.20~0.25g) 均由河北农业大学害虫生物防治实验室提供。

1.1.2 主要试剂和仪器:牛肉蛋白胨、牛肉膏、营养琼脂均为北京双旋微生物培养基制品厂产品;牛血清白蛋白和考马斯亮蓝为 Sigma 公司产品;其它试剂均为国产分析纯。Western 印迹分析中的一抗是以 Txp40 蛋白为抗原制得^[9], 由澳大利亚 CSIRO Entomology 的 Brown 博士馈赠;二抗(碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG) 购自北京中杉金桥公司。PCR 相关试剂均购自 TaKaRa 公司;pGEM-T Easy Vector System 克隆试剂盒购自 Promega 公司;大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。Eppendorf Centrifuge 5810R 型高速冷冻离心机;Sonic VibraCell VC 750 型超声波破碎仪;Millipore 3kDa Centricon YM-3 超滤管;垂直电泳槽、印迹转移槽和电泳仪均购自北京六一仪器厂;Tgradient 基因扩增仪。引物合成和基因测序均由上海 Sangon 公司完成。

1.2 菌液培养

参照文献[11]的方法,将菌种接种于 NBTA 培养基(营养琼脂 45 g, 溴百里酚蓝 0.025 g, 氯化三苯基四氮唑 0.04 g, 水 1000 mL, pH7.2~7.4) 平板上,在 28 $^{\circ}$ C 培养 36~48 h,挑取 I 型菌单菌落接入 5 mL 牛肉汤培养基(牛肉蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, 氯化钠 5 g, 水 1000 mL, pH 7.2~7.4) 中,于 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养过夜,再按 1% 接菌量转接于牛肉汤培养基中,在 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 48 h,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 胞内和胞外蛋白的提取

将 1.2 节培养的菌液在 4 $^{\circ}$ C, 10000 r/min 离心 30 min,吸取上清液并经 0.45 μ m 滤膜过滤得胞外上清液;离心后所得细胞沉淀加适量的磷酸缓冲液(PBS) 每 1000 mL 灭菌水中含 NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.44 g, KH₂PO₄ 0.24 g, pH7.4) 在 4 $^{\circ}$ C, 8000 r/min 离心 30 min,洗涤 2 次后,再用 PBS 重新悬浮,经过超声波破碎(on 9.9 s, off 0.1 s, 85% 振幅),4 $^{\circ}$ C, 10000 r/min 离心 30 min,取上清液经 0.45 μ m 滤膜过滤后为胞内上清液。

通过硫酸铵逐级盐析的方法(4 $^{\circ}$ C, 硫酸铵饱和度逐级达到 20%、30%、50%、65% 和 85%) 分别对胞外上清液和胞内上清液进行初步分离和浓缩,再经过透析(4 $^{\circ}$ C, 每 4 h 更换一次灭菌超纯水),最后得到的胞外和胞内蛋白提取物置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 血腔毒素的分离纯化

1.4.1 胞内蛋白提取物的 native-PAGE 制备型凝胶电泳:通过 native-PAGE 制备型凝胶电泳对胞内蛋白提取物中的组分进一步纯化。蛋白质条带的定位及蛋白样品的洗脱:从胶板的两边各切下一个泳道的胶条,用考马斯亮蓝染色 30 min,剩余的胶片用保鲜膜密封保存于 4 $^{\circ}$ C。根据染色胶条上的蛋白条带位置从未染色的胶片上逐一切下蛋白条带,分别加液氮充分研碎,加入适量的 PBS 缓冲液,4 $^{\circ}$ C 12000 r/min 离心 30 min 除去凝胶碎片,回收上清液用 Millipore 3 kDa Centricon YM-3 超滤管离心透析浓缩,再经 native-PAGE 电泳进行纯度鉴定,分别标号后作为待测样品于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4.2 血腔注射活性测定:用微量进样器(MC: 25 μ L) 将待测样品 5 μ L 从 5 龄大蜡螟幼虫的第一对腹足之间注入血腔,将注射后的试虫放在铺有滤纸的培养皿(直径 9 cm, 10 头/皿) 中。对照组注射同等剂量的 PBS 样品,每个样品 3 次重复,每次重复注射 15 头试虫。注射后放在 26 $^{\circ}$ C 培养箱中,每隔 6 h 检查大蜡螟的死亡情况,连续观察 48 h,从而筛选出高血腔活性蛋白。将筛选出的高血腔活性蛋白逐级稀释,测定其对大蜡螟 5 龄幼虫的 LD₅₀。

采用 DPS 数据处理系统对生测结果进行 Duncan's 新复极差多重比较分析^[12]。

1.4.3 蛋白含量的测定:采用考马斯亮蓝 G-250 法^[13]。

1.5 Native-PAGE 和 SDS-PAGE

Native-PAGE 和 SDS-PAGE 方法、电泳缓冲液、染色液和脱色液(考马斯亮蓝染色)的配制参照郭尧君等^[13]方法。电泳图像的分析应用捷达凝胶分析软件。

1.6 Western 印迹分析

Western blot 操作按照文献[14]的方法进行。

1.7 血腔毒素基因克隆

参照 1.2 的方法对 *X. nematophila* HB310 进行培养至对数生长期(过夜),总 DNA 提取参照文献[15]。

txp40 基因的扩增^[9]:正向引物:5'-AGAGTAAC-GCCTGATGATAA-3',反向引物:5'-CCTGTGTTCT-TGGCTTAGTC-3'。PCR 反应体系:100 ng 总 DNA, 100 pmol 引物, 1 μ L Taq DNA 聚合酶, 5 μ L Buffer(10 \times), 4 μ L dNTP 混合物,其余为 RNase Free dH₂O。

PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 30 s,

72 2 min, 33 个循环; 72 10 min; 25 1 min。扩增完毕后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR 产物的克隆和鉴定: 应用 PCR 产物纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化后克隆到 pGEM-T Easy 载体, 通过蓝白斑筛选获得阳性克隆。参照 pGEM-T Easy Vector System I 克隆试剂盒说明对阳性克隆进行检测。

1.8 血腔毒素基因序列分析

用 DNASTar 软件的 EditSeq 程序和 EXPASY server (www.expasy.ch) 对 1.7 中的测序结果进行蛋白翻译和分析。在网站 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> 上分析信号肽。在 NCBI GenBank 中对毒素基因和蛋白序列进行 BLAST 分析 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), 从中选出高相似序列 (高 score 和低 expectation), 用 Clustal-X 1.83 进行多序列比对^[16]。其结果用 MEGA 3.1 软件构建 NJ (neighbour joining) 系统树 (1000 次抽样分析)。

2 结果和分析

2.1 血腔毒素的分离、纯化

胞内蛋白通过逐级盐析, 获得的蛋白样品分别进行血腔注射活性检测, 对有活性的蛋白组分进行 native-PAGE 图谱比较, 结果表明经 30% 和 50% 硫酸铵饱和度盐析得到的蛋白组分在同一位置都有 1 条较明显的蛋白条带 (图 1-A 6 泳道, 箭头所指条带)。为

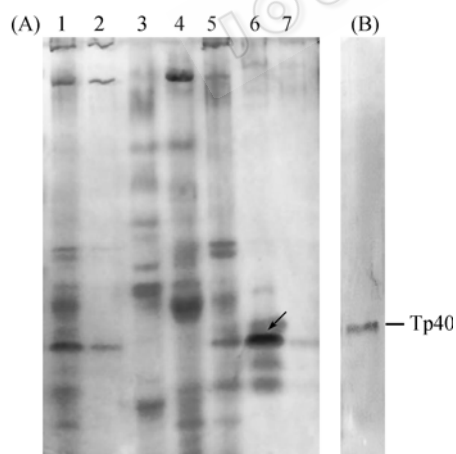


图 1 分离回收蛋白的 8% native-PAGE 图谱

Fig. 1 8% native-PAGE spectrum back-check of isolated proteins. A: 1. The precipitated protein collected directly at 85% saturated ammonium sulfate; 2. Supernatant centrifuged from the cells sonicated product; 7-3. Protein salted out stepwise by 20%, 30%, 50%, 65% and 85% saturated ammonium sulfate from the supernatant of the sonicated cells. B: 8% native-PAGE back-check of isolated Tp40.

方便说明, 将其命名为 Tp40 (Toxin protein 40)。由于 Tp40 在 30% 盐饱和度下聚沉明显, 所以应用 native-PAGE 制备型凝胶电泳从该硫酸铵饱和度得到的胞内混合蛋白中回收纯化。图 1-B 所显示的就是纯化后的 Tp40, 生测结果表明该蛋白具有血腔注射活性, 作为本文研究对象。经过 SDS-PAGE 检测, Tp40 仍显示为单一条带 (图 2-A 1 泳道), 故其为单体蛋白, 并且在胞内混合蛋白中也显示了该蛋白条带 (图 2-A 3 泳道)。根据 Marker, 应用凝胶分析软件计算 Tp40 的分子量约为 42 kDa。

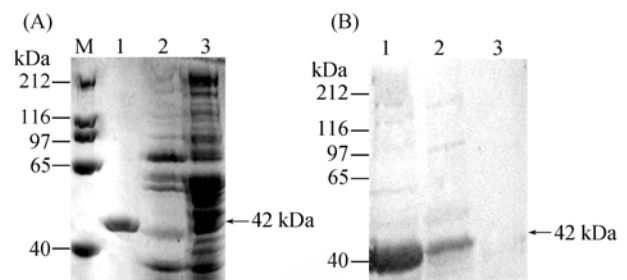


图 2 Tp40 的 10% SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 10% SDS-PAGE spectrum of Tp40. A: M. Protein marker; 1. Tp40; 2. Extracellular protein extracts; 3. Intracellular protein extracts. B: Western blot. 1. Intracellular protein extracts; 2. Tp40; 3. Extracellular protein extracts.

2.2 Tp40 的血腔注射毒力测定

将 Tp40 稀释后, 分别以 64.0 ng/头、65.1 ng/头、66.6 ng/头、68.4 ng/头、69.1 ng/头、69.8 ng/头和 71.0 ng/头 7 个不同剂量注射 5 龄大蜡螟幼虫, 其校正死亡率 (百分比%) 分别为 0、1.3±0.88、18.7±0.66、28.0±2.08、54.0±1.53、93.0±1.54 和 100 (图 3)。用 DPS 软件进行 Duncan 新复极差分析, Tp40 对大蜡螟

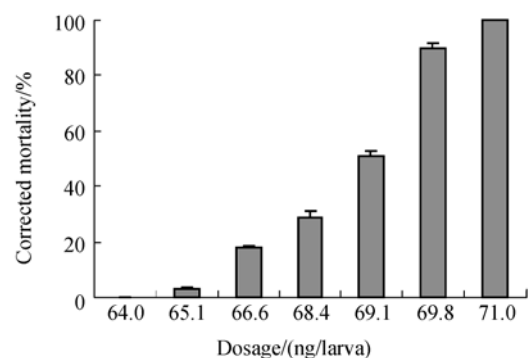


图 3 Native-PAGE 纯化的 Tp40 对大蜡螟 5 龄幼虫血腔注射毒力 (注射 48 h 后)

Fig. 3 Injecting toxicity of Tp40 isolated from native-PAGE gel against *G. mellonella* fifth-instar larvae after 48h. Bar represent means ± SD (n=3)

的 LD₅₀ 为 68.54 ng/头(剂量-死亡率回归方程 LD-p : $y = -61.8632 + 79.9817x$; 标准误差 SE=0.0013; 95%置信限: 68.14~68.95)。当 Tp40 以不低于 70±0.02 ng/头的剂量注射大蜡螟, 试虫均在 20 min 内死亡, 身体发软但无脱水现象, 体色不发生改变。死虫继续放置 6 h 后, 发现从其头部到胸部变黑, 身体其它部分不变色。

2.3 Western blot 鉴定

以已知的来自 *X. nematophila* A24 的蛋白 Txp40 制得的抗体为一抗, 碱性磷酸酶标记的羊抗兔为二抗, 对 Tp40 进行 Western blot 分析。结果表明, Tp40 与 Txp40 抗体出现交叉反应, 显示为同源蛋白(图 2-B 2 泳道); 胞内混合蛋白也出现了交叉反应, 证明 Tp40 蛋白确实存在于细胞内(图 2-B 1 泳道); 在细胞上清(胞外蛋白)中没有发现交叉反应(图 2-B 3 泳道), 此结果与胞外上清 SDS-PAGE 电泳(图 2-A 2 泳道)中没有出现 Tp40 条带相一致, 表明 Tp40 可能不被细胞分泌到胞外。

2.4 基因克隆及序列分析

在验证 Tp40 与 Txp40 为同源蛋白的基础上, 以共生菌 *X. nematophila* HB310 总 DNA 为模板, 利用 Txp40 基因扩增引物进行 PCR 扩增。将纯化的扩增产物与 pGEM-T Easy 载体用 T4 DNA 连接酶连接, 用氯化钙法转化大肠杆菌 DH5 α , 涂 Ampicillin、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上获得了白色阳性重组子, 提交公司测序。序列测定的结果表明, 该基因开放读码框

全长 1107 bp, 编码 368 个氨基酸残基, 未发现信号肽, 利用 EXPASY 计算蛋白分子量为 41505.77, 等电点为 8.66。Tp40 全长基因的核苷酸序列已在 GenBank 中登录, 序列号为 EU095326, 其编码的蛋白登录号为 ABU68418。

在 GenBank 中进行 BLAST 分析, 找到了与 Tp40 基因同源性较高的 13 个序列, 它们分布于发光杆菌属 (*Photobacterium*) 和致病杆菌属 (*Xenorhabdus*) 的 4 个已定名亚种中(表 1)。Tp40 基因与同种共生菌 *X. nematophilus* A24 克隆得到的杀虫毒素 Txp40 基因同源性达 99%, 只有 2 个碱基的差异, 其表达的蛋白也仅有 2 个氨基酸差异。该基因保守性很强, 与致病杆菌属其它种类该基因同源性大多在 99% 以上, 与发光杆菌属基因同源性均低于 90%, 但是仍在 80% 以上。

对表 1 中基因所对应的蛋白序列和推导的 Tp40 氨基酸序列 (ABU68418) 进行了相似性(表 1)和进化分析(图 4)。氨基酸序列经过 Clustal-X 多序列比对。图 4 可以看出, 各节点都显示出了非常高的自展值, 并且系统发育树明显分为两大类群: 致病杆菌属 (*Xenorhabdus*) 和发光杆菌属 (*Photobacterium*)。由此可知, 共生菌菌株的种属分类和蛋白的同源性具有一定的相关性, 即属于致病杆菌属的 10 株菌株位于同一支大的类群, 与它们氨基酸序列的高同源性相一致。这也为依据该蛋白和基因确定未知共生菌菌株的分类地位提供了一条可参考的途径。

表 1 Tp40 毒素基因与 GenBank 中相似基因的同源性 BLAST 分析

Table 1 Identity of Tp40 insecticidal toxin gene comparing with similar genes in GenBank through BLAST

Accession No. (Gene/Protein)	Description	Origin of gene	Identity (Gene/Protein)
DQ242620/ABB29482	40kDa insecticidal toxin	<i>X. nematophila</i> F1 ^[9]	99%/99%
DQ242618/ABB29480	40kDa insecticidal toxin	<i>X. nematophila</i> A24 ^[9]	99%/99%
DQ242621/ABB29483	40kDa insecticidal toxin	<i>X. nematophila</i> Mex ^[9]	99%/98%
DQ242622/ABB29484	40kDa insecticidal toxin	<i>X. nematophila</i> AN6 ^[9]	99%/97%
DQ242629/ABB29491	40kDa insecticidal toxin	<i>Xenorhabdus</i> sp. SaV ^[9]	99%/99%
DQ242628/ABB29490	40kDa insecticidal toxin	<i>X. bovienii</i> T319 ^[9]	99%/99%
DQ242627/ABB29489	40kDa insecticidal toxin	<i>X. bovienii</i> F7 ^[9]	99%/99%
DQ242626/ABB29488	40kDa insecticidal toxin	<i>X. bovienii</i> F5 ^[9]	99%/99%
DQ242619/ABB29481	40kDa insecticidal toxin	<i>X. japonica</i> Kushidai ^[9]	99%/99%
DQ242625/ABB29487	40kDa insecticidal toxin	<i>P. luminescens</i> V16 ^[9]	86%/70%
DQ242624/ABB29486	40kDa insecticidal toxin	<i>X. bovienii</i> T363 ^[9]	86%/70%
BX571866/CAE14352	Complete genome, segment 8/17	<i>P. luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> T101 ^[19]	85%/70%
DQ242623/ABB29485	40kDa insecticidal toxin	<i>P. luminescens</i> HI ^[9]	85%/70%

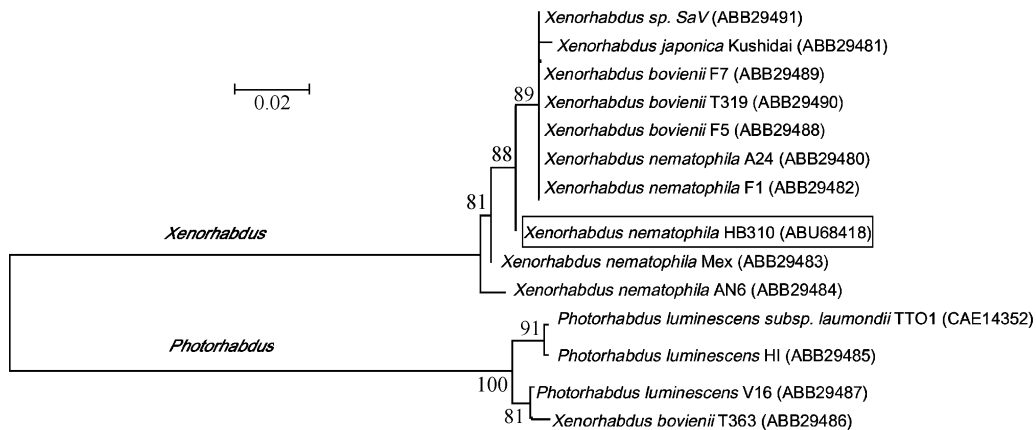


图 4 来自 14 株昆虫病原线虫共生菌的同源蛋白系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of homologous proteins from 14 entomopathogenic bacterium strains based on amino acid sequences. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The numbers on branches are the percentages of 1000 bootstrap pseudosamples supporting the branches. *X. nematophila* HB310 was indicated by pane. Bar, 2% sequence divergence.

3 讨论

昆虫病原线虫共生菌包括两个属:致病杆菌属(*Xenorhabdus*)^[17]和发光杆菌属(*Photorhabdus*)^[18],它们分别与不同科的昆虫病原线虫互惠共生,能够在靶标昆虫血腔内大量繁殖并分泌杀虫活性极高、杀虫谱极广的蛋白毒素。2003年 *P. luminescens* TTO1 菌株基因组全序列测序完成,序列分析表明该菌为已知基因组序列的细菌中含有杀虫毒素基因最多的一种细菌^[19],意味着昆虫病原细菌将成为具有巨大研究和开发潜力的杀虫资源。

Ensign 等^[20]在发光杆菌(*P. luminescens*)代谢物中发现了对昆虫具有毒性的胞外蛋白,注射毫微克这种蛋白便可在 12~24 h 内杀死烟草天蛾(*Manduca sexta*) 5 龄幼虫。Smigielski 等^[21]报道,从嗜线虫致病杆菌 *X. nematophila* A24 发酵液中分离到一种 30 kDa 的杀虫蛋白,注射数微升该发酵液即可使大蜡螟死亡。Brown 等^[14]从嗜线虫致病杆菌 A24 中得到 *txp40* 基因,重组表达后得到一种分子量 42 kDa 的蛋白 Txp40,测得它对大蜡螟幼虫具有血腔注射活性。本实验从嗜线虫致病杆菌 HB310 细胞内获得蛋白 Tp40,生物测定显示它对大蜡螟幼虫也具有高血腔注射活性。Western bolt 分析表明,Tp40 与 Brown 等获得的 Txp40 为同源蛋白,*tp40* 基因与 *Txp40* 基因同源性高达 99%。Brown 等是利用构建粘粒文库的方法先得到基因,然后通过外源表达的方式获得了该蛋白;本研究利用盐析和制备型非变性凝胶电泳等方法同

样得到了分子量相同的该蛋白,证明翻译后的该蛋白不需要进行剪切加工,其杀虫活性的表达也不需要其它辅助蛋白的帮助。本实验也说明发现和分离像 Tp40 这类单体蛋白,本文的方法也是具有可操作性的。

Brown 等^[9]在 47 个 *Xenorhabdus* 菌株和 12 个 *Photorhabdus* 菌株中都发现了 *Txp40* 相似基因,由此认为 Txp40 蛋白毒素在这两个病原线虫共生菌中普遍存在,并且其保守性很强。尽管我们所用嗜线虫致病杆菌 HB310 菌株来自中国河北^[22],与 Brown (2006) 的研究中供试菌株的来源(基本上都来自欧洲和澳洲)属于完全不同的地理区系,但是其所产生的杀虫蛋白 Tp40 与来自欧洲等地嗜线虫致病杆菌其它菌株以及 *Xenorhabdus* 的其它种类共生菌的 Txp40 相似性大多都达到 97% 以上,与 *Photorhabdus* 中的该类蛋白的同源性也达到 70%。因此,Tp40 蛋白及其基因的研究结果进一步补充和证实了 Brown 等的推论:Txp40 蛋白毒素在共生菌中分布普遍,有可能是昆虫病原线虫共生菌关键的杀虫组份之一。

在 *tp40* 基因中没有发现信号肽,这与菌液胞外上清的 Western bolt 结果相一致,都显示出 Tp40 可能不被分泌到细胞外,但它对大蜡螟的高血腔活性又显示出与共生菌的杀虫活性相关。那么,这种广泛存在于昆虫病原线虫共生菌细胞内的杀虫蛋白是怎样起到杀虫作用的呢?我们推测 Tp40 可能是通过细胞自溶被释放到昆虫血淋巴中的。Brown 等^[9,14]的研究结果显示,Txp40 能够破坏靶标昆虫中肠组织和脂肪体,但其具体作用靶标和杀虫机理还不是很清楚。针

对 Tp40 的表达时间、释放途径和杀虫机理, 本实验室也正在做进一步的研究, 对该蛋白的研究将有助于揭示昆虫病原线虫共生菌与寄主昆虫的致病关系。

参 考 文 献

- [1] Akhurst RJ, Boemare NE. Biology and Taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Gaugler R and Kaya HK, editors. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1990, 75–90.
- [2] Ffrench-Constant R, Waterfield N, Daborn P, *et al.* *Photorhabdus*: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, 26: 433–456.
- [3] Ffrench-Constant R, Andrea Dowling, Waterfield R. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon*, 2007, 49: 436–451.
- [4] Bowen D, Rocheleau TA, Blackburn M, *et al.* Novel insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science*, 1998, 280: 2129–2132.
- [5] Blackburn M, Golubeva E, Bowen D, *et al.* A novel insecticidal toxin from *Photorhabdus luminescens*, Toxin complexa (Tca), and its histopathological effects on the midgut of *Manduca sexta*. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 3036–3041.
- [6] Guo LN, Fatig RO, Orr GL, *et al.* *Photorhabdus luminescens* W-14 insecticidal activity consists of at least two similar but distinct proteins. Purification and characterization of toxin A and toxin B. *J Biol Chem*, 1999, 274: 9836–9842.
- [7] Ffrench-Constant RH, Bowen DJ. Novel insecticidal toxins from nematode-symbiotic bacteria. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 57: 828–833.
- [8] Daborn PJ, Waterfield N, Silva CP, *et al.* A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (*mcf*), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 2002, 99: 10742–10747.
- [9] Brown SE, Cao AT, Dobson P, *et al.* Txp40, a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 1653–1662.
- [10] Brillard J, Ribeiro C, Boemare N, *et al.* Two distinct hemolytic activities in *Xenorhabdus nematophila* are active against immunocompetent insect cells. *Journal of Bacteriology*, 2001, 67: 2515–2525.
- [11] 王勤英, 南宮自艳, 陆秀君, 等. 嗜线虫致病杆菌 HB310 菌株杀虫蛋白的纯化及活性鉴定. *昆虫学报(Acta Entomologica Sinica)*, 2005, 48(3): 353–358.
- [12] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社, 2002, 1–664.
- [13] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 2001, 54–157.
- [14] Brown SE, Cao AT, Hines ER, *et al.* A novel secreted protein toxin from the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *J Biol Chem*, 2004, 279: 14595–14601.
- [15] Sammlrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [16] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL-X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (24): 4876–4882.
- [17] Thomas GM, Poinar GO. *Xenorhabdus gen. nov.*, a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. *Int J Syst Bacteriol*, 1979, 29 (4): 352–360.
- [18] Boemare NE, Akhurst RJ, Mourant RG. DNA relatedness between *Xenorhabdus spp.* (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus gen. nov.* *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43: 249–255.
- [19] Eric D, Christophe R, Lionel F, *et al.* The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature Biotechnology*, 2003, 21 (11): 1307–1313.
- [20] Brehonin M, Drif L, Boemare N. Proceeding and Abstract, Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Adelaide: 1990, 213–217.
- [21] Smigielski AJ, Akhurst RJ. Toxin gene from *Xenorhabdus nematophilus*. United States Patent 5972687, 1999.
- [22] 王勤英, 陆秀君, 李秀花, 等. 嗜线虫致病杆菌 *Xenorhabdus nematophilus* HB310 对 3 种十字花科蔬菜害虫杀虫活性的研究. *河北农业大学学报(Journal of Agricultural University of Hebei)*, 2004, 27(5): 72–76.

Purification and characterization of the haemocoel insecticide Tp40 from *Xenorhabdus nematophila*

Jun Yang¹, Qinying Wang^{1*}, Ping Song¹, Ziyang Nangong², Long Cui¹,
Fanfang Kong¹, Shanshan Feng¹

¹College of Plant Protection, Biocontrol Centre of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province,

²College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: [Objective] *Xenorhabdus nematophila* is an insect pathogen bacterium symbiotically associated with entomopathogenic nematode. The bacteria produce a number of toxins to overcome immune response of insect hosts and kill their hosts. We purified a novel haemocoel insecticidal protein from *X. nematophila* HB310, cloned and analysed gene sequence of this novel protein. **[Methods]** We isolated and purified the insecticidal protein by methods of salting out and native-PAGE from the intracellular proteins of *X. nematophila* HB310. We tested the virulence of the protein by direct injection into fifth-instar *Galleria mellonella* larvae. The protein was identified by western blotting. The gene of insecticidal protein was cloned by PCR and analyzed in GenBank. **[Results]** We purified a novel haemocoel insecticidal protein that was named as Tp40. The injectable hemocoelic potency (LD₅₀) of Tp40 was 68.54ng/larva against fifth-instar *G. mellonella* larvae. The SDS-PAGE spectrum of Tp40 only showed a single ~42kDa band. Western blotting with an antibody that was highly specific to the known Txp40 indicated that Tp40 was homologous to the known Txp40 and only existed inside cells. The nucleotide sequences of *tp40* gene have been deposited in GenBank (accession number GenBank: EU095326). The size of the open reading frame of *tp40* was 1107bp, encoding a peptide of 368 amino acid residues, with a theoretical molecular weight 41.5 kDa and an isoelectricpoint (IP) 8.66. The Tp40 shared 85%–99% homology of nucleotide sequences and 70%–99% amino acids with those of 13 group strains. **[Conclusion]** Tp40 is high injectable virulent for *G. mellonella* larvae and its gene/protein sequence is highly conserved, which play a key role during the bacterium-nematode killing host insects process.

Keywords: *Xenorhabdus nematophila*; haemocoel toxin; *Galleria mellonella*; gene cloning; sequence analysis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400296) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2006000443)

*Corresponding author. Tel: +86-312-7528150; Fax: +86-312-7528160; E-mail: wqinying@yahoo.com.cn

Received: 1 November 2007/ Revised: 25 February 2008

答 作 者 问

问: 我的文章现已审查完毕, 并收到了编辑部发来的“审稿意见”。我想咨询, 如果文章修改后, 再次投递, 是否还需要交稿件受理费? 是否仍然用原论文编号提交?

答: 这要分 2 种情况, (1)如果你的文章已经被通知“退稿”了, 那么修改之后再投来的文章将按“新稿件”处理, 从程序上来讲和新投稿件是一样的, 仍需要缴纳稿件受理费。但是为便于稿件审理, 请作者在投稿时在文题的后面加上“原稿件号+修后再投”字样。(2)如果是编辑部在审稿意见中要求您修改后再经本刊“复审”, 则不作为新稿处理, 请作者直接将修改稿上传到远程系统中, 不再另交稿件受理费。