

研究报告

光杆菌(NLK-1) Txp40 毒蛋白基因克隆表达及预测

詹发强 侯敏 杨蓉 杨文琦 侯新强 孙建 龙宣杞*

(新疆农业科学院微生物应用研究所 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘要:【背景】光杆菌存在于嗜菌异小杆线虫肠道内, 并与其互惠共生, 其能够产生多种高效、广谱的杀虫蛋白及毒素, 是近年来继苏云金芽胞杆菌(Bt)之后挖掘新型杀虫蛋白及杀虫基因的热点研究对象。【目的】克隆 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 毒蛋白基因, 分析其与已知其他同属共生菌相似毒蛋白在基因序列、蛋白组成、理化性质及构象的区别, 构建原核表达载体并转化大肠杆菌进行诱导表达, 初步测定其杀虫活性。【方法】采用侵染的大蜡螟幼虫血腔直接分离初生型共生细菌, 根据已报道的序列经比对分析设计引物, 扩增目的基因, 连接克隆质粒 pMD19-T 后测序, 利用 Expasy 在线 ProtParam tool 预测其基本理化特性参数, NPS@-Network Protein Sequence Analysis 在线工具进行二级结构预测。通过克隆、酶切、连接目的基因在 pET28a 原核表达载体上, 转化大肠杆菌 BL21 中, 利用蓝白斑筛选阳性克隆, 测序验证后进行 IPTG 诱导表达; 菌体超声破碎离心, 以毒蛋白含量较高的上清溶液对大蜡螟幼虫进行饲喂和血腔注射毒性测定。【结果】*Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 毒蛋白基因全长为 1 008 bp, 与已知相关基因的序列相似性为 94%, 与已知 40 kD 相关蛋白的氨基酸相似性达到 99%, 分子量 37.9 kD, pI 8.37, 二级结构预测表明其主要由 α 螺旋 35.71%, 无规卷曲 54.46%, 延伸链 9.52% 组成, 跨膜区域与已知蛋白基本相似, 克隆构建了原核表达载体 pET28a-(NLK-1) Txp40, SDS-PAGE 分析其在 38 kD 处有特异条带, 蛋白分子量与预测值基本一致, 且表达相对单一, 表达量较高。*Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 蛋白对大蜡螟幼虫具有较高的血腔毒性, 大蜡螟幼虫注射 5 μ L 蛋白粗提液剂量下 48 h 内致死率达 100%, 未发现胃毒活性。【结论】获得 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 毒蛋白基因, 比对、分析了与已知基因在序列组成、蛋白基本理化性质和二级结构的异同, 构建了原核表达载体并成功诱导表达, 验证了 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 毒蛋白具有较高的大蜡螟幼虫血腔毒性, 为进一步发掘 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) 中的杀虫功能基因和蛋白奠定基础。

关键词: 光杆菌, Txp40 毒蛋白, 共生细菌, 克隆表达

Foundation items: The Youth Funding of Xinjiang Academy of Agricultural Sciences (xjnkq-2015006); International Cooperation Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region (20136013); The Special Funding of the Transformation of Scientific and Technological Achievements of Xinjiang Uygur Autonomous Region (201554113); The Special Funding for Enhancing the Agricultural Scientific and Technological Research Innovation Platform of Xinjiang Academy of Agricultural Sciences (XJNKYPT-2017-002)

*Corresponding author: Tel: 86-991-4530178; E-mail: longxq_xj@sina.com

Received: August 21, 2017; **Accepted:** January 12, 2018; **Published online** (www.cnki.net): January 25, 2018

基金项目: 新疆农业科学院青年基金(xjnkq-2015006); 新疆维吾尔自治区国际合作项目(20136013); 新疆维吾尔自治区科技成果转化专项资金(201554113); 新疆农业科学院农业科技创新平台能力提升建设专项(XJNKYPT-2017-002)

*通信作者: Tel: 86-991-4530178; E-mail: longxq_xj@sina.com

收稿日期: 2017-08-21; **接受日期:** 2018-01-12; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-01-25

Cloning, expression and prediction of insecticidal toxin Txp40 from *Photorhabdus luminescens* NLK-1

ZHAN Fa-Qiang HOU Min YANG Rong YANG Wen-Qi HOU Xin-Qiang
SUN Jian LONG Xuan-Qi*

(Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830091, China)

Abstract: [Background] *Photorhabdus* sp. is preserving in the intestine of *Heterorhabditis* sp., and it can produce variety efficient and broad spectrum insecticidal proteins and toxins. In recent years, it's the novel research object on new insecticidal protein and gene after *Bacillus thuringiensis*. [Objective] To clone *Txp40* toxin gene of *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) and analyze the differences on gene sequence, protein composition, physicochemical properties and conformation similarity to other symbiotic bacteria. *Txp40* toxin gene was cloned in prokaryotic expression vector of *Escherichia coli* and induced its to express, then utilized *Galleria mellonella* larvae to preliminary detect its insecticidal activity. [Methods] The primary symbiotic bacteria were isolated from the infected larvae by *Heterorhabditis bacteriophora*, and the primers were designed according to the reported sequences. The target gene was amplified and sequenced by the cloning plasmid pMD19-T. The Expasy Online ProtParam Tool to predict its basic physical and chemical properties parameters, NPS@-Network Protein Sequence Analysis online tools for secondary structure prediction. *Txp40* toxin gene was detected by cloning, digestion and ligation on pET28a and transformed into *Escherichia coli* BL21 then induced by IPTG, and identified by blue-white blotting. Utilizing *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) *Txp40* protein crude extract to test the insecticidal activity to *Galleria mellonella* larvae by fed and hemocole injection. [Results] *Txp40* toxin gene open reading frame is 1 008 bp (335 amino acid), and the similarity to the known gene was 94%. The similarity with the known 40 kD related protein was 99%, molecular weight was 37.9 kD, pI 8.37, and it was mainly composed of Alpha helix 35.71%, Random coil 54.46%, Extended strand 9.52% by secondary structure predicting. The expression of pET28a-*Txp40* was detected by SDS-PAGE, which showed that there were specific band at 38 kD, and the molecular weight of protein was similar with prediction, and the expression was relatively single and the level was higher. The insecticidal activity tests showed that *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) *Txp40* protein had high virulence to *Galleria mellonella* larvae, and the lethality reached 100% at 48 h under 5 μ L *Txp40* protein crude extract per larvae, but oral toxicity was not detected. [Conclusion] *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) *Txp40* toxin gene was successfully obtained, and the physicochemical properties of the protein were analyzed by comparison to the known gene, and secondary structure were predicted and analyzed to other known protein. At the same time, the prokaryotic expression vector was constructed, the preliminary insecticidal test showed *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) *Txp40* protein had high hemocole toxicity to *Galleria mellonella* larvae. The research laid the foundation for the further study and discovery of insecticidal genes and toxic protein from *Photorhabdus luminescens* (NLK-1).

Keywords: *Photorhabdus luminescens*, *Txp40* toxin protein, Symbiotic bacteria, Cloning and expression

昆虫病原线虫共生菌是一类与昆虫病原线虫 (*Entomopathogenic nematodes*) 互惠共生的杆状细菌, 包括致病杆菌属 (*Xenorhabdus*) 和光杆菌属 (*Photorhabdus*)。在自然环境中, 共生菌存在于三龄

侵染期线虫 (Infective juvenile) 肠道内, 由线虫携带并释放于寄主昆虫血腔中。目前的研究显示, 昆虫病原线虫可在 48 h 内侵入寄主昆虫血腔并致其死亡^[1], 致死原因被归结为线虫和共生菌的联合作用,

包括线虫和共生菌的生长繁殖,以及它们产生的各种杀虫物质^[2]。但目前普遍认为共生菌在这一致死过程中扮演了关键的作用^[3]。共生菌对寄主昆虫免疫调节直至杀死的功能,被认为与其产生的毒力因子,特别是蛋白毒素的作用密切相关^[4]。共生菌能够产生多种代谢产物,包括蛋白、脂类、抗生素等,它们被认为在昆虫病原线虫共生菌复合体感染寄主昆虫的过程中发挥重要的作用。1998年,Tc蛋白毒素复合体首次在 *Photorhabdus luminescens* W14 菌株发酵液中被发现^[5],该蛋白显示出类似 δ -内毒素的杀虫活性和致病特征,但比 δ -内毒素具有更广的杀虫谱。目前,国内外研究较为热门、且比较深入的毒素蛋白及杀虫基因有 Tc 毒素蛋白复合体、致软毒素 Mcf1、Pir 蛋白以及 Txp 蛋白等。Tc 毒素蛋白复合体由 3 种类型的功能蛋白共同组成^[6],根据蛋白序列相似性和分子量,这 3 种类型的蛋白被归为 A、B 和 C 三类^[7-8]。Txp40 (Toxin from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, 40 kD)是一种普遍存在于昆虫病原线虫共生菌致病杆菌属和光杆菌属中的杀虫蛋白,杨君等^[9]从嗜线虫致病杆菌 HB310 菌株中分离出一种对大蜡螟(*Galleria mellonella*)具有高血腔注射活性的 Txp40 蛋白。Brown 等^[10]从 60 种 *Xenorhabdus* 和 *Photorhabdus* 中均分离出一个编码 40 kD 蛋白的完整杀虫基因或杀虫基因片段,分析发现不同菌株中得到的基因之间具有很高的同源性,但不同属种杀虫基因差异较大,是近年来发现的又一系列新型杀虫蛋白,该蛋白的杀虫谱较广,已测定的昆虫包括大蜡螟、印度谷螟 (*Plodia interpunctella*) 和 铜 绿 蝇 (*Lucilia cuprina*) 的幼虫。

本研究中的共生细菌来自作者公开报道的首株新疆本土昆虫病原线虫嗜菌异小杆线虫尼勒克品系^[11](*Heterorhabditis bacteriophora* strain Nileke) 的共生细菌。通过研究昆虫病原线虫共生细菌 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) 杀虫蛋白及其杀虫功能基因,以期能够获得具有高毒力的杀虫蛋白基因,为转基因抗虫、杀虫研究提供多样的、新的

杀虫基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

克隆测序质粒 pMD19-T 购自宝生物工程(大连)有限公司;菌株 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) (分离自被 *Heterorhabditis bacteriophora* strain Nileke 感染的大蜡螟幼虫血腔) GenBank 登录号为 KY814641;原核表达载体 pET28a、感受态细胞 DH5 α 、表达菌株大肠杆菌 BL21、DNA 和蛋白 Marker,以及引物合成和序列测定均由生工生物工程(上海)股份有限公司购买和完成。

1.1.2 培养基

NBTA 培养基^[11],营养琼脂与营养肉汤培养基购自北京奥博星生物技术有限责任公司。

1.1.3 主要试剂和仪器

PCR 预混液,宝生物工程(大连)有限公司;细菌基因组提取试剂盒、胶回收纯化试剂盒、X-Gal、IPTG、氨苄青霉素、卡那霉素、氯霉素等,生工生物工程(上海)股份有限公司,其余试剂均为分析纯。

离心机、PCR 仪,德国 Eppendorf 公司;恒温摇床,上海智城分析仪器制造有限公司;电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像分析仪,北京市六一仪器厂;染色、脱色摇床,苏州市国飞实验室仪器有限公司;超声波细胞粉碎机,无锡久平仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 毒蛋白基因克隆

分离嗜菌异小杆线虫 (*Heterorhabditis bacteriophora* Nileke) 的共生细菌^[11],并提取 NLK-1 总基因组,参照 Brown 等^[10]用于 *Photorhabdus* sp. 中 Txp40 的引物对 Primer-F (5'-AAGCTTATGGTTA TACAATTAACACCTG-3') 和 Primer-R (5'-GGTAG TAAAGTGTATTGGC-3'),以 NLK-1 总基因组为模板进行扩增。PCR 反应体系(25 μ L): 0.5 μ mol/L 的 Primer-F 和 Primer-R, 250 μ mol/L 的 dNTPs,

10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.4), 50 mmol/L 氯化钾, 1.5 mmol/L 氯化镁, 1 U 的 *Taq* DNA 聚合酶, 1 μ L 模板。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 55 s, 47 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。取 3 μ L 扩增产物, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离鉴定, 120 V 电泳 30 min, 目标条带大小 1 000 bp 左右; 切胶回收目的条带, 16 °C 与 pMD19-T 载体连接, 连接产物转化感受态细胞 DH5 α 涂布于含有 Amp 的平板, 37 °C 培养过夜, 通过蓝白斑筛选阳性克隆, 菌落 PCR 方法进行验证, 确定的阳性克隆富集培养后提取质粒 pMD19-*Txp40* 重复测序, 确定序列长度及碱基组成。

1.2.2 *Photobacterium luminescens* (NLK-1) *Txp40* 原核表达载体构建

参照分子克隆实验指南^[12], 以 *Photobacterium luminescens* (NLK-1) 基因组为模板, 用带酶切位点的一对引物 Forward-p1: 5'-GACACCCATGGTTATACAATTAACACCTGATAATAGAAG-3' (下划线处为 *Nco* I 酶切位点) 和 Reverse-p2: 5'-GACACCTCGAGTATATTTTATAATGAGTTCCAACACTATG-3' (下划线处为 *Xho* I 酶切位点), PCR 反应方法同 1.2.1, 克隆连接到质粒 pMD19-T, 转化及阳性鉴定后提取质粒, 预计扩增片段长度为 1 000 bp; 用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Xho* I 对 pMD19-*Txp40* 进行双酶切, 胶回收纯化 *Txp40* 基因片段, 将其定向克隆到经同样酶切的 pET28a 表达载体上, 转化到 BL21 感受态细胞, 菌落 PCR 初步鉴定蓝白斑筛选后的白色阳性菌落, 电泳检测与目的片段大小一致的菌落即为阳性克隆菌落, 提取其重组质粒后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证。

1.2.3 基因及预测蛋白序列比较、重组蛋白基本参数及二级结构预测

将测序得到的 *Txp40* 基因序列与 GenBank 数据库中的核苷酸序列进行 BLAST 比对分析, 从中获取相近的序列, 用 ClustalX 软件和 MEGA 4.1 中 Neighbor-Joining 法构建系统进化树, 并提交序列至 GenBank 获取登录号; 将基因序列用 NCBI 中的

ORF finder 在线工具翻译成氨基酸序列, 提交至 NCBI 中用 BLASTx 比对, 蛋白进化树构建方法同上。重组蛋白基本理化参数预测利用在线网络工具 <https://www.predictprotein.org/>, 二级结构预测利用在线应用软件^[13] NPS@-Network Protein Sequence Analysis。

1.2.4 重组蛋白诱导表达及 SDS-PAGE 分析

挑取 BL21 阳性克隆菌株的单菌落于 2.5 mL LB 培养基(30 μ g/mL 卡那霉素和 34 μ g/mL 氯霉素)试管中, 37 °C、220 r/min 培养过夜, 将培养的菌液按 1:100 比例接种于 3 支含 2.5 mL LB (30 μ g/mL 卡那霉素和 34 μ g/mL 氯霉素)培养管中, 220 r/min 培养约 3 h, 当 OD_{600} 值达到 0.6 左右时, 添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 一支于 37 °C、220 r/min 条件下诱导 4 h; 另一支于 20 °C、220 r/min 条件下诱导过夜; 未加 IPTG 诱导剂的作为阴性对照。4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 弃上清, 菌体用 500 μ L PBS (pH 7.4) 缓冲液悬浮, 超声破碎 6 min, 超 0.5 s, 停 1.5 s, 然后 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 分别收集上清和沉淀, 沉淀用 500 μ L 包涵体溶解液 (8 mol/L Urea, 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0) 溶解, 分别取 40 μ L 样品和 10 μ L 5 \times Protein loading buffer 混匀, 沸水浴 10 min。12% SDS-PAGE 检测, 上样量 10 μ L, 浓缩胶 80 V、20 min, 分离胶 120 V、60 min, 电泳结束经考马斯亮蓝染色、脱色后检测蛋白表达情况。

1.2.5 杀虫效果分析

试验采用饲喂和注射两种形式, 饲喂对照组为带有 pET28a 空载的 BL21 菌悬液, 饲喂和注射组均采用 20 °C 条件下经 IPTG 诱导、超声破碎后的 *Txp40* 杀虫蛋白混合物; 饲喂试验采用与培养物(冻干粉碎后的蜂巢) 1:5 的比例混合饲喂, 每隔 12 h 观察; 采用 5 μ L/大蜡螟幼虫的剂量进行注射实验^[14], 对照组分别为 PBS 缓冲液和经 IPTG 诱导并带有 pET28a 空载的 BL21 菌悬液, 实验组分别为 20 °C 诱导过夜离心后菌体超声破碎后的上清和包涵体溶解液, 用微量进样器将待测样品从大蜡螟

幼虫的第一对腹足之间注入血腔,将注射后的试虫放在培养皿(直径 9 cm,10 头/皿)中,每 8 h 观察记录致死情况。

2 结果与分析

2.1 *Txp40* 基因扩增与条件优化

通过嗜菌异小杆线虫(尼勒克品系 *Heterorhabditis bacteriophora* strain Nileke)侵染大蜡螟幼虫,2 d 后从被侵染的大蜡螟幼虫血腔中分离共生细菌,并提取其基因组,以共生菌基因组为模板扩增目的基因,根据 Brown 等^[10]对几十株不同品系的昆虫病原线虫 *Txp40* 基因扩增使用的 4 对引物进行扩增,其中只有一对针对嗜菌异小杆线虫共生细菌 *Txp40* 基因的引物特异性较高,扩增出的目标条带单一且大小与理论预测相当,因此确定了一对特异性较高的克隆引物,但根据 Brown 等^[10]的退火温度,扩增的目的产物条带亮度较低,不利于后续回收纯化,因此进一步通过退火温度的梯度试验来优化 PCR 扩增条件,在前期预实验的基础上进一步缩小退火温度梯度试验范围,退火温度优化试验设定为 45、47、50 °C,试验表明(图 1)在现有体系下退火温度 47 °C 扩增出的目的基因条带明亮、特异性较高。

2.2 *Txp40* 基因与 pMD19-T 质粒连接转化和序列分析

利用细菌基因组凝胶回收试剂盒回收目的基因,根据蓝白斑筛选阳性克隆,通过菌落 PCR 扩增目的基因,克隆并转化 pMD19-*Txp40* 质粒到 DH5 α ,菌落 PCR 鉴定阳性克隆;实验表明挑取的菌落均为阳性,目的条带一致,特异性较高,阳性对照无扩增条带,多样品重复测序、比对分析表明,*Photorhabdus luminescens* (NLK-1) *Txp40* 基因全长 1 008 bp (335 个氨基酸)(图 2),基因已提交至 NCBI 并获得基因登录号:KY814642,与 3 个已知基因(图 3) *Photorhabdus luminescens* HI (DQ242623.1)、*Xenorhabdus bovienii* T363 (DQ242624.1)、*Photorhabdus luminescens* V16 (DQ242625.1)的长度一致,相似性达到 94%;进化分析表明 *Photorhabdus*

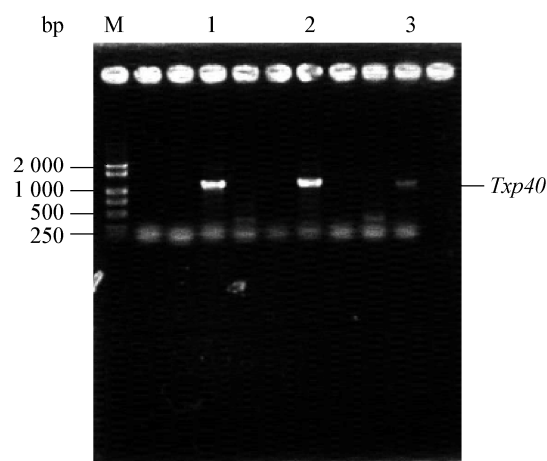


图 1 PCR 不同退火温度优化

Figure 1 The optimization of different annealing temperature

注: M: DNA Marker; 1、2、3 分别代表 45、47、50 °C 不同的退火温度。

Note: M: DNA Marker; 1, 2, 3: Different annealing temperature 45, 47 and 50 °C.

luminescens (NLK-1) *Txp40* 基因与这 3 个基因聚类在一个大支上,可信度达到 100%,其余斯氏线虫共生细菌相似基因聚类在另一大支上,这也表明 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) *Txp40* 基因保守性较高,但在不同属之间的碱基序列组成差异较大。

碱基组成分析表明(表 1),目前已知的嗜菌异小杆线虫共生细菌 *Txp40* 基因主要由腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)组成,两者总和超过 66%,序列比对显示其有近 6%的序列差异性,但不同比对基因在碱基组成及含量上比较接近,但相对于其他 3 个比对基因,NLK-1 的 *Txp40* 杀虫基因 G+C%含量稍高,有可能预示此基因双链稳定性更高。综合分析表明,*Txp40* 基因保守性较强,在不同地域不同菌系中的相似性较高,是一种广泛存在于昆虫病原线虫共生细菌中的一种编码小分子杀虫蛋白的基因。

2.3 *Txp40* 杀虫蛋白理化性质、二级结构预测及蛋白序列比对分析

Photorhabdus luminescens (NLK-1) *Txp40* 杀虫蛋白与相似性最高的假设蛋白对比分析(表 2)

1	ATGGTTATACAATTAACACCTGATAATAGAAGTGGATATCCACCCGTTGAAACGCAAATA
1	M V I Q L T P D N R S G Y P P V E T Q I
61	GCAGGAGATATAGTACGTTTACTAAACTTTAAGCAAACAGATGAGGTTTATACTGCATCA
21	A G D I V R L L N F K Q T D E G Y T A S
121	CATGGAATTGAATATCGAGCTAAGAAAATAATATTAGCGTACGCTTTAGCTGTAAGTGGT
41	H G I E Y R A K K I I L A Y A L A V S G
181	ATTCATGATGTATCTCATCTTCCTGGTGACTATTATAAGAATAAAGAGACTGCTGAGGTA
61	I H D V S H L P G D Y Y K N K E T A E V
241	ATTTATCAAGAATATATGTCTAATCTTTCATCTGCACTATTAGGTGAAAATGGTGATCAA
81	I Y Q E Y M S N L S S A L L G E N G D Q
301	ATTTCTAAAGATATGGCAGATGGTTTTTACAAGAATGAGCTGGATTTTGAAGGTAAATAT
101	I S K D M A D G F Y K N E L D F E G K Y
361	CCTCAAAACATTTGGAATATTCCTGATCTTGAAAATAAACCATTTGAGTGCTTATTCAGAT
121	P Q N I W N I P D L E N K P L S A Y S D
421	GACGATAAATTATTAGCACTATATTTTTTGTCTGCACAGGAAATCCACTGCAGGAAAAT
141	D D K L L A L Y F F A A Q E I P L E E N
481	CAACAATCAAATACCGCAAGATTTTTTAAATTAATTGATTTCTTATTTATCTTATCTGCT
161	Q Q S N T A R F F K L I D F L F I L S A
541	GTAACCTTCACTAGGAAGGAGAATTTTTTCAAAAACTTTTACAATGGGTTAGAGTCTAAA
181	V T S L G R R I F S K N F Y N G L E S K
601	TCATTAGAGAATTATTTAGAGAGAAAAAGCTCTCTAAACCTTTCTCGACCACCGCAG
201	S L E N Y I E R K K L S K P F F R P P Q
661	AAATTACCTGATGGCAGAATAGGTTACTTGGCCAGCCCAACAGAACCGCTAAATGGAGA
221	K L P D G R I G Y L A S P T E P P K W R
721	GTTAGTTTGAAGAACCTAAAAATAACAAATCCAGGAATGGATTACTAATATGGAAAGT
241	V S L Q E L K N N K S R N G F T N M E S
781	GCTGCAAAACAAAAGTATAGCTCATTATATAAAAGAGGTGCAAAAGGGGAACGATCCACTG
261	A A K Q K Y S S F I K E V Q K G N D P L
841	ACAGCAGCAAAAAGTATTGGTACAGCAAGCGGCAGTAACCTTGAAAACTGCCGAATAAT
281	T A A K S I G T A S G S N L E K L P N N
901	TTATATAGTGTGAGGCTAAGCCAAAAAGCAGGGTAACCTTCAATCTAAATAATACTGAC
301	L Y S V R L S Q K D R V T F N L N N T D
961	AGTACAATGACGATTCATAGTGTTGGAACCTATTATAAAAAATATATGA
321	S T M T I H S V G T H Y K N I *

图2 *Photobacterium luminescens* (NLK-1) Txp40 开放阅读框和氨基酸序列Figure 2 Open reading frame of *Photobacterium luminescens* (NLK-1) Txp40 gene and amino acid composition

发现, 两者分子量大小基本相当, *Photobacterium luminescens* (NLK-1) Txp40 杀虫蛋白 pI 8.37, 对比蛋白 pI 6.93, 差别较大, 稳定性也略高于对比蛋白。二级结构预测表明(表 3), 本研究中的目的基因所编码的蛋白主要由 α 螺旋、无规卷曲与延伸链组成, 分析对照假设蛋白其组成与本研究中的目的基因编码的蛋白有一定的差异, 但差异较小; 分析其跨膜区域略有不同, 由内而外两者预测结果有 3 个氨基酸的位移, 由外而内的预测跨膜区域完全一致; 通过二级结构预测也进一步说明本研究中的假设蛋白在结构上与已知假设蛋白相似

性较高, 功能域基本一致, 也说明了这类蛋白相对比较保守, 在不同光杆菌中普遍存在且相对保守, 变异较小。

Photobacterium luminescens (NLK-1) Txp40 基因翻译后的假设蛋白与其他光杆菌属共生菌的 Txp40 杀虫蛋白假设序列相似性达到 90%, 进化分析表明(图 4)其也聚类在嗜菌异小杆线虫的共生细菌 Txp40 杀虫蛋白的大支上, 可信度达到 99%, 与模式蛋白菌株 *Xenorhabdus nematophila* strain A24 40 kD 杀虫蛋白基因相似性在 85% 以上, 假设蛋白相似性在 76%。

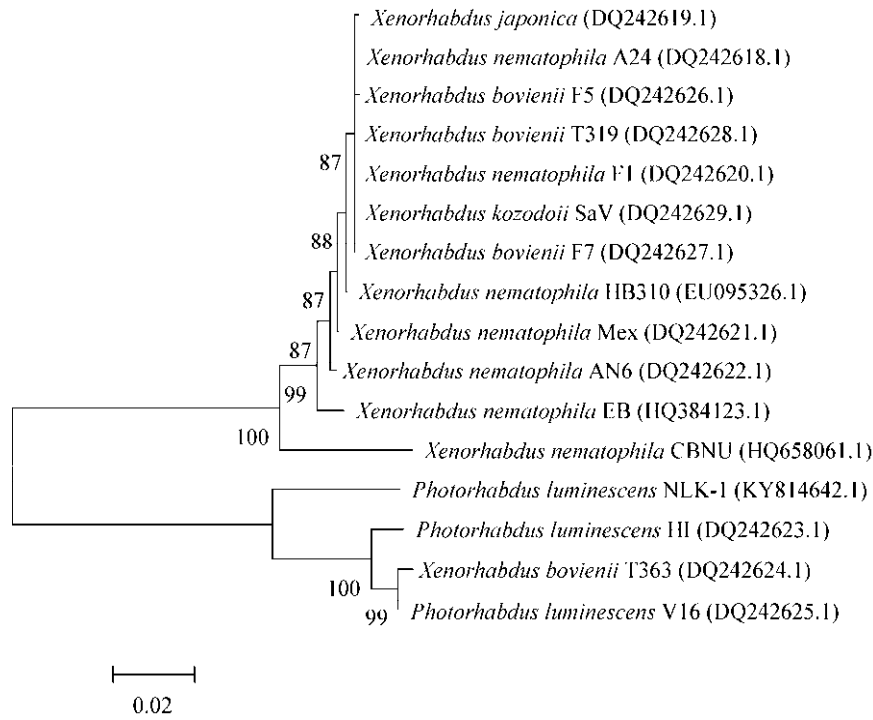


图 3 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) *Txp40* 基因与已知 *Txp40* 基因的进化关系
Figure 3 Neighbour-Joining (NJ) analysis of *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) *Txp40* toxin gene with other known *Txp40* genes
注：括号内为 *Txp40* 基因序列在 GenBank 中的登录号；分支点上的数值为 1 000 次 Bootstrap 分析所得值，仅显示大于 50% 的值；标尺 0.02 为进化距离。
Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the *Txp40* gene sequences of those reference strains; Bootstrap values >50% based on 1 000 replications are shown at branch nodes; Bar, 0.02 substitutions per nucleotide positions.

表 1 不同来源菌株 *Txp40* 基因碱基组成对比
Table 1 The contrast of bases composition of *Txp40* toxin genes from different strains (%)

Accession No.	Adenine	Thymine	Cytosine	Guanine
KY814642 (NLK-1)	37.2	28.97	15.28	18.55
DQ242623.1	37.3	28.97	14.68	19.05
DQ242624.1	37.3	29.07	14.58	19.05
DQ242625.1	37.3	29.17	14.48	19.05

表 2 蛋白基本参数比较
Table 2 The contrast of physical and chemical parameters of *Txp40* protein

Toxin	Accession No.	Full length	Molecular weight	Isoelectric point	Asp+ Glu	Arg+ Lys	Extinction coefficient (280 nm)	GRAVY	Instability index
NLK-1	KY814641	335	37.9	8.37	39	41	37 820	-0.576	39.10
PL	WP 046396429.1	335	38.0	6.93	43	43	36 330	-0.615	34.91

表 3 二级结构预测结果比较
Table 3 The contrast of secondary structure with *Photorhabdus luminescens* ATCC 29999

Toxin	Acession No.	Alpha helix (%)	Random coil (%)	Extended strand (%)	Transmembrane helices inside to outside helices	Transmembrane helices outside to inside helices
NLK-1	KY814641	35.71	54.46	9.52	47-65	168-189
PL	WP 046396429.1	36.01	53.57	10.12	50-68	168-189

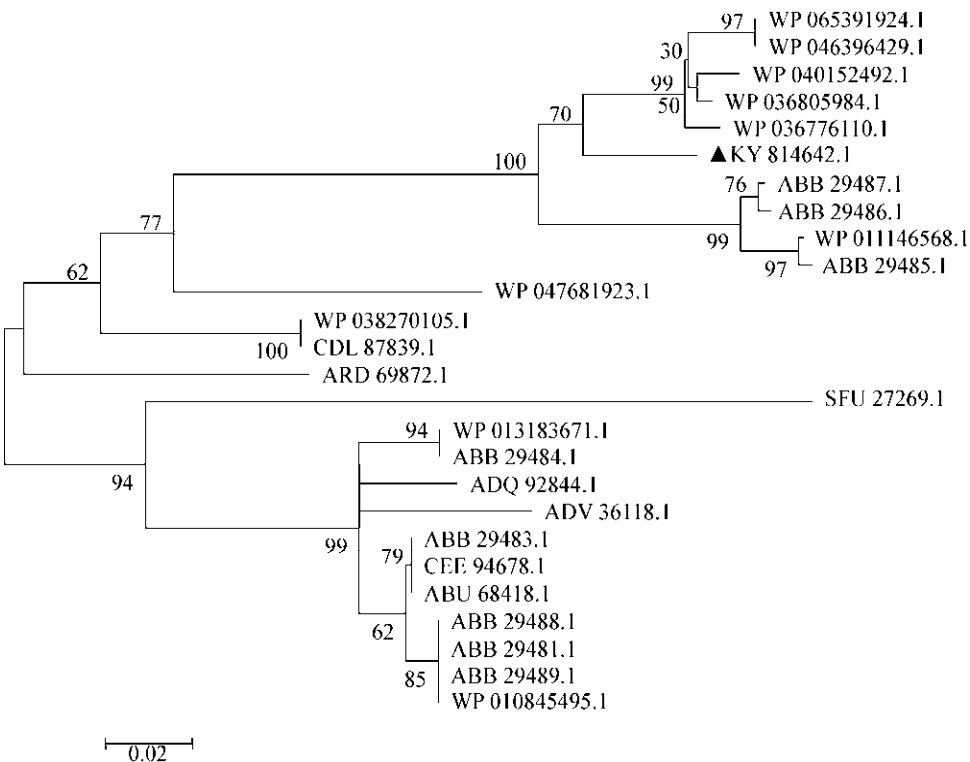


图 4 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 蛋白与假设蛋白序列比对分析
Figure 4 Neighbour-Joining (NJ) analysis of *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 prediction protein with other prediction protein from other different genes
注：每个分支为 Txp40 假设蛋白在 NCBI 的登录号；分支点上的数值为 1 000 次 Bootstrap 分析所得值，仅显示大于 50% 的值；标尺 0.02 为进化距离。
Note: Each branch is the accession number of the Txp40 hypothetical protein on the NCBI; Bootstrap values >50% based on 1 000 replications are shown at branch nodes; Bar, 0.02 substitutions per amino acid positions.

2.4 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 原核表达载体构建及初步诱导表达

将带有酶切位点的目的基因扩增回收，限制性内切酶分别双酶切目的基因与 pET28a 原核表达载体后，连接转化大肠杆菌 BL21，蓝白斑筛选、菌落 PCR 初步验证，经测序验证无突变和

连接正确后进行蛋白诱导表达，研究表明(图 5)成功诱导表达出目的蛋白，蛋白实际大小和理论推算与已有报道的相似蛋白基本一致，诱导表达的蛋白主要以包涵体形式存在，在 IPTG 0.5 mmol/L 情况下，20 °C 培养条件诱导产量比 37 °C 条件下高。

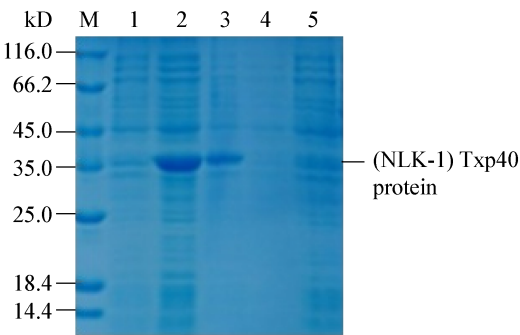


图 5 Txp40 毒蛋白诱导表达后 SDS-PAGE 电泳分析
Figure 5 The analysis of SDS-PAGE of Txp40 toxin protein after induction

注：M：蛋白 Marker；1：诱导前总蛋白；2：20℃ 上清；3：20℃ 沉淀；4：37℃ 上清；5：37℃ 沉淀。
Note: M: Protein Marker; 1: Total protein of pre-induced; 2: Supernatant under 20℃; 3: Precipitate under 20℃; 4: Supernatant under 37℃; 5: Precipitate under 37℃.

2.5 杀虫效果初步试验结果

通过饲喂试验初步发现，在整个试验周期对照组和实验组的所有大蜡螟幼虫均存活，在幼虫运动方面无明显差异，说明诱导表达的 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 蛋白对大蜡螟幼虫无明显胃毒活性；而血腔注射试验(表 4)表明，诱导表达处理后的上清液具有较高的血腔毒性，在 16 h 开始就有 20% 的测试大蜡螟幼虫死亡，虫体开始变黑变软(图 6 B)，到 24 h 致死率未发生显著变化，但个别大蜡螟幼虫出现行动迟缓、反应迟钝的特征，最终到 48 h 上清血腔注射测试毒性的幼虫全部死亡；而沉淀组测试幼虫到 24 h 后开始出现 10% 的死亡，到 48 h 时致死率为 65%，低于上清实验组；两个对照组，注射 PBS 和经 IPTG 诱导的 BL21(pET28a)

表 4 大蜡螟幼虫血腔毒性测试结果
Table 4 The result of hemocoel toxicity test to *Galleria mellonella* larva

Treats	Accumulation mortality (%)					
	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h	48 h
Supernatant	0	20	20	55	75	100
Precipitate	0	0	10	20	35	50
PBS	0	0	0	0	0	0
BL21(pET28a)	0	0	0	0	0	0

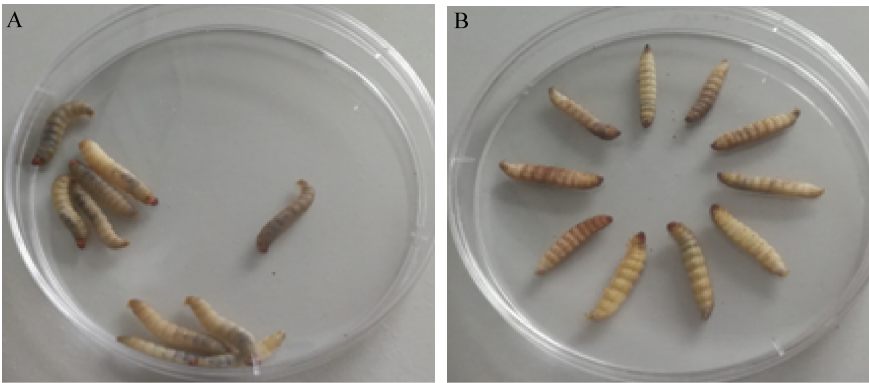


图 6 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 毒蛋白诱导表达后杀虫试验
Figure 6 The experiments of insecticidal activity of *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 toxin protein to *Galleria mellonella* larvae

注：A：血腔注射前；B：血腔注射后 48 h。
Note: A: Before hemocoele injection; B: After hemocoele injection at 48 h.

菌悬液的大蜡螟幼虫在实验周期内未见死亡, 行动正常; 试验充分表明克隆表达的 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 蛋白对大蜡螟幼虫具有较高的血腔毒性。

3 讨论与结论

研究表明由新疆本土分离的嗜菌异小杆线虫共生菌 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) 中的 Txp40 杀虫蛋白基因全长为 1 008 bp, 与 3 个已知基因 *Photorhabdus luminescens* HI (DQ242623.1)、*Xenorhabdus bovienii* T363 (DQ242624.1)、*Photorhabdus luminescens* V16 (DQ242625.1) 的长度一致, 相似性达到 94%, 与模式蛋白菌株 *Xenorhabdus nematophila* strain A24 40 kD 杀虫蛋白基因相似性在 85% 以上, 蛋白相似性在 76%。*Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 预测蛋白大小 37.9 kD, pI 8.37; 二级结构预测表明其主要由 α 螺旋 35.71%、无规卷曲 54.46%、延伸链 9.52% 组成, 跨膜区域与已知蛋白基本相近。SDS-PAGE 分析其在 38 kD 处有特异条带, 而且蛋白分子量与预测值基本一致, 表达相对单一且表达量较高。研究发现 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 基因与 *Xenorhabdus nematophila* strain A24 40 kD 杀虫蛋白基因相似性在 85% 以上, 蛋白相似性在 76%, 与 Brown 等^[10]研究结果 *Photorhabdus* sp. 基因相似性 83%、蛋白相似性 75% 基本接近, 这些细微的差别可能与研究材料属于完全不同的地理区系和生境有一定的关系。本研究还发现能够从一型和二型 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) 菌中都能扩增出目的基因, 说明目的基因不随着型变产生变化; 另外, Brown 等^[10]提到来自 5 个 *Photorhabdus* sp. 不同种之间的差异在 5 个氨基酸, 17 个 *Xenorhabdus* sp. 在氨基酸差异方面最多在 9 个, 而本研究中显示其氨基酸差异数在对比的 *Photorhabdus* sp. 中多达 19 个, 这也说明 Txp40 基因既保守又多样, 还需要更大范围的筛查和深入研究。

另外, 通过初步杀虫试验表明, 本研究中从

Photorhabdus luminescens (NLK-1) 克隆、诱导表达的 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 蛋白对大蜡螟幼虫具有较高的血腔毒性, 但由于本次试验未能将蛋白纯化后做杀虫效果测试, 因此在本次测试中还有较多背景蛋白的影响。另外, 由于受表达诱导稳定性的影响, 也只是在定性的层面初步分析了 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) Txp40 蛋白对大蜡螟幼虫的胃毒和血腔毒性, 未能定量与其他已知蛋白在同一条件下做出全面对比分析。因此, 纯化和回收高纯度表达蛋白, 定量分析其杀虫谱及杀虫效果是我们今后深入研究的重点工作之一。

目前, 在害虫防治方面植物转基因杀虫技术已经获得巨大成功, 但商业化运用的杀虫基因几乎全部来自 Bt (*Bacillus thuringiensis*, 苏云金芽孢杆菌) δ -内毒素, 由此产生的杀虫谱较窄和害虫抗性等问题已经逐步显现, 因此筛选新型抗虫基因的工作变得尤为重要。本研究从新疆本土获得的高毒力昆虫病原线虫共生细菌 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) 的新型单体 Txp40 杀虫基因及蛋白着手, 一方面可为转基因抗虫提供新的杀虫材料和杀虫基因选择, 光杆状菌属和致病杆菌属细菌的不同种或同种不同菌株可产生多种杀虫毒素蛋白, 既有多样性又具有一定的相似性, 已成为一类新的杀虫蛋白基因家族, 其编码的基因可能是能够与 Bt 晶体蛋白基因联合使用的有限候选基因之一, 对抗虫转基因植物的更新换代, 防止害虫对某种抗虫转基因植物产生耐受性, 成为害虫防治的新武器; 另一方面, 昆虫病原线虫共生细菌杀虫基因及其杀虫蛋白的开发利用, 将有效避免昆虫病原线虫在虫害生物防治中的效价不稳定、生产周期长、成本高、受环境因素影响较大等^[15-16]弊端, 从而有效延伸和扩大 *Photorhabdus luminescens* (NLK-1) 的应用范围和领域。

REFERENCES

- [1] Dillman AR, Chaston JM, Adams BJ, et al. An entomopathogenic nematode by any other name[J]. PLoS Pathogens, 2012, 8(3): e1002527

- [2] Forst S, Neilson K. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp.[J]. Microbiological Reviews, 1996, 60(1): 21-43
- [3] van Frankenhuyzen K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2009, 101(1): 1-16
- [4] Herbert EE, Goodrich-Blair H. Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2007, 5(8): 634-646
- [5] Akhurst RJ. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*[J]. Journal of General Microbiology, 1980, 121: 303-309
- [6] Ehlers RU. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56(5/6): 623-633
- [7] Ffrench-constant R, Waterfield N. An ABC guide to the bacterial toxin complexes[J]. Advances in Applied Microbiology, 2005, 58: 169-183
- [8] Ffrench-Constant RH, Dowling A, Waterfield NR. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture[J]. Toxicon, 2007, 49(4): 436-451
- [9] Yang J, Wang QY, Song P, et al. Purification and characterization of the haemocoel insecticide Tp40 from *Xenorhabdus nematophila*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(5): 677-683 (in Chinese)
杨君, 王勤英, 宋萍, 等. 嗜线虫致病杆菌血腔毒素 Tp40 的纯化和特性分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 677-683
- [10] Brown SE, Cao AT, Dobson P, et al. Txp40, a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(2): 1653-1662
- [11] Zhan FQ, Ouerna B, Hou M, et al. Preliminary identification of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis bacteriophora* strain nileke) and its symbiotic bacteria in Xinjiang[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2015, 52(2): 244-251 (in Chinese)
詹发强, 布卡·欧尔娜, 侯敏, 等. 新疆嗜菌异小杆线虫及其共生细菌的初步鉴定研究[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(2): 244-251
- [12] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning[M]. Huang PT, Wang JX, Zhu HC, Trans. Beijing: Science Press, 2002 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 汪嘉玺, 朱厚础, 译. 北京: 科学出版社, 2002
- [13] Combet C, Blanchet C, Geourjon C, et al. NPS@: Network protein sequence analysis[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2000, 25(3): 147-150
- [14] Yang J. Purification and pathogenetic mechanism of haemocoel insecticidal toxin from *Xenorhabdus nematophila*[D]. Baoding: Master's Thesis of Agricultural University of Hebei, 2008 (in Chinese)
杨君. 嗜线虫致病杆菌血腔毒素的纯化及其致病机理的研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2008
- [15] Kaya HK, Guagler R. Entomopathogenic nematodes[J]. Annual Reviews of Entomology, 1993, 38: 181-206
- [16] Liu J, Poinar GO, Berry RE. Control of insect pests with entomopathogenic nematodes: the impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction[J]. Annual Reviews of Entomology, 2000, 45: 287-306