

昆虫病原线虫共生菌 YL001 菌毛蛋白亚基基因的克隆与序列分析

冯纪年^a,李玉凤^a,王永宏^b,张 兴^b

(西北农林科技大学 a 植保资源与病虫害防治教育部重点实验室, b 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了准确克隆昆虫病原线虫共生菌 YL001 菌毛蛋白亚基基因,根据已报道的菌毛蛋白亚基序列设计引物,以昆虫病原线虫共生菌 YL001 的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,获得 1 条大约 500 bp 的特异性片断,将此片断克隆到 T-easy 载体上,获得了重组子 p GEM-PS YL001,序列测定和结构分析结果表明,PS YL001 阅读框全长 537 bp,编码 179 个氨基酸,预测分子量和等电点分别为 18.9 ku 和 6.94,GenBank 登录号为 DQ537944。与 GenBank (A Y140909)上公布的 *Xenorhabdus nematophilus* 菌毛蛋白亚基核苷酸序列的同源性为 99%,氨基酸序列的同源性为 98%。上述分析表明,菌毛蛋白亚基基因得到了成功克隆。

[关键词] 昆虫病原线虫共生菌;菌毛蛋白亚基;基因克隆;序列分析

[中图分类号] S476+.15;Q78

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)08-0143-03

Cloning and characterization analysis of Pilin Subunit gene from *Xenorhabdus nematophilus* YL001

FENG Ji-nian^a, LI Yu-feng^a, WANG Yong-hong^b, ZHANG Xing^b

(a Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, Ministry of Education, b Research and Development Center of Bio rational Pesticide, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to clone the gene of Pilin Subunit from *Xenorhabdus nematophilus* YL001 accurately, a pair of primers were designed based on the sequence of Pilin Subunit reported previously. A Specific band (about 500 bp in length) was amplified from DNA of *Xenorhabdus nematophilus* YL001. The segment was cloned into T-easy vector. Results of sequencing and structural analysis show that the length of PS YL001 is 537 bp, and 179 amino acids are encoded. The predicted MW and *pI* are 18.9 ku and 6.94. The accession number in GenBank is DQ537944. Comparison results show that this gene has 99% similarity to nucleotides level and 98% similarity to amino level according to A Y140909, which is Pilin Subunit gene from *Xenorhabdus nematophilus* in GenBank. The analysis indicates that the Pilin Subunit gene has been cloned successfully.

Key words: *Xenorhabdus nematophilus* YL001; Pilin Subunit; gene cloning; characterization analysis

昆虫病原线虫共生菌是寄生于昆虫病原线虫肠道内的一种细菌,革兰氏染色呈阴性,属肠杆菌科细菌^[1]。共生菌与线虫之间的关系可以概括为:线虫携带共生菌进入寄主昆虫体内,并释放到昆虫的血

腔中;共生菌在昆虫血腔内繁殖,产生杀虫活性极高的蛋白毒素,使昆虫患败血症,一般在 48 h 内死亡^[2-3]。由于这类杀虫毒素蛋白具有高效、杀虫谱广和杀虫迅速等诸多优点^[4-5],从共生菌中克隆杀虫毒

†收稿日期] 2006-07-13

[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目(2002BA516A04);西北农林科技大学研究生教育创新计划项目(05 YCH007)

[作者简介] 冯纪年(1957-),男,陕西白水人,教授,博士生导师,主要从事昆虫分类及分子生物学研究。

素基因用于转基因抗虫作物的开发,以延缓害虫对转 Bt 基因抗虫作物产生的抗性^[6],已成为当今的研究热点。

据 Khandelwal 等^[7]报道,昆虫病原线虫共生菌 *Xenorhabdus nematophilus* 中的菌毛蛋白亚基(Pilin Subunit)对棉铃虫具有口服毒性。YL001 是西北农林科技大学无公害农药研究中心分离得到的一株有较强杀虫活性的线虫致病杆菌属(*Xenorhabdus nematophilus*)细菌,本研究以此为材料对毒素蛋白基因进行了克隆,以期构建新型转基因工程菌和转基因植物提供基因材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 *Xenorhabdus nematophilus* YL001 由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。转化受体菌 *E. coli*. DH5 由西北农林科技大学植保资源与病虫害防治教育部重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶购于华美生物工程公司;克隆载体 p GEM-T Easy、PCR 相关试剂、限制性核酸内切酶、分子质量 Marker、Agarose Gel DNA Purification Kit 试剂盒等均购自上海生物工程公司;IPTG、X-Gal 和氨苄青霉素等均购自 Amersco 公司。

1.2 方法

1.2.1 共生菌基因组 DNA 的提取 将 -70 保存的共生菌涂布于 NBTA 平板^[8]上,28 培养 48 h,挑取一个初生型单菌落接种到 5 mL LB 培养基中,28 200 r/min 震荡培养至 A_{600} 约为 1.5,取 1.5 mL 至 EP 管,12 000 r/min 离心 2 min,去上清^[9],参照 Brunel 等^[10]的方法提取共生菌基因组 DNA。

1.2.2 引物的设计和合成 根据 GenBank 收录的序列号为 A Y140909 的基因序列,参考 Khandelwa 等^[7]的方法设计引物。其序列为:P1:5'-GCG GAT CCA TGA AAC TTA ACA CAA TTG GC-3';P2:5'-GCA AGC TTA AGG TAG TTG A GA GTG AAG TTG-3'。2 个引物分别含酶切位点 *Bam*H 和 *Hind* ,均由上海生物工程公司合成以用于 PSYL001 基因的克隆,预计扩增片段的大小为 537 bp。

1.2.3 PCR 扩增 扩增反应体系以共生菌总 DNA 为模板。取 DNA 模板 4 μ L,上下游引物(10 pmol/L)各 2 μ L,10 mmol/L dNTP Mix 1 μ L,

10 \times Reaction Buffer (Mg^{2+} free) 5 μ L,2.5 mmol/L Mg^{2+} 5 μ L,3 U/ μ L Polymerase 1 μ L,加 Nuclease-Free ddH₂O 至 50 μ L,混匀瞬间离心后进行热循环。扩增条件为:94 预变性 3 min;94 变性 1 min,52 退火 40 s,72 延伸 40 s,31 个循环;72 再延伸 15 min,于 4 保存。用 7 g/L 琼脂糖进行电泳分析,Bio Rad Ge IDoc2000 凝胶成像仪成像。扩增产物的回收纯化参照 TaKaRa 公司的 Agarose Gel DNA Purification Kit 试剂盒说明书进行。

1.2.4 基因的克隆、筛选与鉴定 按 p GEM-T Easy 克隆载体试剂盒的操作说明进行操作,用回收的 PCR 产物和 p GEM-T Easy 克隆载体连接,转化大肠杆菌 DH5 ,用含 IPTG、X-Gal 和氨苄青霉素的平板筛选克隆子,重组克隆用 *Bam*H、*Hind* 双酶切和单酶切,PCR 验证。质粒的提取、酶切、感受态细胞的制备及转化参考文献[11]的方法进行。

1.2.5 序列测定与分析 提取克隆子质粒,由上海博亚生物技术有限责任公司进行测序,基因序列用在线(www.ncbi.nlm.nih.gov)BLAST 软件、EBI(www.ebi.ac.uk)ClustalW 软件及 DNASIS 分析软件进行同源性比较分析。

2 结果与分析

2.1 菌毛蛋白亚基基因的克隆和鉴定

扩增产物经 7g/L 琼脂糖电泳检测,获得 1 条约 537 bp 的条带,与预计大小相符(图 1)。将扩增出的目的基因用 DNA 快速回收试剂盒回收,电泳检测纯度。将纯化的产物与 p GEM-T Easy 载体连接转化 DH5 感受态细胞,挑取白色菌落在含有 100 μ L/mL 氨苄青霉素的 LB 培养液中培养,提取质粒,对重组质粒 p GEM-PSYL001 进行双酶切鉴定,酶切鉴定结果(图 2)与 PCR 产物一致,初步分析所得重组质粒含有目的基因。由设计的引物扩增阳性克隆获得 1 条 537 bp 左右的片段,进一步认定插入的是目的基因。

2.2 核苷酸序列分析

重组质粒 p GEM-PSYL001 的序列测定表明,PSYL001 基因(含起始密码子和终止密码子)大小为 537 bp,由 DNA 序列推导的氨基酸为 179 个。经 DNASTAR 软件分析,预测其蛋白分子质量为 18.9 ku, $pI=6.94$ 。与已报道的该属菌毛蛋白亚基序列(A Y140909)相比,该核苷酸序列与其的同源性为 99%,仅 91 位(G A)、221 位(A G)、528 位(N C)3 个核苷酸发生了变异。二者理论氨基酸序列

的同源性为 98%, 仅有 31 位 (Thr Ala)、74 位 (Arg Lys) 2 个氨基酸的差别, 具体如图 3 所示(其

中 A :DQ537944 ;B :A Y140909)。该基因已在 Gne-Bank 中注册, 登录号为 DQ537944。

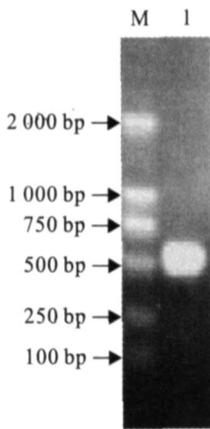


图 1 PS YL001 的 PCR 扩增产物
M. DNA 标准 DL2000; 1. PCR 产物
Fig. 1 PCR amplification of PS YL001
M. DNA Marker DL2000; 1. PCR product

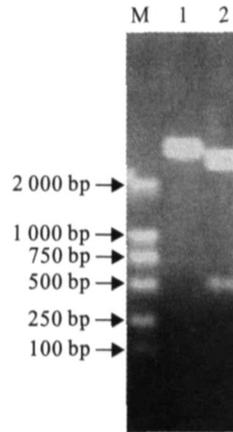


图 2 重组质粒 p GEM- PS YL000 的限制性内切酶鉴定
M. DNA 标准 DL2000; 1. 重组质粒 BamH I 酶切结果;
2. 重组质粒 BamH I / Hind III 酶切结果
Fig. 2 Restriction digestion of recombinant plasmid
p GEM- PS YL001
M. DNA Marker DL2000; 1. Recombinant plasmid cut by BamH I ;
2. Recombinant plasmid cut by BamH I / Hind III

A	MKLNTIGDGRFRWCGFNPGAANAAPTQGDG	VKFTGSIINAACSIKNNNIEVNMGQINNV	60
B	MKLNTIGDGRFRWCGFNPGAANAAPTQGDG	VKFTGSIINAACSIKNNNIEVNMGQINNV	60
A	VLKGGESKPEHFR	IELKDCVLDTLKGVKTMFTGPEAEGTMPGLLALDGGAAQGAIMITN	120
B	VLKGGESKPEHFK	IELKDCVLDTLKGVKTMFTGPEAEGTMPGLLALDGGAAQGAIMITN	120
A	HGNKHIPLGQASDMMTLHDGSKDLNFSARLKGLKGTEGKDISVKTGEFTAIANFTLNYL		179
B	HGNKHIPLGQASDMMTLHDGSKDLNFSARLKGLKGTEGKDISVKTGEFTAIANFTLNYL		179

图 3 氨基酸序列的比对结果

Fig. 3 Contrast result of amino acid sequence

3 讨 论

为保证 SP YL001 基因正确克隆入 p GEM- T Easy 载体, 试验中引物设计时除了引入合适酶切位点外, 还设计了保护碱基并且注意使目的基因处于正确的阅读框架(ORF)内, 为下一步进行表达打下了基础。

本研究首次在国内从陕西杨陵筛选的昆虫病原线虫分离鉴定的 *Xenorhabdus nematophilus* YL001 中克隆出了菌毛蛋白亚基 PS YL001, 从测序结果看, 其与已报道的 GenBank 登陆号为 Y140909 基因的同源性为 99%, 推导理论氨基酸与其同源性为

98%。A Y140909 基因所表达的亚基已被证明对棉铃虫具有口服毒性^[7]。PS YL001 基因的克隆及在 GenBank 中的注册登陆, 为构建新型转基因工程菌和转基因植物提供了基因材料。关于其杀虫毒性将是下一步研究的重点。

[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]. Internation Journal Systematic Bacteriology, 1979, 29: 352-360.

[2] 王立霞, 杨秀芬, 简 恒, 等. 昆虫病原线虫共生细菌的代谢产物[J]. 微生物学报, 2001, 41(6): 753-756.

(下转第 150 页)

土壤贫瘠和肥力水平低的主要根源。

3 结 论

由本研究结果可知,黄土高原南部旱作农地土壤有机碳和氮主要分布在 $< 50 \mu\text{m}$ 的粘粒和粉粒中,分别占土壤有机碳、氮总量的 97.07% 和 85.25%;不同颗粒级中有机碳、氮含量和有机 C/N 均以粘粒最高、粉粒次之、砂粒最小。随农地土壤侵蚀量的增加,土壤和土壤各粒级中有机碳、氮含量均呈减小趋势;而随着土壤侵蚀强度的增加,土壤粘粒中有机 C/N 逐渐增加,砂粒中有机 C/N 逐渐减小。不同粒级中有机碳、氮含量与坡地多年平均产沙量间存在显著和极显著相关性。由于黄土颗粒组成以粘粒和粉粒为主,且自身对养分的固持能力强,在暴雨产沙过程中,大量携带养分的细小颗粒流失,成为导致该区土壤肥力水平低的根源。

[参考文献]

- [1] 刘秉正,吴发启.土壤侵蚀原理[M].陕西:陕西人民出版社,1997:1-3.
- [2] 彭琳.土壤养分坡面流失与侵蚀环境调控[M]//中国科学院水土保持研究所编.土壤侵蚀环境调控与农业持续发展.西安:陕西人民出版社,1995:33-34.
- [3] 白红英,唐克丽,陈文亮,等.坡地土壤侵蚀与养分流失过程[J].水土保持通报,1991,11(3):56-63.
- [4] 刘秉正,李光录,吴发启,等.黄土高原南部土壤养分流失规律[J].水土保持学报,1995,9(2):77-86.
- [5] 蔡崇法,丁树文,张光远,等.三峡库区紫色土坡地养分状况及养分流失[J].地理研究,1996,15(3):77-84.
- [6] 黄丽,丁树文,董舟,等.三峡库区紫色土养分流失的试验研究[J].土壤侵蚀与水土保持学报,1998,4(1):8-13.
- [7] 王洪杰,李宪文,史学正,等.不同土地利用方式下土壤养分的分布及其与土壤颗粒组成的关系[J].水土保持学报,2003,17(2):44-50.
- [8] 傅涛,倪九派,魏朝富,等.不同雨强和坡度条件下紫色土养分流失规律研究[J].植物营养与肥料学报,2003,9(1):71-74.
- [9] 王洪杰,李宪文,史学正,等.四川紫色土区小流域土壤养分流失初步研究[J].土壤通报,2002,33(6):441-444.
- [10] Christensen B T. Carbon and nitrogen in particle size fraction isolated from Danish arable soils by ultrasonic dispersion and gravity-sedimentation [J]. Acta Agriculture Scandinavica, 1985,35:175-187.
- [11] Cameron R S, Posner A M. Mineralizable organic nitrogen in soil fractionated according to particle size[J]. Journal of Soil Science, 1979,30:565-577.
- [12] Tissen H, Stewart J W B. Particle-size fractions and their use in studies of soil organic matter. . Cultivation effects on organic matter composition in size fraction[J]. Soil Science Society of America Journal, 1983,47:509-514.
- [13] 王岩,扬振明,沈其荣.土壤不同粒级中 C、N、P、K 的分配及 N 的有效性研究[J].土壤学报,2000,37(1):85-93.
- [14] 李西开.土壤农业化学常规分析方法[M].北京:科学出版社,1987.
- [3] 崔龙,邱礼鸿,庞义,等.昆虫病原线虫共生菌杀虫毒素研究进展[J].微生物学报,2004,44(2):262-164.
- [4] Bowen D J, Rocheleau T A, Blackburn M, et al. Novel insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens* [J]. Science, 1998,6:2129-2132.
- [5] Bowen D J, Ensign J C. Purification and characterization of a highmolecular weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* [J]. Appl Environ Microbiol, 1998,64:3029-3035.
- [6] McCaughey W H, Gould F, Gelernter W. Bt resistance management[J]. Nat Biotechnol, 1998,16:144-146.
- [7] Khandelwal P, Choudhury D, Birah A, et al. Insecticidal Pilin Subunit from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila* [J]. Bacteriol, 2004,186(19):6465-6476.
- [8] Akhurst R J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic *Nematophilus* and *Heterorhabditis* [J]. J of General Microbiology, 1980,121:303-309.
- [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[J]. 中山大学学报:自然科学版,2003,42(3):47-50.
- [10] Brunel B, Gvaudan A, Lanois A, et al. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997,63:574-580.
- [11] 洒姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁,黎孟枫,译.北京:科技出版社,1998.

(上接第 145 页)