

## 嗜线虫致病杆菌 CB6 菌株胞内外杀虫蛋白的纯化及比较研究

杨保军<sup>1,2</sup>, 杨怀文<sup>1</sup>, 杨秀芬<sup>1</sup>, 刘 峥<sup>1</sup>, 邱德文<sup>1</sup>, 袁京京<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100081; <sup>2</sup>中国水稻研究所, 杭州 310006)

**摘要:** 【目的】分离和纯化嗜线虫致病杆菌北京变种 (*Xenorhabdus nematophila* var. *pekingensis*) CB6 菌株胞内和胞外杀虫蛋白, 鉴定其蛋白种类。为进一步利用此类杀虫蛋白奠定基础。【方法】采用硫酸铵沉淀、DEAE Sepharose FF 离子交换柱层析、Butyl Sepharose FF 疏水柱层析和 Sephacryl S-200 HR 凝胶过滤对该类蛋白进行分离和纯化, 采用 Native-PAGE 和 SDS-PAGE 技术对所纯化蛋白进行组分分析。【结果】获得电泳纯的胞内杀虫蛋白 E1 和胞外杀虫蛋白 E2。以  $2.58 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  含量 E1、以  $4.21 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  含量 E2 喂饲棉铃虫初孵幼虫, 对幼虫的生长抑制率分别达 62.63% 和 97.9%。E1、E2 经相同纯化参数处理获得的洗脱图相似, 经 native-PAGE 和 SDS-PAGE 呈现出相似的单带电泳图谱。SDS-PAGE 测得 E1、E2 表观分子量大于 212 kD, 该杀虫蛋白在 60℃ 仍表现出较强的活性。电泳染色结果表明该类蛋白非糖蛋白也非酯蛋白。【结论】CB6 菌株胞内杀虫蛋白 E1 和胞外杀虫蛋白 E2 可能是同一种 (类) 蛋白。

**关键词:** 嗜线虫致病杆菌; 胞外杀虫蛋白; 胞内杀虫蛋白; 纯化; 比较

## Purification and Comparison of Toxicity Proteins in Extracellular and Intracellular Products by *Xenorhabdus nematophila* var. *pekingensis*

YANG Bao-jun<sup>1,2</sup>, YANG Huai-wen<sup>1</sup>, YANG Xiu-fen<sup>1</sup>, LIU Zheng<sup>1</sup>, QIU De-wen<sup>1</sup>, YUAN Jing-jing<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; <sup>2</sup>China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006)

**Abstract:** 【Objective】Toxic proteins in extracellular and intracellular products produced by the strain CB6 of *Xenorhabdus nematophila* var. *pekingensis* were purified and compared in order to obtain the basic data of toxic proteins for further study. 【Method】Toxic protein fractions from extracellular and intracellular products were purified using the technology of ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sepharose FF chromatography, Butyl Sepharose FF chromatography, and Sephacryl S-200 HR chromatography. The protein components were analyzed with the technique of native-polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE) and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). 【Result】Two toxicity protein fractions E1 and E2, respectively, from extracellular and intracellular products were purified to electrophoretic homogeneity. The growth inhibitory percentages against *Helicoverpa armigera* Hübner larvae was 62.63% and 97.90% with the concentrations of  $2.58 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  E1 and  $4.21 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  E2, respectively. A series of similar liquid chromatograms of E1 and E2 was gained through same purification procedures and parameters. Moreover, they had a similar migration location whether by native-PAGE or by SDS-PAGE. With SDS-PAGE. E1 and E2 have approximate molecular masses higher than 212 kD. They still maintained inhibitory toxicity after heated up to 60℃. Staining experiments showed that the toxicity protein was neither lipoprotein nor glycoprotein. 【Conclusion】This demonstrated the possibility that the target protein from extracellular section was the same as that from intracellular one.

**Key words:** *Xenorhabdus nematophila* var. *pekingensis*, Extracellular protein, Intracellular protein, Purification; Comparison

收稿日期: 2006-07-20; 接受日期: 2006-11-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070519)

作者简介: 杨保军 (1974-), 男, 陕西韩城人, 硕士, 研究方向为杀虫微生物利用研究。E-mail: ybjhz@yahoo.com.cn。通讯作者杨怀文 (1944-), 女, 湖南浏阳人, 研究员, 研究方向为害虫生物防治。Tel: 010-68919959; E-mail: huaiweny@263.net

## 0 引言

【研究意义】昆虫病原线虫共生菌致病杆菌 (*Xenorhabdus*) 是一类兼性厌氧、化能异氧的革兰氏阴性细菌, 该菌寄生于斯氏线虫 (*Steinernema*) 肠道内, 与线虫互惠共生, 属肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) [1]。研究发现, 该类细菌产生的代谢产物不仅能抑制多种细菌和真菌的生长[2], 还具有杀虫活性[3-6]和抑制肿瘤细胞生长的活性[7,8]。因此从该类特异生境细菌中寻找具有新活性、新功能的研究已成为国内外科学家关注的热点[9]。【前人研究进展】嗜线虫致病杆菌 CB6 菌株是本研究室从北京郊区土壤中分离的一小卷蛾斯氏线虫 (*Steinernema carpocapsae*) 品系肠道内所分离到的共生细菌, 经鉴定并定名为嗜线虫致病杆菌北京变种 (*Xenorhabdus nematophila* var. *pekingensis*) [10]。研究表明该菌株的代谢物不仅对多种疫霉有强烈的抑制作用[11-13], 而且对棉铃虫、小菜蛾、甜菜夜蛾等昆虫表现出强烈的抑制生长、致死等毒性[14,15], 并发现从发酵液获得的胞内和胞外产物均含有该类杀虫物质, 该类物质经热处理和酶解均失去活性, 说明其活性因子属蛋白类物质[16]。【本研究切入点】为了进一步利用这一本土细菌资源, 本研究以 CB6 菌株作为研究材料, 分离和纯化其胞内胞外的杀虫活性蛋白, 比较其理化性质。【拟解决的关键问题】本研究结合了多种层析方法对活性蛋白进行分离和纯化, 为研究 CB6 菌株杀虫蛋白的产生途径和进一步应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基 嗜线虫致病杆菌北京变种 (*Xenorhabdus nematophila* var. *pekingensis*) CB6 菌株由本研究室分离, 采用石蜡油封藏法室温保存。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, H<sub>2</sub>O 1 000 ml; A6 液体培养基: 胰蛋白胨 15 g, 蔗糖 10 g, NaCl 5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, H<sub>2</sub>O 1 000 ml, pH 7.2。

1.1.2 供试昆虫 棉铃虫 (*Helicoverpa armigera* Hübner) 初孵幼虫, 敏感品系, 由中国农业科学院植物

保护研究所棉虫组饲养提供。

1.1.3 主要试剂和仪器 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺均购自 Sigma 公司; 高分子量活性电泳标准蛋白(67~669 kD)、高分子量变性电泳标准蛋白(53~212 kD)、Sephacrose DEAE FF 柱材料、Columns C10 柱购自 Pharmacia 公司; 其它试剂均为国产分析纯。Hitrap DEAE FF 1 ml、HiPrep Desalted 5 ml、Hitrap Butyl FF (high sub) 1 ml、HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution 均为 Amersham 公司预装柱; 电泳仪 (PROTEANII), Bio-Rad 公司; 紫外分光光度计 (UV-2550), Shimadzu 公司; 细胞破碎仪 (VCX500), Sonics 公司; 超滤管 (Amicon Ultra-15 10K), Millipore 公司; 蛋白质纯化系统 (ÄKTA explore 10), Amersham 公司。

### 1.2 菌株的培养条件

将 CB6 菌株划线接种于 NBTA 平板, 28℃ 培养 48 h, 然后挑取 I 型单菌落接种于盛有 25 ml A6 液体培养基的 100 ml 三角瓶中, 28℃、190 r/min 振荡培养 18 h, 之后取 5 ml 种子接种于盛有 120 ml 相同培养基的 500 ml 三角瓶中, 相同条件下培养 30 h。

### 1.3 胞内和胞外蛋白的提取

发酵液以 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为胞外提取液 A1; 离心后沉淀菌体加入同体积 PBS 缓冲液, 于振荡器上轻轻重悬菌体细胞, 再离心, 弃上清液, 加同体积 PBS, 重复 3 次, 最后加入同体积 PBS, 重悬细胞, 冰浴下用超声波碎菌体细胞 (振幅 30%, 破碎 6 s, 间隔 6 s, 破碎 10 min), 然后以 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液即为胞内提取液 A2。

### 1.4 蛋白的浓度和生物活性测定

1.4.1 蛋白浓度测定 按 Bradford 法[17]测定, 以牛血清白蛋白为 (BSA) 标准, 做标准曲线。

1.4.2 生物活性测定 将 1 ml 样品与 10 g 人工饲料充分混合, 等份分装入 24 孔养虫盘, 每孔接入棉铃虫初孵幼虫 1 头, 设重复 2 次, 每处理 48 头试虫, 并设溶剂对照 (缓冲液与人工饲料混合) 和空白对照。处理试虫于光温湿自控培养箱 (26±0.5℃, L:D=14:10, Rh: 60±1%) 中饲养。5 d 后计活虫数及活虫体重, 计算幼虫生长相对抑制率。

$$\text{幼虫生长相对抑制率} (\%) = \frac{\text{对照平均单头体重} - \text{处理平均单头体重}}{\text{对照平均单头体重}} \times 100$$

### 1.5 蛋白的纯化

1.5.1 硫酸铵分段沉淀 冰浴下对胞外蛋白粗提液 A1 和胞内蛋白粗提液 A2 分别进行硫酸铵分段沉淀,

盐析饱和度范围为 0~20、20~35、35~50、50~65、65~80 和 80~100, 操作步骤参考文献[18]。所制取各沉淀物用 2 ml PBS 溶解, 然后过 HiPrep 26/10

Desalting 预装柱脱盐,洗脱缓冲液 pH7.4、25 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl。收集各蛋白峰组分,生物测定以确定沉淀活性蛋白的最适硫酸铵饱和范围。

1.5.2 Sepharose DEAE FF 离子交换柱层析 将上述确定的最适硫酸铵饱和范围制取的胞外和胞内活性组分 B1、B2 用 Sepharose DEAE 柱进一步分离。所用层析柱由 7 ml Columns C10 人工自添,柱材料为 Sepharose DEAE FF,预先平衡。洗脱低盐缓冲液 pH7.4、25 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl,高盐用 3 mol·L<sup>-1</sup> NaCl,35CV 阶段洗脱。收集各洗脱峰蛋白组分并进行生物测定。

1.5.3 Butyl FF 疏水柱层析 离子交换层析所获胞外胞内活性组分 C1 和 C2 浓缩后过预装柱 Hitrap Butyl FF 1 ml。高盐缓冲液: pH7.4、25 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl、3 mol·L<sup>-1</sup> NaCl、1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA-Na<sub>2</sub>、2 mmol·L<sup>-1</sup> DTT; 低盐缓冲液: pH7.4、25 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl、1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA-Na<sub>2</sub>、2 mmol·L<sup>-1</sup> DTT。预先用预装柱 Hiprep Desalted 5 ml 将 C1、C2 缓冲体系交换为高盐缓冲液。然后以 1 ml 上样量、1 ml·min<sup>-1</sup> 流速,0~100% 低盐梯度洗脱 20CV。收集洗脱峰组分,脱盐后生物测定。

1.5.4 Sephacryl S-200 HR 凝胶层析 疏水层析所得胞外胞内活性组分 D1、D2 浓缩后以 pH 7.4、25 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 洗脱缓冲液过分子筛预装柱 HiPrep 16/60 Sephacryl S-200。收集洗脱峰组分浓缩后生物测定。

## 1.6 蛋白的 native-PAGE 和 SDS-PAGE 分析

具体步骤参照郭尧君方法<sup>[19]</sup>。native-PAGE 采用 5% 垂直板连续胶凝胶电泳,SDS-PAGE 采用 10% 垂直板连续胶凝胶电泳。

## 1.7 蛋白的热稳定性

纯化的蛋白组分,分别在 25、40、60、80、100 °C 下水浴处理 30 min 后进行生物测定。

## 1.8 蛋白的鉴定

1.8.1 糖蛋白的鉴定 将组分 E1、E2 的 native-PAGE 电泳凝胶用 1% 高碘酸(含 3% 乙酸)室温浸泡 1 h,氧化后再用重蒸水浸泡 1 h,用 Schiff 试剂染色 1 h,将凝胶转移入 1% 亚硫酸钠水溶液中,直至凝胶背景褪为无色为止。Schiff 试剂配制:1 g 碱性品红溶于 200 ml 热重蒸水中,加入 20 ml 1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 和 1.7 g 焦亚硫酸钠,室温下暗处放置 48 h 呈无色溶液,放入棕色瓶 4 °C 下保存,染色前现配,两天内使用。

1.8.2 酯蛋白的鉴定 将组分 E1、E2 的 native-PAGE 电泳凝胶用 5.5 g·L<sup>-1</sup> 苏丹黑 B 加 7.5% 乙酸和加 70% 乙醇染色 24 h,然后用 70% 乙醇浸泡脱色,最后放在 7.5% 乙酸中水化。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白的纯化

各蛋白样品均以 pH7.4、25 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 为缓冲液,生测结果表明,Tris 溶剂对幼虫生长具有一定抑制作用,但其效应均小于 8%。从 CB6 菌株发酵液中所提取的胞内和胞外蛋白提取液 A1 和 A2,经 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 分段盐析,所得各组分生测结果显示(图 1),胞外和胞内均以 35%~50% 饱和度的硫酸铵沉淀组分 B1 和 B2 对棉铃虫初孵幼虫的毒性最强。

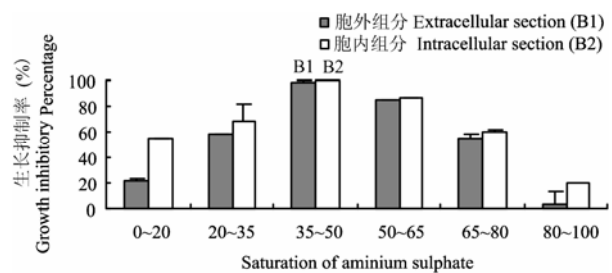


图 1 硫酸铵分段盐析各组分对棉铃虫幼虫的生长抑制作用  
Fig. 1 Growth inhibitory to *H. armigera* of the sections from different saturation of ammonium sulphate

B1 和 B2 过 Sepharose-DEAE FF 离子交换柱层析后的洗脱图如图 2。所收集各蛋白峰生测结果表明,以胞外 C1 和胞内 C2 的毒性最强。

采用疏水层析预装柱 Hitrap Butyl FF (high sub) 分离 C1、C2 的洗脱结果如图 3,收集的蛋白峰进行生物测定,结果表明组分胞外 D1 和胞内 D2 有活性。

疏水层析所得活性组分 D1 和 D2 经分子筛 Sephacryl S-200 High Resolution 后的洗脱图如图 4,所出现蛋白峰组分胞内 E1 和胞外 E2 均有活性。

所纯化的胞外胞内活分蛋白组分 E1、E2 经 SDS-PAGE 检测均显示单条蛋白带(图 6),表明达到电泳纯。从纯化总表可见(表 1、2),E1 以 2.58 μg·ml<sup>-1</sup> 浓度产生 (62.63 ± 19.2185) % 的抑制毒性,E2 以 4.21 μg·ml<sup>-1</sup> 浓度产生 (97.90 ± 0.1569) % 的抑制毒性,而单位剂量对棉铃虫初孵幼虫的生长相对抑制毒性,E1、E2 的分别达 (37.28 ± 11.4396) %、(23.25 ± 0.0373) %,说明它们活性相近。E1 和 E2 经 native-PAGE 检测均只出现位置相同的、分子量大于 669 kD 单一带(图 5),经 SDS-PAGE 检测也只出现位置相同的、分子量大于 212 kD 单一带(图 6),这表明 E1 和 E2 分子量相近。综合分析,E1 和 E2 可能是同一蛋白。

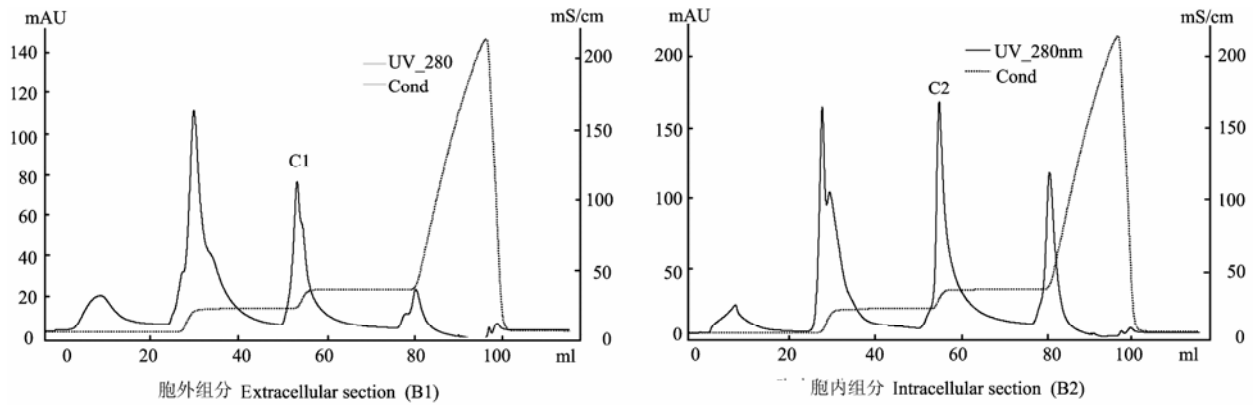


图 2 离子交换层析洗脱图

Fig. 2 The chromatography of IEX

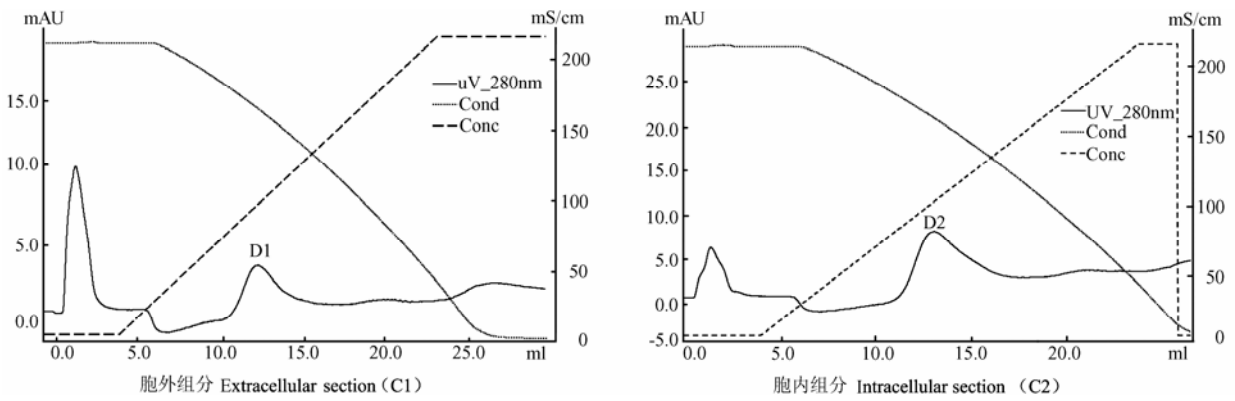


图 3 疏水层析洗脱图

Fig. 3 Hydrophobic chromatography

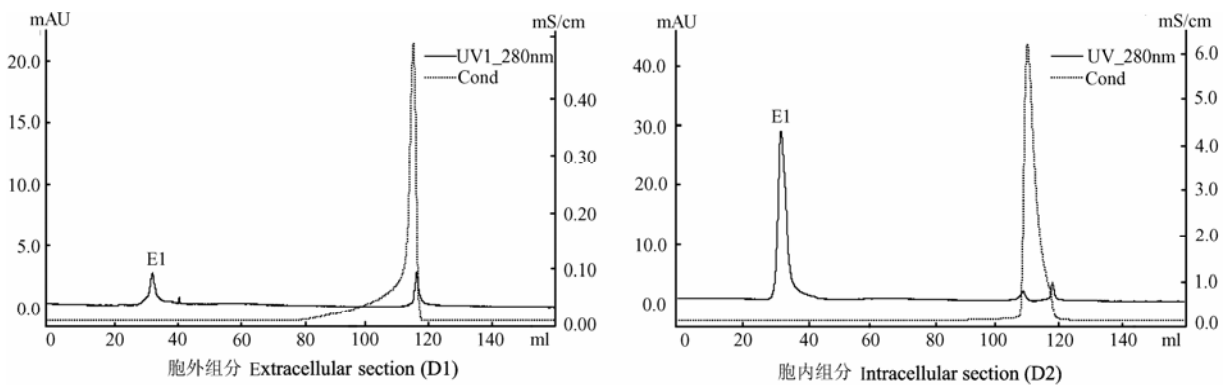


图 4 凝胶层析结果图

Fig. 4 Gel filtration

表 1 胞外毒性蛋白的纯化总表

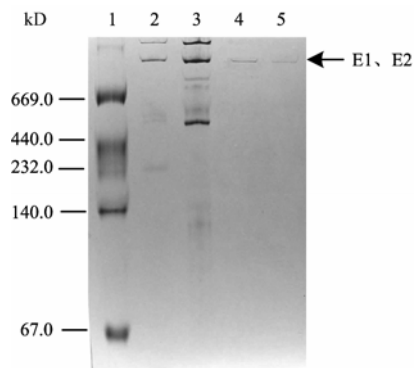
Table 1 A summary of extracellular toxicity protein purification

纯化步骤	浓度	生长相对抑制率	每微克毒蛋白的生长相对抑制率
Purification steps	Concentration( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Growth inhibitory percentage(%)	Growth inhibitory percentage per $\mu\text{g}$ toxicity protein(%)
胞外粗蛋白			
Extracellular crude protein (A1)	469.66	88.65 $\pm$ 2.6903	0.19 $\pm$ 0.0057
硫酸铵分段盐析			
Ammonium sulfate precipitation (B1)	84.70	95.32 $\pm$ 0.9977	1.13 $\pm$ 0.0118
离子交换层析			
DEAE-Sepharose (C1)	18.71	92.83 $\pm$ 1.3900	4.96 $\pm$ 0.0743
疏水层析			
Butyl sepharose fast flow (D1)	4.82	97.74 $\pm$ 0.1255	20.28 $\pm$ 0.0260
凝胶层析			
Sephacryl S-200 HR (E1)	2.58	62.63 $\pm$ 19.2185	37.28 $\pm$ 11.4396

表 2 胞内毒性蛋白的纯化总表

Table 2 A summary of intracellular toxicity protein purification

纯化步骤	浓度	生长相对抑制率	每微克毒蛋白的生长相对抑制率
Purification steps	Concentration( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Growth inhibitory percentage(%)	Growth inhibitory percentage per $\mu\text{g}$ toxicity protein(%)
胞内粗蛋白			
Intracellular crude protein(A2)	724.07	97.57 $\pm$ 0.5479	0.13 $\pm$ 0.0008
硫酸铵分段盐析			
Ammonium sulfate precipitation (B2)	169.43	99.01 $\pm$ 0.0989	0.58 $\pm$ 0.0006
离子交换层析			
DEAE-Sepharose (C2)	24.34	99.07 $\pm$ 0.0847	4.07 $\pm$ 0.0035
疏水层析			
Butyl sepharose fast flow (D2)	7.84	98.97 $\pm$ 0.3282	12.62 $\pm$ 0.0419
凝胶层析			
Sephacryl S-200 HR (E2)	4.21	97.90 $\pm$ 0.1569	23.25 $\pm$ 0.0373



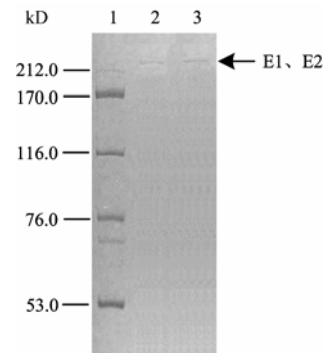
1. 分子量标准; 2. 胞外粗蛋白; 3. 胞内粗蛋白; 4. 胞外纯化蛋白; 5. 胞内纯化蛋白  
1. Molecular weight markers; 2. Crude EP; 3. Crude IP; 4. Purified EP (E1); 5. Purified IP (E2)

图 5 纯化后的毒性蛋白 native-PAGE 图谱

Fig. 5 SDS-PAGE pattern of purified EP, IP

## 2.2 蛋白热稳定性

生测结果表明, 纯化的蛋白组分 E1 和 E2, 分别在 25、40、60 $^{\circ}\text{C}$  处理 30 分钟后仍表现较强的活性,



1. 分子量标准; 2. 胞外纯化蛋白; 3. 胞内纯化蛋白  
1. Molecular weight markers; 2. Purified EP (E1); 3. Purified IP (E2)

图 6 纯化后的毒性蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 6 Native-PAGE pattern of purified EP, IP

而以 80 $^{\circ}\text{C}$  和 100 $^{\circ}\text{C}$  处理 30 分钟后均失活, 说明该蛋白能够耐低温, 但不耐高温。

## 2.3 蛋白鉴定

E1 和 E2 经 native-PAGE 电泳后用不同染色方法结果表明 (图 7), 考马斯亮蓝 R250 法 (I) 显色,

而 Schiff 试剂 (II) 和苏丹黑 (III) 染色未呈现特异性颜色, 说明该蛋白既不是糖蛋白也不是脂蛋白。

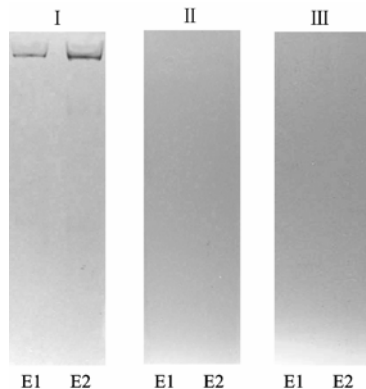


图 7 E1、E2 的 PAGE 用 R250 (I)、Schiff 试剂 (II) 和苏丹黑 (III) 染色图谱

Fig. 7 PAGE of purified E1, E2 stained with Coomassie blue (I), Schiff (II) and Sudan black B (III)

### 3 讨论

前人的研究指出昆虫病原线虫共生菌致病杆菌所产生的杀虫物质主要包括脂多糖、胞内、胞外酶、小分子蛋白等, 其中蛋白类物质是其主效因子, 胞内胞外均有发现。近年来已有研究胞内和胞外蛋白的来源关系的报道。Khandelwal P. 通过透射电子显微镜观察到 *X.nemotophila* 菌体细胞表面分布有小囊泡, 这些外膜囊泡可从菌株的培养物上清液中得到。生测表明外膜囊泡及从其内提取的可溶性蛋白对棉铃虫 (*H. armigera*) 初孵幼虫均有致死活性<sup>[20]</sup>。Dongjin Ji 从 *X. nematophila* ATCC 19061 菌株分离到一种有毒性的 17kD 抗菌肽, 该肽可以在细胞表面表达, 并分泌到胞外培养基中, 该过程也与外膜囊泡有关<sup>[21]</sup>。本研究从 CB6 菌株发酵液分别分离和纯化了胞内和胞外的杀虫蛋白, 获得电泳纯的胞内杀虫蛋白 E1 和胞外杀虫蛋白 E2。E1、E2 经相同纯化参数得到的洗脱图相似, 而且经 native-PAGE 和 SDS-PAGE 测定, 呈现出相似的单带电泳图谱, 表明二者可能是同一种 (类) 蛋白。组分 E1、E2 是否也与囊泡活动有关, 尚需研究。

昆虫病原线虫共生细菌产生的杀虫毒素蛋白是一类新的杀虫物质, 这为开发新的杀虫剂, 或对杀虫蛋白的基因进行克隆, 从而将为转杀虫基因植物提供了新的基因材料。但本领域多个研究表明获得的昆虫病原线虫共生细菌杀虫蛋白多为高分子量蛋白<sup>[22]</sup>。

Morgan 等研究了 *X. nemotophila* PMF1296 菌株的杀虫蛋白基因的克隆与表达, 发现的基因簇由 *xptA1*、*xptB1*、*xptC1*、*xptA2* 和 *xptD1* 等组成。通过对其插入突变子的昆虫口服毒性分析, 发现 *xptA1* 是表达杀虫活性的主效基因<sup>[24]</sup>, 在此基础上 Sergeant 等构建了该菌株 4 个基因联合和独立的大肠杆菌表达系统, 对各个基因的交互作用进行了研究<sup>[25]</sup>。本研究获得的组分 E1、E2 也是大分子蛋白, 经 SDS-PAGE 仅出现有一个表观分子量大于 212 kD 亚基组分。该毒素蛋白在 60℃ 仍表现出较强的活性, 电泳染色结果表明该类蛋白非糖蛋白也非酯蛋白, 如果直接进行测序和反转录, 进而克隆杀虫基因有一定难度。进一步研究可考虑对杀虫蛋白组分进行质谱分析, 生物测定筛选活性片段, 进而进行保守序列分析, 设计引物或探针, 利用 PCR 方法和直接从基因文库中筛选杀虫蛋白基因。

### 4 结论

从 CB6 菌株胞内和胞外所分离和纯化的毒素蛋白 E1、E2 经相同纯化参数得到相似的洗脱图, native-PAGE 和 SDS-PAGE 呈现出相似的电泳图谱, 其生物活性也相似, 表明二者可能是同一种 (类) 蛋白。

致谢: 中国农业科学院植物保护研究所张永军博士提供全部试虫, 在此表示感谢!

### References

- [1] Thomas G M, Poinar G O. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. *Journal of Systematic Bacteriology*, 1979, 29(4): 352-360.
- [2] Li J X, Chen G H, Webster J M. Nematophin, A novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, 43: 770-773.
- [3] Bowen D J, Ensign J C. Purification and characterization of a high-molecular weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(8): 3029-3035.
- [4] Puneet Khandelwal. Insecticidal pilin subunit from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(19): 6465-6476.
- [5] Abdel-Razek A S. Pathogenic effects of *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae) against pupae of the Diamondback Moth *Plutella xylostella* (L.). *Pest Science*, 2003, 76:

- 108-111.
- [6] Mahar A N, Munir M, Elawad S, Gowen S R, Hague N G M. Microbial control of diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) using bacteria (*Xenorhabdus nematophila*) and its metabolites from the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Zhejiang University*, 2004 5(10): 1183-1190.
- [7] Paik S, Park Y H, Suh S, Kim H S, Lee I S, Park M K, Lee C S, Park S H. Unusual cytotoxic phenethylamides from *Xenorhabdus nematophilus*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2001, 22, 4: 372-374.
- [8] 刘卫京, 杨秀芬, 简恒, 吕秋军, 董俊兴. *Xenorhabdus* 和 *Photorhabdus* 代谢产物体外抗肿瘤活性. 天然产物研究与开发, 2004, 16(1): 1-6.
- Liu W J, Yang X F, Jian H, Lu Q J, Dong J X. The antitumour activity of metabolites from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* invitro. *Natural Product Research and Development*, 2004, 16(1): 1-6. (in Chinese)
- [9] Puneet K, Devapriya C, Ajanta B, Reddy M K, Gorakh P G, Nirupama B. Insecticidal pilin subunit from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(19): 6465-6476.
- [10] 庞在堂, 杨怀文, 杨秀芬, 简恒, 刘峥. 一株高毒力致病杆菌 CB6 的鉴定. 微生物学报, 2004, 44(2): 131-135.
- Pang Z T, Yang H W, Yang X F, Jian H, Liu Z. Identification of a strain *Xenorhabdus* spp. with high antibiotic and insecticidal activity. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(2): 131-135. (in Chinese)
- [11] 杨怀文, 张志铭, 杨秀芬, 简恒. 嗜线虫杆菌代谢物对马铃薯晚疫病的抑制作用. 中国生物防治, 2000, 16(3): 111-113.
- Yang H W, Zhang Z M, Yang X F, Jian H. Antibiosis of *Xenorhabdus nematophilus* metabolites against *Phytophthora infestans*. *Chinese Journal of Biological Control*, 2000, 16(3): 111-113. (in Chinese)
- [12] 杨秀芬, 杨怀文, 简恒. 嗜线虫致病杆菌代谢物拮抗大豆疫霉. 大豆科学, 2002, 21(1): 52-55.
- Yang X F, Yang H W, Jian H. Antibiotic activity of metabolites from *Xenorhabdus nematophilus* against *Phytophthora sojae*. *Soybean Science*, 2002, 21(1): 52-55. (in Chinese)
- [13] Yang X F, Zhang Z M, Yang H W, Jian H. Inhibition of metabolites from *Xenorhabdus nematophilus* against *Phytophthora infestans*. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2001, 24(2): 65-68.
- [14] 刘峥, 简恒, 杨秀芬, 杨怀文. 昆虫病原线虫共生细菌发酵液对棉铃虫和菜青虫的口服毒性. 植物保护学报, 2003, 30(1): 19-24.
- Liu Z, Jian H, Yang X F, Yang H W. Oral insecticidal activity of culture broths from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* to *Helicoverpa armigera*, *Pieris papae*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2003, 30(1): 19-24. (in Chinese)
- [15] 李明华, 杨秀芬, 简恒, 王中康, 杨怀文. 嗜线虫致病杆菌 CB6 菌株对小菜蛾幼虫生物活性的研究. 植物保护, 2003, 29(3): 15-17.
- Li M H, Yang X F, Jian H, Wang Z K, Yang H W. Bioactivity of *Xenorhabdus nematophila* CB6 strain against the larvae of *Plutella xylostella*. *Plant Protection*, 2003, 29(3): 15-17. (in Chinese)
- [16] 潘映红, 杨秀芬, 杨夕庆, 李艳飞, 刘峥, 简恒, 杨怀文. 嗜线虫致病杆菌 CB6 菌株对棉铃虫的生物活性. 中国生物防治, 2004, 20(4): 276-278.
- Pan Y H, Yang X F, Yang X Q, Li Y F, Liu Z, Jian H, Yang H W. Bioactivity of intracellular and extracellular extractions from *Xenorhabdus nematophila* strain CB6 against *Helicoverpa armigera*. *Chinese Journal of Biological Control*, 2004, 20(4): 276-278. (in Chinese)
- [17] 汪家政. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000.
- Wang J Z. *Handbook of Protein Technique*. Beijing: Science Press, 2000. (in Chinese)
- [18] 赵永芳. 生物化学技术原理及应用. 北京: 科学出版社, 2002.
- Zhao Y F. *Principle and Application of Biochemistry Technique*. Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)
- [19] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 2001.
- Guo Y J. *Experimental Technique of Protein Electrophoresis*. Beijing: Science Press, 2001. (in Chinese)
- [20] Puneet Khandelwal. Insecticidal activity associated with the outer membrane vesicles of *Xenorhabdus nematophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(4): 2032-2037.
- [21] Dongjin J. An entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila* inhibits the expression of an antibacterial peptide cecropin of the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*, 2004, 50: 489-496.
- [22] Bowen D J, Rocheleau T A, Blackburn M, Andreev O, Golubeva E, Bhartia R, French-Constant R H. Novel insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science*, 1998, 280: 2129-2132.
- [23] Morgan. Sequence analysis of insecticidal genes from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(5): 2062-2069.
- [24] Martin Sergeant. Interactions of insecticidal toxin gene products from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3344-3349.