

嗜线虫致病杆菌血腔毒素 Tp40 对大蜡螟幼虫体内酶活性和中肠组织的影响

杨 君, 王勤英*, 宋 萍, 南宫自艳, 崔 龙

(河北农业大学植物保护学院, 河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 河北保定 071001)

摘要:嗜线虫致病杆菌 *Xenorhabdus nematophila* 在侵入到寄主昆虫血腔后能够成功地逃避或抑制寄主昆虫的免疫反应并快速杀死昆虫。为深入了解嗜线虫致病杆菌的杀虫机理, 明确关键的致病因子, 作者应用盐析和制备型非变性凝胶电泳等方法, 从嗜线虫致病杆菌 HB310 菌株的细胞内分离纯化了一种新的杀虫蛋白——Tp40, 该蛋白对大蜡螟 *Galleria mellonella* 具有高血腔注射活性, 对大蜡螟 5 龄幼虫的 LD_{50} 为 68.54 ng/头。本文检测了该毒素对大蜡螟幼虫的致病特性, 注射 Tp40 毒素后, 大蜡螟幼虫表现出兴奋和痉挛等症状, 当以不低于 (70 ± 0.02) ng/头的剂量注射 Tp40, 大蜡螟幼虫均在 20 min 内死亡, 但试虫的体色、血淋巴的颜色以及血细胞的形态没有发生明显的变化。对大蜡螟体内酶活性的测定结果显示, 在注射 LD_{50} 剂量的 Tp40 蛋白后, 试虫体内羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶活力都明显的高于对照 ($P < 0.05$), 而酚氧化酶活力显著低于对照 ($P < 0.05$)。对大蜡螟幼虫中肠的组织病理学研究显示, 这种 42 kDa 蛋白能够破坏试虫的中肠组织, 导致其肠壁细胞出现排列紊乱、脱落和围食膜消失。据此推测, Tp40 与嗜线虫致病杆菌对寄主昆虫的免疫抑制有关, 寄主中肠组织可能是其作用靶标之一。

关键词:嗜线虫致病杆菌, 血腔毒素, 酶活力, 大蜡螟, 中肠

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2008)06-0601-08

Influence of the haemocoel toxin (Tp40) from *Xenorhabdus nematophila* on enzyme activities and midgut tissues in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae

YANG Jun, WANG Qin-Ying*, SONG Ping, NANGONG Zi-Yan, CUI Long (Biocontrol Centre of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

Abstract: *Xenorhabdus nematophila* is an insect pathogen that overcomes immune response of insect host and kills a wide range of insects. To address the lethal mechanisms of the bacterium, we isolated and characterized the insecticidal toxins from *X. nematophila* HB310 strain. A new protein Tp40 with high injectable haemocoel activity to *Galleria mellonella* larvae was obtained using methods such as salting out and native-PAGE from the cells of *X. nematophila* HB310. The injectable hemocoelic potency (LD_{50}) of Tp40 was 68.54 ng/larva against 5th-instar larvae of *G. mellonella*. Post injection of Tp40, the larvae ceased feeding almost immediately and showed excitement and convulsion. The larvae injected with the dose of more than (70 ± 0.02) ng/larva of Tp40 all died within 20 min. The color of body and hemolymph of Tp40 treated larvae did not change distinctly. The hemocytes of Tp40-treated larvae also were not destroyed. The activity of the carboxylesterase (CarE) and the acetylcholinesterase (AChE) of *G. mellonella* larvae injected with the LD_{50} dose of Tp40 were obviously higher than that of PBS-control ($P < 0.05$), respectively.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30400296); 河北省自然科学基金项目(C2006000443); 河北农业大学重点基金项目(9816)

作者简介: 杨君, 男, 1981年生, 河北人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫病原微生物, E-mail: yang22181@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 86-312-7528150; Fax: 86-312-7528160; E-mail: wqinying@yahoo.com.cn

收稿日期 Received: 2007-11-14; 接受日期 Accepted: 2008-05-14

However, polyphenoloxidase (PO) activity of the Tp40-injected larvae was markedly lower than that of the control ($P < 0.05$). The study on the histopathology of the midgut of *G. mellonella* indicated that Tp40 destroyed the epithelium and the peritrophic membrane of the midgut. These results suggest that Tp40 was likely to be associated with the immunosuppression by *X. nematophila* to hosts. The midgut tissues of the host may be one of the acting targets of Tp40.

Key words: *Xenorhabdus nematophila*; haemocoel toxin; enzyme activity; *Galleria mellonella*; midgut

虽然各种昆虫都拥有体液免疫和细胞免疫的保护 (Lavine and Strand 2002), 但还是有各种微生物能够成功地对付这种先天免疫反应, 成功地侵染寄主昆虫 (Shrestha and Kim, 2007)。嗜线虫致病杆菌 *Xenorhabdus nematophila* 属肠杆菌科 (Enterobacteriaceae), 革兰氏阴性细菌, 与小卷蛾斯氏线虫 *Steinernema carpocapsae* 共生 (Akhurst and Boemare, 1990)。侵染期的昆虫病原线虫能够将携带的共生菌释放到靶标昆虫血腔内, 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, 共生菌扮演着重要的角色, 它们能够在靶标昆虫血腔内繁殖, 分泌各种毒素, 抑制其免疫反应, 最终使靶标昆虫患败血症死亡 (Park and Kim, 2000; Owuama 2001)。

昆虫病原线虫-共生菌复合体具有广泛的寄主范围, 已经被用来防治各种地下害虫及钻蛀类害虫 (Kaya and Gaugler, 1993)。作为杀虫的主导因子, 共生菌产生多种与杀虫活性相关的毒素, 但这些毒素在昆虫病原线虫-共生菌复合体杀虫过程中的具体作用还不清楚。对嗜线虫致病杆菌杀虫毒素的不断研究, 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。现在已从不同的昆虫病原线虫共生菌中分离到了多种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, 具有血腔活性的物质被认为在杀虫过程中起主要作用 (French-Constant *et al.*, 2007)。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 (Bowen *et al.*, 1998; Blackburn *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 1999; French-Constant and Bowen, 2001), mcf 基因表达产物 (Daborn *et al.*, 2002), 以及来自嗜线虫致病杆菌的 Txp40 毒素蛋白 (Brown *et al.*, 2006) 和溶血素 (Brillard *et al.*, 2001) 等。

嗜线虫致病杆菌 HB310 菌株是本实验室从来自河北省土壤的线虫体内分离得到的昆虫病原线虫

共生菌。前期研究已经从其细胞内分离纯化了 2 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 (王勤英等, 2005)。在该菌株的进一步研究中, 又从其细胞内纯化了一种新的对大蜡螟具有高血腔注射活性的蛋白, 其对 5 龄大蜡螟幼虫的血腔注射致死中量 (LD_{50}) 为 68.54 ng/头。该蛋白分子量约为 42 kDa, 命名为 Tp40 (Toxin protein 40)。Tp40 蛋白编码 368 个氨基酸残基 (GenBank 登录号: ABU68418) (杨君等, 2008), 与已知 Txp40 蛋白 (ABB29480) 存在 2 个氨基酸差异, 本文主要针对这种新蛋白的杀虫机理进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和试虫

嗜线虫致病杆菌 HB310 菌株、5 龄大蜡螟 *Galleria mellonella* 幼虫 (体重 0.20 ~ 0.25 g) 均由河北农业大学害虫生物防治实验室提供。

1.2 胞内蛋白提取

参照王勤英等 (2005) 的方法。将培养好的菌液在 4℃, 10 000 r/min 离心 30 min, 所得细胞沉淀加适量的磷酸缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS), 4℃ 8 000 r/min 离心洗涤并用 PBS 重新悬浮, 经超声波破碎和离心后, 上清液再用 0.45 μm 滤膜过滤, 最后由 Millipore 3 kDa Centricon YM-3 离心超滤管浓缩获得胞内蛋白粗提物。

1.3 血腔毒素的纯化

1.3.1 血腔毒素 Tp40 蛋白的分离纯化: 用 30% 硫酸铵盐析对 1.2 节中的胞内蛋白提取物进行初步分离, 透析 (4℃) 后再经过 native-PAGE 制备型凝胶电泳进一步纯化。蛋白质条带的定位及样品的洗脱: 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℃。根据染色胶条上 Tp40 蛋白条带位置, 从未染色的胶片上切下相应位置的条带, 加液氮充分研碎

后再加入适量的 PBS 缓冲液 4°C 12 000 r/min 离心 30 min 除去凝胶碎片,回收上清液用 Millipore 3 kDa Centricon YM-3 离心超滤管透析浓缩,最后经 8% native-PAGE 和 12% SDS-PAGE 进行鉴定分析。

1.3.2 血腔活性测定:毒素分离提纯过程中活性的监测采用注射法。用微量进样器(MC 25 μL)将待测样品 5 μL 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,每个处理注射 30 头试虫。注射后放在 26°C 培养箱中,每隔 6 h 检查大蜡螟的死亡情况和症状,连续观察 48 h,记录其体色、行为等方面的变化。

1.3.3 蛋白含量的测定:使用 Bradford(1976)蛋白浓度测定法,以牛血清白蛋白(BSA)作为标准建立标准曲线。

1.3.4 Native-PAGE 和 SDS-PAGE:电泳方法、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(2001)方法。电泳图像的分析应用捷达凝胶分析软件。

1.4 血腔毒素对大蜡螟血淋巴的影响

根据 1.3.2 的方法,以 68.54 ng/头(LD_{50})的剂量处理试虫。在试虫死亡前分时段(30 min,1,2,4,8,12,24,36 和 48 h)收集血淋巴并观察。对于血细胞的变化是通过常规涂片和相差显微镜(Olympus IX71)进行观察。

1.5 血腔毒素对大蜡螟 3 种酶活性的影响

1.5.1 试虫处理和酶液提取:采用 1.3.2 的方法,以 68.54 ng/头的剂量注射试虫。在第 6,12,24,36 和 48 h 5 个时间点随机采集对照组和处理组存活幼虫。在玻璃匀浆器中加入与每种酶相对应的预冷磷酸缓冲液(按照每克虫重加入 5 mL 缓冲液)后冰浴匀浆。匀浆液离心(4°C ,12 000 r/min,20 min)后除去表面的白色絮状物,取上清液作为粗酶液。

1.5.2 乙酰胆碱酯酶活性的测定:采用 Ellman 等(1961)的方法略有改进。在 2.6 mL 磷酸缓冲液(pH 7.4)中加入 0.1 mL 酶液和 0.1 mL Asch-DTNB (acetylthiocholine dithio-bis-nitrobenzoic acid,体积比 = 1:2)后 25°C 下反应 15 min,用 $0.5\text{ mL } 1 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$ 毒扁豆碱终止反应,于 410 nm 下测量光吸收的变化值。酶活力以 $\text{OD}(\text{min} \cdot \text{mg})$ 表示。每个处理重复 3 次。

1.5.3 羧酸酯酶活性的测定:参照 van Asperen (1962)的方法。 $5\text{ mL } 3 \times 10^{-4}\text{ mol/L } \alpha\text{-醋酸萘酯}$ (含

$1\% 10^{-4}\text{ mol/L}$ 毒扁碱)与 0.9 mL $0.04\text{ mol/L pH } 7.0$ 磷酸缓冲液混合,加入 0.1 mL 酶液后在 30°C 中水浴 30 min,再加入 1 mL 显色剂(5% 十二烷基硫酸钠溶液和 1% 坚固蓝 B 盐溶液以 5:2 的比例混合),室温静置 30 min 后测定其 OD_{600} 值。根据 $\alpha\text{-萘酚}$ 标准曲线(与显色剂结合后, $\alpha\text{-萘酚}$ 浓度与 OD_{600} 值呈线性关系)计算出每毫升酶液生成的 $\alpha\text{-萘酚}$ 数,结合酶液蛋白含量计算其比活力,用 $\alpha\text{-萘酚 } \mu\text{mol}(\text{min} \cdot \text{mg})$ 表示。每个处理重复 3 次。

1.5.4 多酚氧化酶活性的测定:参照 Ishaaya 和 Casida(1974)的方法并略作修改。在 1.5 mL $0.05\text{ mol/L pH } 6.8$ 的磷酸缓冲液中加入 1.5 mL 0.2 mol/L 邻苯二酚作为底物,再加入 0.1 mL 酶液混匀, 25°C 水浴中振荡反应 15 min 后,于 420 nm 处测定 OD 值。根据酶液中蛋白质的含量,酶活力 U 用每毫克酶液每分钟所引起的 OD 值变化表示 [$\text{U}:\text{OD}(\text{min} \cdot \text{mg})$]。每个处理重复 3 次。

1.5.5 数据统计处理方法:对 3 种酶活力的测定数据均通过 DPS 数据处理软件完成。采用 Duncan's 新复极差法($P = 0.05$),数据均为平均数 $\pm$ 标准误 ($\text{mean} \pm \text{SE}$)。

1.6 中肠组织石蜡切片的制作及观察

按照 1.3.2 的方法,以 LD_{50} 的剂量处理试虫。参照 1.5.1 取各时段处理组和对照组试虫,在预冷的 PBS 缓冲液中解剖出中肠,经过布安氏固定液(Bouin's fluid)苦味酸饱和液、40% 甲醛和冰醋酸之比为 75/25/5 固定、酒精逐级脱水、二甲苯透明、石蜡包埋($58^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$)和组织切片(切片厚度 6 ~ 8 μm)后,用苏木精-伊红双染法(Hematoxylin-Eosin)染色封片。使用光学显微(Olympus CX31)照相系统观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 血腔毒素的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

通过 30% 硫酸铵饱和度盐析和制备型凝胶电泳,从嗜线虫致病杆菌 HB310 菌株胞内蛋白提取物中回收到的 Tp40 蛋白再经 8% native-PAGE 进行纯度鉴定,结果显示本方法获得的 Tp40 蛋白成分单一,没有其他杂带出现(图 1:A)。经 12% SDS-PAGE 分析,Tp40 蛋白仍显示为单一条带(图 1:B)。根据标准蛋白 Marker,应用凝胶分析软件计算 Tp40 的分子量约为 42 kDa。

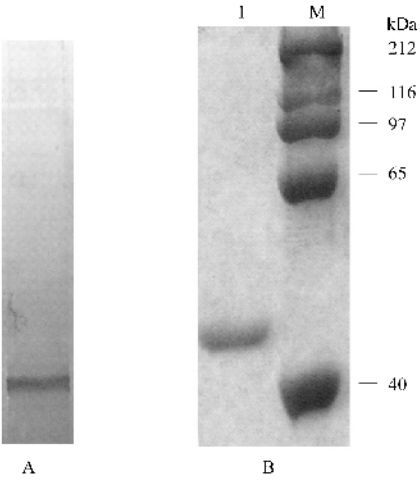


图 1 Tp40 蛋白 8% native-PAGE 和 12% SDS-PAGE
Fig. 1 8% native-PAGE and 12% SDS-PAGE of Tp40
A :Tp40 的 8% native-PAGE 纯度鉴定 8% native-PAGE of purified Tp40 ; B :Tp40 的 12% SDS-PAGE 分析 12% SDS-PAGE analysis of Tp40. 1 :Tp40 ; M :Marker.

2.2 大蜡螟幼虫的病症观察

以 68.54 ng/头(LD₅₀)剂量的 Tp40 注射大蜡螟 , 注射后的试虫随即开始快速爬动 表现出兴奋症状 ; 3 ~ 4 min 后大部分试虫运动减少 , 头胸部翘起 , 口器持续一张一合 ; 10 min 后试虫表现为强烈的痉挛症状 , 足和口器微颤 , 体躯前后抽搐 , 有的扭曲翻滚 , 最后试虫行动缓慢直至死亡。刚刚死亡的试虫身体发软但无脱水现象。与对照组相比 , 体色不发生改变 (图 2 :A 和 B)。继续放置 6 h 后 , 试虫身体从其头部到胸部变黑 , 但身体其他部分不变色 (图 2 :C 和 D)。当以不低于 (70 ± 0.02)ng/头的剂量注射 Tp40 , 大蜡螟幼虫均在 20 min 内死亡。

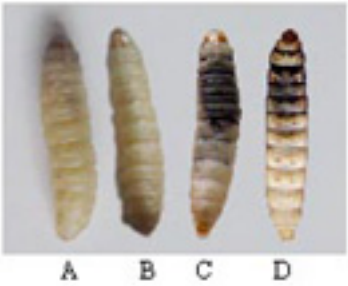


图 2 大蜡螟幼虫注射 Tp40 后的体色变化
Fig. 2 Change of the body color after injecting Tp40 into *G. mellonella* larvae

A 对照 Control ; B :注射 Tp40 后刚死亡的大蜡螟幼虫 The fresh carcasses of *G. mellonella* larvae injected with Tp40 ; C , D 注射 Tp40 死亡后 6 h 的大蜡螟幼虫 6 h carcasses of *G. mellonella* larvae injected with Tp40.

2.3 血腔毒素对大蜡螟幼虫血淋巴的影响

健康大蜡螟幼虫的血淋巴是浅黄色的 (图 3 : A) , 暴露于空气中会变成黑色 (大约 30 min) (图 3 : C) ; 以 LD₅₀ 的剂量注射 Tp40 的大蜡螟血淋巴也是浅黄色的 (图 3 : B) , 与对照无差异 , 并且暴露于空气中也发生黑化 (图 3 : D) , 但黑化时间比对照滞后约 1 h。分时段收集大蜡螟幼虫的血淋巴于相差显微镜下观察 , 并没有发现 Tp40 对血细胞的形态造成明显的影响 (图 4)。

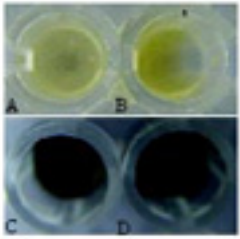


图 3 Tp40 对大蜡螟幼虫血淋巴的影响
Fig. 3 The effect of Tp40 on the hemolymph of *G. mellonella* larvae

A 对照新鲜血淋巴 Control (fresh) ; B :Tp40 处理后的新鲜血淋巴 Hemolymph of Tp40 treatment (fresh) ; C :对照血淋巴 (体外放置 30 min) The normal hemolymph exposed to the air for 30 min ; D :Tp40 处理后的血淋巴 (体外放置 2 h) The hemolymph of Tp40 treated larvae exposed to the air for 2 h.

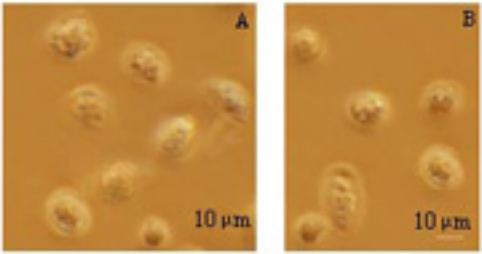


图 4 Tp40 对大蜡螟幼虫血细胞的影响
Fig. 4 The effect of Tp40 on the hemocytes of *G. mellonella* larvae

A 对照血细胞 Control ; B :注射 Tp40 后 12 h 的血细胞 The hemocytes of *G. mellonella* larvae injected with Tp40 at 12 h.

2.4 血腔毒素对大蜡螟幼虫体内 3 种酶活性的影响

以 Tp40 蛋白的致死中量注射大蜡螟 5 龄幼虫 , 然后对幼虫体内羧酸酯酶、乙酰胆碱酯酶和多酚氧化酶的活性变化进行了测定。结果显示 , 在处理 12 ~ 36 h , Tp40 对大蜡螟体内羧酸酯酶的激活作用显著 (*P* < 0.05) , 并且活性表现为随时间增加而增高 (图 5) ; Tp40 对乙酰胆碱酯酶的激活作用更加明显 , 在所取样的 5 个时间点中 , Tp40 处理组与 PBS 处理组都表现出显著差异 (*P* < 0.05) (图 6) ; 但是 ,

T_p40 蛋白对于多酚氧化酶的活性显示出较高的抑制作用,除了处理后 12 h 外,其余时间点处理组幼虫体内多酚氧化酶的活性明显低于 PBS 对照组($P < 0.05$),并且从第 12 h 开始 T_p40 的抑制作用有越来越强的趋势(图 7)。

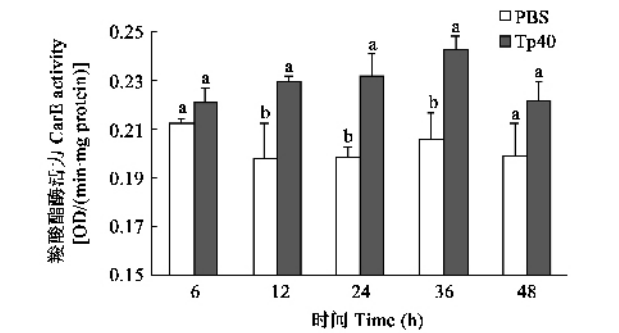


图 5 大蜡螟 5 龄幼虫在不同时段羧酸酯酶活力的变化

Fig. 5 CarE activity in *G. mellonella* larvae injected with T_p40 and PBS

柱上不同字母表示差异显著 Bar represents mean $\pm$ SD ($n = 3$). Different lowercase letters indicate significant differences between different treated larvae ($P < 0.05$,LSD);下图同 The same below .

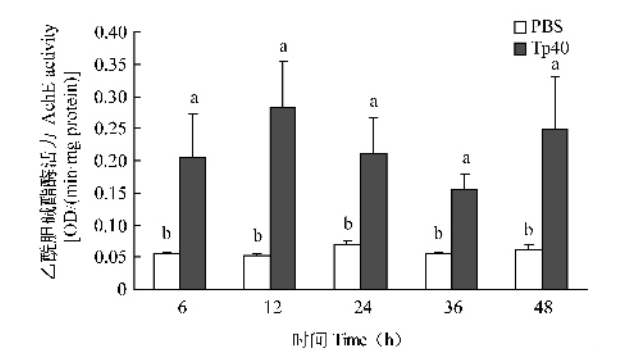


图 6 大蜡螟 5 龄幼虫在不同时段乙酰胆碱酯酶活力的变化

Fig. 6 AchE activity in *G. mellonella* larvae injected with T_p40 and PBS

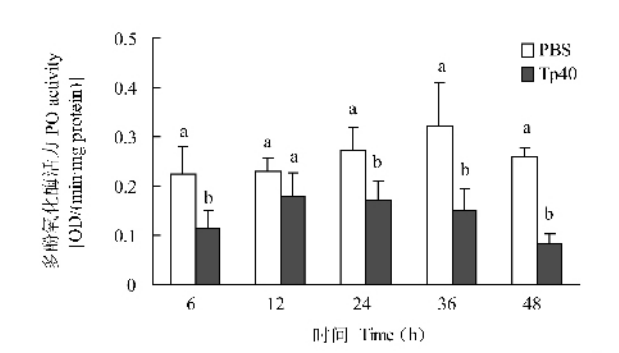


图 7 大蜡螟 5 龄幼虫在不同时段多酚氧化酶活力的变化

Fig. 7 PO activity in *G. mellonella* larvae injected with T_p40 and PBS

2.5 血腔毒素对大蜡螟幼虫中肠的影响

用 PBS 和 T_p40 蛋白分别注射 5 龄大蜡螟幼虫,通过对不同处理和不同时间进行中肠取样,经组织切片显微观察发现:PBS 48 h 处理组(图 8 :A ,其余时间段 PBS 处理的大蜡螟幼虫中肠与 48 h 基本一致)的大蜡螟幼虫中肠细胞排列紧密,围食膜(PM)清晰可见。在 T_p40 处理 12 h (图 8 :B)的中肠切片已经发现部分柱状细胞开始伸长变形,散乱脱落。T_p40 处理 24 h (图 8 :C)围食膜消失,肠壁细胞极度拉长变形,病变加重。到 48 h (图 8 :D),中肠发生完全病变,中肠细胞排列紊乱,大量细胞脱落。

3 讨论

嗜线虫致病杆菌一旦进入到昆虫血腔,首先需要克服昆虫的免疫反应,然后开始增殖并产生多种毒素,在短时间内就会引起昆虫死亡。Bowen 等(1998)从发光杆菌 *P. luminescens* W14 的胞外分泌物中分离纯化出一种高分子量蛋白复合物——Tc 毒素,该蛋白复合物同时具有血腔注射和口服杀虫活性。随后,与编码 Tc 蛋白类似的 *xpt* 杀虫基因簇又从 *X. nematophila* 中被发现了(Morgan *et al.* , 2001 ;Sergeant *et al.* , 2003) ,其编码的 *Xpt* 蛋白也是大分子蛋白复合体,但是 *Xpt* 没有表现血腔注射活性。因为自然状态下,共生菌产生的任何胃毒素都被认为应该在昆虫血腔一侧起作用,所以到目前为止仍然不清楚 *Xpt* 在嗜线虫致病杆菌致病过程中所起的作用。Brown 等(2004)从嗜线虫致病杆菌 A24 中克隆得到 *txp40* 基因,该基因的表达产物是一种分子量为 42 kDa 的蛋白——Txp40,对大蜡螟幼虫具有很强的血腔注射活性,与本实验从嗜线虫致病杆菌 HB310 细胞内获得的蛋白 T_p40 很相似。Western blotting 检测结果表明,Txp40 与 T_p40 属于同源蛋白,由于 T_p40 蛋白的氨基酸序列(GenBank accession number :ABU68418)与已知 Txp40 蛋白存在 2 个氨基酸的差异,所以 T_p40 应为一种新的蛋白(杨君等 , 2008)。Brown 等(2004 ,2006)是利用构建粘粒文库的方法先克隆基因再通过表达获得的 Txp40 蛋白。本研究利用盐析和制备型非变性凝胶电泳等方法先得到了蛋白后确定基因,现在随着蛋白质组技术的发展,从分离纯化蛋白再到确定基因的途径被越来越多的应用(邹勇等 ,2007) ,特别是类似 T_p40 这样的单体蛋白,本文的方法也是具有可操作性的。

在昆虫体内,酯酶主要负责正常的脂类代谢和

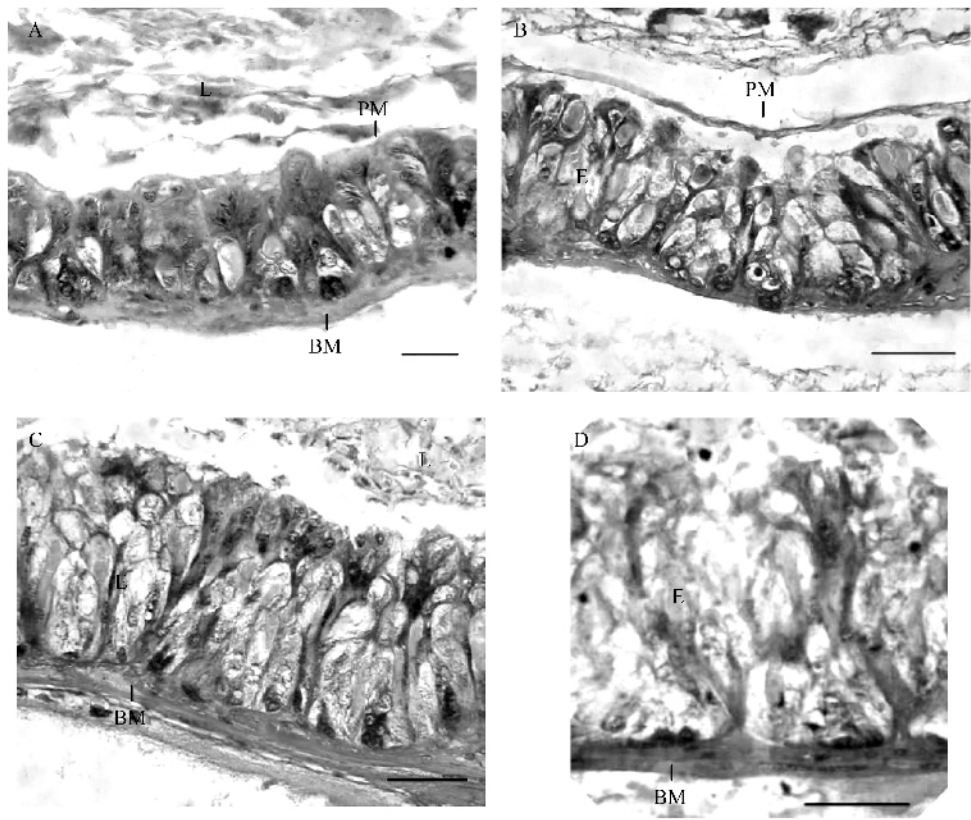


图 8 Tp40 蛋白对大蜡螟幼虫中肠病理学影响

Fig. 8 Histopathological effects of Tp40 protein on the midgut of *G. mellonella* larvae

所有图片均为幼虫中肠纵切, 标尺长 25 μm 。 All images are longitudinal sections through the region of the midguts of larvae inoculated with either PBS or Tp40 ; scale bar = 25 μm 。 A 对照组中肠 Control ; B , C , D : Tp40 处理 12 , 24 和 48 h 的幼虫中肠组织 Larvae midgut tissues at 12 , 24 and 48 h after Tp40 injection , respectively。 BM 基底膜 Basement membrane ; E : 中肠上皮细胞 Midgut epithelium ; L 肠腔 Midgut lumen ; PM 围食膜 Peritrophic matrix。

外源脂类化合物的解毒代谢等。本实验显示注射 Tp40 的大蜡螟 5 龄幼虫体内羧酸酯酶活性明显增强, 这与前人测定昆虫病原线虫对大蜡螟体内酯酶活性的影响结果基本一致(丁晓帆等, 2005; 韩冰等, 2006)。Txp40 的研究表明其对靶标昆虫脂肪体具有明显的破坏作用(Brown *et al.*, 2006), 虽然本研究没有观察到 Tp40 对脂肪体的明显影响, 但是 Tp40 处理后幼虫体内酯酶活性的增强间接反映出 Tp40 对大蜡螟脂肪体是有影响的。酯酶活性增强表明大蜡螟体内脂类物质分解活动增强, 从而可能引起脂肪体的结构破坏, 导致内部组织解体, 加快昆虫死亡。通常乙酰胆碱酯酶被认为是神经毒剂的靶标酶, 这类杀虫剂通过抑制其活性而引起靶标害虫兴奋和痉挛, 最终麻痹死亡(张静等, 2007), Tp40 引起的大蜡螟幼虫的中毒症状如杀虫速度快、痉挛等正好与之基本相符。但是, 对试虫体内乙酰胆碱酯酶活性的测定结果却表明 Tp40 对乙酰胆碱酯酶不仅没有表现抑制作用, 反而引起其活性显著增强。因

此 Tp40 对昆虫神经系统的影响还有待于进一步研究。多酚氧化酶(PO)是昆虫体内很重要的免疫因子, 在昆虫体内是以无活性酶原 PPO 形式存在的, 当病原体入侵时通过 PPO 级联被活化, 与昆虫体内黑色素的形成有关(时超美, 2000)。有研究表明寄生性昆虫、昆虫病原细菌和真菌都能够抑制寄主昆虫体内多酚氧化酶的活性(Beerntsen *et al.*, 2000; Shelby *et al.*, 2000)。注射 Tp40 后, 大蜡螟体内多酚氧化酶的活性受到明显的抑制, 大大降低了其免疫力, 直至试虫死亡也没有诱发黑化反应。对大蜡螟幼虫血淋巴的观察也证实 Tp40 具有延缓黑化的作用。本研究未能在光学显微水平上观察到 Tp40 对大蜡螟幼虫血细胞形态方面的影响, 但 Tp40 能够在一定程度上降低试虫血细胞的数量。由此, 推测 Tp40 可能与共生菌的免疫抑制有关。

许多已知的杀虫毒素如苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* 的 δ -内毒素(δ -endotoxins)和来源于链霉菌 *Streptomyces* 的胆固醇氧化酶(cholesterol

oxidase), 它们的杀虫作用靶标都是昆虫中肠 (Blackburn *et al.*, 1998)。已有研究显示, 来自昆虫病原线虫共生菌的多种毒素如 T_c 毒素、Mcf 毒素、T_{xp}40 毒素等注射到昆虫血腔后都表现出对昆虫中肠组织的破坏作用(Blackburn *et al.*, 1998; Daborn *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2004, 2006), 本实验也观察到了 T_p40 对大蜡螟中肠组织的破坏作用。此外, 应用绿色荧光蛋白标记的方法也证实嗜线虫致病杆菌和发光杆菌对海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 和烟草天蛾 *Manduca sexta* 幼虫中肠上皮细胞具有亲和性 (Silva *et al.*, 2002; Sicard *et al.*, 2004)。由此推断昆虫病原线虫共生菌的作用靶标可能位于昆虫中肠。但是, 无论是 T_p40 还是 T_{xp}40 均未表现出口服杀虫活性(未报导), 即该类毒素在消化道内不能发挥其破坏中肠消化道的活性, 只可能与消化道内的环境有关。杨君等(2008)的研究结果显示出 T_p40 是不被分泌到细胞外的。那么, 这种只存在于细胞内的杀虫蛋白是如何起到杀虫作用的呢? 我们推测 T_p40 可能是通过细胞自溶被释放到昆虫血淋巴中的。到目前为止, 昆虫病原线虫共生菌对寄主昆虫的致病机理还不是很清楚, 对这类毒素的深入研究将有助于揭示昆虫病原线虫共生菌与寄主昆虫之间的关系。

参 考 文 献 (References)

Akhurst RJ, Boemare NE, 1990. Biology and Taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Gaugler R, Kaya HK eds. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. C.R.C. Press, Boca Raton, Florida. 75–90.

Beemtsen BT, James AA, Christensen BM, 2000. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 115–137.

Blackburn M, Golubeva E, Bowen D, ffrench-Constant RH, 1998. A novel insecticidal toxin from *Photorhabdus luminescens*, Toxin complex a (Tea), and its histopathological effects on the midgut of *Manduca sexta*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 3 036–3 041.

Bowen D, Rocheleau TA, Blackburn M, Andreev O, Golubeva E, Bhartia R, ffrench-Constant RH, 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science*, 280: 2 129–2 132.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein unitizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.

Brilliant J, Ribeiro C, Boemare N, Brehélin M, Givaudan A, 2001. Two distinct hemolytic activities in *Xenorhabdus nematophila* are active against immunocompetent insect cells. *Journal of Bacteriology*, 67: 2 515–2 525.

Brown SE, Cao AT, Dobson P, Hines ER, Akhurst RJ, East PD, 2006. T_{xp}40, a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 1 653–

1 662.

Brown SE, Cao AT, Hines ER, Akhurst RJ, East PD, 2004. A novel secreted protein toxin from the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *J. Biol. Chem.*, 279: 14 595–14 601.

Daborn PJ, Waterfield N, Silva CP, Au CPY, Sharma S, ffrench-Constant RH, 2002. A single *Photorhabdus* gene, *makes caterpillars floppy* (*mcf*), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *PNAS*, 99: 10 742–10 747.

Ding XF, Lin MS, Liu LS, 2005. Effects of entomopathogenic nematodes on energetic contents in hemolymph of *Galleria mellonella*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 28(3): 43–47. [丁晓帆, 林茂松, 刘亮山, 2005. 几种昆虫病原线虫对大蜡螟幼虫血淋巴及其能源物质含量的影响. 南京农业大学学报, 28(3): 43–47]

Ellman GL, Courtney KDA, Andres VJr, FeatherStone RM, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88–95.

ffrench-Constant R, Dowling N, Waterfield AR, 2007. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon*, 49: 436–451.

ffrench-Constant RH, Bowen DJ, 2001. Novel insecticidal toxins from nematode-symbiotic bacteria. *Cell Mol. Life Sci.*, 57: 828–833.

Guo LN, Fatig RO III, Orr GL, Schafer BW, Strickland JA, Sukhapinda K, Woodworth AT, Petell JK, 1999. *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.*, 274: 9 836–9 842.

Guo YJ, 2001. Experimental Technique of Protein Electrophoresis. Science Press, Beijing. 54–157. [郭尧君, 2001. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社. 54–157]

Han B, Cong B, Liu YC, Fu HB, 2006. Effect of the different entomopathogenic nematode strains on carboxylesterase activity of *Galleria mellonella*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 34(7): 1 393, 1 396. [韩冰, 从斌, 刘亚臣, 付海滨, 2006. 不同品系昆虫病原线虫对大蜡螟羧酸酯酶活性的影响. 安徽农业科学, 34(7): 1 393, 1 396]

Ishaaya I, Casida JE, 1974. Dietary TH 6040 alters composition and enzyme activity of housefly larval cuticle. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 4: 484–490.

Kaya HK, Gaugler R, 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.*, 38: 181–206.

Lavine MD, Strand MR, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 1 295–1 309.

Morgan JAW, Sergeant M, Ellis D, Ousley M, Jarrett P, 2001. Sequence analysis of insecticidal genes from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 2 062–2 069.

Owuama CI, 2001. Entomopathogenic symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* of nematodes. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 505–515.

Park Y, Kim Y, 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *J. Insect Physiol.*, 11: 1 469–1 476.

Sergeant M , Jarrett P , Ousley M , Morgan JAW , 2003. Interactions of insecticidal toxin gene products from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. *Appl. Environ. Microbiol.* , 69(6): 3 344 – 3 349.

Shrestha S , Kim Y , 2007. An entomopathogenic bacterium , *Xenorhabdus nematophila* , inhibits hemocyte phagocytosis of *Spodoptera exigua* by inhibiting phospholipase A₂. *J. Invertebr. Pathol.* , 96 : 64 – 70.

Shelby KS , Adeyeye OA , Okot-Kotber BM , Webb BA , 2000. Parasitism-linked block of host plasma melanization. *J. Invertebr. Pathol.* , 75 : 218 – 225.

Shi CM , 2000. The activation and application of prophenoloxidase in immunity. *Entomological Knowledge* , 37(5): 310 – 314. [时超美 , 2000. 昆虫酚氧化酶原活化及其在免疫中的作用. 昆虫知识 , 37(5): 310 – 314]

Sicard M , Brugirard-Ricaud K , Pages S , Lanois A , Boemare NE , Brehélin M , Givaudan A , 2004. Stages of infection during the tripartite interaction between *Xenorhabdus nematophila* , its nematode vector , and insect hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* , 70 : 6 473 – 6 480.

Silva CP , Waterfield NR , Dabom PJ , Dean P , Chilver T , Au CPY , Sharma S , Potter U , Reynolds SE , ffrench-Constant RH , 2002. Bacterial infection of a model insect : *Photorhabdus luminescens* and *Manduca sexta*. *Cell Microbiol.* , 4 : 329 – 339.

van Asperen KA , 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.* , 8 : 401 – 416.

Wang QY , NanGong ZY , Lu XJ , Li XH , Li GX , Cui L , 2005. Purification of insecticidal proteins from *Xenorhabdus nematophila* HB310 and detection of their insecticidal activity. *Acta Entomologica Sinica* , 48(3): 353 – 358. [王勤英 , 南宫自艳 , 陆秀君 , 李秀花 , 李国勋 , 崔龙 , 2005. 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 , 48(3): 353 – 358]

Yang J , Wang QY , Song P , NanGong ZY , Cui L , Kong FF , Feng SS , 2008. Purification and characterization of haemocoel insecticidal Tp40 from *Xenorhabdus nematophila*. *Acta Microbiologica Sinica* , 48(5): 677 – 683. [杨君 , 王勤英 , 宋萍 , 南宫自艳 , 崔龙 , 孔繁芳 , 冯姗姗 , 2008. 嗜线虫致病杆菌血腔毒素 Tp40 的纯化和特性分析. 微生物学报 , 48(5): 677 – 683]

Zhang J , Feng G , Ma ZQ , Feng JT , Zhang X , 2007. Toxicity of sarisan against *Mythinna separata* Walker and its effects on AChE and ATPases. *Acta Entomologica Sinica* , 50(6): 574 – 577. [张静 , 冯岗 , 马志卿 , 冯俊涛 , 张兴 , 2007. 细辛醚对粘虫幼虫的毒力及几种重要酶系的影响. 昆虫学报 , 50(6): 574 – 577]

Zou Y , Hou Y , Liu HL , Wang LY , Xia QY , 2007. The application of proteomics in studying on proteins of insect. *Newsletter of Sericultural Science* , 27(2): 21 – 27. [邹勇 , 侯勇 , 刘鸿丽 , 王凌燕 , 夏庆友 , 2007. 蛋白质组学方法在昆虫蛋白质研究中的应用. 蚕学通讯 , 27(2): 21 – 27]

(责任编辑 : 赵利辉)