

致病杆菌功能基因的分子生物学研究进展

龚永兴, 杨怀文

中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100081

[摘要] 致病杆菌是与斯氏线虫共生的肠杆菌科细菌, 存在于昆虫病原线虫肠道内, 可随线虫的侵染进入寄主昆虫血腔, 迅速繁殖并产生多种代谢产物, 抑制其他杂菌的污染, 保护线虫繁殖的环境。多年研究发现, 该菌的代谢产物具有广泛的杀虫、抑菌、抗癌等生物活性。本文介绍了致病杆菌外膜蛋白基因、菌毛蛋白基因、共生作用相关基因、溶血素相关基因、杀虫毒素蛋白基因、抗生素相关基因以及专利申请基因的研究进展。

[关键词] 致病杆菌; 共生; 功能基因

[中图分类号] Q939.96

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)11-0053-05

Advances in Molecular Biology of Functional Genes in *Xenorhabdus*

GONG Yongxing, YANG Huaiwen

Plant Protection Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: *Xenorhabdus* are Gram-negative bacteria that live in symbiosis with *Steinernema* nematodes. During recent decades, more and more researches are focused on the molecular biology of these bacteria. This paper reviews the advances in some functional genes of *Xenorhabdus*, including outer member protein genes, mobility protein genes, symbiosis-associated genes, insecticidal toxin protein genes, hemolysin genes, antibiotics-related genes, and some patented genes.

Key Words: *Xenorhabdus*; symbiosis; functional genes

CLC Number: Q939.96

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)11-0053-05

0 引言

昆虫病原线虫共生细菌是存在于昆虫病原线虫肠道内的一类细菌, 革兰氏阴性, 属肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)^[1]。现已描述的共生细菌有两个属——致病杆菌属 (*Xenorhabdus*) 和发光杆菌属 (*Photorhabdus*), 分别与斯氏属线虫 (*Steinernema*) 和异小杆属线虫 (*Heterorhabditis*) 共生^[2-4]。

昆虫病原线虫共生细菌分子生物学研究除型变外, 大多集中在致病性、共生作用、生物发光以及对极端环境的适应等机理和功能上, 因此大多基因都涉及这些功能的特性。但比较而言, 对致病杆菌的研究晚于光杆状菌。从已有报道来看, 16S RNA 编码基因在该细菌中研究得最早也最为普遍, 在致病杆菌属细菌的分子分类学中起到了相当重要的作用。而真正致病杆菌

功能基因的分子生物学研究, 应从 20 世纪 90 年代后期开始。最初人们对致病杆菌功能基因的研究从外膜蛋白基因和菌毛蛋白基因开始, 以后逐渐到共生作用相关基因, 近几年的研究热点又体现在杀虫毒素基因上。下面将介绍致病杆菌这些功能基因的研究进展。

1 外膜蛋白基因

在大肠杆菌中, 组氨酸激酶信号蛋白 EnvZ 经过自身磷酸化后可以使调节蛋白 OmpR 发生磷酸化。OmpR 磷酸化水平的调节可以控制 *ompF* 和 *ompC* 的差异表达。虽然对 EnvZ 和 OmpR 之间的磷酸转化已有深入研究, 但对 EnvZ 的信号传导功能还研究得不够清楚。Tabatabai 和 Forst^[5]对 EnvZ 的信号传导功能进行了研究, 发现嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophila*) 含有编码

收稿日期: 2007-03-23

作者简介: 龚永兴, 男, 北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业科学院植物保护研究所, 博士研究生, 主要从事分子微生物学研究;

E-mail: yxgong@126.com

杨怀文 (通讯作者), 女, 北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业科学院植物保护研究所, 研究员, 主要从事农业害虫生物防治研究; E-mail: huaiweny@263.net

OmpR 和 *EnvZ* 的操纵子。核苷酸序列分析表明, *EnvX.n* 含有 342 个氨基酸残基, 比大肠杆菌 *EnvZ* 少 108 个。氨基酸序列比较显示 *EnvZ* 分子的胞质结构域之间有 57% 的同源性。相反, *EnvZE.c* 的亲水性周质结构域在 *EnvZX.n* 中缺失, 而代之以短小的疏水区。虽然 *EnvZX.n* 的周质区域分化较大, 但可以补偿大肠杆菌的 δ *envZ* 的功能。OmpF 和 OmpC 发生差异表达, 以应对培养基渗透压的变化。进一步的遗传分析表明, *EnvZX.n* 与 OmpRE.c 之间的异源磷酸化作用可以解释大肠杆菌的 δ *envZ* 基因的补偿作用。他们还发现, 嗜线虫致病杆菌与大肠杆菌的 OmpR 分子之间具有 78% 的氨基酸序列相似性。这些结果表明, 嗜线虫致病杆菌的 *EnvZ* 蛋白可以感受到生长环境中的渗透压变化, 并能正确地调节大肠杆菌中的 OmpR 磷酸化水平。

Forst 等^[6]研究了嗜线虫致病杆菌 *OpnP* 的功能和重新调节。纯化的 *OpnP* 体外孔道功能分析表明, 其单通道电导值与大肠杆菌的孔蛋白 OmpF 相似。核苷酸序列分析显示, 成熟的 *OpnP* 蛋白含 348 个氨基酸残基, 与 OmpF 有 55% 的序列相似性。与 *ompF* 相似, *opnP* 位于 *asnS* 和 *aspC* 之间。*OpnP* 蛋白含有高度保守的 16 个跨膜 β 折叠和内环结构, 而其他外环结构域则差异较大。引物延伸实验鉴定了 *opnP* 的转录起始位点, 在 *opnP* 上游发现一个 δ 70 启动子, 一个完整的 20 bp OmpR 结合位点及一个反义分子 *micF* RNA 的结合位点。

2 运动蛋白基因

致病杆菌的运动主要通过鞭毛来完成。Givaudan 等^[7-8]从嗜线虫致病杆菌 F1 菌株中鉴定到一个位点含有两个 ORFs, 序列分析表明第一个 ORF 对应编码鞭毛蛋白的 *fliC* 基因, 第二个与肠细菌钩状相关蛋白 (FlhD) 具有同源性。致病杆菌 *fliCD* 基因对于恢复大肠杆菌运动性是必需的, *fliC* 基因及其周围结构在两型细胞中都是相同的, 但 Northern 杂交显示 *fliC* 和 *fliD* 在 II 型细胞中不转录或微弱转录。互补实验表明, 将 I 型细胞的 *fliCD* 转到 II 型细胞中, II 型细胞的运动型和鞭毛合成也不能回复。这表明鞭毛调节子的转录级别 (transcriptional hierarchy) 高一些, 所以在 II 型细胞中关闭了。该实验室还构建了该菌株的 *flhD* 缺失突变体, 表明 *flhDC* 操纵子控制鞭毛的表达, 而且脂肪水解和胞外溶血素活性都是依赖 *flhDC* 的。同时, *flhD* 缺失突变体在斜纹夜蛾 (*spodoptera littoralis*) 中的毒性比野生型弱。因此, *flhDC* 操纵子在侵染昆虫的过程中具有运动、脂肪酶、溶血素功能或者其他未知功能。

为了研究致病杆菌生命周期中菌毛的作用, He 等^[9]分析了 *mrx* 操纵子的结构和表达。该操纵子只含有 5 个结构基因 (*mrxACDGH*), 是目前为止所研究的最小的分子伴侣引导的菌毛操纵子之一。不像奇异变形菌

(*Proteus mirabilis*) 的 *mrp* 操纵子, 致病杆菌的 *mrx* 操纵子与位点特异重组酶无关。在最大的菌毛基因 (*mrxA*) 和引导基因 (*mrxC*) 之间区域缺失类似 *mrpB* 的基因, 而 *mrxA* 下游含有 3 个串联反向重复序列。琼脂生长的细胞中, 主要转录含有长为 940 bp 的 *mrxA* 的 mRNA, 而 *mrx* 多顺反子 mRNA 只低水平转录。*mrxA* 上游有一个典型的 δ 70 启动子, 没有出现倒置现象。*lrp* 突变菌株不产生菌毛, 表明亮氨酸应答调节蛋白 Lrp 在调节 *mrx* 操纵子中发挥作用。这些结果表明, *mrx* 操纵子的遗传结构和调节在某些方面与其他分子伴侣引导的菌毛操纵子是截然不同的。

Khandelwal 等^[10]首次报道细菌中菌毛蛋白亚基的杀虫活性。他们对嗜线虫致病杆菌蛋白质复合物提取的 17 kDa 菌毛蛋白亚基进行了克隆、表达和鉴定。实验通过 PCR 扩增, 克隆并在大肠杆菌中表达。体外没有同源的分子伴侣, 重组蛋白用尿素梯度重折叠, 寡聚化的蛋白在体外重折叠, 形成多聚体。菌毛蛋白保守性 N-末端残基的点突变时寡聚结构稳定性大大降低, 表明 N 末端在菌毛蛋白亚基在重折叠和寡聚化的重要性。重组蛋白对棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 幼虫血细胞具有细胞毒性, 引起凝集反应, 并伴随细胞质中乳糖脱氢酶的释放。

3 共生作用相关基因

在大多革兰氏阴性细菌中, δ (S) 转录因子控制逆境抗性、存活或与寄主互作的调节子。因此, Vivas 和 Goodrich-Blair^[11]在首次对嗜线虫致病杆菌共生作用分子机制的研究中阐述了 δ (S) 转录因子在菌株-线虫互动中的作用。他们对嗜线虫致病杆菌编码 δ (S) 的 *rpoS* 基因进行了克隆测序突变研究, 结果发现 *rpoS* 突变体与野生型一样对昆虫有致病性, 但该突变体不能在线虫中肠中共生。该实验室用 Signature-Tagged Mutagenesis (STM) 技术, 从转座子突变体中筛选得到 15 个突变株, 共有 9 个单独的位点被插入突变。其中, 3 个位点的 OPFs 类似编码调节蛋白的基因 (*rpoS*, *rpoE*, *lrp*); 2 个位点的 ORFs 类似编码氨基酸生物合成酶的基因 (*aroA*, *serC*), 1 个位点的 ORFs 命名 *nilB* (nematode intestine localization), 含有的 1 个 ORF 与奈瑟氏球菌 (*Neisseria*) 中推测的外膜蛋白 (OmpU) 有相似性; 含有的另外 3 个基因 (*nilA*, *nilC*, *nilB*) 却在数据库中没有同源性。*nilA*, *nilC* 和 *nilB* 在一个 4 kb 位点上连锁, *nilB* 和 *nilC* 突变使定殖线虫能力降低到野生型的 1/10 000, 推测它们编码位于膜上的蛋白。*nilD* 位点含有广泛重复区域及一些小的 ORFs^[12]。进一步研究表明, 嗜线虫致病杆菌在线虫中定殖需要 *isc-hsc-fdx* 位点的协调表达。在嗜线虫致病杆菌中推测编码铁硫组合体的 *iscRSUA-hscBA-fdx* 位点 *iscA* 和 *hscB* 之间插入, 阻止了在小卷蛾斯氏线虫 (*S. carpocapsae*) 中定殖。这种插入突变破坏了 *iscA* 和

hscB 基因的共转录,但并不降低 *hscBA* 表达^[13]。

Orchard 和 Goodrich-Blair^[14]首次报道了寡肽转运在无脊椎动物-细菌互作中的作用,他们研究了寡肽摄入对于嗜线虫致病杆菌实验室生长和与寄主共生的重要性。实验中鉴定了嗜线虫致病杆菌寡肽透过酶操纵子,该操纵子负责两个连续的编码寡肽结合蛋白的 *oppA* 基因,以及推测的透过酶编码基因 *oppB*, *oppC*, *oppD* 和 *oppF*。多肽饲喂实验表明, *opp* 操纵子编码功能性的寡肽透过酶。试验中分别构建了 *oppA*(1), *oppA*(2) 和 *oppB* 的突变体,检测了这些突变体在富含多肽的培养基以及线虫寄主中的生长能力。结果发现,无论在培养基中,还是在幼虫血淋巴中, *opp* 突变体菌株的生长表型均发生了变化,但是 *opp* 突变体依然能够启动并维持与寄主的共生作用且具有昆虫致病性^[15]。

4 溶血素相关基因

近几年才开始在致病杆菌中展开溶血素相关基因研究。Brillard 等^[16]筛选了嗜线虫致病杆菌 DNA 文库,对一个 5.7 kb 位点进行鉴定,该位点克隆于大肠杆菌中后会引起溶血现象,但在大肠杆菌 *sheA* 缺失突变体中不表现。该位点与 λ 噬菌体的裂解基因同源,而且,它编码的功能蛋白能够补偿 λ Sam7 突变体的功能。

Cowles 和 Goodrich-Blair^[17]研究表明,嗜线虫致病杆菌溶血素 *XhlA* 对烟草天蛾(*Manduca sexta*)幼虫完整毒性是必需的。亮氨酸应答调节蛋白(Leucine-responsive regulatory protein, Lrp)、鞭毛合成调节子(regulator of flagella synthesis, FlhDC)、二价铁限制都正调控 *xhlA* 的转录,表明 *XhlA* 表达与影响获得和运动调节子是相关联的。为了理解 *XhlA* 在毒性中的作用,他们在研究其在细胞中的靶位时发现 *XhlA* 是一种细胞表面的溶血素,可以降解昆虫的两种主要免疫细胞(粒性白细胞和浆血细胞)以及兔和马红细胞,而且, *xhlA* 是菌株完整毒性所必需的。溶血素共调节蛋白基因(haemolysin co-regulated protein gene, *hcp*)是紧邻 *xhlA* 位点上游的基因,在三价铁限制时其转录水平上升,而且 *hcp* 的表达依赖 Lrp。

5 杀虫毒素蛋白基因

杀虫毒素基因在致病杆菌的分子生物学研究中进行得最为深入,而且已经取得了重大进展。英国科学家 Morgan 等^[18]利用柯氏质粒(cHRIM1)对嗜线虫致病杆菌 PMFI296 菌株基因组文库进行了研究,发现 5 个基因(*xptA1*, -A2, -B1, -C1, -D1)与光状发光杆菌(*P. luminescens*)杀虫毒素有高达 49% 的序列相似性,而且一个稍小的基因 *chi* 与推测的几丁酶基因有 38% 相似性。转座子插入诱变表明基因 *xptA2*, *xptD1* 和 *chi* 对欧洲粉蝶(*Pieris brassicae*)杀虫活性的表达并不重要,而 *xptA1* 在活性表达中起关键作用,完整的活性还需要 *xptB1* 和

xptC1 基因。这些基因在染色体上分布在一起,因此表现在一个单一的柯氏质粒插入体上。虽然完整活性需要多基因,但由 λ P_L 启动的 *xptA1* 基因在大肠杆菌中也具有杀虫活性。这与光状发光杆菌中鉴定的毒素基因不同,后者的基因在大肠杆菌中各自表达时无杀虫活性。这些毒素基因和几丁酶基因的定位以及 cHRIM1 中的可移动因子(插入序列)和 tRNA 基因的存在表明:这些 DNA 区域是细菌基因组的致病岛。嗜线虫致病杆菌基因与远缘菌株光状发光杆菌具有同源相似性,表明与线虫共生的细菌含有一套共同的昆虫毒素。这些菌株从共同祖先分化出来时就有这些基因,使它们能完成类似功能;或者这些菌株之间或者菌株与尚未鉴定的菌株之间发生了基因交换。

该实验室于 2003 年还率先报道了致病杆菌杀虫毒素基因的功能,它们在大肠杆菌中分别表达了下面 4 个 *xpt* 基因:*xptA1* (tcdA/sepA-like; 7841 bp; 推测蛋白 287 kDa), *xptA2* (tcdA/sepA-like; 647 bp; 推测蛋白 285 kDa), *xptB1* (tccC/sepC-like; 3047 bp; 推测蛋白 111 kDa), *xptC1* (tcdB/sepA-like; 4256 bp; 推测蛋白 160 kDa), 并且研究了这些基因的不同组合在对不同昆虫种类的活性表达中的作用。结果显示, *xptB1* 和 *xptC1* 基因在不同细胞中分别表达时不能表现杀虫活性,即需要二者在同一细胞中同时表达; *xptA1* 和 *xptA2* 基因显示不同的抗虫活性谱,但它们均需要 *xptB1* 和 *xptC1* 基因产物以呈现完全抗虫活性;基因 *xptA2*, *xptC1* 和 *xptB1* 在嗜线虫致病杆菌 PMFI296 中以一个多顺反子转录体的形式表达。基因 *xptA2* 和 *xptC1* 失活会使下游基因沉默,而基因 *xptA1* 却以单基因表达,因此,这些基因的排列方式显示出更为进化的结构。长久以来,这些远距离可移动的基因能够发生相互作用,有利于细胞产生杀虫毒性。这些基因通过大量的整合作用,而形成了一个紧密完整的单元^[19]。

国内中山大学崔龙等^[20-21]用原位杂交法从嗜线虫致病杆菌 BP 菌株粘粒文库中筛选出 5 个阳性克隆,分别命名为 *XnBP76*, *XnBP83*, *XnBP203*, *XnBP378*, *XnBP414*。通过 PCR 鉴定, *XnBP83* 包含 PMFI296 菌株的全部杀虫毒素基因,其基因大小与之基本相同,序列相似性在 93% 以上。进一步对 BP 菌株杀虫毒素基因簇中各 ORF 与对棉铃虫口服毒性的关系研究发现, *xptC1* 和 *xptA2* 两个基因中缺少任何一个都会使口服毒性大幅度下降或完全消失,而缺少 *xptD1* 和 *xptA1* 对杀虫活力影响很小。 *xptA2* 的单独表达产物具有口服毒性,但与多基因的联合表达产物相比,其杀虫活性明显降低。中国农业科学院刘峥^[22]利用特异引物从杀虫活性不同的 4 个嗜线虫致病杆菌菌株(CB6, CB33, CB43 和 CB54)中扩增得到了杀虫基因片段 *cb6A1*, *cb33A1*, *cb43A1* 和 *cb54A1*, 它们的核苷酸序列具有高度同源性。构建了嗜线虫致病杆菌北京变种杀虫蛋白基因片

段 *cb6A1* 的非融合表达载体 pBV221-*cb6A1*-1 和融合表达载体 pGEX-KG-CB6A1-2, 并在大肠杆菌中获得了表达, 用含有非融合表达蛋白的饲料 (20 μ g 重组蛋白/g 饲料) 饲喂棉铃虫初孵幼虫, 3 天后幼虫死亡率为 91.67%, 证明 *cbA1* 杀虫蛋白基因片段在大肠杆菌中的表达蛋白具有一定的杀虫活性。

最近, 从嗜线虫致病杆菌中鉴定到一个新的 42 kDa 蛋白, 可杀死 *Galleria mellonella* 和棉铃虫 (*H. armigera*) 等昆虫幼虫, 注射剂量分别为 30 和 40 ng/g 幼虫。重组毒素蛋白对许多昆虫都具有直接注射活性。尽管也发现脂肪体也有所破坏, 但毒素的原初作用位点是中肠^[23-24]。

6 抗生素相关基因

到目前为止已从致病杆菌的代谢产物中分离了多种对人体、牲畜、植物病原菌、昆虫以及结肠癌、乳腺癌、子宫癌等具有明显抑制作用的活性成分, 这些抗生素活性物质有着诱人的开发利用前景^[25-26]。但抗生素属于次生代谢物, 抗生素的合成实际上是由多基因编码的多种酶类经过各自的一步催化反应才最终产生的, 所以大大增加了对致病杆菌抗生素相关基因研究的难度, 使其进展缓慢。龚永兴^[27]构建了嗜线虫致病杆菌北京变种的黏粒文库并筛选到具有抗生素活性的克隆; 而且首次对抗生素抗性相关基因的克隆与表达进行了研究, 并取得相应结果。

7 专利保护基因

近几年, 随着对致病杆菌研究的深入, 相关基因特别是杀虫毒素基因的专利申请越来越引起人们的重视。Smigielski 等^[28]最早对嗜线虫致病杆菌 6 个毒素基因提出申请, Morgan^[29-30]拥有 4 个杀虫剂基因和 1 个线虫控制基因专利, East^[31]的专利涉及嗜线虫致病杆菌和发光杆状菌的 20 个毒素基因, Hey 等^[32]从伯氏致病杆菌 (*X. bovienii*) 中获得 13 个杀虫毒素晶体蛋白基因专利, Bintrim 等^[33]拥有 9 个致病杆菌杀虫毒素晶体蛋白基因专利。无疑这些基因专利对致病杆菌从基础理论研究到实际运用都将起到积极的推动作用。

8 功能未知基因

Goetsch 等^[34]对嗜线虫致病杆菌 PixA 包涵体蛋白进行了研究, 该蛋白有 185 个氨基酸残基, 富含蛋氨酸, 其表达不需要 RpoS。利用 *pixA* 突变菌株进行实验, 结果表明 Pix 对于杀虫毒性、细菌在线虫寄主中的定殖或存活都不是必需的, 对线虫繁殖也不必需。*pixA* 基因在伯氏致病杆菌基因组中不出现, 说明 PixA 是嗜线虫致病杆菌所专化产生的。但是其明确的功能尚不清楚。

9 结论与展望

综上所述, 致病杆菌功能基因的分子生物学研究, 从 20 世纪 90 年代中后期才开始涉及。已报道的致病杆菌功能基因主要包括外膜蛋白基因、运动蛋白基因、共生作用相关基因以及杀虫毒素基因。目前, 由孟山都公司和威斯康星大学等组成的联合研究小组, 已经完成了伯氏致病杆菌 (*X. bovienii*) 和嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophila*) ATCC19061 菌株的基因组测序工作。虽然这些序列还没有以免费共享资源在 NCBI 上正式公布, 但可以预测, 致病杆菌各功能基因研究的浪潮已逐渐来临。

参考文献 (References)

- [1] THOMAS G M, POINAR G O. *Xenorhabdus* gen nov, a genus of entomopathogenic nematophilic bacteria of the family *Enterobacteriaceae* [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1979, 29: 352-360.
- [2] EHLERS R U, WYSS U, STACHEBRANDT E. 16s rRNA cataloguing and the phylogenetic position of the genus *Xenorhabdus* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1988, 50: 1691-1692.
- [3] FISCHER L S M, ARTEAGA-HERNANDEZ E. The bacterial symbiont *Xenorhabdus poinarii* (*Enterobacteriaceae*) is harbored by two phylogenetic related host nematodes: The entomopathogenic species *Steinernema cubanum* and *Steinernema glaseri* (Nematode: *Steinernematidae*) [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 29: 149-157.
- [4] POINAR G O. Taxonomy and biology of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae* [M]// GAUGLER R, KAYA H K ed. Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990: 23-60.
- [5] TABATABAI N, FORST S. Molecular analysis of the two-component genes, *OmpR* and *EnvZ*, in the symbiotic bacterium *Xenorhabdus nematophilus* [J]. Molecular Microbiology, 1995, 17: 643-652.
- [6] FORST S, WAUKAU J, LEISMAN G, *et al.* Functional and regulatory analysis of the *OmpF*-like porin, *OpnP*, of the symbiotic bacterium *Xenorhabdus nematophilus* [J]. Molecular Microbiology, 1995, 18(4): 779-789.
- [7] GIVAUDAN A, LANOIS A, BOEMARE N. Cloning and nucleotide sequence of a flagellin encoding genetic locus from *Xenorhabdus nematophilus*: phase variation leads to differential transcription of two flagellar genes (*fliCD*) [J]. Gene, 1996, 183: 243-253.
- [8] GIVAUDAN A, LANOIS A. *flhDC*, the flagellar master operon of *Xenorhabdus nematophilus*: requirement for motility, lipolysis, extracellular hemolysis, and full virulence in insects [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(1): 107-115.
- [9] HE H, SNYDER H A, FORST S. Unique organization and regulation of the *mrx* fimbrial operon in *Xenorhabdus nematophila* [J]. Microbiology, 2004, 150 (Pt 5): 1439-1446.

- [10] KHANDELWAL P, CHOUDHURY D, BIRAH A, *et al.* Insecticidal pilin subunit from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila* [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(19): 6465–6476.
- [11] VIVAS E I, GOODRICH-BLAIR H. *Xenorhabdus nematophilus* as a model for host–bacterium interactions: rpoS is necessary for mutualism with nematodes [J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(16): 4687–4693.
- [12] HEUNGENS K, COWLES C E, GOODRICH-BLAIR H. Identification of *Xenorhabdus nematophila* genes required for mutualistic colonization of *Steinernema carpocapsae* nematodes [J]. Molecular Microbiology, 2002, 45(5): 1337–1353.
- [13] MARTENS E C, GAWRONSKI-SALERNO J, VOKAL D L, *et al.* *Xenorhabdus nematophila* requires an intact iscRSUA–hscBA–fdx operon to colonize *Steinernema carpocapsae* nematodes [J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(12): 3678–3682.
- [14] ORCHARD S S, GOODRICH-BLAIR H. Identification and functional characterization of a *Xenorhabdus nematophila* oligopeptide permease [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(9): 5621–5627.
- [15] MARTENS E C, GOODRICH-BLAIR H. The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation [J]. Cell Microbiology, 2005, 7(12): 1723–1735.
- [16] BRILLARD J, BOYER-GIGLIO M H, BOEMARE N E, *et al.* Holin locus characterisation from lysogenic *Xenorhabdus nematophila* and its involvement in *Escherichia coli* SheA haemolytic phenotype [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 218(1): 107–113.
- [17] COWLES K N, GOODRICH-BLAIR H. Expression and activity of a *Xenorhabdus nematophila* haemolysin required for full virulence towards *Manduca sexta* insects [J]. Cell Microbiology, 2005, 7(2): 209–19.
- [18] MORGAN J A W, SERGEANT M, ELLIS D, *et al.* Sequence analysis of insecticidal genes from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5): 2062–2069.
- [19] SERGEANT M, JARRETT P, OUSLEY M, *et al.* Interactions of insecticidal toxin gene products from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3344–3349.
- [20] 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, 2003(3): 47–50.
CUI Long, QIU Lihong, FANG Yuanyuan, *et al.* Cloning and characterization of insecticidal toxin genes from *Xenorhabdus nematophilus* BP [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatsen, 2003(3): 47–50.
- [21] 崔龙, 邱礼鸿, 辛智海, 等. 昆虫病原线虫共生菌 BP 品系杀虫毒素基因簇中各基因与杀虫活性的关系 [J]. 微生物学报, 2003, 43(6): 747–752.
CUI Long, QIU Lihong, XIN Zhihai, *et al.* Importance of five genes presented in *Xenorhabdus nematophilus* BP toxin gene cluster to its insecticidal activity [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2003, 43(6): 747–752.
- [22] 刘峥. 嗜线虫致病杆菌 CB6 菌株杀虫活性相关分子机制 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2003.
LIU Zheng. Molecular mechanism associated with insecticidal activity of *Xenorhabdus nematophila* strain CB6 [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2003.
- [23] BROWN S E, CAO A T, 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.
- [24] BROWN S E, CAO A T, HINES E R, *et al.* A novel secreted protein toxin from the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(15): 595–601.
- [25] NG K K, WEBSTER J M. Antimycotic activity of *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) metabolites against *Phytophthora infestans* on potato plants [J]. Journal of Plant Pathology, 1997, 19 (2): 125–132.
- [26] 刘卫京, 杨秀芬, 简恒, 等. *Xenorhabdus* 和 *Photorhabdus* 代谢产物体外抗肿瘤活性 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(1): 1–5.
LIU Weijing, YANG Xiufen, JIAN Heng, *et al.* The anti-tumor activity of metabolites from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* *in vitro* [J]. Natural Product Research and Development, 2004, 16(1): 1–5.
- [27] 龚永兴. 嗜线虫致病杆菌北京变种抗生素抗性相关基因的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2006.
GONG Yongxing. Research on antibiotics resistance-related genes of *Xenorhabdus nematophila* var. *pekingensis* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2006.
- [28] SMIGIELSKI A J, AKHURST R J. Toxin gene from *Xenorhabdus nematophilus*: 5972687[P], 1999–10–26.
- [29] MORGAN J A, ELLIS D, JARRETT P. Insecticidal agents [P]. Patent: WO 0030453–A, 2000–06–02.
- [30] MORGAN J A, ELLIS D, JARRETT P, *et al.* Biological control of nematodes [P]. Patent: WO 0042855–A, 2000–07–27.
- [31] EAST P D. Toxin genes from the bacteria *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens* [P]. Patent: US 6630619, 2003–10–07.
- [32] HEY TD, SCHLEPER A D, BEVAN S A, *et al.* Mixing and matching to proteins for pest control [P]. Patent: WO 2004067727–A, 2004–08–12.
- [33] BINTRIM S B, MITCHELL J C, LARRINUA I M. *Xenorhabdus* to proteins and genes for pest control [P]. Patent: WO 2004067750–A, 2004–08–12.
- [34] GOETSCH M, OWEN H, GOLDMAN B, *et al.* Analysis of the PixA Inclusion Body Protein of *Xenorhabdus nematophila* [J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(7): 2706–2710.

(责任编辑 王士泉)