

荧光发光杆菌 TT01 品系 *pirA2B2* 基因的克隆表达与杀虫活性

孙建宇, 柳春林, 邱礼鸿*

中山大学, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275

摘要: 【目的】*Photorhabdus luminescens* TT01 基因组中的一对 ORF plu4437-plu4436 (简称 *pirA2B2*) 的预测氨基酸序列与另一对已证明编码产物有口服杀虫活性的 ORF plu4093-plu4092 (简称 *pirA1B1*) 有 50% 和 45% 的一致性, 本文旨在研究 *pirA2B2* 基因座的表达产物是否也有杀虫活性。【方法】PCR 扩增并克隆了 *pirA2*, *pirB2* 和 *pirA2B2* 基因, 构建了重组表达载体 pQE-*pirA2*, pQE-*pirB2* 和 pQE-*pirA2B2* 并分别转入 M15 菌株表达, 经 SDS-PAGE 和 Western blot 检测证明 3 个重组菌株经 IPTG 诱导后, 分别成功表达了可溶的 PirA2, PirB2 和 PirA2B2 蛋白。用亲和层析结合脱盐技术对 3 个重组菌株表达的外源蛋白分别进行纯化, 并通过生物测定确定纯化蛋白的杀虫活性。【结果】生物测定结果显示联合表达的 PirA2B2 对大蜡螟和斜纹夜蛾五龄幼虫均有明显的血腔杀虫活性, LD₅₀ 分别为每虫 4.0 和 2.8 μg, 单独表达的 PirA2 或 PirB2 对上述 2 种害虫没有血腔杀虫活性, 但两者的混合物具有与两者联合表达相似的杀虫活性; PirA2B2 对大蜡螟和斜纹夜蛾初孵幼虫均无口服杀虫活性。【结论】*pirA2B2* 是 *P. luminescens* TT01 菌株基因组中的另一个二元杀虫毒素基因。【意义】*pirA2B2* 的成功克隆表达和杀虫功能的确定为进一步研究其与 *pirA1B1* 的关系以及该基因的表达调控等打下了基础。

关键词: 荧光发光杆菌, 杀虫毒素, 基因克隆, 毒素基因

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 04-0532-06

发光杆菌属 (*Photorhabdus*) 和致病杆菌属 (*Xenorhabdus*) 细菌分别为异小杆属 (*Heterorhabditis*) 和斯氏属 (*Steinernema*) 昆虫病原线虫 (entomopathogenic nematodes, EN) 的共生细菌^[1]。在自然界中, 这类细菌存在于昆虫病原线虫感染期幼虫的肠道内。当线虫侵入昆虫体内后, 将其携带的共生细菌释放到昆虫血腔中, 共生菌生长繁殖并分泌杀虫蛋白毒素杀死昆虫^[2]。克隆共生菌杀虫毒素基因并了解其杀虫机理对了解昆虫病原线虫的致病机理, 开发转基因抗虫作物等均有重要意义。

目前, 有口服杀虫活性的共生菌杀虫毒素中研

究得比较清楚的是复合毒素 (Toxin complex, Tc) 和致软毒素 (Make caterpillar floppy, Mef)。Tc 毒素是一类由多个大分子量亚基构成的复合杀虫毒素。Ffrench-Constant 等证明组成 Tc 毒素的多个亚基中, A 亚基本身有一定的杀虫活性, 而 B 和 C 亚基对 A 亚基的杀虫活性有明显的增强作用^[3-5]。致软毒素 Mef 可诱导昆虫血细胞及中肠上皮细胞凋亡, 导致昆虫死亡^[6-7]。2003 年, Duchaud 等报道了 *P. luminescens* TT01 基因组中的一对基因 plu4093-plu4092 (*pirA1B1*) 在大肠杆菌中的表达产物对小菜蛾和多种蚊子幼虫有口服杀虫活性^[8-9], 并将其命名为“发光杆菌昆虫相关” (*Photorhabdus insect-*

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30771457); 博士点基金 (20100171110032)

* 通信作者。Tel: +86-20-84113009; E-mail: qielh@mail.sysu.edu.cn

作者简介: 孙建宇 (1985-), 男, 黑龙江省大庆市人, 硕士研究生, 研究方向为资源微生物学。E-mail: Sunjy_Arthur@163.com

收稿日期: 2011-11-07; 修回日期: 2012-02-25

related Pir) 二元毒素基因 *pirAB*^[10]。Waterfield 等报道了 PirB1 与 Bt 的 δ-内毒素及马铃薯甲虫的一种发育调节蛋白保幼激素酯酶 (Juvenile hormone esterase, JHE) 的氨基酸序列有一定的相似性, 但后续研究证明其并不具有 JHE 酶活性^[10]。Blackburn 证实取食表达了 *pirA1B1* 基因的大肠杆菌后小菜蛾中肠顶端围食膜发生脱落^[5]。目前, 没有找到对 *pirA2B2* 进行进一步研究的报道。生物信息学分析显示, PirA2 与 PirA1 的氨基酸一致性为 50%, E 值为 3e-33, 在最新蛋白质数据库中进行 BLAST, 没有发现 PirA2 有同系物存在; PirB2 与 PirB1 的氨基酸一致性为 45%, E 值 1e-122, 两者在 N-末端都有一个 δ-内毒素超家族的保守结构域。本研究对 *pirA2B2* 基因进行了克隆表达及杀虫活性分析, 以确定其是否是同 *pirA1B1* 一样的二元杀虫毒素基因。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株: 原核表达载体 pQE-30, 克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司; 大肠杆菌 DH5α 和 M15 菌株为本实验室保存。

1.1.2 酶和抗生素: Taq DNA 聚合酶, 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, 氨苄青霉素和卡那霉素均购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 昆虫: 大蜡螟 (*Galleria mellonella*)、斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 五龄幼虫为实验室人工饲养的健康昆虫。

1.1.4 其他试剂: Gel Extraction Kit 及质粒少量提取试剂盒为 Omega Bio-Tek 产品, 蛋白纯化柱购自

GE 公司, 超滤管购自 Millipore。

1.2 细菌培养及生长条件

将液氮保存的共生菌菌株涂布于 NBTA (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, 水 1000 mL, pH7.2-7.4) 平板上 28℃ 培养 48 h, 挑取蓝色初生型单菌落接种到 LB 液体培养基 28℃、200 r/min 震荡培养。E. coli DH5a 和 M15 菌株均在 37℃ 下培养。

1.3 *pirA2 pirB2 pirA2B2* 基因的克隆与测序

根据 *pirA2B2* 基因序列 (登录号 NC_005126), 设计了 3 对引物 (见表 1, GGATCC 和 AAGCTT 分别代表 BamHI 和 HindIII 限制性内切酶切位点) 用于扩增 *pirA2 pirB2* 和 *pirA2B2*, 设计 *pirA2B2* 基因的反向引物时, 特意加入 6 × His 标签的密码子 (阴影处), 使得所表达的 PirA2 毒素蛋白的 C-末端加入 6 × His 标签蛋白, 便于纯化。以 TT01 基因组 DNA 为模板, 用 Ex taq DNA 聚合酶进行扩增。扩增条件为, 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳, 按照 Omega Bio2 Tek Gel Extraction kit 说明进行胶回收纯化。回收产物连接到载体 pMD18-T, 构建重组质粒 pMD-*pirA2*, pMD-*pirB2*, pMD-*pirA2B2* 将其转化到大肠杆菌 DH5α, 利用含 Amp 的 x-gal 平板筛选白色菌落。将其培养在含 Amp 的 LB 液体培养基中过夜, 用 Omega Bio-Tek plasmid Extraction kit 提取重组质粒, 用 BamHI、HindIII 进行双酶切鉴定。鉴定正确的克隆送上海 Invitrogen 公司进行序列测定。所测序列用 BLAST 搜索在 GenBank/EMBL (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中与目的基因进行比对。

表 1 用于从 *Photorehabdus luminescens* TT01 中 PCR 扩增 *pirA2*, *pirB2* 和 *pirA2B2* 基因的引物序列

Table 1 Sequences of the PCR primers used to amplify *pirA2*, *pirB2* and *pirA2B2* genes from *Photorehabdus luminescens* TT01

pQE30 derived clone	Primer sequence (5'→3')
pQE-PirAB	PirA2B2-A: TTTAAGCTTGTGGTGGTGGTGGTGCTCAACTAATTGGTGATAAGAA
The <i>pirA2B2</i> operon excluding the promoter region	PirA2B2-S: ATAGGATCCATGCCAGTCAATCAGATTGGCTTAC
pQE-PirA	PirA2-A: CGCAAAGCTTTGTTTATTCCTTATATTTCCACGAA
The <i>pirA2</i> gene alone	PirA2-S: ATAGGATCCATGCCAGTCAATCAGATTGGCTTAC
pQE-PirB	PirB2-A: CGCAAAGCTTTTACTCAACTAATTGGTGATAAGAA
The <i>pirB2</i> gene alone	PirB2-S: ATAGGATCCATGAGCGATATTGTTAAGTATAACC

1.4 *pirA2*, *pirB2* 和 *pirA2B2* 的表达与蛋白可溶性分析

用 BamHI 和 HindIII 对 pMD-*pirA2*, pMD-*pirB2*, pMD-*pirA2B2* 进行双酶切回收目的片段, 分别构建

重组表达载体 pQE-*pirA2*, pQE-*pirB2* 和 pQE-*pirA2B2*。热激转入大肠杆菌 M15 感受态细胞中, 挑取单个阳性克隆, 接入含氨苄青霉素 (100 μg/mL)、卡那霉素 (25 μg/mL) 的 LB 培养基中, 37℃ 培养过

夜。次日按 1:100 比例接种于含氨基青霉素 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、卡那霉素 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养基中,培养到 OD_{600} 为 0.5–0.7 后,加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol 诱导表达,4 h 后取 1 mL 的菌液,12000 $\times g$ 离心 2 min,收集菌体;加入 0.1 mL 结合缓冲液 (20 mmol/L 磷酸钠,0.5 mol/L 氯化钠,pH7.4) 加入溶菌酶至终浓度 1 mg/mL,并在冰上放置 30 min;然后进行超声波破碎 (200–300 W 破碎 2 s,间歇 2 s),4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 $\times g$ 离心裂解后样品 20 min;吸取上清,并将沉淀重悬于 0.1 mL 裂解缓冲液;各取 40 μL 进行 SDS-PAGE 分析。

1.5 蛋白的纯化、脱盐和定量

分别培养并用 IPTG 诱导重组表达菌株 M15 (pQE-pirA2), M15 (pQE-pirB2) 和 M15 (pQE-pirA2B2) 过夜,12000 $\times g$ 离心 2 min 收集菌体,每克菌体中加入 10 mL 结合缓冲液 (20 mmol 磷酸钠,0.5 mol 氯化钠,pH7.4) 冰浴条件下进行超声波破碎 (200–300 W 破碎 2 s,间歇 2 s) 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 $\times g$ 离心裂解后样品 20 min;吸取上清,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下过镍柱 (购自 GE 公司) 3 次;用洗脱缓冲液 (20 mmol 磷酸钠,0.5 mol 氯化钠,50 mmol 咪唑,pH7.4) 洗脱非特异结合的组分,再用 4 mL 洗脱缓冲液 (20 mmol 磷酸钠,0.5 mol 氯化钠,0.5 mol 咪唑,pH7.4) 洗脱并收集目的蛋白。采用 Millipore 3 kDa Centricon YM-3 超滤管,以 PBS 为替换液对目的蛋白进行离心透析浓缩,使咪唑终浓度 0.083 mmol/L (稀释 4000 倍以上),再取 40 μL 进行 SDS-PAGE 分析,200 μL 分装,放于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。蛋白的定量:使用购自碧云天公司的 Enhanced BCA Protein Assay Kit 按照试剂盒给出的步骤对脱盐后的蛋白进行蛋白定量。

1.6 生物测定

以大蜡螟和斜纹夜蛾为对象进行血腔和口服杀虫活性测定。血腔杀虫活性测定方法如下:准备浓度分别为 10、8、6、4、3、2 和 1 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ 的 PirA2B2 蛋白和浓度分别为 4 和 10 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ 的 PirA2 和 PirB2 蛋白的 PBS 溶液作为处理组;PirA2 和 PirB2 物理混合组是将两者按化学计量比 2:1 的比例混匀后配制而成的终浓度为 4 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ 的 PBS 溶液 (混合液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 1h 使二元蛋白充分接触);以 PBS 稀释 3000 倍的洗脱缓冲液 (0.5 mol 磷酸钠,0.5 mol 氯化钠,0.5 mol 咪唑,pH7.4) 为阴性对

照组。用灭菌的微量注射器将 10 μL 待测溶液从幼虫第 2 对腹足注入试虫血腔,每个处理组 24 头虫。处理后在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下饲养,观察记录昆虫的症状,24 h 和 48 h 记录死亡数,计算 LD50。所有测定均重复 3 次。口服杀虫活性测定方法如下:选取大蜡螟和斜纹夜蛾初孵幼虫,按每克人工饲料加入 100 μL 含 200 μg 待测蛋白的比例配制适量人工饲料,阴性对照组选择 PBS 稀释 3000 倍的洗脱缓冲液与人工饲料进行混合,试虫饲养于 12 孔细胞培养板中,每头试虫饲喂 0.1 g 混有杀虫毒素的人工饲料 (足够 3 d 的饲料),封住培养皿盖以保持湿度,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下饲养 3 d 之后再加入 0.1 g,6 d 后称量试虫体重。每组试虫 24 头,重复 3 遍。

2 结果

2.1 pirA2 pirB2 和 pirA2B2 基因克隆及表达载体构建

成功从 TT01 基因组 DNA 中 PCR 扩增得到与 pirA2 pirB2 和 pirA2B2 (分别为 432 bp, 1251 bp 和 1724 bp) 预期大小一致的目的条带 (图 1)。胶回收后与克隆载体 pMD-18T 连接,挑取经酶切验证的质粒送上海英俊公司测序,测序结果与 GenBank 中相应基因的 DNA 序列完全相同。用 BamH I、Hind III 双酶切得到目的片段后插入表达载体 pQE-30 的相应插入位点,构建成重组表达载体 pQE-pirA2、pQE-pirB2 和 pQE-pirA2B2。

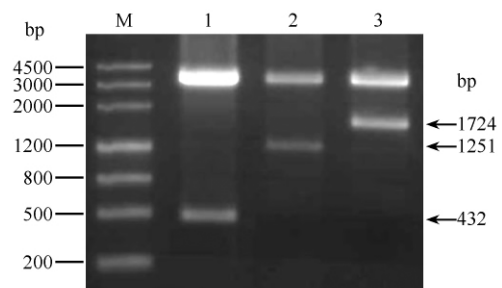


图 1 重组表达载体 pQE-pirA2, pQE-pirB2 和 pQE-pirA2B2 酶切鉴定图

Fig. 1 Restriction analysis of the recombinant vector of pQE-pirA2, pQE-pirB2 and pQE-pirA2B2 with BamH I + Hind III. M: Marker; lane 1–3. pQE-pirA2, pQE-pirB2 and pQE-pirA2B2.

2.2 PirA2 PirB2 和 PirA2B2 蛋白表达与可溶性分析

按照上述操作方法,PirA2,PirB2 和 PirA2B2 蛋

白成功在 M15 细菌中表达。SDS-PAGE 及 Western Blot 分析结果显示, 未经 IPTG 诱导的重组细菌均无目的蛋白条带, 而经 IPTG 诱导的带有 *pirA2* 和 *pirB2* 基因的重组菌株分别有一条明显的 17 kDa 和 47 kDa 条带, 经 IPTG 诱导的 *PirA2B2* 重组菌株有两条明显的蛋白带, 分子量分别为 17 kDa 和 44 kDa, 与预测 *PirA2*, *PirB2* 结果相同 (图 2)。可溶性分析表明, 诱导温度为 28°C 时, *PirB2* 和 *PirA2B2* 蛋白以可溶形式存在, 诱导温度降到 23°C 时, *PirA2* 融合蛋白有 50% 以可溶形式存在。

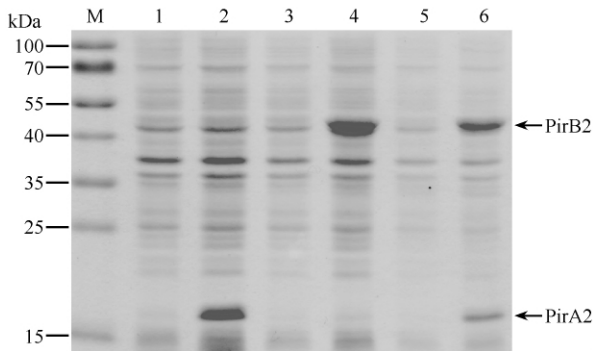


图 2 *PirA2*, *PirB2* 和 *PirA2B2* 在大肠杆菌 M15 中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the *PirA2*, *PirB2* and *PirA2B2* expressed in *E. coli* M15. M: Protein molecular weight standards; Lane 1, 3 and 5: (pQE-*pirA2*) M15, (pQE-*pirB2*) M15 and (pQE-*pirA2B2*) M15 not induced with IPTG; Lane 2, 4 and 6: (pQE-*pirA2*) M15, (pQE-*pirB2*) M15 and (pQE-*pirA2B2*) M15 induced with IPTG.

2.3 *PirA2*, *PirB2* 和 *PirA2B2* 蛋白纯化与脱盐

按照上述操作方法对融合蛋白进行纯化和脱盐, 处理后的 SDS-PAGE 检测结果见图 3, 经 Quantity One 软件定量分析, 目的蛋白纯度达到 95% 以上, 说明目的蛋白得到较好的纯化。重组细菌的 *PirA2*, *PirB2* 和 *PirA2B2* 的产量分别为 20, 40 和 40 mg/L。使用购自 Millipore 的超滤管对纯化后的蛋白进行脱盐, 可将咪唑浓度降低到 0.083 mmol 以下。

2.4 *PirA2B2* 蛋白的杀虫活性

注射剂量大于每虫 4 μg 的 *PirA2B2* 蛋白 10 min 后, 大部分大蜡螟幼虫停止进食, 体色逐渐由乳白色变成深棕色, 身体膨胀, 行动迟缓, 死亡集中发生在注射后的 12 h 内, 12 h 至 48 h 之间仍可见死亡现象, 48 h 后死亡恒定 (图 4)。注射剂量小于每虫 4 μg 的, 出现上述病理现象的大蜡螟数量较少, 对照

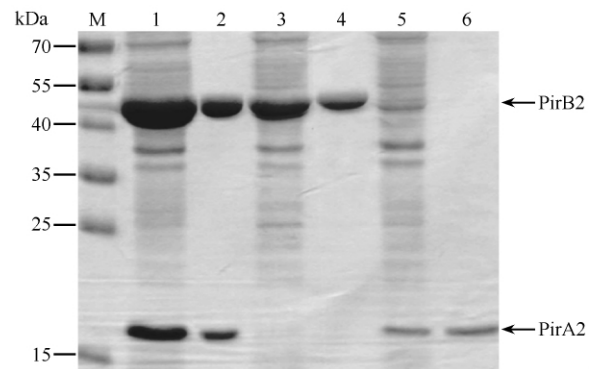


图 3 *PirA2*, *PirB2* 和 *PirA2B2* 蛋白经纯化及脱盐后的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the *PirA2*, *PirB2* and *PirA2B2* expressed in *E. coli* M15 as soluble proteins followed by the purification and desalination protocols described. M: Protein molecular weight standards; Lane 1, 3 and 5: unpurified *PirA2B2*, *PirB2* and *PirA2*, respectively; Lane 2, 4 and 6: purified and desalinated *PirA2B2*, *PirB2* and *PirA2*, respectively.

组和注射 *PirA2* 或 *PirB2* 蛋白的处理组幼虫没有类似的病理现象出现, 也没有出现死亡幼虫。这说明上述病理现象和幼虫死亡是 *PirA2* 和 *PirB2* 蛋白联合作用导致的, 而且只有这两种蛋白同时存在才具有杀虫活性。相比大蜡螟, 斜纹夜蛾对 *PirA2B2* 毒素蛋白更为敏感, 注射 *PirA2B2* 毒素蛋白后, 斜纹夜蛾的死亡出现在 12 h 内, 之后并未见死亡发生, 并且注射 *PirA2* 毒素蛋白后, 斜纹夜蛾的生长在 48 h

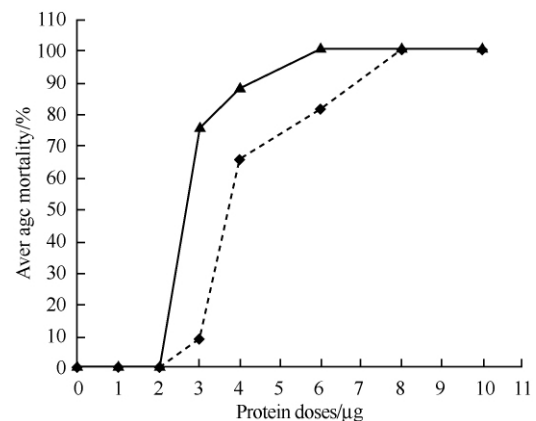


图 4 注射 *PirA2B2* 后 48 h 大蜡螟和斜纹夜蛾五龄幼虫的死亡率

Fig. 4 The dose-response mortality curve of the fifth instar larvae of *Galleria mellonella* (dotted line) and *Spodoptera litura* (solid line) to *PirA2B2* at 48 hours after injection, Bar represents means \pm SD ($n = 3$), * represents very significant difference ($P < 0.01$).

内受到一定程度的抑制,之后生长恢复正常。PirA2B2 毒素蛋白对斜纹夜蛾和大蜡螟的 LD50 分别为每虫 2.8 和 4.0 μg 。物理混合组的幼虫死亡率与相同浓度 PirA2B2 实验组的没有显著差异,这说明物理混合可以恢复二元毒素的血腔杀虫活性。

口服杀虫活性测试结果显示,不论是蜡螟还是斜纹夜蛾,实验组与对照组均没有幼虫死亡,而且虫体的平均体重也无显著差异($P > 0.05$),说明 PirA2B2 对大蜡螟和斜纹夜蛾不具有口服杀虫活性。

3 讨论

本研究证明 PirA2B2 基因的联合表达产物对大蜡螟和斜纹夜蛾 5 龄幼虫具有血腔杀虫活性,LD50 分别为每虫 4.0 和 2.8 μg 。与已研究过的共生菌杀虫毒素相比,PirA2B2 毒素的毒力相对较低,从 *X. nematophila* 中分离得到的 Xpt40 对大蜡螟的血腔注射 LD50 为每虫 26 ng^[11],*P. luminescens* 的毒素蛋白 TcA 注射烟草天蛾老熟幼虫,LD50 为每虫 550 ng^[12],克隆表达 *X. nematophila* 的 Pit 蛋白后注射大蜡螟老熟幼虫,LD50 为每虫 30 ng^[13],由于研究 Mcf1, Mcf2, XptB1, PirA1B1 血腔注射活性时采用的是直接注射重组的大肠杆菌菌体^[6-7,10,14],而非纯毒素蛋白,所以无法定量比较。PirA2B2 毒素的毒力相对较低,可能是毒素本身的性质决定的,也可能是分离纯化过程影响了二元毒素的结构,从而影响了毒力造成的,还需进一步研究确定。

本试验以用 PBS 稀释 3000 倍的洗脱缓冲液为阴性对照组,为最低稀释倍数的 1/2,结果证明残存在 PirA2B2 溶液中的洗脱缓冲液成分对供试昆虫无毒害。本试验证明了 PirA2 与 PirB2 单独对昆虫没有杀虫活性,这一方面证明了 PirA2B2 与 PirA1B1 一样是一个二元毒素,也进一步证明残存在 PirA2B2 溶液中的洗脱缓冲液成分对供试昆虫无毒害。PirA2 和 PirB2 物理混合物对大蜡螟和斜纹夜蛾有杀虫活性的试验结果与 Waterfield 对 PirA1B1 的研究结果相似,Waterfield 发现,对分别重组表达 PirA1 和 PirB1 的大肠杆菌进行物理混合后,可以恢复对大蜡螟的血腔杀虫活性,但对烟草天蛾的血腔杀虫活性并未得到恢复^[10]。

本研究证明 PirA2B2 对大蜡螟和斜纹夜蛾具有血腔杀虫活性的二元毒素,PirA2B2 的成功表达和

纯化为进一步研究该二元毒素的功能、表达调控和杀虫机理等打下了基础。

参考文献

- [1] Poinar GO. Nematodes for Biological Control of Insects. Boca Raton, Florida, CRC Press. 1979.
- [2] Bowen D, Rocheleau TA, Blackburn M, Andreev O, Golubeva E, Bhartia R, ffrench-Constant RH. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science*, 1998, 280(5372): 2129-2132.
- [3] Waterfield N, Hares M, Yang G, Dowling A, ffrench-Constant R. Potentiation and cellular phenotypes of the insecticidal Toxin complexes of *Photorhabdus* bacteria. *Cellular Microbiology* 2005, 7(3): 373-382.
- [4] Liu D, Burton S, Glancy T, Li ZS, Hampton R, Meade T, Merlo DJ. Insect resistance conferred by 283-kDa *Photorhabdus luminescens* protein TcdA in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(10): 1222-1228.
- [5] Blackburn MB, Farrar RR, Novak NG, Lawrence SD. Remarkable susceptibility of the diamondback moth. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2006, 121(1): 31-37.
- [6] Waterfield NR, Daborn PJ, Dowling AJ, Yang G, Hares M, ffrench-Constant RH. The insecticidal toxin Makes caterpillars floppy 2 (Mcf2) shows similarity to HrmA, an avirulence protein from a plant pathogen. *FEMS Microbiology Letters* 2003, 229(2): 265-270.
- [7] Daborn PJ. A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(16): 10742-10747.
- [8] Ahantarig A, Chantawat N, Waterfield NR, ffrench-Constant R, Kittayapong P. PirAB Toxin from *Photorhabdus asymbiotica* as a Larvicide against Dengue Vectors. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(13): 4627-4629.
- [9] Duchaud E, Rusniok C, Frangeul L, Buchrieser C, Givaudan A, Taourit S, Boes S, Boursaux-Eude C, Chandler M, Charles JF, Dassa E, Derose R, Derzelle S, Freyssinet G, Gaudriault S, Médigue C, Lanois A, Powell K, Siguier P, Vincent R, Wingate V, Zouine M, Glaser P, Boemare N, Danchin A, Kunst F. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(11): 1307-1313.

- [10] Waterfield N , George Kamita S , Hammock BD , French-Constant R. The Photorhabdus Pir toxins are similar to a developmentally regulated insect protein but show no juvenile hormone esterase activity. *FEMS Microbiology Letters* 2005 245(1) : 47-52.
- [11] Brown SE. A Novel Secreted Protein Toxin from the Insect Pathogenic Bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of Biological Chemistry* 2004 279(15) : 14595-14601.
- [12] Blackburn M , Golubeva E , Bowen D , French-Constant RH. A novel insecticidal toxin from *photorhabdus luminescens* , toxin complex a (Tca) , and its histopathological effects on the midgut of *manduca sexta*. *Applied and Environmental Microbiology* ,1998 ,64 (8) : 3036-3041.
- [13] Li M , Wu G , Liu C , Chen Y , Qiu L , Pang Y. Expression and activity of a probable toxin from *Photorhabdus luminescens*. *Molecular Biology Reports* , 2008 36(4) : 785-790.
- [14] Joo Lee P , Ahn JY , Kim YH , Wook Kim S , Kim J Y , Park J S , Lee J. Cloning and heterologous expression of a novel insecticidal gene (tccC1) from *Xenorhabdus nematophilus* strain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004 319(4) : 1110-1116.

Cloning , expression and insecticidal activity of the *pirA2B2* gene from *Photorhabdus luminescens* TT01

Jianyu Sun , Chunlin Liu , Lihong Qiu *

State Key Laboratory of Biocontrol , School of Life Sciences , Sun Yat-sen University , Guangzhou 510275 , China

Abstract: [Objective] The predicted amino acid sequence of locus plu4437-plu4436 in the genome of *Photorhabdus luminescens* TT01 (referred to as *pirA2B2*) has a consistency of 50% and 45% with locus plu4093-plu4092 (referred to as *pirA1B1*) , respectively. *PirA1B1* has been confirmed with oral insecticidal activity against *Plutella xylostella* and mosquito. The purpose of the present study was to examine whether *pirA2B2* possesses insecticidal activity. [Methods] *pirA2* , *pirB2* and *pirA2B2* genes were PCR amplified and cloned. The recombinant expression vector pQE-*pirA2* , pQE-*pirB2* and pQE-*pirA2B2* were constructed and transferred into *E. coli* M15 , individually. The soluble *PirA2* , *PirB2* and *PirA2B2* proteins were detected from the supernatant of the recombinant M15 induced with IPTG by both SDS-PAGE and Western-blot. The proteins expressed in the three recombinant *E. coli* M15 strains were purified by affinity chromatography combined with desalination technology and then quantified individually. The haemocoel and oral insecticidal activities of the expressed proteins were analyzed against the larvae of *Galleria mellonella* and *Spodoptera litura*. [Results] The results show: 1. *PirA2B2* had haemocoel insecticidal activity against the fifth instar larvae of both *G. mellonella* and *S. litura* , with an LD50 of 4.0 and 2.8 μg /larvae , respectively , 2. neither *PirA2* nor *PirB2* alone had haemocoel insecticidal activity against the insects tested , while the mixture of *PirA2* and *PirB2* reconstituted full activity , and 3. *PirA2B2* showed no oral insecticidal activity to the first instar larvae of either *G. mellonella* or *S. litura*. [Conclusion] *pirA2B2* in the genome of *P. luminescens* TT01 is a binary insecticidal toxin gene. [Significance] The successful expression and purification of *PirA2B2* laid a foundation for further study on the function , insecticidal mechanism and expression regulation of the binary toxins.

Keywords: *Photorhabdus luminescens* , haemocoel toxin , gene cloning , toxin gene

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771457) and by the Doctoral Program of the Ministry of Education (20100171110032)

* Corresponding author. Tel: +86-20-84113009 , E-mail: qjllh@mail.sysu.edu.cn

Received: 7 November 2011 / Revised: 25 February 2012