

类产碱假单胞菌核心杀虫蛋白基因的转化及杀虫活性

黄敏¹, 李达旭², 向文良^{1,3}, 郭建华¹, 赵健¹, 张杰¹, 杨志荣¹, 孙群^{1*}

(¹四川大学生命科学学院, 成都 610064)

(²四川省草原科学研究院, 成都 611731)(³四川西华大学生命科学学院, 成都 610039)

摘要:【目的】利用类产碱假单胞菌核心杀虫蛋白基因 (*Core Pseudomonas pseudoalcaligenes* insecticidal protein gene, *cppip*) 构建植物表达载体并转化烟草, 以研究 *cppip* 在高等植物体内表达产物的活性。【方法】*cppip* 在烟草基因组中的整合及转录通过烟草转化系 T₀ 代种子发芽的抗生素抗性分离及其 T₁ 代株系的分子检测来证明, 烟草转化系后代表达产物的杀虫效果通过测定蝗虫死亡率来分析。【结果】证明了 *cppip* 能以一定拷贝数插入到烟草基因组内, 并按照孟德尔遗传方式传递给后代; 比较含信号肽 (signal peptide sequence, SPS) 和不含信号肽的类产碱假单胞菌杀虫蛋白基因 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes* insecticidal protein gene, *ppip*) 表达产物的杀虫活性, 发现不含 SPS 的 *ppip* 烟草转化系蛋白表达产物对 2~3 龄蝗虫幼虫的平均致死率为 83.37%, 并对幼虫的生长发育有明显抑制作用, 而含有 SPS 的 *ppip* 烟草转化系蛋白表达产物对 2~3 龄蝗虫幼虫的平均致死率为 15.65%, 两者之间有着显著的差异。【结论】推测 *ppip* 的 SPS 会影响该基因在高等植物体内表达产物的活性, 本研究结果对于高效利用 *ppip* 进行植物转化及抗虫具有重要参考价值。

关键词: 类产碱假单胞菌核心杀虫蛋白基因; 烟草转化; 杀虫活性; 信号肽; 生物测定
中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 09-1198-05

类产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) 是一种对多种草地蝗虫有较强感染力的新型病原细菌^[1]。近年来对该菌的杀虫机理^[2, 3]等研究证明该菌的致病性是由其代谢产生的一种类产碱假单胞菌杀虫蛋白 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes* insecticidal protein, PPIP) 所致。这种杀虫蛋白作用的主要靶点位于蝗虫中肠细胞, 抑制蝗虫中肠细胞的能量代谢, 导致蝗虫死亡^[3, 4]。本实验室已克隆出类产碱假单胞菌杀虫蛋白基因 *ppip* (GenBank: DQ790644), 其编码区长度为 828 bp, 编码 276 个氨基酸残基 (基因结构见图 1-A)。目前该基因已被成功转入到一些牧草基因组中, 但表达效率不高^[5, 6], 杀虫活性低, 开发利用价值不大。因此, 深入研究 *ppip* 各部分结构与杀虫活性的关系, 对利用转基因植物综合防治害虫, 提

高作物的抗虫延续性具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 试验菌株 EHA105 和转化载体 pCAMBIA2301 均由澳大利亚 CAMBIA (Center for Application of Molecular Biology to International Agriculture) 实验室提供。pPPIP (携带全长 *ppip* 的 pCAMBIA2301) 由本实验室自行构建^[5]。类产碱假单胞菌菌株为本实验室自行分离^[1]。

1.1.2 烟草及昆虫: 烟草品种“百日红”无菌组培苗, 由本实验室培育。2~3 龄草地蝗虫 (*Locusta orthoptera*), 由四川大学实验动物中心提供。

1.1.3 主要试剂: pMD18-T 及所用酶均购自 TaKaRa

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目 (2007BAC18B04)

*通讯作者。Tel: +86-28-85412943; Fax: +86-28-85460487; E-mail: hm12190520@163.com

作者简介: 黄敏 (1973-), 女, 安徽嘉山人, 博士研究生, 主要从事资源微生物学方面研究。E-mail: hm12190520@163.com

收稿日期: 2008-03-05; 修回日期: 2008-05-22

公司;胶回收试剂盒购自 V-gene Biotechnology Limited; TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司,植物激素购自北京三博远志生物技术公司;DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I 购自 Boehringer Mannheim 公司。PCR 引物合成及产物测序由上海博亚生物技术公司完成。

1.2 植物表达载体的构建

以 pPPIP 为模板,通过特异设计的 PCR 引物,分别扩增获得不含信号肽(signal peptide sequence, SPS)和非翻译区序列(untranslated region, UTR)的类产碱假单胞菌核心杀虫蛋白基因(Core *Pseudomonas pseudoalcaligene* insecticidal protein gene, *cppip*)以及只含 SPS 不含 UTR 的类产碱假单胞菌杀虫蛋白基因(*cppip-S*)。由 PCR 引入 *Xba*I 和 *Sac*I 酶切位点。反应程序:94 5 min; 94 1 min, 55 1 min, 72 1 min, 30 个循环; 72 5 min。PCR 产物电泳后回收测序。回收片段和 pCAMBIA2301 经 *Xba* / *Sac* 双酶切后以 T4DNA 连接酶连接,分别构建植物表达载体 pCPPIP (携带 *cppip* 的 pCAMBIA2301) 和 pCPPIP-S (携带 *cppip-S* 的 pCAMBIA2301),连同已构建的 pPPIP 植物表达载体^[5],转化 DH5 α 感受态细胞,获得 3 个载体的阳性克隆。表 1 为克隆全长 *ppip*、*cppip* 和 *cppip-S* 的特异性引物序列。

表 1 扩增目的片段的特异性引物序列

Table 1 Primers for the amplification of different *ppip* constructs

Construct	Primer(5 \rightarrow 3)
<i>ppip</i>	TTTCTAGATTCGCAAGACGGCGTGGT TAAGAGCTCCTCTATCCAGCGTTGGCG
<i>cppip</i>	TCGICTAGAATGGATTACGCGGCCTTG AGTGAGCTCTCACGTTTGATCCTGGCA
<i>cppip-S</i>	AGCTCTAGAATGGCTATCTTGCCGGTA TATGAGCTCTCACGTTTGATCCTGGCA

1.3 烟草转化及 T₀ 种子的抗性分离检测

采用叶盘法^[7],将 pPPIP、pCPPIP 和 pCPPIP-S,转化烟草,经卡那霉素抗性筛选分别获得相应的转化植株。烟草转化系 T₀ 种子在卡那霉素抗性培养基上检测遗传分离情况:种子依次用 70% 的乙醇处理 5 min, 15% NaClO₃ 处理 15 min,灭菌双蒸水洗涤 5 次,于灭菌滤纸上晾干后置于发芽培养基(MS 培养基, 75 mg/L 卡那霉素, pH5.8)上,每个平皿约放 40 颗种子,在 28 光照培养箱中,14 h: 10 h(光照:黑暗)培养 20 d,同时用野生型烟草种子为对照,观察 3 种烟草转化系 T₀ 种子在卡那霉素抗性培养基上的发

芽及生长状况。

1.4 烟草转化系 T1 代株系的 PCR 检测

提取 3 种烟草转化系中分离比例不同的部分 T1 代植株的 DNA 进行 PCR 检测,同时以野生型烟草为阴性对照,以 pPPIP 质粒为阳性对照。PCR 引物和反应程序与 1.2 中相同。(阳性对照和阴性对照均用克隆全长 *ppip* 的引物进行 PCR 扩增)

1.5 烟草转化系 T1 代株系的 Southern 杂交分析

分别将 3 种烟草转化系 T1 代株系的总 DNA、野生型烟草(阴性对照)的总 DNA 和 pPPIP 质粒(阳性对照)分成两份,一份用限制性内切酶 *Xba*I 和 *Sac*I 进行双酶切,另一份用 *Hind* III 进行单酶切,电泳检测酶切效果。在电压为 45 V,胶浓度为 0.8% 的琼脂糖凝胶中电泳 16~18 h,然后转移到尼龙膜上。用扩增所得的 *cppip* 片断作为杂交探针的模板,采用 PCR 法对探针进行地高辛标记后,与尼龙膜上的 DNA 片段进行杂交。Southern 杂交方法详见 DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒使用说明书。

1.6 烟草转化系 T1 代株系的 RT-PCR 分析

称取 3 种烟草转化系的叶片各 100 mg,用灭菌去离子水反复冲洗干净后在液氮中研磨,按 TRIzol 说明书的方法提取 T1 代株系叶片的总 RNA,同时以野生型烟草为对照,进行 RT-PCR 分析。RT-PCR 引物与 1.2 中相同。具体步骤详见 One Step RNA PCR Kit(AMV)试剂盒的使用说明书。各项参数为:RT 反应(50 30 min) RTase 失活(94 2 min) PCR 扩增(94 30 s, 55 30 s, 72 1.5 min, 30 Cycles)。反应结束后,取 8 μ L 反应液进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析,电泳时以 pPPIP 的 PCR 扩增产物为阳性对照。

1.7 烟草转化系 T1 代株系的生物测定

因蝗虫不喜食烟草叶片,因此本实验提取 3 种烟草转化系 T1 代株系的杀虫蛋白粗提物饲喂蝗虫若虫,进行生物测定。具体方法如下:各烟草转化系分别取 30 份待测 T1 代叶片各 150 g,提取总蛋白,富集其中大小为 10~40 kDa 的蛋白质得到杀虫蛋白粗提物。将每份叶片的杀虫蛋白粗提物浓缩为 1.5 mL 的样品,每天上午 10 点左右对饥饿的 2~3 龄蝗虫(10 只一组)进行 1 次滴喂,每次 25 μ L,滴喂 1 h 后将蝗虫转移至新鲜玉米幼苗上饲养,连续滴喂 2 d,统计 5 d 内蝗虫的死亡情况。实验重复 3 次。计算死亡率(校正死亡率=(处理的平均死亡率-对照的平均死

亡率)/对照的平均存活率 $\times 100\%$)，同时用野生型烟草为对照进行生物测定，采用称重法检测杀虫蛋白对昆虫生长发育的抑制作用。

2 结果和讨论

2.1 构建植物表达载体

利用表 1 设计的特异性引物进行 PCR 扩增获得 *cppip* 和 *cppip-S* 产物片段，通过酶切和连接分别获得含有 *cppip* 和 *cppip-S* 的植物表达载体 pCPPIP 和 pCPPIP-S (通用表达元件见图 1-B)。将这两种植物表达载体连同已构建的 pPPIP 植物表达载体^[5]分别转化根癌农杆菌 EHA105 菌株，并对(Kan+Str+Rif)表现为三重抗性的转化子单克隆进行 PCR 扩增检测，阳性克隆转化烟草，获得的烟草转化系用于下一步实验。

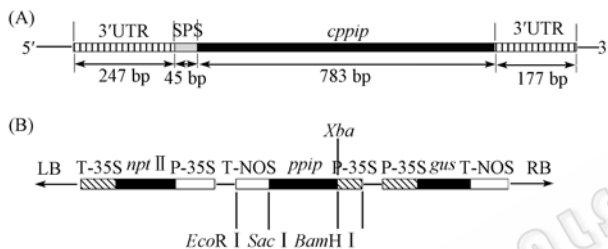


图 1 类产碱假单胞菌杀虫蛋白基因(A)和植物表达载体 pCPPIP(B)的元件图

Fig. 1 Diagram of the element of the *Pseudomonas pseudoalcaligene* insecticidal protein gene (A) and the plant expression vector pCPPIP (B). A: The code frame of *ppip* gene included SPS(signal peptide sequence) and *cppip*, its length is 828 bp plus 5'- and 3'- UTR (untranslated region). B: The *ppip* gene is under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter with nopaline syntase (nos) as the transcription terminator. The expression cassettes of the *gus* (β -glucuronidase) reporter gene and the *npt II* gene (neomycin phosphotransferase) are included in the T-DNA element.

2.2 转化烟草及其后代的鉴定

2.2.1 转基因烟草后代种子发芽检测:以野生型烟草种子为对照，取部分 T_0 种子进行发芽抗性检测，结果见表 2。

作为对照的野生型烟草的 T_1 株系对卡那霉素全无抗性，而表 2 显示的 3 种烟草转化系 T_1 代株系对卡那霉素的抗性分离符合孟德尔分离比率，该结果初步表明 3 种烟草转化系的 T_1 代株系中含有与 *cppip* 连锁的 *npt II* 基因，由于该基因的表达，使 T_1 代株系对卡那霉素表现为显性抗性，并能够以孟德尔分离方式传递给后代。

表 2 烟草转化系 T_0 代种子发芽对卡那霉素的抗性分离比率
Table 2 Segregation ratios of resistant T_0 seeds of *cppip*-transformed tobacco strains

Transformed strain	Ratio of non-resistant plantlets to resistant plantlets	Segregation ratio
1	43 : 127	1 : 3
3	51 : 147	1 : 3
4	38 : 106	1 : 3
5	41 : 123	1 : 3
7	42 : 131	1 : 3
13	3 : 178	1 : 63
16	12 : 173	1 : 15
30	24 : 74	1 : 3
31	43 : 131	1 : 3

Strain No. 1, 3, 4, 5, 7, 13 and 16 are T_1 -generation tobacco strains containing *cppip*; No. 30 is a T_1 -generation tobacco strain containing *cppip-S* and No. 31 is a T_1 -generation tobacco strain containing *ppip*.

2.2.2 转基因烟草 T_1 株系的 PCR 鉴定:选择的 9 个烟草转化株系均能扩增出目的条带，且扩增的基因片段大小与预期的杀虫基因片段一致，而野生型烟草没有扩增出目的条带(图 2)。实验结果可初步表明杀虫基因片段均成功转入烟草，并能够遗传给后代。

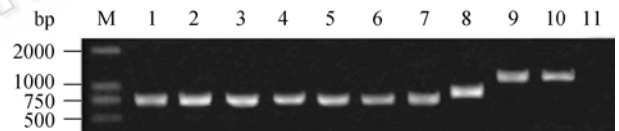


图 2 转烟草 T_1 植株的 PCR 检测

Fig. 2 PCR-based confirmation of transformation for the T_1 generation of transgenic tobacco plantlets. M. DNA marker; 1~7. T_1 -generation tobacco strain containing *cppip*; 8. a T_1 -generation tobacco strain containing *cppip-S* and, 9. a T_1 -generation tobacco strain containing *ppip*; 10. positive control (the product amplified using pPPIP plasmid as template); 11. negative control (wild-type tobacco plantlet).

2.3 Southern 杂交结果

选择抗性分离比较典型的 T_1 代烟草转化系，提取总 DNA，酶切后用于 Southern 杂交分析，结果显示(图 3)，测试的 PCR 阳性植株均有较明显的杂交条带，其中 3 号样品(对应于表 2 中的 13 号菌株)插入的拷贝数可能较多，从杂交条带看可能有 3 个拷贝，而 2 号、5 号和 6 号(分别对应于表 2 中的 5、30、31 号菌株)可能有 1 个拷贝，4 号(对应于表 2 中的 16 号菌株)可能有 2 个拷贝。插入的拷贝数目与对应的株系的抗性分离比例是一致的，这进一步验证了 *cppip*，*cppip-S* 和 *ppip* 被成功地转入烟草基因组，并以孟德尔分离方式显性遗传给后代。

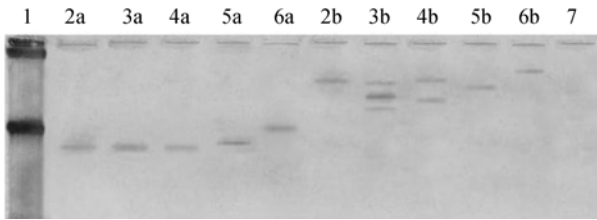


图3 转基因植株的 Southern 杂交结果

Fig. 3 Southern blot analysis of selected plants transformed with *cppip*. a: for DNA samples digested with *Xba*I/*Sac*I enzymes; b: for DNA samples digested with *Hind* III restriction enzyme. 1, PC: pPPIP plasmid digested with *Xba*I/*Sac*I enzymes and used as the positive control; 2-4. T1-generation tobacco strains containing *cppip*; 5a. T1-generation tobacco strain containing *cppip*-S, 6a. T1-generation tobacco strain containing *ppip*; 7. NC: Total DNA of the wild-type tobacco plantlets used as the negative control after digested with *Xba*I/*Sac*I enzymes.

2.4 烟草转化 T1 代株系的 RT-PCR 分析

提取烟草转化系的 T1 代株系的总 RNA 进行 RT-PCR 分析, 结果显示 (图 4), 3 种烟草转化 T1 代株系, 均能够扩增出相应的 cDNA 条带, 阴性对照没有条带, 表明 3 种烟草转化 T1 代株系中的杀虫蛋白基因在烟草基因组中均能够正常转录, 形成 mRNA。

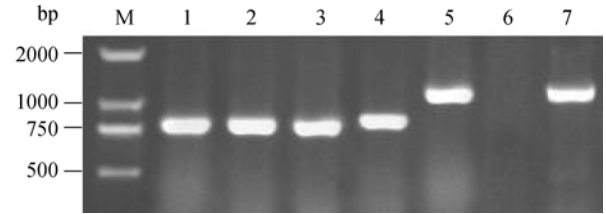


图4 烟草转化 T1 代株系的 RT-PCR 分析

Fig. 4 RT-PCR analysis of the T1-generation plants of selected *cppip*-transformed tobacco strains. M. DNA marker; 1-3. T1-generation tobacco strains containing *cppip*; 4. T1-generation tobacco strain containing *cppip*-S; 5. T1-generation tobacco strains containing full-length *ppip*. 6. NC: wild-type tobacco; 7. PC: the PCR product amplified from pPPIP plasmid.

2.5 基因烟草的生物测定

选择具有抗性分离的 T1 代株系提取杀虫蛋白粗提物, 饲喂 2~3 龄蝗虫若虫, 饲喂结果见表 3。死亡昆虫症状: 虫尸后半部松软, 24 h 后虫尸微发红, 5 d 后病尸渐变为黑色, 挤出的液体呈褐色并有臭味, 用解剖针挑开, 可见虫子中肠腐烂。症状与类产碱假单胞菌杀虫蛋白饲喂蝗虫后症状一致, 由此推断死亡原因是类产碱假单胞菌杀虫蛋白所致。

表 3 数据表明不含 SPS 的转 *cppip* 烟草 T1 代株

表 3 转烟草 T1 代株系杀虫蛋白提取物的生物测定

Table 3 Bioassay of protein extracts from the *cppip*-transformed T1-generation tobacco

Transformed strains	c(Protein extract) /(μ g/ μ L)	Larval weight before feeding /mg	Weight of live larvae after 5 d /mg	Weight gained /mg	Weight gained in the group /mg	Mortality /%	Motility in the group	
Containing <i>cppip</i>	1	0.18	0.56 \pm 0.21	0.63 \pm 0.24	0.07	0.068 \pm 0.012 ^a	77.62	
	3	0.17	0.61 \pm 0.17	0.67 \pm 0.12	0.06		83.37 \pm 0.1032 ^a	
	4	0.18	0.57 \pm 0.19	0.64 \pm 0.15	0.07		81.82	
	5	0.17	0.60 \pm 0.23	0.67 \pm 0.13	0.07		76.64	
	7	0.18	0.59 \pm 0.12	0.66 \pm 0.26	0.07		86.75	
	13	0.16	0.56 \pm 0.26	0.63 \pm 0.19	0.07		91.88	
Containing <i>cppip</i> -S	16	0.16	0.58 \pm 0.31	0.64 \pm 0.07	0.06		89.72	
	30	0.17	0.57 \pm 0.24	1.36 \pm 0.13	0.79	0.80 \pm 0.02 ^b	14.91	
	31	0.17	0.58 \pm 0.21	1.39 \pm 0.13	0.81		16.38	
Containing full-length <i>ppip</i>								
Wild-type tobacco	NC	0.16	0.58 \pm 0.22	1.74 \pm 0.18	1.16	1.16 \pm 0.01 ^c	2.83	0.0283 \pm 0.001 ^b

1, 3, 4, 5, 7, 13 and 16 are T1-generation tobacco strains containing *cppip*; 30 is a T1-generation tobacco strain containing *ppip*-S; 31 is a T1-generation tobacco strain containing full-length *ppip*; NC is a wild-type tobacco. The data were analyzed using the general linear models (GLM) procedure of the data processing system (DPS) statistical package and each value represents the mean and S.D. (n = 3). The letters indicate significant difference between the groups.

系的杀虫蛋白提取物的蝗虫致死率平均为 83.37%, 显著高于含有 SPS 的烟草转化系 (转 *cppip*-S 和 full-length *ppip* 烟草) 的 T1 代株系 (15.65%) 和野生型烟草 (2.83%) 杀虫蛋白提取物的蝗虫致死率。该结果表明不含信号肽序列的 *cppip* 在烟草体内能够表达高活性的杀虫蛋白, 对 2~3 龄蝗虫有较高的致死率, 而含有信号肽序列的 *cppip*-S 和 *ppip* 在烟草体内表达的杀虫蛋白的活性则较低, 对 2~3 龄蝗虫幼虫的致死率也较低。

饲喂转 *cppip* 烟草 T1 代株系杀虫蛋白粗提物的

活体幼虫 5 d 内平均增重 0.068 mg, 显著低于饲喂野生型烟草蛋白粗提物的活体幼虫 5 d 内平均增重量 (1.16 mg) 和饲喂转含有 SPS 的烟草转化系 (转 *cppip*-S 和 full-length *ppip* 烟草) 的 T1 代株系杀虫蛋白粗提物的活体幼虫 5 d 内平均增重量 (0.80 mg), 表明不含信号肽序列的 *cppip* 基因的表达产物对昆虫的生长和发育有显著的抑制作用。

在原核生物中 *ppip* 基因表达产物对目标害虫具有高度特异性的毒杀作用^[2-3]。本研究同时截去 *ppip* 基因

对应的 3 和 5 端的非翻译区序列及信号肽序列, 获得 *cppip* 转化烟草, 使目标昆虫中肠细胞上原毒素作用靶点特异性降低, 核心毒素可非特异地与中肠细胞位点结合^[8], 这种方法不仅提高了类产碱假单胞菌杀虫蛋白与蝗虫中肠细胞的结合能力, 而且操作也比较方便^[9, 10]。

高等植物中, *ppip* 基因表达产物对目标害虫的毒杀效率降低的可能原因是真核生物不能使用原核生物的编码偏好, 影响到杀虫蛋白在真核生物中的正确翻译或后加工, 使杀虫蛋白的杀虫活性降低, 导致转基因株系的杀虫效率低^[11]。本研究比较分析了 *cppip* 和 *cppip-S* 转化烟草后表达产物的杀虫效率, 结果表明, 在烟草体内不含 SPS 的 *cppip* 表达产物的杀虫效率显著高于含有 SPS 的 *cppip-S* 表达产物的杀虫效率, 进一步证明了来自原核生物基因的 SPS 会影响基因本身在真核生物中表达产物的活性。但具体的影响机制, 还有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 刘世贵, 朱文, 杨志荣, 等. 一株蝗虫病原菌的分离和鉴定. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 1995, 35(2): 86–89.
- [2] 张文, 杨志荣. 类产碱假单胞菌杀虫物质的分离纯化和鉴定. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 1998, 38(1): 57–62.
- [3] 杨志荣, 朱文, 葛绍荣, 等. 复合细菌灭蝗剂对脊椎动物的致病性研究. 中国生物防治(*Chinese Journal of Biological Control*), 1996, 12(3): 114–116.
- [4] 赵建, 罗霞, 陈东辉, 等. Study on the locusts energy metabolizability inhibited by the insecticidal protein purified from *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2004, 44 (3): 365–368 (in Chinese).
- [5] 李达旭, 张杰, 赵建, 等. 根癌农杆菌介导转化川草二号老芒麦胚性愈伤组织. 植物生理与分子生物学报(*Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*), 2006, 32(1): 45–51.
- [6] Daxu Li, Qun Sun, Min Huang, et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Elymus breviaristatus* with *pseudomonas pseudoalcaligenes* insecticidal protein gene. *Plant cell tissue and organ culture*, 2007, 5(89): 159–168.
- [7] Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, et al. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 1985, 227: 1229–1231.
- [8] Nicolai S, Menachen K, Jaideep M, et al. A synthetic cry1C gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 15012–15017.
- [9] Bosh B, Bert S, Derkleij H V, et al. Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. *Bio/Technology*, 1994, 12: 915–918.
- [10] Wu D, Aronson AL. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *J Biol Chem*, 1992, 267: 2311–2317.
- [11] Mendelsohn M, Kough J, Vaituzis Z, et al. Are BT crops safe? *Nat Biotechnol*, 2003, 21(9): 1003–1009.

Transformation of core *Pseudomonas pseudoalcaligene* insecticidal protein gene and its insecticidal expression in tobacco

Min Huang¹, Daxu Li^{1,2}, Wenliang Xiang^{1,3}, Jianhua Guo¹, Jian Zhao¹, Jie Zhang¹,

Zhirong Yang¹, Qun Sun^{1*}

⁽¹⁾ College of Life Sciences, Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610064, China

⁽²⁾ Sichuan Grassland Science Academy, Chengdu 611731, China

⁽³⁾ College of Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China

Abstract: [Objective] We studied the effect of the signal peptide sequence (SPS) on the expression of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* insecticidal protein gene (*ppip*). **[Methods]** We obtained the core *pseudomonas pseudoalcaligenes* insecticidal protein gene (*cppip*, *ppip* without the UTR and SPS) by PCR and ligated it into pCAMBIA2301 to generate plant express vector pCPPIP, which was then transformed into tobacco to investigate the insecticidal activity of *cppip* expression products by locust bioassays. The Kanamycin resistance segregation ratio was determined by the germination rate of T₀-generation seeds of the transgenic tobacco. Integration of *ppip* into genomic DNA was detected by PCR and confirmed by Southern blotting. **[Results]** The bioassay with the 2nd and 3rd instar larvae of *Locusta orthoptera* showed that the crude proteins extracted from *cppip* transformed plants caused an average mortality of 83.37%. In contrast, the protein extracts from *ppip* transformed plants caused a much lower mortality (15.65%). The growth of locust was highly inhibited by the expression products of *cppip* when compared with the locusts fed with the protein extracts from wild type tobacco or tobacco transformed with intact *ppip* gene. **[Conclusion]** The results indicated that the SPS might affect the insecticidal activity of *ppip* expressed in plants. The data of this study are helpful for cost-effective genetic engineering of plants with *ppip* gene.

Keywords: bioassay; Core *Pseudomonas pseudoalcaligene* insecticidal protein gene; insecticidal activity; signal peptide; tobacco transformation