

伯氏致病杆菌 IDP16 蛋白抑制大蜡螟的免疫反应

石怀兴, 曾洪梅, 邱德文*

中国农业科学院植物保护研究所, 农业部有害生物综合治理重点实验室, 北京 100081

摘要: 【目的】从伯氏致病杆菌 (*Xenorhabdus bovienii*) 胞外组分中分离纯化出能够抑制大蜡螟 (*Galleria mellonella*) 免疫反应的一种蛋白, 研究其在昆虫病原线虫及其共生菌致病过程中的作用。【方法】采用硫酸铵沉淀和柱层析的方法对活性蛋白进行分离和纯化, 通过体内注射并观察血淋巴黑化进行活性蛋白的筛选; 采用荧光微球和琼脂糖小球评价活性蛋白对血细胞吞噬、包被作用的影响; 采用双向电泳结合质谱分析对活性蛋白进行鉴定, 设计引物用 PCR 的方法克隆其编码基因, 利用 pET 30a 载体进行原核表达, 以亲和层析纯化重组蛋白。【结果】纯化得到一个昆虫免疫抑制蛋白, 命名为 IDP16, 该蛋白可显著抑制大蜡螟血淋巴中的多酚氧化酶活性, 降低血细胞的吞噬和包被作用。克隆得到其编码基因并进行了原核表达, 重组蛋白仍具有免疫抑制活性。【结论】伯氏致病杆菌产生的 IDP16 蛋白能够抑制昆虫的免疫反应, 在共生菌和宿主昆虫互作过程中起着重要的作用。

关键词: 伯氏致病杆菌, IDP16 蛋白, 大蜡螟, 免疫抑制

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 07-0885-09

致病杆菌 (*Xenorhabdus* spp.) 是一种共生于昆虫病原斯氏线虫 (*Steinernema* spp.) 肠道内的革兰氏阴性菌, 属肠杆菌科^[1]。侵染期的线虫进入昆虫血腔以后, 释放其肠道内携带的共生菌, 共生菌在宿主血淋巴中快速繁殖并产生各种毒素蛋白和免疫抑制因子干扰甚至破坏昆虫的免疫系统, 最终将其杀死^[2]。

目前已报道的致病杆菌可产生多种具有口服^[3-5]或者注射活性(血腔毒素)^[4,6-8]的杀虫蛋白和免疫抑制因子^[9-12]。这些物质通过降低血细胞的活力^[6], 使血细胞凝集^[4]、凋亡和溶解^[7,13]来破坏昆虫免疫系统; 或者是通过抑制昆虫体内的磷酸酯酶 PLA2 的活性来降低血细胞免疫活性^[14,10-12,15]

和多酚氧化酶的活性^[10,15], 有的还能够抑制宿主昆虫血淋巴中抗菌物质的活性^[9], 这些免疫抑制反应利于共生菌和线虫在昆虫体内的生存繁殖。

昆虫的免疫系统由细胞免疫和体液免疫两部分组成^[16]: 细胞免疫主要涉及血细胞的吞噬、包被和结节作用, 体液免疫主要包括抗菌肽的产生和多酚氧化酶原 (proPO) 级联反应。病原体侵入昆虫体内以后, 其表面物质被昆虫体内的相关受体识别, 引发昆虫的免疫防御反应, 但这两种免疫反应并不是绝对独立的, 而是相互联系、促进和协作。

目前, 对伯氏致病杆菌 (*X. bovienii*) 产生的杀虫蛋白和免疫抑制蛋白研究较少, 仅有初步分离和活性测定的报道^[17-18]。本文从伯氏致病杆菌胞外

基金项目: 国家自然科学基金 (31071741)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-40-82105929; E-mail: dewenqiu@hotmail.com

作者简介: 石怀兴 (1985-), 男, 山东聊城人, 博士研究生, 主要从事昆虫病原线虫共生菌研究。E-mail: shx.344@163.com

收稿日期: 2012-02-17; 修回日期: 2012-03-31

蛋白中分离得到一种能抑制昆虫免疫的蛋白 IDP16, 克隆得到其编码基因并在大肠杆菌中表达。本工作对进一步研究致病杆菌产生的免疫抑制物质、揭示昆虫病原线虫-共生菌复合体的杀虫机制奠定了重要基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和昆虫: *X. bovienii* 分离自本实验室保存的昆虫病原线虫 *S. feltiae* SN 品系^[19]; 大蜡螟 (*G. mellonella*) 末龄幼虫为本室饲养。

1.1.2 主要试剂和仪器: PCR 相关试剂及大肠杆菌感受态购自北京全式金公司; 限制性内切酶及连接酶购自 NEB 公司; PMD 18-T Simple 克隆载体购自 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收及质粒提取试剂盒购自 Omega 公司; pH 3-10 NL 13cm IPG 干胶条和两性电解质购自 GE 公司; BCA 试剂盒购自 Pierce 公司; Fluorescent Microspheres (荧光微球) 购自 Invitrogen 公司; Grace 昆虫细胞培养基购自 AppliChem 公司; 其他生化试剂均购自 Sigma 公司。Sigma 3-18K 型高速冷冻离心机; GE ÄKTA explor 10 层析系统; PROTEAN II xi cell, Mini-Protein 3 cell, iCycler 基因扩增仪和电泳仪均为 BioRad 公司产品; GE Ettan IPGphor 3 等点聚焦电泳系统; Waters Synapt HDMS High Definition 质谱仪; 岛津紫外分光光度计 2550; Olympus CK40 荧光倒置显微镜。

1.2 细菌培养

参照 Yang 的方法^[20], 将菌种接种于 NBTA 培养基平板上, 挑取 I 型菌单菌落接入胰蛋白胨大豆肉汤培养基培养过夜, 然后转接于 TSB 培养基中, 振荡培养 48 h。

1.3 胞外蛋白提取

除非特别标明, 以下蛋白提取和纯化过程均在 4℃ 进行。

将 1.2 培养的菌液离心弃菌体, 然后在上清液中缓缓加入硫酸铵至 85% 饱和度, 过夜沉淀。12000 × g 离心 20 min 收集沉淀蛋白, 然后溶于适量 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液中, 并装入透析袋 (截留分子量: 8000-14000 Da) 在上述缓冲液中透析过夜, 除盐后的蛋白冻存于 -80℃ 备用。

1.4 胞外蛋白的纯化

将 1.3 透析除盐的蛋白样品, 加至 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 平衡过的 HiTrap Q HP 阴离子交换柱上, 然后用不同浓度的 NaCl 进行步进式梯度洗脱 (0.2, 0.4, 0.6, 1 mol/L), 收集不同的穿透峰和洗脱峰, 透析除盐后分别进行活性测定和 SDS-PAGE。然后在活性组分中加入硫酸铵至 1 mol/L, 上样于 1 mol/L 硫酸铵预平衡过的 HiTrap Butyl FF 疏水柱上, 用 1-0 mol/L 的硫酸铵浓度线性梯度洗脱 10 min, 收集不同的穿透峰和洗脱峰, 透析除盐后分别进行活性测定和 SDS-PAGE。最后, 将活性组分加至 20mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 平衡过的 HiTrap SP HP 阳离子交换柱上, 用 0-1 mol/L 的 NaCl 线性梯度洗脱 20 min, 分别收集穿透峰和洗脱峰并进行活性测定和 SDS-PAGE。蛋白浓度用 BCA 蛋白检测试剂盒测定, 以 BSA 作为标准蛋白。

1.5 蛋白质双向电泳和质谱鉴定

蛋白质的第一向等点聚焦和第二向 SDS-PAGE 分别在 Ettan IPGphor 3 等点聚焦电泳系统和 PROTEAN II xi cell 中进行。第一向等点聚焦, 将 100 μg 的蛋白质溶于适量水化上样液 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% (w/v) CHAPS, 40 mmol/L DTT, 2% (v/v) IPG buffer, 痕量溴酚蓝) 中至 250 μL, 然后上样于等点聚焦槽中, 放入 pH 3-10 NL 13cm IPG 干胶条, 覆盖矿物油, 按如下条件完成等点聚焦: 50 V, 12 h; 500 V, 1 h; 1000 V, 1 h; 8000 V 至总功率为 20 kWh。第二向 SDS-PAGE (12%) 电泳, 于 30 mA/胶条电泳 4 h。考马斯亮蓝染色。

蛋白点的鉴定按文献 [21] 的方法进行。将双向凝胶的蛋白点取下, 胶内酶切消化后, 经液相分离, 在 Synapt HDMS High Definition 质谱仪上进行分析, 所得数据用 Mascot 程序在 NCBI 全细菌基因组数据库中进行检索。

1.6 编码基因的克隆

根据 NCBI 上公布的序列, 设计引物 (F: 5'-ACCCAGGTTGTTGATTTACCTAATC-3'; R: 5'-CCGTTGTTAAACATATCAAGAGGTG-3'), 提取伯氏致病杆菌的基因组 DNA 作为 PCR 反应的模板, 按如下程序进行扩增: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物并回收, 将回收片段连

接至 PMD 18 - T 载体, 转化 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞, 涂板筛选阳性菌落, 送上海生工生物有限公司测序。

1.7 基因的原核表达及重组蛋白的纯化

根据克隆得到的基因序列, 设计带酶切位点的引物 (Nco I-F: 5'-CATGCCATGGCT CAGGCTGAT AAGAACTTGAAGATG-3'; Xho I-R: 5'-CCG CTCG AGTTATTTGATTACTGCATTATCGAC-3'), 按 1.6 的条件进行 PCR 扩增, 产物连接到 pET-30a 载体的 Nco I 和 Xho I 位点, 转入 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 筛选阳性菌落并测序验证。

将测序正确的菌株接种于含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 用 1 mmol/L IPTG 进行诱导表达。离心收集菌体, 用 Binding Buffer (20 mmol/L Tris, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 重悬, 超声破碎 20 min, 12000 \times g 离心 20 min 取上清, SDS-PAGE 电泳检测。

用镍离子金属螯合亲和层析纯化表达产物。将重组蛋白溶液上样于 Binding Buffer 平衡过的 HisTrap HP 柱, 洗去不能结合的蛋白组分, 然后用 40% 的 Elution Buffer (20 mmol/L Tris, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 进行洗脱, 将洗脱组分在 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4) 透析除盐, SDS-PAGE 检测纯化产物并检测其抑制血淋巴黑化的能力。

1.8 黑化反应

参照文献 [22] 的方法。大蜡螟提前用 75% 的酒精消毒, 然后将 5 μ L 待测蛋白液用微量注射器从大蜡螟腹足注入血腔, 于培养皿中室温放置 30 min 后, 用手术剪剪破腹足, 将血淋巴滴在封口膜上, 室温放置 30 min, 观察血淋巴的颜色变化, 如果颜色从黄色变为褐色, 则认为发生了黑化反应, 如果颜色保持黄色, 则认为抑制了血淋巴的黑化反应。注射同体积的缓冲液作为对照, 每个处理重复 3 次。

1.9 多酚氧化酶 (PO) 活性

PO 的活性测定参照文献 [15] 的方法进行。将大蜡螟酒精消毒后取 20 μ L 血淋巴, 加入 5 μ L 待测液混匀, 室温孵育 10 min 后, 加入 975 μ L 含 1 μ g 昆布多糖和 0.01 mmol/L L-多巴的 PBS, 混匀, 在紫外分光光度计上测定其在 495 nm 下的吸光值变化, 其活性大小定义为 5 min 内的吸光值变化。

1.10 对血细胞吞噬的影响

将大蜡螟用 75% 酒精消毒后, 用微量注射器将

5 μ L 待测液注入昆虫血腔中, 于培养皿中室温放置 30 min, 然后将 5 μ L 荧光微球悬液 (5×10^6 个/ μ L) 注入昆虫血腔中, 室温静置 2 h 后, 剪开大蜡螟腹足, 移液枪吸取 20 μ L 血淋巴, 柔和混匀在 180 μ L 预冷的抗凝缓冲液 (98 mmol/L NaOH, 186 mmol/L NaCl, 17 mmol/L Na₂·EDTA, 41 mmol/L 柠檬酸, pH 4.5) [12] 中, 低速离心 5 min (2000 \times g, 4 $^{\circ}$ C), 将收集到的血细胞重悬于 200 μ L 含 10% 胎牛血清的 Grace 昆虫细胞培养基中, 荧光显微镜下分别用明场和 580 nm 激发光检测荧光小球被血细胞吞噬的情况, 与细胞重叠的荧光小球即计为被吞噬, 其余为自由状态, 重复 5 次。

1.11 对血细胞包被的影响

将大蜡螟用 75% 酒精消毒后, 用微量注射器将 5 μ L 待测液注入昆虫血腔中, 于培养皿中室温放置 30 min 后, 剪开大蜡螟腹足, 移液枪吸取 20 μ L 血淋巴, 柔和混匀在 180 μ L 预冷的抗凝缓冲液中, 低速离心 5 min (2000 \times g, 4 $^{\circ}$ C), 将收集到的血细胞重悬于 200 μ L 含 10% 胎牛血清的 Grace 昆虫细胞培养基中, 转移至 96 孔板中, 然后每个孔中加入几粒琼脂糖小球, 室温静置 12 h, 显微镜下观察小球的包被情况。

2 结果和分析

2.1 免疫抑制蛋白的纯化

伯氏致病杆菌的胞外蛋白经硫酸铵沉淀和透析脱盐后, 用 HiTrap Q HP 阴离子交换柱进行初步分离得到 4 个峰, 脱盐后分别注入大蜡螟血腔观察血淋巴的黑化反应, 检测发现 0.2 和 0.4 mol/L NaCl 的洗脱组分 A2 和 A3 具有抑制大蜡螟血淋巴黑化的能力 (图 1 - A), 且 A3 活性较高, 故将 A3 作为下一步层析分离的组分。A3 经 HiTrap Butyl FF 疏水柱分离得到 3 个峰, 活性检测显示穿透峰 B1 能够抑制血淋巴黑化 (图 1 - B)。最后 B1 在 HiTrap SP HP 阳离子交换柱上分离得到穿透峰 C1 和洗脱峰 C2, 活性检测发现 0 - 0.1 mol/L NaCl 洗脱得到的 C2 具有抑制大蜡螟血淋巴黑化的作用 (图 1 - C)。SDS-PAGE 检测 C2 为单一蛋白条带, 表观分子量大约 16 kDa (图 1 - D)。BCA 法测得所得蛋白组分浓度为 0.2 mg/mL。

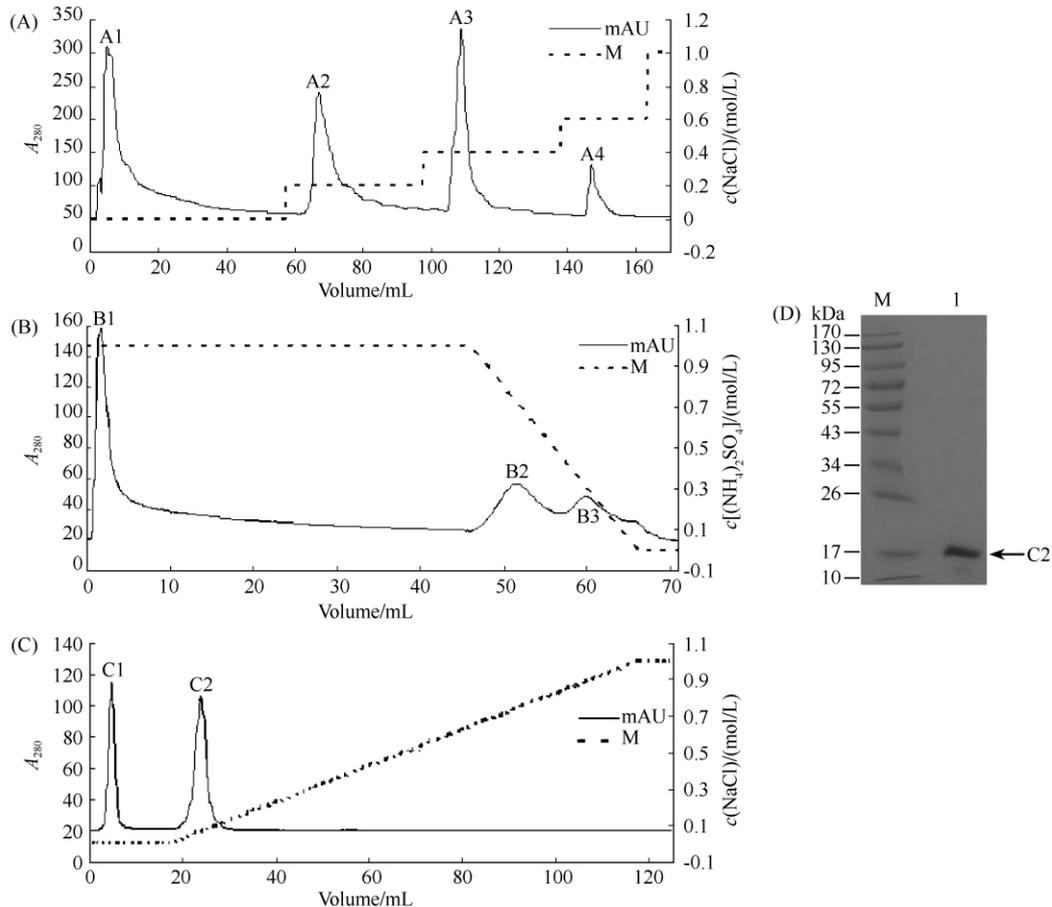


图1 伯氏致病杆菌胞外免疫抑制蛋白的分离纯化

Fig. 1 Purification of immunodepressive protein from extracellular extract of *X. bovienii*. A: Step-elution profile of immunodepressive proteins from HiTrap Q HP column; B: linear elution profile of immunodepressive proteins from HiTrap Butyl FF column; C: Linear elution profile of immunodepressive proteins from RESOURCE Q column; D: SDS-PAGE analysis of purified protein.

2.2 纯化蛋白的质谱鉴定

C2 经双向电泳分离,为单一蛋白点(图2),表现分子量和等电点分别为 16 kDa 和 5.2。挖取该蛋白点进行胶内酶切后,进行 LC-MS/MS 分析,所得数据在 Mascot 检索后得分为 304,有一个显著匹配的蛋白,检索结果显示 C2 蛋白的 3 个肽段与伯氏致病杆菌 *X. bovienii* SS-2004 基因组中一个与丝氨酸蛋白酶抑制剂 ecotin 同源的蛋白(CBJ80493)(图2B)相匹配($p < 0.05$),其理论分子量和等电点分别为 16.01kDa 和 4.98,与双向结果吻合。我们将纯化的蛋白命名为 IDP16 (a 16kDa immunodepressive protein)。

2.3 基因克隆及序列分析

利用特异引物,我们从伯氏致病杆菌(*X.*

bovienii) 基因组 DNA 中克隆得到 IDP16 的全长(GenBank 登录号:JQ669674),该基因共 483bp,编码 160 个氨基酸,经 SignalP 4.0 预测,该蛋白前 19 位为信号肽序列,成熟 IDP16 蛋白共 141 个氨基酸,比大肠杆菌的 ecotin (GenBank 登录号:AAA23719)少一个氨基酸,两者序列一致度达 54.93%。其中二者的 60 s 和 100 s 环结构序列完全一致,50 s 和 80 s 环序列部分相同(图3)。

2.4 IDP16 对大蜡螟血淋巴中多酚氧化酶活性的影响

大蜡螟血淋巴黑化反应是由多酚氧化酶的活化引起,我们以 DOPA 作为底物检测了 IDP16 对多酚氧化酶的影响。图4-A 显示,BSA 孵育的血淋巴在加入多巴以后,氧化产物多巴醌的量不断增加,



图 2 纯化蛋白的双向电泳和质谱分析
 Fig. 2 2-D analysis of purified protein and MS identification. A: 2-D analysis of purified protein; B: The sequence of the ecotin from *X. bovienii* SS-2004, underline indicated the matched peptide.

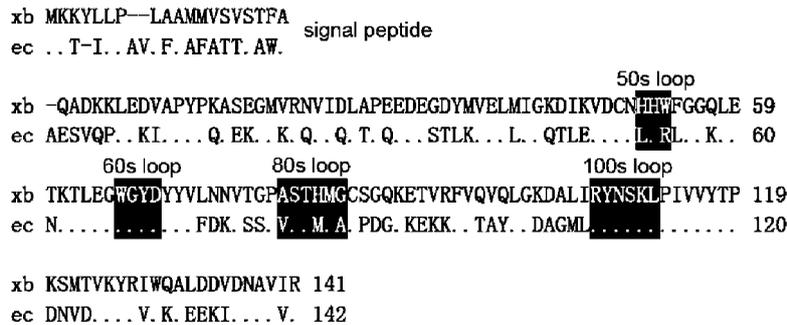


图 3 IDP16 与大肠杆菌 ecotin 的序列比对

Fig. 3 Alignment of IDP16 and ecotin from *E. coli*. Shade are functional sites involved in proteinase inhibition.

过的大蜡螟，其血细胞对琼脂糖小球的包被能力明显降低，血细胞在小球周围聚集不明显（图 5）。

2.7 IDP16 的原核表达及重组蛋白的活性验证

IDP16 基因与 pET-30a 载体连接后，转入大肠杆菌中进行诱导表达，经 SDS-PAGE 电泳检测在目的蛋白预期大小 (24 kDa) 处有一条特异性表达的条带 (图 6)。透析除盐的重组蛋白洗脱组分注入大蜡螟血腔中，具有抑制血淋巴黑化的能力，且与天然蛋白同浓度条件下，多酚氧化酶的活性为对照的 31.5% (数据未显示)，与天然蛋白活性相当。

25 min 后酶活性稍有降低但产物量仍在增加，50 min 后多巴醌的量达到最大并维持稳定。IDP16 孵育的血淋巴在加入底物的 25 min 内，氧化产物多巴醌的量增加缓慢，多酚氧化酶的活性较对照低 (图 4-B)，IDP16 孵育的血淋巴中多酚氧化酶的活性仅为对照活性的 25.6%，且差异显著 (LSD test, $p < 0.05$)，这说明 IDP16 能够显著抑制大蜡螟血淋巴中的多酚氧化酶的活性。

2.5 IDP16 对大蜡螟血细胞吞噬活性的影响

将 IDP16 注入大蜡螟血腔 30 min 后，采用二次注入的方式将荧光微球注入血腔，观察血细胞吞噬能力的变化，结果显示 IDP16 使大蜡螟血细胞对荧光微球的吞噬率降低至 30.9%，仅为对照的 70%，差异显著 (LSD test, $p < 0.05$)。

2.6 IDP16 对大蜡螟血细胞包被活性的影响

将 IDP16 注入大蜡螟血腔 30 min 后，收集血细胞观察其对琼脂糖小球的包被活性，经 IDP16 处理

3 讨论

多酚氧化酶是一种含铜的氧化还原酶，在昆虫体内以无活性的多酚氧化酶原存在于昆虫血淋巴和血细胞中，病原体侵入昆虫体内以后被相关受体识别，并由丝氨酸蛋白酶介导引发多酚氧化酶的级联反应，将 L-酪氨酸羟化，产生 L-多巴，再将 L-多巴氧化成多巴醌，醌与蛋白结合导致硬化，进而生成一系列引起褐化的色素类物质，这些醌类物质和黑色素对侵入昆虫体内的线虫及共生菌会产生毒害作用，抵御病原物的侵染 [23-24]。

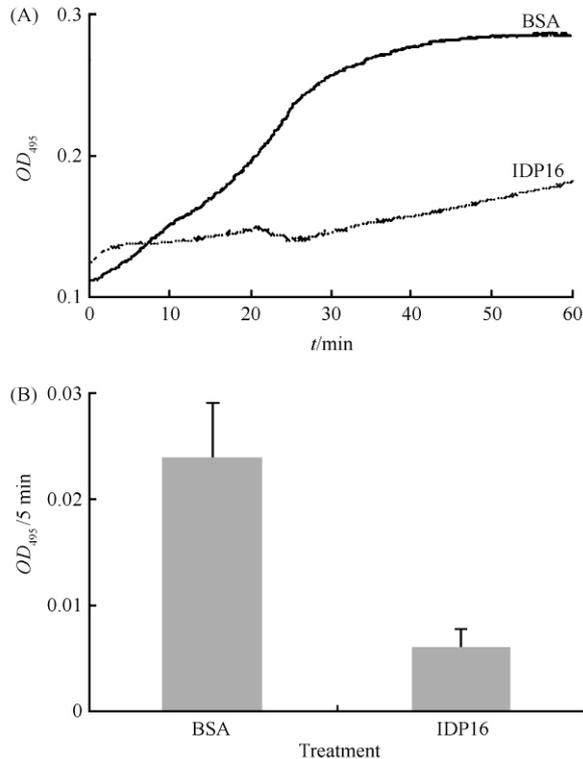


图4 IDP16 对大蜡螟血淋巴中多酚氧化酶活性的影响

Fig. 4 IDP16 influence on hemolymph PO activity of *G. mellonella*. A: Time course of PO activity in BSA or IDP16 - incubated hemolymph; B: Comparison of PO activity in BSA and IDP16 - incubated hemolymph.

线虫-细菌复合体侵入昆虫血腔以后, 引发 proPO 级联反应产生的醌类物质和黑色素能够参与血细胞对菌体的凝聚成结和对线虫的包裹作用^[16], 并能增强血细胞对菌体的吞噬作用^[24], 进而将病原物杀死或清除出体外。

这些醌类及黑色素物质的产生和包裹、结节、吞噬的形成对线虫及共生菌的生存显然是不利的, 在复合体与宿主相互作用的过程中, 线虫或者共生菌就会产生一些活性物质去削弱宿主昆虫的免疫反应以利于自身的定殖, 比如昆虫病原斯氏线虫 *S. carpocapsae* 产生一种糜蛋白酶, 能够抑制多酚氧化酶活性阻止黑化, 同时降低血细胞的包裹能力^[25]; 嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophilus*) 菌体也可以抑制多酚氧化酶活性和降低血细胞的吞噬结节能力^[10,15]; 有报道证明昆虫病原线虫共生菌发光杆菌 (*Photorhabdus luminescens*) 能产生蛋白酶抑制剂或小分子抗生素, 并通过抑制多酚氧化酶的活性来削

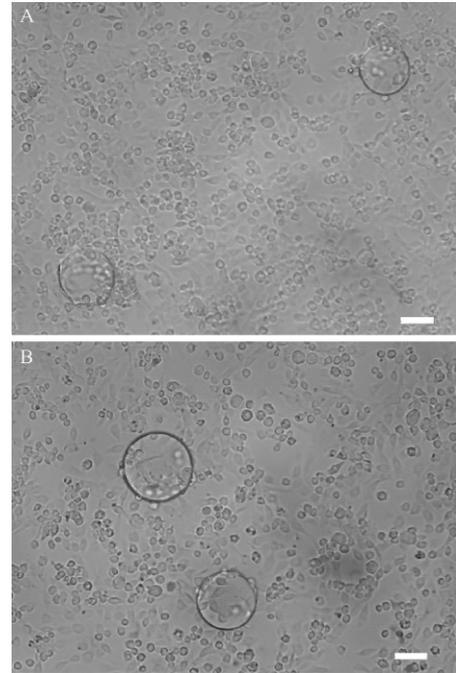


图5 IDP16 对大蜡螟血细胞包被活性的影响

Fig. 5 Effect of IDP16 on encapsulation of hemocytes from *G. mellonella*. Bar indicates $50\mu\text{m}$. A: Encapsulation of BSA-incubated hemocytes; B: Encapsulation of IDP16 - incubated hemocytes.

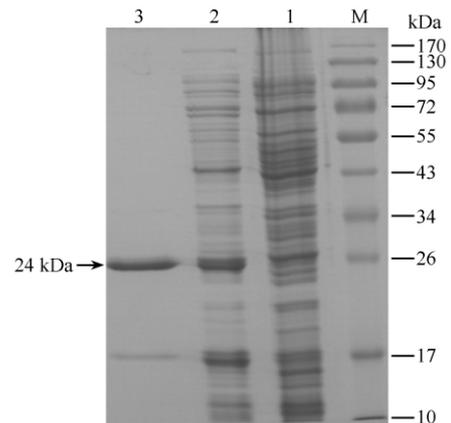


图6 重组蛋白 IDP16 的 SDS-PAGE

Fig. 6 SDS-PAGE of recombinant IDP16. M. Standard proteins; 1. Total proteins of engineering strain without induction by IPTG; 2. Total proteins of engineering strain induction by IPTG; 3. Proteins eluted by 200 mmol/L imidazole.

弱昆虫的免疫反应^[26-27]。本研究中分离得到的 IDP16 可以显著抑制昆虫多酚氧化酶的活性, 降低大蜡螟血细胞的吞噬和包被作用, 推测其在复合体侵染昆虫宿主的过程中能够抑制昆虫的免疫反应而利于自身存活和繁殖。迄今为止, 尚无 *Xenorhabdus* spp. 产生免疫抑制蛋白的报道。

Ecotin 最初是在大肠杆菌的周质中发现的, 是一种竞争性丝氨酸蛋白酶抑制剂, 可强烈抑制胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶和其他的丝氨酸蛋白酶活性, 研究证明 ecotin 的 50 s 和 80 s 环与其抑制谱有关, 但 60 s 和 100 s 环结构是其产生抑制活性的能量来源, 是关键的活性位点^[28]。本研究中 IDP16 具有与大肠杆菌 ecotin 完全一致的 60 s 和 100 s 序列, 50 s 和 80 s 有所差异, 我们推测 IDP16 可能也是通过抑制在多酚氧化酶活化中起重要作用的丝氨酸蛋白酶达到抑制血淋巴黑化效应的, 但其抑制作用可能与大肠杆菌 ecotin 有所不同。相关推断还需实验验证。

伯氏致病杆菌产生的昆虫免疫抑制蛋白 IDP16, 可能有助于线虫和共生菌在昆虫宿主内的存活和繁殖, 并与复合体的致病能力相关。实验中, 我们发现 IDP16 在伯氏致病杆菌产生的胞外蛋白中含量较大(数据未显示), 推测其在昆虫病原线虫-细菌复合体侵入昆虫血腔后起作用, 对其进行研究将有助于深入了解复合体与寄主的相互作用机制。

参考文献

- [1] Forst S, Dowds B, Boemare N, Stackebrandt E. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual Review of Microbiology*, 1997, 51 (1) :47-72.
- [2] Goodrich-Blair H. They've got a ticket to ride: *Xenorhabdus nematophila*-*Steinernema carpocapsae* symbiosis. *Current Opinion in Microbiology*, 2007, 10 (3) :225-230.
- [3] Morgan JAW, Sergeant M, Ellis D, Ousley M, Jarrett P. Sequence analysis of insecticidal genes from *Xenorhabdus nematophilus* PMF1296. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (5) :2062.
- [4] Khandelwal P, Choudhury D, Birah A, Reddy MK, Gupta GP, Banerjee N. Insecticidal pilin subunit from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (19) :6465-6476.
- [5] Joshi MC, Sharma A, Kant S, Birah A, Gupta GP, Khan SR, Bhatnagar R, Banerjee N. An Insecticidal GroEL protein with chitin binding activity from *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283 (42) :28287-28296.
- [6] Cowles KN, Goodrich-Blair H. Expression and activity of a *Xenorhabdus nematophila* haemolysin required for full virulence towards *Manduca sexta* insects. *Cellular Microbiology*, 2005, 7 (2) :209-219.
- [7] Ribeiro C, Vignes M, Brehélin M. *Xenorhabdus nematophila* (enterobacteriaceae) secretes a cation-selective calcium-independent porin which causes vacuolation of the rough endoplasmic reticulum and cell lysis. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (5) :3030-3039.
- [8] Brown SE, Cao AT, Hines ER, Akhurst RJ, East PD. A novel secreted protein toxin from the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (15) :14595.
- [9] Caldas C, Cherqui A, Pereira A, Simoes N. Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (3) :1297-1304.
- [10] Yonggyun Kim DJ, Sunghwan Cho, Youngjin Park. Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, share an inhibitory action against phospholipase A2 to induce host immunodepression. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2005, 89 :258-264.
- [11] Park Y, Stanley D. The entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, impairs hemocytic immunity by inhibition of eicosanoid biosynthesis in adult crickets, *Gryllus firmus*. *Biological Control*, 2006, 38 (2) :247-253.
- [12] Shrestha S, Kim Y. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits hemocyte phagocytosis of *Spodoptera exigua* by inhibiting phospholipase A2. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2007, 96 (1) :64-70.
- [13] Vigneux F, Zumbihl R, Jubelin G, Ribeiro C, Poncet J, Baghdiguian S, Givaudan A, Brehélin M. The xaxAB genes encoding a new apoptotic toxin from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila* are present in plant and human pathogens. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (13) :9571.
- [14] Park Y, Kim Y. Inhibitory Effect of an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, on the release of arachidonic acid from the membrane preparation of *Spodoptera exigua*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*,

- 2005, 8 (1) :61-67.
- [15] Park Y, Kim Y. *Xenorhabdus nematophilus* inhibits *p*-bromophenacyl bromide (BPB)-sensitive PLA2 of *Spodoptera exigua*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2003, 54 (3) :134-142.
- [16] Tsakas S, Marmaras V. Insect immunity and its signalling: an overview. *Invertebr Surv J*, 2010, 7:228-238.
- [17] 段秀峰, 林茂松, 李红梅, 王暄, 刘维红. 伯氏致病杆菌 (*Xenorhabdus bovienii* BE) 杀虫活性物质的分离和生物测定. 江苏农业学报 (*Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*), 2009, 25 (1) :59-67.
- [18] 王立霞. *Xenorhabdus bovienii* A54 菌株杀虫物质的研究. 中国农业科学院博士学位论文, 2000.
- [19] Fallon DJ, Kaya HK, Gaugler R, Sipes BS. Effect of *Steinernema feltiae*-*Xenorhabdus bovienii* insect pathogen complex on *Meloidogyne javanica*. *Nematology*, 2004, 6 (5) :671-680.
- [20] Yang X, Qiu D, Zhang Y, Zeng H, Liu Z, Yuan J, Yang H. A toxin protein from *Xenorhabdus nematophila* var. *pekingensis* and insecticidal activity against larvae of *Helicoverpa armigera*. *Biocontrol Science and Technology*, 2009, 19 (9) :943-955.
- [21] Qi J, He P, Chen W, Wang H, Wang X, Zhang M. Comparative proteome study of apoptosis induced by As_4 S_4 in retinoid acid resistant human acute promyelocytic leukemia NB4-R1 cells. *Leukemia Research*, 2010, 34 (11) :1506-1516
- [22] Doucet D, Cusson M. Role of calyx fluid in alterations of immunity in *Choristoneura fumiferana* larvae parasitized by *Tranosema rostrale*. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology*, 1996, 114 (4) :311-317.
- [23] Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M. Phenoloxidase activity in hemolymph of *Galleria mellonella* larvae challenged with *Aspergillus oryzae*. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska: Biologia*, 2010, 65 (2) :49-57.
- [24] Cerenius L, Lee BL, Soderhall K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 2008, 29 (6) :263-271.
- [25] Balasubramanian N, Hao YJ, Toubarro D, Nascimento G, Simões N. Purification, biochemical and molecular analysis of a chymotrypsin protease with prophenoloxidase suppression activity from the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *International Journal for Parasitology*, 2009, 39 (9) :975-984.
- [26] Wee KE, Yonan CR, Chang FN. A new broad-spectrum protease inhibitor from the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Microbiology*, 2000, 146 (12) :3141-3147.
- [27] Eleftherianos I, Boundy S, Joyce SA, Aslam S, Marshall JW, Cox RJ, Simpson TJ, Clarke DJ. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104 (7) :2419.
- [28] Yang SQ, Wang C-H, Gillmor SA, Fletterick RJ, Craik CS. Ecotin: a serine protease inhibitor with two distinct and interacting binding sites. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 279 (4) :945-957.

An IDP16 protein from *Xenorhabdus bovienii* depresses the immune response in *Galleria mellonella*

Huaxing Shi, Hongmei Zeng, Dewen Qiu*

Key Laboratory of Integrated Pest Management in Crops, Ministry of Agriculture, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: [Objective] A protein with insect immunodepressive activity was purified from *Xenorhabdus bovienii*, a bacterial symbiosis of entomopathogenic nematode. To determine the function of this protein in the pathogenesis of bacterium-nematode symbiosis, we detected the effect of this protein on immune response in *Galleria mellonella*.

[Methods] Proteins from extracellular extract of *X. bovienii* were purified using ammonium sulfate precipitation, HiTrap Q HP chromatography, HiTrap Butyl FF chromatography, and HiTrap SP HP chromatography. Intra-hemocoel injection assay followed by observation of hemolymph melanization was used for activity determination. Fluorescent microspheres and sepharose beads were used to assess the effect of purified protein on phagocytosis and encapsulation of hemocytes, respectively. The purified protein was identified by 2-D and MS analysis. The full-length encoding gene was cloned by PCR, and expressed with pET 30a in *Escherichia coli*. The recombinant protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography. [Results] An immunodepressive protein was purified and designed as IDP16, which can inhibit the phenoloxidase activity, and weaken the phagocytosis and encapsulation of *Galleria mellonella* hemocytes. The encoding gene was then cloned and expressed in *E. coli*. The recombinant protein was also determined to be immunodepressive.

[Conclusion] The IDP16 protein from *Xenorhabdus bovienii* can depress the immune response in insect, which may play an important role in bacteria-host interaction.

Keywords: *Xenorhabdus bovienii*, IDP16 protein, *Galleria mellonella*, immunodepression

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31071741)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-82105929; E-mail: dewenqiu@hotmail

Received: 17 February 2011 / Revised: 31 March 2012