



## 粘虫颗粒体病毒增效蛋白基因片段优化及功能

韩光杰<sup>1,2</sup>, 刘琴<sup>1</sup>, 徐贝贝<sup>2</sup>, 王建军<sup>2</sup>, 祁建杭<sup>1</sup>, 李传明<sup>1</sup>, 徐健<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 江苏里下河地区农业科学研究所, 江苏 扬州 225007

<sup>2</sup> 扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009

**摘要:** 【目的】研究转宿主粘虫颗粒体病毒(*Pseudaletia unipuncta* granulovirus, PuGV-Ps)增效蛋白基因截短片段优化及其增效作用, 探索增效蛋白基因的合理利用途径。【方法】生物信息学分析增效蛋白结构域, 构建增效蛋白基因截短片段原核表达载体, 分析目的基因片段表达产物的表达水平、围食膜蛋白降解效能和增强活性, 进一步明确PuGV-Ps增效蛋白基因的功能区域。【结果】PuGV-Ps增效蛋白含有M60-like结构域、锌离子催化域和糖蛋白结合域, 并包含13个潜在的糖基化位点。以此为依据设计P69(短截M60-like结构域)和P77(短截糖蛋白结合域)2个截短片段, 构建了表达载体pET15b-P69和pET15b-P77, 原核表达量明显高于全长基因P104。表达产物纯化蛋白围食膜降解活性表明, P69对斜纹夜蛾围食膜大分子蛋白降解程度高于P77, 但两者均低于P104。病毒增强苏云金杆菌(Bt)实验表明, 截短片段的表达产物提高了Bt对小菜蛾的毒力, 但增强活性显著低于P104。【结论】研究结果表明, PuGV-Ps增效蛋白基因N端M60-like结构域和C端糖蛋白结合域对其增效作用的发挥都具有一定功能, 这些结构对维持增效蛋白的构象也发挥了一定的作用, 截短片段P69有利于保持PuGV-Ps增效蛋白的活性、提高表达水平。该研究结果对增效蛋白的工业化生产具有一定的指导意义。

**关键词:** 粘虫颗粒体病毒, 增效蛋白, 短截片段, 增效活性

杆状病毒(Baculovirus)是一类在自然界中仅感染节肢动物的病毒, 绝大多数都来自于昆虫纲, 且集中在鳞翅目昆虫<sup>[1]</sup>。杆状病毒是当前重要的生物控制因子, 主要分为Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-baculovirus 4种<sup>[2]</sup>。转宿主粘虫颗粒体病毒(PuGV-Ps)属于Beta-baculovirus, 由美洲粘虫颗粒

体病毒*Pseudaletia unipuncta* granulovirus (PuGV)感染东方粘虫幼虫而来。早期研究显示, PuGV能增强美洲粘虫核型多角体病毒(PuNPV)的感染, 这种增强因子后来被证实为增效蛋白(En)<sup>[3]</sup>。增效蛋白是由杆状病毒基因编码的分子量大小在89–110 kDa的一类特殊蛋白, 在颗粒体病毒<sup>[3–4]</sup>、多

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20141283); 江苏省农业科技支撑计划(BE2014361); 江苏省农业科技自主创新资金(CX(14)2129); 江苏省“333工程”培养资金(BRA2014154)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-514-87302019; E-mail: bio-xj@163.com

收稿日期: 2015-12-11; 修回日期: 2016-02-25; 网络出版日期: 2016-02-29

角体病毒<sup>[5]</sup>、痘病毒<sup>[6]</sup>中均发现这类增效作用的蛋白存在。同时, 在一些细菌如耶尔森氏菌、芽孢杆菌中也发现了增效蛋白基因, 它们与杆状病毒的增效蛋白具有一定的同源性, 但并没有增强病毒毒性的作用<sup>[7-8]</sup>。

增效蛋白作用机理具有2种假说: 一、增效蛋白可以同时与病毒囊膜和细胞质膜结合, 从而增强病毒与中肠细胞的融合<sup>[9]</sup>, Hoover等<sup>[10]</sup>通过比较野生型与缺失增效蛋白的舞毒蛾核型多角体病毒(LdMNPV)感染舞毒蛾幼虫的实验发现, 增效蛋白具有促进病毒与宿主细胞融合的功能; 二、增效蛋白还具有金属蛋白酶活性, 能作用于昆虫中肠围食膜, 降解围食膜肠粘蛋白<sup>[11]</sup>, 增大围食膜基质网孔径, 增强通透性, 也能提高与苏云金杆菌(Bt)毒素蛋白的作用效果<sup>[12]</sup>。定点突变粉纹夜蛾颗粒体病毒(TnGV)增效蛋白锌离子结合域的氨基酸序列, 其增效功能发生显著变化, 也显示了其金属蛋白酶的特性<sup>[13]</sup>。

PuGV-Ps增效蛋白基因编码901个氨基酸, 与PuGV增效蛋白氨基酸同源性达99.59%<sup>[14]</sup>, 利用Compute pI/Mw工具估算其蛋白大小为104.4 kDa。大蛋白的重组表达具有相当大的难度, 这对增效蛋白的深入研究与利用带来了一定的限制。截取增效蛋白功能区, 不仅保存其增效活性, 而且有利于扩大其应用范围。刘相国等<sup>[15]</sup>截取了棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白N端片段, 表达的融合蛋白可以提高棉铃虫核型多角体病毒(HaNPV)感染能力并缩短作用时间。刘平等<sup>[16]</sup>截取TnGV增效基因C端2.2 kb表达的蛋白P80也能显著提高苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)对银纹夜蛾幼虫的感染性。由此可见, 无论截去N端还是C端部分短片段, 增效蛋白仍能发挥增效活性。这些研究有个共同的特性, 截取的片段均包含增效蛋白锌离子结合域(HEXXH), 该结构域被证明与降解围食膜的活性有直接关系<sup>[11]</sup>。这些截短片段生测结果表明, 重组蛋白能增强病毒的感染能力或苏云

金杆菌(Bt)的毒性, 但其并未选用增效蛋白全基因表达产物作为对照, 截短片段增效活性较原蛋白是下降还是上升, 我们不得而知。因此, 为了全面了解增效蛋白功能及提高增效蛋白利用水平, 本文截取了PuGV-Ps增效蛋白N端P77与C端P69, 并以全基因表达蛋白P104为对照, 进一步明确截短优化片段增效活性的变化, 分析增效蛋白的功能, 为增效蛋白的合理应用提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

Bt  $\delta$ -内毒素(Bt.K): 江苏里下河地区农业科学研究所保存的菌种(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kustaki*)。参照王瑛等<sup>[17]</sup>方法, 制得纯化的 $\delta$ -内毒素。

斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)、小菜蛾(*Plutella xylostella*)试验室饲养繁殖适龄幼虫供试; pET15b、pET15b-P104由本实验室保存, 粘虫颗粒体病毒由中科院动物所秦启联教授馈赠。

Ni-NTA His·Bind树脂为Novagen公司产品; *Nde* I、*Xho* I为Fermentas公司产品; 回收纯化试剂盒为Promega公司产品; 其它为常用分析纯。

### 1.2 增效蛋白基因及截短片段序列分析

根据前期PuGV-Ps增效蛋白基因测序结果<sup>[14]</sup>, 利用在线软件Pfam(<http://pfam.xfam.org/>)和Smart(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析其结构域, 通过Prosit(<http://prosite.expasy.org/>)构建结构图谱, 利用NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)分析其糖基化位点。

### 1.3 截短片段克隆及测序

活化实验室保存菌种Top10-En(含质粒pET15b-P104), 并提取质粒备用。根据前期测序结果, 分别设计2对引物, 包括截取N端P77(P104F: GCCATATGTCGTACAAAGTGATTGTACCCGCT, P77R: GCCTCGAGTTATGAATAATATCTAGGAAGGCGG; 扩增片段大小为2091 bp);

P69 (P69F: GCCATATGAACAAAACCAAAAGACAACAACACTGG, P104R: GCCTCGAGTGAA CGTTATTAGAACGCTATCATT; 扩增片段大小为1878 bp), 斜体分别为*Nde* I (CATATG)和*Xho* I (CTCGAG)内切酶酶切位点。以该引物扩增条带并构建测序载体pEASY-T3测序验证。

#### 1.4 截短片段表达载体构建

提取截短片段测序载体质粒pEASY-P69、pEASY-P77, 并进行*Nde* I、*Xho* I双酶切回收目的片段, 与酶切过的表达载体pET15b进行连接, 并转化大肠杆菌Top10。挑取阳性克隆子进行菌落PCR验证, 并进行双酶切验证, 对成功构建的载体命名为pET15b-P69、pET15b-P77。

#### 1.5 大肠杆菌BL21诱导表达及初步纯化

提取重组质粒并转入表达菌株BL21(DE3)中, 在含氨苄青霉素的LB培养液中过夜培养, 按1:100放大培养至 $OD_{600}=0.6-0.7$ 时, 加IPTG至终浓度1 mmol/L, 28 °C诱导4 h, 另以未转化的感受态细胞BL21(DE3)作对照。诱导表达的菌液经超声波破碎, 0.5% Triton-100洗涤粗提后, 得到表达增效蛋白为主的部分纯化蛋白, 用此增效蛋白粗提物进行表达产物增效活性测定。

#### 1.6 增效蛋白截短片段表达产物的提纯

将诱导表达含增效蛋白及截短片段的菌株离心收集, 按Novagen说明书提取包涵体蛋白, 提取的蛋白以尿素梯度(6 mol/L尿素12 h, 5 mol/L尿素12 h, 4 mol/L尿素12 h, 3 mol/L尿素12 h, 2 mol/L尿素12 h, 0.5 mol/L尿素12 h, 0 mol/L尿素12 h)进行复性。以复性的增效蛋白为模板, SDS-PAGE电泳检测并使用Image J软件计算蛋白的含量。

#### 1.7 增效蛋白及其截短片段表达产物对斜纹夜蛾幼虫围食膜的体内活性

分别吸取等量纯化的P104、P69、P77蛋白各0.4  $\mu$ g和0.8  $\mu$ g, 分别添加到0.5 g人工饲料中, 每

个培养皿放置一头斜纹夜蛾5龄初幼虫(饥饿处理2 h), 共计5个重复, 饲料中添加蓝色染料, 待幼虫排出第3颗蓝色粪便时, 进行解剖, 将同一处理的围食膜共同放置1.5 mL离心管中待处理。使用2% SDS、5 mmol/L DTT与围食膜28 °C共浴1 h后, 进行SDS-PAGE电泳分析。电泳3 h后, 按照Swain和Ross<sup>[18]</sup>方法进行银染。

#### 1.8 增效蛋白截短片段表达产物对Bt $\delta$ -内毒素的增效活性测定

使用1.5中粗提的增效蛋白截短片段表达产物测定表达蛋白对Bt  $\delta$ -内毒素的增效活性。将提纯的Bt  $\delta$ -内毒素配成100、200、500、800、1000  $\mu$ g/g对小菜蛾3龄幼虫进行毒力测定,  $\delta$ -内毒素浓度为500  $\mu$ g/g, 小菜蛾幼虫的死亡率在30%左右, 为增效活性测定较佳的浓度。试验设计Bt  $\delta$ -内毒素500  $\mu$ g/g中分别加入增效蛋白0、500  $\mu$ g/g处理。每处理接小菜蛾3龄幼虫20头, 重复3次, 置于26 °C光照培养箱中, 饲养48 h后检查死亡率。

## 2 结果和分析

### 2.1 截短片段的分析与克隆

利用Pfam与Smart分析PuGV-Ps增效蛋白序列, 发现其氨基酸序列在27-323位存在一个M60-like结构域, 525-564位存在锌离子催化域, 746-863位存在糖蛋白或碳水化合物结合域(图1-B)。通过糖基化位点分析, 共发现13个潜在的糖基化位点(图1-A)。因此针对以上特征, 利用Prosite软件构建增效蛋白结构图谱(图1-C), 并将增效蛋白基因截短为P77与P69两条片段。其中, P77含有M60-like结构域和锌离子催化域, 并含有所有的糖基化位点, P69含有锌离子催化域和糖蛋白结合域, 并含有11个糖基化位点。通过PCR扩增片段P69与P77, 纯化后连接pEASY-T3载体, 挑取阳性克隆送至南京金斯瑞公司, 测序验证。测序结果表明, 截短片段无氨基酸突变。

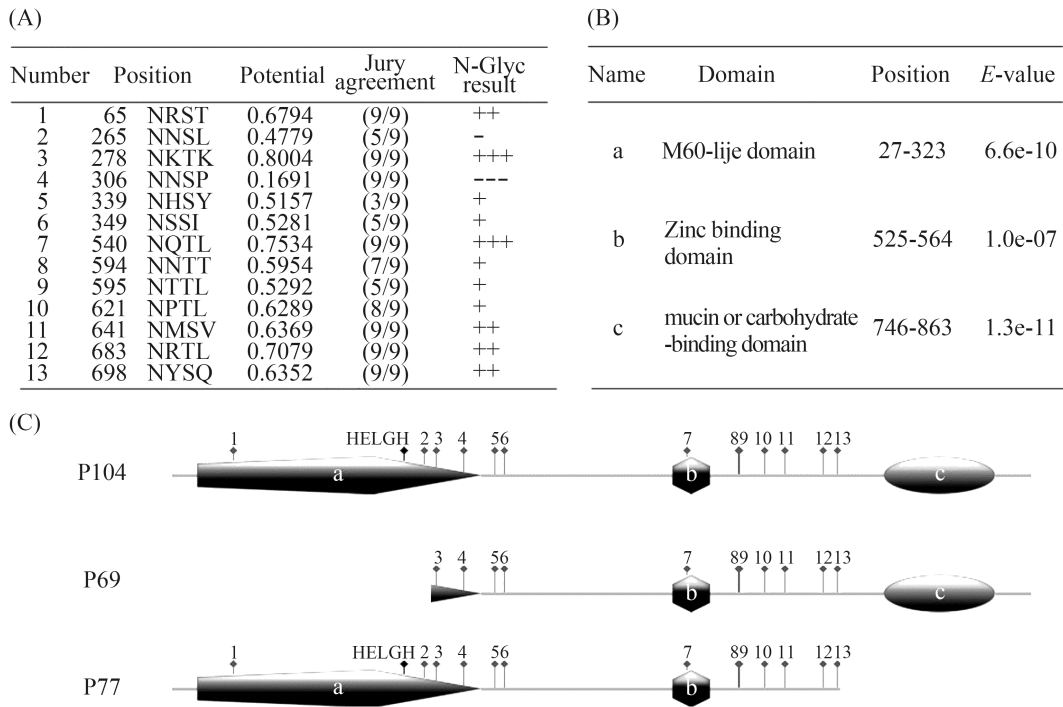


图 1. 增效蛋白序列结构分析及图谱

Figure 1. Analyze and construct the map of enhancin gene. A: 1-13 are glycosylation site; B: forecast the domain of enhancin; C: the map of P104, P69 and P77. a, b, c are same to B. HELGH is  $Zn^{2+}$  binding site.

## 2.2 截短片段表达载体的构建

提取克隆载体质粒pEASY-P69与pEASY-P77, 并双酶切(*Xho* I、*Nde* I双酶切)回收目的片段, 与酶切过的载体pET15b连接, 转化大肠杆菌Top10, 利用菌落PCR技术进行验证, 对阳性克隆放大培养并提取质粒双酶切验证(图2)。pET15b-P69与pET15b-P77均能完整酶切, 酶切片段与目的片段大小一致。对该质粒进行测序, 发现构建的表达载体均无氨基酸突变。

## 2.3 转化表达菌株BL21(DE3)并诱导表达

将重组质粒pET15b-P69与pET15b-P77分别转入表达菌株BL21(DE3), 通过含氨苄青霉素的LB平板筛选, 获得转化的重组菌株。IPTG诱导表达后, 通过SDS-PAGE电泳分析(图3), 与对照菌株BL21相比, pET15b-P69、pET15b-P77和pET15b-P104均有表达(箭头所指)。其中, 截短片段蛋白表达量明显高于P104, 说明短片段更有利

于蛋白的表达。通过对表达蛋白的上清液与菌体电泳分析, 发现表达的蛋白均为包涵体蛋白。

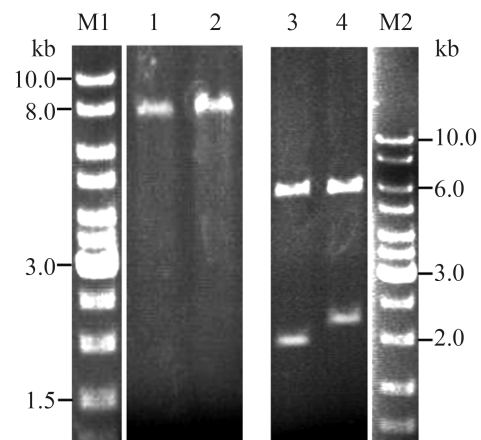


图 2. 截短片段表达载体pET15b-P69 (-P77)检测及双酶切验证

Figure 2. The double digestion of pET15b-P69 (-P77) using *Xho* I and *Nde* I. M1, M2: marker; lane 1, 2, 3, 4: pET15b-P69, pET15b-P77, the production of double enzyme digestion of pET15b-P69 and pET15b-P77.

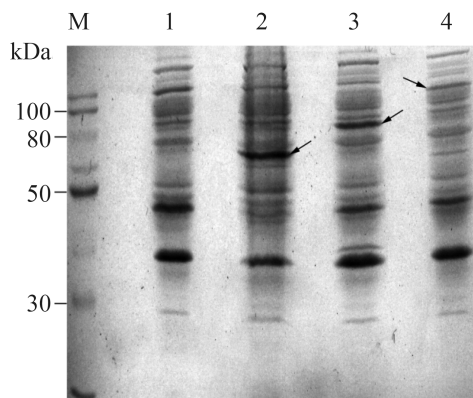


图 3. 大肠杆菌中的增效蛋白基因及其截短片段表达

Figure 3. Expression protein of enhancin gene in BL21. M: marker of protein; lane 1, 2, 3, 4 represent BL21, P69, p77 and P104, respectively.

#### 2.4 增效蛋白截短片段表达蛋白对斜纹夜蛾围食膜的降解

按照1.6中方法提纯增效蛋白, 使用纯化的蛋白样品, 上样10  $\mu\text{L}$ 进行SDS-PAGE电泳分析(图4)。蛋白Marker上样量为0.5  $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ , 通过Image J计算增效蛋白P69、P77、P104的含量分别为0.39、0.15、0.31  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。使用0.4  $\mu\text{g}$ 和0.8  $\mu\text{g}$ 增效蛋白及其截短片段表达产物纯化蛋白饲喂斜纹夜蛾5龄幼虫10 h左右, 解剖其中肠围食膜。中肠围食膜经超纯水洗净后, 使用2% SDS、5 mmol/L DTT处理, SDS-PAGE电泳如图5。低浓度的增效蛋白及截短片段的表达产物处理斜纹夜蛾5龄幼虫10 h后, 其围食膜大蛋白的降解并不明显, 增大处理浓度后, 使用增效蛋白饲喂的斜纹夜蛾幼虫围食膜大蛋白(100 kDa及以上)出现明显的降解(图5中黑线标注区域), 且降解为22 kDa左右的小分子蛋白(图5中箭头所指)。高浓度P69与P77处理的斜纹夜蛾幼虫围食膜也出现了降解, 且大片段均降解为22 kDa左右的小分子蛋白, 但大蛋白降解并不完全。

#### 2.5 增效蛋白及其截短片段表达产物对Bt $\delta$ -内毒素的增效活性

选用 $\delta$ -内毒素500  $\mu\text{g}/\text{g}$ 的浓度, 以1:1的比例

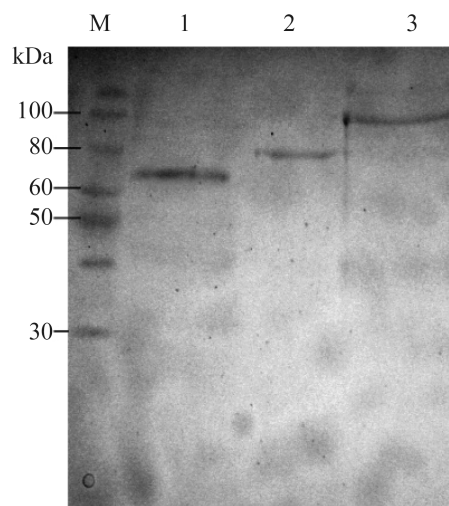


图 4. 增效蛋白及其截短片段表达产物纯化蛋白SDS-PAGE分析

Figure 4. SDS-PAGE analysis of purified proteins from enhancin and short-enhancin. M: marker of protein; lane 1, 2, 3 represent P69, p77 and P104, respectively.

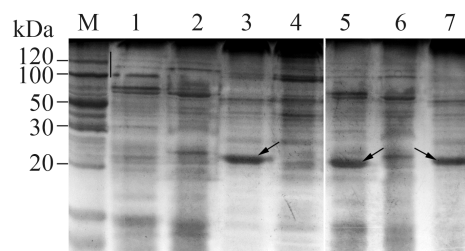


图 5. 斜纹夜蛾5龄幼虫围食膜蛋白SDS-PAGE分析

Figure 5. SDS-PAGE analysis of proteins from the PM of *S. litura*. M: marker of protein; lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 represent the treatment of PM with 0.8  $\mu\text{g}$  BL21, 0.4  $\mu\text{g}$  P69, 0.8  $\mu\text{g}$  P69, 0.4  $\mu\text{g}$  P77, 0.8  $\mu\text{g}$  P77, 0.4  $\mu\text{g}$  P104 and 0.8  $\mu\text{g}$  P104, respectively.

加入增效蛋白截短片段表达产物, 测定其对小菜蛾3龄幼虫的毒力(图6)。从图中可以发现, 增效蛋白P104表达产物对Bt具有增效作用, 其校正死亡率为50%较对照组(BL21+Bt.K) 29.5%有显著差异( $P < 0.05$ )。截短片段表达产物对Bt也有一定的增效作用, 与P104相比, 其增效活性均有所下降。

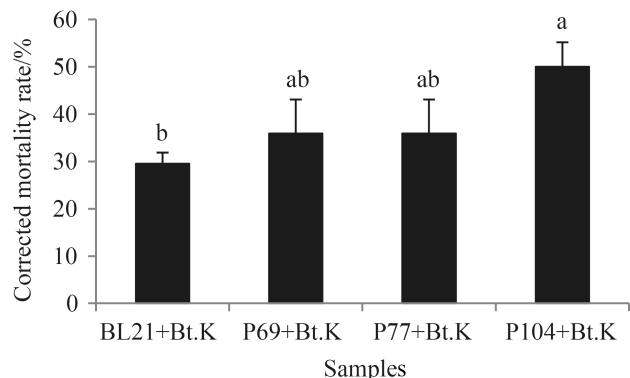


图 6. 截短片段表达蛋白对Bt  $\delta$ -内毒素增效活性测定

Figure 6. Synergistic effects of recombinated protein of delta-endotoxin of Bt (Bt 500  $\mu$ g/g+En 500  $\mu$ g/g).

### 3 讨论

不同增效蛋白氨基酸序列大小和功能区域具有一定的差异, 颗粒体病毒增效蛋白氨基酸序列N端同源性大于C端<sup>[3]</sup>, 由此人们认为增效蛋白N端的氨基酸序列对其生物活性比C端重要, 其功能域很可能在高同源性的N端, 更多的实验结果也支持这一猜测<sup>[13]</sup>。但是也有实验证明截取TnGV增效蛋白基因C端2.2 kb的片段, 其原核表达产物同样能增强AcMNPV对银纹夜蛾幼虫的感染性<sup>[16]</sup>。由此可见, 增效蛋白功能区的分析仍存在一定的争议。本实验利用Pram与Smart生物分析软件分析了PuGV-Ps增效蛋白功能区, 发现其N端含有典型的锌离子结合域(HEXXH), 这与其它病毒增效蛋白的序列特征是一致的, 同时也暗示其金属蛋白酶的特性。分析其C端, 我们发现了1个明显的糖蛋白结合域, 该结合域在其它相似的具有金属蛋白酶特性的蛋白中也被发现<sup>[7]</sup>。同时, 我们还发现PuGV-Ps增效蛋白包含1个锌离子催化域, 位于氨基酸序列的525-564位。这些结构域对增效蛋白的功能或许都发挥着各自的职责。

核型多角体病毒和颗粒体病毒增效蛋白分别含有2-16, 10-19个糖基化位点, 这是否意味着增效蛋白有可能是一种糖蛋白? 刘强和丁翠<sup>[19]</sup>在分

析TnGV的增效蛋白特性时发现, 其天然蛋白的含糖量很少, 低于糖蛋白染色检出限。真核基因在原核细胞表达时, 一般不能进行翻译后的糖基化修饰, 所以增效蛋白及其截短片段的表达产物为包涵体蛋白, 但其表达产物仍具有增效活性, 这就暗示增效蛋白基因翻译是否进行糖基化修饰并不影响该蛋白的生物学功能。因此, 增效蛋白的糖基化位点可能与其结合及降解昆虫围食膜肠粘蛋白相关。PuGV-Ps增效蛋白包含13个潜在的糖基化位点, 它们主要集中在锌离子结合域和催化域, 这也从侧面说明其与降解糖蛋白的相关性。

为了明确增效蛋白的功能区划分, 我们针对PuGV-Ps增效蛋白特征, 设计截短片段P69与P77, 构建的原核表达载体的表达量明显高于原增效蛋白基因P104的表达量, 说明短片段更有利于增效蛋白的表达。纯化的增效蛋白及其截短片段表达蛋白均能降解斜纹夜蛾围食膜大分子蛋白, 但P69和P77降解效果明显不如P104。增效蛋白联合Bt对小菜蛾的生测实验表明, P69与P77均能增强Bt的毒力, 其增强效果也与其它文献报导相似(增强效果为30%左右), 但较P104相比, 增效功能显著降低(P104增强效果为50%)。因此, 只有在N端与C端共存的增效蛋白才能发挥最大的增效功能。根据以上结果, 我们推测, 增效蛋白应当在合理的构象中才能最大发挥金属蛋白酶特性, 而其C端是保证其构象的重要结构, 当然, 这样的推测仍需要更多的实验来证实。

本研究发现P69仍具有降解斜纹夜蛾围食膜大分子蛋白的功能, 与其它相关研究有所区别。尹隽等<sup>[13]</sup>定点突变TnGV增效蛋白锌离子结合域后, 通过体外实验发现, 其真核表达产物除个别突变外, 其它均不能有效降解斜纹夜蛾中肠围食膜肠粘蛋白。然而增效蛋白的原核表达产物与AcMNPV或HaNPV一起感染银纹夜蛾、棉铃虫或小菜蛾, 观察到包涵体能够不同程度的提高病毒感染昆虫的感染率, 其中的原因有待深入探讨。

昆虫的中肠及其复杂, 其体内不仅具有高PH环境, 还有大量的蛋白酶、几丁质酶和共生性微生物, 加上肠道蠕动, 这些对增效蛋白功能的发挥都有一定的影响, 从而造成体内与体外实验的不一致性。明确这些影响因素, 更能深入解析增效蛋白的作用机理。

增效蛋白功能研究目的为其合理利用奠定理论基础。最早发现颗粒体病毒可以增强多角体病毒的作用效果, 这种增强效果的发挥依赖于一种增强因子——增效蛋白, 显示了其潜在的应用价值。后来, TnGV增效蛋白基因在AcMNPV中成功表达, 重组病毒的增效蛋白显示了和天然增效蛋白具有相同的生化特征, 显示了极大的应用潜力, 也推动了转基因作物的研究<sup>[20]</sup>。然而, 病毒需活体增殖, 仍是增效蛋白合理应用亟需解决的瓶颈问题。原核表达成本较低, 利于工业化生产, 具有与真核表达系统无法比拟的优点。但完整的增效蛋白表达量较低, 为了克服这个问题, 应合理截取增效蛋白的功能片段, 增加增效蛋白的表达量。本实验截取的P69与P77均具有增强活性, P69体内降解效果优于P77, 且表达量也高于P77。因此, 利用该功能区域进行生产实验, 将能发挥其最大功效。

## 参考文献

- [1] Slavicek JM. Baculovirus enhancins and their role in viral pathogenicity//Moses PA. Molecular Virology. Croatia: InTech Publishers, 2012: 147–168.
- [2] Jehle JA, Lange M, Wang HL, Hu ZH, Wang YJ, Hauschild R. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. *Virology*, 2006, 346(1): 180–193.
- [3] Roelvink PW, Corsaro BG, Granados RR. Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus enhancin genes. *Journal of General Virology*, 1995, 76(11): 2693–2705.
- [4] Liu Q, Ding C. Enhancement of PsNPV infection by a granulosis virus and the synergistic factor. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 1999, 5(3): 300–304. (in Chinese)
- 刘强, 丁翠. 粘虫颗粒体病毒及其增效因子对粘虫核型多角体病毒的增效作用. *应用与环境生物学报*, 1999, 5(3): 300–304.
- [5] Bischoff DS, Slavicek JM. Molecular analysis of an enhancin gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology*, 1997, 71(11): 8133–8140.
- [6] Mitsuhashi W, Kawakita H, Murakami R, Takemoto Y, Saiki K, Miyamoto K, Wada S. Spindles of an entomopoxvirus facilitate its infection of the host insect by disrupting the peritrophic membrane. *Journal of Virology*, 2007, 81(8): 4235–4243.
- [7] Hajajj-Ellouze M, Fedhila S, Lereclus D, Nielsen-LeRoux C. The enhancin-like metalloprotease from the *Bacillus cereus* group is regulated by the pleiotropic transcriptional activator PlcR but is not essential for larvicidal activity. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 260(1): 9–16.
- [8] Han GJ, Zhao S, Liu Q, Li CM, Xu J. Characteristics of enhancin gene from *Pseudaletia unipuncta* granulovirus-Ps and construction of its integration vector. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 31(2): 279–284. (in Chinese)
- 韩光杰, 赵松, 刘琴, 李传明, 徐健. PuGV-Ps增效蛋白质基因特征及其整合载体的构建. *江苏农业学报*, 2015, 31(2): 279–284.
- [9] Wang P, Hammer DA, Granados RR. Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects. *Journal of General Virology*, 1994, 75(8): 1961–1967.
- [10] Hoover K, Humphries MA, Gendron AR, Slavicek JM. Impact of viral enhancin genes on potency of *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus in *L. dispar* following disruption of the peritrophic matrix. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 104(2): 150–152.
- [11] Wang P, Granados RR. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(13): 6977–6982.
- [12] Xu J, Liu Q, Tan YA, Zhu SD. Synergistic effects of *Pseudaletia unipuncta* granulosis virus (PuGV-Ps) on *Bacillus thuringiensis* (Bt) and the involved degradation of Bt toxins.

- Acta Entomologica Sinica*, 2008, 51(1): 26–32. (in Chinese)  
徐健, 刘琴, 谭永安, 祝树德. 粘虫颗粒体病毒对苏云金杆菌的增效特性及对Bt毒蛋白的降解活化作用. *昆虫学报*, 2008, 51(1): 26–32.
- [13] Yin J, Shan L, Song DX, Zhong J. Site-directed mutagenesis of the zinc-binding domain of *Trichoplusia ni* granulovirus enhancin. *Acta Entomologica Sinica*, 2007, 50(11): 1111–1115. (in Chinese)  
尹隽, 单梁, 宋大新, 钟江. 粉纹夜蛾颗粒体病毒增强蛋白锌离子结合域定点突变. *昆虫学报*, 2007, 50(11): 1111–1115.
- [14] Xu J, Zhao S, Liu Q, Yang Q, Li CM. Expression of enhancin gene from *Pseudaletia unipuncta* granulovirus-Ps in *Escherichia coli* and bioassay of its activity. *Chinese Journal of Biological Control*, 2013, 29(3): 389–394. (in Chinese)  
徐健, 赵松, 刘琴, 杨青, 李传明. 转宿主粘虫颗粒体病毒(PuGV-Ps)增效蛋白基因的克隆表达及活性. *中国生物防治学报*, 2013, 29(3): 389–394.
- [15] Liu XG, Yang G, Qiu BS, Zhang KQ, Tian B. Expression of two truncated enhancin gene from *Helicoverpa armigera* granulosis virus in *E. coli* and its preliminary bioassay. *Acta Microbiologica Sinica*, 2001, 41(2): 167–172. (in Chinese)  
刘相国, 杨恭, 邱并生, 张克勤, 田波. 棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白基因5'端截短片段的表达及增效活性测定. *微生物学报*, 2001, 41(2): 167–172.
- [16] Liu P, Meng XL, Xu JP, Jiang XW, Ye LB, Gao JR. Cloning expression and bioassay of the gene encoding viral enhancing factor of *Trichoplusia ni* granulosis virus. *Chinese Journal of Biological Control*, 1999, 15(4): 188–189. (in Chinese)  
刘平, 孟小林, 徐进平, 姜小文, 叶林柏, 郜金荣. 粉纹夜蛾颗粒体病毒增效因子C-末端片段的克隆表达及其生物活性初步测定. *中国生物防治*, 1999, 15(4): 188–189.
- [17] Wang Y, Bai C, Wen J. Study on the separation of crystals from spores of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 1980, 20(3): 285–288. (in Chinese)  
王瑛, 白成, 温洁. 苏云金杆菌晶体与芽孢分离的研究. *微生物学报*, 1980, 20(3): 285–288.
- [18] Swain M, Ross NW. A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 1995, 16(1): 948–951.
- [19] Liu Q, Ding C, Cai XY. Purification and biochemical characterization of synergetic factor in the capsule of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *Chinese Journal of Virology*, 1998, 14(4): 352–358. (in Chinese)  
刘强, 丁翠, 蔡秀玉. 粘虫颗粒体病毒增效因子的分离纯化及其生化性质. *病毒学报*, 1998, 14(4): 352–358.
- [20] Cao J, Ibrahim H, Garcia J, Mason H, Granados R, Earle E. Transgenic tobacco plants carrying a baculovirus enhancin gene slow the development and increase the mortality of *Trichoplusia ni* larvae. *Plant Cell Reports*, 2002, 21(3): 244–250.



# Optimized expression and functional analysis of enhancin gene from *Pseudaletia unipuncta* granulovirus (PuGV-Ps)

Guangjie Han<sup>1,2</sup>, Qin Liu<sup>1</sup>, Beibei Xu<sup>2</sup>, Jianjun Wang<sup>2</sup>, Jianhang Qi<sup>1</sup>, Chuanming Li<sup>1</sup>, Jian Xu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Jiangsu Lixiahe Institute of Agricultural Sciences, Yangzhou 225007, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] To explore the feasibility of using enhancin as synergist to *Bacillus thuringiensis* (Bt), the truncated fragments of enhancin gene from *Pseudaletia unipuncta* granulovirus (PuGV-Ps) were optimized and the enhancing effects were studied. [Methods] Based on bioinformational analysis of the function domain of PuGV-Ps enhancin, the prokaryotic expression vectors were constructed, and the protein expression levels as well as their enhancing effects on the degradation of peritrophic membrane (PM) proteins were analyzed, and the function domains of PuGV-Ps enhancin were confirmed. [Results] Three domains were found in the enhancin of PuGV-Ps, including M60-like domain, Zincins catalytic domain and putative mucin or carbohydrate-binding domain. Thirteen predicted N-glycosylation sites were also identified. Based on the sequences of truncated M60-like domain (P69) and carbohydrate-binding domain (P77), two expression vectors, pET15b-P69 and pET15b-P77, were constructed. The expressed P69 and P77 abundance were higher than that of full length enhancing (P104). The degradation activity of purified P69 on the PM proteins of *Spodoptera litura* was higher than that of purified P77, but both showed lower degradation activities than P104. Both P69 and P77 improved the toxicity of Bt against larvae of *Plutella xylostella*. However, their synergistic effects were significantly lower than that of P104. [Conclusion] The results revealed that the M60-like domain in N-terminus and carbohydrate-binding domain in C-terminus of PuGV-Ps enhancin all contributed to the enhancing effects of enhancin as well as the maintenance of its native conformation. The truncated P69 fragment may function in keeping the activity of enhancin and improving prokaryotic expression levels. These results provide some useful guidance for the industrialized production of enhancin.

**Keywords:** *Pseudaletia unipuncta* granulovirus, enhancin, optimization fragment, enhancing activity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Jiangsu Science Project of China (BK20141283), by the Jiangsu Province Agricultural Science and Technology Project (BE2014361), by the Jiangsu Province Independent Innovation of Agricultural Science (CX(14)2129) and by the Jiangsu Province "333 engineering" Project (BRA2014154)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-514-87302019; E-mail: bio-xj@163.com

Received: 11 December 2015; Revised: 25 February 2016; Published online: 29 February 2016