

Сравнительный анализ спектра кристаллических белков и плазмид ряда новых штаммов *Bacillus thuringiensis*

И. А. Исакова, С. Е. Рымарь, Л. Н. Кузнецова¹, В. А. Кордюм

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 252143, Украина

¹ Крымский филиал отдела почвенной микробиологии Института сельскохозяйственной микробиологии ААН Украины
Ул. Карла Маркса, 107, Симферополь, 334080, Украина

*Изучены основные характеристики ряда новых штаммов *B. thuringiensis*, выделенных на территории Украины и проявляющих токсичность по отношению к *Lepidoptera* и *Coleoptera* (личинкам колорадского жука). Определен их плазмидный состав, а также молекулярные массы кристаллических инсектицидных белков, продуцируемых этими штаммами во время споруляции.*

Введение. *Bacillus thuringiensis*, спорообразующий почвенный микроорганизм, наиболее известен своей способностью продуцировать кристаллические включения, состоящие из белков, которые называются Сгу белками (кристаллическими белками, или дельта-эндотоксинами). Эти белки обладают токсическими свойствами по отношению к различным насекомым, являющимся либо вредителями сельскохозяйственных культур, либо переносчиками некоторых заболеваний (малярия, тропическая лихорадка и др.) [1, 2]. Обнаружены штаммы *B. thuringiensis*, продуцирующие белки, токсичные для нематод [3]. Преимущества кристаллических белков *B. thuringiensis* заключается в том, что они специфически действуют на определенных насекомых, нетоксичны для позвоночных, не представляют опасности для окружающей среды. Эти свойства сделали Сгу белки *B. thuringiensis* реальной альтернативой химическим инсектицидам, и использование биопрепаратов на основе *B. thuringiensis* в качестве биоинсектицида возрастает.

Применение генетических и геноинженерных методов исследования *B. thuringiensis* стало новым этапом в борьбе с вредными насекомыми, в частности, появилась возможность обойти проблемы, свя-

занные с быстрой инактивацией кристаллических белков под влиянием ультрафиолета, а также с недоступностью препаратов на основе *B. thuringiensis* для насекомых, повреждающих корневую систему и внутренние части растений. Эти проблемы решаются за счет переноса генов *B. thuringiensis*, отвечающих за синтез Сгу белков, в геном других организмов (вирусов, бактерий, растений) [4–6]. В связи с этим во всем мире интенсивно проводятся исследования, связанные с поиском и изучением новых изолятов *B. thuringiensis*, чтобы расширить круг генов Сгу разной специфичности, которые можно использовать для борьбы с насекомыми-вредителями. Помимо этого, наличие широкого выбора изученных Сгу генов *B. thuringiensis* поможет в решении проблемы устойчивости вредителей к Сгу белкам *B. thuringiensis*, которая, хотя и намного медленнее, чем к химическим пестицидам, все же возникает.

Цель данной работы состояла в изучении основных характеристик (спектр продуцируемых белков и плазмидный состав) ряда новых штаммов *B. thuringiensis*, выделенных на территории Украины, которые являются важными при оценке перспективности этих штаммов использования в биотехнологии *B. thuringiensis*.

Материалы и методы. Бактериальные штаммы *B. thuringiensis* и условия их выращивания. В

работе использовали девять штаммов *B. thuringiensis*, выделенных на территории Украины (Крымский филиал отдела почвенной микробиологии Института сельскохозяйственной микробиологии ААН Украины, Симферополь) и отобранных по признаку двойной токсичности: высокой — к *Lepidoptera* и более низкой — к *Coleoptera* (личинкам колорадского жука). Для получения кристаллических белков культуры *B. thuringiensis* выращивали в среде С2 [7], содержащей 1 % глюкозы, 0,2 % пептона, 0,5 % казаминокислот («Difco», США), 0,2 % дрожжевого экстракта, 15 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 23 мМ KH_2PO_4 , 27 мМ K_2HPO_4 , 1 мМ $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6 мМ CaCl_2 , 0,25 мМ MnCl_2 , 0,017 мМ $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,017 мМ $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0,002 мМ $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Культуры *B. thuringiensis* выращивали в условиях аэрации при 30 °С до завершения спорообразования (как правило, 4 сут).

Для выделения плазмидной ДНК клетки *B. thuringiensis* выращивали в условиях аэрации в течение ночи на среде, содержащей 0,75 % пептона, 1 % глюкозы; 10 мМ трис-НСl, рН 7,6.

Анализ кристаллических белков. Споры и кристаллы собирали центрифугированием, дважды отмывали 1 М NaCl и дважды — стерильной деионизованной водой. Осадки ресуспендировали, концентрируя в 25 раз, в стерильной деионизованной воде, содержащей 1 мМ PMSF (фенилметилсульфонилфлюорид), разливали по 0,025—0,050 мл и хранили при -70 °С.

Кристаллические белки для электрофореза готовили следующим образом [8]: порцию (0,010—0,015 мл) препарата, содержащего споры и кристаллы, ресуспендировали в двукратном буфере для нанесения образцов (0,125 М трис-НСl, рН 6,8, 5 % SDS, 5 % 2-меркаптоэтанола, 10 % сахарозы, 0,005 % бромфенолового синего), кипятили в течение 10 мин на водяной бане, центрифугировали при 14 000 об/мин (10 мин), после чего образцы анализировали электрофорезом в 10 %-м ПААГ-SDS по Лэммли [9]. Окрашивание геля бриллиантовым синим R-250 также проводили по Лэммли.

Молекулярную массу белков определяли по калибровочным графикам, отражающим зависимость логарифма молекулярной массы маркерных белков (наборы HWM и LWM фирмы «Pharmacia», Швеция) от их относительной подвижности.

Изучение динамики синтеза кристаллических белков *B. thuringiensis*. Культуры *B. thuringiensis* выращивали в среде С2 [7] в условиях аэрации при 30 °С. Через определенные промежутки времени (6 ч, 1 сут, 3 сут) отбирали равные порции бактериальных культур. Белки готовили и изучали в 10 % ПААГ-SDS, как описано выше.

Выделение плазмидной ДНК *B. thuringiensis*.

Клетки *B. thuringiensis*, выращенные в течение ночи в условиях аэрации при 30 °С, собирали центрифугированием, дважды отмывали ТЕ-буфером (50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 20 мМ ЭДТА). Клетки лизировали инкубацией с лизоцимом (10 мг/мл) в течение 20 мин при 37 °С, после чего их обрабатывали проназой [10] (0,5 мг/мл) в течение 30 мин при 34 °С в присутствии 1 % SDS. Далее ДНК выделяли щелочным методом [11].

Плазмиды *B. thuringiensis* изучали методом электрофореза в 0,7 %-м геле агарозы в ТАЕ-буфере (0,04 М трис-ацетат, 0,002 М ЭДТА) с последующим окрашиванием геля бромистым этидием и визуализацией в ультрафиолетовом свете.

Результаты и обсуждение. *Изучение кристаллических белков *B. thuringiensis*.* Штаммы *B. thuringiensis*, выделенные на территории Украины, были отобраны по наличию токсичности их кристаллических белков как к *Lepidoptera*, так и к личинкам колорадского жука. Белки, продуцируемые этими штаммами во время споруляции, были изучены методом электрофореза в 10 %-м ПААГ (рис. 1). Как видно, пять штаммов из девяти продуцируют кристаллические белки с молекулярной массой выше 130 кДа. Штаммы *B. thuringiensis* 85 и 888 продуцируют два высокомолекулярных белка с близкой молекулярной массой — 137 и 146 кДа (таблица). Три штамма *B. thuringiensis* 014, 836, и 021 продуцируют белки с молекулярной массой 76,5 кДа. Однако *B. thuringiensis* 014 является более эффективным продуцентом этого белка, тогда как эффективность синтеза такого белка *B. thuringiensis* 836 и 021 на всех использованных

Молекулярная масса кристаллических белков изученных штаммов *B. thuringiensis*

Штамм	Молекулярная масса, кДа
820	164,0±4; 18,0±2
949	164,0±4; 18,0±2
834	144,5±4
85	146,0±4; 137,0±4; 18,0±2
888	146,0±4; 137,0±4; 18,0±2
014	76,5±2; 18,0±2
076	96,5±2; 77,0±2
836	76,5±2
021	76,5±2

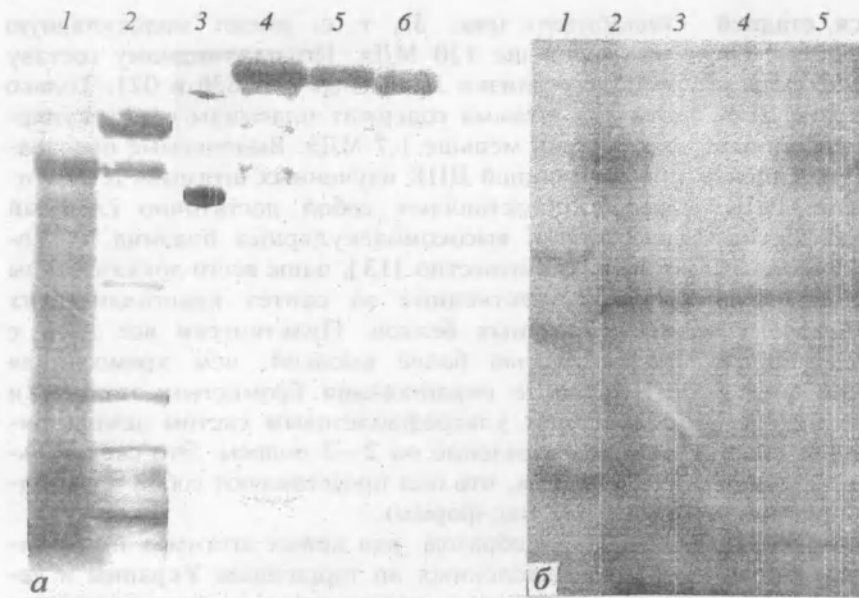


Рис. 1. Анализ кристаллических белков *B. thuringiensis* методом электрофореза в 10 %-м полиакриламидном геле: а — В. т. 014 (1); В. т. 076 (2); БСА и его димер как маркеры молекулярной массы (3); В. т. 949 (4); В. т. 820 (5); 834 (6). б — маркеры молекулярной массы: фосфоорилаза В (94 кДа), БСА (67 кДа), овальбумин (43 кДа) (1); В. т. 85 (2); В. т. 836 (3); В. т. 021 (4); В. т. 888 (5)

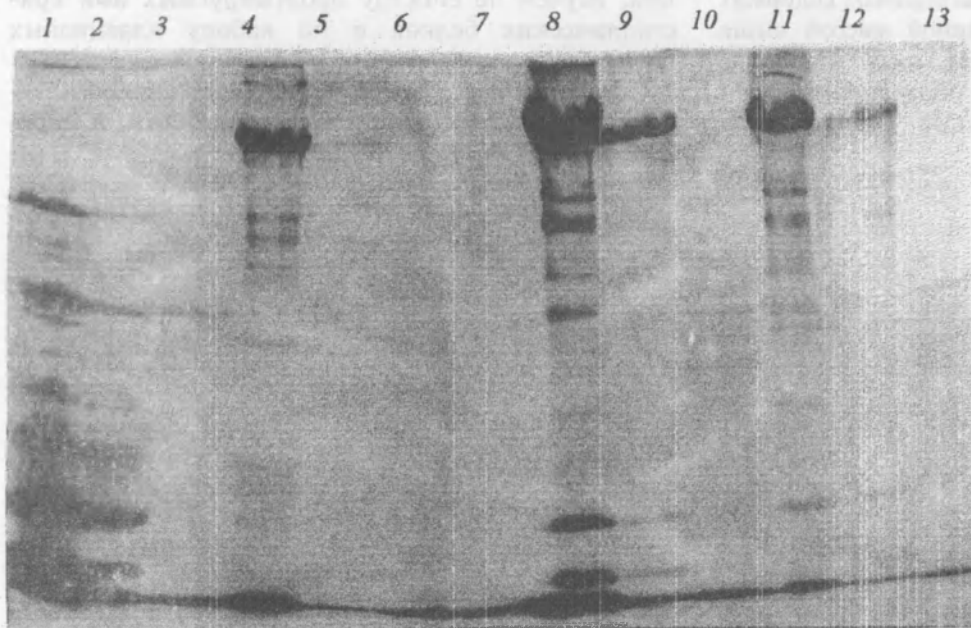


Рис. 2. Динамика синтеза кристаллических белков различными штаммами *B. thuringiensis*: 3, 6, 10, 13 — 6-ч культура В. т. 014, В. т. 834, В. т. 949, В. т. 820 соответственно; 2, 5, 9, 12 — суточная культура В. т. 014, В. т. 834, В. т. 949, В. т. 820; 1, 4, 8, 11 — 3-сут культура В. т. 014, В. т. 834, В. т. 949, В. т. 820

средах невелика. Кроме высокомолекулярных белков, ряд штаммов *B. thuringiensis* 820, 949, 014, 85, 888) продуцируют низкомолекулярный белок (приблизительно 18 кДа). Все описанные белки являются кристаллическими, продуцируются во время спорообразования и не обнаруживаются в вегетативных культурах (рис. 2).

Плазмиды новых штаммов *B. thuringiensis*.

Известно, что практически все изоляты содержат сложный комплекс экстрахромосомных элементов как кольцевых, так и линейных [12]. Выделение полного набора плазмидных ДНК *B. thuringiensis* представляет собой отдельную задачу, поскольку, кроме обычных трудностей, связанных с выделением ДНК высокомолекулярных плазмид, существует зависимость между условиями роста культуры, со-

ставом сред, в которой она выращивается, стадией роста и тем, ДНК каких плазмид выделяется. На рис. 3 представлены результаты электрофореза в 0,7 %-м геле агарозы суммарного препарата ДНК различных штаммов *B. thuringiensis*, полученных из вегетативных бактериальных клеток, выращенных на специальной среде для выделения ДНК. Эти условия, как правило, приводили к эффективному выделению большого набора плазмидных ДНК. Как видно, все изученные штаммы *B. thuringiensis* также содержат сложный комплекс экстрахромосомных элементов как высокомолекулярных (более 30 МДа), так и низкомолекулярных (менее 10 МДа). Один из штаммов — *B. thuringiensis* 834 — имеет отличающийся от других набор плазмид. Он не содержит низкомолекулярных плазмид, чья подвижность в геле ниже, чем подвижность сохранившейся после щелочной обработки хромосомной ДНК (приблизительно 30 МДа). Кроме этого, он содержит две пары высокомолекулярных плазмид с близкой молекулярной массой внутри каждой пары. Все штаммы *B. thuringiensis* содержат несколько плазмид с молекулярной массой выше 63 МДа (F' фактор *Escherichia coli*). Наиболее высокомолекулярные плазмиды обладают меньшей подвижностью, чем ДНК *pTiC58 Agrobacterium*

tumefaciens (рис. 3), т. е. имеют молекулярную массу больше 120 МДа. По плазмидному составу наиболее близки *B. thuringiensis* 836 и 021. Только эти два штамма содержат плазмиды с молекулярной массой меньше 1,7 МДа. Выделяемые препараты плазмидной ДНК изученных штаммов *B. thuringiensis* представляют собой достаточно сложный набор ДНК высокомолекулярных плазмид, на которых, как известно [13], чаще всего локализованы гены, ответственные за синтез кристаллических инсектицидных белков. Практически все ДНК с подвижностью более высокой, чем хромосомная ДНК, после окрашивания бромистым этидием и облучением ультрафиолетовым светом демонстрируют расщепление на 2—3 полосы. Это свидетельствует о том, что они представляют собой плазмидные ДНК (ccc-формы).

Таким образом, ряд новых штаммов *B. thuringiensis*, выделенных на территории Украины и демонстрирующих токсичность к представителям двух отрядов насекомых — *Lepidoptera* и *Coleoptera*, изучен по спектру продуцируемых ими кристаллических белков и по набору плазмидных ДНК.

Дальнейшее исследование специфичности генов, кодирующих кристаллические белки, и опре-

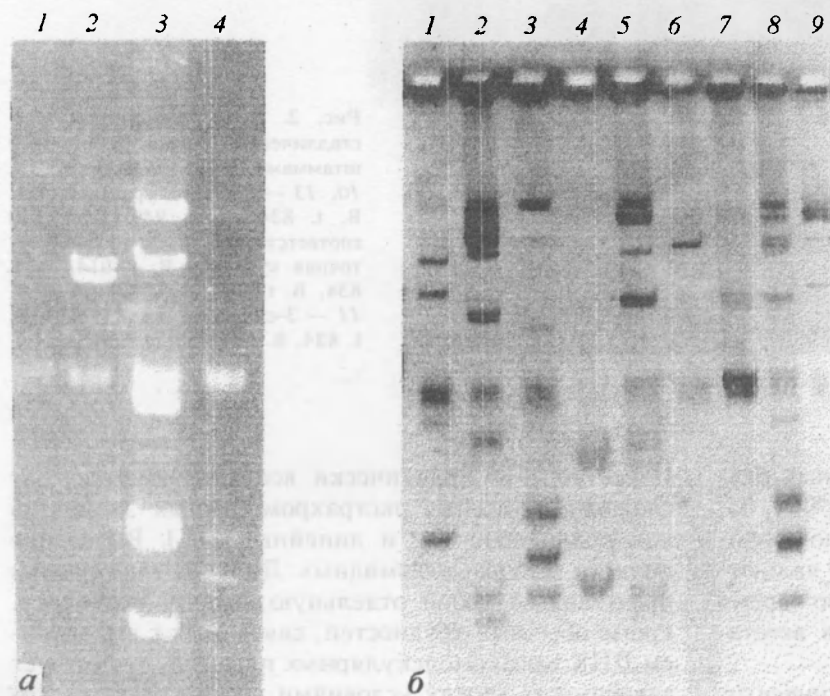


Рис. 3. Электрофорез в 0,7 %-м геле агарозы плазмидных ДНК различных штаммов *B. thuringiensis*: а — *pTiC58* (120 МДа) (1); *B. t.* 834 (2); *B. t.* 85 (3); *B. t.* 888 (4); б — *B. t.* 820 (1); *B. t.* 949 (2); *B. t.* 834 (3); ДНК F' фактора *E. coli* (63 МДа) (4); *B. t.* 836 (5); *pAp* 2034 *E. coli* (6); *B. t.* 014 (7); *B. t.* 021 (8); *B. t.* 076 (9)

деление их локализации позволит выбрать наиболее перспективные штаммы *B. thuringiensis* для дальнейшего их использования при биологическом контроле насекомых.

I. A. Isaikova, S. E. Rimar, L. M. Kuznetsova, V. A. Kordyum

Порівняльний аналіз спектра кристалічних білків та плазмід ряду нових штамів *Bacillus thuringiensis*

Резюме

Вивчено основні характеристики ряду нових штамів *B. thuringiensis*, виділених на території України, які проявляють токсичність по відношенню до *Lepidoptera* та *Coleoptera* (личинкам колорадського жука). Визначено їхній плазмідний склад, а також молекулярні маси кристалічних інсектицидних білків, що продукуються цими штамми під час споруляції.

I. A. Isakova, S. E. Rimar, L. N. Kuznetsova, V. A. Kordyum

Comparative analysis of the spectrum of crystal proteins and *Bacillus thuringiensis* of new plasmids strains

Summary

The spectrum of insecticidal crystal proteins produced by 9 new *B. thuringiensis* strains isolated in Ukraine was studied. These strains demonstrated high toxicity to *Lepidoptera* and lower toxicity to *Coleoptera* (Colorado potato beetle larvae) in biological tests. It was shown that 5 strains produce high molecular weight proteins (137–164 kD), 3 strains produce 76.5 kD proteins, and one produce two proteins (96.5 kD and 77 kD). All the studied strains contain the spectrum of plasmids of both low molecular weight (less than 10 MD) and high molecular weight (more than 30 MD). The strains producing crystal proteins of similar molecular weight differ by plasmid composition.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hofte H., Whiteley H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* // *Microbiol. Rev.*—1989.—53.—P. 242—255.
2. Schnepf E., Crickmore N. J., Van Rie, Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D. R., Dean D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*—1998.—62, N 3.—P. 775—806.

3. Feitelson J. S., Payne J., Kim L. *Bacillus thuringiensis*, insects and beyond // *Bio/Technology*.—1992.—10—P. 271—275.
4. Obukovic M. G., Perlak F. J., Kusano-Kretzmer K., Mayer E. J., Watrub L. S. Integration of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of the root-colonizing strains of pseudomonads using Tn5 // *Gene*.—1986.—45.—P. 327—331.
5. Lampel J. S., Canter G. L., Dimock M. S., Kelly J. L., Anderson J. J., Uratani B. B., Foulke J. S., Turner J. T. Integrative cloning, expression and stability of *cry* IA(c) gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* // *Appl. Environ. Microbiol.*—1994.—60.—P. 501—508.
6. Estruch J. J., Carozzi N. B., Desai N., Duck N. B., Warren G. W., Koziel H. G. Transgenic plants: an emerging approach to pest control // *Nat. Biotechnol.*—1997.—15.—P. 137—141.
7. Malvar T., Gawron-Burke C., Baum J. A. Overexpression of *B. thuringiensis* H kn A, a histidine protein kinase homology, bypasses early spomutation, that result in *cry* IIIA // *J. Bacteriol.*—1994.—176, N 15.—P. 4742—4749.
8. Lecadet M. M., Chaufaux J., Ribier J., Lereclus D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation // *Appl. Environ. Microbiol.*—1992.—58.—P. 840—849.
9. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 // *Nature*.—1970.—227.—P. 680—685.
10. Zaenen I., N. van Larebeko, Teuchy H., van Montagu M., Schell J. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains // *J. Mol. Biol.*—1974.—86.—P. 109—127.
11. Casse F., Boucher C., Julliot J. S., Michel M., Denarie J. Identification and characterization large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis // *J. Gen. Microbiol.*—1979.—113.—P. 229—242.
12. Carlson C. R., Caugant D. A., Kolsto A. B. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains // *Appl. Environ. Microbiol.*—1994.—60.—P. 1719—1725.
13. Kronstad J. W., Schnepf U. R., Whitely U. R. Diversity of localization for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes // *J. Bacteriol.*—1983.—154.—P. 419—428.

УДК 577.212

Поступила в редакцію 18.02.99