

УДК 576.809.5 : 632.937.15

МИКРОБИОЛОГИЯ

Р. А. Захарян, А. С. Агабалян, Л. А. Чил-Акопян,
Н. С. Гаспарян, К. А. Бакунц, П. Е. Татевосян,
член-корреспондент АН Армянской ССР Э. К. Африкян

О возможной роли экстрахромосомальной ДНК в образовании
энтомоцидного эндотоксина *Bac. thuringiensis*

(Представлено 21/VI 1976)

Плазмидная ДНК, представляя собой разновидность цитоплазматических генов, существует у бактерий автономно, независимо от хромосом и кодирует синтез белков и ферментных систем, придавая несущим их бактериям ряд весьма существенных признаков (¹).

Рекомбинантные молекулы ДНК в настоящее время успешно конструируются в условиях опыта *in vitro* на основе плазмидных ДНК ряда бактерий (²) главным образом на основе так называемых R-плазмид, обуславливающих устойчивость к различным антибиотикам. Исследование этих R-генетических структур представляет не только теоретический, но и важный практический интерес, так как именно гены внехромосомной наследственности оказываются в первую очередь ответственными за изменения токсических свойств бактериальной популяции в ходе эпидемического и инфекционного процессов. Не менее важным является изучение внехромосомной наследственности бактерий для установления роли их в биосинтезе физиологически активных соединений и конструирования новых практически ценных форм организмов с заданными свойствами.

Культуры спорообразующих бактерий, объединяемые в вид *Bac. thuringiensis*, образуют в процессе роста специфические кристаллоподобные включения белковой природы, обладающие высокой инсектицидной активностью. Механизм и условия биосинтеза этого токсина, получившего название δ -эндотоксина, остаются неизвестными. Работы в этой области представляют большой производственный интерес, поскольку культуры *Bac. thuringiensis* служат в настоящее время основой промышленной выработки бактериальных инсектицидных препаратов, получающих все более широкое практическое применение (^{3,4}).

Исследования, проведенные в Институте микробиологии АН Армянской ССР по изучению биологии культур *Bac. thuringiensis*, дали ос-

нования предположить о плазмидной, экстрахромосомальной природе наследственной регуляции образования кристаллоподобного токсина у бактерий данного вида. Интенсивность образования кристаллоподобного токсина варьирует, в значительной мере, в зависимости от состава питательной среды и условий выращивания. Иногда отмечается образование в одной клетке 2—3-х кристаллоподобных включений, а гораздо чаще—уменьшение, иногда и полная утеря способности клеток продуцировать эти образования.

Весьма характерным является снижение способности продуцировать кристаллоподобный эндотоксин при частых пересевах на некоторых питательных средах. В подобных случаях отмечается различная степень утери токсинообразования у культур разных серотипов. На массовом материале различных серотипов *Bac. thuringiensis* было изучено сохранение и репродукция способности образования этого токсина. Культуры высевались из пастеризованной суспензии на скошенный МПА в пробирках, инкубировались 5 дней при 28° и—после хранения в течение года при +8+10° в холодильнике—проверялись на репродукцию токсиногенной активности после посева на МПА в чашках Петри.

Сводные данные этих опытов, приведенные в табл. 1, указывают на неодинаковую степень сохранения токсинообразующих свойств у

Таблица 1

Сохранение и репродукция способности образования кристаллоподобного эндотоксина у культур *Bac. thuringiensis*
(учет результатов кристаллообразования при репродукции культур на МПА спустя 1 год)

Серотипы, номера штаммов	Снижение способности образования кристаллов, %
<i>thuringiensis</i> (berliner)	0
949, 990, 1013, 1025 728, 729, 734, 995	30—50
<i>sotto-dendrolimus</i>	0
898, 1002 690, 746, 781, 793, 923, 958, 1001, 1006, 1010, 1023, 1029	10—20
<i>galleriae</i>	0
818, 820, 821, 829, 845, 846, 847, 850, 851, 855, 857, 859, 881, 897, 904, 906, 922, 1005 861, 877	80
<i>caucasicus</i>	10—20
811, 831, 837, 839, 841, 844, 871, 873, 879, 880, 884, 887, 889, 891, 911, 920, 939, 957	30
828, 853, 875, 876, 893, 895, 914, 915, 917, 919, 925, 926 896, 905, 918, 921, 924	30—50

культур разных серотипов. Штаммы серотипа *galleriae* отличаются, как правило, более высокой степенью репродукции способности образования кристалловидных токсинов, тогда как культуры серотипа *caucasicus* выделяются сравнительно большей потерей этой активности. Ряд культур почти полностью теряет кристаллообразующую способность. В нашей практике наблюдались случаи, когда при микроскопическом анализе погибших гусениц тутового шелкопряда отмечалось массовое наличие типичных кристалловидных токсинов спорулирующих клеток *Bac. thuringiensis*, однако высев на МПА давал рост колоний, лишенных кристалловидных включений. В этом отношении большой интерес представляет обнаружение среди культур *Bac. cereus* штаммов, серотипируемых с Н-антигеном типичных представителей *Bac. thuringiensis* (³). Как известно, *Bac. cereus* и *Bac. thuringiensis* являются близко родственными, и основным признаком их видового разграничения является образование кристалловидных включений у последнего. Обнаружение гомологичного жгутикового антигена у представителей этих видов подчеркивает их биологическую однородность и, по-видимому, указывает на то, что в природе *Bac. thuringiensis*, теряя способность к образованию энтомоцидных кристаллов, может обнаруживаться и описываться как *Bac. cereus*.

Спонтанная и стабильная потеря способности образования кристалловидных токсинов, повышение индукции этого явления у клонов при росте в условиях повышенной температуры, а также наличие определенной связи фагочувствительности и фагорезистентности этих бактерий с токсинообразованием дали основание предположить присутствие плазмидного гена и ответственность плазмиды за внехромосомную регуляцию биосинтеза кристалловидного эндотоксина у культур *Bac. thuringiensis*.

Объектами исследований служили культуры *Bac. cereus* и *Bac. thuringiensis*, которые идентифицировались по Н-антигену как представители серотипа *caucasicus*. Штамм 641 *Bac. cereus* выделен в 1959 г. из подстилки на выкормке гусениц тутового шелкопряда, энтомоцидных кристалловидных включений не образует. Штамм 837 выделен из погибшего тутового шелкопряда в 1963 г., образует энтомоцидные кристаллы и является типичным представителем *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* (⁵). По фагочувствительности эти штаммы отличались резистентностью к различным фагам из *Bac. thuringiensis*, однако фаги из производства Абовянского завода биохимпрепаратов, лизировавшие штамм 837, не обладали литическим действием на указанный штамм *Bac. cereus*. Таким образом, способность к образованию кристалловидного токсина у изученных штаммов определенным образом коррелировала с их фагочувствительностью.

Культуры бактерий выращивались в условиях глубинной ферментации на питательной среде следующего состава (в %): K_2HPO_4 —0,2; NaCl—0,5; глюкоза—0,7; пептон—2,0; дрожжевой автолизат—0,5. Ферментация осуществлялась в 20-литровых аппаратах при 30°С в течение 12 часов. Конечный титр вегетативных клеток 1—1,5 млрд/мл; биомасса отделялась центрифугированием и хранилась при —15°С.

Изоляцию экстрахромосомальной ДНК из *Bac. thuringiensis* проводили по методу Гуерри с сопр. (6). Отмытые клетки суспендировали в 0,05М трис-буфере с 25%-ной сахарозой, рН 8,0, добавляли лизоцим (1 мг/мл) и 0,25М ЭДТА. Смесь обрабатывали SDS до 1% и 5М NaCl до 1М. Полученный, подобным образом, лизат оставляли при +4° на ночь, после чего центрифугировали при 1700 об./мин в течение 30 минут. Надосадочная жидкость после такого центрифугирования содержала около 96% экстрахромосомальной, плазмидной ДНК. Последующую депротенинизацию осуществляли хлороформ-фенольным способом. Полученные препараты ДНК обрабатывали РНК-азой и проназой. Об эффективности депротенинизации судили по отношению экстинкций при E_{260} и E_{280} , которое почти во всех случаях было равно 2,0.

Электрофоретическую идентификацию полученных препаратов экстрахромосомальных ДНК проводили в 0,6% агарозе. Расплавленную и охлажденную до 45° агарозу заливали в электрофоретические трубки. На гель насливали до 10 мкг ДНК с 25%-ой сахарозой. Электрофорез проводили при общем напряжении 84 в и силе тока 3,5 мА на трубку. Об окончании электрофореза судили по прохождению бромфенол-синего. Гели окрашивали этидиум бромидом (1 мкг/мл) в течение 30 минут, отмывали и анализировали в хемископе.

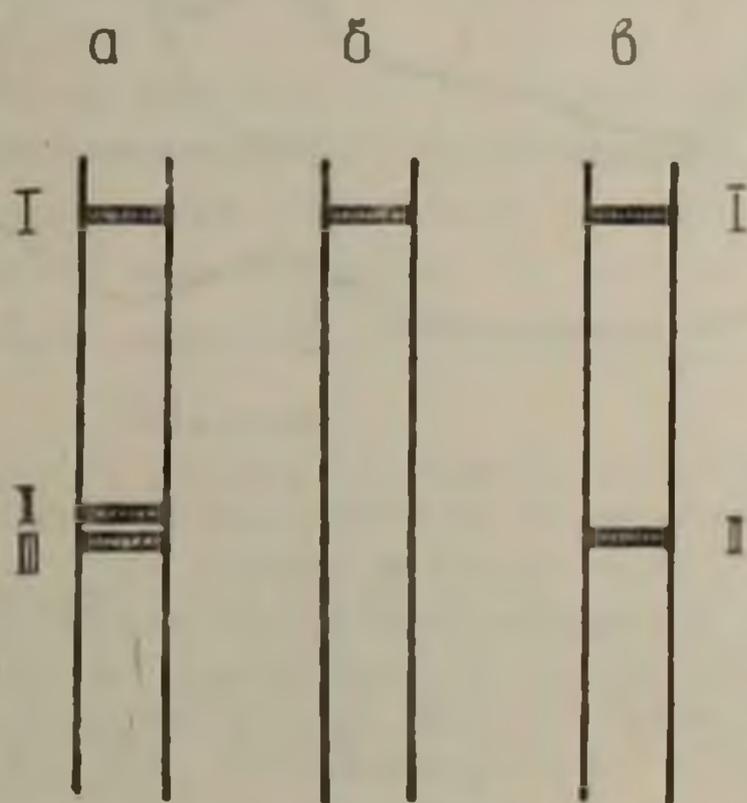


Рис. 1. Электрофоретическая подвижность экстрахромосомальной ДНК в 0,6% агарозе.
 а—I хромосомальная ДНК, II—экстрахромосомальная ДНК, III—экстрахромосомальная ДНК, штамм 837 *Bac. thuringiensis*;
 б—ДНК фага лямбда;
 в—I хромосомальная ДНК, II—экстрахромосомальная ДНК, штамм 641 *Bac. cereus*

Полученные результаты показывают, что не образующий токсин штамм 641 *Bac. cereus* несет в себе один плазмидный ген, а токсинообразующий штамм 837 *Bac. thuringiensis*—два экстрахромосомальных плазмидных гена, т. е. один добавочный (рис. 1).

Экстрахромосомальную ДНК получали также методом хроматографии депротенизированных нуклеиновых кислот лизатов и осветленных лизатов на колонке с гелем сефарозы 4В с пределом эксклюзии $3 \times 10^5 - 20 \times 10^6$. Осветленный бактериальный лизат, полученный по вышеуказанному способу, и депротенизированная тотальная нуклеиновая кислота лизата при хроматографии через колонку сефарозы фракционировались в случае токсинообразующего штамма *Bac. thuringiensis* на две, а в случае не образующего токсин штамма—на одну фракцию экстрахромосомальной ДНК.

Обе экстрахромосомальных ДНК элюировались с колонки в последних фракциях эфлюента, разделяясь от хромосомной ДНК—двух фракций РНК-полисахаридов—в случае токсинообразующего штамма и одной фракции РНК-полисахаридов—у не образующего токсин штамма. Добавочная фракция РНК-полисахаридов—не обнаруживается у не образующего токсин штамма (рис. 2). Выяснение роли данной фракции

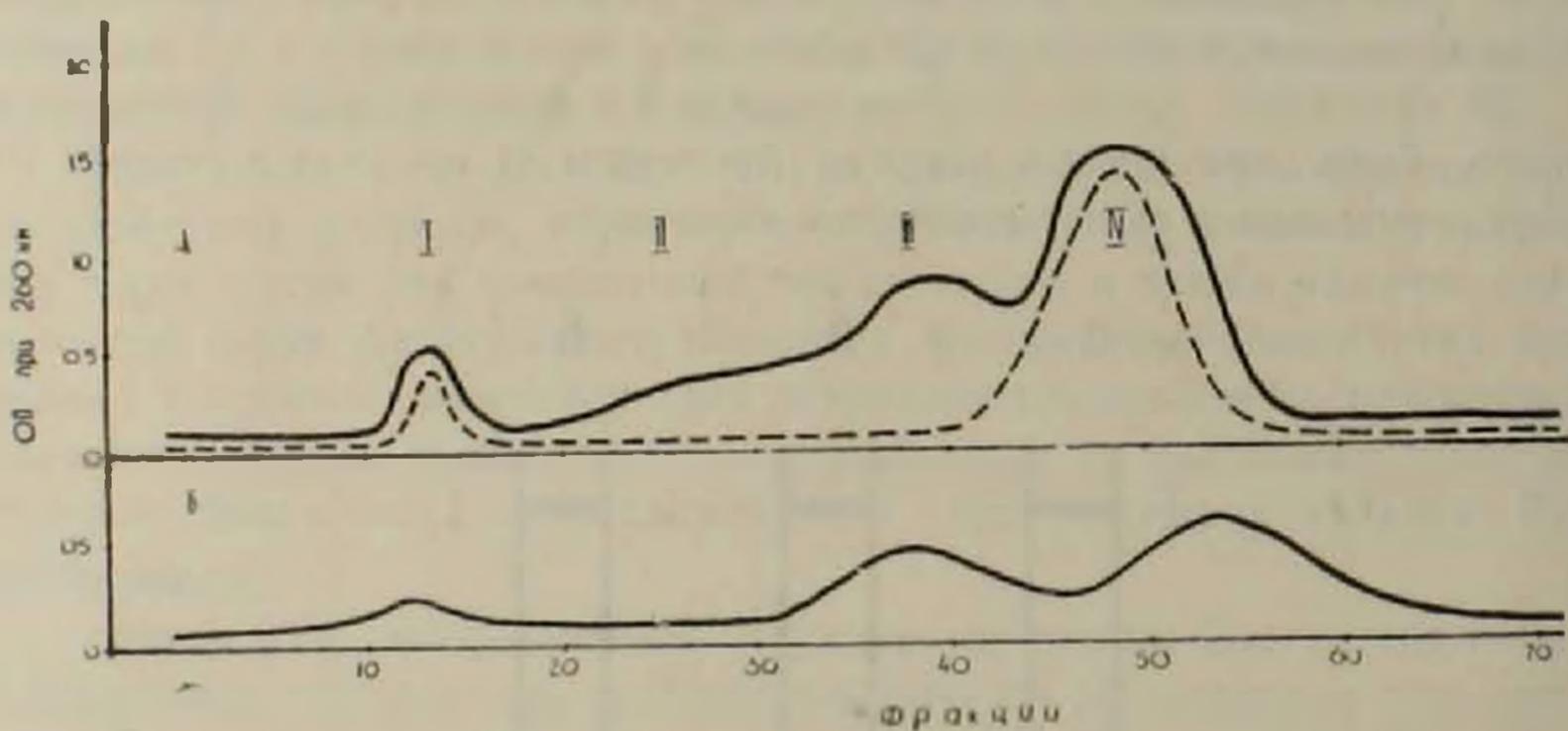


Рис. 2. Хроматография «осветленных лизатов» и депротенизированных н-уклеиновых кислот лизатов на сефарозе 4В.

—лизат штамма 837 *Bac. thuringiensis* (наверху); штамма 641 *Bac. cereus* (внизу);

· · · депротенизированный препарат из лизата штамма *Bac. thuringiensis*

I—хромосомальная ДНК; II—РНК, полисахариды;

III—РНК, полисахариды; IV—экстрахромосомальная ДНК, нуклеотиды, частично полисахариды.

Запись на автоматическом проточном денситометре ZSAV при 260 мμ

рибонуклеиновой кислоты в кодировании синтеза белка энтомоцидного кристаллоидного токсина у *Bac. thuringiensis* представляет большой научно-практический интерес.

Полученные данные позволяют предположить ориентировочный молекулярный вес плазмидных ДНК в пределах $10 \times 10^6 - 12 \times 10^6$ дальтон, согласно профилю электрофоретической подвижности в присутствии маркера с молекулярным весом 27×10^6 . В качестве маркера использовали ДНК фага лямбда «В»2.

Таким образом, впервые у *Bac. thuringiensis* методом электрофореза в агарозном геле и гель-фильтрацией на сефарозе обнаружены

экстрахромосомальные плазмидные гены, из которых один плазмидный ген у не образующего кристаллоподобный токсин штамма и два—у токсинобразующего штамма. Согласно профилю элюции с колонки сефарозы ориентировочный молекулярный вес обнаруженных плазмидных ДНК оценивается в пределах 10×10^6 — 12×10^6 дальтон.

Дальнейшие исследования по элиминации плазмидных генов позволят оценить вклад добавочного гена *Bac. thuringiensis* в синтезе энтомоцидных включений и наметить определенные пути по биосинтезу и стимуляции процесса образования их у бактерий.

Авторы выражают благодарность Ж. И. Акопяну за участие в обсуждении результатов.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР
Институт микробиологии
Академии наук Армянской ССР

Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ, Ա. Ս. ԱՂԱՐԱՎՅԱՆ, Լ. Ա. ԶԻԼ-ՀԱԿՈՐՅԱՆ, Ն. Ս. ԳԻՍՊԻՐՅԱՆ, Կ. Ա. ԲԱՇՈՒՆՑ, Պ. Ե. ԹԱԳԵՎՈՍՅԱՆ, Հայկական ՍՍՀ ԳԱ րդրակից-անդամ է. Գ. ԱՅՐԻԿՅԱՆ

Bac. thuringiensis —ի կողմից էնտոմոցիդ Լնդոտոֆսինի առաջացման համար էֆստրաֆրոմոսումալ ԴՆԹ-ի հնարավոր դերի մասին

Հետազոտությունները կատարել են *Bac. thuringiensis* և *Bac. cereus* շտամների հետ: Փորձերի արդյունքները ցույց են տվել, որ *Bac. thuringiensis*-ի էնտոմոցիդ տարսին առաջացնող 837 շտամը պարունակում է պլազմիդային գեն և չի հայտնաբերվում ուսումնասիրված *Bac. cereus*-ի կուլտուրայի բջիջներում, որոնք զուրկ են այդպիսի ունակությամբ:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ R. C. Clowes. *Bacteriol. Revs.*, 36, 361 (1972). ² N. W. Dunn, F. Gonsalus, J. *Bacteriol.*, 114, 974 (1974). ³ Э. К. Африкян, Энтомопатогенные бактерии и их значение, Ереван 1973. ⁴ Э. К. Африкян, «Успехи микробиологии», № 10, 1975. ⁵ Э. К. Африкян, Л. А. Чил-Акопян, ДАН Арм. ССР, Т. 47, № 4 (1968). ⁶ Guerri et al., *J. Bacteriol.*, 116, 1064 (1973).