

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.113.083

Н. С. Амбарцумян, В. Г. Чичян, К. О. Чилингарян,
В. Ш. Меликсетян, Ж. И. Акопян, академик АН Армянской ССР Э. Г. Африкян

Изменения спектра экстрахромосомальных ДНК культур
Bacillus thuringiensis серотипа Н-14 в зависимости от
стадии развития

(Представлено 24/VII 1986)

Благодаря способности продуцировать параспоральный кристалл (δ -эндотоксин), обладающий инсектицидной активностью, спорообразующие бактерии *Bacillus thuringiensis* в настоящее время широко употребляются для биологической борьбы с насекомыми-вредителями. Большая часть исследованных штаммов *B. thuringiensis* патогенна для личинок насекомых отряда чешуекрылых (¹). Исключение составляет δ -эндотоксин, продуцируемый штаммами серотипа Н-14 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* и сильно токсичный против личинок комаров и мошек (²). Общим свойством культур *B. thuringiensis* является наличие в клетках экстрахромосомальных плазмидных ДНК, сильно различающихся по молекулярным массам (^{3,4}). В некоторых случаях было показано наличие в составе высокомолекулярных плазмид гена, кодирующего δ -эндотоксин (^{5,6}).

Молекулярное клонирование последовательностей, кодирующих δ -эндотоксин, показало, что в некоторых штаммах ген локализован на плазмидах, а в случаях штаммов других серотипов, например, *B. thuringiensis* subsp. *berliner*, как в составе хромосомы, так и на плазмиде (⁷⁻¹¹). Анализ ряда штаммов *B. thuringiensis* показал множественную локализацию и дивергенцию генов δ -эндотоксина, а также существенные различия как по уровню, так и по спектру энтомопатогенной активности (^{8,10,12}). Характерным для культур *B. thuringiensis* является также появление параспорального кристалла только на стадии споруляции культуры (¹³). Полученные данные указывают на сложный характер регуляции активности генов δ -эндотоксина у разных штаммов *B. thuringiensis*.

Возможным вариантом регуляции активности гена может быть увеличение дозы гена, что позволит в ограниченное время продуцировать большее количество белка, необходимое для формирования кристалла.

Для выяснения такой возможности мы изучили спектр экстрахромосомальных ДНК *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* на разных стадиях развития синхронизированной культуры бактерий. Для бактерий серотипа Н-14 показана локализация гена δ -эндотоксина на одной из

высокомолекулярных плазмид (¹⁴), поэтому особое внимание привлекает их поведение в процессе развития бактерий.

В работе использованы два штамма серотипа Н-14 *B. thuringiensis* из коллекции Института микробиологии АН АрмССР (ИНМИА): ИНМИА-1125 (типовой штамм, полученный из Института Пастера, Париж) и оригинальный штамм ИНМИА-477, описанный нами ранее (¹⁵).

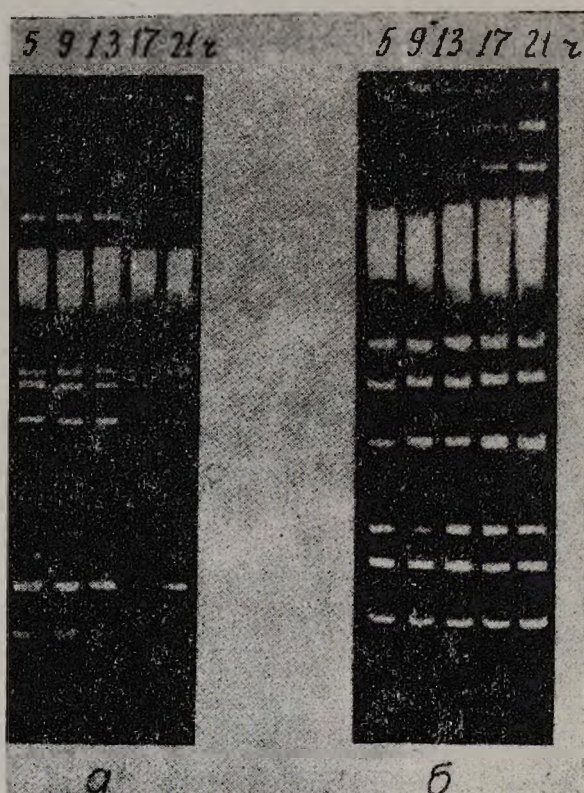
Синхронизированные бактерии выращивались в глубинных условиях в конических колбах (250 мл) по 20 мл в среде, содержащей (г/л): гидролизат рыбный—20,0 $MnSO_4$ —0,002, pH 7,2. Культуры инкубировались на круговой качалке 250 об./мин при 30°. Пробы отбирали через определенные промежутки времени. Одновременно проводили микроскопию нативных препаратов в фазово-контрастном микроскопе для определения стадии развития культуры. Выделение плазмидных ДНК проводили по методу (¹⁶) с модификациями (⁴).

Анализ плазмидных ДНК проводили электрофорезом в 0,7%-ном агарозном геле (18×18×0,3) в буфере 40 мМ трис CH_3COON , 50 мМ CH_3COONa , 1 мМ ЭДТА, pH 7,4, 16 ч при 30 В. После окрашивания геля бромидом этидия (0,5 мкг/мл) молекулы ДНК визуализировали по их свечению в ультрафиолетовом свете.

Ранее в прямых экспериментах по клонированию гена δ -эндотоксина из *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (¹⁴) было показано, что ген δ -эндотоксина локализован в Hind III фрагменте плазмиды с молекулярной массой 72—75 MD. В связи с выяснением вопроса о механизмах регуляции активности генов, кодирующих эндотоксин, мы проследили за поведением высокомолекулярных плазмид *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* на различных стадиях развития культуры. Одновременно исследовались два штамма серотипа Н-14. Синхронизированные культуры двух штаммов—ИНМИА-1125 и ИНМИА-477—подращивались в одинаковых стандартных условиях. Через определенные промежутки времени отбирали пробы для фазово-контрастной микроскопии с целью определения стадии развития культуры. Пробы отбирались через 5, 9, 13, 17, 21 ч с начала развития культуры. В случае обоих штаммов при макроскопии точек через 5, 9, 13 ч наблюдались вегетативные клетки, часто в цепочках по две-три клетки, с однородным содержанием. 17-часовые пробы содержали вегетативные клетки в начале споруляции, с гранулированным содержимым, в отдельных случаях (штамм ИНМИА-477) наблюдалось образование кристаллов и спор. В пробах, отобранных на 21-ом ч развития культур, наблюдались спорующие клетки с включениями; в случае штамма ИНМИА-477 встречались частично выпавшие споры. Мы предполагаем, что скорость развития штамма ИНМИА-477 несколько выше, чем типового штамма ИНМИА-1125, однако количественные расчеты темпов роста и развития культур не проводились.

Одновременно с микроскопией в те же моменты времени отбирались пробы для выделения плазмидных ДНК. Для выделения отбиралось примерно одинаковое количество клеток, определяемое по оптической плотности культур при 650 нм.

На рисунке приведены электрофореграммы гелей, содержащих плазмидные ДНК, выделенные на различных стадиях развития культуры. Видно, что между штаммами наблюдаются определенные различия. В случае штамма ИНМИА-1125 (рисунок ,а) на всех стадиях развития выявляется один и тот же спектр плазмидных ДНК.



Электрофоретическое разделение экстрахромосомальных ДНК клеток *B. thuringiensis*, выделенных на 5, 9, 13, 17 и 21 ч развития культур: а—штамм ИНМИА-1125; б—штамм ИНМИА-477

В плазмидном спектре штамма ИНМИА-477 (рисунок ,б) наблюдаются некоторые изменения. Если в случае плазмидных ДНК, выделенных на более поздних стадиях, обнаруживается или одна, или две полосы ДНК в зоне фореза, где локализуются высокомолекулярные ДНК, то при выделении плазмид на ранних стадиях развития культуры (5 ч) высокомолекулярные плазмиды не обнаруживаются. Тот факт, что для выделения плазмидных ДНК всякий раз отбиралось одинаковое количество клеток, указывает на то, что наблюдаемое различие не является артефактом.

Мы предполагаем, что в исследованном нами штамме ИНМИА-477

во время вегетативной фазы развития культуры, в период подготовки клеток к споруляции и синтезу δ -эндотоксина, происходит амплификация плазмиды, несущей ген δ -эндотоксина. Возможно, такая амплификация необходима для обеспечения массивного синтеза белка эндотоксина во время образования кристалла.

Следует отметить, что наблюдаемые различия в поведении высокомолекулярных плазмид коррелируют со степенью токсичности штаммов: препараты δ -эндотоксина из штаммов ИНМИА-477 примерно в 50 раз токсичнее для личинок двукрылых по сравнению с типовым штаммом ИНМИА-1125 (17).

Изменения в количестве копий плазмидной ДНК были показаны ранее для *B. thuringiensis* subsp. *galleriae*, выращиваемых в различных питательных средах (18), что указывает на нестабильное состояние плазмид, несущих ген δ -эндотоксина.

Дивергенция генов δ -эндотоксина (10), локализация их как на высокомолекулярных плаزمидах, так и на хромосомной ДНК (8), недавнее обнаружение в окружении гена повторяющихся обращенных последовательностей (11), а также различная активность токсинов у разных штаммов,—все это указывает на сложный характер регуляции активности δ -эндотоксина в клетках. Подтверждением сказанного являются также данные, полученные при экспрессии генов δ -эндотоксина в *E. coli*. Уровень экспрессии генов в *E. coli* значительно ниже, чем у исходного штамма бацилл (8,9). Это также указывает на то, что в клетках *Bacillus thuringiensis* имеются дополнительные системы регуляции, приводящие к аномально высокому уровню экспрессии белка. Одной из таких систем может быть амплификация плазмиды, несущей структурный ген δ -эндотоксина.

Мы предполагаем, что нам удалось обнаружить подобный механизм регуляции активности гена δ -эндотоксина в случае штамма ИНМИА-477.

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

Ն. Ս. ՀԱՄԱՐԱԶՈՒՄՅԱՆ, Վ. Գ. ԶԻՉՅԱՆ, Կ. Օ. ԶԻՆԳԱՐՅԱՆ,
Վ. Շ. ՄԵԼԻՔՍԵՅԱՆ, Ժ. Ի. ՀԱԿՈԲՅԱՆ, Է. Գ. ԱՅՐԻԿՅԱՆ

Bacillus thuringiensis H-14 սերոտիպի կոպտուրայի
էֆստրաֆրոմոսումալ Դենթ սպեկտրի փոփոխությունները՝ կախված
զարգացման փուլից

Նկարագրված է *Bacillus thuringiensis* H-14 սերոտիպի շտամների էֆստրաֆրոմոսումալ Դենթ-ի սպեկտրի կապը կոպտուրայի զարգացման փուլից: Ցույց է տված δ -էնդոտոքսինի գենը պարունակող բարձրմոլեկուլար պլազմիդների տարբերությունը: Առաջարկված է δ -էնդոտոքսինի գենի ակտիվության կարգավորման հնարավոր մեխանիզմներից մեկը:

¹ L. J. Goldberg, J. Margalit, Mosquito News, v. 33 (1977). ² H. De Barjac, Entomophaga, v. 286 D (1977). ³ Р. А. Захарян, Ю. С. Исраелян, А. С. Азабян и др. Микробиология, т. 23, вып. 2 (1979). ⁴ D. Lereclus, M. M. Lecadet, J. Riblier e. a. Mol. Gen. Genet., v. 186 (1992). ⁵ J. M. Jr. Gonzales, H. T. Dulmage, A. C. Carlton, Plasmid, v. 5 (1981). ⁶ H. Kamdar, K. Gayazaman, BBRC, v. 110, № 2 (1983). ⁷ G. A. Held, L. A. Bulla, E. Jr. Ferrari e. a., PNAS, v. 79 (1982). ⁸ A. F. Klier, F. Fargette, J. Riblier e. a., EMBO J., v. 1 (1982). ⁹ H. Schnepf, H. R. Whiteley, PNAS, v. 78 (1981). ¹⁰ D. Lereclus, M. M. Lecadet, A. Klier e. a., Biochimie, v. 67 (1985). ¹¹ J. W. Kronstad, H. R. Whiteley, J. Bacteriol., v. 160 (1984). ¹² J. W. Kronstad, H. E. Schnepf, H. R. Whiteley, J. Bacteriol., v. 154 (1983). ¹³ L. A. Bulla, K. J. Kramer, L. I. Davidson, J. Bacteriol., v. 130 (1977). ¹⁴ E. S. Ward, J. D. Ellar, J. A. Todd, FERS-letts, v. 175, №2(1984). ¹⁵ Н. С. Амбарцумян и др. Тезисы II респ. конф. посвященной пробл мам физ.-хим. биол., Ереван, 1986. ¹⁶ H. C. Birnboim, J. Doly, Nucl. Acids. Res., v. 7 (1979). ¹⁷ Заявка № 3789163/28—14. Приоритет от 14.08.84 г., решение о выдаче авторского свидетельства от 26.02.85 г. ¹⁸ L. M. Ermakova, F. P. Galushka, A. Y. Strongin e. a., J. Gen. Microbiol., v. 107 (1978).

