

Białko Cry9_B9 oraz jego zastosowanie

Przedmiotem wynalazku jest białko Cry9_B9, oraz jego zastosowanie w zwalczaniu owadów z rzędu Lepidoptera, w szczególności owadów z gatunku *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). Przedmiotem wynalazku jest także DNA kodujący to białko, wyizolowany z DNA izolatu bakteryjnego *Bacillus thuringiensis* MPU B9.

Insektycydy oparte na kryształach białkowych *B. thuringiensis* mają długą historię ich zastosowania w ochronie roślin przed szkodnikami, a także w zwalczaniu owadów, będących wektorami chorób pasożytniczych. Aktywność bakterii *B. thuringiensis* względem bezkręgowców jest wynikiem wytwarzaniem przez te bakterie wielu czynników toksycznych, z których najbardziej efektywne są białka z grupy Cry. Białka Cry zwane są również białkami krystalicznymi (ang. *crystal toxins*), ponieważ wytwarzane są przez bakterie *B. thuringiensis* w postaci kryształów białkowych w czasie procesu sporulacji, czyli wytwarzania form przetrwalnikowych - endospor. Biologiczne środki ochrony roślin mające w swoim składzie proteiny Cry *B. thuringiensis* są alternatywą dla syntetycznych pestycydów i są cenione ze względu na ich bezpieczeństwo dla kręgowców (w tym ludzi) oraz innych organizmów ekosystemu nie będących celem zwalczania, a także niski koszt ich produkcji [Sansinenea, E., 2012. *Bacillus thuringiensis* Biotechnology, Springer 4].

Poszczególne szczepy *B. thuringiensis* produkują białka Cry charakteryzujące się różną sekwencją aminokwasową, przy czym dany szczep może wytwarzać od jednego do kilku rodzajów białek Cry [Sansinenea, E., 2012. *Bacillus thuringiensis* Biotechnology, Springer 4]. Sekwencje

aminokwasowe wszystkich znanych do chwili obecnej białek Cry (oraz sekwencje DNA kodujące te białka) zdeponowane są w bazie danych Genbank [Clark i wsp., 2016. *Nucleic Acids Res.* 44, D67–D72]. Różnice w sekwencji aminokwasowej protein Cry przekładają się na różnice w
25 poziomie ich toksyczności oraz zakres wrażliwych gatunków owadów. Dane białko Cry wykazuje działanie owadobójcze wobec pewnych grup owadów, a jednocześnie nie wykazuje tych właściwości wobec innych. Dla niektórych białek nie wskazano do tej pory żadnych wrażliwych gatunków owadów. Jak to przedstawił Schnepf i wsp. [1998. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775–806], zmiana nawet jednego aminokwasu w białku może spowodować znaczną zmianę aktywności
30 tego białka i zakresu wrażliwych gatunków owadów. Z tego powodu cały czas poszukuje się nowych białek Cry, charakteryzujących się:

- odmienną sekwencją w stosunku do tych poznanych do tej pory;
 - szerszym spektrum działania oraz
- wyższą aktywnością owadobójczą [Sansinenea, E., 2012. *Bacillus thuringiensis*
35 *Biotechnology*, Springer 4].

Celem wynalazku było wytworzenie toksycznego dla owadów białka kodowanego przez fragment DNA występujący w genomie *Bacillus thuringiensis* oraz opracowanie sposobu wytwarzania tego białka w komórkach bakterii innych niż *Bacillus thuringiensis*, a także jego
40 zastosowanie w praktyce.

Przedmiotem wynalazku jest DNA o sekwencji 1, wyizolowany z DNA szczepu bakteryjnego *B. thuringiensis* MPU B9. Przedmiotem wynalazku są również DNA o podobieństwie sekwencji powyżej 90% do sekwencji 1, korzystnie powyżej 95%, które po ekspresji w organizmach żywych kodują białko identyczne do białka kodowanego przez DNA o sekwencji 1.

45 W drugim aspekcie przedmiotem wynalazku jest białko o strukturze pierwszorzędowej odpowiadającej sekwencji 2 kodowane przez DNA o sekwencji 1. Białko to zostało nazwane przez twórców wynalazku jako białko Cry9_B9.

W trzecim aspekcie przedmiotem wynalazku jest sposób pozyskiwania białka Cry9_B9.

50 Sposób uzyskania białka Cry9_B9 jest wieloetapowy i składa się z następujących kroków:

1. Izolacja genomowego DNA z komórek *B. thuringiensis* MPU B9
 - a) hodowla bakterii *B. thuringiensis* MPU B9 w celu namnożenia materiału genetycznego
 - b) uzyskanie z hodowli osadu zawierającego komórki bakteryjne
 - c) liza enzymatyczna komórek *B. thuringiensis*
 - 55 d) izolacja bakteryjnego genomowego DNA z lizatu
2. Konstrukcja wektora plazmidowego zawierającego DNA kodujący białko Cry9_B9
 - a) amplifikacja fragmentu DNA o sekwencji 1 z DNA wyizolowanego ze szczepu *B. thuringiensis* MPU B9 przy użyciu metody PCR oraz starterów o sekwencjach 3 i 4
 - b) wprowadzenie DNA o sekwencji 1 do wektora plazmidowego pLATE11 metodą LIC i
60 otrzymanie wektora pLATE11-Cry9_B9
 - c) wprowadzenie wektora pLATE11-Cry9_B9 do komórek *E. coli*
 - d) klonowanie wektora pLATE11-Cry9_B9 w komórkach *E. coli* i jego izolacja
3. Uzyskanie białka B9 Cry9_B9 drogą ekspresji w komórkach *E. coli*
 - a) wprowadzenie wektora pLATE11-Cry9_B9 do komórek *E. coli* szczepów zdolnych do
65 syntezy polimerazy RNA bakteriofaga T7
 - b) synteza białka Cry9_B9 w komórkach *E. coli* w wyniku ekspresji DNA o sekwencji 1 zawartej w wektorze pLATE11-Cry9_B9
 - c) izolacja białka Cry9_B9 z komórek *E. coli*

70 Dla potwierdzenia wyżej opisanego sposobu przeprowadzono m.in. następujące badania.

1. Izolacja DNA.

W celu izolacji genomowego DNA szczep bakteryjny MPU B9 hodowano na podłożu LB (BioShop, nr kat. LBL405) w łaźni wodnej z wytrząsaniem 200 rpm, w temperaturze 37°C przez 20 godzin. Następnie 20 mL hodowli zwirowano 3000 rpm, 4°C, 5 min i supernatant odrzucono.
75 Osad zawieszono w 1,5 mL buforu o składzie: 25 mM Tris (BioShop, nr kat. TRS001); 10 mM EDTA (BioShop, nr kat. EDT001); 50 mM glukozy (BioShop nr kat. GLU501); 1 mg/mL lizozymu (Sigma Aldrich nr kat 62970) i 0,04 mg/mL RNazy (Novazym, nr kat. RN1001-10) i inkubowano 1 godzinę w 37°C. Następnie z uzyskanego lizatu izolowano DNA standardową

metodą z użyciem zestawu do izolacji genomowego DNA na złożu krzemionkowym (A&A
80 Biotechnology, nr kat. 116-50) według instrukcji producenta.

2. Konstrukcja wektora plazmidowego zawierającego DNA o sekwencji 1

Za pomocą reakcji PCR przeprowadzono amplifikację fragmentu DNA o sekwencji 1
znajdującego się w genomie *B. thuringiensis* MPU B9 z użyciem startera o sekwencji 3 (Cr9FOR) i
85 startera o sekwencji 4 (Cr9REV). Amplifikację prowadzono w termocyklerze C1000 Thermal
Cycler (Bio-Rad) w mieszaninie reakcyjnej o składzie: 1U polimerazy DNA Pfu (Thermo
Scientific nr kat. EP0501), 5 µl buforu reakcyjnego zawierającego 20 mM MgSO₄ (Thermo
Scientific nr kat. EP0501), 1 µM startera Cr9FOR, 1 µM startera Cr9REV, 200 µM dNTP (Thermo
Scientific nr kat. R0241) oraz 0,7 µg genomowego DNA wyizolowanego ze szczepu
90 *B. thuringiensis* MPU B9. Całość uzupełniono sterylną wodą demineralizowaną do objętości 50 µl.
Parametry reakcji PCR przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba powtórzeń
Denaturacja wstępna	94	180	1
Denaturacja	94	30	28
Przyłączanie starterów	57	30	
Wydłużanie	72	240	
Wydłużanie końcowe	72	480	1

95 Następnie zamplifikowany fragment DNA, został wprowadzony do wektora plazmidowego
pLATE11 za pomocą metody LIC (Ligation Independent Cloning) z użyciem zestawu do
klonowania aLICator (Thermo Fisher Scientific nr kat. K1241) według załączonej instrukcji. W
efekcie uzyskano wektor pLATE11-Cry9_B9. Uzyskany w ten sposób plazmid ekspresyjny
wprowadzono do komórek *Escherichia coli* XL1 Blue (szczep bakteryjny zdeponowany w kolekcji
100 szczepów Zakładu Mikrobiologii UAM) drogą transformacji za pomocą standardowych technik
molekularnych opisanych w Protokole 24 „The Inoue Method for Preparation and Transformation
of Competent *E. coli*: "Ultra-Competent" Cells (Sambrook J, Russell D (2001) Molecular Cloning:

A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.).
Bakterie zawierające wektor z wprowadzonym insertem DNA hodowano na podłożu LB (BioShop,
105 nr kat. LBL405) z dodatkiem ampicyliny (BioShop; nr kat. AMP201; końcowe stęż. 100 µg/mL) w
37°C przez 16 h w celu namnożenia wektora plazmidowego w komórkach *E. coli*. Następnie,
plazmidy izolowano z komórek z użyciem zestawu GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo
Scientific; nr kat. K0502). Wprowadzony do wektora fragment DNA sekwencjonowano z
wykorzystaniem automatycznego analizatora DNA 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystem)
110 i ustalono sekwencję nukleotydów jako sekwencję 1, według niniejszego zgłoszenia.

3. Uzyskanie białka Cry9_B9 drogą ekspresji w komórkach *E. coli*

Białko Cry9_B9 uzyskano poprzez ekspresję w komórkach *E. coli* BL21 (DE3) (szcep
bakteryjny zdeponowany w kolekcji szczepów Zakładu Mikrobiologii UAM), do których
115 wprowadzono wektor pLATE11-Cry9_B9 zawierający DNA o sekwencji 1 kodujący to białko.
Wektor pLATE11-Cry9_B9 wprowadzono do kompetentnych komórek *Escherichia coli* BL21
(DE3) metodą transformacji. W tym celu do 12×10^7 komórek *E. coli* BL21 (DE3) dodawano ok.
25 ng wektora, po czym próbki inkubowano w lodzie przez 30 min. Następnie, zastosowano szok
cieplny poprzez ogrzanie mieszaniny DNA i bakterii w 42°C przez 90 sekund i próbki schłodzono
120 ponownie w lodzie. Do transformowanych komórek dodano 800 ml podłoża hodowlanego LB
(BioShop, nr kat. LBL405) i inkubowano w 37°C przez 45 min. Następnie, bakterie posiewano na
podłoże LB zestalone agarem (BioCorp; nr kat. AB03; końcowe stęż. 1,5 %) z dodatkiem
ampicyliny (BioShop; nr kat. AMP201; końcowe stęż. 100 µg/mL) w celu wyselekcjonowania
komórek, które uległy transformacji.

125 Wyselekcjonowane transformanty *E. coli* BL21 (DE3) użyto do inokulacji podłoża LB
zawierającego ampicylinę (100 µg/ml) i inkubowano w 37°C w łaźni wodnej z wytrząsaniem (225
obr./min) aż do osiągnięcia przez hodowlę gęstości $OD_{600} = 0,8$. Następnie hodowlę wirowano
3000 × g przez 10 min w 21°C. Po odrzuceniu supernatantu osad zawieszano w podłożu LB z
dodatkiem izopropylu β-D-1-tiogalaktopiranozydu (IPTG; BioShop; nr kat. IPT001; końcowe stęż
130 1mM) i inkubowano przez 16 h w temperaturze pokojowej w łaźni wodnej z wytrząsaniem (225
obr./min). Po wirowaniu hodowli przy 5000 × g przez 15 min w 4°C, supernatant odrzucano, a

białko Cry izolowano z osadu. W tym celu osad bakteryjny zawieszano w buforze I (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH8) w objętości 9 ml buforu na każdy gram osadu. Następnie dodano 30 μ l PMSF (10 mM; Thermo Scientific nr kat. 36978), 8 μ l lizozymu (100 mg/ml; Sigma Aldrich nr kat 62970) na jeden gram osadu i inkubowano w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem (40 obr./min) przez 20-30 min. Następnie dodano 4 mg kwasu deoksycholowego (MP Biomedicals; nr kat. 0210149610) na każdy gram osadu i próbę poddano sonikacji, 4 pulsy po 10 s (częstotliwość drgań: 22 kHz, amplituda: 14 mm) z 1 min odstępami, na dezintegratorze ultradźwiękowym UD-11 Automatic. Następnie próbę wirowano przy $18000 \times g$ przez 15 min w 4°C supernatant odrzucano, osad zawieszano w schłodzonym do 4°C buforze II (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 % Triton X-100 (v/v), pH8) w objętości 8 ml przypadających na każdy gram osadu. Próby wirowano przy $18000 \times g$ przez 15 min w 4°C, a supernatant odrzucano. Osad zawieszano w solubilizacyjnym buforze III (50 mM Na₂CO₃, 10 mM ditiotritol, pH10) w objętości 3 ml przypadających na każdy gram osadu i inkubowano z wytrząsaniem (40 obr./min) przez 2 h. Po wirowaniu przy $8000 \times g$ przez 15 min w 4°C, supernatant przenoszono do nowych probówek a osad odrzucano. Następnie próbę dializowano wobec 50 mM Tris-HCl, pH 9 i filtrowano przez sączki PVDF o średnicy porów 0,22 μ m (Roth; nr kat. P666.1). Równolegle otrzymano próbę kontrolną, którą stanowił preparat uzyskany w identyczny sposób jak to opisano powyżej z wyjątkiem tego, że komórki *E. coli* BL21 (DE3) nie zawierały wektora pLATE11-Cry9_B9, a ich hodowla była prowadzona na podłożu bez dodatku ampicyliny.

W celu potwierdzenia syntezy białka Cry9_B9 wykonano rozdział elektroforetyczny białek roztworu zawierającego spodziewaną proteinę, równolegle z próbą kontrolną oraz markerem mas cząsteczkowych (ThermoFisherScientific, nr kat. 26614). Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE wykonano według procedury „SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins” opisanej w Appendix 8: Commonly Used Techniques in Molecular Cloning (Sambrook J, Russell D (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, wyd. 3. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Po analizie elektroforogramu okazało się, że w próbce badanej występuje dodatkowe białko w porównaniu do kontroli co przedawniono na rysunku na figurze 1, przy czym białko to ma masę cząsteczkową około 120 kDa.

160 Poszczególne symbole na figurze 1 oznaczają: Cry9_B9 – roztwór uzyskany z hodowli bakterii zawierających wektor pLATE11-Cry9_B9 ; K - roztwór uzyskany z hodowli próby kontrolnej; M - marker mas cząsteczkowych. Liczby wskazują masę cząsteczkową białek markera w kilodaltonach (kDa). Strzałka wskazuje prążek elektroforogramu odpowiadający białku Cry9_B9, o masie ok. 120 kDa, ustaloną na podstawie jego porównania z migracją prążków
165 odpowiadających białkom markera.

 Jedyną różnicą w procedurze otrzymania roztworu Cry9_B9 a roztworem kontrolnym był brak wektora ekspresyjnego zawierającego DNA o sekwencji 1 wg niniejszego zgłoszenia, w kontrolnych komórkach *E. coli*. Stąd wniosek, że białko Cry9_B9 jest produktem ekspresji DNA o sekwencji jak w sekwencji 1.

170

 Na podstawie sekwencji DNA (sekwencja 1 wg niniejszego zgłoszenia) ustalono strukturę pierwszorzędową (sekwencję aminokwasową) kodowanego przez nią białka Cry9_B9 przy użyciu programu MEGA6 (Tamura i wsp., 2013, *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729). Ustalona sekwencja białka Cry9_B9 składa się z 1150 aminokwasów o sekwencji 2. W dalszej
175 kolejności ustalono, że teoretyczna masa cząsteczkowa białka Cry9_B9 to ok. 127 kDa przyjmując, że jeden aminokwas ma średnią masę około 0,11 kDa. Ustalona teoretycznie masa (~127 kDa) jest zgodna z masą uzyskanego w roztworze białka (~ 120 kDa), przy czym niewielkie rozbieżności są wynikiem naturalnej niedokładności metody SDS-PAGE (Hjelmeland i Chrambach, 1981. *Electrophoresis* 2: 1-11; Sallantin, i wsp. 1990. *Electrophoresis* 11: 34-36).

180

 Sekwencję białka Cry9_B9 (sekwencja 2) oraz sekwencję DNA kodującą to białko (sekwencja 1) porównano ze wszystkimi ujawnionymi i opisanymi sekwencjami zdeponowanymi do dnia wysłania niniejszego zgłoszenia w bazie danych Genbank [Clark i wsp. 2016. *GenBank. Nucleic Acids Res.* 44, D67–D72] za pomocą programu BLAST [Altschul i wsp. 1990. *J. Mol. Biol.* 215, 403–10]. Analiza wykazała, że obie sekwencje są unikatowe i dotąd nie odnotowano
185 białka/genu o identycznej sekwencji.

 W czwartym aspekcie przedmiotem wynalazku jest zastosowanie białka Cry9_B9 w zwalczaniu owadów z rzędu Lepidoptera, w szczególności owadów z gatunku *Cydia pomonella* w

ilości białka Cry9_B9 nie mniejszej niż 10 ng/cm² powierzchni organów roślin narażonych na żerowanie szkodników.

190

TESTY BIOLOGICZNE

Aktywność białek Cry9_B9 określano wobec larw *Cydia pomonella* w stadium L1. Gąsienice *C. pomonella* pochodziły ze standaryzowanej hodowli laboratoryjnej owada prowadzonej w Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. 195 Adama Mickiewicza w Poznaniu. Zarówno hodowlę owadów jak i testy aktywności biologicznej prowadzono na pożywce hodowlanej o składzie według O'Callaghan i wsp., 2012 [O'Callaghan, M., Glare, T.R., Lacey, L.A., 2012. Bioassay of bacterial entomopathogens against insect larvae, in: Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. pp. 101–127].

W testach biologicznych upłynnioną pożywkę tuż przed zestaleniem wylewano do 200 zamkniętych pojedynczych, polistyrenowych studzienek ze swobodnym dostępem powietrza. Wykonano 8 rozcieńczeń preparatu owadobójczego zawierającego badane białko. Każde z rozcieńczeń preparatu nanoszono na pożywkę w 12 studzienkach. W efekcie stężenie białka Cry9_B9 na pożywce w danej serii studzienek wynosiło od 0,01 ng/cm² do 500 ng/cm² (Tabela 2.). Jako kontrolę na pożywkę podawano białka 205 wyizolowane z komórek *E. coli* BL21 (DE3) nie wytwarzających białka Cry9_B9, o łącznym stężeniu 500 ng/cm². Po wyschnięciu preparatu do każdej studzienki z pożywką wkładano jedną larwę. Próby badane jak i próbę kontrolną prowadzono równolegle w identycznych warunkach. Owady inkubowano w 26°C, przy wilgotności względnej powietrza 40-60%, i fotoperiodzie 16 : 8 (światło : ciemność). Liczbę martwych larw 210 owadów określano w 14 dniu po podaniu preparatów. Test biologiczny wykonano w trzykrotnym powtórzeniu, co łącznie dało 36 larw na każde stężenie białka.. Na podstawie śmiertelności owadów wywołanej ekspozycją na różne stężenia danego preparatu owadobójczego obliczono metodą probitową wartość LC₅₀ z wykorzystaniem programu BioStat 2009 Professional

5.8.4 (AnalystSoft). W tabeli 2 przedstawiono uzyskane wyniki śmiertelności larw *Cydia*

215 *pomonella* po 14 dniach ekspozycji na białko Cry9_B9.

Tabela 2

Białko	Stężenie (ng/cm ²)	Liczba larw			Śmiertelność [%]	LC ₅₀
		żywe	martwe	razem		
Cry9_B9	500	0	36	36	100,0%	0,3
	100	3	33	36	91,7%	
	50	6	30	36	83,3%	
	10	8	28	36	77,8%	
	5	9	27	36	75,0%	
	0,5	16	20	36	55,6%	
	0,05	20	16	36	44,4%	
	0,01	31	5	36	13,9%	
kontrola (natywne białko <i>E.</i> <i>coli</i> BL21 (DE3))	500	36	0	36	0,0%	-